

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2025

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 XỐP TÍCH HỢP
VI SINH VẬT VÀ MANG HẠT QUANG XÚC TÁC NHẪM
XỬ LÝ MÔI TRƯỜNG NƯỚC NUÔI TÔM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

TS. Hoàng Phương Hà PGS.TS. Hà Phương Thư

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan 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*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 14 tháng 8 năm 2025

Tác giả luận án
(Ký và ghi rõ họ tên)

Nguyễn Thị Minh

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất đến tập thể giảng viên hướng dẫn, TS. Hoàng Phương Hà và PGS.TS. Hà Phương Thư đã tận tình hướng dẫn, hỗ trợ và định hướng cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp tại Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ sinh học đã hỗ trợ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện thí nghiệm và đóng góp các ý kiến về chuyên môn để tôi có thể hoàn thiện và bảo vệ Luận án.

Xin cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo, Quản lý Khoa học và Hợp tác quốc tế của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ tôi hoàn thành các học phần của luận án và mọi thủ tục cần thiết khác trong quá trình thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, người thân đã luôn động viên và giúp đỡ trong suốt quá trình thực hiện Luận án.

Hà Nội, ngày 14 tháng 8 năm 2025

Tác giả luận án
(Ký và ghi rõ họ tên)



Nguyễn Thị Minh

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	i
DANH MỤC BẢNG.....	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	iii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Vấn đề ô nhiễm môi trường hình thành từ quá trình nuôi thủy sản	4
1.1.1. Ô nhiễm hợp chất hữu cơ.....	4
1.1.2. Ô nhiễm các hợp chất nitơ vô cơ	5
1.1.3. Sự lây lan của dịch bệnh	7
1.1.4. Tồn dư kháng sinh.....	7
1.2. Các phương pháp xử lý nước bị ô nhiễm trong nuôi thủy sản	10
1.2.1. Sử dụng công nghệ màng lọc	10
1.2.2. Sử dụng công nghệ vật liệu hấp phụ	11
1.2.3. Sử dụng công nghệ oxy hóa điện hóa	11
1.2.4. Sử dụng công nghệ quang xúc tác	12
1.2.5. Sử dụng công nghệ nitrat hóa – khử nitrat trong xử lý các hợp chất nitơ vô cơ.....	16
1.3. Định hướng tích hợp chất quang xúc tác và vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên chất mang để nâng cao hiệu quả xử lý môi trường nuôi thủy sản ô nhiễm	18
1.4. Các loại chất mang phổ biến dùng trong xử lý ô nhiễm nguồn nước	21
1.4.1. Vật liệu mang nhân tạo	21
1.4.2. Vật liệu mang có nguồn gốc từ phụ phẩm nông nghiệp	22
1.4.3. Vật liệu mang có nguồn gốc từ polymer tự nhiên	23
1.5. Cải tiến vật liệu nhằm làm tăng hiệu quả tích hợp của vi khuẩn và chất quang xúc tác	24
1.5.1. Thay đổi về điện tích bề mặt	24
1.5.2. Thay đổi độ nhám bề mặt.....	25
1.5.3. Thay đổi tính chất lý hóa bề mặt.....	26
1.5.4. Xử lý nhiệt và tạo vật liệu composite tổng hợp.....	27
1.6. Ứng dụng của vật liệu đất sét trong xử lý môi trường ô nhiễm	27
1.7. Phương pháp tích hợp chất quang xúc tác/vi khuẩn trên vật liệu mang.....	29
1.7.1. Phương pháp tích hợp chất quang xúc tác/vi khuẩn trên vật liệu mang	29
1.7.2. Phương pháp tích hợp vi khuẩn trên vật liệu mang.....	31
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	34

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	34
2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất chế tạo vật liệu	34
2.1.2. Chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy.....	34
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.2.1. Phương pháp chế tạo vật liệu hạt EC và EC biến đổi	36
2.2.2. Phương pháp tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag.....	37
2.2.3. Tích hợp vật liệu nano TiO_2 -Ag trên chất mang EC.....	38
2.2.4. Đánh giá khả năng xử lý ô nhiễm của vật liệu nano TiO_2 -Ag/EC.....	39
2.2.5. Nhóm phương pháp lựa chọn các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitơ phù hợp để tích hợp trên vật liệu EC	43
2.2.6. Phương pháp tích hợp các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu	45
2.2.7. Đánh giá khả năng chuyển hóa amoni, nitrit của vật liệu đã tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ	45
2.2.8. Phương pháp thử nghiệm tích hợp vi khuẩn khử nitrat trên TiO_2 -Ag/EC	46
2.2.9. Phương pháp hóa học	47
2.2.10. Phương pháp xử lý thống kê	49
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	50
3.1. Chế tạo vật liệu EC (Expanded clay) và EC cải tiến	50
3.1.1. Chế tạo vật liệu EC	50
3.1.2. Cải tiến vật liệu EC tích hợp các dưỡng chất dưới dạng nano (EC_Alg_N)	51
3.2.1. Chế tạo dưỡng chất nano nhằm tích hợp trên vật liệu EC	52
3.2.2. Tích hợp dưỡng chất nano lên EC	54
3.2. Tích hợp TiO_2-Ag trên EC và đánh giá hoạt tính vật liệu.....	55
3.2.1. Tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag.....	55
3.2.2. Tối ưu quá trình tích hợp TiO_2 -Ag trên EC	58
3.2.3. Đánh giá khả năng ứng dụng xử lý môi trường của vật liệu TiO_2 -Ag/EC	61
3.3. Tích hợp các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên EC_Alg_N và đánh giá hoạt tính của vật liệu.....	77
3.3.1. Lựa chọn các chủng vi khuẩn khử nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí để tích hợp trên EC_Alg_N	77
3.3.3. Đánh giá khả năng xử lý amoni, nitrit của EC_Alg_N tích hợp vi khuẩn	88

3.4. Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$	94
3.4.1. <i>Đánh giá ảnh hưởng của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến vi khuẩn khử nitrit.</i>	95
3.4.2. <i>Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$</i>	98
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	101
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	103
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	104

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Các chữ viết tắt	Tiếng anh	Tiếng việt
BET	Brunauer-Emmett-Teller	Diện tích bề mặt riêng của vật liệu
BSM	Basal salt medium	Môi trường muối cơ bản
COD	Chemical oxygen demand	Nhu cầu oxy hóa học
DLS	Dynamic light scattering	Tán xạ ánh sáng động
EC	Expanded clay	Hạt đất sét giãn nở
EDX	Energy-dispersive X-ray	Phổ tán xạ năng lượng tia X
EO	Electrochemical oxidation	Quá trình oxy hóa điện hóa
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
FTIR	Fourier-transform infrared	Hồng ngoại biến đổi Fourier
OTC	Oxytetracycline	Kháng sinh tetracycline
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectroscopy	Hệ thống khối phổ plasma cảm ứng
RIF	Rifampicin	Kháng sinh Rifampicin
ROS	Reactive oxygen species	Gốc oxy hóa tự do
TEM	Transmission electron microscopy	Hiển vi điện tử truyền qua
TET	Tetracycline	Kháng sinh tetracycline
UV-Vis	Ultra Violet- Visible	Tử ngoại-Khả kiến
XRD	X-Ray Diffraction	Nhiều xạ tia X

DANH MỤC BẢNG

Số bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1	Sự thay đổi của các yếu tố môi trường ở hồ nuôi tôm sú tại huyện Cần Giờ [8]	5
Bảng 1.2	Đặc tính vật lý của vật liệu EC [141]	28
Bảng 3.1	Thành phần nguyên tố bề mặt của EC nguyên bản và EC cải tiến tích hợp dưỡng chất nano (EC_Alg_N)	55
Bảng 3.2	Phân bố kích thước, thế zeta và nồng độ các thành phần của vật liệu TiO ₂ , Ag và TiO ₂ -Ag	58
Bảng 3.3	Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch TiO ₂ -Ag ban đầu và thời gian tích hợp đến hàm lượng Ti, Ag tích hợp trên chất mang EC	60
Bảng 3.4	So sánh hiệu suất tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh của vật liệu TiO ₂ -Ag/EC với vật liệu quang xúc tác tổng hợp trong nghiên cứu khác	63
Bảng 3.5	Hằng số tốc độ phản ứng (k) và giá trị R ² của quá trình phân hủy kháng sinh sử dụng vật liệu TiO ₂ -Ag/EC dưới ánh sáng mặt trời	71
Bảng 3.6	Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn	84
Bảng 3.7	Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn ban đầu và loại vật liệu đến hiệu quả tích hợp vi khuẩn trên chất mang	86

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Số hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Sự phát sinh của các hợp chất nitơ vô cơ trong hồ nuôi thủy sản	6
Hình 1.2	Cấu trúc hóa học của Tetracycline (A) và Oxytetracycline (B) [26].	8
Hình 1.3	Cấu trúc hóa học của kháng sinh Rifampicin [31].	9
Hình 1.4	Mô tả quá trình tắc nghẽn màng lọc sinh học: (a) Lỗ màng bị bít kín bởi bùn hoạt tính, (b) Hình thành lớp gel nhầy trên màng lọc, (c) Sự dày lên của lớp màng bám dính trên bề mặt màng lọc [40].	10
Hình 1.5	Ảnh minh họa về quá trình quang xúc tác của TiO_2 [47].	13
Hình 1.6	Ảnh minh họa quá trình quang xúc tác của vật liệu TiO_2 -Ag khi được kích thích bởi ánh sáng vùng khả kiến [52].	14
Hình 1.7	Sơ đồ mô tả cơ chế xử lý ô nhiễm của vật liệu đồng tích hợp chất quang xúc tác và vi sinh vật [88].	20
Hình 1.8	Sơ đồ mô tả quá trình tích hợp của chất quang xúc tác $\text{Bi}_{24}\text{O}_{31}\text{Br}_{10}$ và bùn hoạt tính trên chất mang xơ mướp [106].	23
Hình 1.9	Ảnh hưởng của độ nhám bề mặt lên khả năng tích hợp của tế bào vi khuẩn lên vật liệu [123].	25
Hình 1.10	Quá trình tích hợp chất quang xúc tác TiO_2 lên bề mặt điện cực [134]	29
Hình 1.11	Tổng hợp và tích hợp chất quang xúc tác lên bề mặt vật liệu thông qua phương pháp sol-gel [137]	30
Hình 1.12	Mô tả các phương pháp tích hợp vi khuẩn trên vật liệu mang [141]	32
Hình 2.1	Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu trong đề tài	35
Hình 2.2	Sơ đồ thí chế tạo vật liệu EC	36
Hình 2.3	Minh họa quá trình tổng hợp dung dịch dinh dưỡng dưới dạng nano	37
Hình 2.4	Sơ đồ tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag	38
Hình 2.5	Sơ đồ thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của vật liệu TiO_2 -Ag/EC	40

Hình 2.6	Sơ đồ thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy kháng sinh của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$	40
Hình 2.7	Sơ đồ thí nghiệm kiểm tra ảnh hưởng của dung dịch kháng sinh sau khi phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến sinh trưởng của vi khuẩn	41
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).	50
Hình 3.2	Phổ FT-IR của alginate, dung dịch dinh dưỡng thông thường, và dung dịch dinh dưỡng nano (a); ảnh FESEM (b); phân bố kích thước (c), thế Zeta (d) và hình ảnh mô phỏng cấu trúc của các hạt dinh dưỡng nano trong dung dịch alginate.	53
Hình 3.3	Đặc trưng vật liệu EC cải tiến: Ảnh hiển vi điện tử (SEM) bề mặt ngoài (a); cấu trúc bên trong (b) của vật liệu; hạt dinh dưỡng nano tích hợp trên vật liệu (c); phổ EDX thể hiện thành phần nguyên tố bề mặt vật liệu EC cải tiến (EC_Alg_N) (d).	54
Hình 3.4	Ảnh kính hiển vi điện tử FESEM của TiO_2 (a), Ag (b), $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (c) và ảnh TEM của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.	56
Hình 3.5	Phổ FTIR (a), nhiễu xạ tia X (b) và phổ hấp phụ UV-Vis (c) của các vật liệu quang xúc tác TiO_2 và $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.	56
Hình 3.6	Sơ đồ mô tả quá trình thích hợp vật liệu quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên chất mang EC để tạo thành vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.	59
Hình 3.7	Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sử dụng đến hiệu quả tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên vật liệu EC.	60
Hình 3.8	Ảnh FESEM hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đã tích hợp trên vật liệu EC ở các độ phóng đại 5k (a), 10k (b) và 25k (c).	61
Hình 3.9	Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh <i>V. harveyi</i> VTCC 70222 (a), <i>V. parahaemolyticus</i> VTCC 910192 (b), <i>E. coli</i> ATCC 25922 (c) của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và hiệu suất diệt khuẩn tương ứng của chúng (d).	62
Hình 3.10	Cấu trúc phân tử và các giá trị pKa của kháng sinh Tetracycline và Oxytetracycline [209].	66

Hình 3.11	Hiệu suất quang xúc tác phân hủy Tetracycline (TET) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (Đường màu vàng) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (Đường màu xanh) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.	67
Hình 3.12	Hiệu suất phân hủy Oxytetracycline (OTC) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (đường màu cam) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (đường màu xanh) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.	67
Hình 3.13	Hiệu suất phân hủy Rifampicin (RIF) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (đường màu đỏ) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (đường màu đen) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.	68
Hình 3.14	Sự thay đổi màu sắc của kháng sinh RIF (10 ppm, pH7) khi phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.	68
Hình 3.15	Sự phân hủy của các hợp chất kháng sinh thông qua quá trình quang phân (photolysis) và quang xúc tác (photocatalytic) [213].	69
Hình 3.16	Động học quá trình phân hủy TET (a), OTC (b), RIF (c) với nồng độ ban đầu 20 ppm ở các pH khác nhau sử dụng vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ dưới ánh sáng mặt trời; so sánh hằng số tốc độ phản ứng (k) của ba loại kháng sinh ở pH 9 (d).	70
Hình 3.17	Ảnh hưởng của các dung dịch kháng sinh gốc (TET, OTC và RIF); kháng sinh được quang phân trực tiếp bởi ánh sáng mặt trời (TET_{EC} , OTC_{EC} và RIF_{EC}) và kháng sinh được quang xúc tác phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (TET_{TA} , OTC_{TA} và RIF_{TA}) đến sinh trưởng (thể hiện qua giá trị OD600 sau 24 giờ nuôi khuẩn).	72
Hình 3.18	Ảnh hưởng của các nồng độ COD ban đầu khác nhau: 25 mg/L (a), 50 mg/L (b) và 100 mg/L (c) đến hiệu suất phân hủy các hợp chất hữu cơ của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.	74
Hình 3.19	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 phân hủy hợp chất hữu cơ.	76

Hình 3.20	Cơ chế hình thành amonia từ hợp chất n-Pentylamine khi bị quang phân hủy bởi TiO_2 [227].	77
Hình 3.21	Sự hình thành hợp chất nitơ dạng khí trong quá trình khử nitrat của các chủng vi khuẩn thử nghiệm trong điều kiện thiếu khí.	79
Hình 3.22	Hoạt tính khử nitrat/nitrit của các chủng vi khuẩn trong điều kiện yếm khí (a, b) và hiếu khí (c, d).	79
Hình 3.23	Hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn ST20 (a, b); ST26 (c, d).	81
Hình 3.24	Cây phát chủng loại của vi khuẩn ST20 và ST26	81
Hình 3.25	Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (a), nhiệt độ (b) và nguồn cacbon sử dụng (c) đến hiệu suất loại bỏ nitrit của ST20 và ST26.	82
Hình 3.26	Khả năng đối kháng với nhau của vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat.	84
Hình 3.27	Ảnh FESEM của tế bào vi khuẩn chuyển hóa nitơ khi tích hợp trên vật liệu EC (a), EC_Alge (b) và EC_Alge_N (c). Mũi tên màu xanh và màu đỏ lần lượt biểu thị vị trí của các tế bào vi khuẩn và thành phần dưỡng chất dưới dạng nano trên vật liệu.	87
Hình 3.28	Khả năng chuyển hóa nitơ của vi khuẩn tích hợp trên vật liệu khi bổ sung các nồng độ nitơ ban đầu khác nhau: 10 mg-N/L (a), 30 mg-N/L (b), 40 mg-N/L (c), và 60 mg-N/L (d).	89
Hình 3.29	Khả năng chuyển hóa nitơ trong sáu chu kỳ lặp lại	91
Hình 3.30	Ảnh chụp kính hiển vi điện tử SEM bề mặt chất mang EC_Alge_N không có vi khuẩn (a), tế bào vi khuẩn khi tích hợp trên chất mang EC (b, c). Mũi tên màu xanh hướng đến tế bào vi khuẩn.	92
Hình 3.31	So sánh khả năng xử lý amoni, nitrit trong mô hình 50 lít của vi khuẩn chuyển hóa nitơ dạng tự do (đường nét liền) và vi khuẩn tích hợp vật liệu EC_Alge_N (đường nét đứt) (tỷ lệ bổ sung 1% w/v), $[\text{N}] = [\text{N-NH}_4^+] + [\text{N-NO}_2^-]$.	93
Hình 3.32	Tác dụng diệt khuẩn của vật liệu EC chứa chất quang xúc tác TiO_2 -Ag đến vi khuẩn gây bệnh <i>V. parahaemolyticus</i>	96

	VTCC 910192 (a), vi khuẩn khử nitrit <i>Bacillus</i> sp. ST20 (b) và <i>Bacillus</i> sp. ST26 (c). Mẫu đối chứng là dung dịch vi khuẩn không bị xử lý với vật liệu quang xúc tác.	
Hình 3.33	Tỷ lệ sống của vi khuẩn gây bệnh <i>V. parahaemolyticus</i> VTCC 910192 và các chủng vi khuẩn khử nitrit <i>Bacillus</i> sp. ST20, ST26 khi bị xử lý bởi các loại chất mang khác nhau chứa chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.	97
Hình 3.34	Ảnh nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> VTCC 910192 (a), <i>Bacillus</i> sp. ST20 (b), <i>Bacillus</i> sp. ST26 (c) và khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn này (d).	97
Hình 3.35	Ảnh hiển vi điện tử FESEM (a, b) của vi khuẩn khử nitrit khi tích hợp trên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})_x/\text{EC}$; 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.	99
Hình 3.36	So sánh hoạt tính ức chế vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> VTCC 910192 của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{EC}$ (b) và vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{EC}$ tích hợp vi khuẩn khử nitrit (c). Mẫu đối chứng âm (a) gồm dịch vi khuẩn không bổ sung vật liệu.	100

MỞ ĐẦU

Hiện nay, nuôi trồng thủy sản được coi là ngành kinh tế mũi nhọn của nhiều quốc gia, trong đó có Việt Nam. Chất lượng nước là yếu tố quan trọng hàng đầu trong quá trình nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là nuôi thâm canh tôm bởi nó có ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe của động vật thủy sinh. 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.

Đã có nhiều phương pháp vật lý, hóa học được sử dụng trong xử lý nước nuôi thủy sản bị ô nhiễm. Tuy nhiên, vẫn còn những hạn chế về nguy cơ gây ô nhiễm thứ cấp, bởi các chất ô nhiễm thường chỉ được hấp phụ, lọc hay kết tủa để loại ra khỏi môi trường ban đầu nhưng chưa được khoáng hóa phân hủy hoàn toàn hoặc chuyển hóa thành các chất ít độc hại khác. Một số phương pháp sinh học vẫn thường được áp dụng, mặc dù không gây ô nhiễm thứ cấp nhưng nếu không có công nghệ phù hợp đi kèm thì hiệu quả xử lý còn chậm và chưa triệt để.

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, cacbon dioxit (CO_2) 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. Mặt khác, TiO_2 cần được kích thích bởi ánh sáng cực tím để thể hiện khả năng quang xúc tác, vùng ánh sáng 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 có thể 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. Yêu cầu đối với vật liệu ngoài việc có 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 cần được bổ sung thêm các thành phần dưỡng chất 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***”.

1. Mục tiêu nghiên cứu:

Chế tạo được vật liệu xốp mang hạt xúc tác quang $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và vật liệu xốp tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ 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.

2. Nội dung nghiên cứu:

- Chế tạo vật liệu 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 $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

3. Những đóng góp mới của luận án

- Đã chế tạo được vật liệu hạt 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 $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 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 $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 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.

- 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.

- Tích hợp thành công vật liệu EC mang hạt quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 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.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Vấn đề ô nhiễm môi trường hình thành từ quá trình nuôi thủy sản

Để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về thực phẩm thủy sản, kể từ năm 1980, ngành nuôi trồng thủy sản đã không ngừng được mở rộng và dần trở thành ngành sản xuất thực phẩm phát triển nhanh nhất thế giới. Trong đó, tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* là một trong những loài tôm được nuôi phổ biến vì thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng chịu mặn và nhiệt độ thấp tốt, có thể nuôi ở mật độ cao [1]. Tuy nhiên, chính sự phát triển ồ ạt của các mô hình nuôi tôm thâm canh mật độ cao này đã kéo theo nhiều hệ lụy về ô nhiễm môi trường.

1.1.1. Ô nhiễm hợp chất hữu cơ

Hiện nay, hầu hết hoạt động nuôi thủy sản được diễn ra ở các nước đang phát triển, với sản lượng chính từ các hệ thống bán thâm canh và thâm canh. Các quốc gia ở Châu Á (83,4% sản lượng) và Châu Mỹ Latinh (16,3%) chiếm phần lớn sản lượng tôm. Năm 2020, tôm thẻ chân trắng (Pacific white leg shrimp) được đánh giá là loài tôm được nuôi trồng phổ biến nhất với tổng sản lượng đạt 5,8 triệu tấn, chiếm khoảng 61% tổng sản lượng tôm nuôi trên thế giới [2]. Mô hình nuôi tôm thâm canh cho phép tăng mật độ con giống trong khi giảm diện tích đất cần sử dụng, tiết kiệm nhân công, giảm chi phí sản xuất và cải thiện hiệu quả kinh tế. Tuy nhiên, để đạt được năng suất thu hoạch cao, các đầm ao nuôi thủy sản cần được cung cấp một lượng lớn thức ăn công nghiệp. Theo ước tính của FAO, năm 2019 khối lượng thức ăn được sản xuất cho tôm lên đến 9 triệu tấn, chiếm 16% tổng lượng thức ăn nuôi thủy sản toàn cầu [3]. Thành phần dinh dưỡng trong loại thức ăn này gồm 33 – 45% protein, nhưng chỉ 24 – 37% hàm lượng N và 13 – 28% hàm lượng P trong đó được tôm sử dụng để chuyển hóa hỗ trợ cho sinh trưởng, phần còn lại trở thành thức ăn dư thừa tồn tại trong môi trường nước và lắng đọng xuống đáy hồ nuôi [4]. Theo khảo sát của Phạm Thi Anh *et al.* (2010) ở hồ nuôi tôm nước lợ thuộc huyện Cần Giờ, Việt Nam cho thấy giá trị COD trong nước có thể tăng nhanh từ 68 mg/L lên 132 mg/L lần lượt tại thời điểm sau 1 và 4 tháng thả giống (Bảng 1.1).

Các chất thải hữu cơ khi tích tụ với lượng lớn và trong thời gian dài, có thể bị phân hủy bởi hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn hiếu khí, tạo ra nhiều hợp chất nitơ vô cơ độc hại như amoni, nitrit, đồng thời dẫn đến tình trạng thiếu hụt oxy hòa tan trong nước. Các phản ứng khử sulfat diễn ra trong điều kiện yếm khí đã hình thành khí độc H_2S gây ức chế quá trình nitrat hóa và khử nitrat sinh học, từ đó khiến lượng amoni, nitrit hình thành trong môi trường ngày càng gia tăng dẫn đến ô nhiễm hệ sinh thái [5]. Bên cạnh đó, chất lượng nước suy giảm cũng tạo điều kiện cho sự lây lan của dịch bệnh, làm giảm tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống của vật nuôi. Nghiên cứu

của Atlas *et al.* (1991) và Sung *et al.* (1999) đã chỉ ra rằng sự tồn tại của các hợp chất ô nhiễm như NO_2^- , NO_3^- và PO_4^{3-} kích thích sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* spp. [6], [7]. Đây là lý do khiến nhiều loại kháng sinh được sử dụng để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh và cải thiện sản lượng nuôi thủy sản. Mặc dù vậy, trong những năm gần đây với nhiều lý do khác nhau các đợt bùng phát dịch bệnh vẫn thường xuyên diễn ra gây thiệt hại lớn đến năng suất vụ nuôi.

Các phân tích trên chỉ ra rằng thức ăn thủy sản dư thừa là nguyên nhân ban đầu dẫn đến suy giảm chất lượng nước trong nuôi thủy sản, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng của động vật. Vì vậy cần có các biện pháp xử lý môi trường phù hợp để nâng cao chất lượng nước và đảm bảo năng suất nuôi trồng thủy sản.

Bảng 1.1. Sự thay đổi của các yếu tố môi trường ở hồ nuôi tôm sú tại Cần Giò [8].

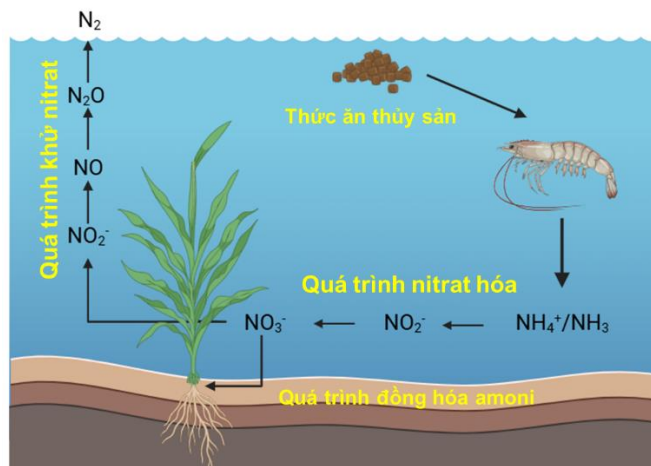
Chỉ tiêu	Đơn vị	Mức độ ô nhiễm trong hồ nuôi tôm theo thời gian			Tiêu chuẩn (TCVN 6986-2001)
		< 1 tháng	2-3 tháng	3-4 tháng	
Nhiệt độ	°C	30,5 (30-32,4)	30,8 (29,4-32,9)	30,5 (30-32,4)	Không có dữ liệu
pH		7,6 (7,2-8,4)	7,6 (7,3-8,2)	8 (7,2-9,1)	6-9
BOD ₅	mg/L	21 (8-48)	39 (15-84)	41 (22-59)	≤ 50
COD	mg/L	68 (6-106)	100 (72-120)	132 (79-246)	≤ 100
TSS	mg/L	69 (26-95)	81 (53-158)	254 (22-103)	≤ 100
Nitơ tổng số	mg/L	2,2 (0,08-3,2)	3,2 (0,1-7,6)	5,7 (1-14,8)	Không có dữ liệu
Photpho tổng số	mg/L	0,25 (0,1-0,5)	0,4 (0,1-1,0)	0,7 (0,1-1,7)	Không có dữ liệu
N-NH ₃	mg/L	0,5 (0,1-0,6)	0,8 (0,1-1,6)	0,7 (0,56-0,84)	≤ 5
DO	mg/L	6,6 (3,5-8,2)	6 (3,9-8,6)	6,6 (5,5-7,5)	≤ 4
Coliform	MPN/100 mL	4475 ($2,1 \times 10^3$ – 11×10^3)	$2,4 \times 10^3$ – 24×10^3	11×10^5 – 15×10^3	≤ 5000

1.1.2. Ô nhiễm các hợp chất nitơ vô cơ

Các hợp chất nitơ vô cơ như amoni và nitrite luôn được hình thành và tăng lên nhanh trong quá trình nuôi tôm, ngay cả khi thay nước, nếu hàm lượng vượt mức qui định cho phép sẽ là những hợp chất gây độc cho cá, động vật thân mềm, giáp xác và cực kỳ độc cho tôm.

Độc tính của amoni và nitrit đối với tôm

Các hợp chất nitơ chính tồn tại trong môi trường nước nuôi thủy sản là amoni, nitrit và nitrat (Hình 1.1). Kết quả thử nghiệm của Valencia-Castañeda *et al.* (2019) cho thấy nồng độ nitơ tổng số là 29 mg/L hay nitrit ở mức 10,6 mg/L có thể gây chết 50% số lượng tôm thả nuôi sau 96 giờ tiếp xúc [9]. Theo Shiping Yang *et al.* (2022), amoni có thể làm tăng quá trình phiên mã gen liên quan đến quá trình tự thực bào (autophagy) như ATG3, ATG4, ATG10 và ATG12; và gen điều phối tiến trình tự chết của tế bào (apoptosis) như Caspase3 và P53. Sự hoạt động của các gen này kích thích tế bào tự thu nhỏ kích thước, gây ra ly giải tế bào hay tạo ra nhiều không bào trong tế bào và cuối cùng dẫn đến các tổn thương lớn trong gan tụy của tôm [10]. Do vậy, nếu hàm lượng NH_3 tăng cao sẽ gây suy giảm miễn dịch từ đó làm tăng tỷ lệ tử vong và dẫn đến tôm chết hàng loạt khi bị lây nhiễm vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio alginolyticus*.



Hình 1.1. Sự phát sinh của các hợp chất nitơ vô cơ trong hồ nuôi thủy sản

Nitrit thường được tạo thành bởi quá trình nitrat hóa và bước đầu của quá trình khử nitrat, nếu nitrit được hình thành cùng một lúc bởi 2 quá trình này sẽ làm gia tăng đột biến rất nguy hiểm, gây độc ngay đối với ấu trùng tôm, giảm khả năng sinh trưởng. Nitrit trong nước tồn tại hai dạng là dạng ion (NO_2^-) và dạng không ion (HNO_2), sự chuyển đổi của 2 dạng này phụ thuộc vào pH của môi trường. Nitrit được cho rằng ít độc hại hơn so với amonia, nhưng trong trường hợp phơi nhiễm lâu sẽ làm giảm sự vận chuyển oxy trong máu dẫn đến tôm bị stress, nếu hàm lượng này vẫn tích tụ và tăng dần lên trong quá trình nuôi, tôm có thể bị yếu dần và chết. Đối với tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei*, giá trị LC_{50} sau 7,2 giờ của nitrit chỉ ở mức 8,3 mg/L ở nồng độ muối NaCl 1 g/L [11].

Nitrat được hình thành bởi quá trình oxy hóa nitrit trong các đầm nuôi và được coi là tương đối ít độc hại đối với tôm, cá. Đối với nuôi cá, nồng độ nitrat 50 mg N/L thường được chấp nhận là giới hạn an toàn cho vật nuôi [12], tuy nhiên ở môi trường

nước mặn, nồng độ nitrat cần dưới 20 mg/L [13]. Khi nồng độ nitrat tăng cao có thể làm chậm sự tăng trưởng và phát triển, tăng khả năng mắc bệnh, gây ra khả năng sinh sản thấp và giảm tỷ lệ sống cho vật nuôi. Mức độ độc của nitrat thay đổi tùy thuộc vào loại động vật thủy sản. Wickins et al. (1976) cho thấy nhiều loại tôm he có giá trị LC₅₀ đối với nitrat sau 48 giờ là 3400 mg/L [14], nhưng Muir *et al.* (1991) lại chỉ ra tỷ lệ sống của tôm *P. monodon zoea* có thể bị ảnh hưởng ngay ở nồng độ nitrat là 0,225 mgN/L (tương đương với 1 mg/L nitrat) khi tiếp xúc trong 40 giờ [15].

1.1.3. Sự lây lan của dịch bệnh

Môi trường ô nhiễm cùng với mật độ nuôi cao khiến tôm dễ bị nhiễm các bệnh như hoại tử gan tụy, đốm trắng, đầu vàng. Trong đó, nhiều nghiên cứu đã xác định rằng vi khuẩn *Vibrio* spp. là nguyên nhân chính gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND), đây là mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với người nuôi tôm. Nhiều loài tôm, chẳng hạn như *L. vannamei*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* và *Artemia franciscana*, thường dễ nhiễm AHPND ngay từ giai đoạn đầu ấu trùng [16]. Khi tôm nhiễm bệnh, vi khuẩn *Vibrio* spp. nhanh chóng di chuyển vào tuyến tiêu hóa và phá hỏng các tế bào gan tụy, khiến tôm có các biểu hiện lâm sàng như chán ăn, chậm phát triển và gan tụy đổi màu nhợt nhạt. Nghiên cứu của de la Peña *et al.* (2004) cho thấy, bệnh AHPND có thể dẫn đến việc tôm chết hàng loạt với tỷ lệ tử vong lên tới 100% trong vòng 30-35 ngày từ khi thả giống [17].

Bên cạnh vi khuẩn *Vibrio* sp., *Escherichia coli* cũng là một loài vi khuẩn Gram âm, gây bệnh ở nhiều loài động vật thủy sinh và thường được tìm thấy trong đường ruột của các loài động vật máu nóng. Khi nguồn nước bị ô nhiễm bởi chất thải của những động vật này, *E. coli* có thể lây nhiễm sang vật nuôi thủy sản như tôm [18]. Tiêu thụ các thực phẩm nhiễm khuẩn gây ra triệu chứng đau bụng, tiêu chảy, buồn nôn và sốt cho con người. Vì vậy một số quốc gia nhập khẩu hiện nay đã đưa ra nhiều quy định nghiêm ngặt hạn chế nhập khẩu các lô hàng thủy sản nếu chúng bị phát hiện chứa *E. coli* [19].

Theo các Tiêu chuẩn Quốc gia (TCVN) số 13656:2023 và 13951:2024 qui định về chất lượng nước trong nuôi trồng thủy sản, mật độ *Vibrio* tổng số và *E. coli* cần ở dưới mức lần lượt là 10³ CFU/mL và 1000 MPN/100 mL [20], [21]. Vì vậy các biện pháp ức chế hoặc tiêu diệt có hiệu quả nhóm vi khuẩn gây bệnh này cần được nghiên cứu áp dụng để ngăn chặn sự phát triển của chúng trong môi trường nuôi thủy sản, đảm bảo an toàn và nâng cao năng suất vụ nuôi.

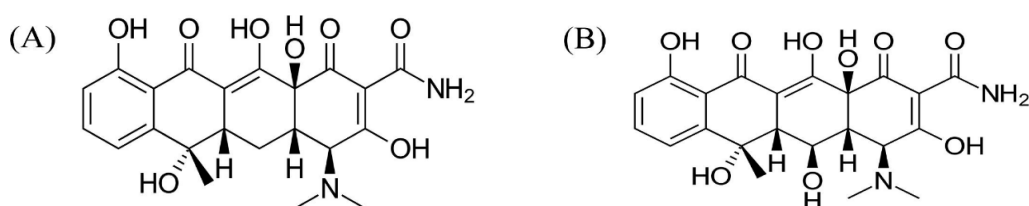
1.1.4. Tồn dư kháng sinh

Kháng sinh được đưa vào sử dụng lần đầu tiên từ những năm 1910, kể từ đó đến nay, nhiều loại kháng sinh đã được phát triển thành công và ngày càng được áp

dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong hoạt động nuôi thủy sản. Khảo sát của Dang *et al.* (2015) tại vùng Đồng bằng sông Cửu Long và Đồng bằng sông Hồng tại Việt Nam vào năm 2011 cho thấy có đến 72% các trang trại nuôi cá và tôm sử dụng ít nhất một loại kháng sinh để điều trị bệnh và kích thích sinh trưởng [22]. Kháng sinh có thể được bổ sung cho vật nuôi cùng với thức ăn, do đó nếu lượng kháng sinh không được hấp thụ hết sẽ tích tụ trong cơ thể vật nuôi hoặc được bài tiết đi vào môi trường nước [23]. Dựa vào cấu trúc hóa học và cơ chế hoạt động có thể phân loại kháng sinh dùng trong nuôi thủy sản thành các nhóm chính gồm: macrolide, β -lactam, sulfonamid, tetracycline, quinolone và các loại khác [24].

Trong đó:

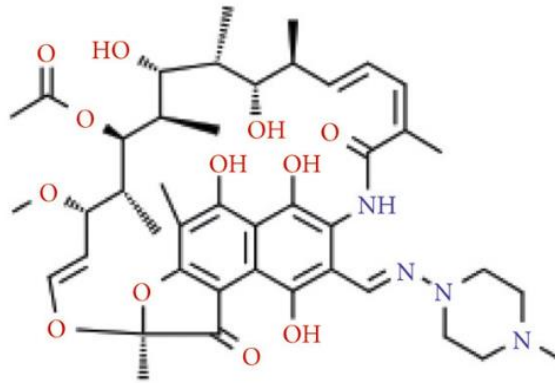
Tetracycline (TC): được phân lập lần đầu tiên từ nấm men *Streptomyces*, đây là một trong những nhóm kháng sinh được dùng phổ biến nhất trong nuôi thủy sản. TC có tác dụng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh bằng cách liên kết với tiểu đơn vị 30S của ribosome, từ đó ngăn cản sự tổng hợp protein của tế bào vi khuẩn. So với penicillin thì TC có phổ kháng khuẩn rộng hơn bởi chúng có tác dụng đối với cả vi khuẩn Gram âm [25]. Dựa trên bản chất, liều lượng và thời gian đào thải nhóm TC có thể được chia thành ba loại kháng sinh gồm: oxytetracycline (OTC), chlortetracycline và tetracycline. Cấu trúc phân tử cơ bản của tetracycline gồm hệ bốn vòng hydrocacbon thơm nối liền (ký hiệu là vòng A, B, C và D) và liên kết với nhiều nhóm chức như hydroxyl (OH^-), methyl (CH_3^+), keto (R-CO-R') và dimethylamino. Về mặt cấu trúc, oxytetracycline có bộ khung phân tử tương tự như tetracycline, tuy nhiên có thêm sự hiện diện của nhóm thế $-\text{OH}$ tại vị trí C5 của vòng B (Hình 1.2).



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của Tetracycline (A) và Oxytetracycline (B) [26].

Rifamycin: là nhóm kháng sinh bán tổng hợp có phổ kháng khuẩn rộng. Hai loại kháng sinh thuộc nhóm rifamycin thường được sử dụng nhất trong nuôi thủy sản là rifampicin và rifamycin [27]. Trong đó, Rifampicin (RIF) là một polyketide (cấu trúc dạng chuỗi chứa các nhóm $(>\text{C}=\text{O})$ xen kẽ với nhóm $(>\text{CH}_2)$ với lõi naphthoquinone được kéo dài bởi một chuỗi ansa aliphatic (Hình 1.3). RIF tồn tại ở dạng tinh thể màu đỏ cam do có chứa nhóm tạo sắc tố naphthoquinone. Kháng sinh này có khả năng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn thông qua quá trình khuếch tán thụ động và gây ra hiện tượng ức chế hoạt động của RNA polymerase phụ thuộc DNA ở

vi khuẩn, từ đó ngăn chặn quá trình tổng hợp protein và tăng sinh của vi khuẩn. Nghiên cứu của Li *et al.* (1999) chỉ ra RIF ở nồng độ bổ sung ≤ 1 mg/L đã có tác dụng kháng lại nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh như loài *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio logei*, *Vibrio pelagius* II, *Vibrio fluvialis* và *Vibrio mediterranei* [28]. Vì vậy, rifampicin được sử dụng nhiều tại một số quốc gia đứng đầu về sản xuất thủy sản như Việt Nam, Philippines và Trung Quốc [27], [29], [30].



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của kháng sinh Rifampicin [31].

Theo thống kê của Schar *et al.* (2020) chỉ tính riêng trong hoạt động nuôi thủy sản ước tính khoảng 10,3 triệu tấn kháng sinh được tiêu thụ năm 2017, con số này dự kiến tăng lên đến 13,6 triệu vào năm 2030. Khu vực Châu Á – Thái Bình Dương chiếm đến 93,8% lượng tiêu thụ toàn cầu này. Trong đó, đối với nuôi tôm, kháng sinh được sử dụng với tỷ lệ trung bình 46 mg/kg [32]. Mặc dù đem lại hiệu quả tốt trong việc tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh, nhưng khoảng 80% lượng kháng sinh bổ sung sẽ bị đào thải ra ngoài môi trường [33]. Khi khảo sát về dư lượng của 12 loại kháng sinh trong quá trình nuôi tôm thẻ chân trắng *L. vannamei*, Li *et al.* (2021) đã phát hiện 6 loại kháng sinh bao gồm Sulfadiazine (SDZ), Sulfamethoxazole (SMX), Levofloxacin (LEOF), Tetracyclines (TC), Oxytetracycline (OTC) và Chlortetracycline (CTC) trong môi trường nước. Trong đó, OTC và SMX là hai hợp chất luôn được tìm thấy trong suốt quá trình nuôi tôm. Hàm lượng kháng sinh trong nước hồ nuôi tăng từ 33 ng/L ở giai đoạn tôm nhỏ đến 64,4 ng/L khi tôm có thể được thu hoạch. Sự tích tụ của kháng sinh trong bùn đáy ở cuối vụ nuôi cũng tăng gấp 5 lần so với mẫu bùn thu thập trước khi thả tôm. Không chỉ tồn tại trong môi trường, mẫu tôm thành phẩm từ hồ nuôi này cũng chứa dư lượng kháng sinh lên tới 134 $\mu\text{g/kg}$ [23]. Ở Việt Nam, các mô hình nuôi tôm thâm canh ngày càng được phát triển nhiều để tăng năng suất thu hoạch, nhưng trong nhiều năm gần đây lợi nhuận của người nông dân thu được từ nuôi tôm ngày càng sụt giảm do sự lây lan của dịch bệnh. Điều này dẫn đến việc lạm dụng nhiều loại kháng sinh, hóa chất diễn ra tràn lan. Nghiên

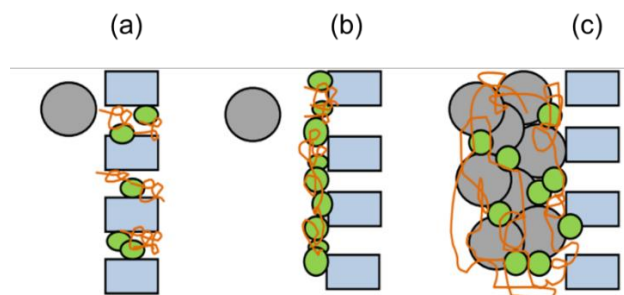
cứu ở vùng nuôi tôm phía Bắc Việt Nam cho thấy sự tồn dư lớn của một số loại kháng sinh thuộc các nhóm sulfonamides, diaminopyrimidine (trimethoprim), and macrolides [34]. Ngoài ra, hai loại kháng sinh norfloxacin và oxolinic acid thuộc nhóm quinolones cũng được phát hiện ở các vùng nuôi tôm ngập mặn [35]. Đối với hoạt động nhập khẩu thực phẩm thủy sản, Hoa Kỳ và các nước thuộc Liên minh Châu Âu (EU) đã đặt ra nhiều quy định nghiêm ngặt để loại bỏ các lô hàng thủy sản chứa dư lượng kháng sinh, tuy nhiên vấn đề này đối với thị trường nội địa Việt Nam vẫn chưa được quản lý chặt chẽ [22]. Nếu sử dụng thực phẩm có tồn dư kháng sinh trong thời gian dài có thể gây ra phản ứng dị ứng, đột biến gen, ung thư hay dị tật cho thai nhi [36], đặc biệt việc tồn dư kháng sinh trong môi trường cũng làm gia tăng sự xuất hiện của các gen kháng kháng sinh (ARG, antibiotic resistance genes), chúng có thể “truyền” từ vi khuẩn gây bệnh cho động vật thủy sản sang các loài vi khuẩn gây bệnh cho con người và động vật khác. Điều này tiềm ẩn nguy cơ xuất hiện các đợt bùng phát dịch bệnh truyền nhiễm ở quy mô lớn mà không có loại kháng sinh nào đủ hiệu quả để sử dụng điều trị.

1.2. Các phương pháp xử lý nước bị ô nhiễm trong nuôi thủy sản

Phương pháp xử lý ô nhiễm môi trường trong nuôi thủy sản có thể được chia thành nhiều loại như: phương pháp vật lý, hóa học hay sinh học dựa trên cơ chế phân tách, đồng hóa, phân hủy hay chuyển hóa chất ô nhiễm này thành chất không độc hại.

1.2.1. Sử dụng công nghệ màng lọc

Công nghệ màng lọc được dùng phổ biến để xử lý nhiều loại nước ô nhiễm khác nhau, trong đó, khi chảy qua màng lọc có kích thước lỗ nhỏ, các chất ô nhiễm kích thước lớn sẽ bị tách khỏi dòng nước [37]. Tuy nhiên, đặc điểm này khiến màng lọc không thể được áp dụng để loại bỏ các chất ô nhiễm hòa tan. Vì vậy, trong thực tế, kết hợp màng lọc vật lý này với các nhóm vi sinh vật để tạo ra màng lọc sinh học (membrane bio-reactor, MBR) nhằm tăng hiệu quả xử lý đã được nhiều nhà nghiên cứu chú ý đến.



Hình 1.4. Mô tả quá trình tắc nghẽn màng lọc sinh học: (a) Lỗ màng bị bít kín bởi bùn hoạt tính, (b) Hình thành lớp gel nhầy trên màng lọc, (c) Sự dày lên của lớp màng bám dính trên bề mặt màng lọc [38].

Sharrer *et al.* (2007) chỉ ra hệ thống MBR có thể loại bỏ lần lượt 95,5% và 96,1% hàm lượng nitơ tổng số và photpho trong nước thải [39]. Mặc dù đạt được hiệu suất cao nhưng khi vận hành liên tục, các màng lọc dễ bị tắc nghẽn và cần được làm sạch hay thay thế thường xuyên, yêu cầu này làm gia tăng đáng kể chi phí vận hành của hệ thống xử lý, khiến chúng khó được áp dụng rộng rãi (Hình 1.4) [40].

1.2.2. Sử dụng công nghệ vật liệu hấp phụ

Công nghệ vật liệu hấp phụ là phương pháp sử dụng vật liệu có bề mặt rộng xốp để hấp phụ, phân tách các chất ô nhiễm ra khỏi môi trường nước. Sự tương tác giữa loại vật liệu này và chất bị hấp thụ thường dựa vào lực Van der Waals, lực liên kết tĩnh điện hay liên kết cộng hóa trị. Vật liệu hấp phụ có thể được tái sử dụng nhiều lần, tuy nhiên trước đó cần có bước tiền xử lý với axit, bazơ hay chất tạo phức để giải hấp phụ các chất ô nhiễm đã liên kết từ bề mặt vật liệu, công đoạn này có thể gây ra ô nhiễm thứ cấp cho môi trường. Do vậy, công nghệ kết hợp vật liệu hấp phụ với vi sinh vật đã và đang được phát triển để từ đó vật liệu tích hợp tạo thành có thể hấp phụ và chuyển hóa hợp chất ô nhiễm sang dạng vô hại với môi trường, giúp xử lý triệt để hơn các chất ô nhiễm. Sự tích hợp vi khuẩn *Bacillus cereus* trên vật liệu hấp phụ than hoạt tính đã tăng hiệu quả xử lý photpho, magie và amoni lên 90,1; 95,6 và 95,7% [41]. Trong một nghiên cứu khác của Huang *et al.* (2023), vật liệu kết hợp giữa than hoạt tính với vi khuẩn *Olivibacter jilunii* xử lý được 100% hàm lượng amoni và 97,4% hàm lượng nitơ tổng số [42].

Các phân tích trên đã cho thấy sự cần thiết của việc kết hợp của phương pháp sinh học và vật lý nhằm nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm môi trường.

1.2.3. Sử dụng công nghệ oxy hóa điện hóa

Quá trình oxy hóa điện hóa (EO - Electrochemical Oxidation) là một phương pháp xử lý nước thải sử dụng dòng điện và hệ thống điện cực để loại bỏ các chất ô nhiễm, đặc biệt là các hợp chất hữu cơ khó phân hủy. Quá trình này hoạt động thông qua việc tạo ra các chất oxy hóa mạnh như gốc hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) và clo hoạt tính ($\text{Cl}\bullet$, ClO^-) tại bề mặt điện cực, giúp phân hủy các chất ô nhiễm thành các hợp chất đơn giản hơn như CO_2 , H_2O và các ion vô cơ [43].

Trong EO, vật liệu anốt đóng vai trò then chốt trong hiệu quả xử lý. Các vật liệu thường được sử dụng bao gồm: graphit, titan, rubidi, điện cực ổn định theo chiều và đặc biệt là điện cực kim cương pha tạp kim loại boron - loại có độ bền hóa học cao và khả năng tạo ra các chất oxy hóa mạnh [44].

Một số nghiên cứu đã chứng minh tính hiệu quả của công nghệ EO trong xử lý nước thải từ hệ thống nuôi trồng thủy sản nhờ các ưu điểm như: ít tạo ra chất thải thứ cấp, dễ vận hành và có thể điều khiển từ xa. Tuy nhiên, EO vẫn tồn tại một số hạn

chế, bao gồm [45]:

- Thời gian vận hành kéo dài,
- Hiệu quả thấp đối với chất rắn lơ lửng,
- Quá trình oxy hóa trực tiếp amonia trong hệ thống EO chỉ hiệu quả ở pH cao ($\text{pH} > 9$), không phù hợp với môi trường nuôi thủy sản,
- Chi phí năng lượng cao, đặc biệt khi mở rộng quy mô hệ thống.

Việc chuyển từ quy mô phòng thí nghiệm sang quy mô thương mại gặp nhiều thách thức kỹ thuật, yêu cầu thiết kế tối ưu để giải quyết các vấn đề như: độ bền của điện cực, hiện tượng bám dính sinh học (biofouling) và sự biến động của chất lượng nước đầu vào. Ngoài ra, chi phí đầu tư và vận hành cao có thể là rào cản lớn đối với các hệ thống nuôi trồng quy mô nhỏ. Công nghệ này cũng đòi hỏi phải được theo dõi và hiệu chỉnh thường xuyên để duy trì hiệu quả xử lý tối ưu.

1.2.4. Sử dụng công nghệ quang xúc tác

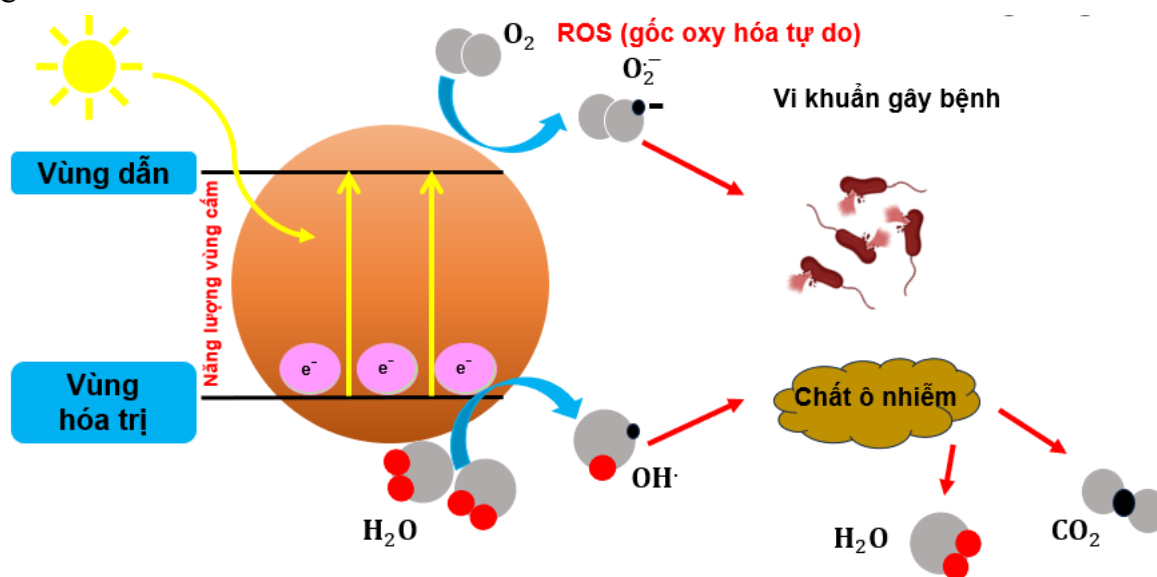
Chất quang xúc tác được biết đến có thể sử dụng để phân hủy nhiều loại hợp chất ô nhiễm dựa trên các đặc điểm riêng biệt như: (i) - khả năng sử dụng năng lượng ánh sáng để biến đổi phân tử nước hay oxy trong không khí thành các gốc oxy hóa tự do mạnh (ROS); (ii) - phản ứng chuyển hóa chất ô nhiễm có thể diễn ra ở điều kiện nhiệt độ, áp suất thường; (iii) - phân hủy hoàn toàn các chất ô nhiễm hữu cơ thành các phân tử vô cơ vô hại như CO_2 và H_2O [46].

1.2.4.1. Cơ chế quang xúc tác phân hủy chất hữu cơ và tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh

Vật liệu quang xúc tác là một loại vật liệu bán dẫn (SC, semiconductor) có đặc tính chuyển đổi năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học bằng cách hấp thụ các photon từ bức xạ vùng khả kiến hoặc cực tím. Thông thường, quá trình quang xúc tác được sử dụng để kích thích và đẩy nhanh tốc độ các phản ứng hóa học nên chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sản xuất năng lượng xanh hay xử lý môi trường.

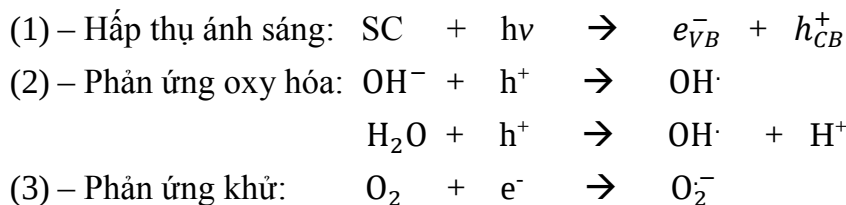
Cấu trúc chất bán dẫn được tạo thành từ vùng hóa trị (VB, Valence Band) và vùng dẫn (CB, Conduction Band). “Khoảng cách” giữa hai vùng này được gọi là năng lượng vùng cấm (eV) (Hình 1.5). Khi được chiếu sáng bởi photon có năng lượng lớn hơn giá trị eV, các điện tử (e^- - electron) trong vùng hóa trị của chất xúc tác quang bị kích thích và di chuyển lên vùng dẫn, tạo thành lỗ trống điện tích dương (h^+ - hole) trong vùng hóa trị. Tại vùng dẫn, các e^- phản ứng với phân tử oxy hòa tan trong nước để tạo thành gốc oxy hóa tự do ($\cdot\text{O}_2^-$), trong khi ở vùng hóa trị các lỗ trống phản ứng với ion hydroxyl (OH^-) hoặc phân tử nước để tạo thành các gốc hydroxyl oxy hóa tự do ($\cdot\text{OH}$). Cặp điện tử - lỗ trống cùng với các gốc oxy hóa tự do ROS nêu trên đều có khả năng oxy hóa mạnh, tấn công phá vỡ các liên kết hóa học của hầu hết các hợp

chất hữu cơ phức tạp trong nước thải và phân hủy chúng thành những hợp chất đơn giản như H_2O , CO_2 và các ion vô cơ khác.



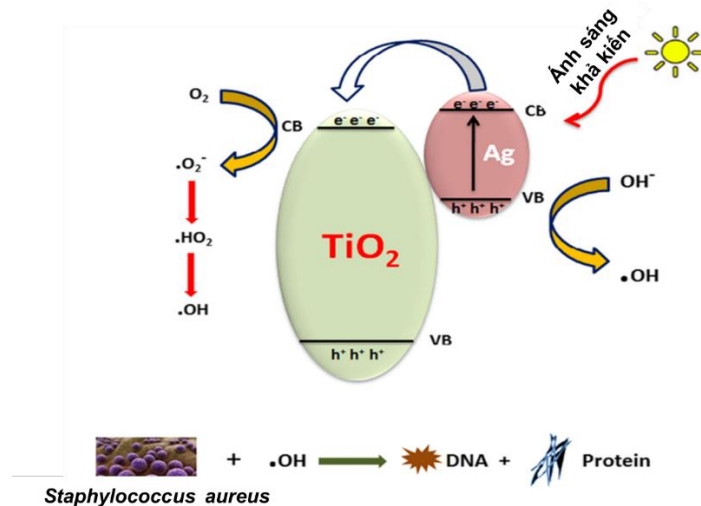
Hình 1.5. Ảnh minh họa về quá trình quang xúc tác của TiO_2 [47].

Tùy thuộc vào điều kiện thực tế của mỗi môi trường mà các lỗ trống, gốc oxy hóa tự do $\text{OH}^\cdot$, hay $\text{O}_2^\cdot$ có thể đóng vai trò chính trong cơ chế phản ứng quang xúc tác [48].



Nhiều loại vật liệu bán dẫn có thể được sử dụng cho quá trình quang xúc tác, trong đó oxit kim loại, đặc biệt là titan oxit (TiO_2) được coi là một trong những chất quang xúc tác phù hợp nhất cho quá trình xử lý nước thải. Bởi TiO_2 ổn định tốt trong khoảng pH rộng, ít độc hại, thân thiện với môi trường và có khả năng tạo ra nhiều cặp điện tử - lỗ trống. TiO_2 tồn tại ở 3 dạng thù hình là anatase, rutile và brookite. Cả rutile và anatase đều có cấu trúc tinh thể tứ phương (tetragonal crystal), trong khi brookite có cấu trúc thoi. Năng lượng vùng cấm của anatase và rutile không có sự khác biệt đáng kể với giá trị lần lượt là 3,20 eV và 3,02 eV [49]. Tuy nhiên, pha anatase thể hiện hoạt tính quang hóa mạnh hơn so với rutiles bởi chúng có khả năng “bắt giữ” các lỗ trống (hole trapping) cao hơn gần 10 lần so với pha rutile, làm tăng thời gian tồn tại tự do của các điện tử của pha anatase. Mặc dù vậy, thời gian tồn tại riêng rẽ của các cặp điện tử và lỗ trống trước khi chúng tái hợp trên bề mặt TiO_2 vẫn tương đối ngắn, làm giảm hiệu suất quang xúc tác đạt được [50]. Hơn nữa, sở hữu năng lượng vùng cấm lớn (~3,2 eV) khiến TiO_2 chỉ có thể được “kích hoạt” bởi tia

UV ($\lambda < 400$ nm). Vùng ánh sáng tử ngoại này chiếm tỷ lệ 5%, nhỏ hơn nhiều so với vùng ánh sáng khả kiến chiếm đến 45% quang phổ mặt trời [51]. Do đó, các nghiên cứu mở rộng vùng ánh sáng hấp phụ của TiO_2 sang vùng ánh sáng cần được tiến hành để khai thác được triệt để lợi thế của ánh sáng mặt trời như một nguồn năng lượng tái tạo và không tốn kém trong ứng dụng về xử lý môi trường.



Hình 1.6. Ảnh minh họa quá trình quang xúc tác của vật liệu TiO_2 -Ag khi được kích thích bởi ánh sáng vùng khả kiến [52].

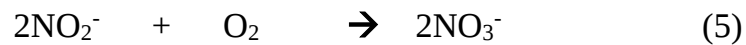
Nghiên cứu cho thấy hạt nano bạc (Ag) có phổ hấp thụ ánh sáng thuộc vùng khả kiến với bước sóng trong khoảng 400-500 nm. Đặc biệt, Ag sở hữu đặc tính kháng khuẩn cao ngay cả khi vật liệu không được chiếu sáng. Các hạt nano Ag có khả năng tương tác với các protein chứa lưu huỳnh trong thành tế bào của vi khuẩn, dẫn đến phá hỏng cấu trúc thành tế bào, từ đó làm tăng tính thấm của màng, gây ra sự rò rỉ của tế bào chất khiến tế bào chết đi [53]. Vì vậy, hạt nano bạc được gợi ý là vật liệu tiềm năng để pha tạp vào TiO_2 , không chỉ giúp làm chậm sự tái hợp của cặp electron-lỗ trống, chuyển dịch dải hấp thụ ánh sáng của vật liệu nano TiO_2 -Ag sang vùng ánh sáng khả kiến mà đồng thời còn tăng hoạt tính quang xúc tác phân hủy chất ô nhiễm và diệt khuẩn của vật liệu tổng hợp tạo thành [54] (Hình 1.6).

1.2.4.2. Hạn chế của quá trình quang xúc tác trong xử lý ô nhiễm nitơ vô cơ

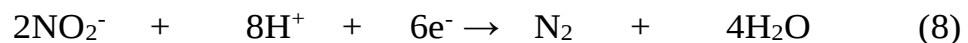
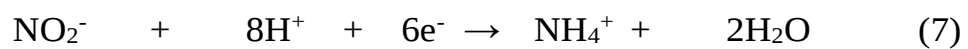
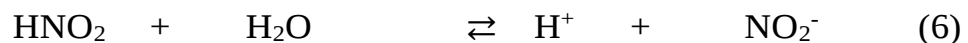
Trong nuôi thủy sản, như đã nói ở trên hàm lượng các hợp chất nitơ vô cơ luôn là ẩn số gây ô nhiễm môi trường nuôi, trong đó phải kể đến amoni và nitrit. Nồng độ amoni, nitrit tăng vượt ngưỡng không những có thể làm giảm khả năng miễn dịch, phá vỡ hệ thống nội tiết của vật nuôi thủy sản mà còn kích thích sự phát triển của các nhóm vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* [7]. Liu et al. (2009) cho thấy vật liệu quang xúc tác TiO_2 biến tính với Ce^{3+} và Ag^+ cũng có thể loại bỏ được $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ và TN với hiệu suất lần lượt là 44,8%; 45,3% và 45,1% [55]. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng hiệu suất oxi hóa amoni và loại bỏ nitrit của TiO_2 -

Ag bị chi phối mạnh bởi khả năng hấp phụ của các hợp chất nitơ này trên bề mặt chất quang xúc tác ở các pH môi trường khác nhau. Điều này có thể được giả thích chi tiết như sau:

TiO₂-Ag có giá trị pH_{pzc} đẳng điện tại 6,6, nên pH khi môi trường thấp hơn giá trị này sẽ gây ra sự proton hóa, tạo nên sự tích điện dương trên bề mặt vật liệu và ngược lại [56]. Tại pH axit, hỗn hợp NH₄⁺/NH₃ cũng tồn tại chủ yếu ở dạng ion NH₄⁺ có điện tích dương cùng dấu với bề mặt TiO₂-Ag, điều này tạo nên lực đẩy tĩnh điện làm hạn chế sự hấp phụ và oxi hóa NH₄⁺ bởi vật liệu quang xúc tác. Kết quả nghiên cứu của Shavisi *et al.* (2014) chứng minh hiệu suất quang hóa phân hủy NH₄⁺/NH₃ là không đáng kể ở pH 7,2 và chỉ đạt cực đại khi cân bằng NH₄⁺/NH₃ chuyển dịch về phía NH₃ ở môi trường có pH > 10 [57]. Mặt khác, sự chuyển hóa amoni bởi vật liệu quang xúc tác có thể dẫn đến sự hình thành của các sản phẩm nitơ vô cơ độc hại khác như NO₂⁻ và NO₃⁻ (Phương trình 1-5) [58].



Đối với nitrit, hợp chất này có giá trị pK_a là 3,3; cho thấy dung dịch có pH < pK_a sẽ khiến phản ứng số (6) đi theo chiều tạo thành HNO₂ thay vì anion NO₂⁻ [59]. Mặc dù phân tử trung tính HNO₂ có thể được hấp phụ trên bề mặt chất bán dẫn, nhưng sự tương tác sẽ yếu hơn so với các ion mang điện tích trái dấu như NO₂⁻. Vì vậy, môi trường có pH lớn hơn pK_a (3,3) nhưng nhỏ hơn pH_{pzc} (6,6) có thể làm tăng khả năng hấp phụ NO₂⁻ trên bề mặt chất xúc tác quang tích điện dương và cung cấp đủ lượng H⁺ để khử hoàn toàn NO₂⁻ thành khí N₂ [60]. Nhưng điều kiện này không phù hợp với thực tế bởi động vật thủy sản thường sinh trưởng trong môi trường có 7,8 < pH < 8,5 [61]. Bên cạnh đó, quá trình loại bỏ nitrit bằng chất xúc tác quang cũng có khả năng tạo thành sản phẩm khí N₂ hoặc hợp chất ô nhiễm NH₄⁺ [62], [63], như được trình bày trong phản ứng (7) và (8):

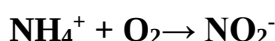


Do vậy cần có sự kế hợp của nhiều biện pháp để có thể đồng thời xử lý hiệu quả tình trạng ô nhiễm hữu cơ và nitơ trong hồ nuôi thủy sản.

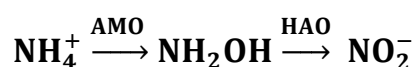
1.2.5. Sử dụng công nghệ nitrat hóa – khử nitrat trong xử lý các hợp chất nitơ vô cơ

Trong xử lý nhiều loại ô nhiễm, phương pháp sinh học thường được ưu tiên lựa chọn bởi ưu điểm chi phí vận hành thấp và thân thiện với môi trường. Đối với ô nhiễm nitơ trong môi trường nuôi thủy sản, ở các nghiên cứu trước cho dù áp dụng với công nghệ nào thì các con đường nitrat hóa và khử nitrat cũng thường được sử dụng:

1.2.5.1. Quá trình nitrat hóa (trong điều kiện hiếu khí)



Quá trình nitrat hóa là quá trình chuyển hóa amoni (NH_4^+) thành nitrat (NO_3^-) bởi tác động của các vi khuẩn tự dưỡng hiếu khí. Trước hết NH_4^+ được chuyển hóa thành NO_2^- nhờ các vi khuẩn oxy hóa amoni (ammonia oxidizing bacteria – AOB). Hai enzyme quan trọng giúp AOB chuyển đổi amoni thành nitrit, đó là enzyme *ammonia monooxygenase* (AMO) giúp oxy hóa amoni thành hợp chất trung gian là hydroxylamine và enzyme *hydroxylamine oxidoreductase* (HAO) có khả năng chuyển đổi hydroxylamine thành nitrit [64].



Vi khuẩn này thuộc nhóm nhóm Gram âm, hóa tự dưỡng và hiếu khí bắt buộc. Chúng được phân loại thành bốn chi chính gồm *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* và *Nitrosovibrio*, trong đó chi *Nitrosomonas* và *Nitrosospira* thường được tìm thấy nhất trong các công trình xử lý nước thải. Các chủng vi khuẩn oxy hóa amoni sinh trưởng tốt ở nhiệt độ khoảng 30°C; pH tối ưu một phần phụ thuộc vào nồng độ muối, ví dụ với 10mM muối amoni thì pH=8 được coi là thích hợp cho sự phát triển của chúng. Tuy nhiên, tốc độ phát triển của nhóm vi khuẩn này là cực kì chậm, thời gian nhân đôi tế bào của vi khuẩn ít nhất là 7-8 giờ thậm chí cũng có thể kéo dài tới vài ngày [65].

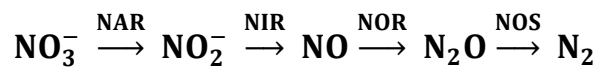
Bước thứ hai của quá trình nitrat hóa là giai đoạn oxy hóa nitrit thành nitrat, được thực hiện bởi nhóm vi khuẩn oxy hóa nitrit (Nitrite Oxidizing Bacteria – NOB). NOB là các vi khuẩn Gram âm, thuộc phân nhóm β - *Proteobacteria* và γ - *Proteobacteria*. Theo khóa phân loại Bergey, NOB gồm bốn chi là *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* và *Nitrospira*. Trong số đó, *Nitrobacter* và *Nitrospira* có khả năng sinh trưởng dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, các nhóm còn lại là các loài hóa tự dưỡng bắt buộc. NOB sử dụng enzyme *nitrit oxidoreductase* (NXR hay NOR) để oxy hóa nitrit theo phản ứng sau [66]:



NOB cũng phát triển khá chậm và khó nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng là các chất khoáng, nguồn nitơ là nitrit và cacbon dioxide (CO₂) là nguồn cacbon duy nhất, nhiệt độ tối ưu 30°C và pH 7,6-8,0; thời gian nhân đôi tế bào là 12 giờ, sản lượng tế bào thấp, chỉ có khoảng 0,9 mg protein/L được hình thành khi chúng oxy hóa được 7,5 mM nitrit [67].

1.2.5.2. Quá trình khử nitrat: sử dụng nitrat làm chất nhận điện tử cuối cùng trong quá trình hô hấp kỵ khí.

Các giai đoạn của quá trình khử nitrat được xúc tác bởi 4 enzyme chính nitrat reductase (NAR), nitrit reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR) và nitrous oxide reductase (NOS) [68], [69]:



Trải qua hàng loạt các phản ứng liên tiếp dưới tác động của hệ enzym reductaza, sản phẩm của quá trình khử nitrat là NO, N₂O hoặc N₂, quá trình sinh học này xảy ra trong tự nhiên với sự tham gia của các vi sinh vật dị dưỡng, chúng sử dụng nguồn cacbon hữu cơ để xây dựng tế bào, vi khuẩn khử nitrat thường thích nghi bám dính trên giá thể hay ở dạng bông bùn hoặc phía dưới màng sinh học để không bị ảnh hưởng nhiều bởi oxy [70].

Phương pháp xử lý sinh học dựa trên nguyên lý của quá trình nitrat hóa và khử nitrat được sử dụng rộng rãi trong chuyển hóa các hợp chất amoni và nitrit nhờ tính hiệu quả và thân thiện với môi trường [71]. Hơn nữa, độ kiềm cần thiết trong quá trình nitrat hóa có thể được cung cấp một phần bởi tính chất tích tụ độ kiềm của quá trình khử nitrat, do đó, sự kết hợp của hai quá trình này sẽ ổn định mức pH của môi trường. Thông thường, các nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat này có thể phân tách bổ sung riêng biệt vào các bể hiếu khí và kỵ khí trong hệ thống ao sinh học (theo công nghệ AAO, Anaerobic-anoxic-oxic) để xử lý sinh học liên tục các chất ô nhiễm trong nước. Công nghệ này có ưu điểm về chi phí lắp đặt thấp nhưng lại đòi hỏi diện tích xây dựng phải lớn để bố trí ao sinh học. Bên cạnh đó, chất lượng nước thải sau xử lý còn biến động, thời gian kéo dài và khó áp dụng được cho các đầm ao nuôi thủy sản quy mô nhỏ.

Tuy nhiên, đến nay một số loài vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* [72]; *Bacillus cereus* [73], *Acinetobacter* sp. YT03 [74], v.v. đã được chứng minh có hoạt tính khử nitrat trong điều kiện hiếu khí. Trong nghiên cứu của Li *et al.* (2019), vật liệu xây dựng đur thừa được đồng cố định với vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat hiếu khí có thể loại bỏ 91,97% nitơ tổng số và 78,82% hàm lượng amoni trong môi trường [75]. Hill *et al.* (2008) cũng cho thấy quá trình cố định đồng thời vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat hiếu khí trên chất mang canxi alginate đã đạt được hiệu quả loại bỏ nitơ

cao hơn nhiều so với việc cố định riêng vi khuẩn nitrat hóa [76].

Như vậy, với mục tiêu xử lý hiệu quả đồng thời các vấn đề về ô nhiễm trong môi trường nuôi thủy sản, trong nghiên cứu này chúng tôi hướng đến việc kết hợp sử dụng công nghệ nitrat hóa – khử nitrat hiệu quả trong chuyển hóa loại bỏ các hợp chất nitơ vô cơ với quá trình quang xúc tác để xử lý các chất hữu cơ, kháng sinh dư thừa và tiêu diệt/ức chế vi khuẩn gây bệnh.

1.3. Định hướng tích hợp chất quang xúc tác và vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên chất mang để nâng cao hiệu quả xử lý môi trường nuôi thủy sản ô nhiễm

Quá trình quang xúc tác và phân hủy sinh học đều có những ưu điểm riêng biệt trong việc xử lý ô nhiễm. Tuy nhiên, hai phương pháp này đều gặp phải hạn chế chung là hiệu suất xử lý không ổn định và chi phí cao khi chất quang xúc tác hay vi khuẩn chuyển hóa nitơ được sử dụng ở dạng tự do ở ngoài thực tế.

Thật vậy:

Các thảo luận trên đã chỉ ra hiệu quả của việc sử dụng quá trình quang xúc tác bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trong xử lý các hợp chất ô nhiễm và ức chế vi khuẩn gây bệnh [77]. Phản ứng quang xúc tác thường dẫn đến quá trình khoáng hóa hoàn toàn các chất ô nhiễm hữu cơ phức tạp thành phân tử nước (H_2O), cacbon dioxit (CO_2) 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 như phân hủy sinh học, hấp phụ, đông tụ và trao đổi ion. Tuy nhiên, việc thu hồi vật liệu nano dạng bột lơ lửng trong dung dịch sau khi sử dụng đã trở thành một vấn đề đáng quan tâm lớn của các nhà khoa học. Bởi khi tồn tại ở dạng bột, các hạt nano có xu hướng kết tụ, chìm hoặc lơ lửng trong dung dịch và rất khó để phân tách ra khỏi môi trường. Điều này làm giảm diện tích bề mặt hoạt động, hạn chế diện tích tiếp xúc giữa vật liệu nano quang xúc tác với các chất ô nhiễm và hiệu quả hấp thụ ánh sáng kém. Đặc biệt, sau khi quá trình xử lý hoàn tất, việc thu hồi hạt nano quang xúc tác dạng bột để tái sử dụng là rất khó, tốn nhiều thời gian và chi phí. Bên cạnh đó, do thiếu các quy định thích hợp về xử lý vật liệu quang xúc tác, một số lo ngại về việc tạo ra ô nhiễm thứ cấp bởi các hạt nano cũng được đề cập [78]. Các hạn chế này đã khiến việc mở rộng quy mô các hệ thống xử lý ứng dụng hạt nano quang xúc tác dạng bột không khả thi, do đó các nhà nghiên cứu đã hướng đến phương pháp tích hợp hạt quang xúc tác trên các loại chất mang phù hợp [79]. Trong thời gian gần đây, song song với việc biến đổi vật liệu quang xúc tác để đạt được hiệu suất xử lý ô nhiễm cao dưới ánh sáng mặt trời thì các nghiên cứu về chế tạo chất mang có đặc tính dễ phân tách và thu hồi cũng được chú ý nhằm nâng cao khả năng tái sử dụng của hạt quang xúc tác, giảm chi phí đầu tư. Trước đây, một số loại chất mang như thủy tinh, gốm sứ, polyme, zeolit hay hạt cát đã được thử nghiệm rộng rãi và thành

công trong việc tích hợp với hạt quang xúc tác, tuy nhiên, mặc dù các vật liệu tổng hợp tạo thành có thể được loại khỏi môi trường nước nhanh chóng sau phản ứng nhưng chúng có hiệu quả quang xúc tác không cao [80]. Điều này có thể được giải thích bởi sau khi được tích hợp diện tích bề mặt riêng của các hạt quang xúc tác bị giảm đáng kể, cùng với đó các chất mang thường chìm xuống tầng đáy của hệ thống xử lý, hạn chế sự tiếp xúc của chất quang xúc tác với nguồn ánh sáng bên trên. Do đó, việc lựa chọn được một loại vật liệu mang phù hợp đáp ứng yêu cầu dễ phân tách nhưng đồng thời không làm ảnh hưởng đến hoạt động quang xúc tác của vật liệu là một trong những chủ đề đặc biệt được quan tâm trong lĩnh vực xử lý môi trường bằng phương pháp này.

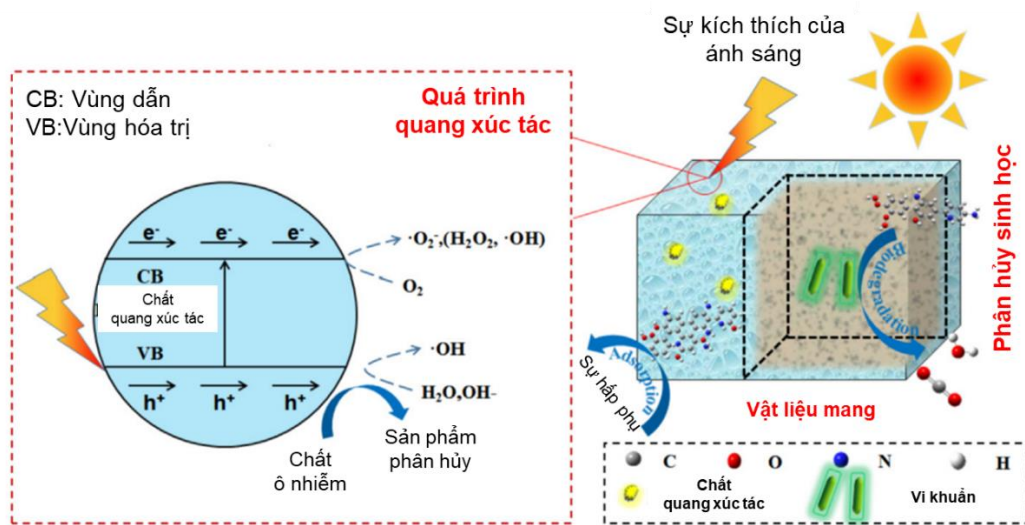
Đối với việc ứng dụng vi khuẩn chuyển hóa nitơ, để tăng hiệu quả trong xử lý thì yếu tố công nghệ cũng rất quan trọng, các nhóm vi khuẩn này được biết đến là rất thích nghi bám dính trong điều kiện có giá thể, do vậy bên cạnh lựa chọn chủng giống vi sinh vật phù hợp, thì việc tích hợp chúng trên chất mang sẽ làm tăng hiệu quả xử lý do vi khuẩn tồn tại lâu hơn trong hệ xử lý khi chúng được tích hợp trên giá thể, tránh hiện tượng vi khuẩn ở dạng tự do bị rửa trôi trong quá trình vệ sinh thông hút đáy ao nuôi [81]. Hơn nữa, tích hợp đồng thời vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat hiếu khí trên chất mang có thể đạt được hiệu quả loại bỏ nitơ cao hơn nhiều so với chỉ sử dụng vi khuẩn nitrat hóa. Chất mang lý tưởng cho vi khuẩn bám dính cần có cấu trúc cứng, rỗng dạng xốp giúp tăng cường khả năng tích hợp và bảo vệ vi khuẩn khi đã bám dính trên vật liệu, thêm vào đó việc gắn thêm các dưỡng chất cần thiết trên vật liệu giúp hỗ trợ và kích thích sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn đồng thời bảo vệ vi khuẩn trước những tác động bên ngoài.

Do vậy, việc nghiên cứu chế tạo ra loại chất mang sao cho có tính chất rỗng, xốp, nổi phù hợp để tích hợp chất quang xúc tác và tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ là điều kiện quan trọng và cực kỳ cần thiết giúp đạt được hiệu suất xử lý môi trường cao, giảm chi phí vận hành, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Hiện nay đã có một số nghiên cứu hướng đến kết hợp quá trình quang xúc tác và phân hủy sinh học trong loại bỏ các chất ô nhiễm như phenol [82], oxytetracycline [83], 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) [84], phenanthrene [85]... Liu *et al.* (2022) chỉ ra sự kết hợp của chất quang xúc tác $\text{Fe}^{3+}/\text{g-C}_3\text{N}_4$ với vi khuẩn tạo màng sinh học thuộc chi *Nakamurella* và *Raoultella* trên chất mang mút xốp (polyurethane sponge) đã tăng hiệu suất phân hủy kháng sinh sulfamethoxazole (SMX) và COD lên lần lượt $96,27 \pm 5,27\%$ và $86,57 \pm 3,06\%$, cao hơn khi so sánh với việc chỉ xử lý bằng chất quang xúc tác (SMX 100%, COD $4,2 \pm 0,74\%$) hay vi khuẩn (SMX $42,21 \pm 0,86\%$, COD $95,1 \pm 0,18\%$) [86]. Gần đây nghiên cứu của Dong *et al.* (2023) cũng có thấy khi vi

khuẩn chủ yếu thuộc chi *Pseudoxanthomonas*, *Ferruginibacter*, *Clostridium*, *Stenotrophomonas* và *Comamonas* được đồng tích hợp với vật liệu B/Bi₃O₄Cl thì hiệu quả phân hủy kháng sinh ciprofloxacin đạt trên 95%, đồng thời tăng khả năng khoáng hóa lên thêm 20% so với bề xử lý chỉ chứa B/Bi₃O₄Cl [87].

Trong các mô hình kết hợp kể trên, chất quang xúc tác và vi sinh vật thường được cố định chung trên một chất mang, trong đó quá trình quang xúc tác và phân hủy sinh học lần lượt diễn ra đồng thời trên bề mặt ngoài và bên trong của chất mang. Khoảng cách giữa vật liệu quang xúc tác và các nhóm vi sinh vật thường trong khoảng từ μm đến mm , giúp cho vi sinh vật có thể nhanh chóng hấp thụ và phân hủy các sản phẩm hình thành từ quá trình quang xúc tác (Hình 1.7).



Hình 1.7. Cơ chế xử lý ô nhiễm của vật liệu đồng tích hợp chất quang xúc tác và vi sinh vật [88].

Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu trước đây chỉ tập chung xử lý một loại chất ô nhiễm nhất định, phổ biến là kháng sinh hay các chất hữu cơ cấu trúc phức tạp, điều này khác biệt với nghiên cứu hiện tại của chúng tôi là nhằm mục đích loại bỏ cả bốn yếu tố ô nhiễm trong môi trường nuôi thủy sản gồm: hợp chất hữu cơ từ thức ăn dư thừa, kháng sinh tồn dư, vi khuẩn gây bệnh và hợp chất nitơ vô cơ. Bốn nguồn ô nhiễm đang xét đến này có thể xảy ra nghiêm trọng trong cùng một thời điểm nhưng cũng có thể có mức độ ô nhiễm khác nhau tùy vào tình hình thực tế của vụ nuôi. Bên cạnh đó, chất quang xúc tác TiO₂-Ag được chúng tôi tập trung hướng đến để xử lý phân hủy hợp chất hữu cơ và tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh, trong khi nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ được sử dụng để loại bỏ hợp chất amoni và nitrit. Mặt khác, để tích hợp hiệu quả vi khuẩn trên chất mang thì bề mặt vật liệu này cần được biến đổi bổ sung thêm các thành phần dưỡng chất thiết yếu cho sinh trưởng và tạo màng sinh học của vi khuẩn, trong khi yêu cầu này là không cần thiết đối với quá trình tích hợp chất

quang xúc tác, quá trình này chỉ phụ thuộc vào cấu trúc bề mặt chất mang. Do đó, việc đồng tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên cùng một loại chất mang để ứng dụng trong xử lý các vấn đề ô nhiễm thủy sản nêu trên có thể còn gây nhiều tranh cãi. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất việc nghiên cứu chế tạo loại các chất mang phù hợp cho từng mục đích tích hợp vật liệu quang xúc tác và tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ để áp dụng trong môi trường nuôi thủy sản. Thông qua đó sẽ có những dữ liệu chính xác để định hướng ứng dụng vật liệu khả thi và phù hợp nhất.

1.4. Các loại chất mang phổ biến dùng trong xử lý ô nhiễm nguồn nước

Đối với các hệ thống xử lý nước sinh học, hiệu suất xử lý đạt được phụ thuộc nhiều vào sự hình thành màng sinh học của vi sinh vật trên vật liệu hay còn gọi là chất mang (carrier) để duy trì mật độ cao của chúng trong hệ thống. Trong đó, các yếu tố về tính chất vật lý/hóa học của bề mặt chất mang, độ nhám, cấu trúc lỗ rỗng, diện tích riêng và loại vật liệu của chất mang đóng vai trò quyết định cho sự bám dính của vi sinh vật. Dựa trên bản chất của vật liệu, chất mang ứng dụng trong các bể phản ứng sinh học có thể được chia thành ba loại: chất mang có nguồn gốc tự nhiên, chất mang làm từ phụ phẩm nông nghiệp và chất mang tổng hợp nhân tạo.

1.4.1. Vật liệu mang nhân tạo

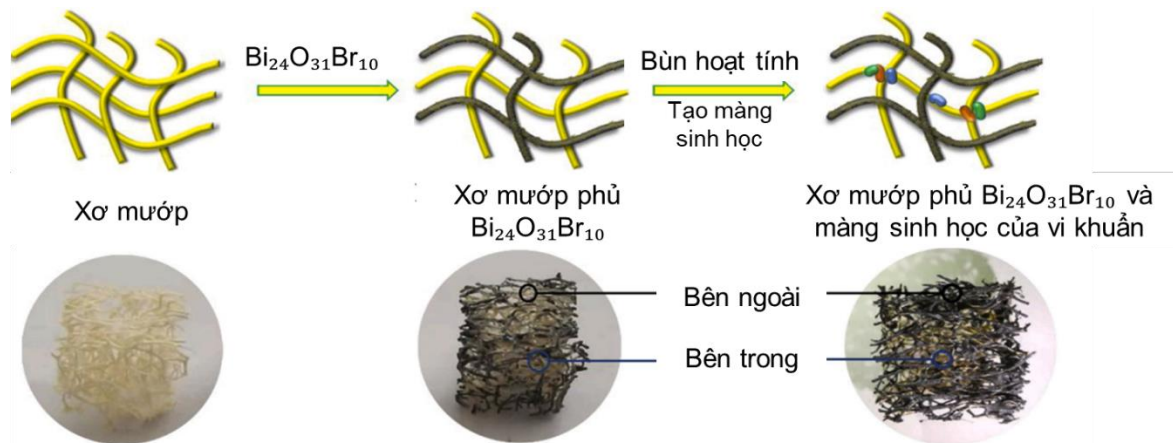
Hiện nay, vật liệu nhân tạo như bọt biển polyurethane, polyethylene, polyvinyl alcohol, poly propylene và polyvinyl clorua là các loại chất mang vi sinh vật được dùng phổ biến [89]. Chúng là loại vật liệu có độ xốp cao với các cấu trúc vi mô thích hợp cho sự “cư trú” của vi sinh vật, đồng thời với độ bền cơ học tốt của vật liệu sẽ ngăn chặn các tác động của dòng nước đến vi sinh vật sau khi tích hợp lên vật liệu [90]. Thử nghiệm thay đổi độ xốp của bọt biển polyurethane từ 20 đến 50 lỗ rỗng trên một inch (ppi) đã cho thấy rằng mật độ vi khuẩn cao với các lớp màng sinh học dày hơn xuất hiện ở vật liệu có độ xốp lớn hơn 50 ppi. Ở độ xốp này cũng lưu giữ được đến 95% sinh khối vi khuẩn trong vật liệu khi nuôi cấy trong điều kiện lắc sau 10 ngày, trong khi chỉ 20% lượng vi khuẩn tích hợp ban đầu còn tồn tại trong vật liệu có độ xốp 20 ppi [91]. Miếng mút xốp với cấu trúc nhiều lỗ rỗng, nhẹ, nổi trên mặt nước cũng được các nhà khoa học Lê Văn Cát *et al.* (2007), Nguyễn Quang Huy *et al.* (2012) sử dụng làm giá thể cho sự bám dính tạo màng sinh học của vi khuẩn chuyển hóa nitơ, từ đó tạo được sản phẩm xử lý nước ô nhiễm amoni, nitrit [92], [93]. Trong một nghiên cứu khác, vật liệu polyethylene được biến đổi để có điện tích dương trên bề mặt nhằm tăng khả năng bám dính của vi khuẩn trong hệ xử lý lên vật liệu, từ đó nâng tăng hiệu quả xử lý xyanua hữu cơ [94]. Các nhà khoa học đã chỉ ra vật liệu chất mang nhân tạo lý tưởng cần được thiết kế sao cho có độ bền cơ học/hóa học ổn định,

độ nhám và độ xốp phù hợp [95]. Tuy nhiên chi phí thiết kế để tạo ra loại vật liệu đạt yêu cầu trên có thể làm tăng giá thành sản phẩm, đồng thời chất mang làm từ vật liệu nhân tạo thường không thân thiện với môi trường. Sau quá trình sử dụng, chất mang này khó bị phân hủy và có thể gây ô nhiễm thứ cấp. Do đó, việc áp dụng rộng rãi các vật liệu nhân tạo làm giá thể cho vi khuẩn trong xử lý nước thải cũng cần được cân nhắc lưu ý [96].

1.4.2. Vật liệu mang có nguồn gốc từ phụ phẩm nông nghiệp

Trong thực tế sản xuất nhiều loại phụ phẩm như vỏ gỗ, xơ dừa, xơ mướp, bã mía, rơm rạ hay chất thải sinh hoạt như các que tăm bông cũng có thể được dùng làm giá thể cho vi sinh vật/hạt quang xúc tác thay thế cho các vật liệu tổng hợp để giảm tình trạng tiêu thụ quá mức các sản phẩm hóa dầu (petrochemicals) và chi phí đầu tư cho quá trình xử lý môi trường [97]. Không chỉ có ưu điểm về mặt kinh tế, các phụ phẩm nông nghiệp cũng có những đặc điểm riêng khiến chúng trở thành vật liệu mang phù hợp cho sự phát triển của màng sinh học như độ xốp cao, diện tích bề mặt riêng lớn và sự tồn tại của một số nhóm chức như amino, hydroxyl, carboxyl, thiol và phosphate trên bề mặt [98]. Các vật liệu này cũng chứa thành phần chính là cellulose, hemicellulose và lignin, do vậy chúng vừa có thể đóng vai trò là vật liệu mang đồng thời cũng được sử dụng như một nguồn cacbon sẵn có kích thích sự phát triển của vi sinh vật trên đó (Hình 1.8). Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Trần Văn Nhị, Hoàng Phương Hà đã thực hiện các đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học để tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn chuyển hóa nitơ có hoạt tính nitrat hóa cao nhằm tích hợp chất mang tro trấu để tạo ra chế phẩm sinh học ứng dụng trong xử lý môi trường ô nhiễm amoni, nitrit. Thử nghiệm trong mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng tại tỉnh Sóc Trăng cho thấy, chế phẩm sinh học này có khả năng loại bỏ đến 99% hàm lượng nitơ tổng (TAN). Mặc dù hiệu quả của sản phẩm đã được khẳng định, nhưng chế phẩm sinh học hiện tại còn chưa phù hợp sử dụng đối với nhiều mô hình nuôi thủy sản do dễ bị lắng xuống đáy ao và bị rửa trôi khỏi ao nuôi trong quá trình thay nước và thông hút đáy ao [99, 100, 101]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Aslam *et al.*, (2017) đã thành công trong việc dùng các que tăm bông làm vật liệu lọc trong hệ thống lọc sinh học nhỏ giọt (Biotrickling filter) để đạt hiệu suất xử lý BOD và COD lần lượt lên đến 69–78 % và 65–80 % [102]. Một số nghiên cứu khác cũng gợi ý việc sử dụng trấu, rơm rạ hay lõi ngô làm giá thể và nguồn cacbon bổ sung cho vi khuẩn giúp tăng hiệu suất quá trình khử nitrat [103]. Trong đó, khi rơm rạ và lõi ngô được sử dụng, hiệu quả xử lý đạt 47,3% - 50,2% đối với COD và 21,8% - 24,8% đối với hàm lượng nitơ tổng số [104]. Tuy nhiên cần lưu ý rằng khi bổ sung các loại vật liệu này trong môi trường nước, nguồn cacbon hữu cơ bị phân tán ra không được sử dụng

hết bởi vì sinh vật có thể gây ra hiện tượng ô nhiễm thứ cấp. Bên cạnh đó cũng chưa có báo cáo rõ ràng về việc có hay không hàm lượng nitơ, photpho hay các chất màu trôi ra từ các phụ phẩm nông nghiệp kể trên có thể gây ra những tác động xấu đến chất lượng nước trong quá trình xử lý môi trường [105]. Do vậy, các lo ngại này phần nào dẫn đến việc hạn chế sử dụng các phụ phẩm nông nghiệp trong quá trình xử lý nước ô nhiễm, đặc biệt là đối với quá trình khử nitrat.



Hình 1.8. Sơ đồ mô tả quá trình tích hợp của chất quang xúc tác $\text{Bi}_{24}\text{O}_{31}\text{Br}_{10}$ và bùn hoạt tính trên chất mang xơ mướp [106].

1.4.3. Vật liệu mang có nguồn gốc từ polymer tự nhiên

Để có thể ứng dụng trên mô hình xử lý quy mô lớn, chất mang cần có giá thành thấp, sẵn có và là vật liệu thân thiện với môi trường. Hiện nay, ngày càng có nhiều nghiên cứu khoa học chứng minh hiệu quả của việc áp dụng các polymer tự nhiên như agarose, κ -carrageenan, alginate, agar và chitosan trong các hệ thống xử lý nước thải bởi chúng không chỉ có giá thành rẻ mà còn có tính tương thích sinh học cao, không gây độc hại và dễ sử dụng [107]. Nghiên cứu của Maya Erna *et al.* (2013) cho thấy hiệu quả chuyển hóa nitơ vượt trội của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* và *Nocardioideus albus* khi tích hợp lên vật liệu làm từ polymer alginate, nồng độ nitơ tổng số và nitrit sau xử lý luôn duy trì dưới mức 0,5 mg/L [108]. Tuy được nghiên cứu rộng rãi nhưng hầu hết các polymer tự nhiên đều có độ bền cơ học kém, dẫn đến chất mang dễ bị phân hủy theo thời gian sử dụng, làm cho vi sinh vật bị tách rời khỏi chất mang và bị rửa trôi ra khỏi hệ thống xử lý. Vì vậy việc chuyển đổi vật liệu chất mang từ dạng polymer tự nhiên sang các vật liệu vô cơ tự nhiên có thể phần nào giải quyết được tình trạng này. Các loại chất mang làm từ cao lanh (clay), vermiculite, sepiolit, bentonit hay zeolit cũng đều là các vật liệu có sẵn trong tự nhiên với độ ổn định hóa học và cơ học tốt hơn. Một số báo cáo đã chỉ ra đất sét và các loại chất mang biến đổi từ đất sét có hiệu quả cao trong việc loại bỏ kim loại nặng và hợp chất hữu cơ ô nhiễm. Trong nghiên cứu của Quintelas *et al.*,

(2013) chủng vi khuẩn *Streptococcus equisimilis* và *Arthrobacter viscosus* đã được thử nghiệm tích hợp trên bốn loại chất mang khác nhau gồm bentonit, kaolin, sepiolit và vermiculit để loại bỏ hợp chất dung môi độc hại diethylketone (DEK) khỏi nước, với hiệu quả đều đạt trên 98% [109]. Zeolit tự nhiên là khoáng chất aluminosilicat có điện tích âm trên bề mặt, độ xốp cao với các lỗ rỗng siêu nhỏ, kích thước lỗ rỗng của vật liệu này có thể dao động từ 0,3 đến 1 nm, tạo lên độ xốp từ 0,1 đến 0,35 cm³/g [110]. Với tính chất lý hóa đặc trưng này và diện tích bề mặt riêng lớn, zeolit có thể được dùng làm vật liệu lọc có khả năng hấp phụ tốt [111]. Năm 2019, khi tích hợp vi khuẩn trên zeolit tự nhiên và vật liệu tổng hợp PU (polyurethane), tác giả Valdez *et al.* (2019) đã cho thấy hai hệ thống PBBR (packed-bed biofilm reactor) chứa các loại chất mang này đạt hiệu quả loại bỏ trichloroethylene tương đương là 58,63 và 62,7% [112]. Tác giả cũng quan sát thấy rằng, màng sinh học của vi khuẩn được phát triển chủ yếu bên trong của chất mang tổng hợp PU, trong khi nó tập trung nhiều trên bề mặt bên ngoài của zeolit, việc này có thể giúp vi khuẩn dễ dàng tiếp xúc và phân hủy các chất ô nhiễm trong môi trường. Trong các nghiên cứu trước đây của Li *et al.* (2013), zeolit cũng được ứng dụng thành công làm vật liệu mang cho bùn hoạt tính chứa vi khuẩn nitrat hóa, giúp tăng hiệu suất chuyển hóa NH₄⁺ lên 91,2% [113].

1.5. Cải tiến vật liệu nhằm làm tăng hiệu quả tích hợp của vi khuẩn và chất quang xúc tác

Sự bám dính/liên kết ban đầu của tế bào vi khuẩn/hạt quang xúc tác vào bề mặt chất mang thường bị chi phối bởi các đặc tính về điện tích bề mặt, khả năng thấm ướt, độ nhám và độ xốp của chất mang.

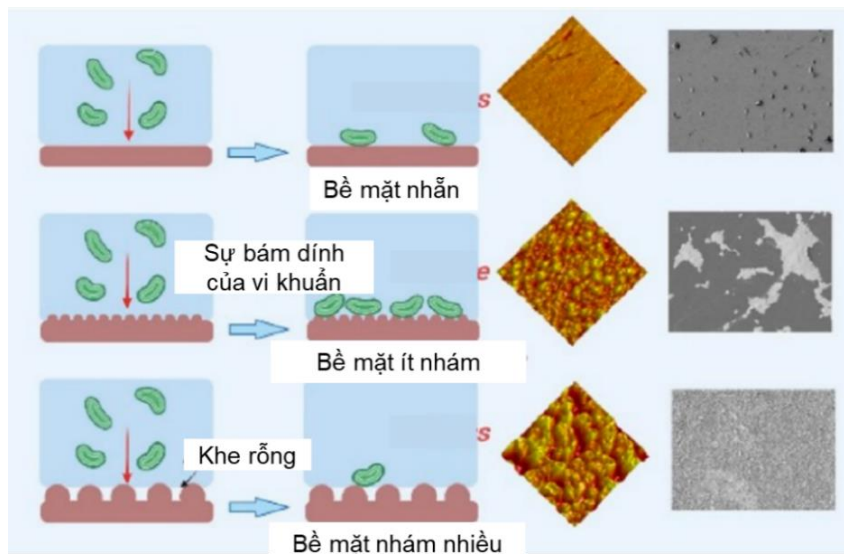
1.5.1. Thay đổi về điện tích bề mặt

Điện tích bề mặt của vật liệu có thể tạo ra lực hút/đẩy tĩnh điện giữa chất mang và tế bào vi khuẩn. Cấu trúc màng tế bào có chứa các nhóm carboxylic và axit photphoric nên hầu hết tế bào vi khuẩn có điện tích âm ở bề mặt. Vì vậy, vật liệu mang điện tích bề mặt dương có thể tạo ra tương tác tĩnh điện van der Waals “lôi kéo” các tế bào liên kết với vật liệu tốt hơn [114]. Dựa trên nguyên lý này tác giả Wang *et al.* đã sử dụng phản ứng ngưng tụ (condensation reaction) và phản ứng chuyển vị Hofman (phản ứng chuyển một amide thành sản phẩm là amine bậc 1 có ít hơn 1 cacbon, amide rearrangement reaction) để tạo liên kết hóa học giữa vật liệu vermiculit với hai hợp chất chứa nhóm -NH₂ là aminopropyltriethoxysilane (APTES) và diethylenetriamine (DETA), từ đó tạo ra vật liệu có điện tích bề mặt dương. Lúc này vi khuẩn *Sporosarcina pasteurii* với điện tích bề mặt âm có thể được hấp phụ chặt chẽ vào bề mặt chất mang nhờ lực tương tác Coulomb trong điều kiện pH < 9,74 [115]. Trong một nghiên cứu khác, Chrzanowski *et al.* đã lợi dụng ảnh hưởng của pH

môi trường để tạo nên điện tích trái dấu trên bề mặt của chất mang xơ mướp và tế bào vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, làm tăng hiệu suất tích hợp vi khuẩn lên 86% ở pH 7,2. Thật vậy, xơ thực vật (plant sponge) thường có điểm đẳng điện (pH_{pzc}) tại pH 5,2 [116]. Trong khi đó, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 có giá trị pH_{pzc} là 11, nên khi pH môi trường ở mức 7,2, lớn hơn pH_{pzc} của xơ mướp nhưng nhỏ hơn pH_{pzc} của chủng KB2 sẽ tạo nên điện tích âm trên bề mặt vật liệu và điện tích dương trên tế bào vi khuẩn [117].

1.5.2. Thay đổi độ nhám bề mặt

Sự tiếp xúc và liên kết của tế bào với bề mặt vật liệu là bước quan trọng đầu tiên trong sự hình thành màng sinh học vi khuẩn, quá trình này thường xảy ra thông qua hai giai đoạn liên tiếp. Đầu tiên, các tế bào vi khuẩn di chuyển về phía vật liệu và có những tương tác thuận nghịch không đặc hiệu với bề mặt rắn này. Tiếp theo, ở giai đoạn thứ hai, khi tế bào vi khuẩn tiến lại gần và khoảng cách giữa chúng với vật liệu chỉ ở mức nanômét (nm), các tương tác đặc hiệu hơn sẽ xuất hiện tạo nên sự liên kết không thuận nghịch với bề mặt. Lúc này lớp polymer ngoại bào (EPS) sẽ được vi khuẩn tiết ra để thúc đẩy sự bám dính chặt chẽ của các tế bào trên bề mặt vật liệu. Tuy nhiên, quá trình tạo màng sinh học này của vi khuẩn có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như bề mặt vật liệu, loài vi khuẩn và điều kiện môi trường (Hình 1.9).



Hình 1.9. Ảnh hưởng của độ nhám bề mặt lên khả năng tích hợp của tế bào vi khuẩn lên vật liệu [118].

Trong đó, sự gia tăng độ nhám bề mặt thường thúc đẩy sự bám dính của vi khuẩn do diện tích tiếp xúc giữa bề mặt vật liệu và tế bào vi khuẩn tăng lên. Đồng thời vật liệu với bề mặt gồ ghề nhiều khe, rãnh cũng giúp bảo vệ tế bào sau khi tích hợp không bị đánh bật ra khỏi chất mang bởi tác động của dòng nước (water shear force) [119]. Quirynen *et al.* (1995) gợi ý rằng vi khuẩn có thể bám dính trên vật liệu

có giá trị độ nhám trung bình (Ra- roughness average) tối thiểu là 0,2 μm [120]. Giá trị tối thiểu này cũng có thể thay đổi tùy theo kích thước và hình dạng của tế bào của mỗi loại vi khuẩn [121]. Khi vật liệu kính có Ra tăng dần từ 0,07 μm ; 0,58 μm ; 0,99 μm ; 2,5 μm đến 5,8 μm đã đẩy nhanh tốc độ liên kết tạo màng sinh học của vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* lên vật liệu [122]. Tuy nhiên, Hilbert *et al.* lại chỉ ra rằng Ra của vật liệu thép không gỉ tăng trong khoảng từ 0,01 đến 0,9 μm không tạo ra sự khác biệt đáng kể nào trong việc kích thích sự tạo màng của vi khuẩn *Listeria monocytogenes* và *Candida lipolytica* lên vật liệu [123].

1.5.3. Thay đổi tính chất lý hóa bề mặt

Sự bám dính của vi khuẩn vào bề mặt phụ thuộc vào nhiều đặc tính lý hóa khác của cả tế bào và bề mặt vật liệu, việc sửa đổi bất kỳ thông số nào cũng sẽ tác động đến hiệu quả của quá trình tích hợp vi khuẩn lên vật liệu. Theo Liu *et al.* (2004) giống như trong các phản ứng hóa học, khả năng tự kết hợp giữa tế bào vi khuẩn và vật liệu cũng được thể hiện thông qua sự biến thiên năng lượng tự do, ký hiệu $(G^{\circ}_{\text{adh}})'$ [124]. Trong đó, $(G^{\circ}_{\text{adh}})'$ có tương quan tỷ lệ nghịch với độ kỵ nước tương đối giữa tế bào vi khuẩn và bề mặt vật liệu ($H_{o/w}$) thông qua công thức:

$$(G^{\circ}_{\text{adh}})' = G^{\circ}_{\text{adh}} - aRT \ln(H_{o/w})$$

$$\text{Trong đó, } H_{o/w} = \frac{\text{tương tác kỵ nước tương đối giữa tế bào và vật liệu}}{\text{tương tác ưa nước tương đối giữa tế bào và vật liệu}} = \frac{H_m + H_s}{(1 - H_m) + (1 - H_s)}$$

Vì vậy, dựa vào phương trình trên, sự liên kết của vi khuẩn với bề mặt vật liệu có thể được chia thành ba trường hợp gồm:

- (1) - Khi bề mặt tế bào và vật liệu đều có tính kỵ nước, lúc này giá trị $\ln(H_{o/w})$ sẽ tăng lên và làm giảm giá trị $(G^{\circ}_{\text{adh}})'$, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho sự liên kết của tế bào vi khuẩn lên vật liệu;
- (2) - Ngược lại với trường hợp (1), nếu cả bề mặt tế bào và vật liệu đều có tính ưa nước, sự tương tác của tế bào vi khuẩn với vật liệu sẽ khó diễn ra;
- (3) - Khi một trong hai thành phần bề mặt tế bào hoặc bề mặt vật liệu có tính ưa nước thì việc “chỉnh sửa” để tăng tính kỵ nước của thành phần còn lại sẽ giúp hỗ trợ sự liên kết của chúng khi tiếp xúc với nhau.

Trong nghiên cứu sử dụng xơ mướp làm vật liệu lọc ở hệ thống xử lý nước IFAS (Intergrated fixed film activated sludge), Dang *et al.* đã cải tiến làm tăng độ bền của loại chất mang này bằng cách “bao phủ” chúng trong lớp polymer có chứa CaCO_3 để ngăn chặn sự thẩm thấu của nước vào các sợi xơ mướp. Bên cạnh phương pháp biến đổi tính chất kỵ nước/ưa nước của vật liệu thì việc cải tiến tăng độ rỗng xốp của vật liệu cũng giúp tế bào vi khuẩn dễ dàng “neo đậu” trên vật liệu. Cấu trúc tinh thể của

lớp composite CaCO_3 /polymer trên xơ mướp đã làm tăng diện tích bề mặt riêng của vật liệu xơ mướp cải tiến từ $0,018 \text{ m}^2/\text{g}$ lên $0,875 \text{ m}^2/\text{g}$ [125]. Đối với các chất mang có bản chất là cellulose, hemicellulose hay lignin, quá trình tiền xử lý vật liệu với dung dịch axit hoặc bazơ cũng sẽ làm phá vỡ một số liên kết trong mạng lưới cấu trúc không đồng nhất (heterogeneous structure network), loại bỏ thành phần tạp nhiễm, mở rộng kích thước lỗ rỗng, từ đó làm tăng độ xốp và tính sinh khả dụng (bioavailability) của vật liệu [103], [126].

1.5.4. Xử lý nhiệt và tạo vật liệu composite tổng hợp

Tiền xử lý vật liệu ở nhiệt độ cao cũng có thể được dùng để tạo ra các chất mang có độ bền và diện tích bề mặt lớn hơn [127]. Than sinh học như than củi hay tro trấu là ví dụ điển hình về việc áp dụng quá trình nhiệt phân ở nhiệt độ cao trong môi trường thiếu oxy làm tăng diện tích bề mặt và độ xốp cũng như khả năng giữ ẩm của vật liệu [128]. Đồng thời, thành phần hóa học của than sinh học có chứa các hợp chất cacbon hữu cơ, nitơ, photpho, kali và các nhóm chức như hydroxyl và carboxyl tạo điều kiện phù hợp cho sự sinh trưởng và hình thành màng biofilm của vi khuẩn [129]. Sử dụng quá trình nhiệt phân, Gina *et al.* đã chế tạo thành công vật liệu đất sét giãn nở (expanded clay) từ hỗn hợp của đất sét tự nhiên, vỏ trấu và Na_2CO_3 với diện tích bề mặt cao trong khoảng $456,143 - 566,998 \text{ m}^2/\text{g}$. Vật liệu này có khả năng hấp phụ tốt các hợp chất kim loại nặng như arsen và chì với hiệu suất đạt lần lượt là 59% và 84% [130]. Bên cạnh đó, các nhà khoa học cũng hướng đến việc tích hợp thêm thành phần polymer trên vật liệu để nâng cao tính sinh khả dụng của chúng. Zhang *et al.* sử dụng polymer cation ưa nước hexadecyl trimethyl phủ lên trên đá basalt tự nhiên để biến đổi diện tích bề mặt chất mang đá và kích thích sự tích hợp của *Bacillus subtilis* [131].

1.6. Ứng dụng của vật liệu đất sét trong xử lý môi trường ô nhiễm

Dựa trên những điểm đã phân tích cho thấy nhiều loại vật liệu như nhựa, polymer tự nhiên hay phụ phẩm nông nghiệp có thể được sử dụng làm chất mang cho sự bám dính để tạo mang sinh học của vi khuẩn hay chất quang xúc tác, nhưng chúng có độ bền cơ học kém, diện tích bề mặt riêng thấp cũng như có thể gây ra ô nhiễm thứ cấp trong quá trình sử dụng, do vậy các loại chất mang này không phải là lựa chọn phù hợp khi hướng đến mục tiêu xử lý ô nhiễm một cách thân thiện với môi trường.

Hạt đất sét giãn nở (expanded clay, EC) là một loại vật liệu đặc biệt được tạo thành bởi sự nung nóng ở nhiệt độ cao. Khi nung, các hợp chất hữu cơ trong đất sét bị đốt cháy, khiến đất sét giãn nở tăng về thể tích và tạo nên cấu trúc lớp vỏ cứng bên ngoài và lõi rỗng xốp bên trong của vật liệu. Các hạt EC thu được có trọng lượng nhẹ,

xốp, trơ về mặt hóa học, có giá trị pH trung tính và không phân hủy sinh học. Đồng thời vật liệu có tính bền về nhiệt, không chứa các chất độc hại, không bị phân hủy bởi hóa chất hay khi ngâm trong nước. Thông thường hạt EC có thể được ứng dụng trong các cơ sở xử lý nước để lọc và làm sạch nước thải đô thị và nước uống. Đặc tính vật lý của vật liệu hạt EC được đưa ra trong Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Đặc tính vật lý của vật liệu EC [132]

Thông số	Giá trị đo	Thông số	Giá trị đo
Kích thước hạt (mm)	1,5 – 2,5	SiO ₂ (%)	62
Diện tích bề mặt (m ² /m ³)	~2200	Al ₂ O ₃ (%)	18
Diện tích bề mặt riêng (m ² /kg)	~2,93	Fe ₂ O ₃ (%)	7
Trọng lượng	1600	CaO (%)	3
Độ bền với nhiệt	Cao	MgO (%)	3
Độ bền trong axit	Cao	K ₂ O (%)	4
Độ bền trong bazơ	Cao	Na ₂ O (%)	2
		C (tổng số) (%)	0,02

Như đã phân tích, các đặc tính về diện tích bề mặt, khả năng thấm ướt, độ nhám và độ xốp của chất mang đóng vai trò quan trọng ảnh hưởng lớn đến sự bám dính/liên kết ban đầu của tế bào vi khuẩn hay hạt quang xúc tác lên bề mặt vật liệu này. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi hướng đến chế tạo ra hạt EC thông qua quá trình nhiệt phân hỗn hợp đất sét và vỏ trấu. Việc sử dụng hai loại nguyên liệu sẵn có tại các vùng nông nghiệp ở Việt Nam sẽ giúp tiết kiệm chi phí sản xuất hơn so với các nguyên liệu tổng hợp nhân tạo. Trong quá trình chế tạo, sự đốt cháy thành phần hữu cơ tồn tại trong vỏ trấu cùng với sự giãn nở của đất sét ở nhiệt độ cao 1200°C và hạ nhiệt nhanh sẽ tạo nên vô số các khoang rỗng bên trong cấu trúc chất mang.

Cấu trúc cứng, rỗng xốp của EC có thể tăng cường khả năng tích hợp và bảo vệ tế bào vi khuẩn/chất quang xúc tác bề mặt vật liệu. Đồng thời, đặc tính nổi của EC có thể tối đa hóa việc tiếp xúc ánh sáng, phát huy tác dụng của chất xúc tác quang, làm tăng hàm lượng oxi tham gia vào quá trình quang hóa phân hủy trên bề mặt tiếp xúc nước/không khí, từ đó làm tăng tốc độ hình thành các gốc tự do, tăng hiệu suất oxi hóa và đơn giản hóa quá trình thu hồi tái sử dụng vật liệu.

Mặt khác, để tối ưu hóa chất mang EC phù hợp cho việc tích hợp nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ, lớp polymer alginate có chứa thành phần N, P, C và K sẽ được phủ lên chất mang, chúng đóng vai trò vừa là nguồn cung cấp dưỡng chất đồng thời là thành phần giữ nước, tạo ra môi trường ẩm thích hợp cho sự tồn tại của tế bào

vi khuẩn trong thời gian bảo quản trước khi sử dụng. Tính chất nổi của EC cũng làm tăng sự tương tác của vi khuẩn với oxy không khí, khiến cho quá trình oxy hóa amoni, nitrit được diễn ra thuận lợi. Đối với nhóm vi khuẩn khử nitrat, tế bào vi khuẩn có thể phân bố vào các vùng có độ sâu khác nhau trong cấu trúc của EC tùy thuộc vào nhu cầu về nồng độ oxy cần thiết cho sự phát triển của chúng.

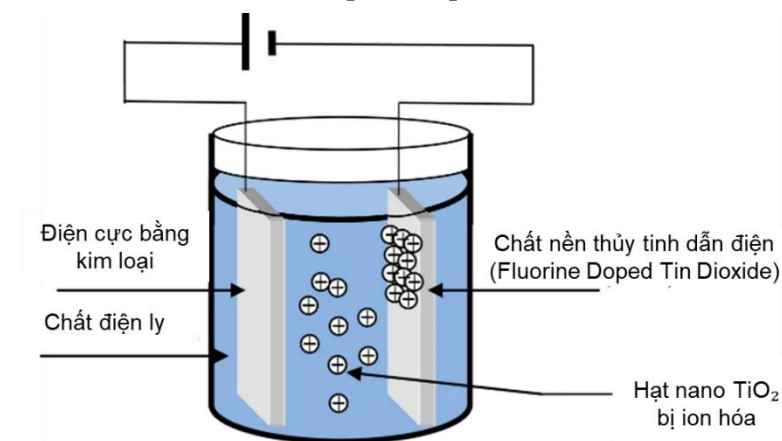
Những biến đổi nêu trên trong cấu trúc của chất mang EC được kỳ vọng đem lại hiệu quả cao trong việc tích hợp chất xúc tác quang/vi khuẩn chuyển hóa nitơ, đây là tiền đề để nâng cao hiệu suất xử lý ô nhiễm của các loại vật liệu tích hợp tạo thành khi ứng dụng trong môi trường nuôi thủy sản.

1.7. Phương pháp tích hợp chất xúc tác quang/vi khuẩn trên vật liệu mang

1.7.1. Phương pháp tích hợp chất xúc tác quang/vi khuẩn trên vật liệu mang

a. Phương pháp tích hợp chất xúc tác quang trên vật liệu mang. Phương pháp lắng đọng quang *Electrophoretic deposition (EPD)*

Phương pháp lắng đọng quang (EPD) là một kỹ thuật được sử dụng để tích hợp các hạt nano quang xúc tác lên bề mặt vật liệu có điện tích. Điện cực, là chất nền kim loại cần được phủ lớp quang xúc tác, sẽ được nhúng vào dung dịch chứa chất quang xúc tác. Khi một điện thế được áp dụng, các hạt quang xúc tác lơ lửng trong dung dịch sẽ di chuyển về phía điện cực có điện tích trái dấu. Trong quá trình này, các hợp chất như isopropanol hoặc acetylacetone có thể được sử dụng để điều chỉnh độ dẫn điện của dung dịch, qua đó tăng cường độ ổn định điện tích của các hạt lơ lửng và cải thiện tính đồng nhất cũng như độ bền của lớp phủ thu được (Hình 1.10). Phương pháp lắng đọng quang này đã được ứng dụng rộng rãi để tạo ra các lớp phủ đồng nhất trên các vật thể có cấu trúc phức tạp [133].



Hình 1.10. Quá trình tích hợp chất xúc tác quang TiO_2 lên bề mặt điện cực [134]

Trong các nghiên cứu trước đây, khi chất quang xúc tác TiO_2 được thử nghiệm tích hợp trên các vật liệu như thép không gỉ và thủy tinh phủ oxit thiếc pha tạp flo (FTO) bằng phương pháp lắng đọng quang, tuy nhiên vật liệu tích hợp hình thành sau

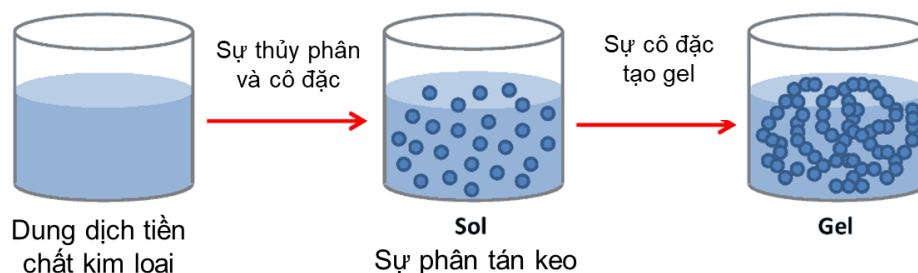
đó cần được xử lý nhiệt ở 450 °C trong 2 giờ để tăng cường độ ổn định liên kết của TiO_2 với vật liệu. Đồng thời, các yếu tố như cường độ dòng điện, thời gian tích hợp và loại dung môi sử dụng cần được tối ưu hóa kỹ lưỡng để đảm bảo hiệu quả tích hợp. Việc kéo dài thời gian phản ứng có thể làm tăng độ dày của lớp phủ TiO_2 trên vật liệu, nhưng nếu vượt quá giá trị tối ưu, lớp phủ sẽ trở nên không ổn định, ngay cả khi đã được xử lý nhiệt [135].

b. Phương pháp lắng đọng dung môi (Solvent deposition)

Lắng đọng dung môi là một phương pháp đơn giản để cố định chất quang xúc tác dạng bột lên bề mặt vật liệu mang. Trong phương pháp này, các hạt nano được phân tán vào dung môi như ethanol, acetone, isopropyl alcohol, N-Methyl-2-pyrrolidone hoặc Dimethylformamide. Sau khi dung dịch được chuẩn bị, chúng sẽ được phun hoặc đổ lên bề mặt vật liệu mang, tạo thành lớp phủ chất quang xúc tác khi dung môi bay hơi. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ tạo ra lớp phủ thông qua sự lắng đọng của dung môi mà không bổ sung các tác nhân liên kết thích hợp. Do đó, vật liệu tích hợp tạo thành khó có thể ứng dụng trong thực tế, bởi vì các hạt nano có thể dễ dàng bị tách ra khỏi vật liệu, xâm nhập vào môi trường xung quanh và gây ra nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người [136].

c. Phương pháp Sol-gel

Kỹ thuật sol-gel là một phương pháp hóa học ướt được ứng dụng rộng rãi trong khoa học vật liệu để cố định quang xúc tác. Trong phương pháp này, các tiền chất hóa học tổng hợp chất quang xúc tác được phân tán vào dung dịch (sol). Khi quá trình tổng hợp diễn ra, các hạt nano quang xúc tác sẽ hình thành và phân tán trong mạng lưới sợi polymer (gel) (Hình 1.11).



Hình 1.11. Tổng hợp và tích hợp chất quang xúc tác lên bề mặt vật liệu thông qua phương pháp sol-gel [137]

Dung dịch chứa các hạt quang xúc tác này có thể được sử dụng để tạo ra lớp màng mỏng trên bề mặt vật liệu mang (như thủy tinh, kim loại,...) thông qua các phương pháp như phủ nhúng (dip coating) hoặc phủ quay (spin coating). Trong quá

trình này, vật liệu có thể được sấy để đạt được mức độ trùng ngưng hoàn toàn, đồng thời cải thiện tính chất cơ học của lớp màng thu được [138]. So với các kỹ thuật khác, ưu điểm của sol-gel là quá trình cô đặc có thể thực hiện ở nhiệt độ thấp, giúp đơn giản hóa quy trình và giảm tiêu tốn năng lượng. 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 [138]. Vì vậy, phương pháp này là lựa chọn lý tưởng để tích hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên hạt EC trong nghiên cứu của chúng tôi.

1.7.2. Phương pháp tích hợp vi khuẩn trên vật liệu mang

a. Phương pháp liên kết cộng hóa trị (Covalent binding)

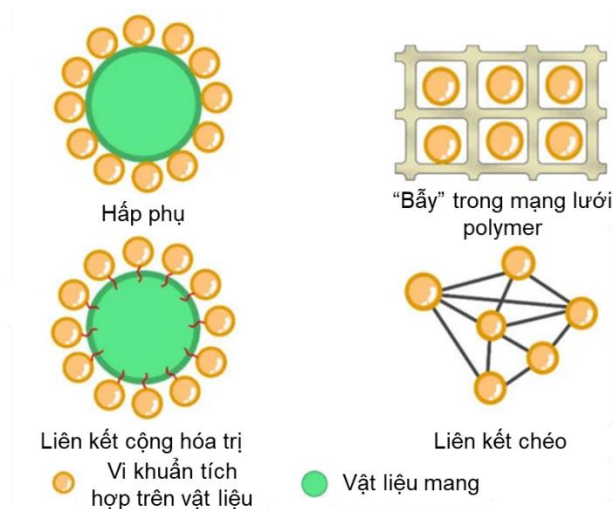
Phương pháp liên kết cộng hóa trị là kỹ thuật trong đó vi khuẩn được tích hợp lên bề mặt rắn thông qua sự hình thành các liên kết hóa học mạnh và ổn định (liên kết cộng hóa trị) với các nhóm chức năng trên bề mặt tế bào vi khuẩn. Phương pháp này thường được sử dụng trong các ứng dụng như cảm biến sinh học, xử lý môi trường và phân phối thuốc, cho phép vi khuẩn hoạt động ổn định và được kiểm soát trên bề mặt mong muốn. Không giống như hấp phụ, liên kết cộng hóa trị là phương pháp cố định không thể đảo ngược [139].

Quá trình tích hợp tế bào vi khuẩn thường được bắt đầu bằng việc kích hoạt bề mặt của vật liệu hỗ trợ bằng hợp chất hóa học như glutaraldehyde (GA) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) hay carbodiimide hydrochloride (EDC) để tạo ra các nhóm chức năng phù hợp để liên kết với các nhóm chức năng cụ thể trên màng tế bào vi khuẩn (như axit amin) để tạo thành liên kết cộng hóa trị, gắn chặt vi khuẩn vào bề mặt. Tuy nhiên, các tác nhân liên kết hoặc liên kết chéo sử dụng thường có độc tính và gây mất khả năng sống của tế bào, do đó, phương pháp liên kết cộng hóa trị chủ yếu được áp dụng để cố định enzym hơn là cố định toàn bộ tế bào. Mặt khác, nhược điểm chính của phương pháp cố định liên kết cộng hóa trị là trong hầu hết các trường hợp, các điều kiện cố định phức tạp cũng dẫn đến mất đáng kể hoạt động của enzyme thông qua việc thay đổi cấu trúc protein [140].

b. Phương pháp hấp phụ (Adsorption)

Hấp phụ được coi là kỹ thuật lâu đời và phổ biến nhất trong việc cố định tế bào nhờ quy trình thực hiện đơn giản. Quá trình này thường diễn ra qua hai giai đoạn: hấp phụ và hình thành màng sinh học. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc cố định ban đầu của vi sinh vật lên vật liệu mang chủ yếu được thúc đẩy bởi sự hấp phụ vật lý hoặc lực hút tĩnh điện. Lực hút tĩnh điện này có thể hình thành từ các tương tác yếu giữa các phân tử hữu cơ và các nhóm chức oxy trên bề mặt vật liệu mang với tế bào vi khuẩn. Trong khi đó, sự hấp phụ vật lý diễn ra thông qua lực Van der Waals và

liên kết hydro giữa vi sinh vật và bề mặt vật liệu [115].



Hình 1.12. Mô tả các phương pháp tích hợp vi khuẩn trên vật liệu mang [141]

Ở giai đoạn thứ hai, tính kỵ nước giữa các thành phần của vi khuẩn, như protein và lipopolysaccharides, với vật liệu mang cũng đóng vai trò thúc đẩy quá trình hấp phụ. Màng sinh học là sự kết hợp của các vi sinh vật gắn kết với chất nền hoặc tế bào khác thông qua ma trận polyme ngoại bào bảo vệ. Tùy thuộc vào loài vi khuẩn, sự hình thành màng sinh học (giai đoạn thứ hai) có thể diễn ra song song với quá trình hấp phụ (giai đoạn đầu tiên). Sự bám dính của vi khuẩn bám vào bề mặt có thể được hỗ trợ bởi lớp màng polyme ngoại bào (Hình 1.12). Khi vật liệu mang có cấu trúc rỗng, xốp, vi khuẩn có thể bám vào bề mặt bên trong và các lỗ rỗng của vật liệu, giúp bảo vệ các màng sinh học chứa vi khuẩn khỏi tác động của dòng nước, đồng thời tăng cường độ ổn định cho các tế bào vi khuẩn [142]. Phương pháp hấp phụ mang lại ưu điểm vượt trội so với các phương pháp khác nhờ quy trình đơn giản, hiệu quả và không yêu cầu bổ sung phụ gia hóa học có hại, giúp đảm bảo sự sống của tế bào sau khi được tích hợp. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là lực liên kết yếu giữa tế bào vi khuẩn và bề mặt vật liệu [143].

c. Phương pháp tích hợp vi khuẩn trong các mạng lưới polymer (Entrapment)

Trong phương pháp tích hợp này, các loại polyme tự nhiên và tổng hợp khác nhau như alginat, agar, agarose, kappa-carrageenan, polyacrylamide, cellulose, polysulfide (PVA), polyacrylamide hay carboxymethyl cellulose có thể được sử dụng làm chất mang để cố định tế bào vi khuẩn trong mạng lưới các mạch polymer của chúng. Mạng lưới polymer này có cấu trúc xốp, cho phép các chất ô nhiễm và sản phẩm trao đổi chất dễ dàng khuếch tán đến tế bào vi khuẩn; đồng thời đóng vai trò như một lớp màng bảo vệ, giúp giảm thiểu những tác động tiêu cực từ môi trường bên ngoài đối với sự sống của tế bào. Tuy nhiên, bên cạnh những đặc điểm có lợi nêu trên, các vật liệu polymer tự nhiên này rất nhạy cảm với dung môi hữu cơ, chỉ ổn định

trong phạm vi pH hẹp và có độ bền cơ học thấp [144].

Do đó, trong nghiên cứu này, nhằm nâng cao hiệu quả của quá trình tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên bề mặt vật liệu hạt EC, 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 EC. 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.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất chế tạo vật liệu

- Đất sét và vỏ trấu được thu mua tại vùng nông nghiệp tại Hà Nội sẽ sử dụng trong nghiên cứu chế tạo hạt đất sét EC (Expanded clay). Các hóa chất khác bao gồm TiCl_4 (0,09M in 20% HCl), NaBH_4 (99%), AgNO_3 (99%), alginate, Tetracycline (99%), Oxytetracycline hydrochloride (95%), được mua từ Aldrich-Sigma (St. Louis, MO, Hoa Kỳ). Kháng sinh Rifampicin (95%) được mua từ BioWorld (Dublin, Ohio, Hoa Kỳ).

2.1.2. Chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

2.1.2.1. Chủng vi sinh vật

- Các chủng vi khuẩn, 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: *Vibrio harveyi* VTCC 70222, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 và *Escherichia coli* ATCC 25922.
 - + Vi khuẩn có lợi *Lactobacillus acidophilus* LB.

được sử dụng trong nghiên cứu 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.

- Nhóm vi khuẩn khử nitrat/nitrit kỵ khí và hiếu khí được phân lập từ mẫu nước nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* ngày thứ 60 tại tỉnh Bạc Liêu. .

2.1.2.2. Môi trường nuôi vi khuẩn

- *V. harveyi* VTCC 70222 và *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 được hoạt hóa trên môi trường Thiosulfate–citrate–bile salts–sucrose (TCBS, Sigma-Aldrich, UK), sau đó nhân nuôi để thu sinh khối trên môi trường Luria-Bertani medium (LB, Sigma-Aldrich, UK) [145]. Bên cạnh đó, sinh khối của *E. coli* ATCC 25922 cũng được chuẩn bị riêng rẽ trên môi trường LB. Riêng chủng lợi khuẩn *L. acidophilus* được sinh trưởng trên môi trường MRS đặc trưng với thành phần gồm (g/L): Pepton (10), Cao thịt (10), cao nấm men (5), glucose (20), K_2HPO_4 (2), NH_4Cl (2), CH_3COONa (5), MgSO_4 (0,2), $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ (Ammonium Citrate Tribasic) (5), Tween (80-100 μl), pH - 6,5.

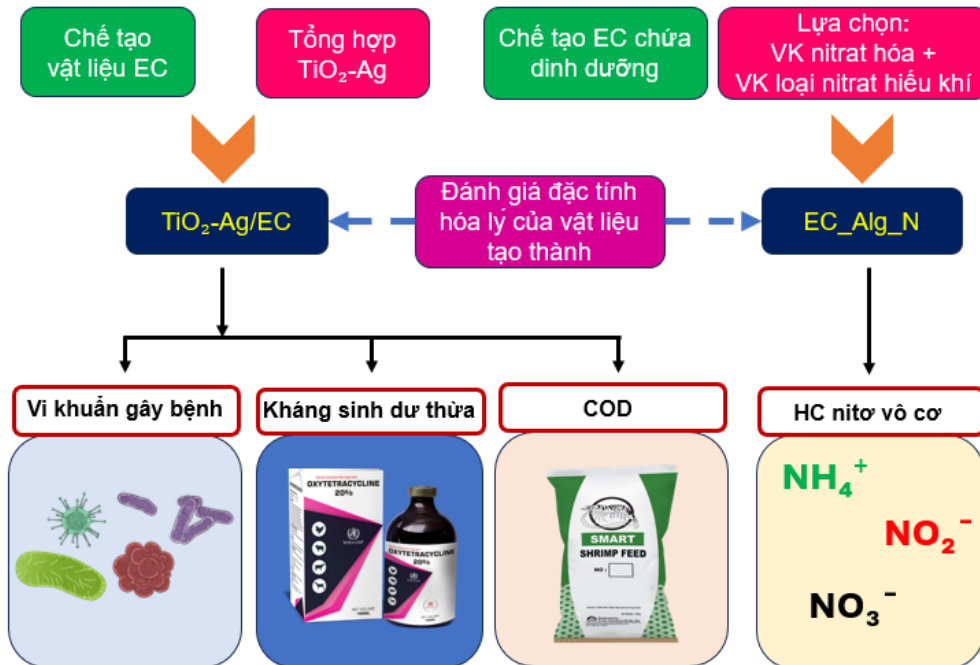
- Môi trường muối cơ bản (BSM) dùng để làm giàu, phân lập và kiểm tra hoạt tính chuyển hóa nitơ của nhóm vi khuẩn khử nitrat chứa (g/L) K_2HPO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NaCl (5) và 1 mL dung dịch nguyên tố vi lượng (g/L): H_3BO_3

(0,4), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4), CoCl_2 (0,05), $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,3), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,01) và $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5).

- Môi trường K1, K2 và K3 được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn oxy hóa amoni, vi khuẩn oxy hóa nitrit và vi khuẩn khử nitrat. Môi trường K1 chứa: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g-N/L, KH_2PO_4 0,07 g-P/L, CaCO_3 2 g/L, CH_3COONa 2 g/L, pH 7,8. Trong môi trường K2, thành phần $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được thay thế bằng NaNO_2 ở cùng nồng độ. Môi trường K3 gồm: NaCl 10‰, CH_3COONa 2 g/L, cao nấm men 0,1 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, pH 7-7,5 [146, 147, 148].

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, vật liệu EC với cấu trúc rỗng xốp sẽ được chế tạo nhằm tăng khả năng tích hợp chất quang xúc tác. Đồng thời, để thúc đẩy quá trình hình thành màng sinh học và hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn, vật liệu EC sẽ được biến đổi thành EC_Alg_N bằng cách bổ sung các dưỡng chất ở dạng nano. Song song với quá trình chế tạo vật liệu nền, chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sẽ được tổng hợp và tích hợp lên bề mặt EC. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat sẽ được tuyển chọn dựa trên hiệu quả xử lý amoni và nitrit, sau đó tích hợp vào vật liệu EC_Alg_N (Hình 2.1).



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu trong đề tài.

Hai loại vật liệu tích hợp sẽ được đánh giá thông qua các thử nghiệm:

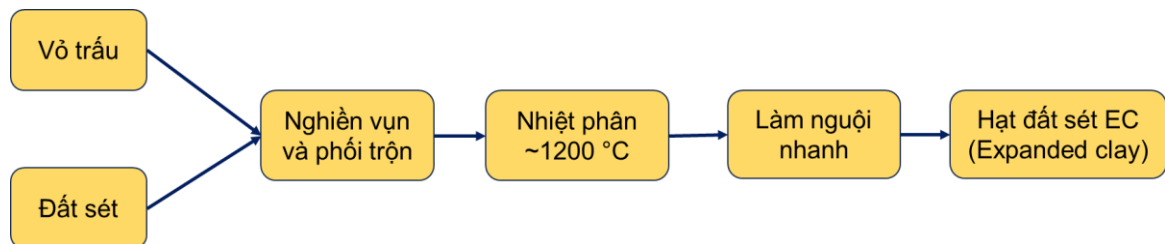
- Với vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, sẽ kiểm tra khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, phân hủy kháng sinh tồn dư và các hợp chất hữu cơ.

- Với vật liệu EC_Alq_N chứa vi khuẩn, sẽ đánh giá hiệu quả xử lý amoni và nitrit trong môi trường nuôi thủy sản.

2.2.1. Phương pháp chế tạo vật liệu hạt EC và EC cải tiến

2.2.1.1. Chế tạo vật liệu hạt EC

Hạt 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 rồi tạo hình các hạt có đường kính khoảng 1 cm. Các hạt này được 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 (Hình 2.2). Quá trình làm mát nhanh ngay sau đó sẽ cố định cấu trúc xốp của đất sét giãn nở (EC) [149]. Diện tích bề mặt riêng, thể tích và kích thước lỗ rỗng của các mẫu EC được xác định bằng cách sử dụng đường đẳng nhiệt hấp phụ vật lý N₂ ở 77 K (Tristar-3030 system, Micromeritics-US). Phân tích khối phổ plasma cảm ứng (ICP-MS) thiết bị Nexion 2000 của PerkinElmer (US) cũng được dùng để xác định hàm lượng Ti và Ag ban đầu tồn tại trong chất mang EC.

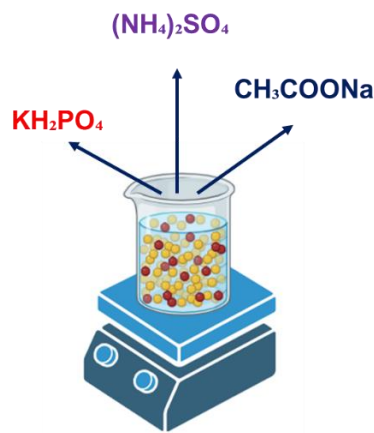


Hình 2.2. Sơ đồ thí chế tạo vật liệu EC.

2.2.1.2. Chế tạo vật liệu EC biến đổi chứa các dưỡng chất dưới dạng nano

Các chất N, P, K (dưỡng chất thông thường) dưới dạng hợp chất (NH₄)₂SO₄ KH₂PO₄ và nguồn cacbon natri axetat được hòa tan và phân tán đều trong dung dịch polymer alginat để tạo ra dung dịch dưỡng chất nano (Hình 2.3). Bổ sung các hạt EC đã tạo thành ở bước trên vào dung dịch dưỡng chất nano, khuấy từ nhẹ ở nhiệt độ phòng qua đêm rồi tách vật liệu khỏi dung dịch để sấy khô thêm 24 giờ ở 30°C. Lúc này vật liệu EC tạo thành đã được “phủ thêm lớp polymer alginat có chứa các dưỡng chất thiết yếu ở dạng nano, ký hiệu là vật liệu EC_Alq_N. Để khẳng định thêm khả năng kích thích của sự bổ sung dưỡng chất trên vật liệu đối với sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn, một loại chất mang khác, trong đó EC nguyên bản được bao phủ bởi lớp polymer alginat không có dưỡng chất nano cũng được chế tạo, ký hiệu là vật liệu EC_Alq.

Các đặc tính lý hóa của dung dịch dưỡng chất nano/alginate và cấu trúc của hạt EC_Alg_N cũng được xác nhận bằng các phương pháp như quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy) (FTIR-8400S, SHIMADZU, Nhật Bản), phổ tán xạ năng lượng tia X (EDX, Energy-dispersive X-ray spectroscopy) và kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM, Field Emission Scanning Electron Microscopes) (Hitachi Ltd. S-4800 Ibaraki, Nhật Bản). Ngoài ra, phân bố kích thước và thế zeta của dung dịch dưỡng chất nano/alginate được xác định thông qua kỹ thuật tán xạ ánh sáng động (DLS, Dynamic Light Scattering) trên thiết bị Malvern Nano-ZS ZEN 3600 zeta sizer (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Anh).

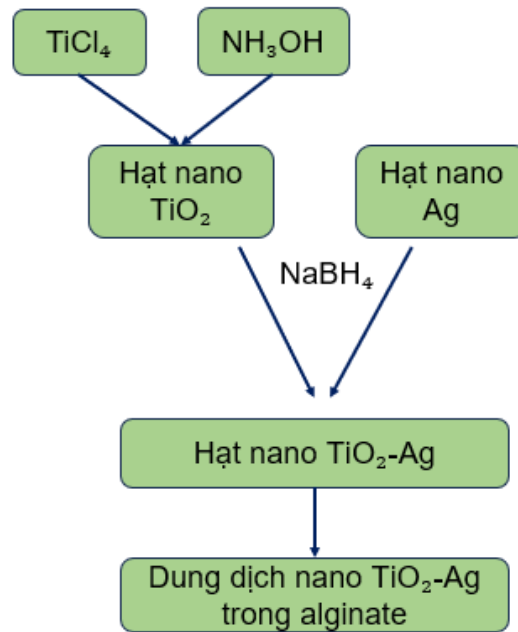


Hình 2.3. Minh họa quá trình tổng hợp dung dịch dưỡng chất dưới dạng nano.

2.2.2. Phương pháp tổng hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$

▪ Tổng hợp vật liệu

Các hạt nano TiO_2 được tổng hợp bằng phương pháp kết tủa dung dịch TiCl_4 với amoni hydroxit [150]. Tiếp đó, rửa lượng kết tủa thu được bằng nước đồng thời sử dụng máy siêu âm để loại bỏ tạp chất. Sấy khô mẫu ở 60°C trong 30 phút và nung nóng đến 500°C trong 2 giờ để tạo thành hạt nano TiO_2 . Đối với tổng hợp dung dịch nano Ag, sử dụng NaBH_4 9 mM (30 mL) để khử ion Ag^+ trong AgNO_3 2 mM (120 mL) về dạng Ag^0 , dung dịch hỗn hợp phản ứng được đặt trên máy khuấy từ ở tốc độ 350 vòng/phút trong 2 giờ. Sử dụng phương pháp khử hóa học các hạt nano bạc trên bề mặt nano TiO_2 để thu được vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Cụ thể: phân tán 0,4 g nano TiO_2 trong 100 mL nước cất bằng máy siêu âm trong 5 phút; tiếp đó chuyển cốc phản ứng sang máy khuấy từ và bổ sung thêm 5 mL NaBH_4 0,1 M. Hòa tan 5 mL dung dịch AgNO_3 0,1 M vào hỗn hợp này, khuấy liên tục ở tốc độ 350 vòng/phút trong 2 giờ. Cuối cùng, thêm 100 mL natri alginate 1% (w/v) và khuấy ở tốc độ 500 vòng/phút trong 24 giờ tiếp theo để tạo thành vật liệu composite nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trong alginate (Hình 2.4).



Hình 2.4. Sơ đồ tổng hợp chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$.

▪ **Đánh giá đặc trưng vật liệu**

Sử dụng phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier để phân tích cấu trúc phân tử của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trong khoảng bước sóng $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (Shimadzu FTIR Spectrometer 8000 series, SHIMADZU, Japan). Bên cạnh đó, cấu trúc tinh thể của các hệ nano tổng hợp ở trên cũng được kiểm tra bằng thiết bị Bruker D8-Advance (Bruker, Hoa Kỳ) với nguồn bức xạ $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), công suất 35 KV, góc quét 2θ từ 30° đến 70° , bước nhảy $0,02^\circ/4\text{s}$. Tiếp đó, 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 (ICP Mass Spectrometer, Nexion 2000, PerkinElmer, Hoa Kỳ). Phân tích quang phổ UV-vis thực hiện bằng máy quang phổ UV-6300PC (VWR, Radnor PA) 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, Dynamic light scattering) trên thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Vương quốc Anh). Hình thái của vật liệu được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM; Hitachi S-4800, Nhật Bản) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM; hệ thống JEOL JEM-1010 hoạt động ở 120 kV).

2.2.3. Tích hợp vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên chất mang EC

Chất mang EC được rửa với nước và sấy khô ở 60°C trong 5 giờ để loại bỏ bụi bẩn và tạp chất. Chuẩn bị các dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có nồng độ Ti khác nhau (20.000, 25.000, 30.000 hoặc 35.000 ppm). Bỏ 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. hàm lượng Ti và Ag đã tích hợp trên vật liệu EC ($\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$) được xác định bằng phương pháp phân tích quang phổ phát xạ plasma ghép nối khối phổ ICP-MS. Dựa trên kết quả thu được, so sánh để lựa chọn được điều kiện nồng độ dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ban đầu và thời gian tích hợp phù hợp sao cho đạt được hiệu quả tích hợp cao nhất.

2.2.4. Đánh giá khả năng xử lý ô nhiễm của vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm kiểm tra hoạt tính của vật liệu quang xúc tác được trong điều kiện chiếu sáng mặt trời. Thí nghiệm được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (tọa độ $21^\circ 02' 57.2''\text{N}$ $105^\circ 48' 06.8''\text{E}$) trong thời gian từ tháng 7-9/2024, cường độ ánh sáng và nhiệt độ trong khoảng 70 – 100 klux và $30\text{-}35^\circ\text{C}$.

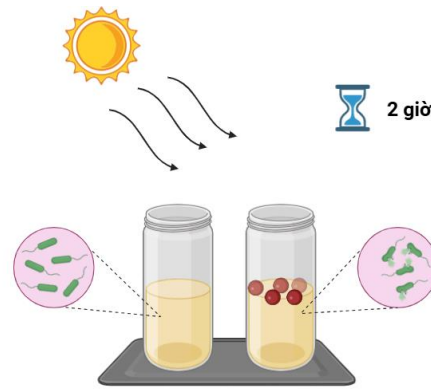
2.2.4.1. Khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh

Trong nghiên cứu này, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được sử dụng để đánh giá hoạt tính tiêu diệt một số loại vi khuẩn gây bệnh gồm: *V. harveyi* VTCC 70222, *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 và *Escherichia coli* ATCC 25922. Sinh khối các chủng này được hòa riêng rẽ trong nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%) để thu được các dung dịch vi khuẩn có mật độ 10^6 CFU/mL. Tiếp đến, bổ sung từng hạt vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ vào mỗi bình thủy tinh trong suốt chứa 5 mL các dịch vi khuẩn đã chuẩn bị. Bình thí nghiệm bổ sung vật liệu EC không tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được coi là đối chứng âm. Sau 2 giờ chiếu sáng dưới ánh nắng mặt trời, thu mẫu kiểm tra mật độ vi khuẩn còn lại trong bình để xác định 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 $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Sau mỗi thí nghiệm, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được rửa nhẹ với nước và để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong khoảng 24 giờ và sử dụng lại trong đợt thử nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm được lặp lại trong 7 chu kỳ theo phương pháp mô tả ở trên để đánh giá sự ổn định trong hoạt tính ức chế vi khuẩn của vật liệu.



Hình 2.5. Sơ đồ thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

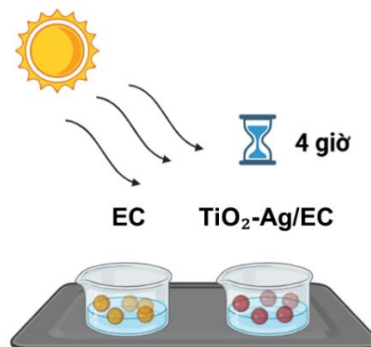
2.2.4.2. Khả năng phân hủy kháng sinh

a. Xác định hiệu suất phân hủy kháng sinh bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Khả năng quang xúc tác phân hủy kháng sinh của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được đánh giá với ba loại hợp chất gồm: Tetracycline (TET), Oxytetracycline (OTC) và Rifampicin (RIF). Trong đó, đối với mỗi loại kháng sinh, dung dịch phản ứng được chuẩn bị ở các nồng độ (10, 20 và 30 ppm) và pH (3, 5, 7 hay 9) khác nhau. Bổ sung 3 g vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ vào 30 mL dung dịch kháng sinh, khuấy từ nhẹ trong bóng tối 30 phút để đạt được trạng thái cân bằng hấp thụ, sau đó đặt bình phản ứng dưới ánh sáng mặt trời trong 4 giờ. Theo thời gian thí nghiệm, thu mẫu dịch và kiểm tra nồng độ kháng sinh TET, OTC và RIF còn lại bằng phép đo quang học lần lượt tại bước sóng UV 354, 352 và 335 sau 1, 2, 3 và 4 giờ. Trong mẫu đối chứng âm, vật liệu EC không chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được bổ sung thay cho $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$. 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 .



Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy kháng sinh của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

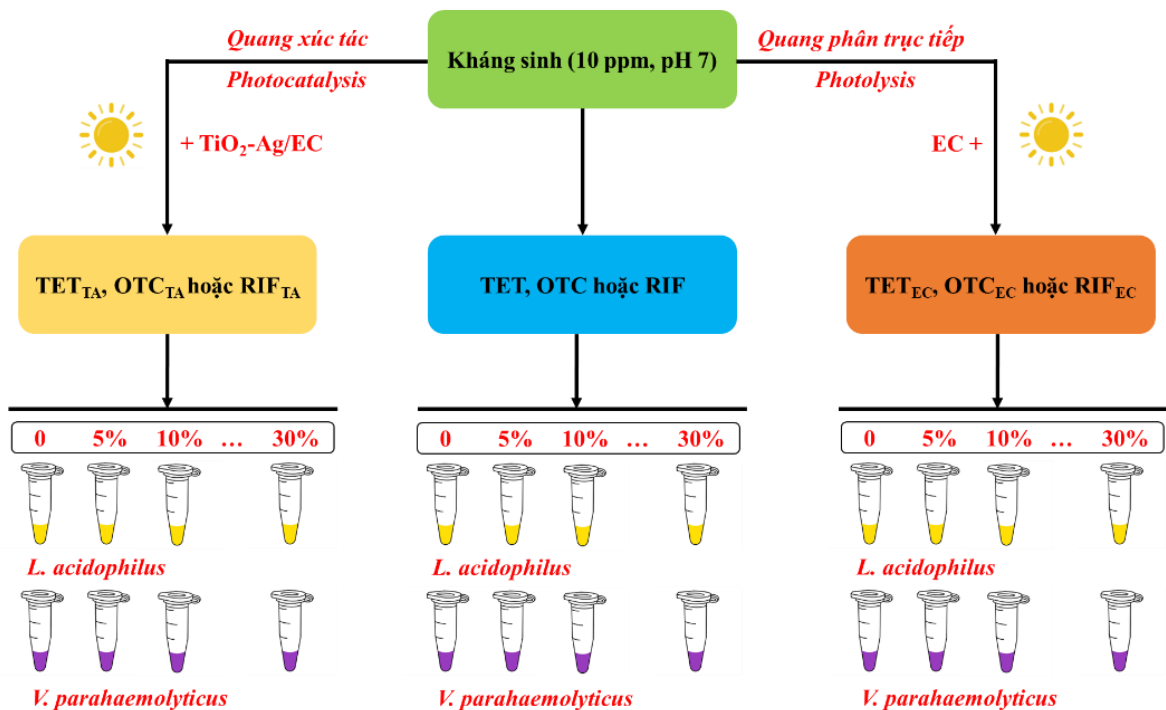
Bên cạnh hiệu suất xử lý, động học quá trình phân hủy của mỗi loại kháng sinh thử nghiệm được xác định bằng cách áp dụng mô hình động học bậc 1 (pseudo-first-order (PFO) kinetic model) với biểu thức:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right) = kt$$

trong đó, k là hằng số tốc độ phản ứng phân hủy kháng sinh

b. Xác định ảnh hưởng của dung dịch kháng sinh sau khi phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến sinh trưởng của vi khuẩn

Sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Vibrio parahaemolyticus* VTCC 910192 với nồng độ 10^5 CFU/mL được bổ sung (2% v/v) vào các ống eppendorf chứa 100 μL môi trường tương ứng cho mỗi chủng vi khuẩn là MRS và LB. Tiếp đó, dung dịch kháng sinh TET, OTC và RIF (10 ppm, pH 7) sau khi phân hủy bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, ký hiệu là TET_{TA} , OTC_{TA} và RIF_{TA} , được pha loãng sử dụng môi trường MRS hoặc LB để bổ sung lần lượt bổ sung vào từng ống vi khuẩn đã chuẩn bị sao cho đạt các nồng độ kháng sinh khác nhau là 0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30% v/v (Hình 2.7).



Hình 2.7. Sơ đồ thí nghiệm kiểm tra ảnh hưởng của dung dịch kháng sinh sau khi phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến sinh trưởng của vi khuẩn.

Đồng thời, trong thí nghiệm này, các ống vi khuẩn bổ sung: (1) – dung dịch kháng sinh được quang phân bởi ánh sáng khi bổ sung vật liệu EC không chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, ký hiệu là TET_{EC} , OTC_{EC} và RIF_{EC} hoặc (2) – dung dịch TET, OTC và RIF ở

nồng độ 10 ppm, pH 7 cũng được chuẩn bị để so sánh ảnh hưởng của các dung dịch TET_{TA}, OTC_{TA} và RIF_{TA} so với dung dịch kháng sinh gốc và dung dịch TET_{EC}, OTC_{EC} và RIF_{EC} đến sinh trưởng của vi khuẩn (Hình 13). Trong đó, ống thí nghiệm mà vi khuẩn được sinh trưởng trong môi trường không bổ sung kháng sinh được coi là đối chứng âm. Mô hình thí nghiệm được thể hiện trong Hình 10. Sau 24 giờ được nuôi trong tủ ấm 35 °C, thu mẫu đo độ đục của dịch vi khuẩn tại bước sóng 600 nm. Các ống thí nghiệm có bổ sung kháng sinh mà tại đó có giá trị OD600 nm khác biệt, nhỏ hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với mẫu đối chứng âm thì nồng độ kháng sinh trong ống được coi là nồng độ tối thiểu để ức chế vi khuẩn.

2.2.4.3. Khả năng xử lý hợp chất hữu cơ

a. Ảnh hưởng của nồng độ COD ban đầu đến hiệu suất xử lý của TiO₂-Ag/EC

+ Dung dịch COD gốc có nồng độ tương đương 250 mg/L được chuẩn bị bằng cách bổ sung thức ăn cho tôm (Tomboy, Skretting Việt Nam) vào môi trường nước với tỷ lệ 0,07% w/v sau đó tiến hành khử trùng [151].

+ Sử dụng dung dịch COD gốc này tạo ra các môi trường mô phỏng nuôi thủy sản có mức ô nhiễm hữu cơ khác nhau (25, 50 và 100 mg/L).

+ Bổ sung vật liệu TiO₂-Ag/EC với tỷ lệ 10% w/v vào mỗi dung dịch COD đã chuẩn bị và đặt dưới ánh sáng mặt trời trong thời gian 8 tiếng/ngày (khung giờ từ 8h30 sáng đến 16h30 chiều).

+ Thu mẫu dịch để kiểm tra nồng độ COD còn lại trong môi trường sau mỗi 8 giờ chiếu sáng theo phương pháp mô tả bởi LaPara *et al.* (2000) [152].

+ Hiệu suất làm giảm COD được tính theo phương trình:

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

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

b. Ảnh hưởng của tỷ lệ vật liệu TiO₂-Ag/EC bổ sung đến hiệu suất xử lý

+ Chuẩn bị 6 cốc đựng thủy tinh trong suốt, mỗi cốc được bổ sung 1 lít dung dịch có nồng độ COD 100 mg/L.

+ Bổ sung các tỷ lệ khác nhau (0,5; 1, 2,5; 5 và 7,5% w/v) của vật liệu TiO₂-Ag/EC vào mỗi cốc rồi tiến hành quá trình quang xúc tác phân hủy dưới ánh sáng mặt trời.

+ Thu mẫu dịch để kiểm tra nồng độ COD, amoni, nitrit còn lại trong môi trường sau mỗi 8 giờ chiếu sáng. Dựa trên kết quả thu được để lựa chọn ra nồng độ bổ sung vật liệu quang xúc tác phù hợp để đạt được hiệu quả phân hủy COD cao.

2.2.5. Nhóm phương pháp lựa chọn các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitơ phù hợp để tích hợp trên vật liệu EC

2.2.5.1. Làm giàu nhóm vi khuẩn khử nitrat

Thí nghiệm làm giàu được thực hiện dựa trên phương pháp mô tả bởi Motamedi *et al.* [153]. Bổ sung 10 mL mẫu nước nuôi tôm đã thu thập vào 90 mL môi trường BSM (pH~ 6,5-7) chứa 10 mgN-NO₃/L, bình nuôi vi khuẩn được sục khí N₂ để loại O₂, đậy kín bằng nút cao su, khuấy từ liên tục để đảo trộn môi trường, nuôi ở 35 °C trong 6-7 ngày. Glucose (2 g/L) được dùng làm nguồn cacbon chính trong môi trường BSM để hỗ trợ sự sinh trưởng của vi khuẩn. Sau khi làm giàu, mẫu dịch nuôi được pha loãng 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ và 10⁻⁵ lần trong lọ penicillin và cấy trải lên môi trường BSM thạch (agar 2%). Sau 72 giờ tiếp theo, từng khuẩn lạc vi khuẩn xuất hiện trên bề mặt thạch được phân tách và nuôi cấy riêng rẽ trên các đĩa thạch mới để thu được chủng sạch.

2.2.5.2. Đánh giá khả năng khử nitrat/nitrit của các chủng vi khuẩn phân lập

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

Khả năng khử nitrat/nitrit trong điều kiện yếm khí của các chủng vi khuẩn phân lập được tiến hành bằng phương pháp tương tự như đã nêu ở trên, tuy nhiên, các bình thí nghiệm trước khi nuôi cấy được sục bằng khí N₂ 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 nuôi cấy để xác định hoạt tính khử nitrat/nitrit trong điều kiện yếm khí của vi khuẩn.

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

Khả năng khử nitrat hiếu khí của các chủng phân lập được đánh giá bằng cách cấy chuyển riêng rẽ 1 mL sinh khối mỗi chủng vi khuẩn đã phân lập (~10⁶ CFU/mL) vào 9 mL môi trường BSM chứa 20 mgN-NO₃/L. Glucose (2 g/L) được sử dụng làm nguồn cacbon chính trong môi trường. Ngoài ra, để xác định hoạt tính loại bỏ nitrit của vi khuẩn, các thí nghiệm tương tự cũng được tiến hành trong đó nguồn nitơ NaNO₃ được thay thế bằng NaNO₂. Các bình thí nghiệm chứa vi khuẩn này được đặt trong điều kiện nhiệt độ 35 °C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 72 giờ nuôi, sự sinh trưởng của tế bào vi khuẩn được xác định dựa trên giá trị OD tại bước sóng 600 nm (UV-1601, Shimadzu, Nhật Bản). Để đo hàm lượng nitrat và nitrit còn lại, các mẫu dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 5 phút, sau đó phân tích theo phương pháp Griss và Salicylate [154].

2.2.5.3. Xác định hình thái và vị trí phân loại của vi khuẩn khử nitrat

Để quan sát hình thái tế bào các chủng vi khuẩn khử nitrat đã phân lập, khuẩn lạc của mỗi chủng được đưa vào 50 µL nước đã khử trùng và nhỏ lên miếng

silicon (kích thước 5 mm x 5 mm, Namkang Hi-Tech Co., Ltd). Các mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trước khi phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) (Hitachi S-4800 High-Resolution Scanning Electron Microscope).

Xác định vị trí phân loại chủng bằng phương pháp sinh học phân tử sử dụng gen 16S rRNA: DNA tổng số của mỗi chủng vi khuẩn cũng được tách chiết bằng Bộ kit Power Soil Isolation Kit (Mo Bio) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn gen 16S rRNA với kích thước khoảng 1500 bp được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp mồi 27f/1527r (27f 5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; 1527r 5' AGAAAGGAGGTGATCCAG CC 3') và giải trình tự tại Phòng thí nghiệm trọng gen (IBT, VAST). Trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn khử nitrat phân lập trong nghiên cứu này được so sánh độ tương đồng với trình tự gen của các chủng vi khuẩn có quan hệ gần gũi với chúng bằng phần mềm CLUSTALW. Từ đó, sử dụng chương trình MEGA 6.06 để xây dựng cây phát sinh loại của các chủng vi khuẩn khử nitrat này.

2.2.5.4. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng loại bỏ nitrit của vi khuẩn

Các thông số khác nhau bao gồm độ mặn (0, 15, 20, 30, 40 ‰), nhiệt độ (4, 20, 30, 35 và 40 °C) và các nguồn cacbon (glucose, lactose, saccharose, natri axetat và natri citrat) lần lượt được sử dụng làm điều kiện nuôi cấy của các chủng vi khuẩn để đánh giá ảnh hưởng của chúng đối với hoạt tính loại bỏ nitrit của vi khuẩn. Đối chứng âm tính trong mỗi thí nghiệm là mẫu chỉ chứa môi trường đã khử trùng mà không bổ sung thêm sinh khối vi khuẩn. Nồng độ nitrit ban đầu trong môi trường là 20 mgN/L. Thí nghiệm được lặp lại ba lần theo phương pháp đã mô tả ở mục 2.2.5.2.

2.2.5.5. Phương pháp nhuộm Gram và đánh giá khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn

▪ Phương pháp nhuộm Gram

Các chủng vi khuẩn được hoạt hóa qua đêm trên môi trường MPA và được nhuộm Gram theo mô tả của Gilligan *et al.*[155].

▪ Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn

Khả năng tạo màng sinh học (biofilm) của các chủng vi khuẩn được phát hiện dựa vào sự bắt màu của tím tinh thể trên các ống eppendorf và được định lượng khi đo độ hấp thụ ở bước sóng OD₅₇₀. Giá trị OD₅₇₀ tỉ lệ thuận với khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn [156].

2.2.5.6. Phương pháp đánh giá tính đối kháng lẫn nhau của các chủng vi khuẩn chuyển hóa nito nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn được cấy lên cùng đĩa petri chứa môi trường thạch K1 bổ sung nguồn carbon hữu cơ natri axetat. Các đường cấy vi khuẩn được vạch sao cho

đường cấy của chủng này gần sát với vạch cấy của các chủng còn lại nhưng không chạm nhau. Đĩa thạch sau đó được ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 35 °C trong 2-5 ngày. Sau thời gian nuôi, trong trường hợp các chủng vi khuẩn có tính đối kháng lẫn nhau sẽ hình thành nên vùng ức chế xung quanh các vạch cấy tại điểm giao cắt, đồng thời không có sự xuất hiện của vi khuẩn trong vùng này [157].

2.2.6. Phương pháp tích hợp các nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu

Phương pháp tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu EC_Alge_N được thực hiện theo thứ tự các bước dưới đây:

Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn oxi hóa amoni (bao gồm *Nitrosomonas* sp. PD60, *Nitrosomonas* sp. PD58), vi khuẩn oxi hóa nitrit (bao gồm *Nitrobacter* sp. 2 NM, *Nitrobacter* sp. 5 NM) và vi khuẩn khử nitrat (*Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26) trên các môi trường tương ứng K1, K2 và K3; tiếp theo phối trộn dịch sinh khối các nhóm vi khuẩn tạo thành theo tỷ lệ 1:1:1 để đạt được mật độ vi khuẩn tổng số tương đương 10^5 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 trước khi sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Vật liệu tích hợp vi khuẩn tạo thành được rửa nhẹ với nước cất rồi nghiền vụn và bổ sung (1 g) vào 9 mL nước cất khử trùng, lắc 70v/phút, trong 15 phút. Sau đó, dung dịch được pha loãng tới hạn và cấy trải trên ba loại môi trường thạch K1, K2 và K3 để đếm số lượng khuẩn lạc tương ứng với các nhóm vi khuẩn oxi hóa amoni, oxi hóa nitrit và khử nitrat tạo thành (CFU) [158]. Thành phần của các môi trường K1, K2 và K3 được đề cập trong mục 2.1.

Ngoài ra các mảnh vật liệu EC đã nghiền vụn tích hợp vi khuẩn đó được được sấy nhẹ ở 37 °C trong 2 giờ, sau đó cố định trên giá đỡ mẫu và phủ một lớp Platinum (Pt) mỏng để quan sát hình ảnh tế bào vi khuẩn bằng kính hiển vi điện tử quét (Hitachi Ltd. S-4800 Ibaraki, Nhật Bản).

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

2.2.7.1. Ảnh hưởng của nồng độ amoni, nitrit ban đầu đến hiệu suất xử lý

Vật liệu EC đã tích hợp vi khuẩn (đường kính ~ 1 cm, nặng 1 g) 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. Bình thí nghiệm bổ sung vật liệu EC không tích hợp vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng âm. Đối chứng dương là các dịch hỗn hợp vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat

có nồng độ vi khuẩn tổng số tương đương bổ sung vào môi trường để so sánh hiệu suất chuyển hóa nitơ của vi khuẩn ở dạng tự do và dạng đã được tích hợp trên vật liệu. Xác định các thành phần amoni, nitrit còn lại trong môi trường theo phương pháp Phenate và Griess [159], [160] tại thời điểm bắt đầu và sau 24 giờ theo dõi.

Mỗi thí nghiệm diễn ra trong 24 giờ như mô tả ở trên được coi là một chu kỳ sử dụng của vật liệu. Với mục đích đánh giá khả năng tái sử dụng vật liệu tích hợp vi khuẩn trong xử lý ô nhiễm nitơ, các loại vật liệu đã sử dụng trong chu kỳ thứ nhất được tách ra khỏi môi trường cũ và chuyển vào môi trường mới để tiếp tục xác định hiệu suất chuyển hóa amoni, thí nghiệm được kéo dài qua sáu chu kỳ. Trong thí nghiệm này, môi trường được bổ sung đồng thời amoni và nitrit với tỷ lệ 1:1 để đạt nồng độ nitơ 10 mg-N/L.

2.2.7.2. Đánh giá hoạt tính loại bỏ amoni và nitrit của vật liệu EC_Al_g_N tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên mô hình 50 lít

Vật liệu EC_Al_g_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* ở tỉnh Bạc Liêu, Việt Nam. Dịch sinh khối vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat (ở dạng tự do, được coi là đối chứng dương) có mật độ tế bào tương đương với vi khuẩn đã tích hợp trên vật liệu EC_Al_g_N cũng được bổ sung vào bể thí nghiệm số 2. Hoạt động của hai bể thí nghiệm được chia thành ba giai đoạn liên tiếp nhau, mỗi giai đoạn kéo dài trong 7 ngày. Amoni ((NH₄)₂SO₄) và nitrit (NaNO₂) 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 N-NH₄⁺/N-NO₂⁻ là 1: 1) lần lượt trong các Giai đoạn I, II và III. Nồng độ NH₄⁺, NO₂⁻ và NO₃⁻ được đo vào ngày 1, 3 và 7 của mỗi giai đoạn bằng các phương pháp Phenate, Griess và Salicylate tương ứng.

2.2.8. Phương pháp thử nghiệm tích hợp vi khuẩn khử nitrat trên TiO₂-Ag/EC

2.2.8.1. Ảnh hưởng của TiO₂-Ag/EC đến sinh trưởng của vi khuẩn khử nitrat

Trong nghiên cứu này, ba loại vật liệu gồm EC nguyên bản (ký hiệu EC), EC chứa TiO₂-Ag (ký hiệu TiO₂-Ag/EC) và EC chứa TiO₂-Ag được phủ thêm lớp polymer chitosan (ký hiệu (TiO₂-Ag)c/EC)) đã được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của chúng đối với vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và vi khuẩn khử nitrat *Bacillus* sp. ST20, *Bacillus* sp. ST26. Sinh khối vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và vi khuẩn khử nitrat *Bacillus* sp. ST20, *Bacillus* sp. ST26 được hòa riêng rẽ trong nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,9%) để thu được các dung dịch vi khuẩn có nồng độ 10⁶ CFU/mL. Tiếp theo dịch sinh khối của mỗi loại

vi khuẩn được chia vào nhiều bình thí nghiệm (5 mL/bình), mỗi bình được bổ sung thêm 1 loại vật liệu EC có chứa chất quang xúc tác và chiếu sáng bằng đèn halogen (Tungsten, 400 W) để mô phỏng sự kích thích của ánh sáng khả kiến đến vật liệu quang xúc tác. Bình thí nghiệm chứa dịch vi khuẩn nhưng không bổ sung thêm vật liệu được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 2 giờ chiếu sáng, thu mẫu xác định tỷ lệ sống của mỗi chủng vi khuẩn theo công thức:

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

2.2.8.2. Tích hợp vi khuẩn khử nitrat lên vật liệu TiO₂-Ag/EC

Dịch sinh khối vi khuẩn khử nitrat, *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26 với mật độ khoảng 10⁸ CFU/mL được phối trộn với tỷ lệ 1:1, sau đó natri alginat (0,5% w/v) được phân tán vào hỗn hợp vi khuẩn này ở tốc độ 75 vòng/phút trong 2 giờ để tạo thành dung dịch đồng nhất. Các vật liệu, bao gồm EC nguyên bản, TiO₂-Ag/EC và (TiO₂-Ag)c/EC được đưa vào hỗn hợp dịch vi khuẩn/natri alginat đã chuẩn bị và nuôi tĩnh ở 35 °C trong tủ ấm. Trong thí nghiệm này, vật liệu EC nguyên bản đóng vai trò là đối chứng dương để đánh giá tác động của các hạt nano TiO₂-Ag trên TiO₂-Ag/EC và (TiO₂-Ag)c/EC đến khả năng đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrat của vật liệu. Sau mỗi 24 giờ, thu mẫu các vật liệu để xác định ảnh hưởng của thời gian tích hợp đến mật độ vi khuẩn và hoạt tính loại bỏ nitrit của vật liệu đồng tích hợp tạo thành. Phương pháp kiểm tra mật độ vi khuẩn đã tích hợp trên vật liệu được thực hiện theo mô tả tại mục 2.2.6.

Vật liệu đồng tích hợp vi khuẩn và chất quang xúc tác TiO₂-Ag (~ 1 g vật liệu) được thêm vào bình thí nghiệm thể tích 15 mL chứa 10 mL môi trường có nồng độ nitrit 5 mgN/L và nuôi ở 35 °C. Bình thí nghiệm chứa vật liệu không tích hợp vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 3 ngày, thu mẫu kiểm tra nồng độ nitrit còn lại trong môi trường bằng phương pháp Grissess [159] và tính hiệu suất xử lý nitrit của mỗi loại vật liệu thử nghiệm.

2.2.9. Phương pháp hóa học

2.2.9.1. Định lượng amoni trong nước lợ theo phương pháp Phenate [154]

Phương pháp xác định dựa trên nguyên tắc tạo phức hợp màu xanh đậm với giữa amoni với thuốc thử chứa hypochlorite và sodium nitroprusside.

Hóa chất: Dung dịch phenol: trộn 11,1 mL dung dịch phenol nóng (89%) với ethyl alcohol 95% (v/v) đến thể tích cuối cùng là 100 mL; dung dịch sodium nitroprusside 0,5% (w/v), đựng trong chai màu sẫm để tối đa 1 tháng; dung dịch alkaline citrate: hoà 200 g trisodium citrate và 10 g NaOH trong nước khử ion đến

thể tích cuối cùng là 1 lít; dung dịch sodium hypochloride 5% (sản phẩm thương mại); dung dịch oxy hoá: trộn 100ml dung dịch alkaline citrate với 25 mL dung dịch sodium hypochloride, chuẩn bị hằng ngày; dung dịch chuẩn gốc N-NH_4 1 g/L.

Hỗn hợp phản ứng chứa 1 mL dung dịch phenol, 1 mL dung dịch sodium nitroprusside, 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.

Hàm lượng NH_4^+ trong dung dịch nghiên cứu được tính theo công thức:

$$[\text{NH}_4^+](\text{mg/L}) = [\text{OD}_{\text{mẫu}}.1/\text{OD}_{\text{chuẩn}}. \text{Nồng độ chuẩn (mg/L)}]. \text{Độ pha loãng.}$$

2.2.9.2. Định lượng nitrit trong nước theo phương pháp Grisses [154]

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

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

Tiến hành: Thêm 0,05ml Griss I và 0,05 mL 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 tỷ lệ thuận với nồng độ nitrite. Lượng nitrite có trong mẫu nghiên cứu tính được dựa vào đồ thị chuẩn sử dụng dung dịch N-NO_2 5 mg/L.

Hàm lượng NO_2^- trong dung dịch mẫu được tính bằng công thức:

$$[\text{NO}_2^-] (\text{mg/L}) = [\text{OD}_{\text{mẫu}}.1/\text{OD}_{\text{chuẩn}}. \text{Nồng độ chuẩn (mg/L)}]. \text{Độ pha loãng.}$$

2.2.9.3. Định lượng nitrat trong nước theo phương pháp Salycilate [154]

Phương pháp này dựa trên phản ứng màu của NO_3^- và hợp chất brucine tạo phức hợp màu vàng có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420 nm.

Thuốc thử: Sodium salycilate 0,5%, H_2SO_4 98%, NaOH 30%, NaOH 2,5%, nước cất.

Tiến hành: Lấy 10 mL mẫu nghiên cứu cho vào cốc đốt (cốc sứ, $v = 25$ mL). Thêm 1 mL dung dịch sodium salycilate 0,5%. Đun nhẹ cho đến khi cạn và để nguội đến nhiệt phòng. Thêm 1 mL H_2SO_4 98%, để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 8 mL nước cất, để nguội đến nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 7 mL NaOH 30% và 9 mL NaOH 2,5%.

Nếu trong dung dịch có NO_3^- sẽ xuất hiện màu vàng chanh. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng NO_3^- trong dung dịch. Sau 20 phút phản ứng kết thúc đo độ hấp thụ ở bước sóng 420nm. Cường độ màu tỷ lệ thuận với nồng độ nitrate. Lượng

nitrate có trong mẫu nghiên cứu tính được dựa vào đồ thị chuẩn sử dụng dung dịch N-NO₃ 5 mg/L.

Hàm lượng NO₃⁻ được tính theo công thức:

$$[\text{NO}_3^-] \text{ (mg/L)} = [\text{OD}_{\text{mẫu}} / \text{OD}_{\text{chuẩn}} \cdot \text{Nồng độ chuẩn (mg/L)}] \cdot \text{Độ pha loãng}$$

2.2.10. Phương pháp xử lý thống kê

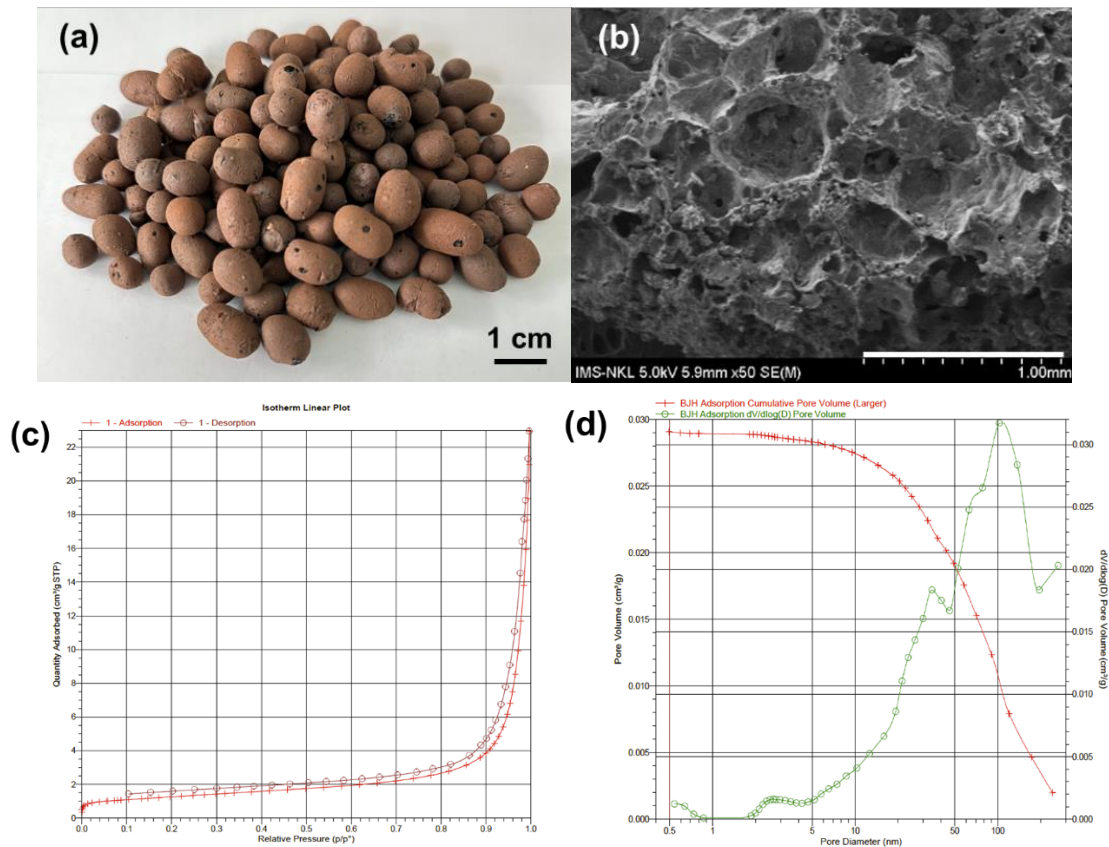
Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần. Kết quả số liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD (n = 3). Kiểm định T-test được sử dụng để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các kết quả thu được giữa các mẫu thí nghiệm ($p < 0,05$).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

3.1.1. Chế tạo vật liệu EC

Trong nghiên cứu này, vật liệu EC được chế tạo thông qua quá trình nhiệt phân hỗn hợp đất sét và vỏ trấu. Việc sử dụng hai loại nguyên liệu sẵn có tại các vùng nông nghiệp ở Việt Nam sẽ giúp tiết kiệm chi phí sản xuất hơn so với các nguyên liệu tổng hợp nhân tạo. Trong quá trình chế tạo, sự đốt cháy thành phần hữu cơ tồn tại trong vỏ trấu cùng với sự giãn nở của đất sét ở nhiệt độ cao 1200 °C và hạ nhiệt nhanh sẽ tạo nên vô số các khoang rỗng bên trong vật liệu như đã trình bày ở phần vật liệu và phương pháp. Kích thước của các lỗ rỗng này sẽ được cố định khi vật liệu được làm nguội nhanh.



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).

Sản phẩm chất mang EC tạo thành có hình tròn bầu dục với trọng lượng trung bình $1,2 \pm 0,35$ g (Hình 3.1 a). Phép đo Brunauer-Emmett-Teller (BET) cho thấy vật liệu EC có diện tích bề mặt riêng $4,4 \pm 0,12$ m²/g và kích thước lỗ rỗng là $25,1 \pm 0,05$ nm với thể tích khoảng $0,027 \pm 0,005$ cm³/g. Số liệu phân tích phù hợp với các đặc điểm hình thái quan sát được trên EC thông qua chụp ảnh hiển vi điện tử FESEM (Hình 3.1 b). Mặc dù, so với nghiên cứu của Dutra et al., vật liệu EC đã chế

tạo có diện tích bề mặt riêng nhỏ hơn giá trị $7,02 \text{ m}^2/\text{g}$ của gốm ceramic, nhưng việc tăng đường kính lỗ xốp từ $1,84 \text{ nm}$ lên $25,1 \pm 0,05 \text{ nm}$ trên vật liệu EC là một đặc điểm có lợi để tạo điều kiện cho việc tích hợp hạt quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ hay các nhóm vi khuẩn xử lý môi trường lên vật liệu [161]. Theo phân loại của IUPAC [162], đường đẳng nhiệt hấp phụ của EC thuộc dạng hấp phụ H3 (Hình 3.1 c). Khả năng hấp phụ của vật liệu EC tăng dần theo áp suất tương đối P/Po và lượng hấp phụ dao động từ $1,95$ đến $22,95 \text{ g/cm}^3$ STP (số phân tử khí chiếm trong 1 cm^3 ở điều kiện nhiệt độ, áp suất thường). Khi áp suất tương đối vượt quá $0,9$, các đường cong hấp phụ tăng nhanh, cho thấy sự hiện diện của số lượng lớn các lỗ rỗng trong vật liệu EC [163].

Thông qua kết quả khảo sát đặc trưng tính chất vật liệu, có thể thấy rằng hạt EC được chế tạo có cấu trúc rỗng với nhiều lỗ xốp phân bố đều, giúp tăng diện tích bề mặt tiếp xúc. Đặc điểm này rất phù hợp cho việc tích hợp vi khuẩn hoặc các hạt nano quang xúc tác, tạo điều kiện thuận lợi cho các quá trình xử lý sinh học và quang hóa phân hủy chất ô nhiễm. Bên cạnh đó, tính nổi của hạt EC giúp chúng duy trì trên bề mặt nước, từ đó tối ưu hóa khả năng tiếp xúc với oxy và ánh sáng, đây là hai yếu tố then chốt trong các quá trình oxy hóa sinh học và quang xúc tác. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong môi trường nuôi thủy sản, nơi cần kết hợp cả vi sinh vật và chất quang xúc tác để xử lý các chất ô nhiễm hữu cơ cũng như các hợp chất nitơ vô cơ độc hại như amoni và nitrit.

3.1.2. Cải tiến vật liệu EC tích hợp các dưỡng chất dưới dạng nano (EC_Alg_N)

Hiện nay, nhiều loại vật liệu tự nhiên hay tổng hợp đã nghiên cứu làm giá thể cho sự bám dính của vi sinh vật để ứng dụng trong các hệ thống xử lý nước sinh học, trong đó các polyme tự nhiên như chitosan, alginate đang được sử dụng rộng rãi trong nhiều mô hình xử lý nước thải. Tuy nhiên, bên cạnh tác dụng có lợi, các polyme tự nhiên này rất nhạy cảm với dung môi hữu cơ, chỉ ổn định trong phạm vi pH hẹp và có độ bền cơ học thấp. Do cấu trúc của chúng dễ dàng bị phá vỡ trong quá trình sử dụng [164]. Mặt khác, các chất mang nhựa thường thiếu cấu trúc xốp làm giảm hiệu quả bám dính của vi khuẩn lên vật liệu. So sánh hiệu quả loại bỏ nitơ của các vật liệu khác nhau trong hệ thống lọc nhỏ giọt (trickling filters system), Lekang *et al.* (2000) đã chứng minh hiệu quả xử lý cao, đạt đến 100% khi sử dụng vật liệu EC so với khi sử dụng chất mang nhựa như vòng Kaldnes hoặc vòng Norton chỉ đạt hiệu suất lần lượt là 80% và 60% [165]. Thông thường, thời gian cần thiết để vi khuẩn oxy hóa nitrit có thể tích hợp một cách tự nhiên trên bề mặt chất mang sẽ mất 30-45 ngày [166]. Khi vi khuẩn tiếp xúc với bề mặt vật liệu, chúng sẽ tiết ra các polymer ngoại bào tạo thành màng sinh học giúp dễ dàng bám dính trên bề mặt vật liệu [167]. Do đó, trong xử lý nước thải, vật liệu mang vi khuẩn lý tưởng không chỉ cần có bề mặt

phù hợp để tăng cường khả năng tích hợp vi khuẩn mà còn cần phải có cấu trúc hợp lý để bảo vệ màng sinh học vi khuẩn trước áp lực nước. Ngoài ra, các nghiên cứu cho thấy thành phần dưỡng chất là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và hình thành màng sinh học của vi khuẩn [168, 169, 170]. Vì vậy, bên cạnh việc tạo ra loại vật liệu mang vi khuẩn có cấu trúc bền vững, thì việc tích hợp thêm dưỡng chất cần thiết vào cấu trúc đó là một điểm nhấn cần được chú ý để hỗ trợ quá trình hình thành màng sinh học và tương tác với môi trường bên ngoài của vi khuẩn.

Để đạt được mục đích nêu trên, nghiên cứu của chúng tôi hướng đến việc chế tạo loại vật liệu EC, có đặc tính dạng xốp, nhiều lỗ rỗng để có thể tăng khả năng gắn vi khuẩn lên vật liệu, đồng thời còn có thể nổi và dễ dàng tái sử dụng. Các vật EC này còn được cải tiến bằng cách phủ thêm hỗn hợp alginate tích hợp thêm các dưỡng chất dạng nano, thích hợp cho việc tích hợp vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat lên đó. EC đóng vai trò là cấu trúc nền tăng cường độ vững chắc của chất mang, trong khi alginate và các dưỡng chất nano thiết yếu có vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ sự hình thành màng sinh học và bám dính của vi khuẩn, từ đó có thể làm tăng hiệu quả xử lý môi trường ô nhiễm của vật liệu khi sử dụng.

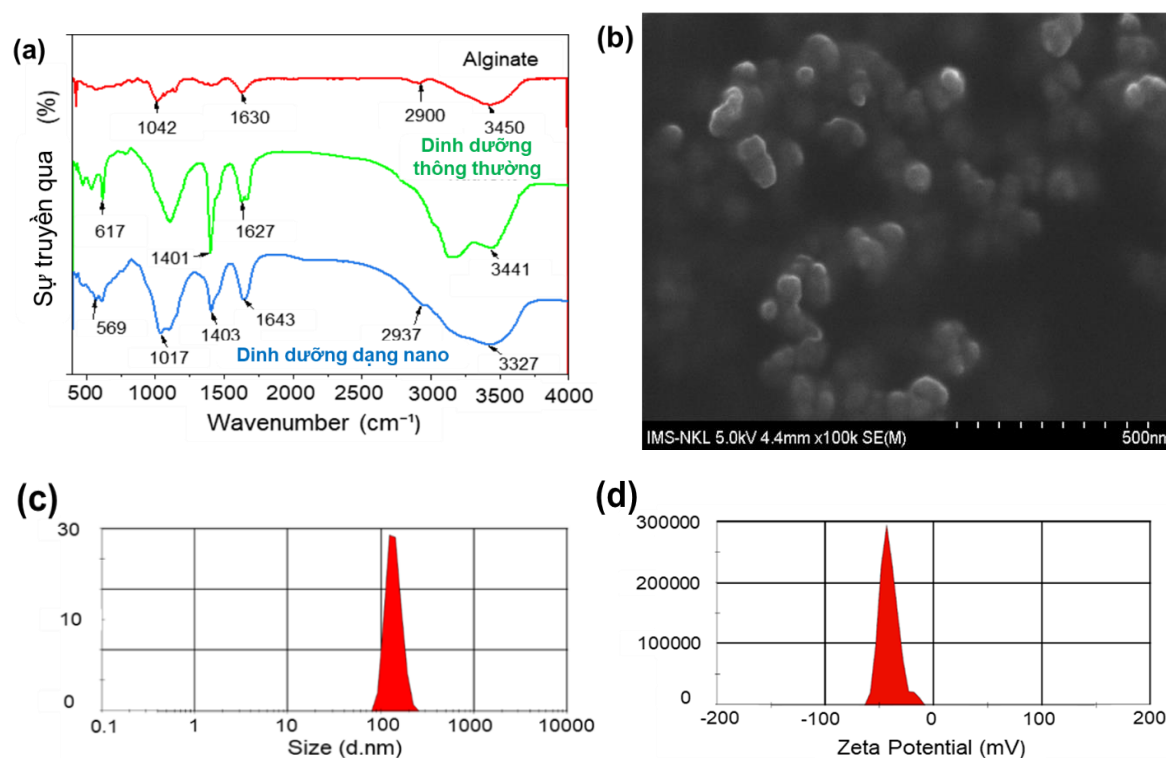
3.2.1. Chế tạo dưỡng chất nano nhằm tích hợp trên vật liệu EC

Một số nghiên cứu gợi ý rằng việc bổ sung nguồn cacbon trên giá thể sẽ hỗ trợ sự sinh trưởng của vi khuẩn tích hợp [171], [172]. Do đó, natri axetat đóng vai trò là nguồn cacbon bổ sung đã được kết hợp trong dung dịch dưỡng chất nano để tích hợp lên vật liệu EC. Bên cạnh đó, đối với nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat, các hợp chất nitơ vô cơ sẽ được vi khuẩn chuyển hóa nhằm mục đích thu năng lượng. Trong quá trình xử lý ô nhiễm, các hợp chất nitơ trong môi trường nước sẽ đóng vai trò là nguồn nitơ chính hỗ trợ sự phát triển của vi khuẩn. Tuy nhiên, để hạn chế tình trạng thiếu nguồn nitơ trong thời gian bảo quản sản phẩm hay giữa các chu kỳ sử dụng, hợp chất nitơ cũng được tích hợp trên EC để hỗ trợ sự tồn tại của vi khuẩn sau khi tạo màng sinh học bám dính trên vật liệu.

Tóm lại, để tạo được vật liệu mang vi khuẩn hay gọi cách khác là tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ lên vật liệu đạt hiệu quả tối ưu thì: i) vật liệu được sử dụng là đất sét giãn nở kết hợp với trấu nung ở nhiệt độ cao lên tới 1200 °C, rồi hạ nhiệt độ nhanh để tạo cấu trúc lỗ, xốp rỗng; ii) vật liệu được tích hợp các dưỡng chất N, P, K và nguồn cacbon dưới dạng phân tán đều trong dung dịch gel alginate.

Hình 3.2 a cho thấy sự xuất hiện của các peak đặc trưng của alginate (đường màu đỏ) và dung dịch dưỡng chất thông thường (đường màu xanh lá cây) trên phổ FTIR. Khi hỗn hợp các dưỡng chất được kết hợp với polymer alginate tạo thành dung dịch nano, các peak đặc trưng cho dao động hóa trị -OH, C-H (sp^3) và C-O-C của

alginate đã chuyển tới các vị trí tương ứng là 3327 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} , và 1017 cm^{-1} . Trong dung dịch dưỡng chất thông thường, dao động hóa trị đối xứng của liên kết P-O trong phân tử PO_4^{3-} , và dao động biến dạng mặt phẳng của phân tử NH_4^+ được đặc trưng bởi dải hấp thụ ở các vị trí lần lượt là 617 cm^{-1} và 1401 cm^{-1} . Các peak đặc trưng này cũng được xác định trong phổ FTIR của dung dịch dưỡng chất nano tại vị trí 569 cm^{-1} và 1403 cm^{-1} . Những kết quả này đã chứng minh sự kết hợp của hỗn hợp dung dịch dưỡng chất thông thường và alginate để tạo ra dung dịch dưỡng chất nano. Ảnh FESEM cho thấy vật liệu nano thu được có dạng hình cầu, đường kính trung bình khoảng $136,7\text{ nm}$ (Hình 3.2 b, c).



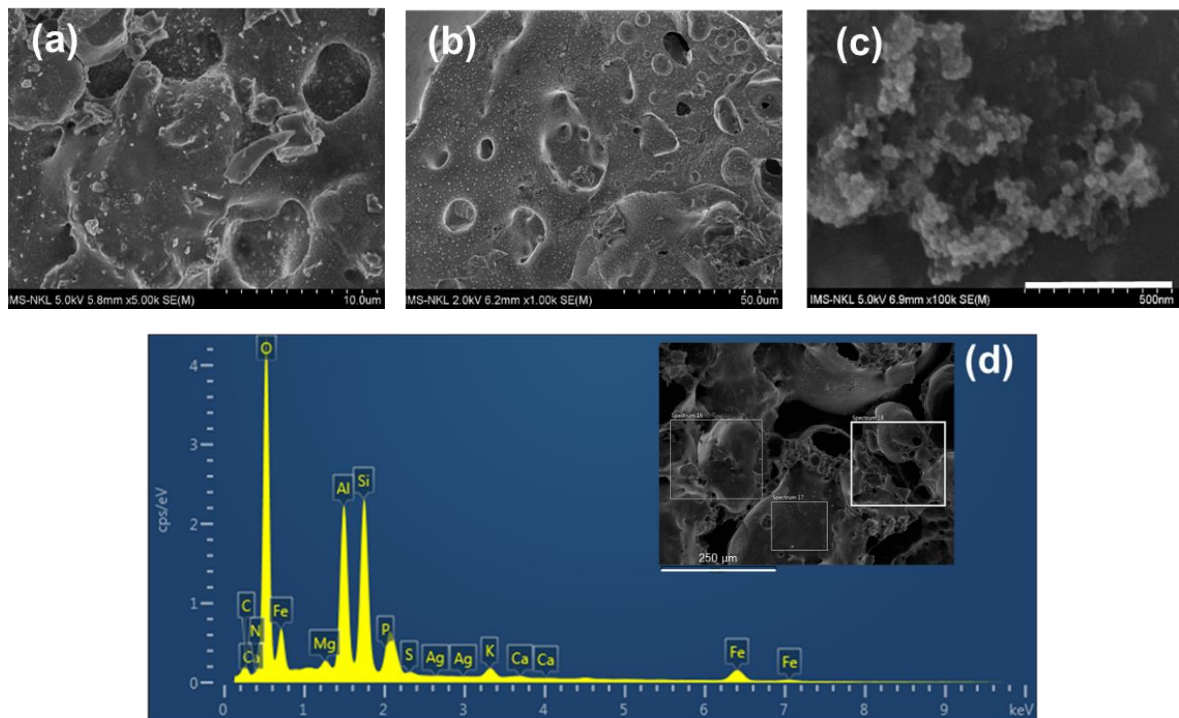
Hình 3.2. Phổ FT-IR của alginate, dung dịch dưỡng chất thông thường, và dung dịch dưỡng chất nano (a); ảnh FESEM (b); phân bố kích thước (c), thế Zeta (d) và hình ảnh mô phỏng cấu trúc của các hạt dưỡng chất nano trong dung dịch alginate.

Trong các nghiên cứu về vật liệu nano, thế zeta thường được dùng làm phép đo lực đẩy tĩnh điện giữa các lớp điện tích bao xung quanh một hạt nano lơ lửng. Trong thực nghiệm, hệ phân tán nano có giá trị tuyệt đối của thế Zeta trong khoảng 30 và 60 mV là hệ có sự ổn định cao nhờ lực đẩy giữa các tiểu phân nano tích điện cùng dấu giúp chúng khó kết dính với nhau. Khi giá trị này nhỏ hơn 15 mV biểu thị độ phân tán kém bền vững của các hạt nano trong hệ. Đối với dung dịch dưỡng chất nano tạo thành trong nghiên cứu này, giá trị thế Zeta đo được đạt giá trị $-39,9\text{ mV}$ cho thấy độ ổn định tương đối tốt của dưỡng chất nano hình thành (Hình 3.2 d).

3.2.2. Tích hợp dưỡng chất nano lên EC

Vật liệu EC có cấu trúc rỗng, dạng xốp bên trong và bên ngoài được tạo thành bởi quá trình nhiệt phân hỗn hợp đất sét và trấu. Quá trình nung nóng hỗn hợp này ở nhiệt độ cao 1200°C sẽ khiến đất sét trương nở cùng với sự đốt cháy của thành phần trấu tạo nên các lỗ rỗng trong cấu trúc của EC. Tiếp đó quá trình làm nguội nhanh sẽ cố định cấu trúc rỗng xốp của EC với kích thước các lỗ rỗng tạo thành trong khoảng $10 - 20\ \mu\text{m}$ (Hình 3.3).

Để tích hợp dưỡng chất nano đã chuẩn bị lên EC, vật liệu được nhúng chìm trong dung dịch dưỡng chất, dưới tác động của khuấy từ các mạch alginate dài mang dưỡng chất nano sẽ bao bọc tạo thành “lớp màng” phủ lên vật liệu EC cải tiến (ký hiệu EC_Algs_N).



Hình 3.3. Đặc trưng vật liệu EC cải tiến: Ảnh hiển vi điện tử (SEM) bề mặt ngoài (a); cấu trúc bên trong (b) của vật liệu; hạt dưỡng chất nano tích hợp trên vật liệu (c); phổ EDX thể hiện thành phần nguyên tố bề mặt vật liệu EC cải tiến (EC_Algs_N) (d).

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_Algs_N đã được tích hợp dưỡng chất nano. Ngoài ra, đất sét và trấu là những nguyên liệu giàu khoáng chất [173], [174]. Do đó, nhiều thành phần nguyên tố khác nhau bao gồm O (41,58%), Si (12,88%), Fe (26,91%), Mg (0,61%), Ca (0,39%), S (0,18%), Al (11,56%) và Ag (0,01%) cũng được phát hiện trên EC_Algs_N (Hình 3.3, Bảng 3.1). Ngược lại, các nguyên tố N, P và C không được phát hiện trên vật liệu EC nguyên bản (Bảng 3.1). Dựa trên các kết quả được trình bày, có thể xác nhận dưỡng chất nano đã được tích

hợp thành công lên vật liệu EC nguyên bản để tạo thành vật liệu cải tiến EC_Alg_N tích hợp dưỡng chất.

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

TT	Nguyên tố	Tỷ lệ thành phần nguyên tố bề mặt	
		EC nguyên bản (EC)	EC tích hợp dưỡng chất (EC_Alg_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%

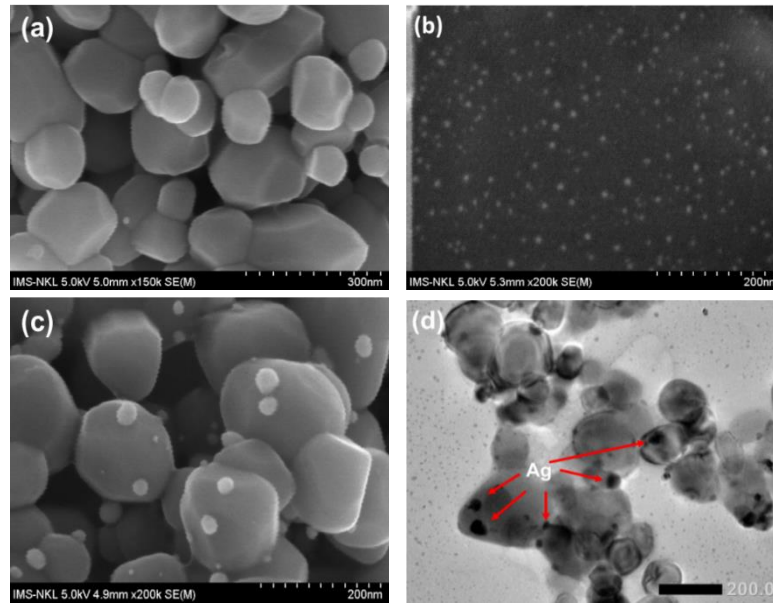
Như vậy, trong nghiên cứu này đã chế tạo được hai loại vật liệu gồm: (1) vật liệu EC nguyên bản có đặc tính rỗng dạng xốp, nhẹ nổi trên mặt nước phù hợp để tích hợp làm tăng hiệu quả chất quang xúc tác trên vật liệu, và (2) vật liệu EC biến đổi phủ lớp alginate có chứa thành phần dưỡng chất (N, P, K) và nguồn cacbon, ký hiệu là EC_Alg_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. Do đó, hai loại vật liệu này (EC và EC_Alg_N) sẽ được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo để lần lượt tối ưu các quy trình tích hợp TiO_2 -Ag và vi khuẩn trên vật liệu, nhằm tạo ra các sản phẩm ứng dụng trong xử lý môi trường nước nuôi thủy sản.

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

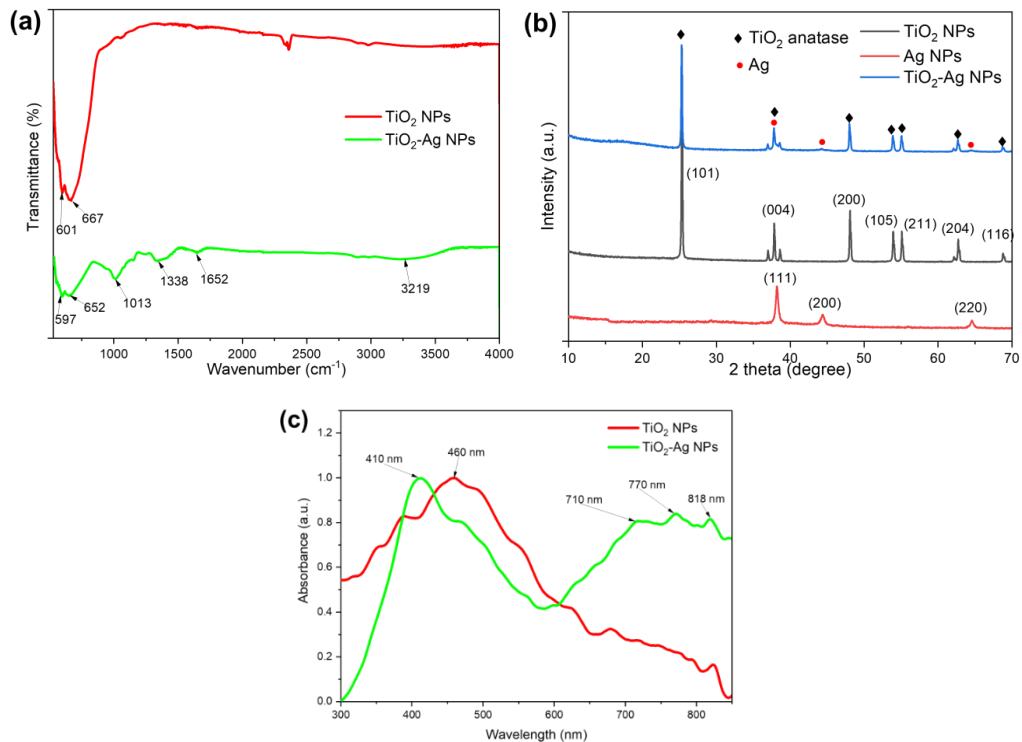
3.2.1. Tổng hợp chất quang xúc tác TiO_2 -Ag

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 khoảng $25,29 \pm 3,61$ nm có thể dễ dàng nhìn thấy trên bề mặt các hạt TiO_2 có kích thước lớn 98 ± 11 nm (Hình 3.4, Bảng 3.2). Do sự khác biệt về độ tương phản giữa TiO_2 và Ag nên ở hình chụp hiển vi điện tử truyền qua TEM, các hạt

Ag được quan sát thấy là các chấm đen chồng lên nền TiO_2 [175].



Hình 3.4. Ảnh kính hiển vi điện tử FESEM của TiO_2 (a), Ag (b), TiO_2 -Ag (c) và ảnh TEM của TiO_2 -Ag.



Hình 3.5. Phổ FTIR (a), nhiễu xạ tia X (b) và phổ hấp phụ UV-Vis (c) của các vật liệu quang xúc tác TiO_2 và TiO_2 -Ag.

Trong phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), khi bị chiếu sáng bởi tia hồng ngoại, mỗi loại vật liệu sẽ khả năng hấp thụ ánh sáng đặc trưng khác nhau, dựa trên nguyên lý này để xác định cấu trúc của vật liệu được phân tích [176]. Trên phổ FTIR của TiO_2 xuất hiện các peak tại vị trí 601 cm^{-1} và 667 cm^{-1} lần lượt đặc trưng cho các liên kết Ti-O và Ti-O-Ti (Hình 3.4

a). Các đỉnh hấp thụ tương ứng này của Ti-O cũng được tìm thấy trong phổ FTIR của TiO₂-Ag, tuy nhiên sự dịch chuyển các đỉnh peak đến vị trí 597 cm⁻¹ và 652 cm⁻¹ cho thấy sự có mặt của Ag trong mẫu và sự hình thành liên kết Ag-TiO₂ [177, 178, 179]. Bên cạnh đó, phổ FTIR của TiO₂-Ag cũng chứa các đỉnh đặc trưng của polymer alginate tại 3219 cm⁻¹, 1652 cm⁻¹ và 1338 cm⁻¹, tương ứng với dao động hóa trị của các nhóm -OH, C=O và C-O-C [180]. Các điểm đặc trưng trong phổ FTIR này chứng minh nghiên cứu này đã tổng hợp thành công vật liệu TiO₂-Ag phân tán trong alginate [181, 182].

Để cung cấp thêm thông tin về cấu trúc tinh thể, thành phần hóa học và tính chất vật lý của các loại vật liệu quang xúc tác đã tổng hợp, phân tích nhiễu xạ tia X cũng được chúng tôi tiến hành với mẫu TiO₂, Ag và TiO₂-Ag. Trong phân tích này, mẫu vật liệu bột được chiếu bởi chùm tia X và độ lệch của chùm tia tới so với tia nhiễu xạ đặc trưng của mỗi loại vật liệu mà có thể xác định được thành phần cấu trúc của nó [183]. Kết quả đo phổ nhiễu xạ tia X (XRD) của TiO₂ được trình bày tại Hình 3.5 b hiển thị một số peak có cường độ mạnh ở $2\theta = 25,29^\circ$; $37,85^\circ$; $48,06^\circ$; $53,91^\circ$; $55,11^\circ$; $62,6^\circ$ và $68,73^\circ$ tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (101), (004), (200) và (215) của TiO₂ dạng anatase (JCPDS 78-2486). Cùng với đó, các đỉnh nhiễu xạ của Ag ở góc 2θ là 38° , 44° và 64° tương ứng với các mặt phẳng tinh thể (111), (200) và (220) (JCPDS 4-0783) [184]. Sau khi biến tính TiO₂ với Ag, các đỉnh đặc trưng này của Ag cũng được xác định trong giản đồ nhiễu xạ của vật liệu TiO₂-Ag. Tuy nhiên, do tỷ lệ pha tạp Ag trong TiO₂-Ag tương đối thấp (khoảng 5%) nên một số đỉnh đặc trưng khác của Ag bị che khuất trong phổ nhiễu xạ tia X của TiO₂-Ag (Hình 3.5 b, Bảng 3.2). Những kết quả này cũng góp phần khẳng định thêm sự hiện diện ổn định của Ag trong TiO₂-Ag mà không phá vỡ cấu trúc tinh thể TiO₂ [47], [185], [186].

Trong nghiên cứu này, TiO₂ được biến tính với Ag nhằm “chuyển dịch” vùng hấp phụ ánh sáng của vật liệu TiO₂-Ag sang vùng khả kiến. Do đó, phổ hấp phụ UV-Vis của hai loại vật liệu TiO₂ và TiO₂-Ag đã được đo trong dải bước sóng từ 300 đến 900 nm. Hình 3.5 c thể hiện các hạt nano TiO₂ có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 460 nm, tương ứng với năng lượng vùng cấm là 2,3 eV. Trong khi đó, TiO₂-Ag thể hiện một đỉnh hấp thụ ở 410 nm tương ứng với đỉnh cộng hưởng plasmon bề mặt của Ag [184], cho thấy Ag đã được kết hợp vào TiO₂-AgNP, điều này phù hợp với kết quả TEM và SEM. Khi biến đổi TiO₂ với Ag, hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt của Ag cũng giúp dịch chuyển ngưỡng hấp thụ của TiO₂ từ 460 nm sang 700 - 800 nm, thuộc vùng

ánh sáng khả kiến, ở $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Sự thay đổi này đã giúp “giảm” năng lượng vùng cấm của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ xuống 2,0 eV (Hình 3.5 c).

Phân tích khối phổ - plasma cảm ứng (ICP-MS) cho thấy hàm lượng Ag chiếm khoảng $4,01 \pm 0,09\%$ trong hỗn hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (Bảng 3.2). Ngoài ra, phân tích DLS và quan sát trên ảnh hiển vi điện tử cho thấy các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có hình thái đồng nhất với kích thước trung bình là $458,90 \pm 18,51$ nm và thế zeta $-43,70 \pm 1,12$ mV, chứng minh tính ổn định của vật liệu nano tạo thành (Bảng 3.2).

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

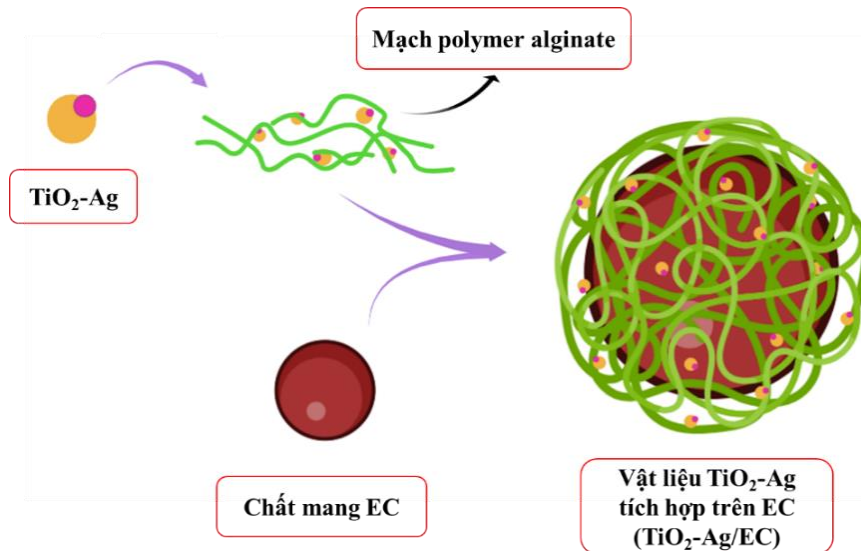
	Kích thước (nm)	Thế Zeta (mV)	Nồng độ (ppm)
TiO_2	$97,75 \pm 11,06$	$-47,2 \pm 6,42$	$4976,82 \pm 45,20$
Ag	$25,29 \pm 3,61$	$-35,51 \pm 13,10$	$185,49 \pm 14,63$
$\text{TiO}_2\text{-Ag}$	$458,90 \pm 18,51$	$-43,70 \pm 1,12$	Ti: $4852,51 \pm 23,72$ Ag: $194,58 \pm 6,29$

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

Trong một số nghiên cứu trước đây các phương pháp như xử lý ở nhiệt độ cao, phun phủ dung dịch keo (sol-spray), mạ điện (electrodeposition), lắng đọng/kết tủa hóa học pha hơi (chemical vapour deposition) hay nhúng-phủ (dip-coating) thường được sử dụng để chế tạo ra các vật liệu tích hợp chất quang xúc tác [187]. Trong đó, kỹ thuật mạ điện cho phép hình thành một hoặc nhiều lớp màng chứa chất quang xúc tác với độ dày có thể được kiểm soát trên các vật liệu có cấu trúc hình học phức tạp [188]. Dunlop *et al.* (2008) đã ứng dụng kỹ thuật này để tạo nên lớp phủ của TiO_2 trên bề mặt vật liệu bán dẫn dưới tác dụng của dòng điện, sau đó tiến hành nung nóng vật liệu ở 500°C trong 1 giờ để tăng tính ổn định của vật liệu tạo thành [189]. Bên cạnh đó, xử lý nhiệt cũng là một trong những phương pháp phổ biến và tiện dụng được dùng giúp tích hợp trực tiếp TiO_2 ở dạng bột lên chất mang thay vì cần tạo ra TiO_2 trong dung dịch keo như các phương pháp khác. Nhiệt độ nung cao khoảng 400°C đồng thời tạo nên hiệu ứng chuyển hóa TiO_2 dạng anatase sang rutile, dạng tồn tại ổn định hơn của TiO_2 [190]. Tuy nhiên có hiệu quả cao nhưng việc lựa chọn các kỹ thuật trên để chế tạo vật liệu EC tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sử dụng làm sạch môi trường nước trong các mô hình nuôi thủy sản ngoài thực tế là chưa phù hợp, bởi chúng đòi hỏi đầu tư các thiết bị hiện đại với chi phí lớn.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sau khi hình thành được phân tán đều trong dung dịch polymer alginate. Thông qua bước tổng hợp này, các mạch dài của polymer alginate sẽ bao quanh các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, điều này

không chỉ giúp tăng độ ổn định của hệ vật liệu mà còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên chất mang EC sau này. Bởi vì, khi EC được đưa vào các dung dịch nano đã chuẩn bị, dưới tác động khuấy đảo liên tục trong quá trình tích hợp, mạch alginate có đính các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sẽ tiếp tục bao quanh EC. Cùng với đó, cấu trúc gồm nhiều lỗ rỗng của EC cũng tạo ra các vị trí neo đậu phù hợp cho hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ (Hình 3.6).

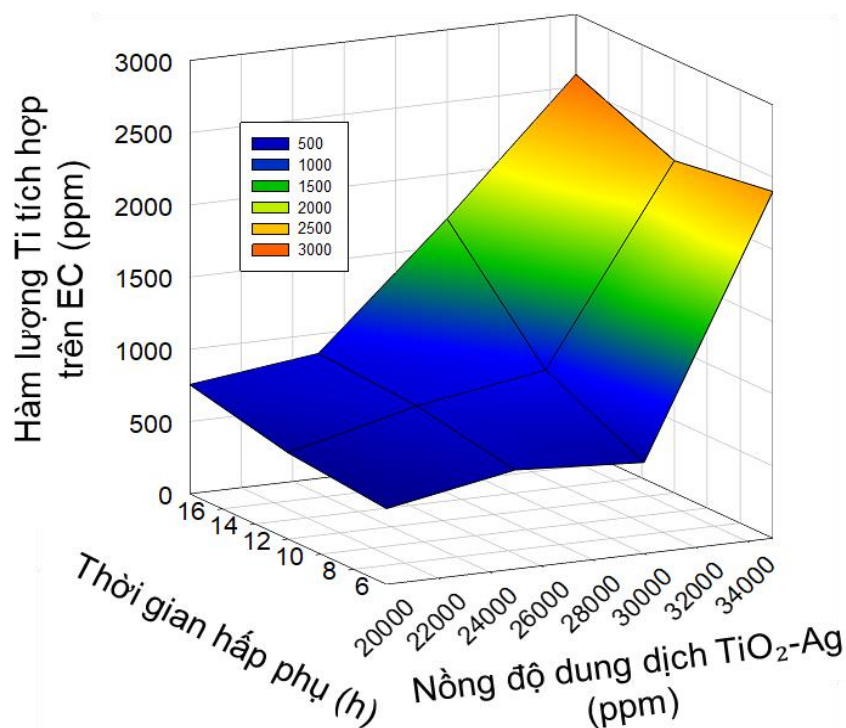


Hình 3.6. Sơ đồ mô tả quá trình thích hợp vật liệu quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên chất mang EC để tạo thành vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

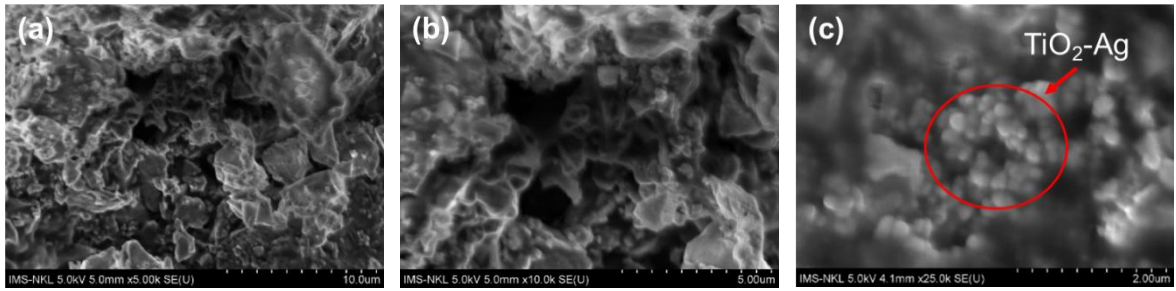
Do vậy khi tăng nồng độ dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sử dụng từ 20.000 ppm đến 35.000 ppm (tính theo hàm lượng của Ti) với thời gian tích hợp tăng từ 6, 12 đến 18 giờ thì số lượng hạt nano có thể lấp đầy vào các lỗ rỗng trên bề mặt EC cũng được tăng lên tương ứng. Nếu xét trong cùng một nồng độ $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, vật liệu được tích hợp sau 18 giờ có hàm lượng Ti cao hơn đáng kể so với khi tích hợp ở 6 hay 12 giờ. Hàm lượng Ti đạt đến $755,85 \pm 28,53$ ppm trên vật liệu Ag/EC_{18-20k} , trong khi giá trị này chỉ ở mức $524,32 \pm 63,21$ ppm trên $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{6-20k}$. Bên cạnh đó, tỷ lệ Ti được tích hợp trên EC cũng tăng dần theo nồng độ chất quang xúc tác sử dụng. Hàm lượng cao của Ti ở mức $864,63 \pm 6,79$ và $1198,60 \pm 42,39$ ppm lần lượt đo được trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-25k}$ và $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-30k}$ khi tăng nồng độ $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ban đầu sử dụng lên 25.000 và 30.000 ppm. Tại nồng độ $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ban đầu là 35.000 ppm, hiệu suất tích hợp chất quang xúc tác lên chất mang EC đạt cao nhất, lúc này mật độ Ti trên EC đạt mức “bão hòa” chỉ sau 12 giờ, đạt đến $2503,95 \pm 35,80$ ppm và không tăng đáng kể khi kéo dài thời gian tích hợp lên 18 giờ (Hình 3.7, Bảng 3.3). Hình ảnh các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên chất mang EC có thể được quan sát bằng kính hiển vi điện tử trường FESEM ở các mức độ phóng đại khác nhau (Hình 3.8).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ban đầu và thời gian tích hợp đến hàm lượng Ti, Ag tích hợp trên chất mang EC.

			Ti (ppm)	Ag (ppm)
EC nguyên bản			$38,94 \pm 5,32$	-
Nồng độ Ti trong $\text{TiO}_2\text{-Ag}$	Thời gian	Ký hiệu vật liệu tạo thành	Hàm lượng Ti (ppm) trên EC	Hàm lượng Ag (ppm) trên EC
20 000 ppm	6 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{6-20k}$	$524,32 \pm 63,21$	$154,47 \pm 24,74$
	12 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{12-20k}$	$597,26 \pm 20,40$	$132,63 \pm 37,65$
	18 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-20k}$	$755,85 \pm 28,53$	$133,66 \pm 8,12$
25 000 ppm	6 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{6-25k}$	$685,36 \pm 10,06$	$306,71 \pm 63,58$
	12 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{12-25k}$	$814,33 \pm 30,11$	$116,71 \pm 2,76$
	18 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-25k}$	$864,63 \pm 6,79$	$226,00 \pm 39,93$
30 000 ppm	6 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{6-30k}$	$631,09 \pm 89,44$	$354,75 \pm 34,21$
	12 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{12-30k}$	$957,00 \pm 52,95$	$405,17 \pm 52,73$
	18 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-30k}$	$1198,60 \pm 42,39$	$350,73 \pm 34,85$
35 000 ppm	6 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{6-35k}$	$1691,25 \pm 19,02$	$793,5 \pm 92,62$
	12 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{12-35k}$	$2503,95 \pm 35,80$	$961,62 \pm 54,55$
	18 h	$\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}_{18-35k}$	$2584,51 \pm 49,52$	$332,45 \pm 23,85$



Hình 3.7. Ảnh hưởng của thời gian và nồng độ dung dịch $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ sử dụng đến hiệu quả tích hợp $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên vật liệu EC.



Hình 3.8. Ảnh FESEM hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đã tích hợp trên vật liệu EC ở các độ phóng đại 5k (a), 10k (b) và 25k (c).

Kaur *et al.* cũng có các nghiên cứu tương tự về việc tối ưu quá trình tích hợp của chất quang xúc tác TiO_2 lên các hạt đất sét (clay beads) nhằm tạo ra vật liệu phân hủy hợp chất thuốc diệt nấm carbendazim, tuy không xác định được chính xác hàm lượng Ti đã tích hợp trên vật liệu mang, nhưng tác giả đã kết luận cần dùng nồng độ TiO_2 ban đầu là 20.000 ppm và lặp lại quá trình tích hợp 2 lần với thời gian tổng cộng là 24 giờ thì độ dày lớp TiO_2 trên chất mang đạt cao nhất và không tăng lên dù tăng số lần tích hợp. Với nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng Ti đạt mức bão hòa nhanh hơn khi chỉ sau 1 lần tích hợp với thời gian là 12 giờ và nồng độ sử dụng $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ban đầu là 35.000 ppm. Điểm khác biệt này có thể do $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ được phân tán đều trong alginate và khuấy đảo liên tục cùng chất mang EC trong quá trình tích hợp thay vì để tĩnh trong môi trường nước như phương pháp được Kaur *et al.* (2018) miêu tả. Hơn nữa, vật liệu mang được Kaur *et al.* sử dụng có kích thước lỗ rỗng là 0,382 nm, nhỏ hơn so với giá trị đo được trên EC ($25,1 \pm 0,05$ nm) [191].

Như vậy, 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 EC.

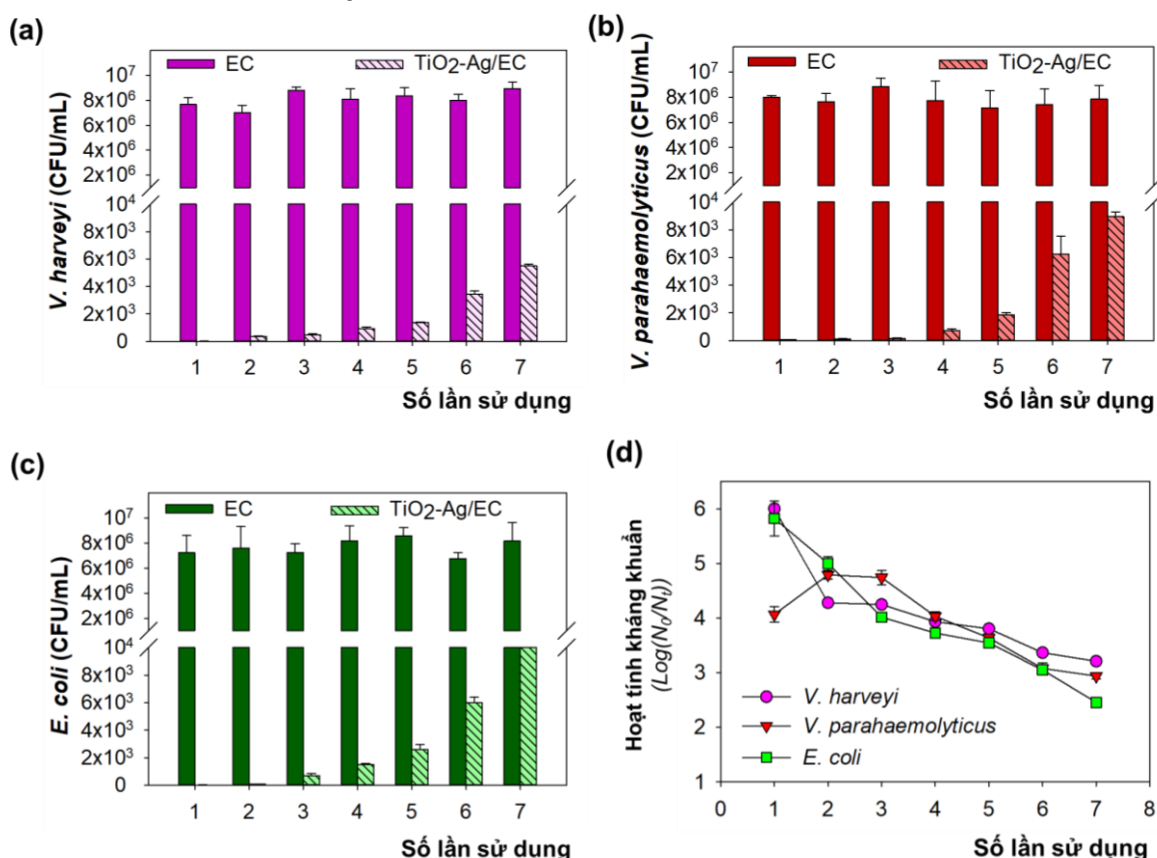
3.2.3. Đánh giá khả năng ứng dụng xử lý môi trường của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

3.2.3.1. Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh

Dựa trên khảo sát các công trình công bố từ năm 2002 đến 2023, Suyamud *et al.* (2024) chỉ ra rằng trong 11 nước Đông Nam Á, Việt Nam, Malaysia và Thái Lan là ba nước có nhiều công trình công bố nhất về sự xuất hiện của vi khuẩn kháng kháng sinh. Đặc biệt, các gen kháng kháng sinh thường xuất hiện phổ biến ở ba chi vi khuẩn gây bệnh là *Escherichia coli*, *Aeromonas* và *Vibrio* [192]. Tại Việt Nam, 86 mẫu vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ mẫu nước ở các vùng nuôi thủy sản (tại Nam Định; Hải Phòng; Quảng Ninh; Ninh Bình và Thái Bình) có tỷ lệ kháng kháng sinh đạt tới 100%, 98,84%, 84,88% và 69,77% tương ứng đối với ampicillin, amoxicillin, streptomycin và oxytetracycline [193]. Đứng trước tình trạng kháng thuốc diễn ra ngày càng nhiều,

nếu tiếp tục lạm dụng kháng sinh trong quá trình phòng trị bệnh có thể gây ra nhiều hệ lụy nghiêm trọng cho chính môi trường sinh thái và con người. Để phát triển kháng sinh thế hệ mới đòi hỏi rất nhiều thời gian và thông qua quy trình kiểm nghiệm nghiêm ngặt trước khi được đưa ra thị trường. Vì vậy, trong những năm gần đây, vật liệu quang xúc tác đã được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm bởi tác dụng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh tốt.

Thông thường TiO_2 cần được kích thích bằng bước sóng UV để các điện tử di chuyển từ VB lên CB hình thành các lỗ trống. Từ đó kích hoạt các phản ứng oxy hóa khử tạo ra các gốc ROS như O_2^- , $\text{OH}^\cdot$ hay ion OH^- . Tuy nhiên, trong nghiên cứu này khi được biến tính với nano Ag, $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ có thể hấp thụ bước sóng từ 700 đến 800 nm thuộc vùng khả kiến như đã nói ở trên. Do vậy, phản ứng quang xúc tác của vật liệu có thể dễ dàng xảy ra khi được chiếu sáng bởi ánh sáng mặt trời, điều này được chứng minh thông qua kết quả thử nghiệm tính kháng khuẩn của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đối với 3 loài vi khuẩn gây bệnh phổ biến trong nuôi thủy sản gồm *V. parahaemolyticus* VTCC 910192, *V. harveyi* VTCC 70222 và *E. coli* ATCC 25922.



Hình 3.9. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. harveyi* VTCC 70222 (a), *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 (b), *E. coli* ATCC 25922 (c) của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và hiệu suất diệt khuẩn tương ứng của chúng (d).

Bảng 3.4. So sánh hiệu suất tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh của vật liệu TiO₂-Ag/EC với vật liệu quang xúc tác tổng hợp trong nghiên cứu khác.

Vật liệu	Nguồn sáng	Nồng độ VK ban đầu (CFU/mL)		Thời gian xử lý	Loại vi khuẩn	Hiệu quả ức chế VK Log(N ₀ /N _t)	Tài liệu tham khảo
EC tích hợp với TiO ₂ -Ag/EC	Ánh sáng mặt trời	7,7 × 10 ⁶	Lần 1	120 phút	V. <i>harveyi</i> VTCC 70222	6,0 Log	Nghiên cứu của chúng tôi
		8,9 × 10 ⁶	Lần 7			3,2 Log	
		8,0 × 10 ⁶	Lần 1		V. <i>parahaemolyticus</i> VTCC 910192	5,1 Log	
		7,8 × 10 ⁶	Lần 7			2,9 Log	
		7,2 × 10 ⁶	Lần 1		E. <i>coli</i> ATCC 25922	5,8 Log	
		8,2 × 10 ⁶	Lần 7			2,5 Log	
Chất mang gạch men tích hợp với TiO ₂ -Ag	Đèn Xenon (1000 W; λ ≥ 420 nm)	1 × 10 ⁶		120 phút	E. <i>coli</i>	2- 3 Log	Zhang <i>et al.</i> (2022) [194]
					S. <i>aureus</i>	2- 3 Log	
					Salmonella	2- 3 Log	
					Shigella	2- 3 Log	
Khẩu trang được phủ với 2% TiO ₂	Ánh sáng mặt trời	10 ⁵		18 giờ	E. <i>coli</i>	3,7 Log	Ahmed <i>et al.</i> (2022) [195]
					S. <i>aureus</i>	3,34 Log	
TiO ₂ tích hợp trên vật liệu nhựa HDPE	Đèn UV-A (λ _{max} ~ 356 nm)	10 ⁷		180 phút	E. <i>coli</i>	2,67 Log	Yemmireddy <i>et al.</i> (2017) [196]
Màng film cellulose acetate chứa TiO ₂	Đèn UV-A (λ _{max} ~ 356 nm)	1 × 10 ⁷		360 phút	E. <i>coli</i>	5,2 Log	Xie <i>et al.</i> (2019) [197]
Màng film chứa TiO ₂ /Ag/Ni	Tia UV	7,2 × 10 ⁴		10 phút	P. <i>fluorescens</i>	2,48 Log	Skorb <i>et al.</i> (2008) [198]
Mảnh lưới phủ Ni/TiO ₂	Đèn UV-A	1 × 10 ⁷		30 phút	E. <i>coli</i>	5,17 Log	Jeong <i>et al.</i> (2021) [199]
TiO ₂ đồng biến tính với Co và Mn (Mn/Co:TiO ₂)	Đèn xenon (chứa 5% UV-A và 0.1% UV-B)	1,5 × 10 ⁸		60 phút	K. <i>pneumoniae</i>	6 Log	Venieri <i>et al.</i> (2017) [200]
	Ánh sáng mặt trời					3 Log	

Sau 2 giờ đặt dưới ánh sáng mặt trời, tế bào vi khuẩn nhanh chóng bị bất hoạt, mật độ vi khuẩn còn lại sau xử lý giảm mạnh từ 10⁶ 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 (N₀/N_t). Trong nghiên cứu của Zhang *et al.* (2022), TiO₂-Ag cũng được tích hợp trên chất mang với vật liệu là gạch men ceramic để đánh giá khả năng ức chế E. *coli*, tuy nhiên với cùng thời gian xử lý 2 giờ, vật liệu này chỉ đạt được hiệu quả diệt khuẩn 2- 3 Log(N₀/N_t), thấp hơn nhiều khi so sánh với vật liệu TiO₂-Ag/EC (Hình 3.9, Bảng 3.4).

Để đánh giá độ ổn định của TiO₂-Ag/EC, sau mỗi thí nghiệm, vật liệu được rửa nhẹ với nước khử trùng, làm khô ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ trước khi được tái sử dụng trong các đợt thí nghiệm tiếp theo. Kết quả cho thấy sau bốn lần tái sử dụng, khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và *V. harveyi* VTCC 70222 của TiO₂-Ag/EC được duy trì ở mức cao, với hiệu suất kháng khuẩn đạt trên 4 Log(N₀/N_t) (Hình 3.9 d). Theo Joost *et al.* (2015), trong quá trình quang xúc tác, các gốc ROS tác động làm phá vỡ sự toàn vẹn tế bào vi khuẩn, khiến các thành phần nội bào bị rò rỉ ra bên ngoài. Mặc dù TiO₂ có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn sau 20 phút chiếu sáng, nhưng các mảnh vỡ tế bào vẫn có thể được quan sát dưới kính hiển vi điện tử ở thời điểm 60 phút [201]. Sự tồn tại của các mảnh vỡ tế bào trên bề mặt ngăn cản quá trình hấp thụ ánh sáng cũng như che lấp các vị trí hoạt động (active site) của chất quang xúc tác, gây giảm hiệu quả khi tái sử dụng vật liệu này [202, 203]. Do đó, sau khi sự sống của tế bào bị ức chế bởi TiO₂, thời gian phản ứng cần được kéo dài thêm để TiO₂ phân hủy hoàn toàn những thành phần tế bào này, đồng thời nung nóng vật liệu ở nhiệt độ cao, sử dụng sóng siêu âm hay dung dịch bazơ là các phương pháp phù hợp để phân hủy/giải hấp phụ những tạp chất liên kết với chất quang xúc tác trong quá trình xử lý, từ đó giúp tái tạo bề mặt vật liệu cho lần sử dụng tiếp theo [204]. Khảo sát của Cao *et al.* (2000) cho thấy, hoạt tính phân hủy chất ô nhiễm toluene của TiO₂ chỉ có thể được phục hồi khi vật liệu được nung nóng ở nhiệt độ 420 °C, nhiệt độ này cho phép đốt cháy toàn bộ các hợp chất hữu cơ trung gian hấp phụ trên TiO₂ trong quá trình xử lý [205].

Nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục đích chế tạo ra vật liệu có hiệu quả kháng khuẩn cao, với quy trình sử dụng đơn giản để có thể áp dụng ở nhiều mô hình nuôi thủy sản khác nhau cũng như không muốn bị ảnh hưởng bởi các hợp chất ngoại lai khác sẽ làm ảnh hưởng đến chất lượng thủy sản. Nên thay vì sử dụng các hóa chất hay thiết bị phức tạp thì sau mỗi thí nghiệm vật liệu nổi EC tích hợp TiO₂-Ag được đưa ra khỏi môi trường xử lý và phơi khô ở nhiệt độ thường trong bóng tối trước khi sử dụng cho đợt kiểm tra tiếp theo. Kết quả đã cho thấy, sau bảy lần sử dụng, hiệu quả kháng khuẩn của TiO₂-Ag/EC giảm dần từ 5,1 – 6,0 xuống còn 2,5 – 3,2 Log(N₀/N_t), nhưng TiO₂-Ag/EC vẫn có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh từ mật độ ban đầu ở 10⁶ CFU/mL xuống xấp xỉ 10³ CFU/mL sau 2 giờ xử lý trong lần sử dụng thứ 7. Khả năng diệt khuẩn này tương đương với một số vật liệu như màng film chứa TiO₂/Ag/Ni, nano Co/TiO₂ hay nano TiO₂ bao bọc trong màng film cellulose acetate được tổng hợp trong các nghiên cứu khác (Bảng 3.4). Trong thực tế quá trình nuôi thủy sản, nồng độ vi khuẩn gây bệnh thường dao động ở ngưỡng ~10⁴ CFU/mL [206], thấp hơn so với mật độ vi khuẩn gây bệnh ban đầu thử nghiệm trong nghiên

cứu này, nên khi được áp dụng với thời gian chiếu sáng dài hơn, 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.

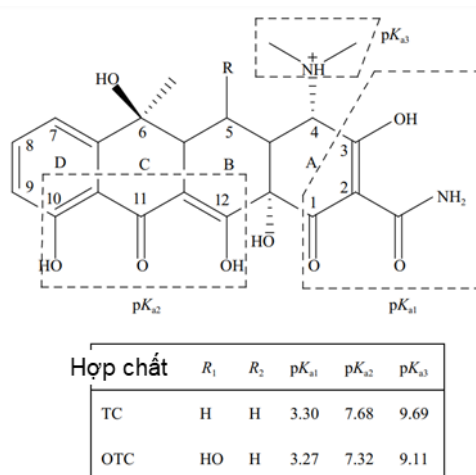
3.2.3.2. Khả năng phân hủy kháng sinh

a. Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và pH môi trường đến hiệu suất phân hủy của vật liệu

Kháng sinh đã từ lâu được sử dụng để phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn cho vật nuôi thủy sản từ trên khắp thế giới. Theo thống kê của Cục Thú y, mỗi năm có đến 2.000 tấn thuốc diệt khuẩn được nhập khẩu vào Việt Nam. Khảo sát của Dang *et al.* (2015) cho thấy từ những năm 2011 có đến 72% số trang trại nuôi tôm và cá ở vùng Đồng bằng Sông Hồng và Đồng bằng Sông Cửu Long dùng ít nhất một loại kháng sinh trong quá trình sản xuất [22]. Nồng độ kháng sinh tồn dư trong môi trường nước nuôi thủy sản thường ở mức ng/L [207]. Sự tích tụ của kháng sinh dư thừa trong môi trường dẫn đến sự xuất hiện của các gen và vi khuẩn kháng kháng sinh trong thực phẩm thủy sản, đây là mối nguy hiểm lớn đối với sức khỏe con người và nhiều loại động vật khác.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ bên cạnh được đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, cũng được sử dụng thử nghiệm để phân hủy một số loại kháng sinh phổ biến dùng trong nuôi thủy sản là Tetracycline (TET), Oxytetracycline (OTC) và Rifampicin (RIF). Trong quá trình xử lý, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được bổ sung vào dung dịch kháng sinh và để tĩnh trong bóng tối 30 phút để đạt được trạng thái cân bằng hấp phụ (adsorption equilibrium) trước khi bắt đầu quá trình quang xúc bởi ánh sáng mặt trời. Giá trị pH môi trường và nồng độ kháng sinh ban đầu là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất phân hủy kháng sinh. Do đó, đối với mỗi loại kháng sinh, hiệu suất xử lý của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được đánh giá ở bốn giá trị pH (3, 5, 7 và 9) với ba mức nồng độ (10, 20 và 30 ppm) khác nhau.

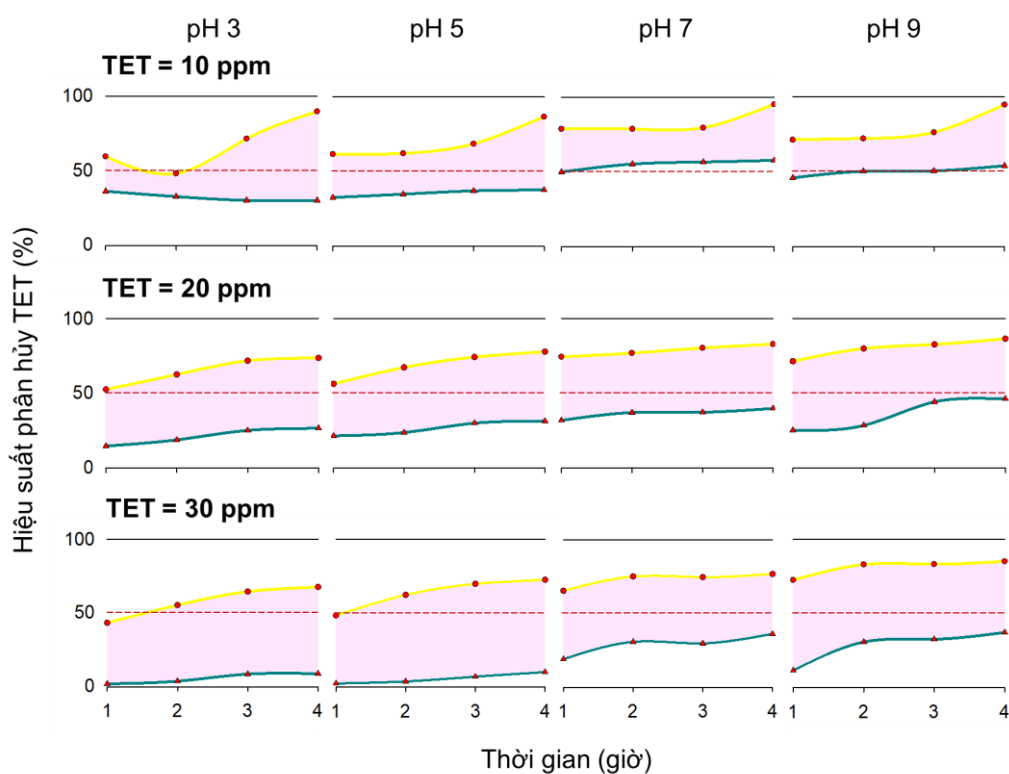
$\text{TiO}_2\text{-Ag}$ thường có điểm đẳng điện (pH_{pzc}) tại 6,6; do vậy vật liệu có bề mặt tích điện dương khi pH môi trường nhỏ hơn pH_{pzc} và ngược lại. Trong khi đó, TET và OTC là các chất lưỡng tính (chất đồng thời có khả năng cho và nhận proton H^+) bởi trong cấu trúc của chúng tồn tại của các nhóm chức như dimethylammonium (C4), phenolic diketone (C10 - 12) và hệ tricarbonyl (C1 - C3). Điểm khác biệt duy nhất về cấu trúc giữa TET và OTC nằm ở vị trí C5 chứa thêm nhóm OH đối với OTC. Điều này khiến TET và OTC có các giá trị pK_a gần như tương đương nhau, pK_{a1} 3,27 - 3,30; pK_{a2} 7,32 - 7,68 và pK_{a3} 9,11 - 9,69 (Hình 3.10).



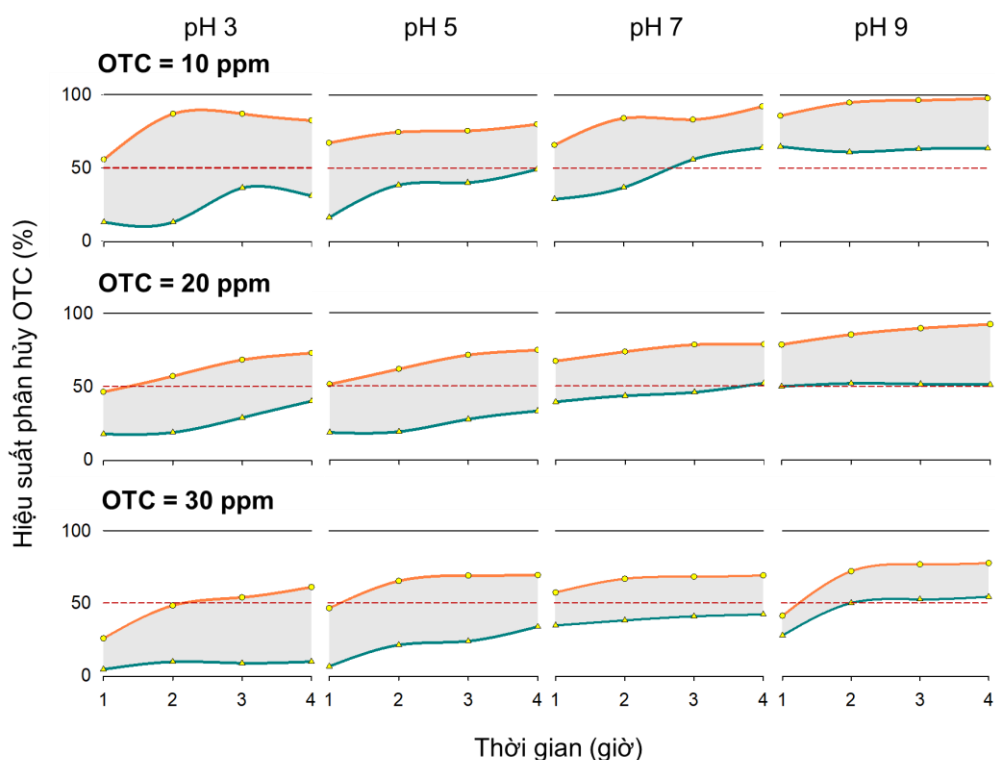
Hình 3.10. Cấu trúc phân tử và các giá trị pK_a của kháng sinh Tetracycline và Oxytetracycline [208].

Với pH < 3 hay > 9, lúc này TET, OTC và TiO₂-Ag mang điện tích cùng dấu, tạo ra lực đẩy tĩnh điện giữa kháng sinh với chất quang xúc tác. Khi pH tăng từ 3 lên 7, độ tích điện dương bề mặt của TiO₂-Ag giảm xuống, cùng với đó TET và OTC ở trạng thái trung tính nên lực đẩy tĩnh điện giữa hai thành phần này giảm dần. Từ đó, hiệu quả phân hủy TET và OTC đã tăng từ 86,9 – 89,6% ở pH 3 lên đến 92,3 – 95,1% ở pH 7 với nồng độ kháng sinh ban đầu là 10 ppm. Nghiên cứu của Sun *et al.* (2021) cho thấy các gốc ROS có thời gian tồn tại ngắn nên dễ bị phân hủy khi di chuyển ra xa bề mặt chất quang xúc tác [209]. Do vậy sự liên kết của các chất ô nhiễm gần bề mặt TiO₂-Ag/EC sẽ giúp tăng tốc độ và hiệu suất phản ứng quang xúc tác. Đối với pH môi trường trong khoảng 7 đến 9, hợp chất kháng sinh và TiO₂-Ag cùng mang điện tích âm, tuy nhiên độ tích điện của hai thành phần này có thể còn thấp nên hiệu suất phân hủy kháng sinh vẫn duy trì ở mức cao ở 94,6 và 97,8% lần lượt tương ứng với TET và OTC (Hình 3.11, 3.12).

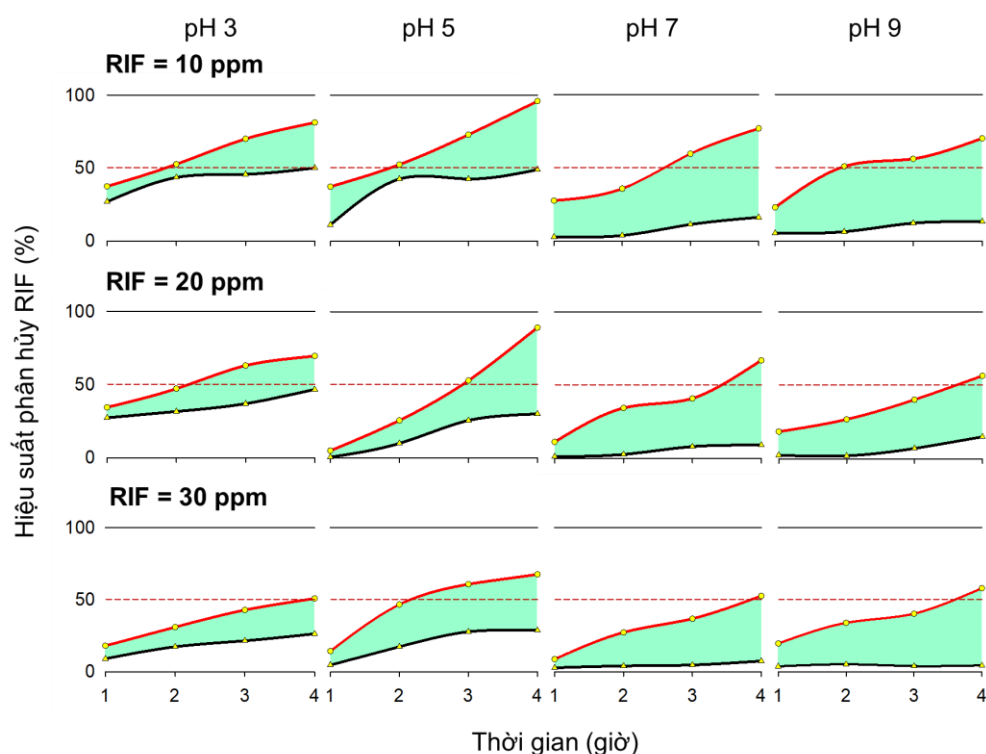
Kháng sinh Rifampicin (RIF) cũng có cấu trúc hóa học gồm một số nhóm ion hóa như nhóm hydroxyl và vòng piperazine nitrogen (vòng hydrocarbon no có hai nguyên tử N ở vị trí đối xứng nhau) tạo nên hai giá trị pK_{a1} và pK_{a2} tương ứng ở 1,7 và 7,9 [210]. Như vậy với 3 < pH < 5, phân tử RIF ở trạng thái trung hòa về điện. Thêm vào đó, TiO₂-Ag có pH_{pzc} ở 6,6 nên khi pH môi trường đi gần đến giá trị pH 5 độ tích điện dương trên bề mặt TiO₂-Ag giảm dần giúp cho RIF có thể liên kết tốt hơn với TiO₂-Ag để đạt hiệu suất phân hủy kháng sinh cao nhất là 95,7% ở pH này. Phản ứng quang phân hủy RIF bị ức chế nhiều khi pH môi trường tăng cao. Tại pH 7, 76,7% nồng độ kháng sinh RIF ban đầu (10 ppm) có thể được chuyển hóa sau 4 giờ xử lý, nhưng giá trị này giảm xuống còn 69,9% ở pH 9 (Hình 3.13, 3.14).



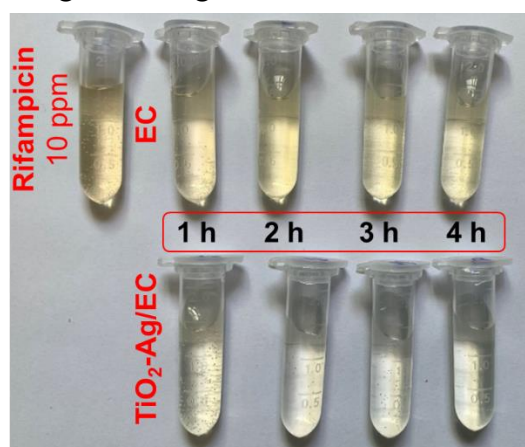
Hình 3.11. Hiệu suất quang xúc tác phân hủy Tetracycline (TET) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (Đường màu vàng) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (Đường màu xanh) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.



Hình 3.12. Hiệu suất phân hủy Oxytetracycline (OTC) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (đường màu cam) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (đường màu xanh) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.

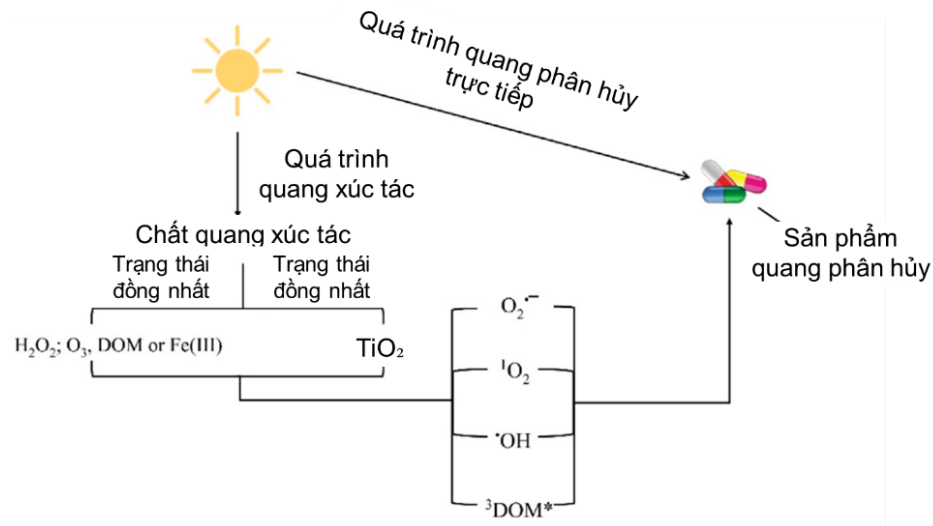


Hình 3.13. Hiệu suất phân hủy Rifampicin (RIF) bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (đường màu đỏ) và quang phân hủy trực tiếp kháng sinh bởi ánh sáng mặt trời (đường màu đen) ở điều kiện pH và nồng độ kháng sinh ban đầu khác nhau.



Hình 3.14. Sự thay đổi màu sắc của kháng sinh RIF (10 ppm, pH7) khi phân hủy bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Đồng thời với sự diễn ra của quá trình quang xúc tác bởi vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, ba loại kháng sinh thử nghiệm cũng được quang phân hủy trực tiếp (photolysis) khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời. Dưới tác động của các photon ánh sáng, cấu trúc hóa học của kháng sinh có thể trực tiếp bị biến đổi hoặc chúng truyền năng lượng hấp thụ được cho các hợp chất khác và trở lại trạng thái không kích thích ban đầu [211]. Thông qua quá trình truyền năng lượng này các gốc ROS được tạo ra và quay trở lại thực hiện phản ứng phân hủy kháng sinh (Hình 3.15).

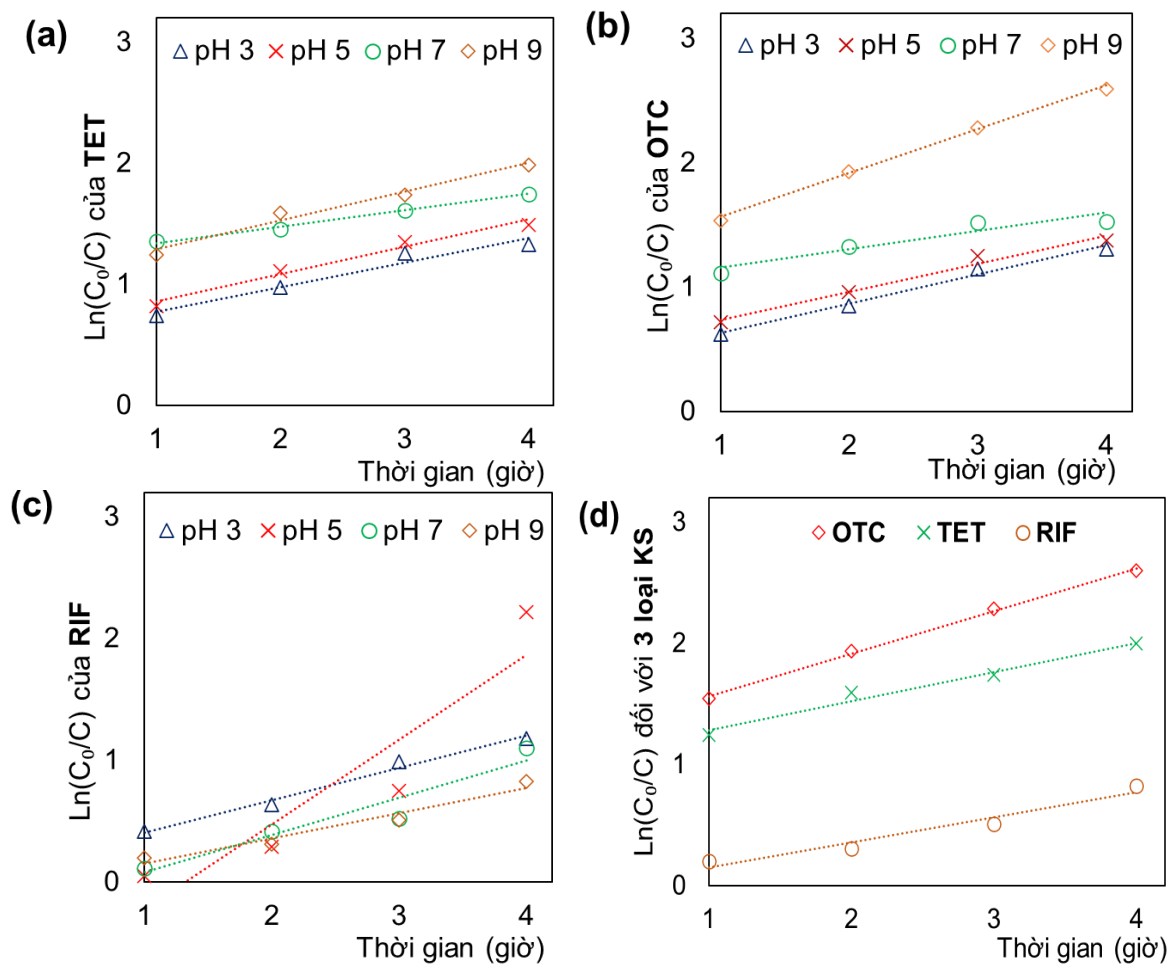


Hình 3.15. Sự phân hủy của các hợp chất kháng sinh thông qua quá trình quang phân (photolysis) và quang xúc tác (photocatalytic) [212].

Sự hấp thụ photon trực tiếp từ ánh sáng thường xảy ra đối với các hợp chất chứa nhiều liên kết no và không no xen kẽ nhau như trong cấu trúc của TET, OTC và RIF [213]. Trong nuôi thủy sản, pH môi trường thường được duy trì ở khoảng 7,8 tới 8,5 [61]. Do vậy khi đánh giá hiệu suất quang phân hủy trực tiếp của kháng sinh ở điều kiện pH 7 hay 9, kết quả cho thấy năng lượng ánh sáng mặt trời chỉ phân hủy được 53,7 đến 63,6% đối với TET và OTC ở nồng độ bổ sung ban đầu là 10 ppm (Hình 3.11, 3.12). Hiệu suất xử lý giảm xuống dưới 50% khi nồng độ kháng sinh tăng lên 20 hay 30 ppm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Dai *et al.* cho thấy hiệu quả quang phân trực tiếp của TET thấp hơn đáng kể khi so sánh với thí nghiệm sử dụng chất quang xúc tác [214]. Mặt khác, RIF khó bị phân hủy trong môi trường không chứa vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, ngay cả ở nồng độ kháng sinh thấp 10 ppm (pH 7), chỉ 15,7% hàm lượng RIF ban đầu được loại bỏ dưới tác động của ánh sáng mặt trời sau 4 tiếng xử lý, nhưng hiệu suất này đạt đến 76,7% trong bình thí nghiệm có chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$. Màu sắc kháng sinh RIF trong các mẫu đối chứng (không bổ sung $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$) cũng không có sự thay đổi nhiều so với thời điểm bắt đầu, trong khi đó màu nâu đỏ của RIF (10 ppm) nhạt theo thời gian xử lý trong mẫu bổ sung vật liệu quang xúc tác (Hình 3.14). Kết quả tương tự cũng được đưa ra trong nghiên cứu của Zambrano *et al.*, một số loại kháng sinh như tetracycline, ciprofloxacin, sulfadiazine và sulfamethoxazole cần thời gian từ 100 đến 240 giờ để phân hủy hoàn toàn khi được chiếu xạ với tia UV-C, trong khi đó, nếu môi trường bổ sung TiO_2 thì chỉ sau 3,5 đến 15,6 giờ đã loại bỏ đến 99-100% lượng kháng sinh ban đầu [215]. Các phân tích này đã khẳng định vai trò quan trọng của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ trong việc nâng cao hiệu quả xử lý các chất kháng sinh ô nhiễm.

b. Nghiên cứu động học quá trình phân hủy kháng sinh của TiO₂-Ag/EC

Để khẳng định thêm sự phụ thuộc của phản ứng phân hủy ba loại kháng sinh bởi vật liệu TiO₂-Ag/EC vào pH của môi trường, bên cạnh đánh giá về hiệu suất xử lý, động học quá trình phân hủy này cũng được chúng tôi tiến hành nghiên cứu dựa trên mô hình động học bậc 1 (pseudo-first-order (PFO) kinetic model). Giá trị R² cho tất cả các mô hình đạt từ 0,87 đến 0,99 cho thấy sự phù hợp của mô hình động học này trong mô tả kết quả thí nghiệm (Bảng 3.5). Hằng số tốc độ phản ứng phân hủy (*k*) của TET, OTC và RIF ở nồng độ 20 ppm trong các điều kiện pH khác nhau được trình bày tại Hình 3.16 và Bảng 3.5. Trong đó, hằng số *k* của TET và OTC tăng từ $5,45 \times 10^{-3}$ và $5,53 \times 10^{-3}$ tại pH 3 lên giá trị cao nhất là $10,83 \times 10^{-3}$ và $8,31 \times 10^{-3}$ tại pH 9 hoàn toàn tương đồng với độ tăng hiệu suất phân hủy tại Hình 24, 25 của hai kháng sinh này trong điều kiện bazơ. Ngược lại, đối với RIF, kháng sinh này có thể được phân hủy tối ưu trong môi trường acid nhẹ ở pH 5 với giá trị *k* đạt cao nhất là $9,23 \times 10^{-3}$.



Hình 3.16. Động học quá trình phân hủy TET (a), OTC (b), RIF (c) với nồng độ ban đầu 20 ppm ở các pH khác nhau sử dụng vật liệu TiO₂-Ag/EC dưới ánh sáng mặt trời; so sánh hằng số tốc độ phản ứng (*k*) của ba loại kháng sinh ở pH 9 (d).

Bảng 3.5. Hằng số tốc độ phản ứng (k) và giá trị R^2 của quá trình phân hủy kháng sinh sử dụng vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ dưới ánh sáng mặt trời.

	Oxytetracycline		Tetracycline		Rifampicin	
	k	R^2	k	R^2	k	R^2
pH 3	$5,45 \times 10^{-3}$	0,99	$5,53 \times 10^{-3}$	0,95	$4,92 \times 10^{-3}$	0,97
pH 5	$5,71 \times 10^{-3}$	0,98	$6,24 \times 10^{-3}$	0,98	$9,23 \times 10^{-3}$	0,87
pH 7	$6,40 \times 10^{-3}$	0,90	$7,30 \times 10^{-3}$	0,99	$4,58 \times 10^{-3}$	0,92
pH 9	$10,83 \times 10^{-3}$	0,99	$8,31 \times 10^{-3}$	0,98	$3,45 \times 10^{-3}$	0,95

c. Xác định độc tính của dịch kháng sinh sau phân hủy bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Trong nuôi thủy sản, các chủng vi khuẩn có lợi thuộc chi *Bacillus* và *Lactobacillus* thường được bổ sung vào môi trường hay thức ăn của vật nuôi để kích thích tiêu hóa, sinh trưởng cũng như năng suất thu hoạch. Tuy nhiên, nghiên cứu của Blandino *et al.* (2008) cho thấy các kháng sinh vancomycin, ampicillin, cefotaxime và erythromycin ở mức ≤ 2 mg/L đã có thể ức chế sinh trưởng của các chủng vi khuẩn có lợi thuộc chi *Bifidobacterium* spp. [216]. Đặc biệt đối với *Lactobacillus*, đây là nhóm vi khuẩn Gram âm, không có khả năng sinh bào tử nên sinh trưởng của chúng dễ bị ảnh hưởng bởi các tác nhân từ môi trường bên ngoài. Do vậy, ba mẫu kháng sinh TET, OTC và RIF (nồng độ ban đầu 10 ppm, pH 7) sau khi được phân hủy bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, ký hiệu lần lượt là TET_{TA} , OTC_{TA} , RIF_{TA} , đã được chúng tôi kiểm tra với chủng vi khuẩn có lợi *Lactobacillus acidophilus* LB và chủng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và so sánh với mẫu kháng sinh gốc ban đầu trước khi xử lý, kết quả thu được sẽ giúp đưa ra nhận định về hiệu quả làm giảm độc tính kháng sinh ban đầu sau bị quang hóa phân hủy bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Các dung dịch kháng sinh được bổ sung vào môi trường nuôi khuẩn ở các nồng độ khác nhau (0, 5, 10, 15, 20, 25 và 30% v/v), sau 24 giờ nuôi cấy, sinh trưởng của vi khuẩn trong mẫu được xác định thông qua giá trị $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$. Bản đồ nhiệt tại Hình 30 thể hiện sự khác biệt rõ rệt về khả năng ức chế sinh trưởng của mẫu kháng sinh trước (TET, OTC và RIF) và sau phân hủy bởi vật liệu EC thông thường (gồm TET_{EC} , OTC_{EC} , RIF_{EC}) hay $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (gồm TET_{TA} , OTC_{TA} , RIF_{TA}).

TET và OTC là hai hợp chất thuộc nhóm kháng sinh Tetracycline với cấu trúc hóa học gồm nhiều vị trí tạo phức với các ion kim loại như hệ β -diketone (C11, 12), nhóm enol (C1, 3) và carboxamide (C2) [217]. Phức hợp giữa kháng sinh nhóm này với ion Mg^{2+} đóng vai trò quan trọng giúp chúng liên kết và ngăn cản hoạt động tổng hợp protein của tiểu đơn vị ribosome 30S, từ đó tạo nên hoạt tính kháng khuẩn của hợp chất. Do vậy, ở nghiên cứu hiện tại, vi khuẩn *L. acidophilus* LB đã bị ức chế hoàn toàn khi bổ sung TET và OTC ở nồng độ 5% (tương đương với 0,5 mg/mL),

tăng liều kháng sinh lên 10% cũng giúp bất hoạt các tế bào vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192. Tuy nhiên, điểm đặc biệt là hai chủng vi khuẩn này có thể sinh trưởng tốt trong môi trường chứa TET_{TA} và OTC_{TA} ở tất cả nồng độ thử nghiệm từ 5 đến 30%. Tại hàm lượng bổ sung 30%, giá trị OD₆₀₀ của *L. acidophilus* LB và *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 trong mẫu TET_{TA} và OTC_{TA} cao tương đương so với mẫu đối chứng âm (không chứa kháng sinh). Trong khi, nếu kháng sinh chỉ được quang phân bởi ánh sáng mặt trời mà không có mặt TiO₂-Ag/EC, ký hiệu là TET_{EC} và OTC_{EC}, hoạt lực kháng khuẩn của dung dịch sau xử lý cũng giảm hơn so với mẫu kháng sinh ban đầu, nhưng với nồng độ bổ sung TET_{EC} và OTC_{EC} ở 15% đã ức chế sự phát triển của hai chủng vi khuẩn thử nghiệm (Hình 3.17).

L. acidophilus

	Nồng độ kháng sinh bổ sung						
	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
TET	0,964	0,054	0,048	0,040	0,064	0,048	0,077
TET _{EC}	1,083	0,666	0,069	0,065	0,040	0,045	0,063
TET _{TA}	1,055	1,129	1,139	1,065	1,179	1,054	1,107

	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
OTC	1,178	0,044	0,057	0,070	0,073	0,067	0,059
OTC _{EC}	1,143	0,718	0,305	0,069	0,065	0,040	0,056
OTC _{TA}	0,989	1,140	1,137	1,239	1,088	1,086	1,141

	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
RIF	1,231	0,046	0,065	0,063	0,070	0,058	0,058
RIF _{EC}	1,145	0,079	0,067	0,073	0,068	0,056	0,066
RIF _{TA}	1,204	1,213	1,078	1,145	1,051	1,117	1,118

V. parahaemolyticus

	Nồng độ kháng sinh bổ sung						
	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
TET	0,432	0,243	0,066	0,065	0,048	0,060	0,067
TET _{EC}	0,447	0,274	0,074	0,043	0,074	0,038	0,080
TET _{TA}	0,463	0,525	0,507	0,495	0,483	0,539	0,512

	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
OTC	0,520	0,221	0,062	0,046	0,044	0,049	0,074
OTC _{EC}	0,514	0,529	0,249	0,066	0,044	0,025	0,042
OTC _{TA}	0,470	0,524	0,516	0,537	0,540	0,527	0,524

	0	5%	10%	15%	20%	25%	30%
RIF	0,492	0,072	0,072	0,064	0,058	0,048	0,066
RIF _{EC}	0,485	0,148	0,053	0,033	0,025	0,039	0,042
RIF _{TA}	0,512	0,511	0,569	0,590	0,520	0,559	0,553

Hình 3.17. Ảnh hưởng của các dung dịch kháng sinh gốc (TET, OTC và RIF); kháng sinh được quang phân trực tiếp bởi ánh sáng mặt trời (TET_{EC}, OTC_{EC} và RIF_{EC}) và kháng sinh được quang xúc tác phân hủy bởi vật liệu TiO₂-Ag/EC (TET_{TA}, OTC_{TA} và RIF_{TA}) đến sinh trưởng (thể hiện qua giá trị OD₆₀₀ sau 24 giờ nuôi khuẩn).

Yuan *et al.* (2011) gợi ý gốc ROS (H₂O₂) có thể tấn công phá vỡ các liên kết hóa học của OTC và chuyển hóa chúng thành các sản phẩm thứ cấp như đơn giản không độc hại như 1, 4-benzenedicarboxylic acid, 4-oxopentanoic acid, propanedioic acid, hydroxymalonic acid, glycerin và một số aliphatic acids khác [218]. Tuy nhiên, sản phẩm trung gian của quá trình quang hóa trực tiếp (photolysis) OTC có một số nhóm chức thay đổi so với hợp chất kháng sinh gốc nhưng vẫn còn chứa cấu trúc tetra-phenyl nên chúng dễ dàng thẩm thấu qua màng của nhóm vi khuẩn phát sáng [219]. Do vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi sau 4 giờ xử lý, khi trên 92% hàm lượng TET và OTC đã bị phân hủy, điều này khiến cho mẫu TET_{TA} và OTC_{TA} sau xử lý không còn khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn *L. acidophilus* LB và *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 trong nồng độ thử nghiệm. Đối với mẫu đối chứng

bổ sung vật liệu EC không chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, TET và OTC chỉ bị quang phân một phần bởi ánh sáng mặt trời, với hiệu suất xử lý kháng sinh đạt lần lượt dưới 57,5 và 64,0% (Hình 24, 25), nên lượng kháng sinh tồn dư trong mẫu TET_{EC} và OTC_{EC} ngăn cản sinh trưởng của vi khuẩn ngay khi bổ sung ở nồng độ 10 - 15%. Kết quả tương tự cũng thu được đối với kháng sinh RIF, các tế bào vi khuẩn *L. acidophilus* LB bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 5% RIF_{EC} , nhưng lại có thể sinh trưởng bình thường trong môi trường bổ sung 30% RIF_{TA} .

3.2.3.3. Khả năng phân hủy hợp chất hữu cơ (COD)

a. Ảnh hưởng của nồng độ COD đến hiệu suất xử lý

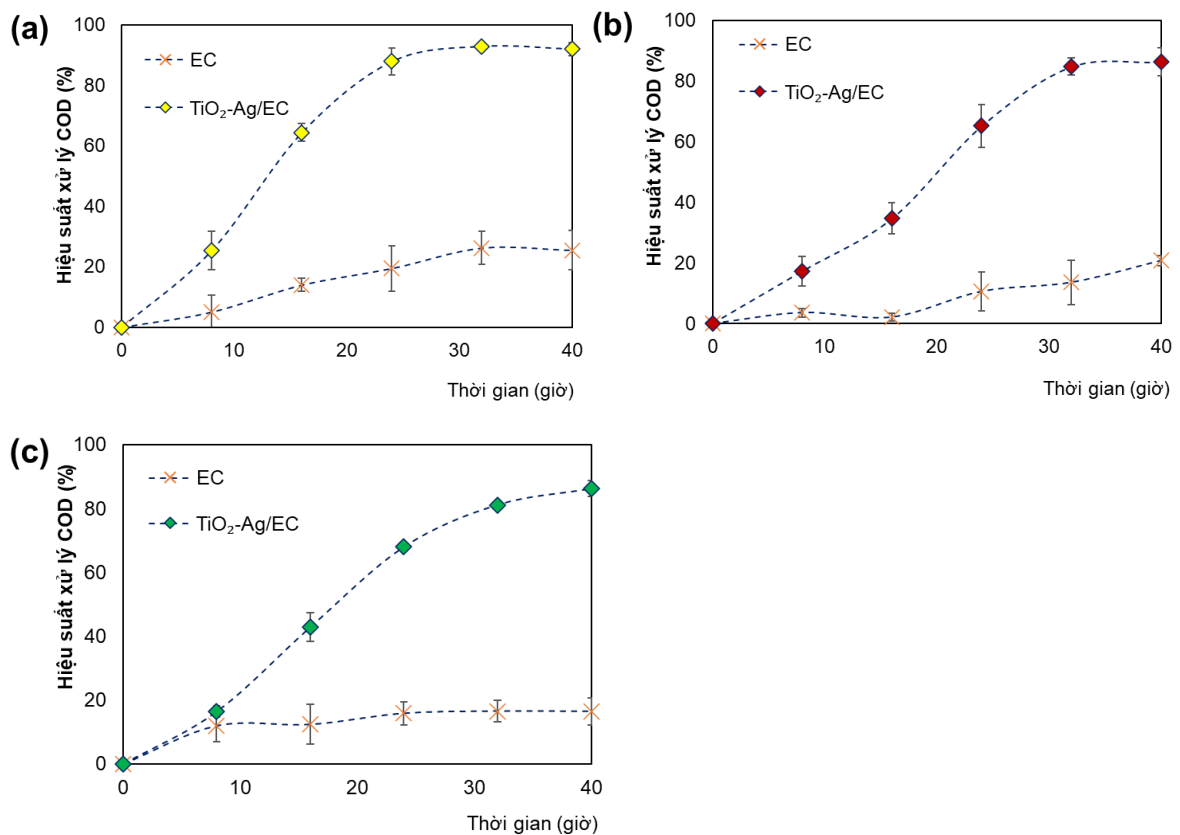
Trong qui trình nuôi một vụ tôm, theo Wang *et al.* (2023) cho rằng chỉ 21-24% N và 10-13% P trong thức ăn được tôm sử dụng cho sinh trưởng, phần còn lại lắng đọng xuống đáy hồ và theo thời gian sẽ gây nên ô nhiễm hữu cơ [4]. Quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ sẽ hình thành các hợp chất nitơ vô cơ như amoni, nitrit, nếu hàm lượng các hợp chất này vượt quá qui định cho phép sẽ trở thành các hợp chất độc hại. Chính sự xuất hiện của các chất ô nhiễm này làm suy giảm khả năng miễn dịch của vật nuôi, tăng nguy cơ lây lan của dịch bệnh và đây là tình trạng dẫn đến người nuôi trồng thủy sản lạm dụng kháng sinh để phòng và điều trị bệnh. Vì vậy, xử lý ô nhiễm hữu cơ có thể đóng vai trò quan trọng giúp hạn chế sự phát sinh của những tác nhân ô nhiễm khác.

Dựa trên cơ chế phản ứng quang xúc tác như trình bày ở phần tổng quan tài liệu, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ ở các nghiên cứu trước đây đã chứng minh có thể phân hủy hiệu quả một số loại kháng sinh tổng hợp và tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh. Với mục đích ứng dụng chúng trong xử lý ô nhiễm môi trường nước nuôi tôm, tiếp nối các nghiên cứu trước, vật liệu này tiếp tục được nghiên cứu thử nghiệm khả năng phân hủy hợp chất hữu cơ hình thành từ thức ăn thủy sản trong mô hình phòng thí nghiệm.

Để tạo ra môi trường có nồng độ COD cao mô phỏng sự ô nhiễm hữu cơ trong hồ nuôi thủy sản, theo Zainol *et al.* (2022), một lượng thức ăn thủy sản (khoảng 0,07%) có thể được thêm vào môi trường nước, sau đó tiến hành khử trùng [151]. Do đó, phương pháp tương tự đã được chúng tôi áp dụng để tạo ra dung dịch có hàm lượng COD tương đương 250 mg/L từ thức ăn nuôi tôm công nghiệp (Tomboy-Skretting Việt Nam), từ đó pha loãng để tạo ra các môi trường có mức ô nhiễm hữu cơ khác nhau (25, 50 và 100 mg/L) nhằm đánh giá hiệu suất loại bỏ COD của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Kết quả thể hiện tại Hình 3.18 cho thấy trên $92,9 \pm 0,7\%$ hàm lượng COD ban đầu 25 mg/L có thể được $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ loại bỏ sau 32 giờ dưới ánh sáng mặt trời. Khi tăng nồng độ COD lên 50 và 100 mg/L, hiệu suất vẫn được duy trì ở mức cao, đạt

trên 86% tại thời điểm 40 giờ. Sự quang phân hủy trực tiếp (photolysis) hợp chất hữu cơ bởi ánh sáng mặt trời cũng được ghi nhận ở nghiên cứu này, nhưng hiệu suất chỉ ở mức thấp dưới 25,5% ở cả ba nồng độ COD thử nghiệm. Trong thí nghiệm này, khả năng loại bỏ COD xác định dựa vào hàm lượng của toàn bộ các hợp chất hữu cơ trong môi trường trước và sau xử lý. Trong khi trước đây đối với thí nghiệm phân hủy kháng sinh, hiệu suất xử lý được tính trên độ giảm nồng độ của hợp chất kháng sinh gốc mà chưa xét đến sự hình thành và chuyển hóa của các sản phẩm trung gian sau phản ứng. Do vậy, khi so sánh kết quả của hai thí nghiệm này, $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ có khả năng phân hủy kháng sinh nhanh hơn (trong 4 giờ) so với phân hủy hợp chất hữu cơ (trong 32-40 giờ).



Hình 3.18. Ảnh hưởng của các nồng độ COD ban đầu khác nhau: 25 mg/L (a), 50 mg/L (b) và 100 mg/L (c) đến hiệu suất phân hủy các hợp chất hữu cơ của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

Hiện nay, vật liệu quang xúc tác cũng được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm sử dụng để xử lý ô nhiễm COD trong các môi trường khác nhau. Nghiên cứu của Munien *et al.* (2023) đã chứng minh khi chiếu sáng bởi tia UV với nồng độ TiO_2 600 ppm có thể loại bỏ 25,88% hàm lượng COD trong nước thải sinh hoạt [220]. Hiệu quả xử lý COD trong nước thải công nghiệp đạt đến 94,5% ở nghiên cứu của Orojlu *et al.* (2022) khi tăng nồng độ TiO_2 sử dụng lên 2.000 ppm. Đối với nghiên cứu của chúng tôi, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được chế tạo với hàm lượng Ti tích hợp trên EC ở khoảng

2.500 ppm [221]. Như vậy khi bổ sung $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ ở tỷ lệ 10% w/v vào dung dịch xử lý thì có thể ước lượng được nồng độ chất quang xúc tác (tính theo Ti) có trong môi trường chỉ đạt mức tương đương 250 ppm. Tuy nhiên, trong môi trường nuôi thủy sản, nồng độ COD thường thấp hơn so với giá trị COD thường thấy ở nước thải công nghiệp (nồng độ ~ 1.000 mg/L) [221], [222]. Vì vậy, dù sử dụng ở nồng độ thấp, $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ vẫn đạt được hiệu suất loại bỏ COD cao trên 86% ở cả ba nồng độ COD thử nghiệm (25, 50 hay 100 mg/L)

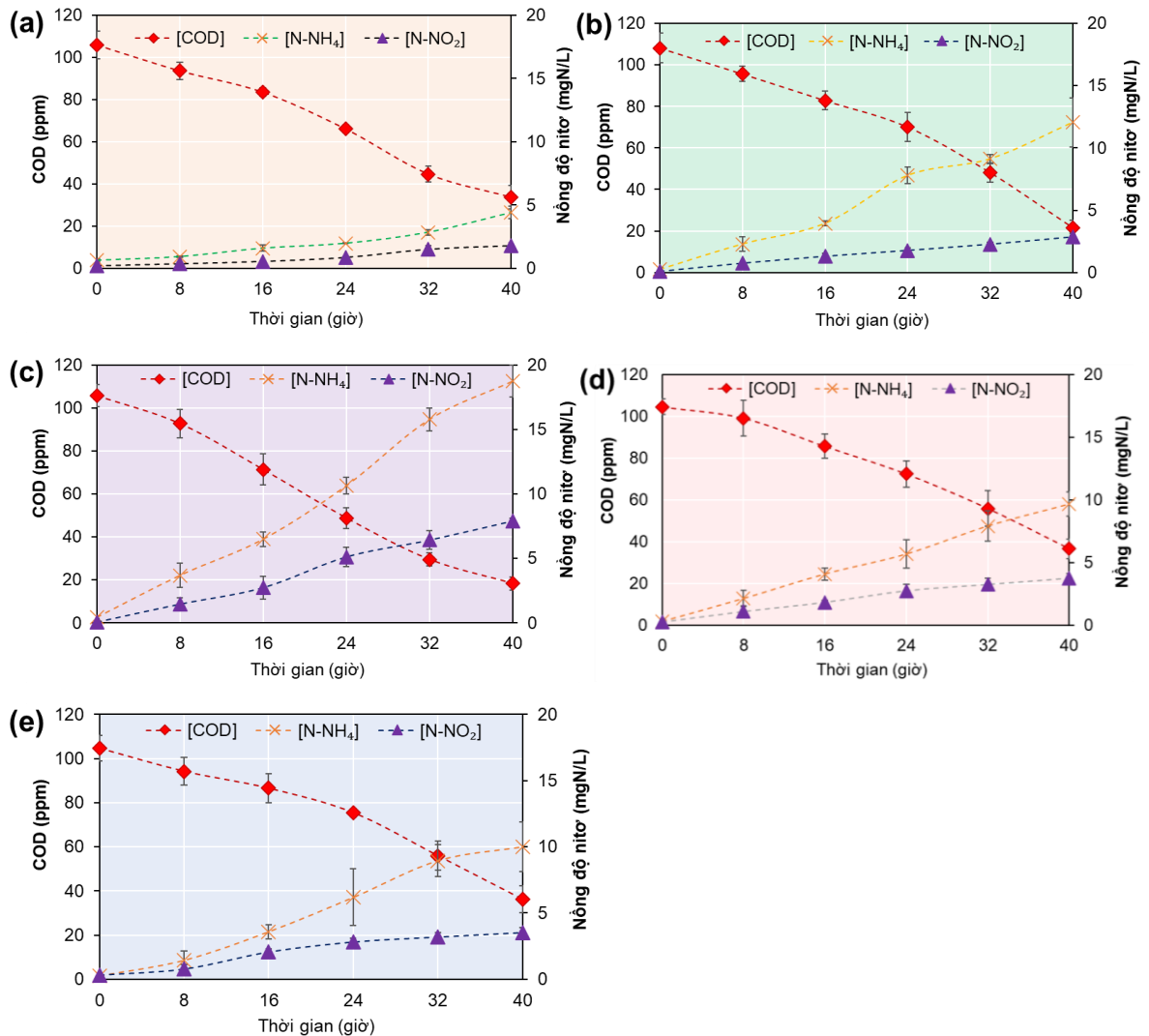
b. Ảnh hưởng của tỷ lệ vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ sử dụng đến hiệu suất xử lý

Tại mô hình thử nghiệm ban đầu, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ với tỷ lệ 10% w/v có thể loại bỏ được $86,2 \pm 2,5\%$ hàm lượng COD ở 100 mg/L, nhưng chất mang EC có tính chất nổi, vì vậy khi áp dụng tỷ lệ bổ sung này vào thực tế có thể khiến vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ nổi bao phủ phần lớn diện tích mặt hồ nuôi. Do vậy, chúng tôi hướng đến đánh giá ảnh hưởng của các tỷ lệ bổ sung $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ khác nhau (0,5; 1; 2,5; 5 và 7,5% w/v) đến hiệu quả xử lý COD (100 ppm) nhằm tìm ra lượng bổ sung thấp nhất có thể sử dụng mà vẫn duy trì được hiệu suất xử lý, đây có thể là yếu tố quan trọng giúp giảm thiểu một phần chi phí vụ nuôi.

Hình 3.19 thể hiện khi tăng tỷ lệ $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ sử dụng từ 0,5 lên 2,5% w/v thì hàm lượng COD còn lại sau xử lý giảm từ $33,6 \pm 5,5$ xuống $18,4 \pm 3,1$ mg/L tương ứng với hiệu suất loại bỏ COD đạt cao nhất là $82,7 \pm 2,0\%$ sau 40 giờ chiếu sáng. Tuy nhiên, hiệu suất này có xu hướng giảm xuống $65,2 \pm 6,7\%$ nếu lượng vật liệu quang xúc tác trong môi trường tăng lên 5 và 7,5% w/v. Zhang *et al.* (2020) cũng chỉ ra chất quang xúc tác KBNNO ($[\text{KNbO}_3]_{0.9}\text{-}[\text{BaNi}_{0.5}\text{Nb}_{0.5}\text{O}_3\text{-}\delta]_{0.1}$) ở nồng độ 1.800 mg/L có thể loại bỏ 44% hàm lượng thuốc nhuộm methyl blue nhưng hiệu suất phản ứng này không thay đổi đáng kể trong trường hợp KBNNO sử dụng ở nồng độ 2.000 mg/L [223]. Điều này có thể được giải thích bởi khi mật độ chất quang xúc tác nhỏ, lượng photon được hấp thụ và chuyển hóa sinh ra gốc ROS thấp, do đó hiệu suất phản ứng phân hủy không cao. Nếu vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được bổ sung thêm vào môi trường, lúc này diện tích bề mặt hấp thụ photon lớn giúp cải thiện hiệu quả quang xúc tác. Nhưng khi tỷ lệ $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ tăng đến giá trị nhất định mà diện tích bề mặt bề phản ứng không đổi, các hạt vật liệu này có thể che khuất làm giảm sự hấp thụ ánh sáng của nhau khi cùng nổi trên bề mặt, từ đó hiệu quả xử lý không tăng tương ứng với sự tăng của số khối lượng chất quang xúc tác sử dụng.

Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của chúng tôi, sự xuất hiện của hai hợp chất NH_4^+ và NO_2^- cũng được xác định với hàm lượng tăng dần theo thời gian phản ứng (Hình 4). Bình phản ứng chứa 2,5% w/v $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ có hiệu suất phân hủy chất hữu

cơ tốt nhất khiến nồng độ NH_4^+ và NO_2^- hình thành đạt mức cao lần lượt là $18,7 \pm 1,2$ và $7,9 \pm 0,2$ mgN/L.

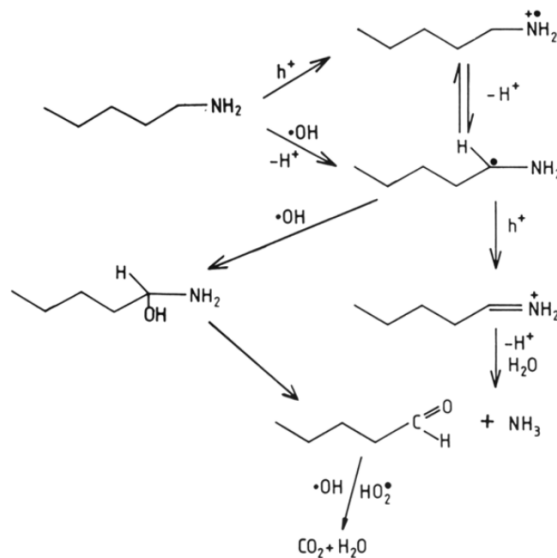


Hình 3.19. Ảnh hưởng của tỷ lệ $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ bổ sung: 0,5 (a); 1 (b); 2,5 (c); 5 (d) và 7,5% w/v (e) đến hiệu suất phân hủy hợp chất hữu cơ.

Trong nuôi thủy sản, nguồn thức ăn công nghiệp sử dụng thường có thành phần protein thô chiếm tới 25% - 40% hàm lượng dinh dưỡng, cao hơn so với thức ăn được sử dụng cho động vật nuôi trên cạn (gia cầm, lợn và gia súc) [224]. Do vậy, quá trình quang hóa để phân hủy axit amin trong protein có thể dẫn đến hình thành các sản phẩm cuối cùng là hợp chất amoni, nitrit hay nitrat. Đây cũng là vấn đề đáng lo ngại được nhiều nghiên cứu chỉ ra khi ứng dụng chất quang xúc tác để phân hủy những hợp chất hữu cơ chứa nguyên tố nitơ trong cấu trúc hóa học của chúng (nitrogen-containing organic compounds) [225, 226]. Kết quả nghiên cứu của Low *et al.* (1991) cho thấy, amoni và nitrat là hai sản phẩm luôn xuất hiện khi TiO_2 phân hủy một số hợp chất như n-pentylamine, piperidine, pyridine, phenylalanine, desipramine, thioridazine, penicillamine, isosorbide dinitrate, 4-nitrocatechol, 2,4-

dinitrophenol, cyclophosphamide, 5-fluorouracil, atrazine, ethylenediaminetetracetic acid và tetrabutylammonium phosphate (Hình 3.20) [219].

Theo lý thuyết, amoni và nitrit có thể tiếp tục được $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ oxy hóa/khử thành khí nitơ phân tử, nhưng trong điều kiện nuôi thủy sản có pH dao động trong khoảng 7,8 – 8,5 thì hai hợp chất nitơ vô cơ này tồn tại chủ yếu ở dạng NH_3 và NO_2^- , khó hấp phụ lên bề mặt mang điện âm của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ do lực đẩy tĩnh điện. Bởi vậy, cần có sự kết hợp của nhiều biện pháp để có thể đồng thời xử lý hiệu quả tình trạng ô nhiễm phát sinh từ quá trình phân hủy hợp chất hữu cơ trong hồ nuôi thủy sản.



Hình 3.20. Cơ chế hình thành amonia từ hợp chất n-Pentylamine khi bị quang phân hủy bởi TiO_2 [226].

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

3.3.1. Lựa chọn các chủng vi khuẩn khử nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí để tích hợp trên EC_Alg_N

3.3.1.1. Đánh giá khả năng khử nitrat/nitrit của vi khuẩn

Phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) là quá trình sử dụng các con đường chuyển hóa của vi sinh vật để phân hủy các hợp chất gây ô nhiễm trong môi trường. Để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về xử lý ô nhiễm nitơ trong hệ thống nuôi trồng thủy sản, các nghiên cứu cho đến nay vẫn luôn đề cập đến việc loại bỏ các hợp chất ô nhiễm này bằng con đường xử lý sinh học áp dụng công nghệ nitrat hóa và khử nitrat. Vi khuẩn nitrat hóa (chủ yếu thuộc chi *Nitrosomonas* và *Nitrobacter*) có thể chuyển đổi amoni (NH_4^+) thành nitrit (NO_2^-) nhờ các enzyme ammonia monooxygenase (AMO), hydroxylamine oxidoreductase (HAO) và tiếp đó sử dụng enzyme nitrit oxidoreductase (NXR hay NOR) để oxy hóa nitrit thành nitrat trong

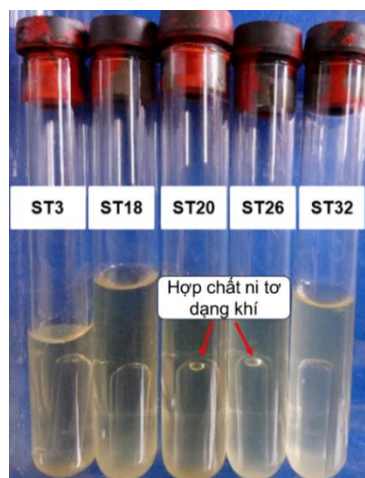
điều kiện hiếu khí. Trong khi đó, quá trình khử nitrat được tiếp diễn trong điều kiện kỵ khí dưới tác động từ hệ enzym reductase của vi khuẩn khử nitrat dị dưỡng để tạo thành các sản phẩm lần lượt là NO_2 , NO , N_2O và N_2 [227]. Sự khác biệt về nhu cầu sử dụng oxy của nhóm hai nhóm vi khuẩn này đặt ra khó khăn khi áp dụng chúng để loại bỏ amoni, nitrit trong môi trường nuôi thủy sản thường xuyên được sục khí. Do đó, nghiên cứu về việc lựa chọn các chủng vi khuẩn có khả năng loại bỏ nitrat/nitrit hiếu khí nên được tập trung để đơn giản hóa quá trình xử lý truyền thống [228].

Trong nghiên cứu này, mẫu nước thu thập từ hồ nuôi tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* tại Bạc Liêu, đã được làm giàu và đã phân lập được năm chủng vi khuẩn ký hiệu là ST3, ST18, ST20, ST26 và ST32. Đánh giá khả năng khử nitrat của 5 chủng vi khuẩn này trong điều kiện yếm khí bằng cách đưa các sinh khối vi khuẩn nuôi trong dịch môi trường đã được sục khí N_2 để loại bỏ O_2 rồi đậy kín nắp. Kết quả thể hiện tại Hình 3.21 cho thấy chỉ có sự xuất hiện của bọt khí trong ống Durham trong ống thí nghiệm chứa sinh khối hai chủng vi khuẩn ST20 và ST26, các chủng còn lại không nhìn thấy. Điều này chứng tỏ 2 chủng vi khuẩn ST20 và ST26 có khả năng khử nitrat để chuyển hóa thành các sản phẩm dạng khí trong điều kiện yếm khí. Hiệu suất loại bỏ nitrat của hai chủng vi khuẩn ST20 và ST26 đạt từ 68–81% sau 7 ngày nuôi (Hình 3.22 a). Quá trình khử nitrat bao gồm bước khử nitrit, do đó hai chủng này được kiểm tra thêm khả năng loại bỏ nitrit trong điều kiện yếm khí. Kết quả (Hình 3.22 b) cho thấy, với nồng độ nitrit ban đầu 20 mg-N/L, cả hai chủng đều loại bỏ được tới 77% sau 7 ngày nuôi. Như vậy, ST20 và ST26 được xác định là các chủng vi khuẩn có thể khử trực tiếp nitrit trong điều kiện yếm khí.

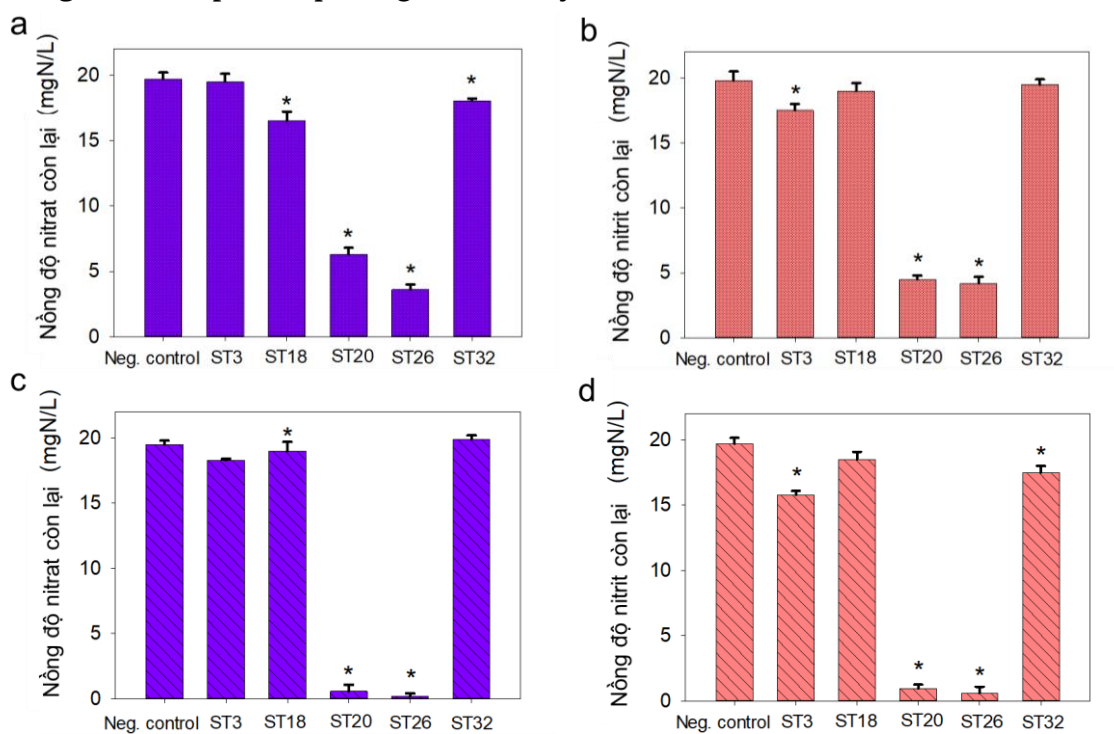
Trong môi trường nuôi thủy sản thường xuyên được sục khí để cung cấp đủ oxy cho sinh trưởng của vật nuôi, do đó dễ ứng dụng trong xử lý ô nhiễm thực tế, hướng tới mục tiêu phân lập được các chủng vi khuẩn có khả năng loại bỏ nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí. Tiến hành thử nghiệm trong điều kiện nuôi lắc (Hình 3.22c) cho thấy hiệu suất loại bỏ nitrat của ST20 và ST26 ở điều kiện hiếu khí vượt trội hơn so với yếm khí. Cụ thể, sau 72 giờ nuôi, hàm lượng nitrat còn lại chỉ ở mức 0,57 và 0,21 mg-N/L, thấp hơn nhiều so với 6,30 và 3,60 mg-N/L trong điều kiện yếm khí. Trong khi đó, các chủng ST3, ST18, ST32 gần như không thay đổi hàm lượng nitrat, duy trì ở mức tương đương mẫu đối chứng âm (khoảng 19,5 mg-N/L). Song song với việc đánh giá khả năng khử nitrat, thì việc khử nitrit cũng được tiến hành trong điều kiện hiếu khí, kết quả ở Hình 3.22 d đã cho thấy ST20 và ST26 có hiệu quả cao trong việc loại bỏ nitrit, đạt hiệu suất lần lượt 95,2% và 97,0%, cao hơn hẳn so với các chủng còn lại.

Như vậy kết quả thu được đã chứng minh, hai chủng vi khuẩn ST20 và ST26

là vi khuẩn khử nitrat/nitrit trong điều kiện yếm khí nhưng có khả năng loại bỏ được nitrat/nitrit trong điều kiện hiếu khí.



Hình 3.21. Sự hình thành hợp chất nitơ dạng khí trong quá trình khử nitrat của các chủng vi khuẩn phân lập trong điều kiện yếm khí.



Hình 3.22. Hoạt tính khử nitrat/nitrit của các chủng vi khuẩn trong điều kiện yếm khí (a, b) và hiếu khí (c, d).

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Ký hiệu “*” thể hiện cho sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) của các mẫu thử nghiệm so với đối chứng.

Trong các trang trại nuôi thủy sản, ao nuôi thường được sục khí để hỗ trợ sự phát triển của động vật [229]. Tuy nhiên, quá trình khử nitrat thường diễn ra trong điều kiện thiếu oxy trong khi oxy lại là thành phần cần thiết trong quá trình oxy hóa amoni thành nitrat, do đó hoạt động khử nitrat kỵ khí sẽ bị ức chế bởi sự hiện diện của oxy. Hơn nữa, con đường khử nitrat hoàn chỉnh được chia thành bốn bước theo

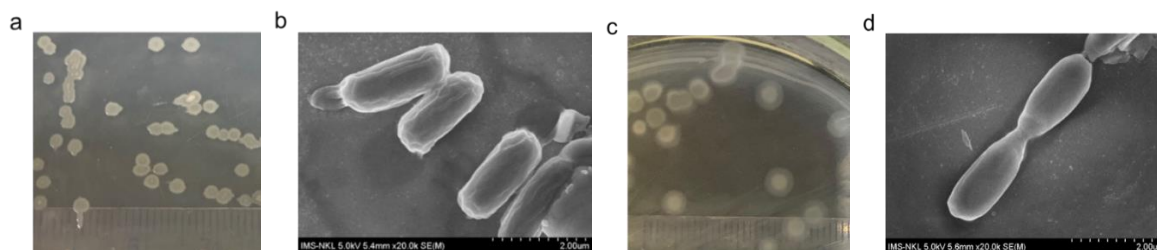
trình tự tham gia của các enzyme nitrat reductase (NAR), nitrit reductase (NIR), nitric oxide reductase (NOR) và nitrous oxide reductase (NOS) [230, 231, 232]. Một số vi khuẩn được báo cáo rằng quá trình khử nitrat của chúng chỉ dừng lại ở sự tạo thành nitrit mà không tạo thành các sản phẩm nitơ dạng khí bởi hệ gen của chúng thiếu trình tự mã hóa cho các enzyme như NIR, NOR hay NOS [233, 234], hiện tượng này là một trong những nguyên nhân khiến nitrit bị tích tụ trong môi trường. Bên cạnh đó, Zhao *et al.* (2018) đã chỉ ra rằng tốc độ khử nitrat của chủng *Pseudomonas stutzeri* XL-2 giảm khi xuất hiện oxy với tốc độ lắc trong nuôi cấy vi khuẩn được đặt 90 vòng/phút hoặc 150 vòng/phút [235]. Hoạt tính khử nitrat của các vi khuẩn khác như *Pseudomonas stutzeri* 1-6 và *Acinetobacter* sp. 2-2 cũng bị ức chế ở mức oxy là 10,68 mg/L [236]. Nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy hai chủng vi khuẩn ST20 và ST26 có khả năng loại bỏ nitrat trong cả môi trường thiếu oxy và có oxy, như vậy sẽ giúp chúng phù hợp ứng dụng trong nhiều loại mô hình xử lý khác nhau, đặc biệt sẽ không bị ảnh hưởng trong quá trình xử lý tại các đầm ao nuôi thủy sản, nơi bắt buộc phải có guồng quay cung cấp oxy cho động vật thủy sản. Bên cạnh đó, các chủng ST20 và ST26 không chỉ có thể sử dụng nitrat mà còn có thể sử dụng nitrit làm chất nhận điện tử, do đó chỉ cần xuất hiện nitrit trong môi trường là chúng có thể chuyển hóa nitrit thành các dạng hợp chất nitơ khác. Như vậy ST20 và ST26 đã được lựa chọn cho các nghiên cứu thí nghiệm hiếu khí tiếp theo để đánh giá khả năng chuyển hóa nitơ của chúng trong các điều kiện môi trường khác nhau.

3.3.1.2. Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn khử nitrat lựa chọn

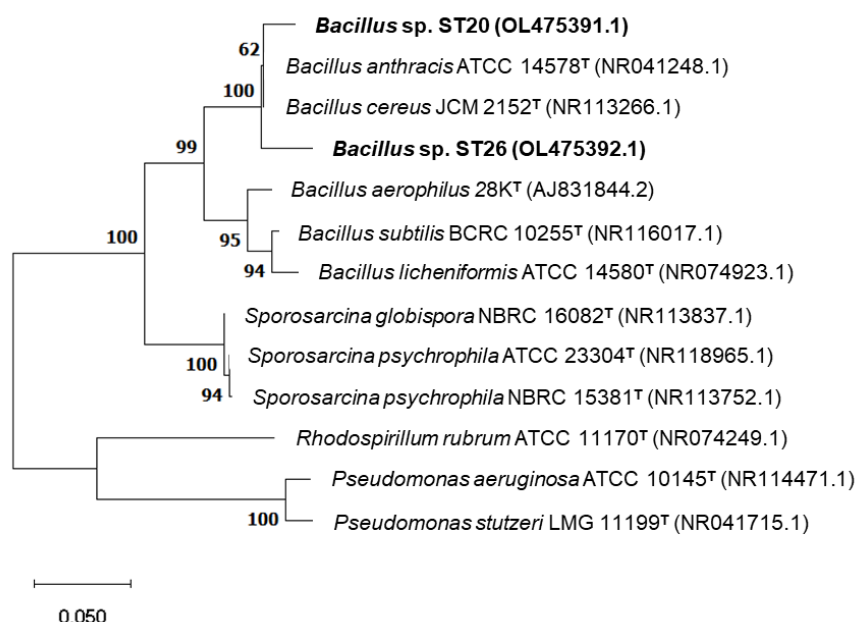
Sự khác biệt về hình dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào của hai chủng ST20 và ST26 được phát hiện bằng cách quan sát sự sinh trưởng của chúng trên môi trường thạch và dưới kính hiển vi điện tử quét (Hình 3.23). Các khuẩn lạc ST20 và ST26 xuất hiện có màu vàng kem, nhưng ST20 có đường kính khoảng 2 mm trong khi các khuẩn lạc ST26 có đường kính lớn hơn khoảng 5 mm. Các tế bào vi khuẩn của cả hai chủng đều có dạng hình que, với tế bào ST26 có bề mặt mịn hơn tế bào ST20.

Phân tích các trình tự gen 16S rRNA của ST20, ST26 và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI cho thấy hai chủng phân lập này có độ tương đồng cao với cả hai loài *Bacillus anthracis* và *Bacillus cereus*. Thật vậy, ST20 có sự tương đồng lần lượt là 98,39 và 98,18% với các chủng *Bacillus anthracis* ATCC 14578 và *Bacillus cereus* JCM 2152. Tỷ lệ phần trăm tương đồng của trình tự gen 16S rRNA của ST26 với hai chủng tham chiếu trên giảm nhẹ xuống còn 97,22 và 97,05%. Việc sử dụng trình tự gen 16S rRNA để xác định phân loại vi khuẩn từ lâu đã được các nhà khoa học áp dụng rộng rãi [237], tuy nhiên các nghiên cứu cho thấy trình tự 16S rRNA có khả năng phân biệt kém đối với một số chi và loài có quan hệ gần gũi như

Bacillus cereus, *Bacillus anthracis*, *Bacillus globisporus* và *Bacillus psychrophilus* [238]. Do đó, trong nghiên cứu này, ST20 và ST26 đã được định danh là *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26 (Hình 3.24). Trình tự 16S rRNA của chúng có thể được truy cập trên cơ sở dữ liệu NCBI sử dụng mã số OL475391.1 đối với chủng ST20 và OL475392.1 đối với chủng ST26.



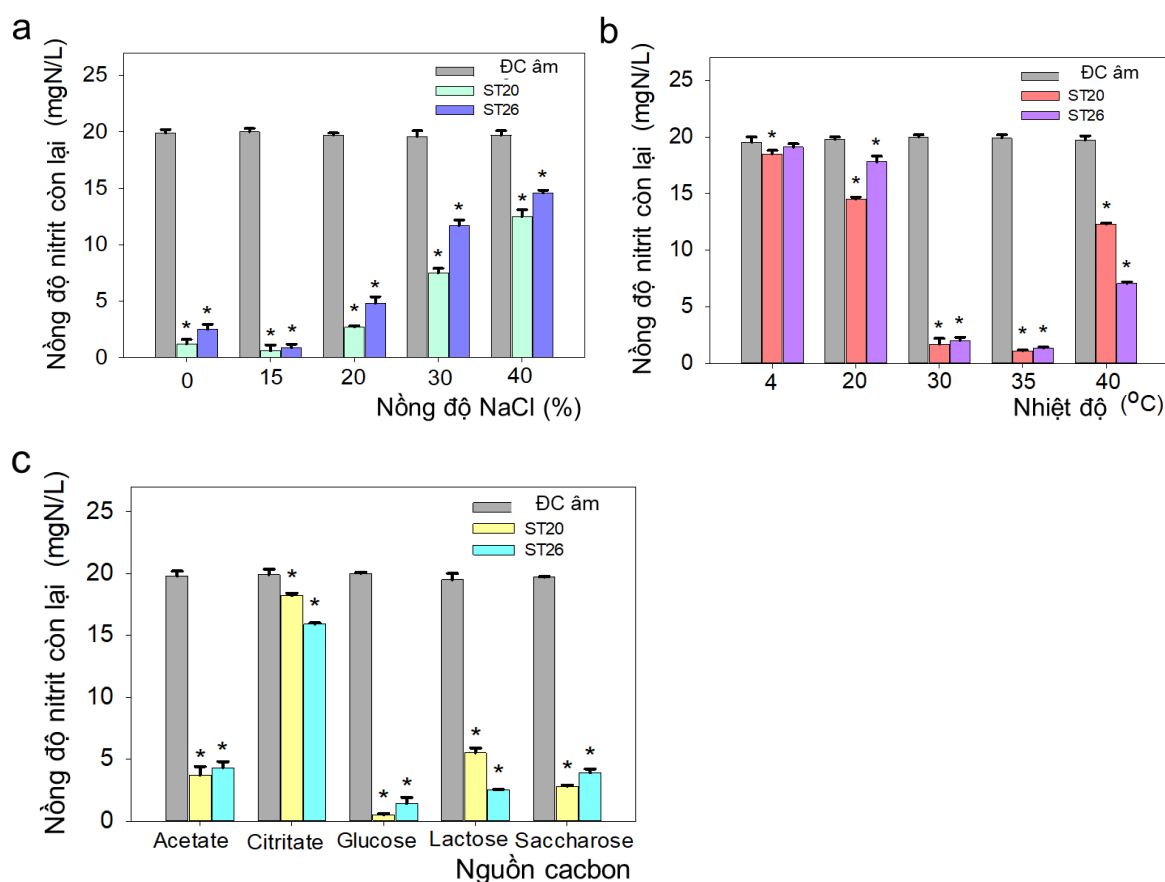
Hình 3.23. Hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn ST20 (a, b); ST26 (c, d)



Hình 3.24. Cây phát chủng loại của vi khuẩn ST20 và ST26

3.3.1.3. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng loại nitrit của vi khuẩn

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng loại bỏ nitrit của vi khuẩn ST20 và ST26 chỉ ra rằng hai chủng vi khuẩn này có thể thích ứng tốt với các điều kiện độ mặn và nhiệt độ thường được ghi nhận tại các vùng nuôi thủy sản nước lợ. Thật vậy, Hình 3.25 a cho thấy độ mặn $\leq 15\%$ là điều kiện tối ưu cho hai chủng vi khuẩn khử nitrit này. Ở nồng độ NaCl 15‰, khi bổ sung riêng rẽ sinh khối vi khuẩn ST20 và ST26 vào môi trường nuôi, hàm lượng nitrit giảm từ 20 mgN/L xuống lần lượt 0,6 mgN/L và 0,9 mgN/L, tương ứng với hiệu suất loại bỏ nitrit là 97 và 95,5% sau 72 giờ. Hiệu quả loại bỏ nitrit của chúng vẫn duy trì trên 75% khi nồng độ NaCl tăng lên đến 20‰. Nhưng khi độ mặn thử nghiệm ở mức 40‰ NaCl, thì nitrit chỉ giảm khoảng 37,6%.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl (a), nhiệt độ (b) và nguồn cacbon sử dụng (c) đến hiệu suất loại bỏ nitrit của ST20 và ST26.

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Ký hiệu “*” thể hiện cho sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) của các mẫu thử nghiệm so với đối chứng.

Trong nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, dữ liệu thể hiện ở Hình 3.25 b cho thấy, khả năng chuyển hóa nitrit của ST20 và ST26 ổn định ở nhiệt độ từ 30 - 35 °C với hiệu suất cao nhất tương ứng là 94,5% đối với ST20 và 93,3% đối với ST26 ở 35 °C. Nhiệt độ tăng lên 40 °C đã ảnh hưởng đến hoạt tính khử của cả 2 chủng vi khuẩn này, trong đó ST20 bị ảnh hưởng nhiều hơn so với ST26, khả năng khử nitrit của chúng chỉ đạt lần lượt là 38,5 và 64,7%. Ở 4 °C và 20 °C nồng độ nitrit trong môi trường chứa ST20 và ST26 gần như không thay đổi so với đối chứng âm.

Bên cạnh độ mặn và nhiệt độ, nguồn cacbon cũng đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển và hoạt động của vi khuẩn khử nitrat. Nguồn cacbon sử dụng trong nghiên cứu này là glucose, natri axetat, lactose và saccharose. Số liệu trình bày trong Hình 3.25 c đã thể hiện ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau đến hoạt tính chuyển hóa nitơ của ST20 và ST26. Trong số các nguồn cacbon thử nghiệm, glucose được cho là nguồn cacbon thích hợp nhất cho sinh trưởng cũng như hoạt tính của ST20 và ST26, hiệu suất loại bỏ nitrit cao nhất của hai chủng vi khuẩn này đạt hơn 93%. Ở các nguồn cacbon khác như acetate, saccharose hay lactose mặc dù hiệu quả

loại bỏ nitrit thu được thấp hơn so với nguồn glucose, nhưng vẫn đạt hiệu suất trên 72,5%. Đối với natri citrat, He *et al.* (2015) chứng minh rằng, chủng *Pseudomonas putida* Y9 có thể loại bỏ lượng nitơ tổng số cao hơn trong môi trường chứa nguồn cacbon này [239], tuy nhiên, natri citrat lại không có tác động tốt đến hai chủng vi khuẩn ST20 và ST26, hoạt tính chuyển hóa nitrit của chúng trong môi trường chứa natri citrat chỉ đạt dưới 20% sau 72 giờ nuôi cấy. Mặt khác, Peng *et al.* (2007) lại cho thấy tốc độ khử nitrat của hệ thống xử lý nước thải tăng từ 3,2 lên 9,6 hoặc 12 mgN/(gVSS x h) khi thêm methanol, ethanol hoặc axetat trong môi trường [240]. Những kết quả này cho thấy khả năng khử nitrat khác nhau của từng chủng vi khuẩn phụ thuộc vào nguồn cacbon sử dụng trong môi trường nuôi.

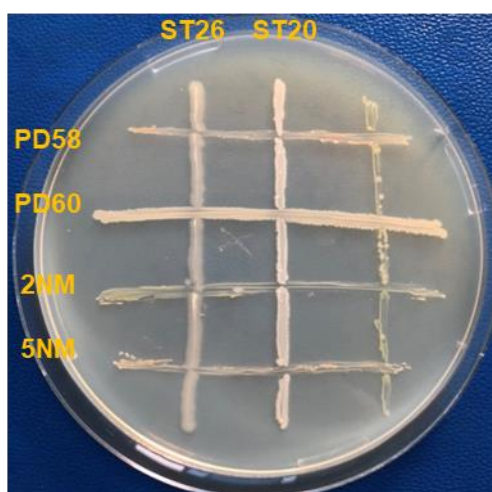
Trong nghiên cứu của chúng tôi, glucose được thêm vào môi trường như một nguồn cacbon bên ngoài để thay thế cho các hợp chất giàu dinh dưỡng như pepton, cao nấm men hoặc cao thịt nhằm mục đích kiểm tra xem vi khuẩn có thể sử dụng thành phần cacbon đơn giản để hỗ trợ sự sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa nitơ của chúng hay không. Từ đó, có thể tiết kiệm chi phí hơn khi cung cấp glucose thay vì các hợp chất có giá thành cao kể trên trong quá trình nhân nuôi sinh khối vi khuẩn quy mô lớn hay dùng trong hệ thống xử lý nước thải thực tế. Ngoài ra, sử dụng nguồn cacbon thay thế này cũng có thể làm hạn chế nguy cơ gây ô nhiễm hữu cơ thứ cấp khi vi khuẩn không thể sử dụng hết lượng dinh dưỡng được cung cấp bởi các hợp chất peptone, cao thịt hay cao nấm men kể trên.

3.3.1.4. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn nitrat hóa, khử nitrat

Trong quá trình nitrat hóa, amoni được oxy hóa thành nitrit và cuối cùng thành nitrat bởi vi khuẩn oxy hóa amoni (AOB) và vi khuẩn oxy hóa nitrit (NOB). Tuy nhiên, sự tích tụ nitrit có thể xảy ra khi vi khuẩn oxy hóa nitrit không thể oxy hóa toàn bộ lượng nitrit hình thành [241]. Do đó, sự kết hợp giữa vi khuẩn nitrat hóa với vi khuẩn khử nitrat/nitrit có thể làm tăng hiệu quả xử lý các hợp chất nitơ ô nhiễm, ngăn ngừa sự gia tăng đột biến của hàm lượng NO_x trong môi trường. Trong nghiên cứu này, kết quả nhận được từ Hình 3.26 cho thấy, hai chủng vi khuẩn khử nitrit *Bacillus* sp. ST20, *Bacillus* sp. ST26 không có hiện tượng đối kháng sinh trưởng với các chủng vi khuẩn oxi hóa amoni (PD58, PD60) và vi khuẩn oxy hóa nitrit (2NM, 5NM). Do vậy, chúng có thể tồn tại chung trong cùng một môi trường để thực hiện đồng thời quá trình xử lý amoni và nitrit.

Mặt khác, dữ liệu tại Bảng 3.6 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. Màng sinh học của vi khuẩn là sự hình thành lớp

polymer ngoại bào, có tác dụng bảo vệ chúng khỏi những tác động tiêu cực của điều kiện ngoại cảnh [242, 243]. Ngoài ra, sự hình thành màng sinh học là cơ sở để vi khuẩn dễ dàng bám dính vào bề mặt chất mang [244].



Hình 3.26. Khả năng đối kháng với nhau của vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat

Bảng 3.6. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn

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

Các nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả tuyệt vời của việc sử dụng vi khuẩn cố định so với vi khuẩn dạng tự do trong xử lý nước ô nhiễm [245, 246]. Zhao *et al.* (2020) đã chứng minh rằng việc sử dụng vi khuẩn nitrat hóa - khử nitrat hiếu khí *Klebsiella* sp. KSND cố định trên chất mang chitosan làm tăng hiệu quả loại bỏ nitơ lên 90,1%, trong khi hiệu quả của vi khuẩn dạng tự do chỉ đạt 87,7% [247]. Hơn nữa, trong nghiên cứu của Hill *et al.* (2008) quá trình cố định đồng thời vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat trên chất mang canxi alginate đã đạt được hiệu quả loại bỏ nitơ cao hơn nhiều so với việc cố định riêng vi khuẩn nitrat hóa [76]. 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.

3.3.2. Tối ưu điều kiện tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên EC_Algin_N

Nhóm vi khuẩn nitrat hóa (gồm chủng *Nitrosomonas* sp. PD58, *Nitrosomonas* sp. PD60 và *Nitrobacter* sp. 2NM, *Nitrobacter* sp. 5NM) và nhóm vi khuẩn khử nitrat/nitrit (gồm chủng *Bacillus* sp. ST20, *Bacillus* sp. ST26) có khả năng tạo màng tốt và không đối kháng lẫn nhau nên chúng được lựa chọn để tích hợp trên ba loại vật liệu chất mang khác nhau gồm: EC nguyên bản (EC), EC được phủ thêm lớp polyme alginate (EC_Algin) và EC cải tiến được phủ thêm lớp polyme alginate có chứa thành phần dưỡng chất dưới dạng nano (EC_Algin_N). Nghiên cứu trước đó đã xác định nhiệt độ 35 °C là phù hợp cho sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn, do vậy nhiệt độ này được sử dụng khi tích hợp vi khuẩn lên chất mang. Trong thí nghiệm này, sinh khối nhóm vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat (tỷ lệ 2:1 v/v) ở các mật độ 10^4 , 10^5 và 10^6 CFU/mL được sử dụng để tích hợp trên ba loại chất mang gồm EC, EC_Algin và EC_Algin_N theo thời gian.

Kết quả thể hiện tại Bảng 3.7 cho thấy khi dịch sinh khối vi khuẩn ban đầu với mật độ 10^5 và 10^6 CFU/mL được sử dụng, thời gian 2 ngày là thích hợp để các nhóm vi khuẩn này tạo màng sinh học và tích hợp trên chất mang, đạt mật độ 10^7 CFU/g EC đối với cả ba loại chất mang. Kéo dài thời gian tích hợp lên 4 ngày không làm thay đổi đáng kể mật độ vi khuẩn trên chất mang. Do vậy, mật độ vi khuẩn 10^5 CFU/mL trong dịch sinh khối ban đầu và thời gian tích hợp 2 ngày là các điều kiện được lựa chọn để tạo ra vật liệu tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ trong các thí nghiệm tiếp theo của nghiên cứu này.

Trong điều kiện lựa chọn trên, kết quả chỉ ra từ Bảng 3.7 chỉ ra chất mang EC_Algin_N có mật độ vi khuẩn tích hợp trên vật liệu cao nhất, 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. Ở vật liệu EC_Algin và EC làm mật độ vi khuẩn oxy hóa amoni giảm đáng kể xuống còn $(3,3 \pm 0,3) \times 10^7$ CFU/g và $(5,6 \pm 0,6) \times 10^7$. Trong ba loại vật liệu sử dụng, chất mang EC nguyên bản có khả năng tích hợp vi khuẩn oxy nitrit và vi khuẩn khử nitrat kém nhất. Mật độ của hai nhóm vi khuẩn này trên EC nguyên bản chỉ đạt lần lượt là $(3,2 \pm 0,5) \times 10^7$ và $(19 \pm 9) \times 10^7$ CFU/g.

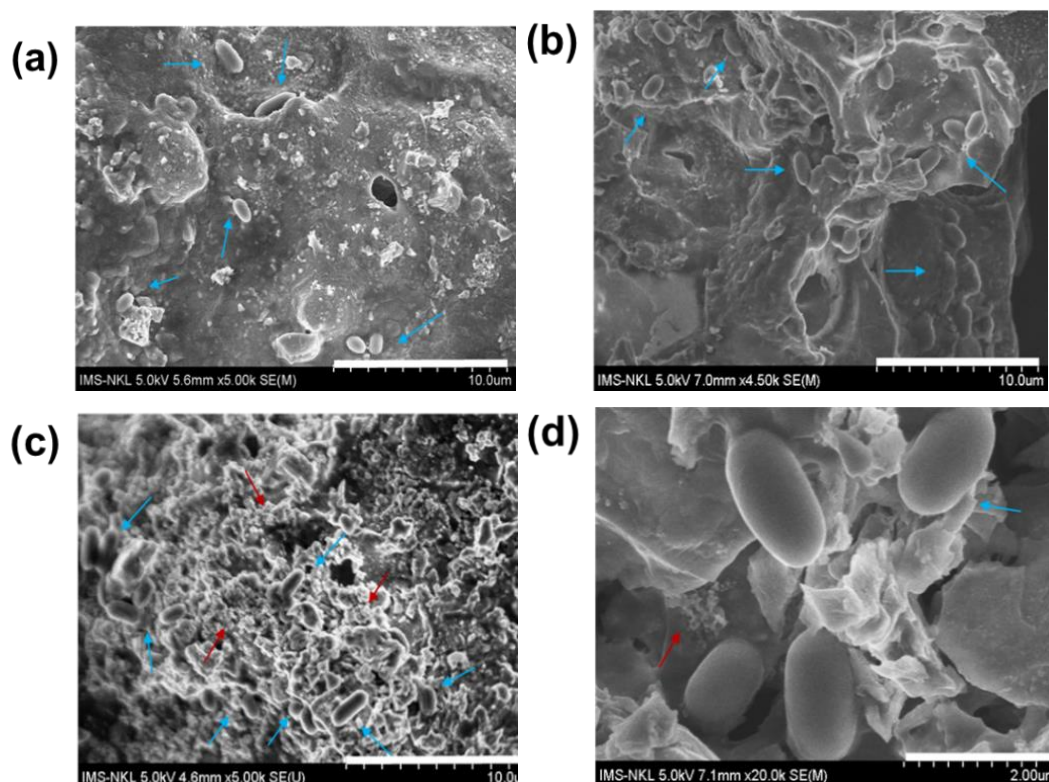
Kariminiaae-Hamedani *et al.* (2003) cũng sử dụng vật liệu gốm ceramic để cố định các nhóm vi khuẩn xử lý ô nhiễm COD, với mật độ tế bào tích hợp chất mang đạt đến $2,9 \times 10^9$ CFU/g cao hơn so với trên EC_Algin_N [248]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Kariminiaae-Hamedani *et al.* (2003), tác giả đã áp dụng lực hút chân không trong quá trình tích hợp vi khuẩn lên gốm ceramic, nó đóng vai trò “thúc đẩy” sự di chuyển của các tế bào vi khuẩn vào các vị trí lỗ trống trên vật liệu, đây là một phương pháp hiệu quả giúp tăng hiệu suất tích hợp. Nhưng, việc sử dụng phương

pháp này trong các mô hình sản xuất lớn hơn ngoài thực tế sẽ gặp trở ngại do đòi hỏi chi phí đầu tư về máy móc cao hơn. Vì vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, dựa trên đặc tính tạo màng sinh học tự nhiên của vi khuẩn khi tiếp xúc với bề mặt giá thể, tế bào vi khuẩn sẽ được “bắt giữ” trong các lớp màng polysaccharides và tích hợp trên chất mang EC_Algin. Vật liệu EC nguyên bản tuy có cấu trúc rỗng xốp nhưng vẫn còn hạn chế về “không gian cư trú” cho tế bào vi khuẩn [249]. Do đó, khi chuỗi mạch dài của polymer alginate được dùng để bao bọc lên vật liệu EC để tạo thành vật liệu EC_Algin và EC_Algin_N có thể đã làm tăng thêm diện tích bề mặt chúng so với EC.

Bảng 3.7. 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_Algin	$1,5 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,9$	87 ± 24
		EC_Algin_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_Algin	$2,8 \pm 0,4$	$23,2 \pm 9,5$	$162,8 \pm 1,2$
		EC_Algin_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_Algin	$3,3 \pm 0,3^{*a}$	$45 \pm 2^{*a}$	$210 \pm 60^{*a}$
		EC_Algin_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_Algin	$4,0 \pm 0,5$	20 ± 1	230 ± 32
		EC_Algin_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_Algin	$4,9 \pm 3,1^a$	39 ± 12	183 ± 10
		EC_Algin_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_Algin	$5,8 \pm 2,2$	$38 \pm 0,8$	149 ± 53
		EC_Algin_N	$15 \pm 9,2$	$50 \pm 7,4$	402 ± 74

Số liệu được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ SD ($n=3$). Trong cùng một hàng, ký hiệu “*” thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa mật độ vi khuẩn tích hợp trên cùng 1 loại vật liệu theo thời gian. Đối với hai vật liệu EC_Algin và EC_Algin_N, số liệu được ký hiệu bởi các chữ cái khác nhau cũng thể hiện ($p < 0,05$) giữa mẫu.



Hình 3.27. Ảnh FESEM của tế bào vi khuẩn chuyển hóa nitơ khi tích hợp trên vật liệu EC (a), EC_Al (b) và EC_Al_N (c). Mũi tên màu xanh và đỏ lần lượt biểu thị vị trí của tế bào vi khuẩn và thành phần dưỡng chất dưới dạng nano trên vật liệu.

Bên cạnh đó, Purwasena *et al.* (2019) cũng đã chỉ ra rằng việc bổ sung các nguồn cacbon, nitơ và photpho sẽ giúp kích thích tăng sự sinh trưởng của vi khuẩn [250]. Các tác giả đề xuất môi trường có thành phần gồm 4,6% mật đường, 0,48% diammonium phosphate và 0,5% NPK (đại diện cho hỗn hợp các nguồn nitơ, photpho và kali) là tối ưu cho sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn. Salgar-Chaparro *et al.* (2020) trước đây đã báo cáo hiện tượng tăng cường độ bền và độ dày của màng sinh học vi khuẩn trên bề mặt thép cacbon khi sử dụng môi trường chứa các thành phần dưỡng chất thiết yếu như photpho và nitơ [251]. Một nghiên cứu khác bởi Zheng *et al.* (2017) cũng báo cáo rằng việc bổ sung các nguyên tố vi lượng Fe, Mn và B ở nồng độ lần lượt là 0,12 mg/L, 0,1 mg/L và 0,064 mg/L sẽ làm tăng tốc độ loại bỏ amoni và sinh polysaccharides ngoại bào – một thành phần chính của màng sinh học, của vi khuẩn nitrat hóa dị dưỡng, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T [252].

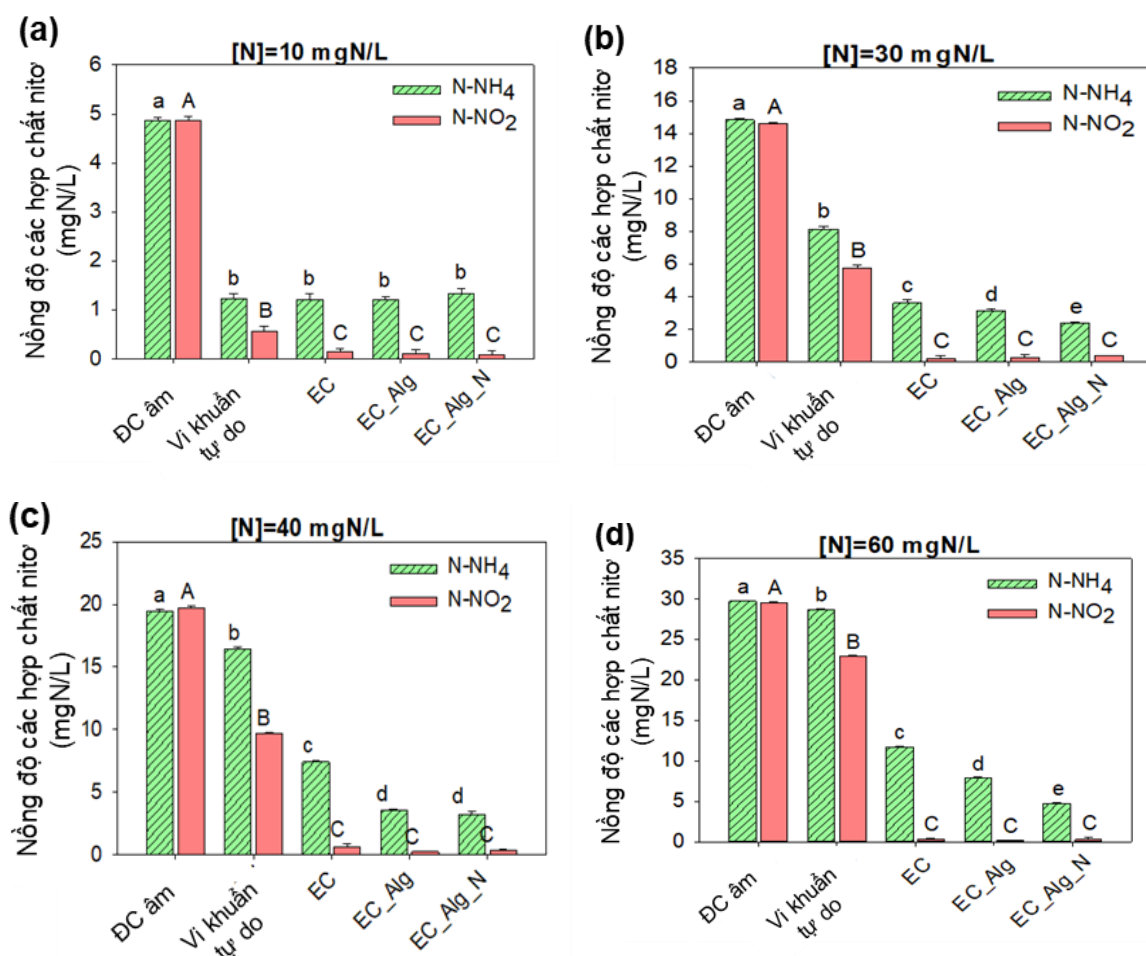
Do vậy, sự đa dạng của thành phần dưỡng chất, quan trọng nhất là sự hiện diện của các hợp chất C, N, P, K và cùng các nguyên tố vi lượng trong giá thể EC_Al_N được tạo thành ở nghiên cứu của chúng tôi có thể đã tạo ra môi trường thích hợp cho sự hình thành màng sinh học của vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat. Giả thuyết này được minh chứng thông qua kết quả kiểm tra mật độ nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên giá thể EC_Al_N cao hơn nhiều so với giá thể EC nguyên bản và EC_Al chỉ

phủ thêm lớp polymer alginate. Hình ảnh tế bào nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ khi được tích hợp trên ba loại giá thể có thể được quan sát thông qua ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử SEM trong Hình 3.27.

3.3.3. Đánh giá khả năng xử lý amoni, nitrit của EC_Alq_N tích hợp vi khuẩn

3.3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ amoni, nitrit ban đầu đến hiệu suất xử lý của vật liệu EC_Alq_N tích hợp vi khuẩn

Bên cạnh việc kiểm tra mật độ vi khuẩn tích hợp trên các loại vật liệu EC đã chế tạo, hoạt tính chuyển hóa nitơ chúng cũng được xác định và thể hiện trên Hình 3.28. Trong đó, đối với các bình thí nghiệm có bổ sung nồng độ nitơ (bao gồm amoni và nitrit với tỷ lệ 1:1) ở mức thấp 10 mg-N/L, không có sự khác biệt đáng kể về hoạt tính loại bỏ nitơ giữa vi khuẩn tự do và cố định. Hàm lượng amoni và nitrit còn lại trong môi trường sau 24 giờ thí nghiệm lần lượt nằm trong khoảng 1,23 - 1,34 và 0,09 - 0,56 mg-N/L (Hình 3.28 a). Tuy nhiên, khi hàm lượng nitơ bổ sung ban đầu tăng lên 60 mg-N/L, hiệu suất chuyển hóa của vi khuẩn tự do giảm nhanh xuống dưới 14% tương ứng với dư lượng nitơ còn lại trong môi trường trên 50 mg-N/L (Hình 3.28 d). Ở nồng độ nitơ bổ sung ban đầu 30 mg-N/L, hiệu suất chuyển hóa nitơ khá giống nhau giữa ba loại chất mang. Hàm lượng amoni còn lại lần lượt là $2,73 \pm 0,12$; $3,40 \pm 0,29$ và $3,81 \pm 0,38$ mg-N/L trong môi trường chứa vi khuẩn cố định trên chất mang EC_Alq_N, EC_Alq và EC (Hình 3.28 b). Tuy nhiên, EC_Alq_N có hiệu suất loại bỏ nitơ cao hơn so với chất mang EC và EC_Alq, nếu hàm lượng nitơ đầu vào tăng lên 40 và 60 mg-N/L (Hình 41 c, d). Hiệu suất loại bỏ nitơ của EC_Alq_N đạt tới $91,62 \pm 0,67\%$, trong khi đó EC_Alq và EC chỉ chuyển hóa được lần lượt $86,40 \pm 0,21$ và $79,87 \pm 0,30\%$ khi bổ sung nồng độ nitơ ban đầu là 60 mg-N/L. Yan *et al.* (2019) trước đây đã báo cáo hiệu suất loại bỏ nitơ là 67,3% của vi khuẩn được bao bọc trong vật liệu tổng hợp từ hỗn hợp polymer polyvinyl và alginate [253], thấp hơn so với hiệu suất đạt được bởi vi khuẩn tích hợp trên EC_Alq_N. Hơn nữa, trong nghiên cứu của chúng tôi nồng độ nitrit còn lại trong môi trường sau xử lý ở mức thấp dưới 0,36 mg-N/L đối với cả ba chất mang. Trong quá trình chuyển các hợp chất nitơ vô cơ bằng con đường sinh học, việc loại bỏ nitrit có thể được thực hiện đồng thời bởi vi khuẩn oxy hóa nitrit và vi khuẩn khử nitrat. Do đó, khi đồng tích hợp hai nhóm vi khuẩn này trên chất mang EC sẽ giúp ổn định hiệu suất xử lý nitrit cho dù nồng độ nitơ bổ sung ban đầu trong môi trường tăng lên. Đặc biệt việc sử dụng vi khuẩn khử nitrat hiếu khí *Bacillus* sp. ST20 và ST226 trong nghiên cứu này đã đơn giản hóa quy trình xử lý, cho phép loại bỏ đồng thời amoni và nitrit trong điều kiện hiếu khí.



Hình 3.28. Khả năng chuyển hóa nitơ sau 24 giờ của vi khuẩn tích hợp trên vật liệu khi bổ sung các nồng độ nitơ ban đầu khác nhau: 10 mg-N/L (a), 30 mg-N/L (b), 40 mg-N/L (c), and 60 mg-N/L (d).

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Số liệu được ký hiệu với các chữ cái in hoa (trên cột biểu thị nồng độ amoni) và in thường (trên cột biểu thị nồng độ nitrit) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) của các mẫu thử nghiệm.

Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nitrat hóa là nhóm vi khuẩn tự dưỡng và sự sinh trưởng của chúng khá nhạy cảm với các tác động của môi trường. Hoạt tính chuyển hóa nitơ của vi khuẩn dễ bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi của điều kiện môi trường như nồng độ oxy hòa tan, pH, nhiệt độ, nồng độ amoni và nitrit [254, 255]. Trong nghiên cứu của Pasmionka *et al.* (2021) hàm lượng amoni ở mức khoảng 60 mg/L có thể ức chế quá trình nitrat hóa cho dù sinh khối của vi khuẩn đã được bổ sung thêm trong hệ xử lý [256]. Do vậy, đối với nghiên cứu của chúng tôi, khi amoni và nitrit được bổ sung đồng thời vào môi trường (tỷ lệ 1:1) để đạt nồng độ 60 mg-N/L có thể là nguyên nhân gây ức chế làm giảm hiệu suất loại bỏ nitơ của vi khuẩn ở dạng tự do. Ngược lại, vi khuẩn khi được tích hợp trên chất mang lại cho hoạt tính nitrat hóa và khử nitrat ổn định tốt hơn so với vi khuẩn tự do. Kết quả tương tự khẳng

định hiệu quả xử lý ô nhiễm nitơ của vi khuẩn cố định cao hơn so với vi khuẩn lơ lửng cũng được báo cáo trong nghiên cứu trước đây của Zhao *et al.* (2020) [247].

Như vậy, các kết quả trình bày ở trên đã cho thấy lợi ích của việc sử dụng vi khuẩn tích hợp trên chất mang trong xử lý nước ô nhiễm các hợp chất nitơ vô cơ. Hơn nữa, việc bổ sung dưỡng chất thiết yếu trên chất mang EC_Alge_N đã nâng cao mật độ vi khuẩn được tích hợp trên vật liệu từ đó giúp tăng hoạt tính chuyển hóa nitơ. Do đó, các chất mang này có tiềm năng ứng dụng trong việc giảm thiểu sự gia tăng của các thành phần nitơ vô cơ độc hại như amoni và nitrit trong hệ thống nuôi thủy sản. Ngoài ra, nghiên cứu này cũng lần đầu tiên báo cáo tác động của dưỡng chất nano có chứa thành phần C, N, P và K đến việc tăng cường hoạt tính loại bỏ nitơ của vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat với nồng độ nitơ bổ sung ban đầu là 60 mg-N/L. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu hơn có thể được thực hiện để tối ưu hóa nồng độ của dung dịch alginate và dưỡng chất nano được sử dụng trong quy trình chế tạo EC_Alge_N để đạt được hiệu quả loại bỏ nitơ cao hơn

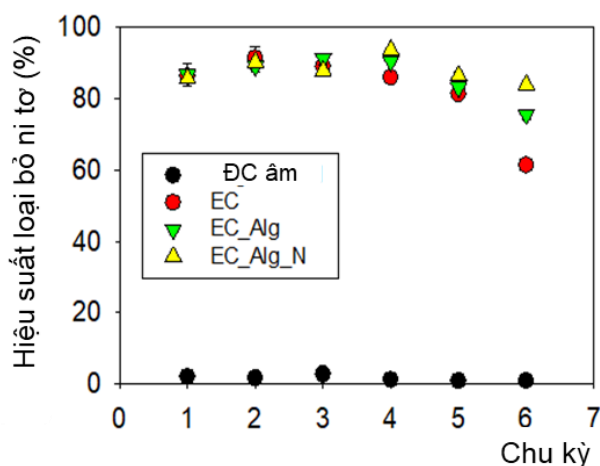
3.3.3.2. Đánh giá khả năng tái sử dụng của vật liệu EC_Alge_N đã tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ

Khả năng tái sử dụng của vật liệu EC_Alge_N đã tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ là một trong những mối quan tâm lớn của chúng tôi khi nói đến việc tạo ra một sản phẩm xử lý ô nhiễm thân thiện với môi trường.

Một số nghiên cứu trước đây đã chứng minh khả năng tích hợp vi khuẩn trên các vật liệu từ tính như hạt nano oxit sắt, các hạt nano có từ tính sau quá trình xử lý ô nhiễm có thể được phân tách và thu hồi từ môi trường bằng cách sử dụng lực hút của các khối nam châm ở quy mô nhỏ hay của máy phát điện từ trường ở mô hình xử lý lớn hơn [257, 258, 259]. Tuy nhiên, việc ứng dụng này vẫn còn hạn chế do khó khăn trong việc áp dụng máy tạo từ trường trong nhà máy xử lý nước thải ngoài thực tế [260], hơn nữa ở các trang trại nuôi thủy sản, chi phí cần thiết để thiết lập hệ thống này có thể đặt ra trở ngại lớn cho người nông dân. Vì vậy, việc lợi dụng đặc tính nổi của chất mang EC_Alge_N được chế tạo trong nghiên cứu của chúng tôi là một câu trả lời đơn giản nhưng hiệu quả để giải quyết vấn đề này. Thật vậy, chất mang EC_Alge_N tích hợp vi khuẩn có thể dễ dàng được tách ra khỏi môi trường xử lý bằng cách lọc hoặc sử dụng vợt lưới và di chuyển đến vị trí bị ô nhiễm cần xử lý tiếp theo.

Trong thí nghiệm này, môi trường được bổ sung nồng độ nitơ thấp là 10 mg-N/L. Do đó, không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả loại bỏ nitơ giữa ba loại vật liệu EC, EC_Alge và EC_Alge_N trong vài chu kỳ đầu tiên. Nhưng khi thí nghiệm được tiếp tục kéo dài, vi khuẩn đã tích hợp có thể dần dần bị tách ra khỏi vật liệu EC và EC_Alge do có cấu tạo chưa phù hợp, dẫn đến làm giảm hiệu quả loại bỏ nitơ của hai

loại vật liệu này, nhưng EC_Alginat là nơi cư trú phù hợp nên lớp vi khuẩn ngoài bong ra thì lớp tiếp theo lại sinh trưởng và bám dính trên vật liệu. Vì vậy, đây có thể là lý do để cải thiện khả năng tái sử dụng của vật liệu EC_Alginat so với hai vật liệu còn lại. Kết quả đã được minh chứng tại Hình 3.29, vật liệu EC_Alginat tích hợp vi khuẩn có thể duy trì hiệu suất loại bỏ nitơ ở mức $83,95 \pm 0,15\%$ ngay cả sau 6 chu kỳ xử lý (mỗi chu kỳ kéo dài 24 giờ). Trong khi đó, hiệu suất xử lý của chất mang EC và EC_Alginat giảm xuống còn $61,38 \pm 0,12$ và $75,59 \pm 1,35\%$ tại chu kỳ 6.



Hình 3.29. Khả năng chuyển hóa nitơ của vi khuẩn tích hợp trên vật liệu trong sáu chu kỳ lặp lại.

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$).

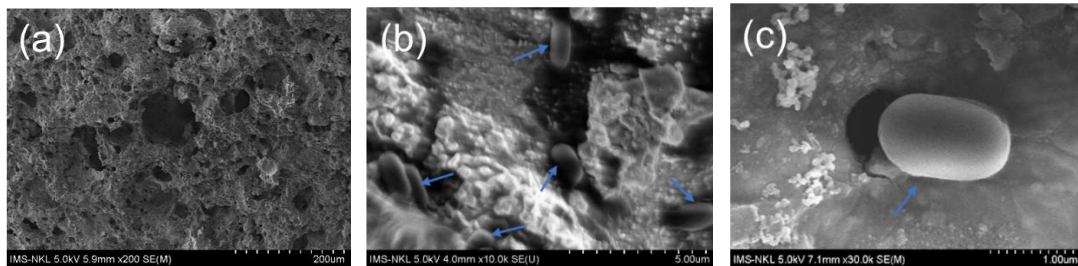
Tóm lại, thông qua nghiên cứu này chúng tôi đã chế tạo được chất mang EC có tính chất nổi và xốp thích hợp cho việc tích hợp vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat nhằm mục đích xử lý ô nhiễm nitơ trong nước nuôi thủy sản. Kết quả thí nghiệm đã chứng minh hiệu quả loại bỏ nitơ (bao gồm amoni và nitrit) của vi khuẩn tích hợp trên chất mang EC cao hơn so với vi khuẩn tự do. Đặc biệt, nghiên cứu cho thấy alginate và các chất thành phần C, N, P, K là hai yếu tố quan trọng góp phần làm tăng mật độ vi khuẩn và khả năng chuyển hóa nitơ của vi khuẩn khi tích hợp trên EC_Alginat. Vật liệu EC_Alginat đạt hiệu suất loại bỏ nitơ cao nhất là $91,62 \pm 0,67\%$ với nồng độ nitơ bổ sung ban đầu là 60 mg-N/L . Hơn nữa, chất mang EC_Alginat tích hợp vi khuẩn có khả năng tái sử dụng tốt, duy trì hiệu suất chuyển hóa nitơ ở mức $83,95 \pm 0,15\%$ sau 6 chu kỳ xử lý. Do đó, vật liệu EC_Alginat tích hợp vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn khử nitrat có thể là sản phẩm tiềm năng để ứng dụng trong xử lý nước ô nhiễm hợp chất nitơ vô cơ trong hệ thống nuôi thủy sản.

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

Kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy việc tích hợp đồng thời các nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat trên chất mang EC_Alginat đem lại hiệu

quả xử lý amoni và nitrit đạt trên 90%, cao hơn so với vi khuẩn dạng tự do, với tổng hàm lượng nitơ bổ sung ban đầu là 60 mgN/L. Do vậy, vật liệu tích hợp này được chúng tôi tiếp tục thử nghiệm đánh giá độ ổn định của hoạt tính chuyển hóa nitơ trên mô hình xử lý thể tích 50 lít.

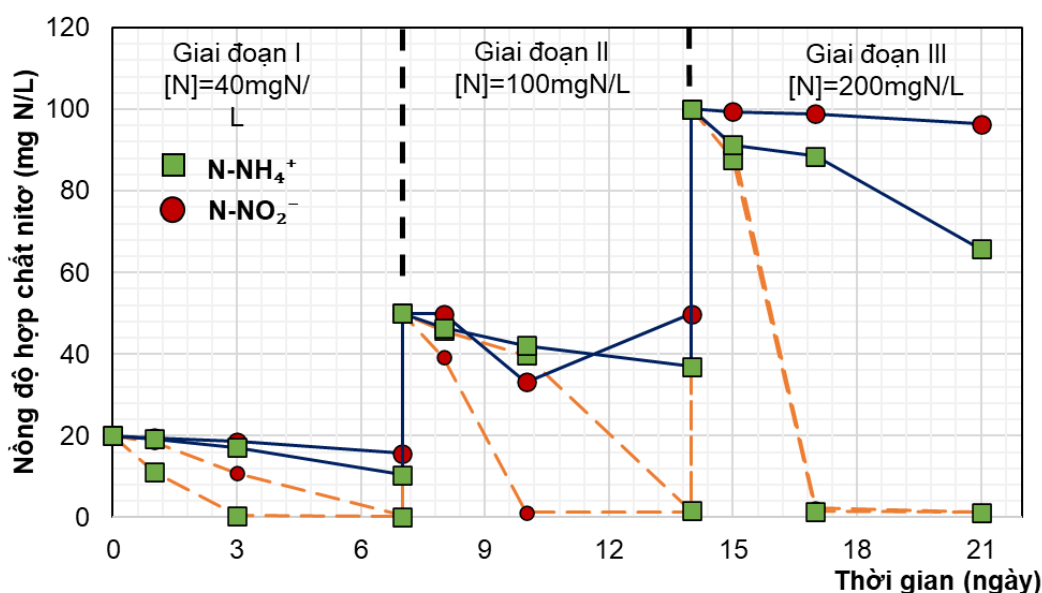
Hình ảnh hiển vi điện tử SEM cho thấy sự xuất hiện của các tế bào vi khuẩn chuyển hóa nitơ sau khi được tích hợp trên bề mặt chất mang EC_Alge_N (Hình 3.30). Mật độ từng nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat được xác định bằng cách cấy trải trên từng loại môi trường đặc trưng cho mỗi nhóm vi khuẩn. Trong đó, số lượng vi khuẩn đạt xấp xỉ 10^7 CFU/g EC_Alge_N đối với nhóm vi khuẩn nitrat hóa và 15×10^8 CFU/g EC_Alge_N đối với vi khuẩn khử nitrat.



Hình 3.30. Ảnh chụp kính hiển vi điện tử SEM bề mặt chất mang EC_Alge_N không có vi khuẩn (a), tế bào vi khuẩn khi tích hợp trên chất mang EC (b, c). Mũi tên màu xanh hướng đến tế bào vi khuẩn.

Để mô phỏng điều kiện môi trường nuôi thủy sản thực tế, các chất mang tích hợp vi khuẩn được thêm với tỷ lệ 1% w/v vào hệ xử lý chứa 50 lít mẫu nước thu thập tại hồ nuôi tôm ở giai đoạn 45 ngày sau khi thả giống. Hàm lượng amoni, nitrit của mẫu nước ban đầu được kiểm tra và bổ sung thêm sao cho tổng nồng độ nitơ ($[N] = [N-NH_4^+] + [N-NO_2^-]$) trong hệ đạt lần lượt 40, 100 và 200 mgN/L tương ứng với 3 giai đoạn thử nghiệm của hệ xử lý.

Kết quả từ Hình 41 cho thấy vật liệu EC_Alge_N có khả năng chuyển hóa nitơ tốt, loại bỏ trên 96% hàm lượng nitơ bổ sung ban đầu ở cả ba giai đoạn thử nghiệm. Đặc biệt ở giai đoạn III, hiệu quả loại bỏ amoni và nitrit lần lượt đạt đến 97,8 và 98,5% ngay sau ba ngày vận hành đầu tiên. Hơn nữa, không có sự hình thành của hợp chất nitrat trong thời gian thử nghiệm. Tại ngày thứ 21, hàm lượng amoni và nitrit còn lại trong hệ chỉ ở mức 1,44 mgN- NH_4 /L và 1,20 mgN- NO_2 /L. Ngược lại, hệ xử lý bổ sung dung dịch vi khuẩn tự do (với mật độ tương đương) có hiệu suất loại bỏ thấp hơn nhiều so với vi khuẩn tích hợp trên chất mang EC_Alge_N, chỉ 34,5% hàm lượng nitơ được chuyển hóa trong giai đoạn I. Tại ngày thứ 7 của mỗi giai đoạn II và III, nồng độ amoni và nitrit còn lại chiếm hơn 80% lượng bổ sung ban đầu (Hình 3.31).



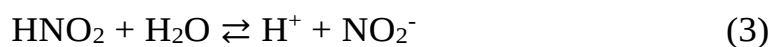
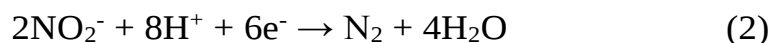
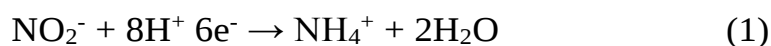
Hình 3.31. So sánh khả năng xử lý amoni, nitrit trong mô hình 50 lít của vi khuẩn chuyển hóa nitơ dạng tự do (đường nét liền) và vi khuẩn tích hợp vật liệu EC_Algin_N (đường nét đứt) (tỷ lệ bổ sung 1% w/v), $[N] = [N-NH_4^+] + [N-NO_2^-]$.

Trong nghiên cứu này, cấu trúc lỗ rỗng của EC đã giúp tăng cường khả năng bám dính của vi khuẩn trên vật liệu, đồng thời tính chất nổi của EC sẽ làm tăng sự tương tác của vi khuẩn với oxy không khí, khiến cho quá trình oxy hóa amoni, nitrit được diễn ra thuận lợi. Đối với nhóm vi khuẩn khử nitrat, tế bào vi khuẩn có thể phân bố vào các vùng có độ sâu khác nhau trong cấu trúc của EC tùy thuộc vào nhu cầu về nồng độ oxy cần thiết cho sự phát triển của chúng. Bên cạnh đó, lớp alginate có chứa thành phần N, P, C và K phủ lên chất mang EC có thể đóng vai trò vừa là nguồn cung cấp dưỡng chất đồng thời là thành phần giữ nước, tạo ra môi trường ẩm thích hợp cho sự tồn tại của tế bào vi khuẩn trong thời gian bảo quản trước khi sử dụng. Trong nghiên cứu của Liu *et al.* (2020), màng sinh học do vi khuẩn nitrat hóa/khử nitrat hình thành cũng đã được áp dụng trong hệ thống xử lý MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor), đạt hiệu suất loại bỏ amoni và nitơ tổng số lần lượt là 88,6 và 76,6% [261]. Tuy nhiên, nước thải tổng hợp được đưa vào MBBR có nồng độ amoni dưới 40 mgN/L, thấp hơn so với ngưỡng thử nghiệm trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi. Mặt khác, trong quá trình xử lý bởi EC_Algin_N không phát hiện được sự hình thành của hợp chất nitrat, điều này cho thấy hai nhóm vi khuẩn nitrat hóa và khử nitrat đã kết hợp tốt để loại bỏ hoàn toàn các dạng hợp chất nitơ vô cơ khỏi môi trường nước. Do đó, hiệu suất loại bỏ nitơ cao thu được trên 96% trong nghiên cứu này là bằng chứng chứng minh khả năng ứng dụng vật liệu EC_Algin_N tích hợp vi khuẩn nitrat/khử nitrat trong việc xử lý nước nuôi thủy sản bị ô nhiễm nitơ ngoài thực tế.

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

Trong nuôi thủy sản, như đã nói ở trên hàm lượng các hợp chất ni tơ vô cơ luôn là ẩn số gây ô nhiễm môi trường nuôi, trong đó có nitrit. Nồng độ nitrit cao thường do sự oxy hóa amoni và khử nitrat diễn ra chưa hoàn toàn. Nồng độ nitrit tăng vượt ngưỡng không những có thể làm giảm khả năng vận chuyển oxy trong máu, phá vỡ hệ thống nội tiết [262] mà còn kích thích sự phát triển của các nhóm vi khuẩn gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn thuộc chi *Vibrio* [7]. Nhiều nghiên cứu cho thấy các loài tôm như *L. vannamei*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* và *Artemia franciscana* khi bị lây nhiễm *Vibrio* spp. sẽ gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) dẫn đến hiện tượng tôm chết hàng loạt trong vòng 30-35 ngày kể từ khi thả giống [17]. 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.

Vật liệu bán dẫn như TiO₂ được biết đến rộng rãi với hoạt tính kháng khuẩn phổ rộng và khả năng quang phân hủy nhiều hợp chất ô nhiễm khác nhau. Cơ chế kháng khuẩn chính của TiO₂ liên quan đến sự hình thành của các gốc oxy hóa tự do (ROS) khi chất xúc tác quang này được kích thích bởi bởi bước sóng UV (≤ 400 nm), từ đó gây ra stress oxy hóa cho tế bào vi khuẩn [263]. TiO₂ thường được biến tính với Ag để “giảm” năng lượng vùng cấm của vật liệu tổng hợp tạo thành, khiến chúng dễ dàng kích thích quang bằng ánh sáng khả kiến và tăng hiệu suất diệt khuẩn cũng như hoạt tính quang phân hủy [54]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy quá trình loại bỏ nitrit bằng chất xúc tác quang có thể tạo thành sản phẩm khí N₂ hoặc hợp chất ô nhiễm NH₄⁺ [72], như được trình bày trong phản ứng (1) và (2):



Theo đó, để tạo ra một phân tử N₂, cần có sự hiện diện của hai “gốc N” trên bề mặt chất xúc tác quang, điều này làm cho tỷ lệ bao phủ bề mặt của các “gốc N” so với các “gốc khử” trở thành một trong những yếu tố quan trọng kiểm soát hiệu suất quang xúc tác. Tugaoen *et al.* (2017) cho rằng tỷ lệ này phụ thuộc phần lớn vào pH của môi trường phản ứng [63]. TiO₂-Ag có điểm đẳng điện (pH_{pzc}) xấp xỉ 6,6. Do đó, khi pH môi trường có giá trị nhỏ hơn pH_{pzc} sẽ gây ra sự proton hóa và tạo nên sự tích điện dương trên bề mặt chất xúc tác quang [56]. Mặt khác, nitrit có giá trị pK_a là 3,3, cho thấy dung dịch có pH < pK_a sẽ khiến phản ứng số (3) đi theo chiều tạo thành HNO₂ thay vì NO₂⁻ [59]. Mặc dù phân tử trung tính, HNO₂, có thể được hấp phụ trên bề mặt chất bán

dẫn, nhưng sự tương tác sẽ yếu hơn so với các ion mang điện tích trái dấu như NO_2^- . Vì vậy, môi trường có pH lớn hơn pKa (3,3) nhưng nhỏ hơn pH_{pzc} (6,6) của $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và có thể làm tăng khả năng hấp phụ NO_2^- trên bề mặt chất xúc tác quang tích điện dương và cung cấp đủ lượng H^+ để khử hoàn toàn NO_2^- thành khí N_2 [60]. Tuy nhiên, yêu cầu này khiến việc áp dụng chất quang xúc tác trong xử lý nước nuôi thủy sản ô nhiễm nitrit trở nên không thực tế bởi hầu hết các loài động vật thủy sản sống trong phạm vi pH tối ưu từ 7,8 đến 8,5 [61].

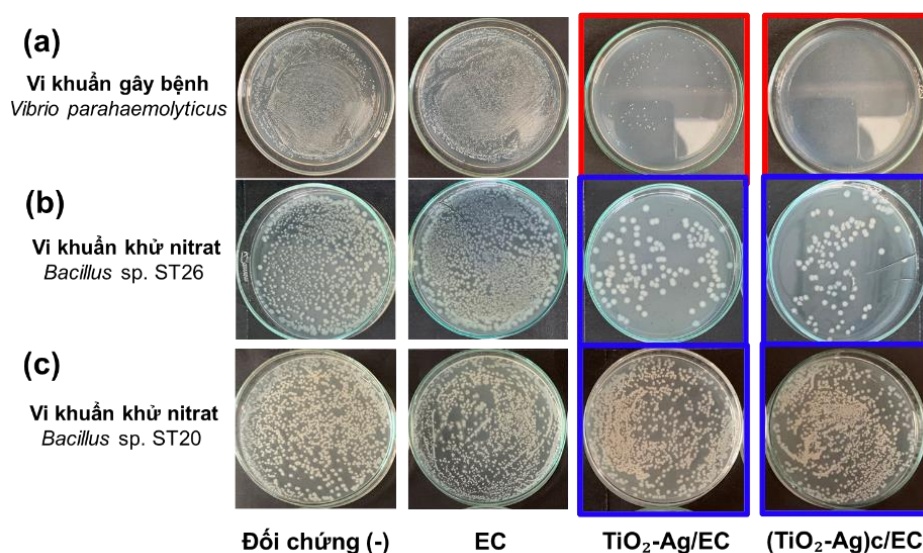
Từ những đặc tính trên nên trong nghiên cứu này bên cạnh mục tiêu tích hợp nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitơ trên vật liệu xốp EC_Alg_N cải tiến để xử lý môi trường ô nhiễm amoni, nitrit, chúng tôi còn hướng đến thử nghiệm tích hợp nhóm vi khuẩn khử nitrit trên chất mang EC có chứa chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 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. Đánh giá ảnh hưởng của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đến vi khuẩn khử nitrit

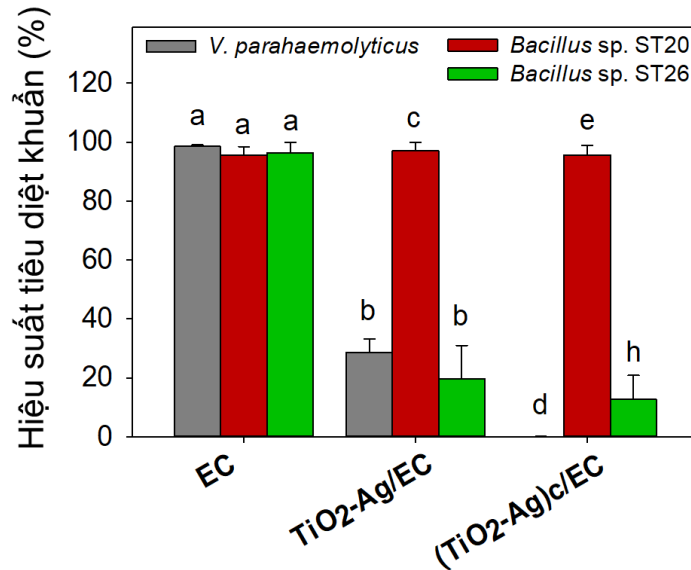
Để tăng cường độ ổn định của các hạt nano $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ trên bề mặt của chất mang, vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ được tiến hành bao bọc trong lớp polymer chitosan, tạo thành vật liệu mới với ký hiệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$. Các loại vật liệu tạo thành sẽ được sử dụng để đánh giá khả năng khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 cũng như tác động của chúng đến các chủng vi khuẩn khử nitrit trước khi nhóm vi khuẩn này được đồng tích hợp trên bề mặt vật liệu chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$. Trong thí nghiệm này, ba loại vật liệu gồm EC, $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ được bổ sung riêng rẽ vào các dung dịch chứa vi khuẩn gây bệnh với nồng độ ban đầu 10^5 CFU/mL và tiến hành kích thích bằng ánh sáng khả kiến tạo ra bởi bóng đèn halogen (400w) trong 2 giờ. Như thể hiện trong Hình 3.32 a, vật liệu EC nguyên bản không có tác dụng diệt khuẩn đối với *V. parahaemolyticus* VTCC 910192. Nhưng vi khuẩn gây bệnh này bị ức chế đáng kể bởi $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$, làm giảm tỷ lệ sống sót xuống còn $28,7 \pm 4,5\%$. Nghiên cứu trước đây có chỉ ra polymer chitosan thường được ứng dụng trong lĩnh vực y học bởi chúng cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn [264]. Do đó, việc bao phủ lớp chitosan trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ đã làm tăng khả năng kháng khuẩn của vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ tạo thành lên $99,93 \pm 0,1\%$ (Hình 3.32 a và Hình 3.33).

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định khả năng tạo màng sinh học của vi khuẩn để kháng lại sự tác động của thuốc kháng sinh hay các tác nhân kháng khuẩn khác như ROS. Bên trong lớp màng sinh học, sự xâm nhập của các chất diệt

khuẩn sẽ bị hạn chế, trong khi các tế bào vi khuẩn có thể phân hóa thành các dạng khác như bào tử để bảo vệ tính toàn vẹn của tế bào [265]. Ngoài ra, sự hiện diện của peptidoglycan trong thành tế bào vi khuẩn được coi là một trong những hàng rào phòng vệ chúng trước các tác động bất lợi của môi trường sống [266]. Tuy nhiên, kết quả kiểm tra cho thấy *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 thuộc nhóm vi khuẩn gram âm có lớp thành peptidoglycan mỏng và khả năng tạo màng sinh học kém hơn so với hai chủng vi khuẩn khử nitrit thử nghiệm (Hình 3.34). Vậy nên, *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 dễ dàng bị tiêu diệt bởi vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$. Trong khi đó chủng *Bacillus* sp. ST20, thuộc nhóm Gram dương, có thành tế bào bao chứa lớp peptidoglycan dày hơn tế bào Gram âm và thể hiện khả năng hình thành màng sinh học cao nhất trong số ba chủng vi khuẩn thử nghiệm (Hình 3.34). Chủng *Bacillus* sp. ST26 cũng là vi khuẩn Gram âm, nhưng lại có hoạt tính tạo màng sinh học cao hơn so với *V. parahaemolyticus* VTCC 910192, nên đây có thể là nguyên nhân giúp chủng ST26 phần nào chống chịu được trước tác động của $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$. Vì vậy khi được đặt trong điều kiện thí nghiệm tương đương, các chủng vi khuẩn khử nitrat/nitrit gồm *Bacillus* sp. ST20 và ST26, có thể “chống lại” được tác động diệt khuẩn của $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ với tỷ lệ sống sót đạt lần lượt là $95,70 \pm 3,26\%$ và $12,60 \pm 8,22\%$. Mặc dù tỷ lệ sống sót của ST26 có thể thấp hơn ST 20 nhưng hiệu quả xử lý nitrit của chúng lại cao nên vẫn sử dụng chủng vi khuẩn này cho các nghiên cứu tiếp ở dạng đa chủng (ST20 và ST26) (Hình 3.33).

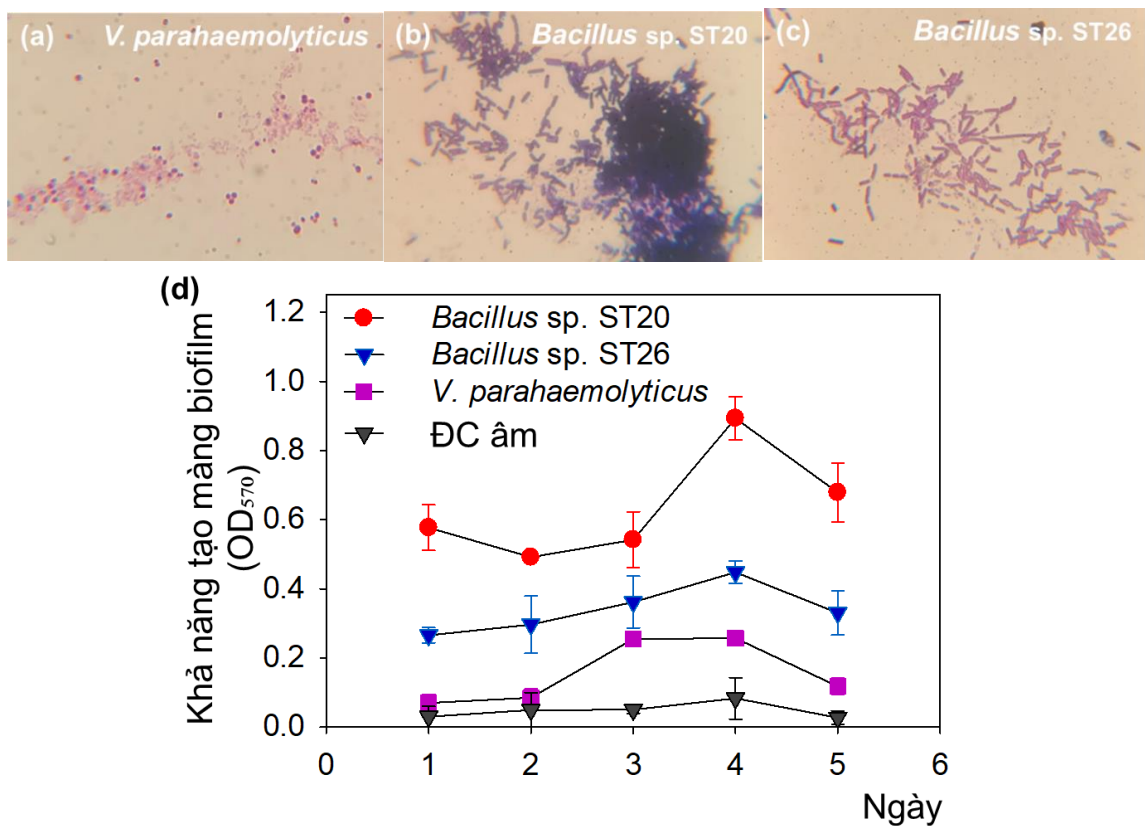


Hình 3.32. Tác dụng của vật liệu EC chứa $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ đến vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 (a), vi khuẩn khử nitrit *Bacillus* sp. ST20 (b) và *Bacillus* sp. ST26 (c). Đối chứng (-) là mẫu không bổ sung vật liệu.



Hình 3.33. Tỷ lệ sống của vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 và các chủng vi khuẩn khử nitrit *Bacillus* sp. ST20, ST26 khi bị xử lý bởi các loại chất mang khác nhau chứa chất quang xúc tác TiO₂-Ag.

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Trên mỗi cột số liệu biểu thị tỷ lệ sống của vi khuẩn khi bị xử lý bởi cùng một loại vật liệu, các ký hiệu chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của tỷ lệ sống giữa các chủng vi khuẩn thử nghiệm ($p < 0,05$).



Hình 3.34. Ảnh nhuộm Gram của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 (a), *Bacillus* sp. ST20 (b), *Bacillus* sp. ST26 (c) và khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn này (d).

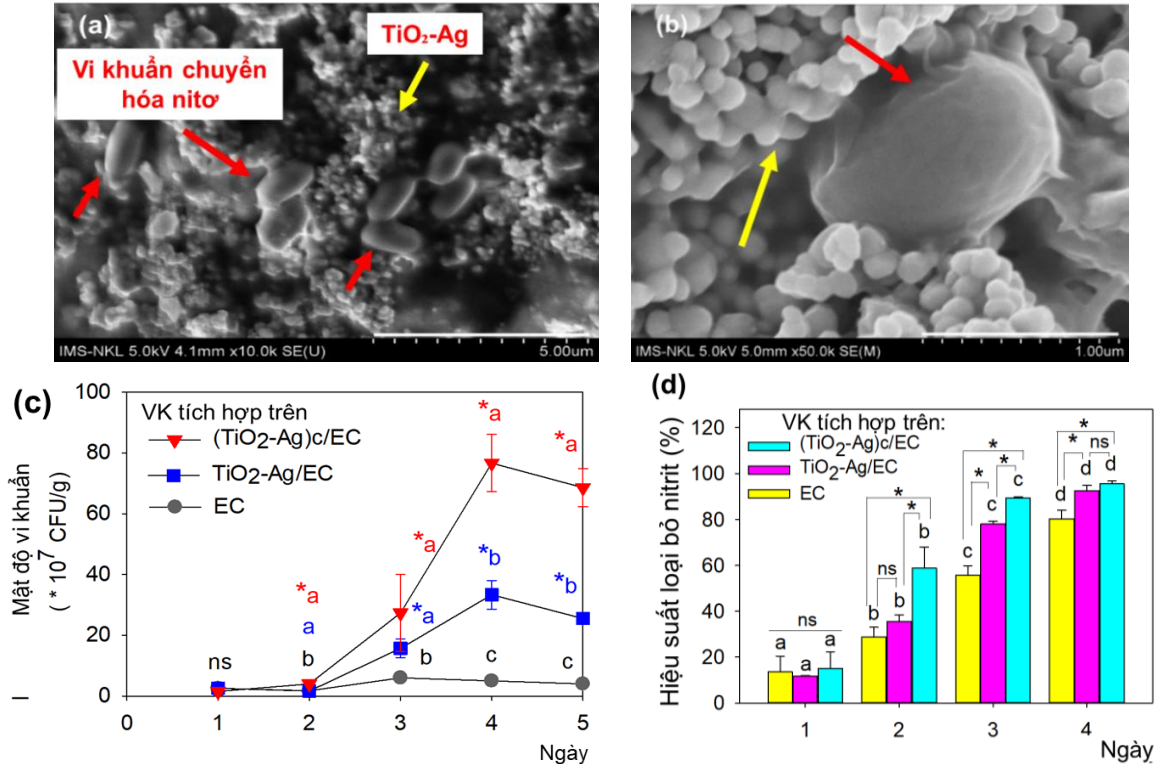
3.4.2. Thử nghiệm đồng tích hợp vi khuẩn khử nitrit trên vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$

Hai chủng vi khuẩn khử nitrit, *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26, đã được đánh giá có hiệu suất loại bỏ nitrit đạt 95% sau 72 giờ trong điều kiện có oxy. Bên cạnh đó, chúng đều thuộc chi *Bacillus* là nhóm vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, có thể thích ứng để sinh trưởng trong môi trường có nồng độ oxy thay đổi, điều này đã được chứng minh ở trên (mục 3.3.1). Do đó, khi được tích hợp lên vật liệu EC có tính chất nổi, vi khuẩn sẽ được tiếp xúc với thành phần oxy trong không khí, tạo cho chúng điều kiện sống phù hợp. Bên cạnh đó, tuy hai chủng ST20 và ST26 có tỷ lệ sống khác nhau khi bị tác động bởi chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$, nhưng việc sử dụng hỗn hợp các chủng vi khuẩn trong xử lý ô nhiễm thường đem lại hiệu quả cao hơn so với đơn chủng [267]. Vậy nên cả hai chủng ST20 và ST26 đều được lựa chọn để tích hợp trên $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ nhằm đánh giá hoạt tính loại bỏ nitrit của các vật liệu tạo thành.

Trong nghiên cứu này, 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 $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$. Chitosan và alginate là hai loại polymer tự nhiên có điện tích trái dấu, tận dụng đặc tính này nên sinh khối vi khuẩn trong lớp polymer alginate cũng có thể dễ dàng được tích hợp lên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ có lớp chitosan bao phủ bên ngoài nhờ lực hút tĩnh điện. Số liệu mô tả trong Hình 3.34 cho thấy màng sinh học do *Bacillus* sp. ST20 và *Bacillus* sp. ST26 hình thành đạt giá trị OD_{570} cao nhất vào ngày thứ 4 và bắt đầu bị phá vỡ vào ngày thứ 5. Dựa trên quan sát này, quá trình tích hợp các vi khuẩn này trên vật liệu EC, $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ được thực hiện trong 4 ngày. Theo đó, số lượng vi khuẩn được tích hợp trên vật liệu tăng theo thời gian và đạt cao nhất vào ngày thứ 4 trên cả ba loại vật liệu thử nghiệm (Hình 3.35 c). Tuy nhiên, có sự khác biệt đáng kể về khả năng tích hợp vi khuẩn giữa các vật liệu này ($p < 0,05$). Tại ngày thứ 4, $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ có mật độ vi khuẩn cao nhất là $(76,67 \pm 9,43) \times 10^7$ CFU/g, tiếp theo giảm xuống giảm xuống $(33,33 \pm 4,71) \times 10^7$ CFU/g và $5,0 \times 10^7$ CFU/g lần lượt ở vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ và EC.

Những kết quả này gợi ý rằng sự tồn tại của liên kết tĩnh điện giữa chitosan trên bề mặt $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c/EC}$ và lớp alginate bao quanh tế bào vi khuẩn có thể đã giúp tăng cường khả năng “thu hút” vi khuẩn lên bề mặt vật liệu này nhiều hơn so với vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ nhưng không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn này. Hình ảnh FESEM cho thấy tế bào vi khuẩn khử nitrit vẫn còn nguyên vẹn và được bao quanh bởi lớp màng sinh học hình

thành khi chúng bám dính trên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ (Hình 3.35 a, b). Hình 3.35 d cũng thể hiện vi khuẩn khử nitrit sau khi tích hợp vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ có hiệu suất loại bỏ nitrit tốt đạt từ 92,5 đến 95,5%; cao hơn đáng kể so với vật liệu EC chỉ đạt hiệu suất 80,3 $\pm$ 3,8%.

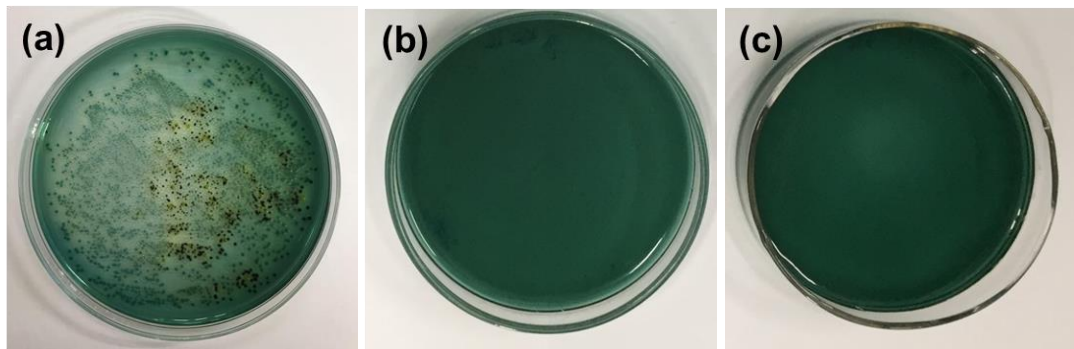


Hình 3.35. Ảnh hiển vi điện tử FESEM (a, b) của vi khuẩn khử nitrit khi tích hợp trên vật liệu $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$; mật độ vi khuẩn (c) và hiệu suất loại bỏ nitrit (d) của vi khuẩn trên ba loại vật liệu theo thời gian tích hợp.

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD ($n = 3$). Hình (c): Ký hiệu “*” thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về mật độ vi khuẩn trên một loại vật liệu ở các thời gian khác nhau, trong khi đó cột số liệu được ký hiệu bởi các chữ cái khác nhau thể hiện $p < 0,05$ giữa mật độ vi khuẩn của ba loại vật liệu tại cùng một thời gian kiểm tra. Các ký hiệu ngược lại được dùng ở hình (d) để biểu hiện sự sai khác thống kê.

Bên cạnh đó, thử nghiệm so sánh hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 của $\text{TiO}_2\text{-Ag}/\text{EC}$ và $(\text{TiO}_2\text{-Ag})\text{c}/\text{EC}$ tích hợp vi khuẩn khử nitrit cũng được tiến hành. Hai vật liệu nêu trên được bổ sung riêng rẽ vào dung dịch vi khuẩn gây bệnh ($\sim 10^6$ CFU/mL), chiếu sáng dưới ánh sáng mặt trời. Sau 2 giờ xử lý, mật độ vi khuẩn gây bệnh còn lại trong môi trường được xác định thông qua phương pháp cấy trải trên môi trường TCBS đặc trưng cho nhóm vi khuẩn thuộc chi *Vibrio*. Kết quả thể hiện trên Hình 3.36 cho thấy, vi khuẩn gây bệnh vẫn tồn tại, không bị ảnh hưởng trong mẫu đối chứng âm (không chứa vật liệu) với các khuẩn lạc màu xanh đặc trưng có thể được quan sát thấy trên đĩa thạch TCBS. Trong khi đó, không có sự xuất hiện của các tế bào vi khuẩn gây bệnh trong các mẫu thí nghiệm bổ sung

loại vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ hay $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ tích hợp vi khuẩn khử nitrit (Hình 3.36).



Hình 3.36. So sánh hoạt tính ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 của vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (b) và vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ tích hợp vi khuẩn khử nitrit (c). Mẫu đối chứng âm (a) gồm dịch vi khuẩn không bổ sung vật liệu.

Kết quả thử nghiệm còn cho thấy, phương pháp tích hợp vi khuẩn khử nitrit lên vật liệu sử dụng trong nghiên cứu này đã hạn chế được ảnh hưởng của các gốc oxy hóa tự do sinh ra bởi chất quang xúc tác $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên sự sinh trưởng cũng như khả năng chuyển hóa nitrit của vi khuẩn ST20 và ST26; đồng thời vật liệu này cũng có hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh tương đương so với vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ (Hình 3.36). Nghiên cứu gần đây về sự kết hợp giữa chất quang xúc tác và quá trình phân hủy sinh học trong các quy trình xử lý nước thải đã mang lại kết quả khả quan với hiệu quả xử lý cao và cách vận hành đơn giản [268]. Tuy nhiên, đây mới chỉ là nghiên cứu đầu tiên thử nghiệm sự kết hợp giữa vi khuẩn khử nitrit và $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ để đồng thời xử lý ô nhiễm nitrit và ức chế *V. parahaemolyticus* VTCC 910192 trong mô hình phòng thí nghiệm, do đó các nghiên cứu tiếp theo có thể triển khai trên mô hình nuôi tôm thực tế để đánh giá độ ổn định và hiệu quả xử lý môi trường của vật liệu đồng tích hợp này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

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 $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ lên EC, tạo vật liệu quang xúc tác nổi có hiệu quả xử lý cao. Vật liệu với tỷ lệ 10% (w/v) $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ 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; $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$ 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 O_2 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 $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ 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 nitơ ô nhiễm trong nước.

KIẾN NGHỊ

1. Đánh giá khả năng xử lý các vấn đề về ô nhiễm hữu cơ, ức chế vi khuẩn gây bệnh, phân hủy kháng sinh dư thừa (nếu có) và loại bỏ hợp chất nitơ vô cơ của các loại vật liệu tích hợp tạo thành trong mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng ngoài thực tế.
2. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian và điều kiện bảo quản đến hoạt tính xử lý môi trường của EC tích hợp chất quang xúc tác vật liệu $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ và EC_Alginat tích hợp vi khuẩn chuyển hóa nitơ.
3. Nghiên cứu chuyên sâu về con đường phân hủy và sản phẩm hình thành từ quá trình phân hủy kháng sinh bởi quá trình quang xúc tác của $\text{TiO}_2\text{-Ag/EC}$.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Thị Minh**, Hà Phương Thư, 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 Thư (2022). “*Characterization of iso-lated 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 Thư (2024). “*Multilayer immobilizing of denitrifying Bacillus sp. and TiO_2 -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 Thư, 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 TiO_2 -Ag photocatalyst enables effective antibiotic degradation and pathogen growth control*”. RSC advance, 15: 18324–18337. DOI: 10.1039/d5ra02333e.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. H. O. Pinto, J. L. Rocha, J. P. do Vale Figueiredo, R. F. S. Carneiro, C. Damian, L. de Oliveira, W. Q. Seiffert, 2020, Culture of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc technology system using artificially salinized freshwater: Zootechnical performance, economics and nutritional quality, *Aquaculture*, 520, pp. 734960.
- [2] L. M. Strebel, K. Nguyen, A. Araujo, T. Corby, M. Rhodes, B. H. Beck, L. A. Roy, D. A. Davis, 2023, On demand feeding and the response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to varying dietary protein levels in semi-intensive pond production, *Aquaculture*, 574, p. 739698.
- [3] FAO, 2022, Extruded shrimp feeds improve performance, so why are they not more popular?
- [4] J. Wang, D. Luo, and J. Liu, 2023, Nitrogen and phosphorus budgets of a polyculture system containing *Penaeus vannamei*, *Siganus guttatus*, and *Selenotoca multifasciata*, *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(5), pp. 1337–1353.
- [5] J. M. Caffrey, S. Bonaglia, and D. J. Conley, 2019, Short exposure to oxygen and sulfide alter nitrification, denitrification, and DNRA activity in seasonally hypoxic estuarine sediments, *FEMS Microbiology Letters*, 366(1), pp. fny288.
- [6] R. M. Atlas, A. Horowitz, M. Krichevsky, and A. K. Bej, 1991, Response of microbial populations to environmental disturbance, *Microbial ecology*, 22(1), pp. 249–256.
- [7] H. H. Sung, H. C. Li, F. M. Tsai, Y. Y. Ting, and W. L. Chao, 1999, Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), pp. 261–271.
- [8] P. T. Anh, C. Kroeze, S. R. Bush, and A. P. J. Mol, 2010, Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control, *Agricultural Water Management*, 97(6), pp. 872–882.
- [9] G. Valencia-Castañeda, M. G. Frías-Espericueta, R. C. Vanegas-Pérez, M. C. Chávez-Sánchez, and F. Páez-Osuna, 2019, Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 70, pp. 103193.
- [10] S. Yang, J. Luo, Y. Huang, Y. Yuan, and S. Cai, 2022, Effect of sub-lethal ammonia and nitrite stress on autophagy and apoptosis in hepatopancreas of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Fish & Shellfish Immunology*, 130, pp. 72–78.
- [11] J. Ramírez-Rochín, M. G. Frías-Espericueta, J. F. Fierro-Sañudo, S. G. Alarcón-Silvas, M. G. Fregoso-López, and F. Páez-Osuna, 2017, Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water, *Aquaculture Research*, 48(5), pp. 2337–2343.
- [12] M. T. Gutierrez-Wing and R. F. Malone, 2006, Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications, *Aquacultural Engineering*, 34(3), pp. 163–171.
- [13] S. Spotte, 2024, Fish and invertebrate culture; water management in closed

- systems, Wiley-Interscience, New York and London, pp. 145.
- [14] J. F. Wickins, 1976, The tolerance of warm-water prawns to recirculated water, *Aquaculture*, 9(C), pp. 19–37.
 - [15] P. R. Muir, D. C. Sutton, and L. Owens, 1991, Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoa, *Marine Biology*, 108(1), pp. 67–71.
 - [16] V. Kumar, S. Roy, B. K. Behera, P. Bossier, and B. K. Das, 2021, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture, *Toxins*, 13(8), 524.
 - [17] I. T. Tseng and J. C. Chen, 2004, The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress, *Fish & Shellfish Immunology*, 17(4), pp. 325–333.
 - [18] M. Faridullah, C. Roy, U. J. Lithi, and V. C. Roy, 2016, Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh, *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 2(2), pp. 171–176.
 - [19] D. Loest *et al.*, 2022, Carbapenem-resistant *Escherichia coli* from shrimp and salmon available for purchase by consumers in Canada: a risk profile using the Codex framework, *Epidemiology and Infection*, 150, pp. e148.
 - [20] Tiêu chuẩn: TCVN 13656:2023 - Nước nuôi trồng thủy sản – Chất lượng nước nuôi thâm canh tôm sú, tôm thẻ chân trắng..
 - [21] Tiêu chuẩn: TCVN 13951:2024 - Nước nuôi trồng thủy sản – Nước biển – Yêu cầu chất lượng.
 - [22] D. K. Pham *et al.*, 2015, Monitoring antibiotic use and residue in freshwater aquaculture for domestic use in Vietnam, *EcoHealth*, 12(3), pp. 480–489.
 - [23] F. Li, J. Huang, M. Wang, L. Chen, and Y. Xiao, 2021, Sources, distribution and dynamics of antibiotics in *Litopenaeus vannamei* farming environment,” *Aquaculture*, 545, pp. 737200.
 - [24] H. Erdem, 2023, The application of different technologies for removal of rifampicin from aquatic environments: A recent review, *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi*, 14(1), pp. 145–163.
 - [25] A. Fiaz, D. Zhu, and J. Sun, 2021, Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives, *Environmental Sciences Europe*, 33(1), pp. 1–17.
 - [26] F. Alanazi, R. Almugbel, H. M. Maher, F. M. Alodaib, and N. Z. Alzoman, 2021, Determination of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline residues in seafood products of Saudi Arabia using high performance liquid chromatography–Photo diode array detection, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(6), pp. 566–575.
 - [27] R. Lulijwa, E. J. Rupia, and A. C. Alfaro, 2020, Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers, *Reviews in Aquaculture*, 12(2), pp. 640–663.
 - [28] J. Li, J. Yie, R. W. T. Foo, J. M. L. Ling, H. Xu, and N. Y. S. Woo, 1999, Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*, *Marine Pollution Bulletin*, 39(1–12), pp. 245–249.
 - [29] R. Wang, Y. Zhong, X. Gu, J. Yuan, A. F. Saeed, and S. Wang, 2015, The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*, *Frontiers*

- in Microbiology*, 6(MAR), pp. 134247.
- [30] R. X. Wang, A. L. Wang, and J. Y. Wang, 2014, Antibiotic resistance monitoring in heterotrophic bacteria from anthropogenic-polluted seawater and the intestines of oyster *Crassostrea hongkongensis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109, pp. 27–31.
 - [31] K. R. Hardie and S. J. Fenn, 2022, MM profile: rifampicin: a broad-spectrum antibiotic, *Journal of medical microbiology*, 71(8), pp. 001566.
 - [32] D. Schar, E. Y. Klein, R. Laxminarayan, M. Gilbert, and T. P. Van Boeckel, 2020, Global trends in antimicrobial use in aquaculture, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–9.
 - [33] F. C. Cabello *et al.*, 2013, Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health, *Environmental microbiology*, 15(7), pp. 1917–1942.
 - [34] P. T. P. Hoa *et al.*, 2011, Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam, *The Science of the total environment*, 409(15), pp. 2894–2901.
 - [35] T. X. Le, Y. Munekage, and S. I. Kato, 2005, Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas, *The Science of the total environment*, 349(1–3), pp. 95–105.
 - [36] M. G. Bacanlı, 2024, The two faces of antibiotics: an overview of the effects of antibiotic residues in foodstuffs, *Archives of Toxicology*, 98(6), pp. 1717.
 - [37] J. Xu *et al.*, 2021, Application of hybrid electrocoagulation–filtration methods in the pretreatment of marine aquaculture wastewater, *Water Science and Technology*, 83(6), pp. 1315–1326.
 - [38] Y. Shi *et al.*, 2017, Evaluation of soluble microbial products (SMP) on membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) at the fractional and overall level: a review, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(1), pp. 71–85.
 - [39] M. J. Sharrer, Y. Tal, D. Ferrier, J. A. Hankins, and S. T. Summerfelt, 2007, Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system, *Aquacultural Engineering*, 36(2), pp. 159–176.
 - [40] S. Chen, J. Yu, H. Wang, H. Yu, and X. Quan, 2015, A pilot-scale coupling catalytic ozonation–membrane filtration system for recirculating aquaculture wastewater treatment, *Desalination*, 363, pp. 37–43.
 - [41] Z. Han *et al.*, 2021, Recovery of phosphate, magnesium and ammonium from eutrophic water by struvite biomineralization through free and immobilized *Bacillus cereus* MRR2, *Journal of Cleaner Production*, 320, pp. 128796.
 - [42] J. Huang, Y. Xiao, and B. Chen, 2023, Nutrients removal by *Olivibacter jilunii* immobilized on activated carbon for aquaculture wastewater treatment: ppk1 gene and bacterial community structure, *Bioresource Technology*, 370, pp. 128494.
 - [43] F. L. G. de Menezes, A. J. C. da Silva, C. A. Martínez-Huitle, C. L. P. S. Zanta, J. J. F. Alves, and S. S. L. Castro, 2017, Electrochemical treatment of shrimp farming effluent: role of electrocatalytic material, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(7), pp. 6061–6070.
 - [44] I. Linares-Hernández, C. Barrera-Díaz, B. Bilyeu, P. Juárez-GarcíaRojas, and

- E. Campos-Medina, 2010, A combined electrocoagulation–electrooxidation treatment for industrial wastewater, *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), pp. 688–694.
- [45] H. Zöllig, C. Fritzsche, E. Morgenroth, and K. M. Udert, 2015, Direct electrochemical oxidation of ammonia on graphite as a treatment option for stored source-separated urine, *Water Research*, 69, pp. 284–294.
- [46] P. P. Singh *et al.*, 2024, Light-driven photocatalysis as an effective tool for degradation of antibiotics, *RSC Advances*, 14(29), pp. 20492–20515.
- [47] H. Chakhtouna, H. Benzaid, N. Zari, A. el kacem Qaiss, and R. Bouhfid, 2021, Recent progress on Ag/TiO₂ photocatalysts: photocatalytic and bactericidal behaviors, *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(33), pp. 44638.
- [48] F. Mohamadpour and A. M. Amani, 2024, Photocatalytic systems: reactions, mechanism, and applications, *RSC Advances*, 14(29), pp. 20609–20645.
- [49] S. I. Sadia *et al.*, 2024, Crystallographic biography on nanocrystalline phase of polymorphs titanium dioxide (TiO₂): A perspective static review, *South African Journal of Chemical Engineering*, 50, pp. 51–64.
- [50] W. S. Koe, J. W. Lee, W. C. Chong, Y. L. Pang, and L. C. Sim, 2020, An overview of photocatalytic degradation: photocatalysts, mechanisms, and development of photocatalytic membrane, *Environmental science and pollution research international*, 27(3), pp. 2522–2565.
- [51] I. Arora, H. Chawla, A. Chandra, S. Sagadevan, and S. Garg, 2022, Advances in the strategies for enhancing the photocatalytic activity of TiO₂: Conversion from UV-light active to visible-light active photocatalyst, *Inorganic Chemistry Communications*, 143, pp. 109700.
- [52] M. Samir, R. A. Geioushy, S. El-Sherbiny, and O. A. Fouad, 2022, Enhancing the anti-ageing, antimicrobial activity and mechanical properties of surface-coated paper by Ag@TiO₂-modified nanopigments, *Environmental Science and Pollution Research*, 29(48), pp. 72515–72527.
- [53] A. Girma *et al.*, 2024, Green-synthesised silver nanoparticles: antibacterial activity and alternative mechanisms of action to combat multidrug-resistant bacterial pathogens: a systematic literature review, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 17(1), pp. 2412601.
- [54] H. Liu, X. Dong, C. Duan, X. Su, and Z. Zhu, 2013, Silver-modified TiO₂ nanorods with enhanced photocatalytic activity in visible light region, *Ceramics International*, 39(8), pp. 8789–8795.
- [55] L. F. Liu, Y. Zhang, F. L. Yang, G. Chen, and J. C. Yu, 2009, Simultaneous photocatalytic removal of ammonium and nitrite in water using Ce³⁺–Ag⁺ modified TiO₂, *Separation and Purification Technology*, 67(2), pp. 244–248.
- [56] L. Gomathi Devi and K. Mohan Reddy, 2010, Enhanced photocatalytic activity of silver metallized TiO₂ particles in the degradation of an azo dye methyl orange: Characterization and activity at different pH values, *Applied Surface Science*, 256(10), pp. 3116–3121.
- [57] Y. Shavisi, S. Sharifnia, S. N. Hosseini, and M. A. Khadivi, 2014, Application of TiO₂/perlite photocatalysis for degradation of ammonia in wastewater, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(1), pp. 278–283.
- [58] K. Vikrant, K. H. Kim, F. Dong, and D. A. Giannakoudakis, 2020,

- Photocatalytic platforms for removal of ammonia from gaseous and aqueous matrixes: Status and Challenges, *ACS Catalysis*, 10(15), pp. 8683–8716.
- [59] H. Duan *et al.*, 2020, Improving wastewater management using free nitrous acid (FNA), *Water Research*, 171, pp. 115382.
 - [60] M. Pavel, C. Anastasescu, R. N. State, A. Vasile, F. Papa, and I. Balint, 2023, Photocatalytic degradation of organic and inorganic pollutants to harmless end products: Assessment of practical application potential for water and air cleaning, *Catalysts*, 13(2), pp. 380.
 - [61] W. N. Wang, A. L. Wang, L. Chen, Y. Liu, and R. Y. Sun, 2002, Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na⁺-K⁺ ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles, *Aquatic Toxicology*, 60(1–2), pp. 75–83.
 - [62] F. Zhang, Y. Pi, J. Cui, Y. Yang, X. Zhang, and N. Guan, 2007, Unexpected selective photocatalytic reduction of nitrite to nitrogen on silver-doped titanium dioxide, *Journal of Physical Chemistry C*, 111(9), pp. 3756–3761.
 - [63] H. O. N. Tugaoen, S. Garcia-Segura, K. Hristovski, and P. Westerhoff, 2017, Challenges in photocatalytic reduction of nitrate as a water treatment technology, *Science of The Total Environment*, 599–600, pp. 1524–1551.
 - [64] T. C. Bradley, C. N. Haas, and C. M. Sales, 2020, Nitrification in Premise Plumbing: A Review, *Water*, 12(3), pp. 830.
 - [65] H.-P. Koops, U. Purkhold, A. Pommerening-Röser, G. Timmermann, and M. Wagner, 2006, The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria, in *The Prokaryotes*, Springer New York, pp. 778–811.
 - [66] E. Spieck and A. Lipski, 2011, Cultivation, growth physiology, and chemotaxonomy of nitrite-oxidizing bacteria, in *Methods in Enzymology*, 486©, Academic Press Inc., pp. 109–130.
 - [67] A. Abeliovich, 2006, The Nitrite Oxidizing Bacteria, pp. 861–872.
 - [68] B. Ji *et al.*, 2015, Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4), pp. 643–651.
 - [69] S. A. Kivanç, M. Takim, M. Kivanç, and G. Güllülü, Bacillus spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens,” *African Health Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 364–371, Jun. 2014, doi: 10.4314/ahs.v14i2.11.
 - [70] T. H. Boyer, 2014, Physical-chemical processes for nitrogen removal, in *Comprehensive Water Quality and Purification*, Elsevier Inc., 3, pp. 163–195.
 - [71] S. Rahimi, O. Modin, and I. Mijakovic, 2020, Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater, *Biotechnology Advances*, 43, pp. 107570.
 - [72] J. Su *et al.*, 2001, Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere, *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), pp. 853–860.
 - [73] P. Wang *et al.*, 2013, Isolation and immobilization of new aerobic denitrifying bacteria, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, pp. 12–17.
 - [74] B. Li *et al.*, 2019, A Novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis, *Frontiers in*

- microbiology*, 10, pp.02580.
- [75] H. Li, X. Zhang, X. Zhang, and Z. Zhang, 2019, Immobilization of nitrifying/denitrifying bacteria onto construction waste and the elimination of pollutants from stormwater runoff, *Desalination and Water Treatment*, 152, pp. 82–91.
 - [76] C. B. Hill and E. Khan, 2008, A Comparative study of immobilized nitrifying and co-immobilized nitrifying and denitrifying bacteria for ammonia removal from sludge digester supernatant, *Water, Air, and Soil Pollution*, 195(1), pp. 23–33.
 - [77] D. Kanakaraju, F. D. anak Kutiang, Y. C. Lim, and P. S. Goh, 2022, Recent progress of Ag/TiO₂ photocatalyst for wastewater treatment: Doping, co-doping, and green materials functionalization, *Applied Materials Today*, 27, pp. 101500.
 - [78] S. Thakur *et al.*, 2024, Advances in powder nano-photocatalysts as pollutant removal and as emerging contaminants in water: Analysis of pros and cons on health and environment, *Advanced Powder Materials*, 3(6), pp. 100233.
 - [79] Y. Xue *et al.*, 2023, Immobilization of photocatalytic materials for wastewater treatment using 3D printing technology – advances and challenges, *Environmental Pollution*, 316, pp. 120549.
 - [80] A. Joseph and A. Vijayanandan, 2023, Review on support materials used for immobilization of nano-photocatalysts for water treatment applications,” *Inorganica Chimica Acta*, 545, pp. 121284.
 - [81] Y. Zhao *et al.*, 2019, Insights into biofilm carriers for biological wastewater treatment processes: Current state-of-the-art, challenges, and opportunities, *Bioresource technology*, 288, pp. 121619.
 - [82] S. Dong *et al.*, 2016, Role of self-assembly coated Er³⁺: YAlO₃/TiO₂ in intimate coupling of visible-light-responsive photocatalysis and biodegradation reactions, *Journal of Hazardous Materials*, 302, pp. 386–394.
 - [83] R. Ding *et al.*, 2018, Light-excited photoelectrons coupled with bio-photocatalysis enhanced the degradation efficiency of oxytetracycline,” *Water Research*, 143, pp. 589–598.
 - [84] D. Wen, G. Li, R. Xing, S. Park, and B. E. Rittmann, 2012, 2,4-DNT removal in intimately coupled photobiocatalysis: The roles of adsorption, photolysis, photocatalysis, and biotransformation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), pp. 263–272.
 - [85] H. Cai, L. Sun, Y. Wang, T. Song, M. Bao, and X. Yang, 2019, Unprecedented efficient degradation of phenanthrene in water by intimately coupling novel ternary composite Mn₃O₄/MnO₂-Ag₃PO₄ and functional bacteria under visible light irradiation, *Chemical Engineering Journal*, vol. 369, pp. 1078–1092.
 - [86] Q. Liu, J. Hou, J. Wu, L. Miao, G. You, and Y. Ao, 2022, Intimately coupled photocatalysis and biodegradation for effective simultaneous removal of sulfamethoxazole and COD from synthetic domestic wastewater,” *Journal of Hazardous Materials*, 423, pp. 127063.
 - [87] Y. Dong *et al.*, 2023, Enhanced antibiotic wastewater degradation by intimately coupled B-Bi₃O₄Cl photocatalysis and biodegradation reactor: Elucidating degradation principle systematically, *Journal of Hazardous Materials*, 445, pp. 130364.

- [88] M. Yu *et al.*, 2020, Intimate coupling of photocatalysis and biodegradation for wastewater treatment: Mechanisms, recent advances and environmental applications, *Water Research*, 175, pp. 115673.
- [89] Z. Dong, M. Lu, W. Huang, and X. Xu, 2011, Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier,” *Journal of Hazardous Materials*, 196, pp. 123–130.
- [90] S. Raj Deena *et al.*, 2022, Efficiency of various biofilm carriers and microbial interactions with substrate in moving bed-biofilm reactor for environmental wastewater treatment, *Bioresource Technology*, 359, pp. 127421.
- [91] S. Fukuzaki, N. Nishio, and S. Nagai, 1990, The use of polyurethane foam for microbial retention in methanogenic fermentation of propionate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(3), pp. 408–413.
- [92] Lê Văn Cát, 2007, *Xử lý nước thải giàu hợp chất ni tơ và photpho*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
- [93] Nguyen Quang Huy, Ngo Thi Kim Toan, Trinh Thi Hien, and Pham Bao Yen, 2012, Biofilm forming bacteria isolated from wastewater in Vietnam, *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, 28(2S), pp. 137–143.
- [94] C. Li *et al.*, 2018, Combination of a recombinant bacterium with organonitrile-degrading and biofilm-forming capability and a positively charged carrier for organonitriles removal, *Journal of Hazardous Materials*, 353, pp. 372–380.
- [95] S. Sfaelou, H. K. Karapanagioti, and J. Vakros, 2015, Studying the formation of biofilms on supports with different polarity and their efficiency to treat wastewater, *Journal of Chemistry*, 2015(1), pp. 734384.
- [96] A. Zainab, S. Meraj, and R. Liaquat, 2020, Study on Natural Organic Materials as Biofilm Carriers for the Optimization of Anaerobic Digestion, *Waste and Biomass Valorization*, 11(6), pp. 2521–2531.
- [97] M. A. Wahab, F. Habouzit, N. Bernet, J. P. Steyer, N. Jedidi, and R. Escudié, 2014, Sequential operation of a hybrid anaerobic reactor using a lignocellulosic biomass as biofilm support, *Bioresource Technology*, 172, pp. 150–155.
- [98] L. Massimi, A. Giuliano, M. L. Astolfi, R. Congedo, A. Masotti, and S. Canepari, 2018, Efficiency evaluation of food waste materials for the removal of metals and metalloids from complex multi-element solutions, *Materials*, 11(3), pp. 334.
- [99] Hoàng Phương Hà, “Nghiên cứu vi khuẩn nitrat hóa để ứng dụng trong công nghệ xử lý nước nhiễm amoni,” Viện Công nghệ sinh học, 2010.
- [100] Hoàng Phương Hà, Nguyễn Thị Minh, Lê Thị Nhi Công, Đỗ Thị Liên, Cung Thị Ngọc Mai, 2021, Một số điều kiện ảnh hưởng tới vi khuẩn chuyển hóa nitơ khi lên men xộp tạo chế phẩm xử lý ni tơ trong ao nuôi thủy sản,” in *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, pp. 1192–1197.
- [101] Trần Văn Nhị, Nguyễn Thị Kim Cúc, Hoàng Phương Hà, 2008, Nghiên cứu ảnh hưởng của chất mang đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa nitrogen của vi khuẩn nitrate hóa, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 6(4A), pp. 783–789.
- [102] M. M. A. Aslam *et al.*, 2017, Performance evaluation of trickling filter-based wastewater treatment system utilizing cottonsticks as filter media,” *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(5), pp. 1955–1962.
- [103] G. Sun, J. Wan, Y. Sun, H. Li, C. Chang, and Y. Wang, 2019, Enhanced

- removal of nitrate and refractory organic pollutants from bio-treated coking wastewater using corncobs as carbon sources and biofilm carriers,” *Chemosphere*, 237, pp. 124520.
- [104] X. Guan, G. Ji, S. Xu, Y. Yun, and H. Liu, 2019, Selection of agricultural straws as sustained-release carbon source for denitrification in a drawer-type biological filter, *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(1), pp. 1–11.
- [105] Y. Ling *et al.*, 2021, Release mechanism, secondary pollutants and denitrification performance comparison of six kinds of agricultural wastes as solid carbon sources for nitrate removal, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), pp. 1–13.
- [106] F. Li, X. Lan, J. Shi, and L. Wang, 2021, Loofah sponge as an environment-friendly biocarrier for intimately coupled photocatalysis and biodegradation (ICPB), *Journal of Water Process Engineering*, 40, pp. 101965.
- [107] W. Zhang, X. Ren, J. He, Q. Zhang, C. Qiu, and B. Fan, 2019, Application of natural mixed bacteria immobilized carriers to different kinds of organic wastewater treatment and microbial community comparison, *Journal of Hazardous Materials*, 377, pp. 113–123.
- [108] N. M. Erna, S. Banerjee, M. Shariff, and F. M. Yusoff, 2013, Screening, identification and immobilization of ammonia oxidizing bacterial consortium collected from mangrove areas and shrimp farms, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(1), pp. 73–81.
- [109] C. Quintelas, F. Costa, and T. Tavares, 2013, Bioremoval of diethylketone by the synergistic combination of microorganisms and clays: Uptake, removal and kinetic studies, *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), pp. 1374–1383.
- [110] P. J. Reeve and H. J. Fallowfield, 2018, Natural and surfactant modified zeolites: A review of their applications for water remediation with a focus on surfactant desorption and toxicity towards microorganisms, *Journal of Environmental Management*, 205, pp. 253–261.
- [111] A. Safonov, N. Popova, N. Andrushenko, K. Boldyrev, N. Yushin, and I. Zinikovskaia, 2021, Investigation of materials for reactive permeable barrier in removing cadmium and chromium(VI) from aquifer near a solid domestic waste landfill, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(4), pp. 4645–4659.
- [112] F. Berrelleza-Valdez *et al.*, 2019, A novel process of the isolation of nitrifying bacteria and their development in two different natural lab-scale packed-bed bioreactors for trichloroethylene bioremediation, *Journal of Environmental Management*, 241, pp. 211–218.
- [113] Q. Li *et al.*, 2013, Short-cut nitrification in biological aerated filters with modified zeolite and nitrifying sludge, *Bioresource Technology*, 136, pp. 148–154.
- [114] F. Song, H. Koo, and D. Ren, Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation,” *Journal of Dental Research*, 94(8), pp. 1027–1034.
- [115] Z. Wang, T. Liu, G. Yang, and S. Zhao, 2024, Preparation and research on cationic modified vermiculite with strong adsorption capacity for mineralizing bacteria, *Materials Letters*, 363, pp. 136313.

- [116] O. S. Esan, O. N. Abiola, O. Owoyomi, C. O. Aboluwoye, and M. O. Osundiya, 2014, Adsorption of brilliant green onto luffa cylindrical sponge: Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamic studies, *International Scholarly Research Notices*, 2014(1), pp. 743532.
- [117] D. Wojcieszynska, J. Klamka, A. Marchlewicz, I. Potocka, J. Żur-Pińska, and U. Guzik, 2022, Immobilized *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in naproxen degradation, *Molecules*, 27(18), pp. 5795.
- [118] M. Mu *et al.*, 2023, Influence of surface roughness, nanostructure, and wetting on bacterial adhesion, *Langmuir*, 39(15), pp. 5426–5439.
- [119] W. Teughels, N. Van Assche, I. Sliepen, and M. Quirynen, 2006, Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development,” *Clinical oral implants research*, 17(SUPPL.2), pp. 68–81.
- [120] M. Quirynen and C. M. L. Bollen, 1995, The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man,” *Journal of Clinical Periodontology*, 22(1), pp. 1–14.
- [121] L. D. Renner and D. B. Weibel, 2011, Physicochemical regulation of biofilm formation, *MRS bulletin*, 36(5), pp. 347–355.
- [122] K. Bohinc *et al.*, 2014, Available surface dictates microbial adhesion capacity, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 50, pp. 265–272.
- [123] L. R. Hilbert, D. Bagge-Ravn, J. Kold, and L. Gram, 2003, Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(3), pp. 175–185.
- [124] Y. Liu, S. F. Yang, Y. Li, H. Xu, L. Qin, and J. H. Tay, 2004, The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment, *Journal of Biotechnology*, 110 (3), pp. 251–256.
- [125] H. T. T. Dang, C. V. Dinh, K. M. Nguyen, N. T. H. Tran, T. T. Pham, and R. M. Narbaitz, 2020, Loofah sponges as bio-carriers in a pilot-scale integrated fixed-film activated sludge system for municipal wastewater treatment, *Sustainability*, 12(11), pp. 4758.
- [126] T. Li, X. L. Yang, H. L. Song, J. J. Wu, and J. Y. Xu, 2019, Alkali-treated cellulose carrier enhancing denitrification in membrane bioreactor, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 145, pp. 104813.
- [127] U. Dorji *et al.*, 2022, On-site domestic wastewater treatment system using shredded waste plastic bottles as biofilter media: Pilot-scale study on effluent standards in Bhutan, *Chemosphere*, 286, pp. 131729.
- [128] S. Dalahmeh, L. Ahrens, M. Gros, K. Wiberg, and M. Pell, 2018, Potential of biochar filters for onsite sewage treatment: Adsorption and biological degradation of pharmaceuticals in laboratory filters with active, inactive and no biofilm, *Science of The Total Environment*, 612, pp. 192–201.
- [129] S. Bolan *et al.*, 2023, The potential of biochar as a microbial carrier for agricultural and environmental applications, *Science of The Total Environment*, 886, pp. 163968.
- [130] G. O. Ihekwe, I. I. Obianyo, E. N. Anosike-Francis, V. N. Anyakora, O. S. Odusanya, and A. P. Onwualu, 2021, Expanded clay aggregates multi-functionality for water purification: Disinfection and adsorption studies, *Cogent Engineering*, 8(1), pp.1883232.
- [131] X. Zhang *et al.*, 2019, A sustainable bio-carrier medium for wastewater

- treatment: Modified basalt fiber, *Journal of Cleaner Production*, 225, pp. 472–480.
- [132] M. A. Nkansah, A. A. Christy, T. Barth, and G. W. Francis, 2012, The use of lightweight expanded clay aggregate (LECA) as sorbent for PAHs removal from water, *Journal of Hazardous Materials*, 217–218, pp. 360–365.
 - [133] I. Gurrappa and L. Binder, 2008, Electrodeposition of nanostructured coatings and their characterization—A review, *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(4), pp. 43001–43012.
 - [134] N. Ghrairi and M. Bouaicha, 2012, Structural, morphological, and optical properties of TiO₂ thin films synthesized by the electro phoretic deposition technique, *Nanoscale Research Letters*, 7(1), pp. 1–7.
 - [135] M. Nuño, R. J. Ball, C. R. Bowen, R. Kurchania, and G. D. Sharma, 2015, Photocatalytic activity of electrophoretically deposited (EPD) TiO₂ coatings, *Journal of Materials Science*, 50(14), pp. 4822–4835.
 - [136] P. J. Carlson, L. A. Pretzer, and J. E. Boyd, 2007, Solvent deposition of titanium dioxide on acrylic for photocatalytic application, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(24), pp. 7970–7976.
 - [137] Y. Tao and P. P. Pescarmona, 2018, Nanostructured oxides synthesised via scCO₂-assisted sol-gel methods and their application in catalysis, *Catalysts*, 8(5), pp. 212.
 - [138] M. Pagliaro, R. Ciriminna, and G. Palmisano, 2007, The chemical effects of molecular sol-gel entrapment, *Chemical Society Reviews*, 36(6), pp. 932–940.
 - [139] T. Prabhakar *et al.*, 2025, Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective, *Chemical Engineering Journal*, 503, pp. 158054.
 - [140] S. Smith, K. Goodge, M. Delaney, A. Struzyk, N. Tansey, and M. Frey, 2020, A comprehensive review of the covalent immobilization of biomolecules onto electrospun nanofibers, *Nanomaterials*, 10(11), pp. 2142.
 - [141] D. Liu *et al.*, 2022, Immobilization of biomass materials for removal of refractory organic pollutants from wastewater, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), pp. 13830.
 - [142] Y. Wu, T. Li, and L. Yang, 2012, Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review,” *Bioresource technology*, 107, pp. 10–18.
 - [143] Y. Su, C. Qian, T. Zheng, and Q. Chen, 2021, A prepared easily bio-carrier based on chitosan modified polypropylene fibers, *Biochemical Engineering Journal*, 165, pp. 107824.
 - [144] D. Berillo, A. Al-Jwaid, and J. Caplin, 2021, Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water, *Polymers*, 13(7), pp. 1073.
 - [145] Pham Thi Lan Anh, Khang Le, Nguyen Trong Thuc, Do Phuc Chau, Nguyen Thi Hoai Thu, 2020, Optimizing conditions for *Vibrio Parahaemolyticus* culture and preservation, *IFMBE Proceedings*, 69, pp. 681–684.
 - [146] H. P. Koops, H. Harms, and H. Wehrmann, 1976, Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp, *Archives of microbiology*, 107(3), pp. 277–282.
 - [147] E. M. van den Berg, U. van Dongen, B. Abbas, and M. C. van Loosdrecht, 2015, Enrichment of DNRA bacteria in a continuous culture, *The ISME Journal*

- 9(10), pp. 2153–2161.
- [148] S. W. Watson and J. B. Waterbury, 1971, Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp.,” *Archiv für Mikrobiologie* 77(3), pp. 203–230.
 - [149] Nguyen Thi Minh, Ha Phuong Thu, Le Thi Thu Huong, Phan Ke Son, Le Thi Nhi Cong, Mai Thi Thu Trang, Hoang Phuong Ha, 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), pp. 41-47.
 - [150] W. Buraso, V. Lachom, P. Siriya, and P. Laokul, 2018, Synthesis of TiO₂ nanoparticles via a simple precipitation method and photocatalytic performance, *Materials Research Express*, 5(11), pp. 115003.
 - [151] N. Zainol, K. A. Samad, C. A. Ilyana Che Jazlan, and N. A. Razahazizi, 2022, Optimization of COD, nitrate-N and phosphorus removal from hatchery wastewater with acclimatized mixed culture, *Heliyon*, 8(4), pp. e09217.
 - [152] T. M. LaPara, J. E. Alleman, P. G. Pope, T. M. LaPara, J. E. Alleman, and P. G. Pope, 2000, Miniaturized closed reflux, colorimetric method for the determination of chemical oxygen demand, *Water Management*, 20(4), pp. 295–298.
 - [153] H. Motamedi and M. Jafari, 2020, Screening heterotrophic ammonia removal and aerobic denitrifying bacteria from wastewater of ammonia production units of a petrochemical industry, *Current Microbiology*, 77(9), pp. 2207–2214.
 - [154] A. D. Eaton, L. S. Clesceri, S. Lenore, A. E. Franson, 1995, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th Edition, American Public Health Association Inc., New York.
 - [155] P. H. Gilligan, 2013, Identification of pathogens by classical clinical tests, *The Prokaryotes: Human Microbiology*, pp. 57–89.
 - [156] M. Morikawa, S. Kagihiro, M. Haruki, K. Takano, S. Branda, R. Kolter, S. Kanaya, 2006, Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate, *Microbiology (Reading, England)*, 152(9), pp. 2801–2807.
 - [157] R. M. Atlas, 2005, *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. CRC Press,.
 - [158] S. Han, I. Jang, E. K. Choi, W. Park, C. Yi, and N. Chung, 2020, Bacterial self-healing performance of coated expanded clay in concrete, *Journal of Environmental Engineering*, 146(7), pp. 04020072.
 - [159] N. S. Bryan and M. B. Grisham, 2007, Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free radical biology & medicine*, 43(5), pp. 645.
 - [160] P. T. T. Le and C. E. Boyd, 2020, Comparison of phenate and salicylate methods for determination of total ammonia nitrogen in freshwater and saline water, *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(6), pp. 885–889.
 - [161] L. F. Dutra, M. E. Freitas, A. C. Grillet, N. Mendes, and M. Woloszyn, 2019, Microstructural characterization of porous clay-based ceramic composites, *Materials*, 12(6), pp. 946.
 - [162] K. A. Cychosz and M. Thommes, 2018, Progress in the physisorption characterization of nanoporous gas storage materials, *Engineering*, 4(4), pp.

- 559–566.
- [163] D. Jeong, S. C. Kim, T. An, D. Lee, H. Hwang, S. Q. Choi, J. Park, 2023, Synthesis of Aluminum-Based Metal–Organic Framework (MOF)-derived carbon nanomaterials and their water adsorption isotherm, *Nanomaterials*, 13(16), pp. 2351.
 - [164] J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, and M. Pinelo, 2018, A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts*, 8(2), pp. 92.
 - [165] O. I. Lekang and H. Kleppe, 2000, Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media, *Aquacultural Engineering*, 21(3), pp. 181–199.
 - [166] G. Ruiz, D. Jeison, O. Rubilar, G. Ciudad, and R. Chamy, Nitrification–denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters, *Bioresource Technology*, 97(2), pp. 330–335.
 - [167] P. Di Martino, 2018, Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype, *AIMS Microbiology*, 4(2), pp. 274.
 - [168] S. Paytubi, C. Cansado, C. Madrid, and C. Balsalobre, Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*, *Frontiers in Microbiology*, 0(NOV), pp. 2160.
 - [169] A. E. Marsden, K. Grudzinski, J. M. Ondrey, C. R. DeLoney-Marino, and K. L. Visick, 2017, Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri*, *PLOS ONE*, 12(1), pp. e0169521.
 - [170] A. Soares, L. C. Gomes, G. A. Monteiro, and F. J. Mergulhão, 2021, The influence of nutrient medium composition on escherichia coli biofilm development and heterologous protein expression, *Applied Sciences*, 11(18), pp. 8667.
 - [171] S. Lackner, A. Terada, and B. F. Smets, 2008, Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: Results of a modeling study, *Water Research*, 42(4–5), pp. 1102–1112.
 - [172] C. Chen, M. Zhang, X. Yu, J. Mei, Y. Jiang, Y. Wang, T. C. Zhang, 2018, Effect of C/N ratios on nitrogen removal and microbial communities in the anaerobic baffled reactor (ABR) with an anammox-coupling-denitrification process, *Water Science and Technology*, 78(11), pp. 2338–2348.
 - [173] M. Garcia-Valles, P. Alfonso, S. Martínez, and N. Roca, 2020, Mineralogical and thermal characterization of kaolinitic clays from Terra Alta (Catalonia, Spain), *Minerals*, 10(2), pp. 142.
 - [174] M. Thiedeitz, W. Schmidt, M. Härder, and T. Kränkel, 2020, Performance of rice husk ash as supplementary cementitious material after production in the field and in the lab, *Materials*, 13(19), pp. 4319.
 - [175] D. Guin, S. V. Manorama, J. N. L. Latha, and S. Singh, 2007, Photoreduction of silver on bare and colloidal TiO₂ nanoparticles/nanotubes: Synthesis, characterization, and tested for antibacterial outcome, *Journal of Physical Chemistry C*, 111(36), pp. 13393–13397.
 - [176] Y. Gong, X. Chen, and W. Wu, 2024, Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in sample preparation: Material characterization and mechanism investigation, *Advances in Sample Preparation*, 11, pp. 100122.
 - [177] E. H. Alsharaeh, T. Bora, A. Soliman, F. Ahmed, G. Bharath, M. G. Ghoniem, K. M. Abu-Salah, J. Dutta, 2017, Sol-gel-assisted microwave-derived synthesis

- of anatase Ag/TiO₂/GO nanohybrids toward efficient visible light phenol degradation, *Catalysts*, 7(5), pp. 133.
- [178] T. Dayakar, V. R. K., M. Vinodkumar, K. Bikshalu, B. Chakradhar, and R. R. K., 2017, Novel synthesis and characterization of Ag@TiO₂ core shell nanostructure for non-enzymatic glucose sensor,” *Applied Surface Science*, 435, pp. 216–224.
- [179] L. Gharibshahi, E. Saion, E. Gharibshahi, A. H. Shaari, and K. A. Matori, 2017, Structural and optical properties of ag nanoparticles synthesized by thermal treatment method, *Materials*, 10(4), pp. 402.
- [180] K. Son Phan, T. T. Huong Le, T. Minh Nguyen, T. T. Trang Mai, P. Ha Hoang, X. Thang To, T. Tung Nguyen, K. Dang Pham, P. Thu Ha, 2022, Co-delivery of Doxycycline, Florfenicol and Silver nanoparticles using alginate/chitosan nanocarriers, *ChemistrySelect*, 7(33), pp. e202201954.
- [181] Z. D. Mahmoudabadi, E. Eslami, and M. Narimisa, 2018, Synthesis of Ag/TiO₂ nanocomposite via plasma liquid interactions: Improved performance as photoanode in dye-sensitized solar cell, *Journal of Colloid and Interface Science*, 529, pp. 538–546.
- [182] G. Yang, Z. Jiang, H. Shi, T. Xiao, and Z. Yan, 2010, Preparation of highly visible-light active N-doped TiO₂ photocatalyst, *Journal of Materials Chemistry*, 20(25), pp. 5301–5309.
- [183] C. F. Holder and R. E. Schaak, 2019, Tutorial on powder x-ray diffraction for characterizing nanoscale materials, *ACS Nano*, 13(7), pp. 7359–7365.
- [184] K. S. Phan, T. Minh Nguyen, X. Thang To, T. T. Huong Le, T. Tung Nguyen, K. Dang Pham, P. Ha Hoàng, T. Nham Dong, D. Kim Dang, T. H. Tuyet Phan, T. T. Trang Mai, P. Thu Ha, 2022, Allium sativum@AgNPs and Phyllanthus urinaria@AgNPs: a comparative analysis for antibacterial application,” *RSC Advances*, 12(55), pp. 35730–35743.
- [185] T. Narkbuakaew and P. Sujaridworakun, 2019, Role of Ag (0) deposited on TiO₂ nanoparticles for superior photocatalytic performance induced by calcination, *Optical Materials*, 98, pp. 109407.
- [186] M. Michalska J. Pavlovsky, K. Lemanski, M. Malecka, M. Ptak, V. Novak, M. Kormunda, V. Matejka, 2022, The effect of surface modification with Ag nanoparticles on 21 nm TiO₂: anatase/rutile material for application in photocatalysis,” *Materials Today Chemistry*, 26, pp. 101123.
- [187] A. H. Navidpour, B. Xu, M. B. Ahmed, and J. L. Zhou, 2024, Immobilization of TiO₂ and ZnO by facile surface engineering methods to improve semiconductor performance in photocatalytic wastewater treatment: A review, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 179, pp. 108518.
- [188] S. Karupuchamy, K. Nonomura, T. Yoshida, T. Sugiura, and H. Minoura, 2002, Cathodic electrodeposition of oxide semiconductor thin films and their application to dye-sensitized solar cells, *Solid State Ionics*, 151(1–4), pp. 19–27.
- [189] P. S. M. Dunlop, T. A. McMurray, J. W. J. Hamilton, and J. A. Byrne, Photocatalytic inactivation of clostridium perfringens spores on TiO₂ electrodes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 196(1), pp. 113–119.
- [190] Z. H. Cui, F. Wu, and H. Jiang, 2016, First-principles study of relative stability

- of rutile and anatase TiO₂ using the random phase approximation, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(43), pp. 29914–29922.
- [191] T. Kaur, A. Sraw, R. K. Wanchoo, and A. P. Toor, 2018, Solar assisted degradation of carbendazim in water using clay beads immobilized with TiO₂ & Fe doped TiO₂, *Solar Energy*, 162, pp. 45–56.
- [192] B. Suyamud, Y. Chen, D. T. T. Quyen, Z. Dong, C. Zhao, and J. Hu, 2024, Antimicrobial resistance in aquaculture: Occurrence and strategies in Southeast Asia,” *Science of The Total Environment*, 907, pp. 167942.
- [193] Ngo Thi Huyen, Xuan Nghi Vu, Le Dang Lam Oanh, Dang Le Quynh, Le Thi Tuyet Mai, Pham Thi Tam, Dong Van Quyen, Vu Thi Bich Huyen, 2022, The Antibiotics resistance of *Vibrio* spp. isolated from aquaculture water in some areas of Northern Vietnam, *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 131(1C), pp. 83–93.
- [194] Y. Zhang, X. Zhao, S. Fu, X. Lv, Q. He, Y. Li, F. Ji, X. Xu, 2022, Preparation and antibacterial activity of Ag/TiO₂-functionalized ceramic tiles, *Ceramics International*, 48(4), pp. 4897–4903.
- [195] O. B. Ahmed and T. Alamro, 2022, Evaluation of the antibacterial activities of face masks coated with titanium dioxide nanoparticles, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 18739.
- [196] V. K. Yemmireddy and Y. C. Hung, 2017, Photocatalytic TiO₂ coating of plastic cutting board to prevent microbial cross-contamination, *Food Control*, 77, pp. 88–95.
- [197] J. Xie and Y. C. Hung, 2019, Methodology to evaluate the antimicrobial effectiveness of UV-activated TiO₂ nanoparticle-embedded cellulose acetate film, *Food Control*, 106, pp. 106690.
- [198] E. V. Skorb, L. I. Antonouskaya, N. A. Belyasova, D. G. Shchukin, H. Möhwald, and D. V. Sviridov, 2008, Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO₂ and TiO₂:In₂O₃ nanocomposite, *Applied Catalysis B: Environmental*, 84(1–2), pp. 94–99.
- [199] E. Jeong, H. Y. Park, J. Lee, H. Kim, C. Lee, E. Kim, S. W. Hong, 2021, Long-term and stable antimicrobial properties of immobilized Ni/TiO₂ nanocomposites against *Escherichia coli*, *Legionella thermalis*, and MS2 bacteriophage, *Environmental Research*, 194, pp. 110657.
- [200] D. Venieri, I. Gounaki, M. Bikouvaraki, V. Binas, A. Zachopoulos, G. Kiriakidis, D. Mantzavinos, 2017, Solar photocatalysis as disinfection technique: Inactivation of *Klebsiella pneumoniae* in sewage and investigation of changes in antibiotic resistance profile, *Journal of Environmental Management*, 195, pp. 140–147.
- [201] U. Joost, K. Juganson, M. Visnapuu, M. Mortimer, A. Kahru, E. Nommiste, U. Joost, V. Kisand, A. Ivask, 2015, Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: Effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, pp. 178–185.
- [202] M. Rosenberg, M. Visnapuu, K. Saal, D. Danilian, R. Parna, A. Ivask, V. Kisand, 2021, Preparation and characterization of photocatalytically active antibacterial surfaces covered with acrylic matrix embedded nano-ZnO and nano-ZnO/Ag, *Nanomaterials*, 11(12), pp. 3384.

- [203] M. Kook, H. Kaur, D. Danilian, M. Rosenberg, V. Kisand, and A. Ivask, 2024, Durability of photocatalytic ZnO-based surface coatings and preservation of their antibacterial effect after simulated wear, *Journal of Coatings Technology and Research*, 21(3), pp. 1005–1016.
- [204] X. J. Yan, Y. Tang, C. Ma, Y. Liu, and J. Xu, 2018, Deactivation and regeneration of photocatalysts: a review, *Desalination and Water Treatment*, 124, pp. 160–176.
- [205] L. Cao, Z. Gao, S. L. Suib, T. N. Obee, S. O. Hay, and J. D. Freihaut, 2000, Photocatalytic oxidation of toluene on nanoscale TiO₂ Catalysts: Studies of deactivation and regeneration, *Journal of Catalysis*, 196(2), pp. 253–261.
- [206] Bản tin Thông báo kết quả quan trắc chất lượng nước phục vụ vùng nuôi tôm nước lợ ở ĐBSCL – đợt 4 năm 2023 - Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2.
- [207] E. L. Thiang, C. W. Lee, H. Takada, K. Seki, A. Takei, S. Suzuki, A. Wang, C. W. Bong, 2021, Antibiotic residues from aquaculture farms and their ecological risks in Southeast Asia: a case study from Malaysia, *Ecosystem Health and Sustainability*, 7(1), pp.1926337.
- [208] Y. Chen, H. Li, Z. Wang, T. Tao, and C. Hu, 2011, Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: effects of Ca²⁺ and Mg²⁺, *Journal of environmental sciences (China)*, 23(10), pp. 1634–1639.
- [209] X. Sun, K. Xu, A. Chatzitakis, and T. Norby, 2021, Photocatalytic generation of gas phase reactive oxygen species from adsorbed water: Remote action and electrochemical detection, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), pp. 104809.
- [210] M. Motiei, L. P. de Gouveia, T. Sopik, R. Vicha, D. Skoda, J. Cisar, R. Khalili, E. D. Bergerova, L. Munster, H. Fei, V. Sedlarik, P. Saha, 2021, Nanoparticle-Based Rifampicin Delivery System Development, *Molecules*, 26(7), pp. 2067.
- [211] T. Liu, L. Wang, C. Sun, X. Liu, R. Miao, and Y. Lv, 2019, A comparison of the photolytic and photocatalytic degradation of fluvastatin, *Chemical Engineering Journal*, 358, pp. 1296–1304.
- [212] C. P. Silva, V. Louros, V. Silva, M. Otero, and D. L. D. Lima, 2021, Antibiotics in aquaculture wastewater: Is It feasible to use a photodegradation-based treatment for their removal?, *Toxics*, 9(8), pp. 194.
- [213] A. Gürses, M. Açıkıldız, K. Güneş, and M. S. Gürses, 2016, Dyes and Pigments: Their Structure and Properties, pp. 13–29.
- [214] Y. Dai, M. Liu, J. Li, S. Yang, Y. Sun, Q. Sun, W. Wang, L. Lu, K. Zhang, J. Xu, W. Zheng, Z. Hu, Y. Yang, Y. Gao, Z. Liu, 2020, A review on pollution situation and treatment methods of tetracycline in groundwater,” *Separation Science and Technology*, 55(5), pp. 1005–1021.
- [215] J. Zambrano, P. A. García-Encina, J. J. Jiménez, R. López-Serna, and R. Irusta-Mata, 2022, Photolytic and photocatalytic removal of a mixture of four veterinary antibiotics, *Journal of Water Process Engineering*, 48, pp. 102841.
- [216] G. Blandino, I. Milazzo, and D. Fazio, 2008, Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy,” *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20(4), pp. 199–203.
- [217] J. P. White and C. R. Cantor, 1971, Role of magnesium in the binding of

- tetracycline to *Escherichia coli* ribosomes, *Journal of Molecular Biology*, 58(1), pp. 397–400.
- [218] F. Yuan, C. Hu, X. Hu, D. Wei, Y. Chen, and J. Qu, 2011, Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process, *Journal of Hazardous Materials*, 185(2–3), pp. 1256–1263.
- [219] G. H. Lu, Y. H. Zhao, S. G. Yang, and X. J. Cheng, 2002, Quantitative structure-biodegradability relationships of substituted benzenes and their biodegradability in river water, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(1), pp. 111–116.
- [220] C. Munien, E. Kweinor Tetteh, T. Govender, S. Jairajh, L. L. Mguni, and S. Rathilal, 2023, Turbidity and COD removal from municipal wastewater using a TiO₂ photocatalyst—A comparative study of UV and visible light, *Applied Sciences*, 13(8), pp. 4766.
- [221] S. Heydari Orojloo, S. Rastegarzadeh, and B. Zargar, 2022, Experimental and modeling analyses of COD removal from industrial wastewater using the TiO₂–chitosan nanocomposites, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–15.
- [222] T. Threrujirapapong, W. Khanitchaidecha, and A. Nakaruk, 2017, Treatment of high organic carbon industrial wastewater using photocatalysis process, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 8, pp. 163–168.
- [223] D. Zhang, S. Lv, and Z. Luo, A study on the photocatalytic degradation performance of a [KNbO₃] 0.9 -[BaNi 0.5Nb0.5O₃–δ] 0.1 perovskite, *RSC Advances*, 10(3), pp. 1275–1280.
- [224] E. A. Amaya, D. A. Davis, and D. B. Rouse, 2007, Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions, *Aquaculture*, 262(2–4), pp. 393–401.
- [225] E. Pellzzetti, V. Maurino, C. Minero, V. Carlin, M. L. Tosato, E. Pramauro, O. Zerbinata, 1990, Photocatalytic degradation of atrazine and other s-Triazine herbicides, *Environmental Science and Technology*, 24(10), pp. 1559–1565.
- [226] G. K. C. Low, S. R. McEvoy, and R. W. Matthews, 1991, Formation of nitrate and ammonium ions in titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of organic compounds containing nitrogen atoms, *Environmental Science and Technology*, 25(3), pp. 460–467.
- [227] Z. Z. Loh, N. S. Zaidi, A. Syafiuddin, E. L. Yong, M. B. Bahrodin, A. Aris, R. Boopathy, 2023, Current status and future prospects of simultaneous nitrification and denitrification in wastewater treatment: A bibliometric review, *Bioresource Technology Reports*, 23, pp. 101505.
- [228] A. Rajta, R. Bhatia, H. Setia, and P. Pathania, 2020, Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater, *Blackwell Publishing Ltd*, 128(5), pp. 1261–1278.
- [229] A. Rajta, R. Bhatia, H. Setia, and P. Pathania, 2020, Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater, *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), pp. 1261–1278.
- [230] T. Khin and A. P. Annachhatre, 2004, Novel microbial nitrogen removal processes, *Biotechnology Advances*, 22(7), pp. 519–532.
- [231] B. Ji, K. Yang, L. Zhu, Y. Jiang, H. Wang, J. Zhou, H. Zhang, 2015, Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Korean Society for Biotechnology

- and Bioengineering, 20(4), pp. 643–651.
- [232] S. A. Kivanç, M. Takim, M. Kivanç, and G. Güllülü, 2014, *Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens, *African health sciences*, 14(2), pp. 364–371.
 - [233] D. R. H. Graf, C. M. Jones, and S. Hallin, 2014, Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions, *PLOS ONE*, 9(12), pp. e114118.
 - [234] P. Lycus, M. J. Soriano-Laguna, M. Kjos, D. J. Richardson, A. J. Gates, D. A. Milligan, A. Frostegard, L. Bergaust, L. R. Bakken, 2018, A bet-hedging strategy for denitrifying bacteria curtails their release of N₂O, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), pp. 11820–11825.
 - [235] B. Zhao, D. Y. Cheng, P. Tan, Q. An, and J. S. Guo, 2018, Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal, *Bioresource technology*, 250, pp. 564–573.
 - [236] L. Zhu, W. Ding, L. Juan Feng, Y. Kong, J. Xu, and X. Yang Xu, 2012, Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem, *Bioresource technology*, 108, pp. 1–7.
 - [237] R. Srinivasan, U. Karaoz, M. Volegova, J. MacKichan, M. Kato-Maeda, S. Miller, R. Nadarajan, E. L. Brodie, S. V. Lynch, 2015, Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens,” *PLOS ONE*, 10(2), pp. e0117617.
 - [238] J. M. Janda and S. L. Abbott, 2007, 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls,” *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), pp. 2761.
 - [239] T. X. He and Z. L. Li, 2015, Identification and denitrification characterization of a novel hypothermia and aerobic nitrite-denitrifying bacterium, *Arthrobacter arilaitensis* strain Y-10, *New pub: Balaban*, 57(41), pp. 19181–19189.
 - [240] Y. zhen PENG, Y. MA, and S. ying WANG, 2007, Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process, *Journal of Environmental Sciences*, 19(3), pp. 284–289.
 - [241] I. S. Thakur and K. Medhi, 2019, Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities, *Bioresource technology*, 282, pp. 502–513.
 - [242] K. U. Mahto, Vandana, M. Priyadarshane, D. P. Samantaray, and S. Das, 2022, Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability, *Journal of Cleaner Production*, 379, pp. 134759.
 - [243] W. Yin, Y. Wang, L. Liu, and J. He, 2019, Biofilms: The microbial ‘protective clothing’ in extreme environments, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), pp. 3423.
 - [244] A. Dzionek, D. Wojcieszynska, K. Hupert-Kocurek, M. Adamczyk-Habrajska, and U. Guzik, 2018, Immobilization of *Planococcus* sp. S5 strain on the loofah

- sponge and its application in naproxen removal, *Catalysts*, 8(5), pp. 176.
- [245] M. U. Mustapha, N. Halimoon, W. L. W. Johari, and M. Y. A. Shukor, 2020, Enhanced carbofuran degradation using immobilized and free cells of *Enterobacter* sp. isolated from soil, *Molecules*, 25(12), pp. 2771.
- [246] P. Kunapongkiti, C. Rongsayamanont, P. Nayramitsattha, and T. Limpiyakorn, 2020, Application of cell immobilization technology to promote nitrification: A review, *Environmental Engineering Research*, 25(6), pp. 807–818.
- [247] R. Zhao, Z. Cui, B. Pan, Y. Li, Y. Chen, J. Qu, P. Jin, Z. Zheng, 2020, Enhanced stability and nitrogen removal efficiency of: *Klebsiella* sp. entrapped in chitosan beads applied in the domestic sewage system, *RSC Advances*, 10(67), pp. 41078–41087.
- [248] H.-R. Kariminiaae-Hamedani, K. Kanda, and F. Kato, 2003, Wastewater treatment with bacteria immobilized onto a ceramic carrier in an aerated system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(2), pp. 128–132.
- [249] S. Han, E. K. Choi, W. Park, C. Yi, and N. Chung, 2019, Effectiveness of expanded clay as a bacteria carrier for self-healing concrete, *Applied Biological Chemistry*, 62(1), pp. 1–5.
- [250] I. A. Purwasena, D. I. Astuti, T. Intan, D. Lani, and W. N. Rodiana, 2019, Effects of nutrient composition on the formation of biofilm and biocorrosion in MEOR biostimulation medium based on response surface methodology, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 299(1), pp. 012015.
- [251] S. J. Salgar-Chaparro, K. Lepkova, T. Pojtanabuntoeng, A. Darwin, and L. L. Machuca, 2020, Nutrient level determines biofilm characteristics and subsequent impact on microbial corrosion and biocide effectiveness,” *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), pp. e02885-19.
- [252] Z. Zheng, W. Li, X. Huang, and W. Qin, 2017, Effect of trace elements and optimization of their composition for the nitrification of a heterotrophic nitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T, at low temperature, *Annals of Microbiology*, 67(11), pp. 715–725.
- [253] Y. Yan, D. Fu, and J. Shi, 2019, Screening and immobilizing the denitrifying microbes in sediment for bioremediation, *Water*, 11(3), pp. 614.
- [254] Y. Chen, S. Lan, L. Wang, S. Dong, H. Zhou, Z. Tan, Xu. Li, 2017, A review: Driving factors and regulation strategies of microbial community structure and dynamics in wastewater treatment systems,” *Chemosphere*, 174, pp. 173–182.
- [255] Y. Cao, C. Zhang, H. Rong, G. Zheng, and L. Zhao, 2017, The effect of dissolved oxygen concentration (DO) on oxygen diffusion and bacterial community structure in moving bed sequencing batch reactor (MBSBR),” *Water research*, 108, pp. 86–94.
- [256] I. B. Paśmionka, Karol Bulski, P. Herbut, E. Boligłowa, F. M. C. Vieira, G. Bonassa, M. Bortoli, M. C. de Pra, 2021, Toxic effect of ammonium nitrogen on the nitrification process and acclimatisation of nitrifying bacteria to high concentrations of $\text{NH}_4\text{-N}$ in wastewater, *Energies*, 14(17), pp. 5329.
- [257] H. Ozaki, S. Kurinobu, T. Watanabe, S. Nishijima, and T. Sumino, 2004, A new wastewater treatment system recovering magnetically immobilized microorganisms under strong magnetic field, *Water Supply*, 4(1), pp. 47–54.
- [258] S. He, L. Zhong, J. Duan, Y. Feng, B. Yang, and L. Yang, 2017, Bioremediation of wastewater by iron oxide-biochar nanocomposites loaded

- with photosynthetic bacteria, *Frontiers in Microbiology*, 0(MAY), pp. 823.
- [259] S. M. Siddeeg, M. A. Tahoon, and F. Ben Rebah, 2019, Simultaneous removal of calconcarboxylic acid, NH_4^+ and PO_4^{3-} from pharmaceutical effluent using iron oxide-biochar nanocomposite loaded with *Pseudomonas putida*, *Processes*, 7(11), pp. 800.
- [260] Y. Wang, X. Gu, J. Quan, G. Xing, L. Yang, C. Zhao, P. Wu, F. Zhao, B. Hu, Y. Hu, 2021, Application of magnetic fields to wastewater treatment and its mechanisms: A review, *Science of The Total Environment*, 773, pp. 145476.
- [261] T. Liu, G. Jia, J. Xu, X. He, and X. Quan, 2020, Simultaneous nitrification and denitrification in continuous flow MBBR with novel surface-modified carriers, *Environmental Technology*, 42(23), pp. 3607–3617.
- [262] A. Ciji and M. S. Akhtar, 2020, Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: a review, *Reviews in Aquaculture*, 12(2), pp. 878–908.
- [263] M. Ozdal and S. Gurkok, 2022, Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent, *ADMET & DMPK*, 10(2), pp. 115.
- [264] A. Guarnieri, M. Triunfo, C. Scieuzo, D. Ianniciello, E. Tafi, T. Hahn, S. Zibek, R. Salvia, A. D. Bonis, P. Falabella, 2022, Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–12.
- [265] D. Sharma, L. Misba, and A. U. Khan, 2019, Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities,” *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), pp. 1–10.
- [266] A. K. Yadav, A. Espallat, and F. Cava, 2018, Bacterial strategies to preserve cell wall integrity against environmental threats, *Frontiers in Microbiology*, 9 (AUG), pp. 2064.
- [267] P. Puvanasundram, C. M. Chong, S. Sabri, M. S. Yusoff, and M. Karim, 2021, Multi-strain probiotics: Functions, effectiveness and formulations for aquaculture applications,” *Aquaculture Reports*, 21, pp. 100905.
- [268] L. Zhang, Y. Zhang, K. Xiao, J. Shi, X. Du, L. Wang, X. Wu, 2021, The intimate coupling of photocatalysis and biodegradation for the degradation and mineralization of atrazine in water, *New Journal of Chemistry*, 45(29), pp. 13029–13039.