



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

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

(11) 
2-0002236

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00172

(22) 18.05.2016

(45) 27.01.2020 382

(43) 27.11.2017 356

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

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

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

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP DÙNG ĐỂ
XỬ LÝ SULFUA VÀ HỢP CHẤT HỮU CƠ TRONG ĐÁY AO NUÔI TRỒNG
THỦY SẢN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp chứa các chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* QN_{71} , *Rhodobacter sphaeroides* QN_{52} và *Rhodovulum sulfidophilum* TH_{21} để xử lý sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản gồm các bước sau:

Bước 1: Nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10 ml

Bước 2: Nhân giống trong lọ thủy tinh 50 ml

Bước 3: Nhân giống trong bình nhựa trong 5 (lít)

Bước 4: Nhân giống sang bình có thể tích lớn 10, 20, 50, 100 (lít) để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp chứa các chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* QN_{71} , *Rhodobacter sphaeroides* QN_{52} và *Rhodovulum sulfidophilum* TH_{21} để xử lý sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường bằng công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp dùng để xử lý sulfua và hợp chất hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nuôi trồng thủy sản ven biển đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển kinh tế của nhiều quốc gia trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Ngay từ những năm 90 của thế kỷ 20, tầm quan trọng của nuôi trồng thủy sản đã được nhà nước ta xác định và coi đó là ngành kinh tế mũi nhọn và là ngành xuất khẩu chủ lực. Tuy nhiên, sự phát triển nuôi trồng không gắn liền với quy hoạch đã làm phát sinh nhiều vấn đề môi trường đáng lo ngại. Hiện nay, nuôi trồng thủy sản chủ yếu là theo quy mô công nghiệp, nuôi thả với mật độ cao, sử dụng các hoá chất diệt khuẩn, sử dụng thức ăn công nghiệp, hiệu suất chuyển hóa thức ăn kém. Theo tính toán, chỉ có 20-30% lượng nitơ cung cấp từ thức ăn được chuyển thành sinh khối tôm, trong khi phần còn lại tích tụ ở đáy ao nuôi (Kutako *et al.*, 2009), lượng thức ăn dư thừa và chất thải vật nuôi ở đáy ao được chuyển hóa bởi các vi khuẩn kỵ khí tạo ra amoniac và hydro sulfua (H_2S). Cả hai hợp chất này rất độc hại cho tôm, cá đặc biệt là hydro sulfua (Rao *et al.*, 2000 và Antony và Philip, 2006). Vì vậy, tiêu chuẩn nước được sử dụng để nuôi trồng thủy sản, hàm lượng sulfua không được vượt quá 0,005mg/l (Boyd, 1998). Chỉ cần một lượng sulfua rất nhỏ (0,001 ppm) nhưng hiện diện trong một thời gian liên tục đã làm giảm sự sinh sản của tôm và cá, nồng độ 1,3 ppm sulfua trong nước có thể gây sốc, tê liệt và thậm chí gây chết tôm (Bagarinao, 1992). Như vậy, với sự hiện diện của sulfua vượt ngưỡng tiêu chuẩn cho phép mà không được xử lý sẽ gây hại cho thủy sinh vật, kìm hãm sự phát triển của sinh vật phù du, gây ô nhiễm môi trường nước, tạo điều kiện cho dịch bệnh lây lan, làm cho vật nuôi chết hàng loạt dẫn đến giảm năng suất và mất mùa (Nguyễn Văn Hảo và cs, 2004; Arulampalam *et al.*, 1998; Logan Walter *et al.*, 1998). Điều này có nghĩa rằng, môi trường cần phải được kiểm soát ở mức độ an toàn cho tôm, cá tăng trưởng. Trong số các vi khuẩn liên quan với các chu trình như cacbon, nitơ và chu trình lưu huỳnh, thì vi khuẩn tía quang hợp là nhóm hữu ích nhất để cải thiện chất lượng nước nuôi trồng thủy sản đặc biệt là ao nuôi tôm (Antony và Philip, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Nhóm này có khả năng sinh trưởng quang dị dưỡng và quang tự dưỡng, chúng có khả năng sử dụng đa dạng nguồn cacbon trong điều kiện

tối và có ánh sáng, trong nhóm này nhiều loài có khả năng loại bỏ sulfua (Antony và Philip, 2006; Kornochalart *et al.*, 2014). Vi khuẩn tía quang hợp cũng được coi là vi khuẩn có lợi vì tế bào của chúng có chứa hàm lượng protein cao, các axit amin thiết yếu và chứa một hàm lượng cao vitamin B12, ubiquinon và carotenoit (Shapawi *et al.*, 2012; Kornochalart *et al.*, 2014). Vì vậy, vi khuẩn tía quang hợp có một tiềm năng rất lớn để sử dụng như chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản (Shapawi *et al.*, 2012). Ứng dụng nhóm vi khuẩn tía quang hợp để loại bỏ được sulfua và hữu cơ trong trầm tích các đáy ao nuôi thủy sản là giải pháp hữu hiệu nhất vì đây là nhóm thân thiện với môi trường và cũng là nhóm chiếm ưu thế khi tác giả Mukkata và cộng sự (2015) đã công bố về đa dạng vi sinh vật trong 16 ao nuôi tôm tại Thái Lan (Mukkata *et al.*, 2015).

Hiện nay, có hơn 100 chế phẩm probiotic của nước ngoài đóng gói tại Việt Nam đang có mặt trên thị trường nước ta (Võ Thị Hạnh và cs., 2004). Giá bán các loại chế phẩm này khá cao nên đã gây khó khăn cho người nuôi trồng thủy sản trong việc lựa chọn một sản phẩm vừa đạt chất lượng vừa có giá thành rẻ (Võ Thị Hạnh và cs., 2004).

Các chế phẩm sinh học sản xuất trong nước có giá bán rẻ hơn nhưng chưa được người nuôi trồng thủy sản sử dụng rộng rãi vì số lượng và chủng loại vi sinh vật trong chế phẩm này không cao. Do nhu cầu của các doanh nghiệp nuôi trồng thủy sản một số chế phẩm đã bước đầu đáp ứng được yêu cầu làm sạch môi trường nuôi như: chế phẩm VEM (Võ Thị Hạnh và cs., 2004), chế phẩm BioII (Lê Tấn Hưng và cs., 2003) chế phẩm BIOCHIE (Võ Thị Thứ và cs., 2004) v.v. trên thị trường có một số chế phẩm vi sinh xử lý đáy ao nuôi trồng thủy sản như PRO-BEST – (công ty cổ phần thủy sản Bình Minh – thành phố Hồ Chí Minh), CTA – serri (công ty Biển Cờ), SUPERKING (Trung Quốc), BACTA (Thailand), EM (Nhật Bản) v.v. đã có chứa nhóm vi khuẩn tía quang hợp. Thực tế cho thấy, trong các chế phẩm chứa vi khuẩn tía quang hợp bổ sung vào ao nuôi, mật độ cũng như chất lượng nhóm vi khuẩn tía quang hợp không đáp ứng được như cầu xử lý sulfua và hữu cơ trong các đáy ao nuôi trồng thủy sản. Vì vậy, vẫn còn hiện tượng mất mùa hoặc giảm năng suất vật nuôi khi môi trường nuôi không được đảm bảo, ảnh hưởng rất lớn đến kinh tế. Do vậy, rất cần chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp được sản xuất tại Việt Nam nhằm đáp ứng khả năng làm sạch sulfua và hữu cơ kiểm soát được chất lượng môi trường nuôi tốt không ảnh hưởng đến tăng trưởng cũng như chất lượng vật nuôi.

Ở nước ta, VKQHT đã bắt đầu được chú trọng gần đây trong các nghiên cứu phân loại (Đỗ Thị Tổ Uyên và cs, 1997; Trần Văn Nhị và cs, 1999; Vũ Thị Minh Đức và cs, 2000). Tại phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học,

nhóm vi khuẩn này đã và đang được chú trọng tìm kiếm, thu nhận để ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau như xử lý nước thải đậm đặc hữu cơ (Đỗ Thị Tố Uyên và cs., 1997; 2003; Trần Văn Nhị và cs., 1999), phân hủy các hydrocacbon mạch vòng (Đinh Thị Thu Hằng và cs., 2003), thu nhận các hoạt chất sinh học có giá trị (Đỗ Thị Tố Uyên và cs., 2005), sử dụng như một nguồn thức ăn tươi sống trong nuôi trồng thủy sản (Hoàng Thị Yến và cs., 2006).

Để ứng dụng vi khuẩn tía quang hợp trong xử lý đáy ao nuôi trồng thủy sản, nhóm tác giả Võ Thị Hạnh và cộng sự (2004) đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm VEM dựa vào quy trình sản xuất chế phẩm dạng EM của Nhật. Chế phẩm này ngoài chủng loại và số lượng vi sinh vật có trong chế phẩm EM còn có thêm các loài vi khuẩn *Bacillus* spp. và vi khuẩn tía quang hợp (*Rhodobacter* và *Rhodococcus* có nguồn gốc từ Trung Quốc) (Võ Thị Hạnh và cs., 2004). Lê Thị Thúy Ái và cộng sự (2004) đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh từ nhiều thủy vực khác nhau có khả năng chuyển hóa amoni, sulfua và thủy phân hữu cơ để sử dụng trong quá trình xử lý nước thải chế biến hải sản. Kết quả, từng chủng vi khuẩn hoặc hỗn hợp các chủng vi khuẩn này có thể loại bỏ được sulfua, COD, BOD₅ đến xấp xỉ nước thải loại B, amoni được loại bỏ gần như hoàn toàn (<http://tintuc.xalo.vn>). Tuy nhiên, cho đến nay, ở Việt Nam chưa có công bố nào về quy trình tạo chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp với chức năng xử lý sulfua và hữu cơ.

Do vậy, chúng tôi đã nghiên cứu và tạo ra chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp gồm 03 chủng *Rhodobacter sphaeroides* QN₇₁, *Rhodobacter sphaeroides* QN₅₂ và *Rhodovulum sulfidophilum* TH₂₁ có hoạt tính loại bỏ sulfua cao nhất và đã được nghiên cứu kỹ các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và vị trí phân loại. Ba chủng này được lựa chọn trong tập đoàn chủng giống của phòng Công nghệ sinh học môi trường - Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp có chức năng xử lý sulfua và hợp chất hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là khắc phục hạn chế của các chế phẩm trong nước và nhập ngoại để xử lý sulfua và hữu cơ. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp phân lập tại Việt Nam với khả năng loại bỏ sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản. Quy trình theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

Bước 1: Nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10 ml

Bước 2: Nhân giống trong lọ thủy tinh 500 ml

Bước 3: Nhân giống trong bình nhựa trong 5 (lít); và

Bước 4: Nhân giống sang bình có thể tích lớn 10, 20, 50, 100 (lít) để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig. 1 thể hiện quy trình tạo chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

Fig. 2 thể hiện hình dạng khuẩn lạc, hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử của chủng *Rhodobacter sphaeroides* QN₇₁, *Rhodobacter sphaeroides* QN₅₂, *Rhodovulum sulfidophilum* TH₂₁ để tạo chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

Fig. 3 thể hiện khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sulfua

Fig. 4 thể hiện vị trí phân loại của ba chủng lựa chọn để tạo chế phẩm

Fig. 5 thể hiện 3 chủng VKT lựa chọn không đối kháng nhau

Fig. 6 hình ảnh chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp để xử lý sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản như được thể hiện trên Fig.1 và trình bày một cách chi tiết dưới đây:

Bước 1: Nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10 ml

Ba chủng vi khuẩn tía quang hợp được lựa chọn để tạo chế phẩm sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích là các chủng QN₇₁, QN₅₂ và chủng TH₂₁. Các chủng này được phân lập và tuyển chọn có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sulfua cao nhất trong bộ sưu tập giống tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hai chủng QN₇₁ và QN₅₂ được phân lập từ các mẫu bùn đáy các ao nuôi trồng thủy sản tại Quảng Ninh, Chủng TH₂₁ được phân lập từ các mẫu bùn đáy các ao nuôi trồng thủy sản tại Thanh Hóa. Khuẩn lạc của ba chủng lựa chọn có màu nâu vàng hoặc nâu đỏ, tế bào có dạng hình cầu hoặc elip với kích thước khác nhau được mô tả ở Fig. 2, sinh sản theo kiểu phân đôi. Cả ba chủng vi khuẩn này đều là vi khuẩn Gram (-), thuộc họ vi khuẩn tía không lưu huỳnh. Khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sulfua được mô tả ở Fig. 3. Khả năng sinh trưởng được thể hiện bằng độ hấp phụ của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 800 nm (OD₈₀₀), hoạt tính loại bỏ sulfua được thể hiện bằng lượng sulfua còn lại trong môi trường nuôi, hàm lượng sulfua được xác định bằng phương pháp so màu với thuốc thử dimetyl-p-phenylenediamin.

Ba chủng vi khuẩn lựa chọn đều chứa sắc tố quang hợp là bacteriochlorophyll a và carotenoid họ *Sphaeroidene*. Chúng đều tổng hợp được sắc tố ở điều kiện kỵ khí,

sáng và hoạt tính này bị ức chế khi sinh trưởng trong tối. Cả ba chủng lựa chọn đều có khả năng sử dụng được nguồn cơ chất như là axetat, succinat, glucoza, sacaroza, rỉ đường và bột đậu tương trong đó axetat, succinat và bột đậu tương là nguồn chúng có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính loại bỏ sulfua cao nhất khi nuôi trong nguồn C được thay thế bằng cơ chất trên với hàm lượng 1 g/l, sulfua được bổ sung với hàm lượng ban đầu là $10 \text{ mgS}^{2-}/\text{l}$. môi trường DSMZ 27 bao gồm các thành phần sau: cao nấm men (0,3 g/l), succinat - Na (1 g/l), axetat (0,5 g/l), K_2HPO_4 (1g/l), KH_2PO_4 (0,5 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/l), NH_4Cl (0,4 g/l), vi lượng $\text{SL}_6^{(*)}$ (1 ml/l), dung dịch vitamin $\text{B}_{12}^{(**)}$ (0,4 ml/l), Nước cất (1000 ml), pH (6,8). “Dung dịch vi lượng SL_6 (mg/l): HCl (25%) 6,5 ml; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g; H_3BO_3 0,3 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 24 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg, H_2O 993 ml. Dung dịch vitamin B12: 10 mg trong 100 ml nước được khử trùng bằng màng lọc”

Kết quả xác định mức độ tích lũy sinh khối (theo ΔOD_{800}) và hàm lượng sulfua còn lại trong môi trường nuôi của 3 chủng lựa chọn sau 5 ngày được trình bày dưới đây: (Bảng 1)

Bảng 1. Mức độ tích lũy sinh khối (ΔOD_{800}) và hàm lượng sulfua còn lại các chủng lựa chọn trên các môi trường chứa nguồn cơ chất khác nhau

Nguồn cơ chất	QN ₇₁		QN ₅₂		TH ₂₁	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)
Axetat	1,25±0,05	0,00±0,00	1,20±0,08	0,00±0,00	1,40±0,07	0,00±0,00
Succinat	1,37±0,06	0,00±0,00	1,35±0,05	0,00±0,00	1,63±0,05	0,00±0,00
Glucoz	0,80±0,02	2,67±0,22	0,77±0,03	3,00±0,4	0,87±0,03	2,34±0,20
Saccharoz	0,50±0,02	4,40±0,15	0,40±0,05	4,82±0,26	0,68±0,02	3,77±0,19
Rỉ đường	0,55±0,02	4,13±0,17	0,39±0,02	4,75±0,19	0,70±0,05	3,55±0,23
Bột đậu	1,28±0,04	0,00±0,00	1,23±0,07	0,00±0,00	1,44±0,08	0,00±0,00

tương						
ĐC	0,10±0,03	8,90±0,02	0,15±0,01	8,90±0,03	0,17±0,02	8,90±0,03

(ĐC: Đối chứng)

Như vậy, trong giải pháp hữu ích chúng tôi có thể sử dụng nguồn cơ chất axetat, succinat và bột đậu tương cho nhân nuôi và sản xuất sinh khối tạo chế phẩm. Cả ba chủng lựa chọn có khả năng sinh trưởng và sử dụng sulfua đến 20 mgS²⁻/l. Kết quả thử nghiệm trong giải pháp hữu ích khi nuôi chúng trong môi trường DSMZ-27 dịch thể, bổ sung sulfua với các nồng độ khác nhau từ 0-20 mgS²⁻/l được thể hiện như sau: (Bảng 2)

Bảng 2. Khả năng tích lũy sinh khối (ΔOD_{800}) và hoạt tính loại bỏ sulfua của các chủng chọn lựa tạo chế phẩm

Hàm lượng sulfua ban đầu (mgS ²⁻ /l)	Ký hiệu chủng					
	QN ₅₂		QN ₇₁		TH ₂₁	
	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)	ΔOD_{800}	Hàm lượng sulfua còn lại (mgS ²⁻ /l)
0	1,32±0,05	0,0±0,00	0,08±0,02	0,0±0,00	1,62±0,03	0,0±0,00
2,5	1,40±0,04	0,0±0,00	0,84±0,01	0,0±0,00	1,59±0,01	0,0±0,00
5,0	1,52±0,08	0,0±0,00	1,50±0,2	0,0±0,00	1,58±0,03	0,0±0,00
10	1,20±0,07	0,5±0,04	1,15±0,14	0,0±0,00	1,57±0,02	0,0±0,00
15	0,99±0,09	4,5±0,1	1,07±0,16	4,76±0,25	1,55±0,05	0,64±0,03
20	0,80±0,05	11,4±0,3	0,76±0,2	14,5±0,34	1,50±0,08	2,5±0,2
Đối chứng	0,12±0,01	8,88±0,01	0,10±0,01	8,50±0,02	0,2±0,01	8,65±0,05

Cả ba chủng QN₇₁, QN₅₂ và chủng TH₂₁ có khả năng sinh trưởng và hoạt tính loại bỏ sulfua tối ưu ở độ muối 0- 3%, pH 5,5-7,5, nhiệt độ 26 – 28 °C, cường độ chiếu sáng thích hợp 3600 - 6000 lux.

Dựa vào các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, các đặc điểm về sinh lý, sinh hóa và dựa vào phân tích trình tự đoạn gen 16S rRNA chúng tôi đã định tên như sau: *Rhodobacter sphaeroides* QN₇₁, *Rhodobacter sphaeroides* QN₅₂ và *Rhodovulum sulfidophilum* TH₂₁. Vị trí phân loại của ba chủng được thể hiện ở Fig. 4.

Ba chủng vi khuẩn tía quang hợp từ các ống thạch nghiêng giữ giống được nhân nuôi riêng trong các bình hình trụ có thể tích 10ml chứa môi trường DSMZ 27 dạng lỏng, ủ ở điều kiện kỵ khí chiếu sáng trong phòng thử nghiệm, sau khoảng 3- 5 ngày, mật độ tế bào sẽ đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml (có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3)

Bước 2: Nhân giống trong lọ thủy tinh 500 ml bằng trộn ba chủng vi khuẩn lựa chọn với tỷ lệ 1:1:1 tạo thành hỗn hợp ba chủng (ba chủng thu được 90 ml giống hỗn hợp), hỗn hợp này được nhân sang 2 bình 500 ml với tỷ lệ giống 10% bằng cách mỗi bình chứa 405 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể với 45 ml thể tích giống, ủ ở điều kiện chiếu sáng đèn sợi đốt trong phòng thử nghiệm, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày kiểm tra OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 có thể sử dụng làm nguồn giống cấp 1 để nhân sang các bình 5 lít; Cả ba chủng lựa chọn không đối kháng nhau kết quả được thể hiện ở Fig. 5.

Bước 3: Nhân giống trong bình nhựa trong 5 lít bằng cách sử dụng giống từ các bình giống 500 ml nhân sang bình nhựa trong có thể tích 5 lít với tỷ lệ 10% giống, cụ thể như sau: chuẩn bị 4550 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể bổ sung thêm 4,5 g bột đậu tương, sau đó bổ sung với 450 ml hỗn hợp giống, đặt dưới ánh sáng mặt trời, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 sử dụng làm nguồn giống để nhân sang các bình có thể tích lớn hơn như 10, 20, 50, 100 lít; và

Bước 4: Nhân giống sang bình có thể tích lớn 10, 20, 50, 100 (lít) để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp bằng cách nhân từ các bình 5 lít với tỷ lệ giống 10%, sử dụng môi trường DSMZ 27 dịch thể bổ sung thêm 1g/l bột đậu tương, đặt dưới điều kiện tự nhiên dưới ánh sáng mặt trời, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

Kiểm định chế phẩm:

Chế phẩm tạo thành được đóng chai nhựa trong PET 5 lít, chế phẩm được sử dụng bằng cách phân phối đều trong các ao nuôi trồng thủy sản với liều lượng 10 lít/ 1000 m², chế phẩm được bổ sung hai tuần/lần. Chế phẩm được sử dụng trong vòng 6 tháng. Kiểm tra mật độ tế bào của chế phẩm bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa petri (CFU/ml). Mật độ được xác định theo phương pháp pha loãng như sau: mẫu được pha loãng liên tục bằng nước cất vô trùng từ 10^1 đến 10^{10} . Dùng pipet vô trùng lấy 50 µl dung dịch ở các nồng độ thích hợp nhỏ lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường DSMZ 27. Dùng que gạt vô trùng dàn đều dịch đó trên mặt thạch. Đặt các đĩa thạch chứa mẫu vi khuẩn tía quang hợp trong điều kiện khí quyển nitơ, dưới ánh sáng đèn sợi đốt 60w, tiến hành đếm số khuẩn lạc sau 5 -7 ngày.

Số lượng khuẩn lạc (CFU) xuất hiện trên đĩa được đếm và tính theo công thức:

$$\text{CFU/ml} = a \times 1/v \times n$$

Trong đó: n là độ pha loãng mẫu, a là số khuẩn lạc đếm được trên bề mặt đĩa thạch, v là thể tích mẫu được cấy, 1/v thể tích mẫu quy về 1 ml.

Chế phẩm được đưa vào môi trường DSMZ 27 (1:10) và bổ sung 10mg S²⁻/l, kiểm tra hoạt tính loại bỏ sulfua trong môi trường của chế phẩm

Cách thức sử dụng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

Cơ chế xử lý sulfua và hữu cơ của chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp theo giải pháp hữu ích này được thể hiện như sau: khi bổ sung chế phẩm vào ao nuôi trồng thủy sản vi khuẩn tía quang hợp sẽ lắng xuống đáy ao. Nhóm vi khuẩn này sinh trưởng quang dị dưỡng sử dụng các nguồn hữu cơ từ chất thải của vật nuôi và từ nguồn thức ăn dư thừa tồn tại dưới đáy ao làm nguồn cacbon và sử dụng sulfua làm chất cho điện tử trong quá trình quang hợp. Cần phải bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp trong suốt quá trình nuôi tương ứng với chất thải và thức ăn dư thừa ngày càng tích tụ nhiều, gia tăng theo thời gian và sự sinh trưởng của vật nuôi. Chế phẩm được bổ sung hai tuần /lần với liều lượng 10 lít/1000m³ ao nuôi tôm hoặc cá cho đến hết vụ nuôi. Trong quá trình nuôi và bổ sung chế phẩm cần theo dõi các chỉ số như BOD₃, hàm lượng sulfua trong ao nuôi và trong bùn đáy ao, hàm lượng NH₄, NO₂... để theo dõi có thể bổ sung thêm chế phẩm nếu mật độ nuôi cao.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất 100 lít chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

Ba chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* QN₇₁, *Rhodobacter sphaeroides* QN₅₂ và *Rhodovulum sulfidophilum* TH₂₁ từ các ống thạch nghiêng giữ giống được nhân nuôi riêng trong các bình hình trụ có thể tích 10ml chứa môi trường DSMZ 27 dạng lỏng, (mỗi chủng cấy 3 bình hình trụ chứa 10ml môi trường DSMZ 27) ủ ở điều kiện kỵ khí dưới ánh sáng đèn sợi đốt trong phòng thử nghiệm, sau khoảng 3- 5 ngày, chúng tôi xác định OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 (tương đương với mật độ tế bào sẽ đạt khoảng 10⁸- 10⁹CFU/ml).

Sau đó chúng tôi đã trộn ba chủng tạo chế phẩm với tỷ lệ như nhau (1:1:1) thu được 90 ml hỗn hợp ba chủng. Tiếp tục nhân nuôi hỗn hợp giống 90 ml sang 2 bình có thể tích 500ml, mỗi bình chứa 405 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể với 45 ml thể tích giống, ủ ở điều kiện chiếu sáng đèn sợi đốt trong phòng thử nghiệm. Sau 5-7 ngày kiểm tra OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 có thể sử dụng làm nguồn giống cấp 1.

Nhân nuôi giống từ hai bình thể tích 500 ml sang 2 bình nhựa trong có thể tích 5l chứa 4550 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể có bổ sung 4,5g bột đậu tương và 450

ml hỗn hợp giống và đặt dưới ánh sáng mặt trời. Sau 5-7 ngày kiểm tra OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 có thể nhân giống sang bể kính có thể tích 150 (lít) chứa 90 lít môi trường DSMZ 27 dịch thể bổ sung 90 g bột đậu tương với 10 lít hỗn hợp giống. Sau 5-7 ngày kiểm tra OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 có thể thu sản phẩm được coi là chế phẩm dạng dịch vi khuẩn tía quang hợp. Để tiện cho vận chuyển chúng tôi đóng chế phẩm vào chai nhựa trong PET 5 lít. Chế phẩm được sử dụng trong vòng 6 tháng. Kiểm tra mật độ tế bào của chế phẩm bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa petri (CFU/ml)

Ví dụ 2: Thử nghiệm chế phẩm dung dịch đối với nước nuôi cá rô phi ở quy mô pilot

Chúng tôi đã tiến hành thực hiện giải pháp hữu ích tại ao nuôi ở qui mô pilot nuôi cá rô phi và cho ăn thức ăn công nghiệp dạng viên nổi, chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp được bổ sung 2 tuần/lần, các chỉ số gây độc trong nước được theo dõi 2 tuần/lần. Kết quả cho thấy: sau 1, 2 tháng nuôi cá rô phi chưa có sự khác biệt về các chỉ số như NH₄⁺, NO₂⁻, trong nước và H₂S trong bùn giữa hai bể đối chứng và bể thử nghiệm. Nhưng sau 3 - 4 tháng, kích thước và trọng lượng cá bắt đầu gia tăng mạnh, các chỉ số môi trường nước nuôi giữa hai bể có sự khác nhau rõ rệt. Kết quả được trình thể hiện như sau: (Bảng 3)

Bảng 3. Hàm lượng amoni, nitrit trong nước và hàm lượng H₂S trong bùn đáy ao trong các bể nuôi cá rô phi sau 4 tháng thử nghiệm

Mẫu	1 tháng (mg/l, mg/gbùn)			3 tháng (mg/l, mg/gbùn)			4 tháng (mg/l, mg/gbùn)		
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	H ₂ S	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	H ₂ S	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	H ₂ S
Bể TN	0±0,0	0±0,0	0,20±0,03	0±0,00	0±0,0	2,05±0,1	0,5±0,1	0±0,0	1,0±0,2
Bể ĐC	0±0,0	0±0,0	0,25±0,02	5,57±0,02	0±0,0	4,65±0,1	4,77±0,1	0,02±0,01	4,98±0,1

Kết quả cho thấy: với mô hình nuôi ở quy mô pilot khi bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp đã duy trì được chất lượng nước tốt hơn so với bể đối chứng không được bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp. Sau 1 tháng nuôi, không phát hiện thấy NH₄⁺ và NO₂⁻ trong nước, Hàm lượng sulfua trong bùn được sinh ra giữa hai công thức thử nghiệm và đối chứng có sự sai khác không có ý nghĩa (P>0,05). Nhưng sau 3 tháng không phát hiện thấy NO₂⁻, hàm lượng sulfua và amoni có sự sai khác giữa hai bể thử nghiệm và bể đối chứng có ý nghĩa (P<0,05), sau 4 tháng nuôi các chỉ số độc trong nước như amoni, nitrit trong nước và sulfua trong bùn đều có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (P<0,05). Như vậy, khi được bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp vào bể nuôi cá rô phi không những hàm lượng sulfua trong bùn được giảm thiểu đáng kể, do vậy, làm giảm hàm lượng sulfua khuếch tán từ bùn vào môi trường nước, mà còn giảm thiểu được hàm lượng amoni. Điều này có thể giải thích là do vi khuẩn

tía quang hợp có thể sử dụng nguồn cacbon hữu cơ cho sinh trưởng nên hàm lượng amoni sinh ra trong bể thử nghiệm cũng giảm đi so với bể đối chứng.

Sau 4 tháng nuôi, cá rô phi được thu hoạch và xác định trọng lượng, kích thước ở bể thử nghiệm và bể đối chứng. Kết quả được trình bày ở Bảng 4

Bảng 4. Trọng lượng và kích thước trung bình của cá rô phi ở các bể nuôi sau 4 tháng

Công thức thử nghiệm	Trọng lượng trung bình (kg)	Chiều dài trung bình (cm)	Con to nhất
Bể đối chứng	0,22±0,14	15±2	Nặng 0,4 kg, dài 17 cm
Bể thử nghiệm	0,283±0,17	16,7±3,5	Nặng 0,6kg, dài 20cm

Kết quả ghi nhận được ở quy mô pilot có bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp xử lý sulfua đáy cho thấy: việc sử dụng chế phẩm đã duy trì được chất lượng nước trong bể nuôi, cá khỏe và tăng trưởng tốt hơn so với bể nuôi không sử dụng chế phẩm. Mặc dù cân nặng và kích thước cá ở bể thử nghiệm không có sự khác nhau có ý nghĩa so với bể đối chứng ($P>0,05$). Tuy nhiên, kết quả này chỉ là bước đầu cần phải thử nghiệm ở quy mô lớn hơn để đánh giá vai trò của chế phẩm trong xử lý sulfua và hữu cơ đối với ao nuôi ngoài tự nhiên.

Ví dụ 3: Thử nghiệm chế phẩm xử lý sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi thực tế

Chúng tôi hợp tác với Trung tâm nghiên cứu và sản xuất giống thủy sản Thanh Hóa tiếp tục đánh giá chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp đối với ao nuôi tôm công nghiệp tại Hoàng Hóa, Thanh Hóa, sau khi bổ sung chế phẩm vào các ao thử nghiệm, mẫu nước và mẫu bùn ở 4 ao gồm hai ao thử nghiệm và hai ao đối chứng được thu và phân tích H_2S theo định kỳ. Kết quả được trình bày ở Bảng 5

Bảng 5: Biến động hàm lượng H_2S (mg/l) trong nước ao theo thời gian nuôi

Đợt kiểm tra	Lô thử nghiệm		Lô đối chứng	
	Ao TN1	Ao TN2	Ao ĐC1	Ao ĐC2
1	0,02±0,005	0,02±0,003	0,02±0,001	0,02±0,003
2	0,01±0,003	0,01±0,002	0,03±0,003	0,03±0,001
3	0,00±0,001	0,00±0,001	0,04±0,006	0,04±0,002
4	0,00±0,00	0,01±0,001	0,05±0,002	0,05±0,006
5	0,00±0,00	0,00±0,00	0,05±0,005	0,05±0,004

Ghi chú: Đợt 1: Trước khi bổ sung chế phẩm; Đợt 2,3,4,5: Sau khi bổ sung chế phẩm 1 tháng, 1,5 tháng, 2 tháng, 2,5 tháng.

Kết quả cho thấy: hàm lượng H_2S đo được trong nước ở các ao trước khi bổ sung chế phẩm có giá trị tương tự nhau ($0,02 \pm 0,003$; $0,005$; $0,001$ mg/l). Nhưng sau khi bổ sung chế phẩm, hàm lượng H_2S ở 2 ao thử nghiệm đã giảm rõ rệt và sau 2,5 tháng bổ sung chế phẩm không phát hiện được hàm lượng sulfua có trong nước ao nuôi (H_2S có giá trị bằng 0). Ở 2 ao đối chứng không được bổ sung chế phẩm thì hàm lượng H_2S tăng lên theo thời gian (từ $0,02 \pm 0,001$; tăng lên $0,05 \pm 0,005$). Sự sai khác về hàm lượng sulfua giữa ao đối chứng và ao thử nghiệm có ý nghĩa thống kê sinh học ($P < 0,05$). Kết quả ghi nhận được chứng tỏ chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp có tác dụng tốt đối với chất lượng nước ao nuôi.

Hàm lượng sulfua sinh ra trong bùn đáy các ao nuôi trồng thủy sản là nguyên nhân dẫn đến sự khuếch tán H_2S trong nước. Hàm lượng sulfua trong các mẫu bùn được theo dõi trong suốt quá trình nuôi. Kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Biến động hàm lượng H_2S (mg/g bùn tươi) trong bùn đáy ao theo thời gian nuôi

Đợt kiểm tra	Lô thử nghiệm		Lô đối chứng	
	Ao TN1	Ao TN2	Ao ĐC1	Ao ĐC2
1	$4,67 \pm 0,09$	$4,45 \pm 0,10$	$4,5 \pm 0,08$	$4,4 \pm 0,09$
2	$3,4 \pm 0,05$	$4,1 \pm 0,07$	$4,7 \pm 0,05$	$4,7 \pm 0,04$
3	$3,0 \pm 0,06$	$3,0 \pm 0,05$	$5,0 \pm 0,06$	$5,1 \pm 0,09$
4	$2,7 \pm 0,10$	$2,8 \pm 0,09$	$5,2 \pm 0,10$	$5,3 \pm 0,10$
5	$1,50 \pm 0,08$	$1,6 \pm 0,08$	$5,5 \pm 0,05$	$5,4 \pm 0,06$

Ghi chú: Đợt 1: Trước khi bổ sung chế phẩm; Đợt 2,3,4,5: Sau khi bổ sung chế phẩm 1 tháng, 1,5 tháng, 2 tháng, 2,5 tháng.

Hàm lượng H_2S trong bùn ở 2 ao thử nghiệm có xu hướng giảm sau khi bổ sung chế phẩm. Sau 2,5 tháng bổ sung chế phẩm, lượng H_2S trong ao TN1 giảm từ $4,67 \pm 0,09$ mg/g xuống còn $1,5 \pm 0,08$ mg/g và ao TN2 giảm từ $4,45 \pm 0,10$ mg/g xuống $1,6 \pm 0,08$ mg/g.

Trong khi đó ở 2 ao đối chứng, hàm lượng H_2S có chiều hướng tăng dần sau 2,5 tháng nuôi tôm. Ở ao ĐC1 lượng H_2S tăng từ $4,5 \pm 0,08$ mg/g đến $5,5 \pm 0,05$ mg/g và ao ĐC 2 tăng từ $4,4 \pm 0,09$ mg/g đến $5,4 \pm 0,06$ mg/g (Bảng 7). Hàm lượng sulfua ở đáy các ao thử nghiệm sau 2,5 tháng bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp so với hàm lượng sulfua có trong các ao đối chứng có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học ($P < 0,05$). Kết quả cho thấy chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp bổ sung có ảnh hưởng tốt tới xử lý sulfua trong bùn đáy ao nuôi. Do vậy, làm giảm đáng kể hàm lượng sulfua được khuếch tán vào môi trường nước, góp phần tạo nên chất lượng môi trường nước nuôi được đảm bảo.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Sử dụng chế phẩm chứa vi khuẩn tía quang hợp bổ sung vào bể thử nghiệm ở quy mô pilot và ao nuôi cá rô phi thâm canh có tác dụng tốt tới môi trường nuôi, đã làm giảm rõ rệt hàm lượng NH_4 , NO_2 , BOD_3 và H_2S trong nước và trong bùn đáy ao. Do vậy, sử dụng chế phẩm chứa vi khuẩn tía quang hợp 2 tuần/lần góp phần ảnh hưởng tốt đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của cá rô phi nuôi thâm canh.

Ứng dụng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp có thể làm sạch môi trường ao đầm nuôi mà không gây ảnh hưởng đến đối tượng nuôi thủy sản.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp dùng để xử lý sulfua và hữu cơ trong đáy ao nuôi trồng thủy sản gồm các bước sau:

Bước 1: Nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10 ml bằng cách cấy riêng 3 chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* QN₇₁, *Rhodobacter sphaeroides* QN₅₂ và *Rhodovulum sulfidophilum* TH₂₁ từ ống thạch nghiêng sang môi trường DSMZ 27 dạng dịch chứa trong bình 10 ml đặt dưới ánh sáng đèn sợi đốt (ba chủng mỗi chủng cấy 3 lọ), nhiệt độ 28 ± 2 độ C, sau 3-5 ngày mật độ tế bào đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml (có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3) sử dụng làm giống để nhân sang bình thủy tinh 500 ml;

Bước 2: Nhân giống trong lọ thủy tinh 500 ml bằng cách trộn ba chủng vi khuẩn lựa chọn với tỷ lệ 1:1:1 tạo thành hỗn hợp ba chủng (ba chủng thu được 90 ml giống hỗn hợp), hỗn hợp này được nhân sang 2 bình 500 ml với tỷ lệ giống 10% bằng cách mỗi bình chứa 405 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể với 45 ml thể tích giống, ủ ở điều kiện chiếu sáng đèn sợi đốt trong phòng thử nghiệm, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày kiểm tra OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 có thể sử dụng làm nguồn giống cấp 1 để nhân sang các bình 5 lít;

Bước 3: Nhân giống trong bình nhựa trong 5 lít bằng cách sử dụng giống từ các bình giống 500 ml nhân sang bình nhựa trong có thể tích 5 lít với tỷ lệ 10% giống, cụ thể như sau: chuẩn bị 4550 ml môi trường DSMZ 27 dịch thể bổ sung thêm 4,5 g bột đậu tương, sau đó bổ sung với 450 ml hỗn hợp giống, đặt dưới ánh sáng mặt trời, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 sử dụng làm nguồn giống để nhân sang các bình có thể tích lớn hơn như 10, 20, 50, 100 lít; và

Bước 4: Nhân giống sang bình có thể tích lớn 10, 20, 50, 100 (lít) để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp bằng cách nhân từ các bình 5 lít với tỷ lệ giống 10%, sử dụng môi trường DSMZ 27 dịch thể bổ sung thêm 1g/l bột đậu tương, đặt dưới điều kiện tự nhiên dưới ánh sáng mặt trời, nhiệt độ 28 ± 2 độ C; Sau 5-7 ngày có thể xác định bằng OD₈₀₀ đạt khoảng 1,2-1,3 thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

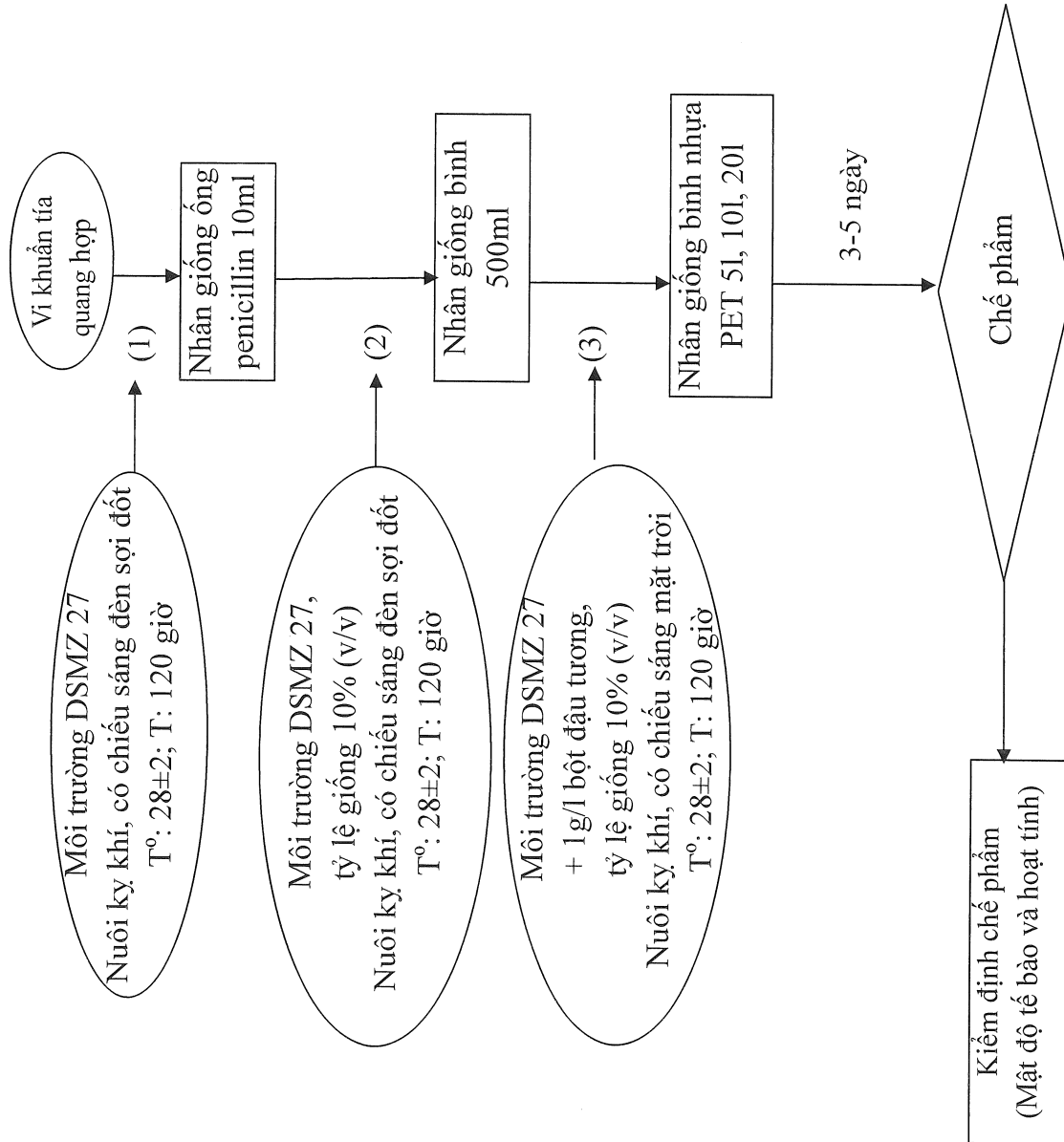


Fig. 1. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp

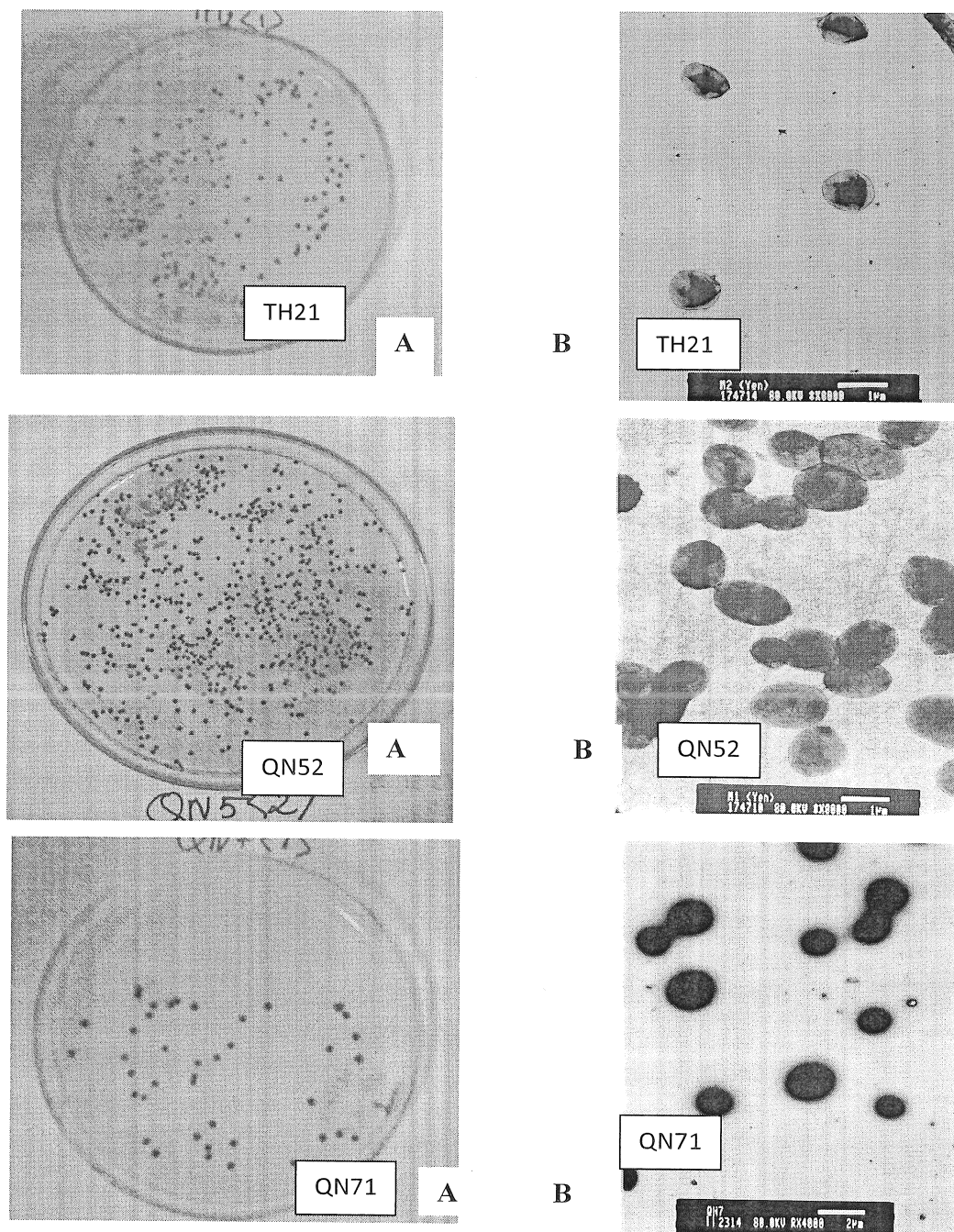


Fig. 2. Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử của ba chủng vi khuẩn tía quang hợp được lựa chọn

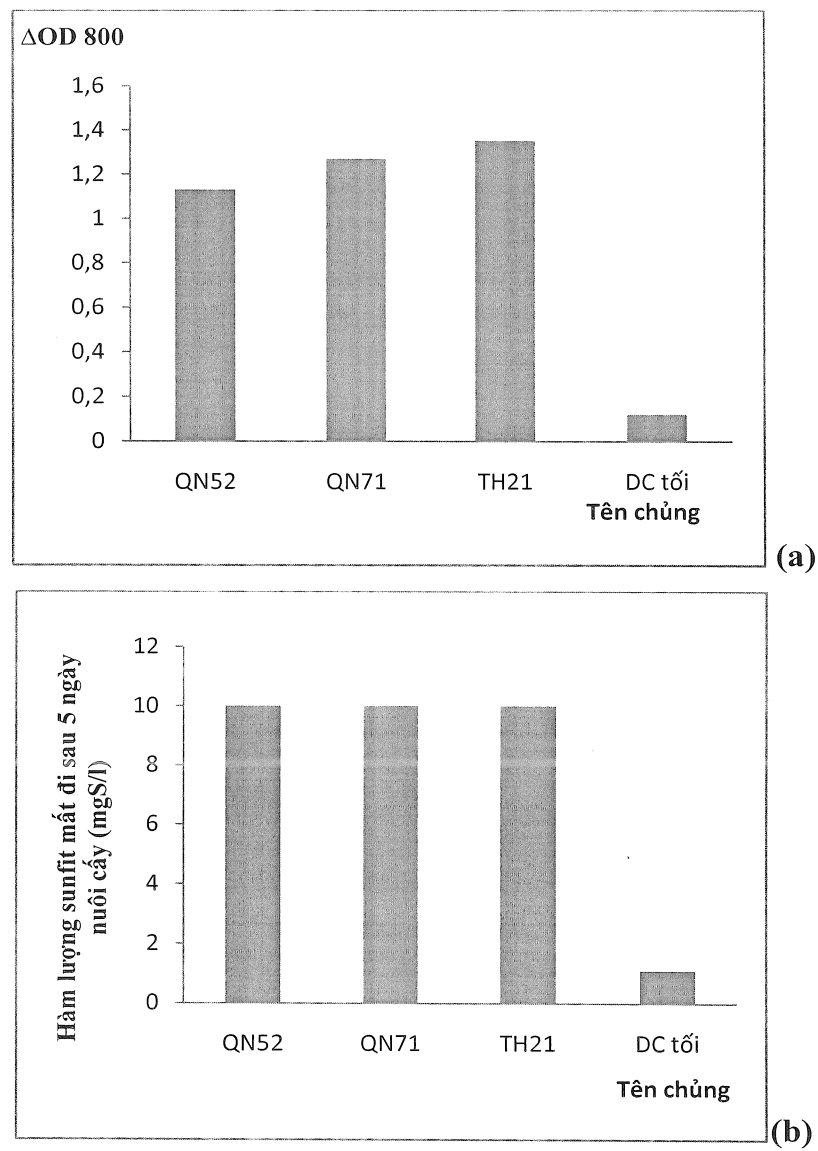


Fig. 3. Thể hiện khả năng sinh trưởng (a) và hoạt tính loại bỏ sulfua của ba chủng vi khuẩn tía quang hợp (b)

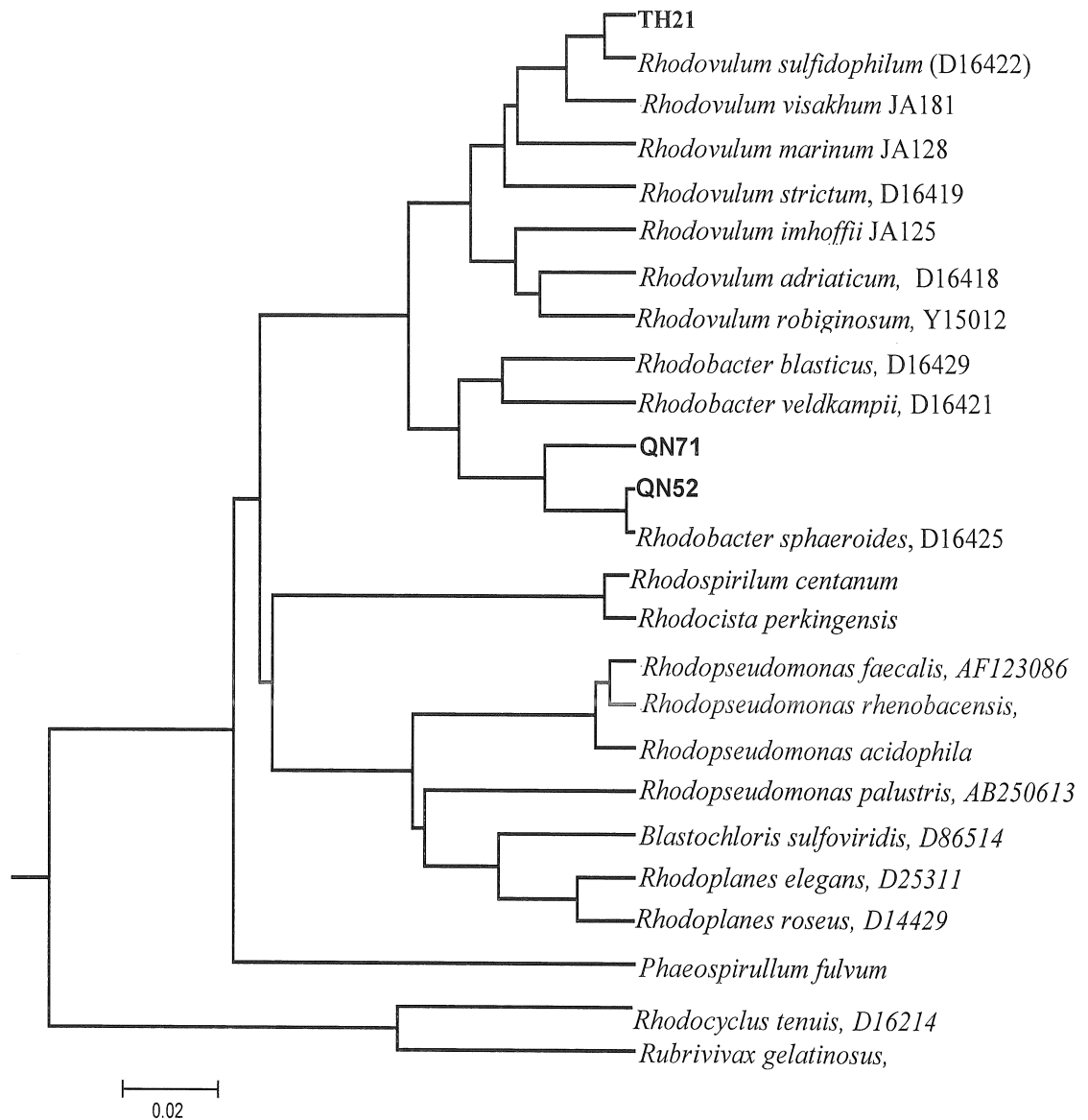


Fig. 4. Vị trí phân loại của các chủng chọn lựa

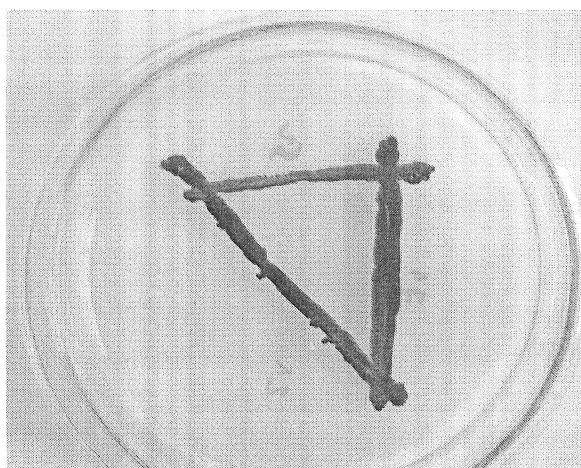


Fig. 5. Hình ảnh minh chứng 3 chủng VKT lựa chọn không đối kháng nhau



Fig. 6. Hình ảnh chế phẩm vi khuẩn tia quang hợp