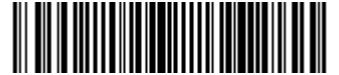




(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0002445

(51)⁷ **C12N 1/00; C12N 1/20; C02F 11/00; C02F
3/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00432

(22) 29/10/2018

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/01/2019 370A

(73) Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A30, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Văn Mạnh (VN); Tăng Thị Chính (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CHỊU MẶN DẠNG VIÊN VÀ CHẾ
PHẨM VI SINH VẬT CHỊU MẶN DẠNG VIÊN THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn bao gồm các bước: a. Nhân giống cấp 1 các chủng vi sinh vật chịu mặn bao gồm: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza, chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza, chủng *Lactobacillus brevis* L8, và chủng *Rhodobacter sphaeroides* R1 vi khuẩn tía không lưu huỳnh; b. lên men thu sinh khối các chủng trên các môi trường thích hợp với từng chủng; và c. tạo chế phẩm vi sinh vật bằng cách phối trộn sinh khối lên men của các chủng với chất mang bao gồm (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn thu được từ quy trình nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học môi trường, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn bao gồm các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao phân tử như xenluloza, tinh bột, protein, kitin và các chủng có khả năng loại bỏ các hợp chất chứa lưu huỳnh, dùng để xử lý đáy các thủy vực nước mặn và nước lợ bị ô nhiễm các hợp chất hữu cơ và dinh dưỡng. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn thu được từ quy trình nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Hiện nay các phương pháp sản xuất và sử dụng chế phẩm vi sinh vật cho các môi trường nước đều rất phổ biến, không những chế phẩm được sản xuất trong nước mà còn các chế phẩm được nhập từ nước ngoài. Chế phẩm vi sinh vật được ứng dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, xử lý mùi hôi, ức chế các vi khuẩn gây hại hoặc xử lý các ao hồ ô nhiễm tại các thành phố lớn....

Tuy nhiên, phần lớn các chế phẩm mới chỉ đề cập đến môi trường nước mà chưa thấy nhiều đến môi trường nền đáy. Khi sử dụng chế phẩm cho môi trường nước thường chỉ cải thiện về phía bề mặt thủy vực và một phần nước dưới lớp bề mặt. Khi các quá trình phân giải này kết thúc, các sản phẩm dạng chất rắn được tạo ra sẽ lắng xuống nền đáy và gây ô nhiễm thứ cấp cho thủy vực là điều khó có thể tránh khỏi. Tùy thuộc vào phương pháp, chất gây ô nhiễm, diện tích cần xử lý và chủng vi sinh vật sử dụng mà mức độ gây ảnh hưởng đến nền đáy là khác nhau, do đó quan tâm đến cải thiện chất lượng môi trường nền đáy các thủy vực, tránh đảo lộn bề mặt lớp trầm tích và hệ sinh thái nền đáy việc đưa ra một phương pháp cải thiện là cần thiết và ưu tiên trong bối cảnh suy giảm chất lượng môi trường hiện nay. Hơn nữa trong một phạm vi thủy vực không phải độ sâu nào cũng ứng dụng chế phẩm giống nhau, mà tùy thuộc vào bản chất của môi trường và điều kiện cụ thể để có thể áp dụng cho phù hợp và mang lại hiệu quả cao như phải phân lập, tuyển chọn, nhân giống từ bản địa, thử

nghiệm điều kiện sống tương thích với thực tiễn.... thì qua đó chế phẩm mới có thể áp dụng được cho đại trà.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là tạo ra được chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên có thể đưa các vi sinh vật bao gồm các chủng vi sinh vật chịu mặn sinh tổng hợp các enzym amylaza, proteaza, xenlulaza, kitinaza ngoại bào, khử hợp chất chứa lưu huỳnh vào đáy các vùng nước lợ, nước mặn để làm tăng mật độ của các vi sinh vật phân giải các hợp chất gây ô nhiễm như protein, kitin, tinh bột, xenlulo, ... góp phần cải thiện quần xã vi sinh vật hữu ích trong môi trường nền đáy. Để đạt được mục đích này giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn bao gồm các bước:

a. Nhân giống cấp 1 các chủng vi sinh vật chịu mặn bao gồm: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza, chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza, chủng *Lactobacillus brevis* L8, và chủng *Rhodobacter sphaeroides* R1 vi khuẩn tía không lưu huỳnh;

b. lên men thu sinh khối các chủng trên các môi trường thích hợp với từng chủng; và

c. Tạo chế phẩm vi sinh vật bằng cách phối trộn sinh khối lên men của các chủng với chất mang bao gồm (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn thu được từ quy trình nêu trên. Thành phần và mật độ của các chủng vi sinh vật có trong chế phẩm theo giải pháp hữu ích được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần, mật độ của các chủng vi sinh vật có trong chế phẩm

TT	Thành phần vi sinh vật	Mật độ (CFU/g)	Chức năng
1	<i>Sphingobacterium mizutaii</i> B8	10^8	Phân giải protein
2	<i>Lactobacillus Brevis</i> L8	10^8	Axit hóa các hợp chất hữu cơ

3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TB10	10^8	Phân giải tinh bột, kitin, lipit
4	<i>Bacillus subtilis</i> DN1.3	10^8	Phân giải xenlulo, tinh bột, lipit, kitin
5	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> R1	10^7	Phân hủy các hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh, không hình thành H_2S

Việc cố định các chủng vi sinh vật chịu mặn vào chất mang chứa đất sét đã tạo ra các ổ sinh thái trong chế phẩm dạng viên (xem Hình 1 và 2) giúp dễ dàng đưa các chủng vi sinh này vào môi trường nước nhằm tăng cường khả năng phân hủy các hợp chất gây ô nhiễm góp phần làm giảm thiểu nguy cơ suy thoái và cải thiện chất lượng môi trường các thủy vực. Viên chế phẩm được sản xuất có dạng hình tròn, kích thước đường kính trong khoảng 4-5 cm, trọng lượng khoảng 0,3 - 0,4 kg.

Ưu điểm của phương pháp sản xuất chế phẩm và chế phẩm dạng viên thu được như sau:

- Dễ chìm xuống môi trường nền đáy.
- Cố định được tổ hợp các vi sinh vật và tránh pha loãng chế phẩm ra môi trường.
- Tạo các ổ sinh thái dễ thích nghi với điều kiện môi trường.
- Tập trung và khoanh vùng dễ dàng để xử lý được các điểm ô nhiễm.
- Không gây ô nhiễm đến môi trường, an toàn với hệ sinh thái.
- Dễ dàng cố định tại các ô đã được khoanh vùng cho xử lý.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn theo giải pháp hữu ích.

Hình 2: Là hình ảnh chụp kết quả nuôi vi khuẩn tía không lưu huỳnh.

Hình 3. Là ảnh chụp chế phẩm vi sinh vật dạng viên sản xuất được.

Hình 4: Là ảnh chụp mô hình thử nghiệm ngoài hiện trường theo giải pháp hữu ích.

Hình 5.1: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý TOC trong nước ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 5.2: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý T-N trong nước ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 5.3: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý T-P trong nước ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.1: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý TOC trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.2: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý T-N trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.3: Là đồ thị thể hiện hiệu quả xử lý T-P trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.4: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải protein trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.5: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải kitin trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 5.6: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải tinh bột trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.7: Là đồ thị thể hiện mật độ vi sinh vật phân giải xenluloza trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 6.8: Là đồ thị thể hiện mật độ vi khuẩn tía không lưu huỳnh trong trầm tích ở 2 mẫu thử nghiệm.

Hình 7: Là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất ứng dụng chế phẩm vi sinh vật để xử lý nền đáy thủy vực.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các môi trường MRS, MPA, MPB và SA được sử dụng trong bản mô tả này là các môi trường thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được thể hiện trên Hình 1, quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn được tiến hành như sau:

a. Nhân giống cấp 1

Tuyển chọn các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật dùng để tạo chế phẩm vi sinh được phân lập và tuyển chọn từ môi trường tự nhiên ở Việt Nam như từ các mẫu bùn đáy của các thủy vực nước mặn như mẫu bùn tại Âu thuyền Thọ Quang (thành phố Đà Nẵng), tại các cảng cá ven biển, tại các vùng nuôi thủy sản nước lợ, nước mặn trên các môi trường đặc hiệu cho các chủng vi khuẩn là môi trường MPA cải tiến có thành phần trong 1 lít môi

trường như sau: cao thịt 3 g, pepton 5 g, thạch aga 20 g, nước cất 1000ml, được bổ sung thêm 3% NaCl. Ngoài ra còn cần 1 bổ sung thêm 1% cơ chất (tinh bột để tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy tinh bột, bột xenluloza để tuyển chọn chủng phân hủy xenluloza, casein để tuyển chọn chủng phân giải protein). Sau đó môi trường được thanh trùng ở 121°C, 15 phút. Các mẫu bùn được pha loãng trong nước muối sinh lý 0,85% NaCl với các nồng độ sau: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Lấy 100µl dung dịch pha loãng nhỏ vào các đĩa thạch chứa các cơ chất khác nhau. Nuôi trong tủ ổn nhiệt ở 30°C, sau 48 giờ lấy ra để xác định hoạt lực enzym của các chủng vi khuẩn sinh ra.

Ví dụ để phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzym xenlulaza, các đĩa môi trường MPA có bổ sung bột xenluloza sau khi tiến hành nuôi cấy lấy ra nhỏ dung dịch lugol, nếu xung quanh khuẩn lạc nào có vùng không màu trong suốt, vùng không bắt màu xanh tím càng lớn thì khả năng sinh enzym của chủng vi khuẩn đó càng cao. Chỉ tuyển chọn những khuẩn lạc có đường kính vòng phân giải trên 30 mm, để tiếp tục nghiên cứu.

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

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

Các chủng vi sinh vật được tuyển chọn bao gồm chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza và chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza, chủng *Lactobacillus Brevis* L8 sinh axit lactic và chủng.

Các chủng vi sinh vật này vừa có khả năng sinh trưởng và phát triển có nhiệt độ từ 15 đến 40°C), nồng độ NaCl từ 0,05% đến 4%, chúng sinh tổng hợp mạnh các enzym ngoại bào như là xenlulaza, amylaza, proteaza cao. Do vậy, khi sử dụng chế phẩm vi sinh bao gồm hỗn hợp các chủng nêu trên để đưa vào các thủy vực nước lợ và nước mặn các chủng này sẽ sinh trưởng và phát triển tốt làm tăng mật độ của chúng

trong môi trường nước và trong bùn đáy, thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy các chất ô nhiễm hữu cơ trong nước và trong bùn đáy của các thủy vực này, làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Sau khi tuyển chọn, các chủng này được cấy vào các ống môi trường thạch và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C và được lưu giữ trong bộ sưu tập giống tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ môi trường – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các chủng vi sinh vật được chọn từ bộ sưu tập giống vi sinh vật được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ môi trường – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, để sản xuất chế phẩm bao gồm: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza, chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza, chủng *Lactobacillus brevis* L8, và chủng *Rhodobacter sphaeroides* R1 vi khuẩn tía không lưu huỳnh. Trong đó:

- 3 chủng *Bacillus subtilis* DN1.3, *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 và *Sphingobacterium mizutaii* B8 được hoạt hóa bằng cách cấy truyền từng chủng giống từ ống thạch sang các ống thạch mới chứa môi trường MPA + 3%NaCl và tiến hành nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C từ 24 - 48 giờ; Các chủng giống đã được hoạt hóa được nhân giống cấp 1 trên môi trường MPB có thành phần trong 1 lít môi trường bao gồm: cao thịt: 3 g, pepton: 5 g, NaCl: 30 g, nước cất 1000ml; Điều kiện nuôi cấy là trong máy lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ 30°C, với vận tốc lắc 200 vòng/phút, thời gian nuôi 24 giờ.

- Chủng *Lactobacillus brevis* L8 được nuôi cấy trên môi trường MRS ở nhiệt độ 37°C, nuôi tĩnh, không sục khí, thời gian nhân giống 48 giờ.

- Chủng vi khuẩn tía không lưu huỳnh *Rhodobacter sphaeroides* R1 được hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường SA, trong điều kiện không cấp oxy, được chiếu sáng bằng đèn nilong trong phòng ở điều kiện nhiệt độ 25-30°C, thời gian nhân giống 7-10 ngày.

b. Lên men thu nhận sinh khối của các chủng

Các chủng vi khuẩn sau khi được nhân giống cấp 1 sẽ được tiến hành lên men riêng rẽ để thu nhận sinh khối trên các môi trường đặc hiệu, trong đó:

- Chủng *Bacillus subtilis* DN1.3 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột xenluloza; Tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml.

- Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% tinh bột; Tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml.

- Chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột casein; Tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml.

- Chủng *Lactobacillus brevis* L8 được lên men trong môi trường MRS +3% NaCl; Tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 5-6, nhiệt độ 37°C, lên men tĩnh, thời gian lên men 48-60 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml.

Chủng vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* R1 được lên men trong môi trường SA cải tiến có bổ sung 30 g/l NaCl; Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn quang hợp tía không lưu huỳnh chi *Rhodobacter* được nuôi cấy trên môi trường SA, ở điều kiện không sục khí dưới ánh sáng tự nhiên hoặc chiếu sáng bằng đèn nilong, nhiệt độ 30-35°C, độ pH tối ưu là 6,5-7,5; thời gian nuôi 10-14 ngày, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml.

c. Tạo chế phẩm vi sinh vật

Chất mang là thành phần có vai trò quan trọng trong chế phẩm vi sinh vật. Chất mang vừa có tác dụng cung cấp dinh dưỡng và chất khoáng đồng thời làm giá thể để các vi sinh vật bám vào. Do vậy, giải pháp hữu ích đã tiến hành thử nghiệm đánh giá để lựa chọn chất mang thích hợp. Cụ thể là chất mang theo giải pháp hữu ích sử dụng là các nguyên liệu để làm môi trường xốp bao gồm (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%; Trong đó, các thành phần cám gạo, vỏ trấu và than bùn có vai trò cung cấp chất dinh dưỡng và chất khoáng cho các chủng vi sinh

vật. Bột đất sét có vai trò quan trọng trong việc làm giảm độ ẩm của hỗn hợp và làm giá thể để các chủng vi sinh vật bám vào và tăng độ kết dính của chế phẩm.

Các thành phần tạo chất mang nêu trên được cho vào máy đảo trộn đều trước khi thanh trùng; Sau đó, hỗn hợp được sấy khô ở 100°C trong 2 -3 giờ đến khi độ ẩm đạt 10%; Chất mang sau sấy được làm nguội đến nhiệt độ 30°C, bổ sung 10% thể tích dịch sinh khối thu được ở bước b) của 5 chủng vi khuẩn nêu trên đảo trộn đều rồi ép thành viên nén có đường kính 4 - 5cm.

Theo một phương án, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn thu được từ quy trình nêu trên, trong đó chế phẩm vi sinh này bao gồm các thành phần: *Bacillus subtilis* DN1.3 $\geq 10^8$ CFU/g; *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 $\geq 10^8$ CFU/g; *Sphingobacterium mizutaii* B8 $\geq 10^8$ CFU/g; *Lactobacillus brevis* L8 $\geq 10^8$ CFU/g; *Rhodobacter sphaeroides* R1 $\geq 10^8$ CFU/g; và chất mang bao gồm các thành phần (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%. Ngoài ra, chế phẩm theo giải pháp hữu ích không chứa các vi sinh vật gây bệnh như *E.coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Quy trình sử dụng chế phẩm vào xử lý bùn đáy các thủy vực sẽ được thực hiện theo các bước như mô phỏng trong Hình 7.

Để có cơ sở ứng dụng chế phẩm vi sinh vật chịu mặn nhằm xử lý ô nhiễm tại các thủy vực mong muốn, việc đầu tiên cần làm là phải khoanh vùng, tính toán diện tích, thể tích bùn tại khu vực cần xử lý ô nhiễm (gọi tắt là khu vực). Quan trọng nhất là phải có được bộ số liệu về hiện trạng môi trường nền tại khu vực bao gồm hàm lượng các thông số ô nhiễm điển hình như tổng cacbon hữu cơ (TOC), tổng nitơ (T-N) và tổng photpho (T-P, xác định sự hiện diện của các vi sinh vật bản địa có trong khu vực và các chủng vi khuẩn đối kháng có thể có tại khu vực với 05 chủng vi khuẩn có trong chế phẩm vi sinh vật chịu mặn nêu trên. Từ đó, sẽ tính toán lượng chế phẩm cần sử dụng để xử lý ô nhiễm tùy theo hiện trạng môi trường tại khu vực. Sau đó, ước tính chia ô tại khu vực để việc phân bổ chế phẩm được đồng đều cho toàn bộ thể tích nền đáy cần xử lý.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**Ví dụ 1**

Để sản xuất được chế phẩm vi sinh vật theo quy trình của giải pháp hữu ích, các yếu tố cần thiết bao gồm:

a) Trang thiết bị, máy móc

- Hệ thống lên men xốp; nồi hấp khử trùng, tủ sấy; tủ ẩm, buồng cấy vô trùng, máy lắc ổn nhiệt, hệ thống lên men chìm; thiết bị phối trộn, đóng gói; bình, cốc thủy tinh, cốc định lượng, petri, ống nghiệm...

b) Nguyên liệu

Bảng 2. Nguyên vật liệu sử dụng để sản xuất 100kg chế phẩm

Nguyên vật liệu	Thông số kỹ thuật	Số lượng
Môi trường MPB	Cao thịt: 3,0 g; pepton: 5,0 g; NaCl: 30,0 g; nước cất 1000ml	3 lít
Môi trường tinh bột	Cao thịt: 3,0 g; pepton: 5,0 g; NaCl: 30,0 g; tinh bột 20,0 g; nước cất 1000ml	10 lít
Môi trường xenlulo	Cao thịt: 3,0 g; pepton: 5,0 g; NaCl: 30,0 g; CMC: 20,0 g; nước cất 1000ml	10 lít
MRS	Pepton: 10 g, cao thịt: 10 g, cao nấm men: 5 g/l, gluco 20 g, K_2HPO_4 : 2 g, natri axetat: 5 g Amoni – xitrat: 2 g, magie sulfat: 0.2 g Mangan sulfat: 0,05 g; nước cất 1000ml	10 lít
Môi trường SA	KH_2PO_4 : 0,5 g; NH_4Cl : 0,4 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,05 g Vi lượng: 1,0 ml; dung dịch $NaHCO_3$: 50,0 ml Dung dịch $Na_2S \cdot 9H_2O$: 50,0 ml Dung dịch natri pyruvat: 50,0 ml NaCl: 30,0 g; nước cất 1000ml, pH 6,5-7	10 lít
Chất mang	10% cám gạo; 10% trấu; 40% than bùn và 40% bột đất sét	60 kg

Chủng giống vi sinh vật: Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý chất thải hữu cơ trong nguồn nước mặn, nước lợ, bao gồm các chủng vi sinh vật có khả năng chuyển hóa hợp chất hữu cơ giàu protein, kitin, tinh bột, xenlulo và vi khuẩn tía không lưu huỳnh. Tổ hợp nhóm vi sinh vật sử dụng trong sản xuất như sau:

Bảng 3. Tổ hợp vi sinh vật sử dụng trong sản xuất chế phẩm

TT	Thành phần vi sinh vật	Mật độ (CFU/g)	Chức năng
1	<i>Sphingobacterium mizutaii</i> B8	10^8	Có khả năng hấp thụ protein dưới dạng axit amin hạn chế sản sinh ra NH_3 và H_2S
	<i>Lactobacillus Brevis</i> L8	10^8	Chuyển hóa các loại đường lacto thành axit lactic, ức chế các vi khuẩn <i>E.coli</i> và <i>Samonella</i> trong môi trường
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TB10	10^8	Sinh enzym phân giải mạnh các hợp chất tinh bột, xenlulo, kitin và ức chế vi sinh vật gây bệnh
4	<i>Bacillus subtilis</i> DN1.3	10^8	Sinh enzym phân giải mạnh các hợp chất tinh bột, xenlulo, protein, kitin và ức chế vi sinh vật gây bệnh
5	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> R1	10^7	Góp phần hạn chế sản sinh ra khí H_2S

Trong quá trình sử dụng các chủng vi sinh vật, việc đánh giá chất lượng các chủng vi sinh vật luôn đòi hỏi là một khâu chính của quy trình. Hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật sử dụng được đánh giá theo các phương pháp thí nghiệm thường qui đã được chuẩn hóa trong phòng thí nghiệm.

c) Sản xuất 100 kg chế phẩm

Sử dụng các nguyên liệu và trang thiết bị máy móc nêu trên, tiến hành sản xuất theo quy trình được mô tả chi tiết nêu trên thu được 100 kg chế phẩm vi sinh chịu mặn dạng viên. Chế phẩm tạo ra được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 1 tháng, sau đó tiến hành đánh giá mật độ vi sinh của các chủng vi sinh có trong chế phẩm trước và sau bảo quản 1 tháng. Kết quả được trình bày trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Sự tồn tại của các chủng vi sinh trong chế phẩm sau 1 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng

Tên chủng vi sinh vật	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)	
	Ngày đầu sản xuất	Sau 1 tháng bảo quản
<i>Sphingobacterium mizutaii</i> B8	$5,1 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
<i>Lactobacillus brevis</i> L8	$7,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TB10	$6,3 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$
<i>Bacillus subtilis</i> DN1.3	$4,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> R1	$6,3 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$

Ví dụ 2

Ứng dụng chế phẩm từ các chủng vi khuẩn chịu mặn vào quá trình xử lý Âu thuyền Thọ Quang, giải pháp hữu ích đã tiến hành đánh giá khả năng xử lý bùn đáy của các chủng vi sinh vật tuyển chọn trong chế phẩm ở quy mô nghiên cứu thực nghiệm ngoài hiện trường tại âu thuyền Thọ Quang với diện tích bề mặt 100 m² và được chia làm 02 ô. Mô hình thử nghiệm được trình bày chi tiết như sau:

Quây diện tích khu thực nghiệm với 100 m² bề mặt thủy vực, chia làm 02 ô, mỗi ô có diện tích bề mặt là 50 m² với độ dày lớp bùn vào khoảng 0,5 m. Diện tích thử nghiệm được thiết kế có cửa để cho nước thủy triều ra vào thuận tiện. Ô thí nghiệm (viết tắt là TN) có bổ sung chế phẩm vi sinh vật với tỉ lệ 1% chế phẩm/thể tích trầm tích cần xử lý. Ô đối chứng (viết tắt là ĐC) không bổ sung chế phẩm.

Theo dõi thí nghiệm trong 06 tháng (tương ứng 182 ngày), 07 ngày lấy mẫu phân tích một lần bao gồm mẫu trầm tích và nước tại mỗi bề.

Các chỉ tiêu cần theo dõi đánh giá như sau: tổng cacbon hữu cơ (TOC), tổng nitơ (T-N), tổng photpho (T-P) trong nước và trầm tích. Mật độ vi sinh vật phân giải protein, kitin, tinh bột, xenluloza và vi khuẩn tía không lưu huỳnh trong trầm tích.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Hiệu quả xử lý ô nhiễm qua 1 số chỉ tiêu hóa sinh trong quá trình thử nghiệm

TT	Chỉ tiêu	Ô đối chứng (ĐC)	Ô thí nghiệm (TN)
1	TOC trong nước	36,51%	62,96%
2	T-N trong nước	28,75%	55,75%
3	T-P trong nước	30,48%	52,38%

4	TOC trong trầm tích	16,00%	64,84%
5	T-N trong trầm tích	26,04%	49,34%
6	T-P trong trầm tích	24,14%	50,00%
7	Mật độ VSV phân giải protein trong trầm tích	Tăng 1,5 lần	Tăng 7,7 lần
8	Mật độ VSV phân giải kitin trong trầm tích	Tăng 1,7 lần	Tăng 12,1 lần
9	Mật độ VSV phân giải tinh bột trong trầm tích	Tăng 2,4 lần	Tăng 5,6 lần
10	Mật độ VSV phân giải xenluloza trong trầm tích	~ 1 lần	Tăng 2,5 lần
11	Mật độ vi khuẩn tía không lưu huỳnh trong trầm tích	Tăng 1,1 lần	Tăng 13,0 lần

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tuyển chọn, kết hợp 5 chủng vi khuẩn chịu mặn để tạo ra chế phẩm vi sinh có khả năng phân hủy các hợp chất hữu cơ cao như xenluloza, tinh bột, protein, kitin và đặc biệt là chủng khuẩn tía không lưu huỳnh để thúc đẩy quá trình phân hủy, làm sạch các chất ô nhiễm hữu cơ trong môi trường nước lợ hoặc nước mặn ở các thủy vực, như tại các âu thuyền ven biển, các đầm phá nuôi trồng thủy sản đồng thời hạn chế sinh ra khí H_2S gây mùi khó chịu trong quá trình xử lý.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên để xử lý các thủy vực nước lợ và nước mặn bao gồm các bước:

a. Nhân giống cấp 1

Các chủng vi sinh vật được chọn từ bộ sưu tập giống vi sinh vật được lưu giữ tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ môi trường – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, để sản xuất chế phẩm bao gồm: chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DN1.3 sinh tổng hợp enzym xenlulaza, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 sinh tổng hợp enzym amylaza, chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 sinh tổng hợp proteinaza, chủng *Lactobacillus brevis* L8, và chủng *Rhodobacter sphaeroides* R1 vi khuẩn tía không lưu huỳnh; trong đó:

- 3 chủng *Bacillus subtilis* DN1.3, *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 và *Sphingobacterium mizutaii* B8 được hoạt hóa bằng cách cấy truyền từng chủng giống từ ống thạch sang các ống thạch mới chứa môi trường MPA + 3% NaCl và tiến hành nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C từ 24 - 48 giờ; các chủng giống đã được hoạt hóa được nhân giống cấp 1 trên môi trường MPB có thành phần trong 1 lít môi trường bao gồm: cao thịt: 3 g, pepton: 5 g, NaCl: 30 g, nước cất 1000ml; điều kiện nuôi cấy là trong máy lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ 30°C, với vận tốc lắc 200 vòng/phút, thời gian nuôi 24 giờ;

- Chủng *Lactobacillus brevis* L8 được nuôi cấy trên môi trường MRS ở nhiệt độ 37°C, nuôi tĩnh, không sục khí, thời gian nhân giống 48 giờ;

- Chủng vi khuẩn tía không lưu huỳnh *Rhodobacter sphaeroides* R1 được hoạt hóa và nuôi cấy trên môi trường SA, trong điều kiện không cấp oxy, được chiếu sáng bằng đèn nilong trong phòng ở điều kiện nhiệt độ 25-30°C, thời gian nhân giống 7-10 ngày;

b. Lên men thu nhận sinh khối của các chủng

Các chủng vi khuẩn sau khi được nhân giống cấp 1 sẽ được tiến hành lên men riêng rẽ để thu nhận sinh khối trên các môi trường đặc hiệu, trong đó:

- Chủng *Bacillus subtilis* DN1.3 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột xenluloza; tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để

nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml;

- Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% tinh bột; tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml;

- Chủng *Sphingobacterium mizutaii* B8 được lên men trong môi trường MPB +3%NaCl + 2% bột casein; tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 7, nhiệt độ 30°C, cấp khí để nồng độ oxy DO đạt 4-5mg/L, thời gian lên men 30-36 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml;

- Chủng *Lactobacillus brevis* L8 được lên men trong môi trường MRS +3% NaCl; Tỷ lệ giống bổ sung 5%, pH 5-6, nhiệt độ 37°C, lên men tĩnh, thời gian lên men 48-60 giờ, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml;

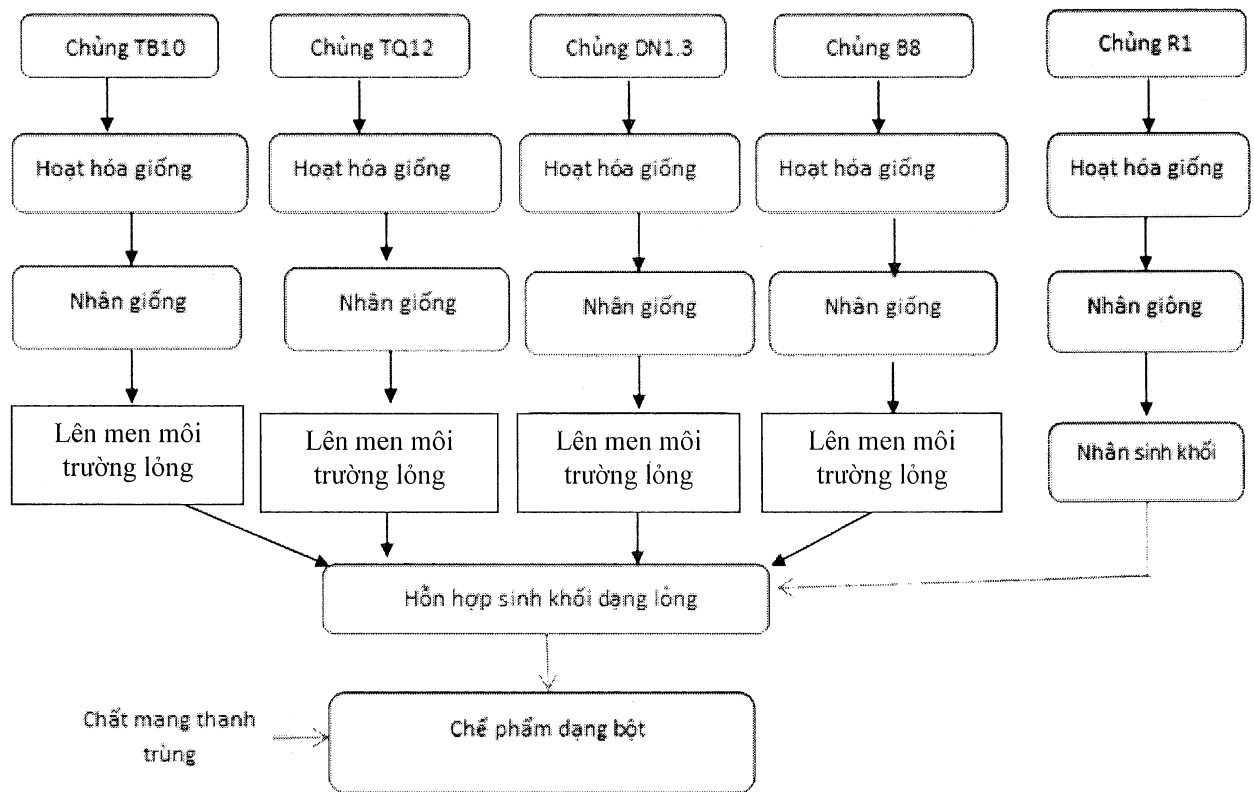
Chủng vi khuẩn *Rhodobacter sphaeroides* R1 được lên men trong môi trường SA cải tiến có bổ sung 30 g/l NaCl; điều kiện nuôi cấy vi khuẩn quang hợp tía không lưu huỳnh chỉ *Rhodobacter* được nuôi cấy trên môi trường SA, ở điều kiện không sục khí dưới ánh sáng tự nhiên hoặc chiếu sáng bằng đèn nilong, nhiệt độ 30-35°C, độ pH tối ưu là 6,5-7,5; thời gian nuôi 10-14 ngày, mật độ vi sinh đạt 10^9 CFU/ml; và

c. Tạo chế phẩm vi sinh vật

Chuẩn bị chất mang: thành phần các nguyên liệu sử dụng để làm môi trường xộp tạo chất mang bao gồm (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%; các thành phần này được cho vào máy đảo trộn đều trước khi thanh trùng; sau đó, chất mang được sấy khô ở 100°C trong 2 -3 giờ đến khi độ ẩm đạt 10%; chất mang sau sấy được làm nguội đến nhiệt độ 30°C, bổ sung 10% thể tích dịch sinh khối thu được ở bước b) của 5 chủng vi khuẩn nêu trên đảo trộn đều rồi ép thành viên nén có đường kính 4 - 5cm.

2. Chế phẩm vi sinh vật chịu mặn dạng viên được sản xuất bởi quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm vi sinh này bao gồm các thành phần: *Bacillus subtilis* DN1.3 $\geq 10^8$ CFU/g; *Bacillus amyloliquefaciens* TB10 $\geq 10^8$ CFU/g; *Sphingobacterium mizutaii* B8 $\geq 10^8$ CFU/g; *Lactobacillus brevis* L8 $\geq 10^8$ CFU/g; *Rhodobacter sphaeroides* R1 $\geq$

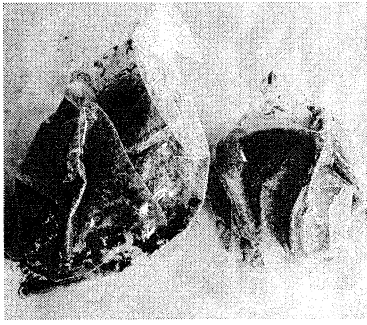
10^8 CFU/g; và chất mang bao gồm các thành phần (% trọng lượng): cám gạo 10%, vỏ trấu 10%, than bùn 40%, và đất sét 40%.



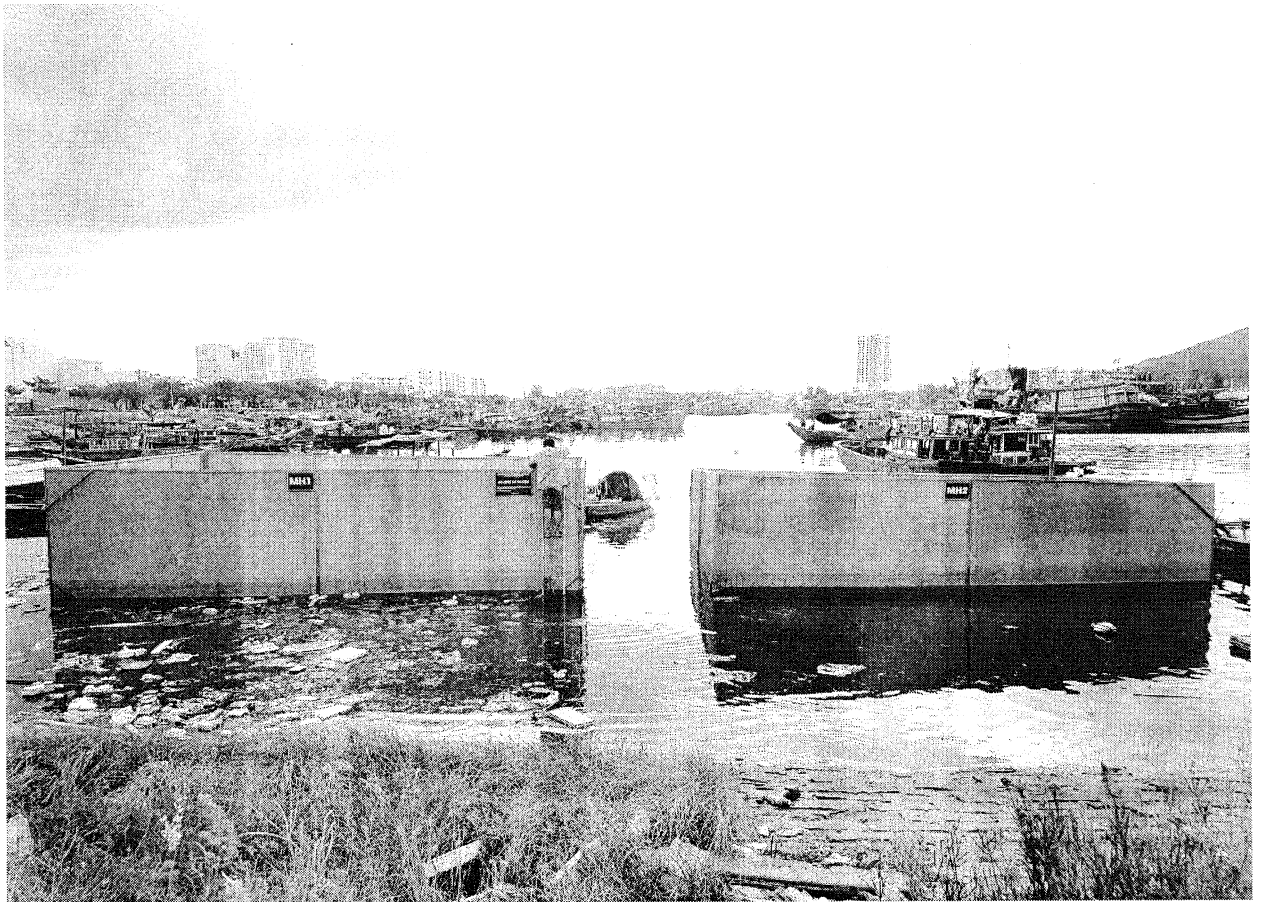
Hình 1



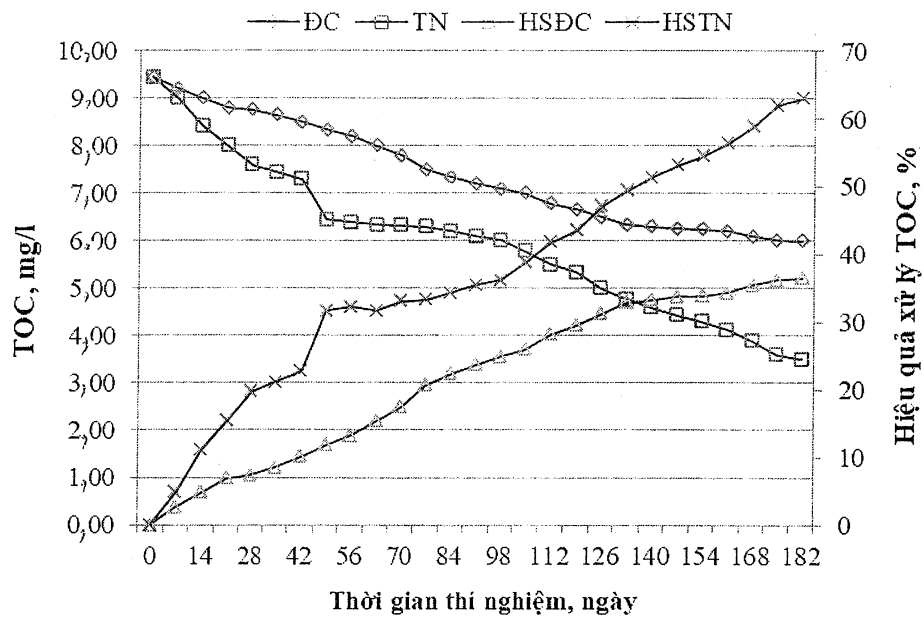
Hình 2



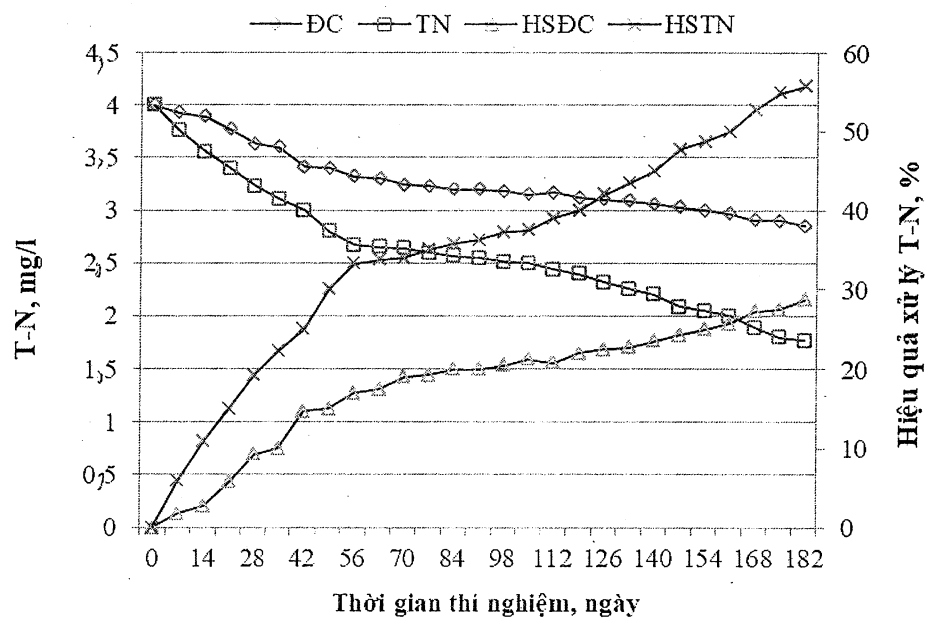
Hình 3



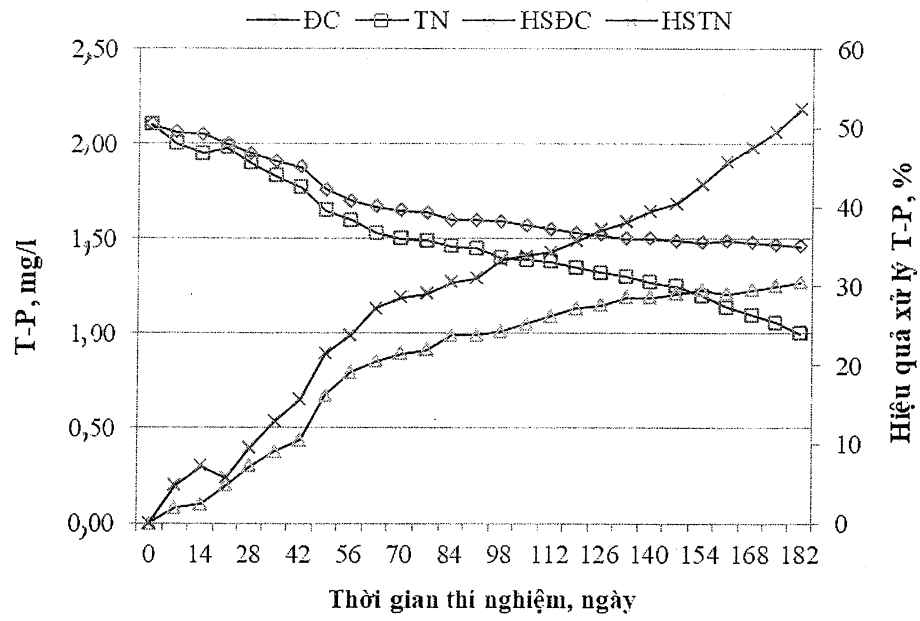
Hình 4



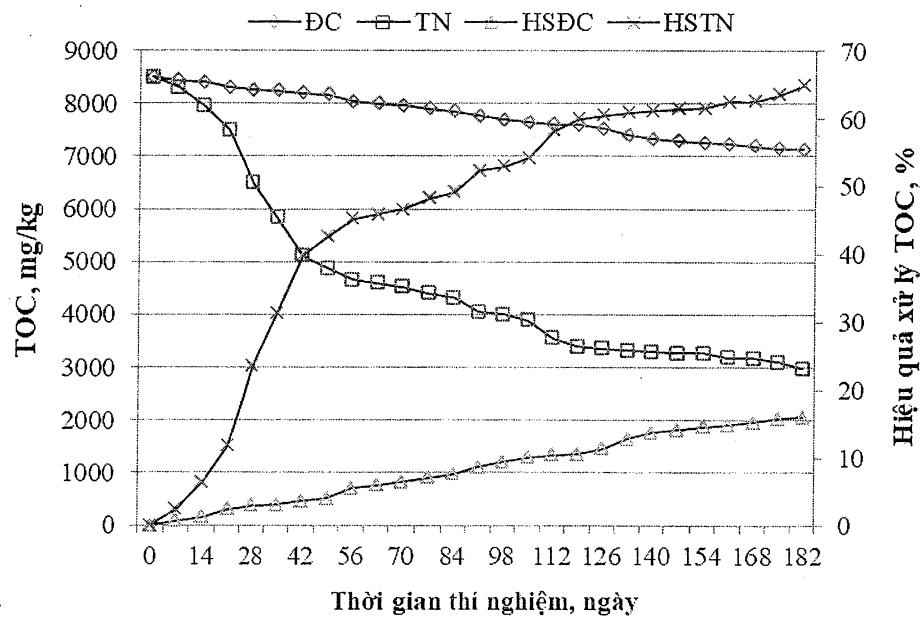
Hình 5.1



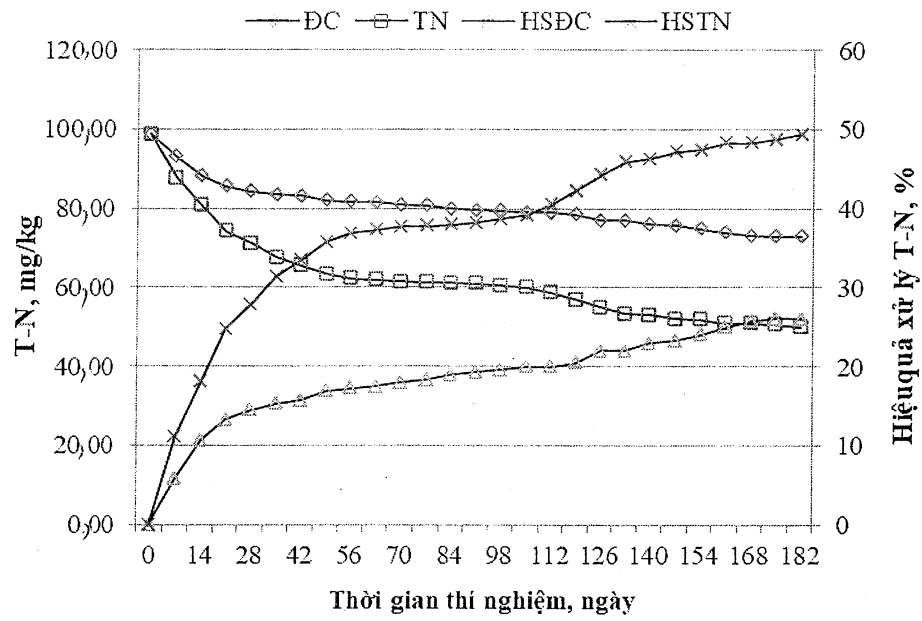
Hình 5.2



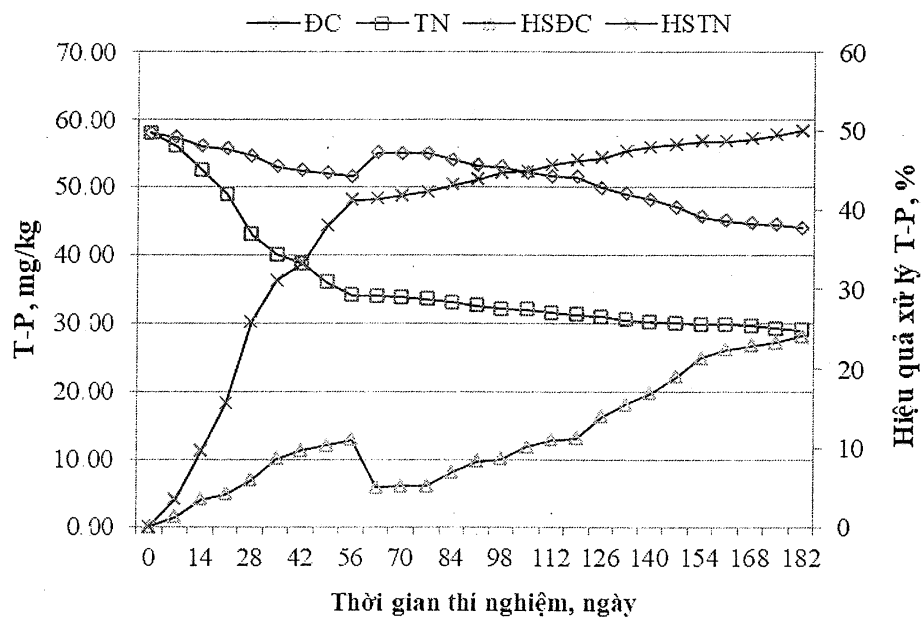
Hình 5.3



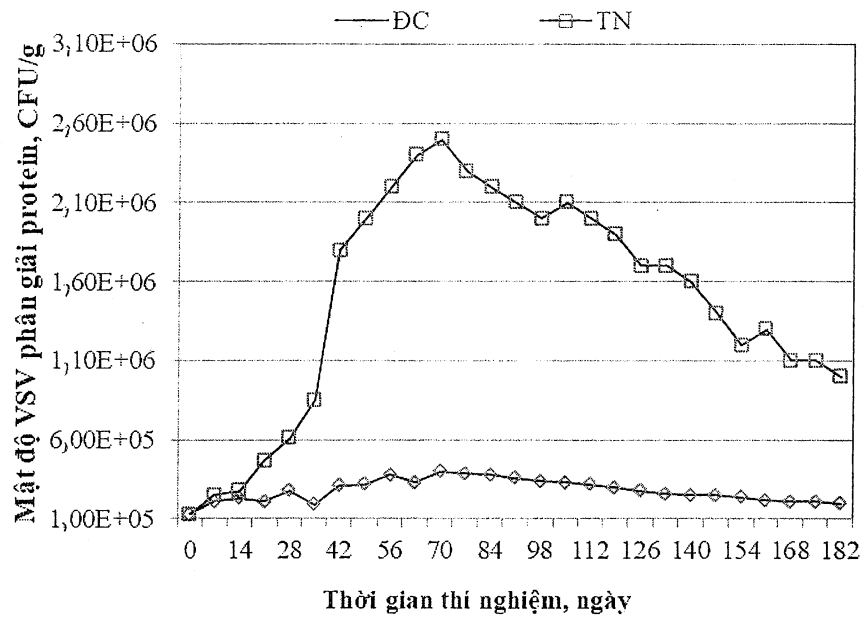
Hình 6.1



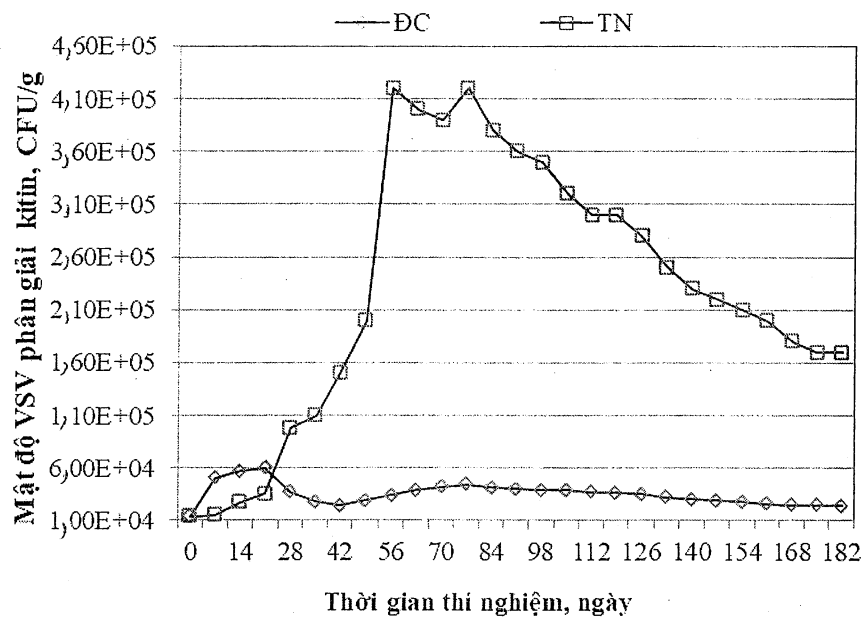
Hình 6.2



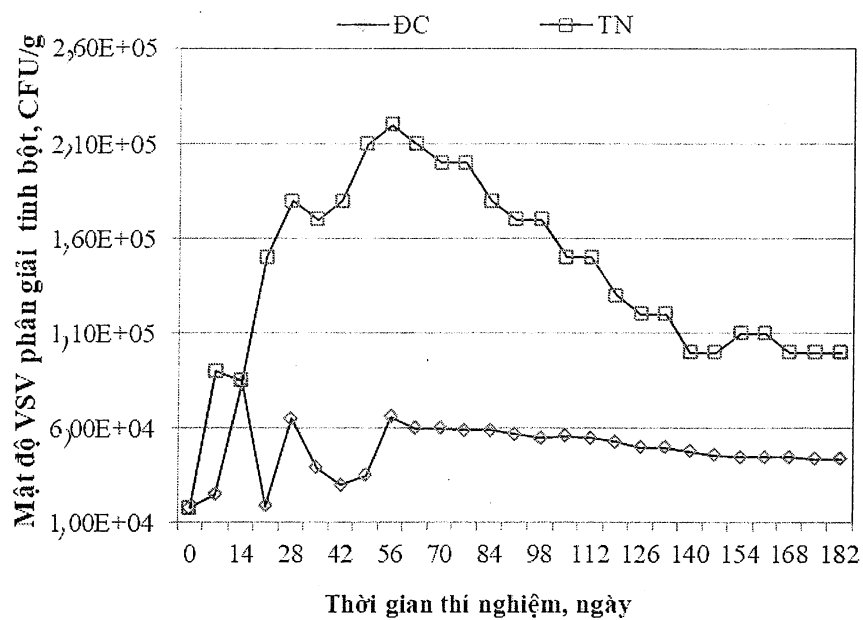
Hình 6.3



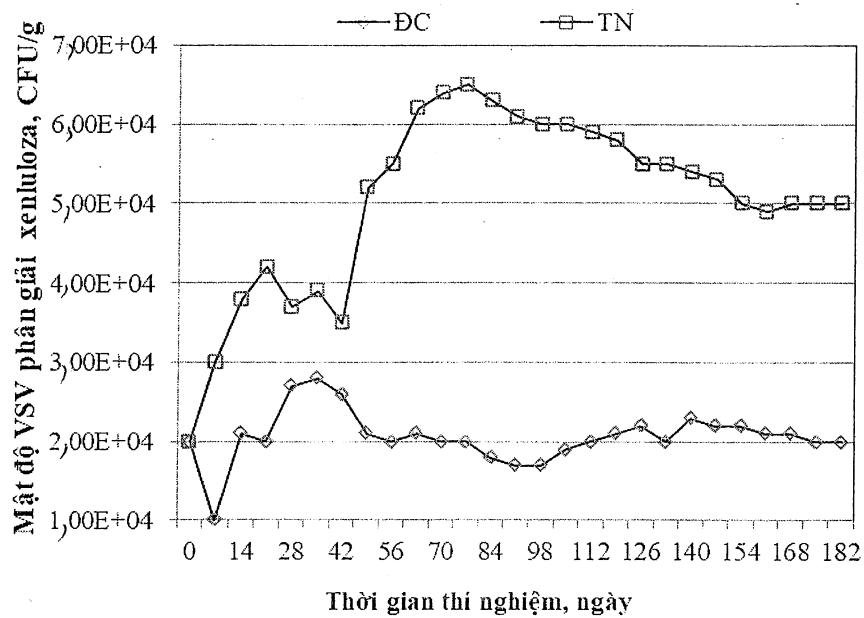
Hình 6.4



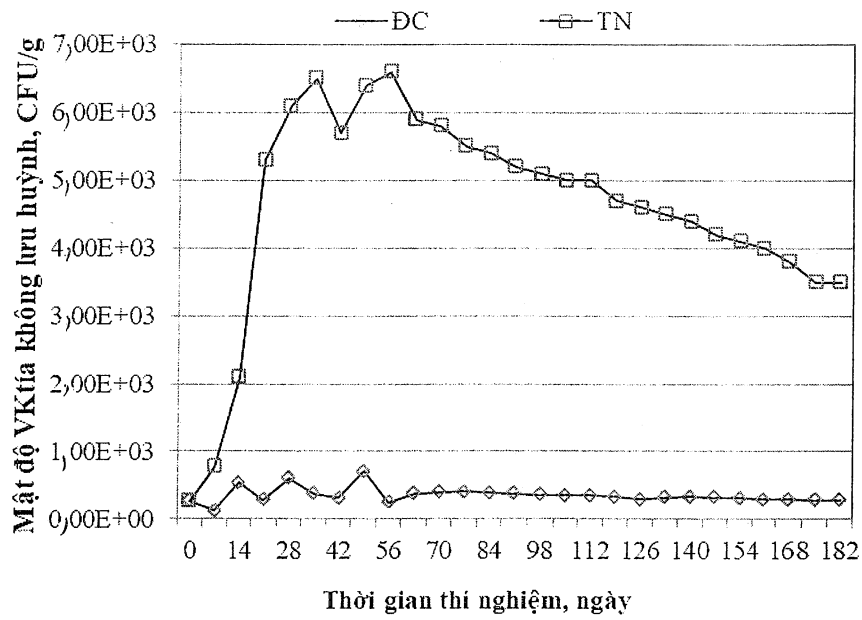
Hình 6.5



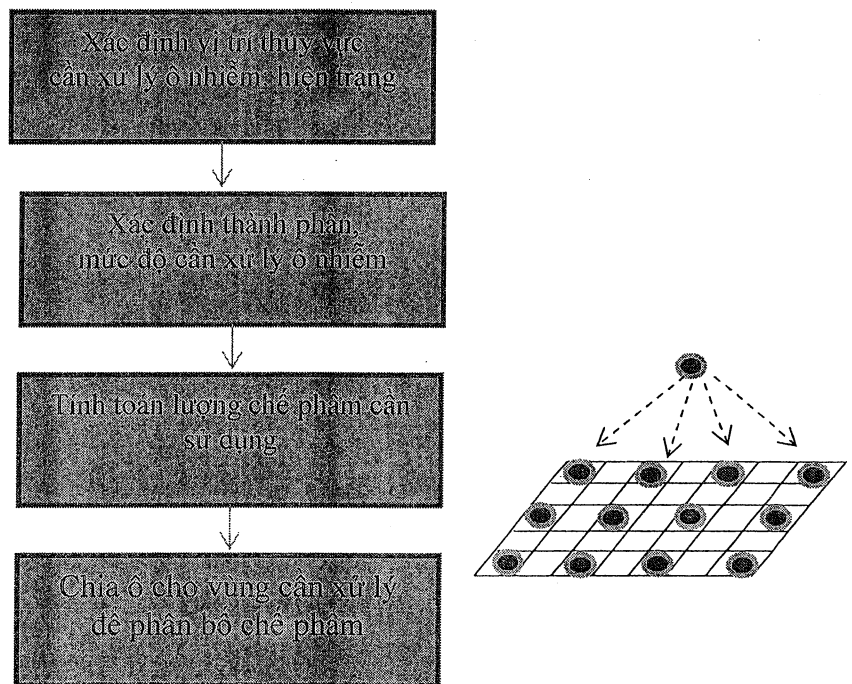
Hình 6.6



Hình 6.7



Hình 6.8



Hình 7