



(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) 
2-0002216

(51)⁷ **C12M 1/34, G01N 33/18**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00159

(22) 24.06.2016

(67) 1-2016-02314

(45) 27.01.2020 382

(43) 25.12.2017 357

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (VN)**
140 Lê Trọng Tấn, phường Tây Thạnh, quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Xuân Hoàn (VN), Nguyễn Khánh Hoàng (VN), Phạm Huy (VN), Nguyễn Thị Thúy Vân (VN), Huỳnh Thị Lê Dung (VN), Mai Thành Nghê (VN), Nguyễn Hồ Thái Sơn (VN), Nguyễn Hồng Thiên (VN)

(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) **BỘ KIT THỬ PHÁT HIỆN ĐỘC CHẤT TRONG NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỰC PHẨM**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất bộ kit thử phát hiện độc chất trong nước thải chế biến thực phẩm, trong đó bao gồm trứng *Daphnia* dạng bất hoạt (ephippia), bộ hoá chất kèm theo, các cặp đĩa petri được dùng để ấp trứng, các tấm đĩa nhựa với các giếng thử, bột tảo *Spirulina* được dùng làm thức ăn cho con non, ống nhỏ giọt để chuyển sinh vật vào giếng thử nghiệm, rây nhỏ để rửa trứng và thùng tối, kín, cách và giữ nhiệt cho phép chứa đủ các bộ phận nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập tới bộ kit thử phát hiện độc chất trong nước, cụ thể hơn là bộ kit thử phát hiện độc chất trong nước thải chế biến thực phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thử nghiệm sinh trắc sàng lọc với các loài *Daphnia* đã được phát triển bởi các nhóm nghiên cứu của Giáo sư Tiến sĩ G. Persoone tại Phòng thí nghiệm Nghiên cứu Độc học môi trường và sinh thái thủy sản thuộc Đại học Ghent, Bỉ. Phương pháp thử nghiệm này cho phép phát hiện độc chất có trong nước thải, hoá chất của ngành chế biến thủy sản cũng như một số ngành chế biến thực phẩm khác.

Thử nghiệm độc tính chất thải thông qua đáp ứng của sinh vật thử nghiệm là phương pháp khá phổ biến để xác định khả năng gây độc đối với môi trường. Các nghiên cứu cho thấy động vật giáp xác là sinh vật phù hợp để sử dụng làm tác nhân sinh học nhận biết biến đổi trong môi trường nước. Trong đó, *Daphnia magna* đã được lựa chọn làm sinh vật sử dụng trong thử nghiệm độc tính nước thải dựa trên những phân tích lựa chọn tác nhân sinh học sử dụng trong thử nghiệm độc tính nước thải chế biến của một số ngành chế biến thực phẩm. Cụ thể là, động vật giáp xác *Daphnia* được sử dụng dưới dạng trứng (ephippia). Những quả trứng được bảo vệ trong một lớp vỏ kitin (ephippium), và có thể được lưu trữ trong thời gian dài mà không bị mất khả năng hoạt động. Khi ephippia được đặt trong điều kiện môi trường phù hợp sẽ phát triển trong khoảng 3 ngày và sau đó có thể được sử dụng ngay lập tức cho các thử nghiệm độc tính.

Bộ kit thử dưới dạng kit thử nghiệm độc tố chứa toàn bộ những vật liệu cần thiết để thực hiện thử nghiệm độc tính một cách đơn giản, nhanh chóng, độ nhạy cao với chi phí thấp.

Bộ kit thử phát hiện còn có ưu điểm là sinh vật thử nghiệm được đưa vào bộ dụng cụ dưới dạng bất hoạt và chúng có thể được kích hoạt khi sử dụng. Điều này giúp giảm chi phí cho quá trình duy trì sinh vật thử nghiệm luôn trong trạng thái hoạt động. Kích thước

bộ kit thử nghiệm và không gian cần thiết để tiến hành thử nghiệm không lớn giúp giảm chi phí và dễ dàng thao tác đối với đơn vị sử dụng.

Tuy nhiên, việc nghiên cứu sản xuất bộ kit thử sử dụng *Daphnia* vẫn chưa được tiến hành nghiên cứu chuyên sâu, đồng thời chi phí sản xuất cao, dẫn tới giá thành sản phẩm cao, hạn chế khả năng sản phẩm được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống.

Do vậy, yêu cầu đặt ra là cần có một bộ kit thử đơn giản cùng quy trình sản xuất với chi phí thấp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Từ những vấn đề kỹ thuật nêu trên, sau khi đã đầu tư thời gian, công sức để nghiên cứu thử nghiệm, cải tiến, khắc phục những vấn đề còn tồn tại, tác giả giải pháp hữu ích đề xuất bộ kit thử phát hiện độc chất trong nước thải chế biến thực phẩm và quy trình sản xuất bộ kit thử này khắc phục một cách hiệu quả những hạn chế của kỹ thuật hiện có.

Cụ thể hơn là, theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích được thực hiện nhằm mục đích tạo ra bộ kit thử khả năng gây độc của nguồn nước thải sinh ra từ một số ngành chế biến thực phẩm đối với hệ sinh thái trong môi trường nước.

Để thực hiện được mục tiêu nêu trên, bộ kit thử theo giải pháp hữu ích bao gồm: Trứng *Daphnia* dạng bất hoạt (ephippia); tốt nhất là trứng được đựng trong ống nhựa 1 ml bao phủ bằng nhôm lá mỏng chứa ephippia của *Daphnia magna*; bộ hoá chất để tạo thành 2 lít dung dịch ấp trứng và pha loãng; đĩa petri được dùng để ấp trứng; tám đĩa nhựa, mỗi tám đĩa nhựa có các giếng để sử dụng cho thử nghiệm; bột tảo *Spirulina* được dùng làm thức ăn cho con non được ấp từ trứng trước khi tiến hành thử nghiệm; ống nhỏ giọt được sử dụng để chuyển sinh vật vào giếng thử nghiệm; rây nhỏ được sử dụng rửa trứng trước khi ấp; và một thùng tối, kín, cách và giữ nhiệt cho phép chứa đủ các bộ phận nêu trên.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được bộc lộ rõ hơn thông qua việc mô tả chi tiết các phương án thực hiện dưới đây. Cần lưu ý rằng phần mô tả các phương án thực hiện ưu tiên của giải pháp hữu ích được trình bày sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa và mô tả cho giải pháp

hữu ích, hoàn toàn không nhằm mục đích giới hạn các phương án thực hiện của giải pháp và giải pháp hữu ích hoàn toàn không bị giới hạn trong phần mô tả này.

Bộ kit thử nghiệm bao gồm:

Trứng *Daphnia* dạng bất hoạt (ephippia). Tốt nhất là trứng này được đựng trong các ống nhựa 1-2 ml, tốt hơn nữa là các ống nhựa chứa ephippia của *Daphnia magna* được bao phủ bằng nhôm lá mỏng để hạn chế tiếp xúc với ánh sáng. Tốt nhất là trứng được lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 3-7°C cho đến khi được sử dụng. Tốt nhất là số lượng trứng trong mỗi lọ nở ra số con non vừa đủ cho một thử nghiệm độc tính.

Bộ hoá chất kèm theo, cụ thể là bộ hóa chất bao gồm 4 ống đựng để tạo thành 2 lít dung dịch ấp trứng và pha loãng dùng trong thử nghiệm. Trong đó, Lọ 1 chứa NaHCO_3 (129,5 mg - hòa tan trong 2l = 67,75 mg/l). Lọ 2 chứa $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (588 mg - hòa tan trong 2l = 294 mg/l). Lọ 3 chứa $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (246,5 mg - hòa tan trong 2l = 123,25 mg/l). Lọ 4 chứa KCl (11,5 mg - hòa tan trong 2l = 5,75 mg/l);

Các cặp đĩa petri được dùng để ấp trứng, tốt nhất là mỗi bộ kit thử nghiệm bao gồm 8-12 cặp đĩa petri. Tốt hơn nữa là các đĩa petri này có đường kính 5cm.

Các tấm đĩa nhựa, mỗi tấm đĩa nhựa có số giếng đủ để sử dụng cho 2 thử nghiệm độc tính nước thải (số giếng cụ thể là 78)

Bột tảo *Spirulina* được dùng làm thức ăn cho con non được ấp từ trứng trước khi tiến hành thử nghiệm.

Ống nhỏ giọt được sử dụng để chuyển sinh vật vào giếng thử nghiệm.

Rây nhỏ được sử dụng rửa trứng trước khi ấp.

Thùng tối, kín, cách và giữ nhiệt cho phép chứa đủ các bộ phận nêu trên.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Sau đây là phần mô tả ví dụ thực hiện thử nghiệm phát hiện độc chất sử dụng bộ kit thử theo giải pháp hữu ích.

Thử nghiệm được thực hiện dựa trên nguyên tắc tính không lặp lại để xác định giá trị EC50 hoặc LC50 sau 24 giờ và 48 giờ phơi nhiễm trên đối tượng sinh vật thử nghiệm là con non cùng độ tuổi. Trứng sinh vật thử nghiệm (*Ephippia*) được lưu trữ tối ở nhiệt độ 5°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) để bảo đảm khả năng tồn tại.

Việc ấp trứng sinh vật chỉ thị sử dụng trong thử nghiệm được tiến hành trước khi thực hiện thử nghiệm trong 72 giờ.

Sau đó, toàn bộ trứng (*ephippia*) trong lọ được chuyển vào phễu lọc. Trứng được rửa sạch bằng nước máy để loại bỏ tất cả môi trường lưu trữ. Chuyển trứng đã rửa sạch vào đĩa petri có chứa 50 ml nước ngọt tiêu chuẩn. Đậy nắp đĩa petri và ủ trong 72 giờ, ở nhiệt độ 22°C trong điều kiện chiếu sáng liên tục với cường độ sáng tối thiểu là 6000 lux (Nguồn sáng đặt phía trên hộp lồng petri). Thử nghiệm với 120 con non có tuổi 18 giờ.

Các con *Daphnia* non sử dụng trong thử nghiệm được cung cấp thực phẩm là vi tảo (*Spirulina*) 2 tiếng trước thử nghiệm.

Một dãy nồng độ pha loãng của nước thải với tỉ lệ 100% - 50% - 25% - 12,5% và 6,25% được chuẩn bị bằng cách pha loãng liên tục theo tỉ lệ 1: 1 pha loãng với nước ngọt tiêu chuẩn. Chuyển dung dịch thử nghiệm với các nồng độ khác nhau vào giếng thử nghiệm. Ở mỗi nồng độ độc chất và mẫu chứng được lặp lại ít nhất 4 lần.

Chuyển sinh vật thử nghiệm vào giếng thử nghiệm và ủ trong môi trường nhiệt độ 22°C và không có ánh sáng.

EC50 là nồng độ ức chế hữu hiệu 50% sau thời gian thử nghiệm được tính theo tuyến tính bậc nhất của logarit phần trăm độ kìm hãm hoạt tính theo sự thay đổi nồng độ trong đó tỉ lệ phần trăm kìm hãm

$$EC50 = [1 - (S_n / S_o)] * 100\%$$

trong đó:

- S_o là hệ số góc của mẫu đối chứng
- S_n là hệ số góc khi có chất độc.

Liều gây chết 50% được tính theo công thức của Reed Muench

$$LD_{50} = \left[\frac{A-50}{A-B} \right] (a - b) + a$$

trong đó:

A là tỉ lệ phần trăm gây chết sát trên 50%

B là tỉ lệ phần trăm gây chết sát dưới 50%

a là nồng độ pha loãng tại A

b là nồng độ pha loãng tại B

Bảng 1. Kết quả thí nghiệm độc tính nước thải

	Mẫu đối chứng		C 6,25%		C 12,5%		C 25%		C 50%		C 100%	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
A	0	1	0	0	2	2	3	3	5	5	5	5
B	0	0	0	0	1	2	2	4	5	5	5	5
C	0	0	1	1	2	2	3	3	5	5	5	5
D	0	0	1	1	2	2	3	3	5	5	5	5
Tổng	0/20	1/20	2/20	3/20	9/20	10/20	11/20	13/20	20/20	20/20	20/20	20/20
% chết	0	5	10	15	45	50	55	65	100	100	100	100
LD₅₀ 24					18,75%		18,75%					
LD₅₀ 48				13,13%				13,13%				

Kết quả: LD₅₀ sau 24 giờ là dung dịch nước thải với nồng độ 18,75%. LD₅₀ sau 48 giờ là dung dịch nước thải với nồng độ 13,13%. Như vậy nước thải được khảo sát trong nghiên cứu nếu thải thẳng ra nguồn tiếp nhận mà chưa qua xử lý sẽ gây tổn hại đến hệ sinh thái môi trường nước thông qua việc làm giảm số lượng sinh vật trong chuỗi thức ăn của hệ sinh thái thủy sinh.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Bộ kit thử nghiệm độc tố chứa toàn bộ những vật liệu cần thiết để thực hiện thử nghiệm độc tính một cách đơn giản, nhanh chóng, nhạy cảm với chi phí thấp. Ưu điểm nữa của bộ kit thử nghiệm là sinh vật thử nghiệm được đưa vào bộ dụng cụ dưới dạng bất hoạt và chúng có thể được kích hoạt khi sử dụng. Cụ thể hơn là, sinh vật sử dụng trong thử nghiệm là động vật giáp xác được sử dụng dưới dạng trứng (ephippia) được bảo vệ trong một lớp vỏ kitin có thể được lưu trữ trong thời gian dài mà không bị mất khả năng tồn tại. Nhờ đó, chi phí cho quá trình duy trì sinh vật thử nghiệm luôn trong trạng thái hoạt động được giảm thiểu. Kích thước bộ kit thử nghiệm và không gian cần thiết để tiến hành thử nghiệm không lớn giúp giảm chi phí và dễ dàng thao tác đối với đơn vị sử dụng

Cần hiểu rằng, phần mô tả chi tiết, ví dụ thực hiện trên đây cùng các hình vẽ kèm theo chỉ nhằm mục đích minh họa cho giải pháp hữu ích, chứ hoàn toàn không nhằm mục đích giới hạn phạm vi giải pháp hữu ích. Từ phần mô tả chi tiết cùng với các hình vẽ, người có trình độ kỹ thuật trung bình trong cùng lĩnh vực có thể có những thay đổi, cải biến khác nữa, những thay đổi này không nằm ngoài phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích, được xác định trong phần yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Bộ kit thử phát hiện độc chất trong nước thải chế biến thực phẩm, trong đó bộ kit thử này bao gồm:

trứng *Daphnia* dạng bất hoạt;

bộ hoá chất kèm theo bao gồm 4 ống đựng để tạo thành 2 lít dung dịch, trong đó, lọ 1 chứa NaHCO_3 ở nồng độ 67 mg/l, lọ 2 chứa $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ 294 mg/l, lọ 3 chứa $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ 123 mg/l, lọ 4 chứa KCl ở nồng độ 6 mg/l;

các cặp đĩa petri được dùng để ấp trứng;

các tấm đĩa nhựa, mỗi tấm đĩa nhựa có 78 số giếng đủ để sử dụng cho 2 thử nghiệm độc tính nước thải;

bột tảo *Spirulina* được dùng làm thức ăn cho con non được ấp từ trứng *Daphnia* trước khi tiến hành thử nghiệm;

ống nhỏ giọt được sử dụng để chuyển sinh vật vào giếng thử nghiệm;

rây nhỏ được sử dụng rửa trứng trước khi ấp; và

thùng tối, kín, cách và giữ nhiệt cho phép chứa đủ các bộ phận nêu trên.

2. Bộ kit thử theo điểm 1, trong đó trứng *Daphnia* được đựng trong các ống nhựa 1-2 ml, được bao phủ bằng nhôm lá mỏng để hạn chế tiếp xúc với ánh sáng, được lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 3-7°C cho đến khi được sử dụng.

3. Bộ kit thử theo điểm 1, trong đó bao gồm 8-12 cặp đĩa petri có đường kính 5cm.