



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

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

(11)



2-0003063

(51) **A61K 36/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00339

(22) 24/04/2020

(62) 1-2020-02347

(45) 27/03/2023 420

(43)

(73) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Đặng Diễm Hồng (VN); Hoàng Thị Minh Hiền (VN); Lê Thị Thơm (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA DỊCH CHIẾT TỪ LÁ BÀNG VÀ LÁ ỒI
CÓ KHẢ NĂNG DIỆT KHUẨN TRONG NUÔI TRỒNG VI KHUẨN LAM *SPIRULINA*
PLATENSIS Ở QUY MÔ CÔNG NGHIỆP

(57) Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước (i) chuẩn bị dịch chiết từ lá bàng, (ii) chuẩn bị dịch chiết từ lá ổi và (iii) tạo chế phẩm. Sáng chế tạo ra chế phẩm có khả năng kháng khuẩn ở các nồng độ 5% và 10% trên đĩa thạch, nồng độ 0,2‰ và 0,5‰ trong môi trường LB lỏng và ở các hệ thống nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* cấp độ bình tam giác 250mL và bình nhựa 10 lít.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong số các loài vi tảo đang sử dụng phổ biến hiện nay, *Spirulina platensis* là một loài thuộc ngành vi khuẩn lam được nuôi trồng phổ biến ở nhiều nước như Mỹ, Trung Quốc, Đài Loan, Thái Lan, Ấn Độ và Việt Nam. *Spirulina platensis* chứa nhiều chất dinh dưỡng như protein, vi lượng, vitamin, polysacarit, cacbohydrat, các axit béo mạch dài không bão hòa đa nối đôi, v.v., được coi là nguồn thức ăn bổ sung có giá trị cho người và động vật nuôi, làm thuốc chữa bệnh, làm phân bón hữu cơ và được dùng để xử lý nước thải (Costa và cộng sự, 2003; Chu, 2012). Đến nay, diện tích nuôi trồng *S. platensis* đã được mở rộng lên tới hàng trăm hecta như ở Công ty Sosa Texcoco (Mexico), Hawaii (Mỹ), Siam (Thái Lan) và Hainan (Trung Quốc). Bên cạnh đó, quy mô thị trường toàn cầu cho các sản phẩm thực phẩm dạng thuốc từ *Spirulina* được ước tính khoảng 30-60 tỷ đô la và cho các sản phẩm từ vi khuẩn lam *Spirulina* là trên 197 tỷ đô la (Soni và cộng sự, 2017).

Hiện nay, nuôi trồng sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* để thương mại hóa sản phẩm thường được thực hiện ở nhiều quy mô công nghệ khác nhau (Deamici và cộng sự, 2018; Đặng Diễm Hồng và cộng sự, 2017). Tảo có thể được nuôi trong bình nhựa, bể chứa bằng xi măng hoặc composit, các bể lớn xây dựng ngoài trời hoặc trong hệ thống bể phản ứng quang sinh - photobioreactor (PBRs). Mặc dù, nuôi vi khuẩn lam *Spirulina* theo hình thức nào (bể hở hay PBRs) và ở quy mô lớn hay nhỏ, việc bảo đảm vô trùng, không nhiễm vi sinh vật và nhiễm tảo tạp là một tiêu chí phải bảo đảm, nhưng đòi hỏi chi phí cao. Trong quá trình nuôi *Spirulina* thường bị nhiễm các loài virus, vi khuẩn, nấm, động vật phù du, động vật nguyên sinh và các loài tảo tạp khác nhau gây ra. Sinh khối tảo bị nhiễm vi sinh vật và tảo tạp thường chiếm đến 30% tổng sản lượng sinh khối tảo nuôi trồng được đã dẫn đến làm tăng cao giá thành sản phẩm từ vi tảo. Wang và cộng sự (2016) khi phân tích 65 bể nuôi tảo ngoài trời thuộc hai vùng phía Đông và Bắc của Trung Quốc đã xác định được sự có mặt của 3 loài rotifer (*Brachionus plicatilis*, *Trichocerca* và *Lecane* sp.), 2 loài amip (*Nuclearia simplex* và *Euplaesiobystra hypersalinica*) và 11 loài trùng lông (*Frontonia didieri*, *Didinium nasutum*, *Euplotes euryhalinus*, *Meseres corlissi*, *Cyclidium marinum*, *Gastrostyla*

steinii, *Schmidingerothrix* sp., *Vorticella microstoma*, *Spathidium* sp., *Suctorina* sp. và *Oxytricha* sp.). Hoekstra và cộng sự (2011) đã xác định được sự có mặt của 5 loài *Clostridium* trong sinh khối tảo *Spirulina* đang được thương mại hóa. Vardaka và cộng sự (2016) khi phân tích sinh khối và các sản phẩm tảo *Spirulina* đang được thương mại hóa trên thị trường đã phát hiện được sự có mặt của các vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Fusobacterium* và *Enterococcus*. Năm 2016, Mogale đã phát hiện thấy 11 loài vi khuẩn thuộc các nhóm *Alkalimonas delamerensis*, *Cecembia lonaresis*, *Pseudomonas mendocina*, *Paenibacillus camelliae*, *Halomonas* sp., *Mesorhizobium* sp., *Idiomarina* sp. và *Micrococcus* sp. trong cả bể nuôi lẫn trong sinh khối tảo. Điều này làm giảm tính thuần nhất của sản phẩm và giảm đáng kể năng suất nuôi trồng cũng như không bảo đảm an toàn sức khỏe cho người sử dụng.

Ở Việt Nam, *S. platensis* đang được nuôi trồng khá phổ biến trên quy mô vừa, bán công nghiệp và công nghiệp để cung cấp sinh khối cho thương mại sản phẩm từ sinh khối tảo nuôi được. Ví dụ như Công ty CP tảo tại Vĩnh Hảo, Bình Thuận có năng suất 10-15 tấn tảo khô/năm; Công ty cổ phần Khoa học xanh Hidumi Pharma - Quỳnh Lương, tỉnh Nghệ An có năng suất 5-10 tấn khô/năm; Công ty cổ phần Long Phú, Quảng Xương, Thanh Hóa có năng suất khoảng 1 tấn khô/năm; Công ty TNHH Công nghệ Sinh học Vinatao®, Hòa Lạc, Hà Nội với năng suất khoảng 5-6 tấn khô/năm. Tuy nhiên, chỉ có khoảng 50-60% tảo thu hoạch đạt tiêu chuẩn chất lượng và an toàn cho sức khỏe con người được sử dụng dạng tươi hoặc chế biến thành dạng viên nang, viên nén và thực phẩm chức năng như tảo tươi *Spirulina* Vinatao®, Viên tảo xoắn *Spirulina* khô Vinatao®, cốm tảo Spivital Kid, tảo xoắn Spivital Nutri, tảo xoắn MICHIO, v.v., 40-50% tổng số sinh khối tảo còn lại bị nhiễm vi sinh vật và tảo tạp khác trong quá trình nuôi. Theo nghiên cứu của chúng tôi tại Công ty CP Khoa học xanh Hidumi Pharma, Quỳnh Lương, Nghệ An từ tháng 3-8/2018 cho thấy trong tất cả các cấp độ nuôi trồng *S. platensis* đều có khả năng bị lây nhiễm vi sinh vật, đặc biệt là sự có mặt của các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Hallomonas*. Đây là một trong những vấn đề khó khăn, tạo thách thức đối với các doanh nghiệp cần phải giải quyết đồng bộ vì sản phẩm làm ra mặc dù chưa đủ để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường trong khi đó sản lượng tảo không đảm bảo chất lượng lại tồn kho cao, cần tìm hướng giải quyết để nâng cao năng suất nuôi trồng *Spirulina* hiện nay. Trong khi đó, cho đến nay chưa có một công trình công bố nào liên quan đến việc nghiên cứu khai thác, tạo và sử dụng các chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ thực vật và thảo dược trong phòng ngừa và giảm thiểu sự lây nhiễm của vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy *Spirulina* ở quy mô công nghiệp tại Việt Nam. Trong khi đó, có rất nhiều nghiên cứu sử dụng cao chiết có hoạt tính từ thực vật và thảo dược có tác dụng kháng khuẩn,

kháng virus được áp dụng trong quá trình nuôi thủy, hải sản. Tác giả Trịnh Thị Trang và Nguyễn Thanh Hải (2016) đã công bố sử dụng cao khô dịch chiết từ lá trà không có tác dụng ức chế đối với vi khuẩn *Aeromonas* sp. và *Streptococcus agalactiae*. Nguyễn Thiện Chí và cộng sự (2016) công bố tinh dầu trà không có khả năng ức chế sự tăng trưởng của 3 loài vi sinh vật: *B. subtilis*, *F. oxysporum* và *A. niger* với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC) lần lượt là 100, 200 và 200 µg/mL. Triệu Thị Thanh Hằng và cộng sự (2018) thông báo các dịch chiết từ hạt và lá cây trám bầu có khả năng kháng một số loài vi khuẩn như *Aeromonas hydrophyla*, *Edwardsiella ictaluri* và *Vibrio parahaemolyticus*. Huỳnh Kim Diệu và Phan Thị Tư, (2015) nhận thấy cao chiết cây Lược Vàng có khả năng kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ($512 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 1024 \mu\text{g/mL}$), *Edwardsiella* sp. ($1024 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 2048 \mu\text{g/mL}$), *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Aeromonas hydrophila* ($2048 \mu\text{g/mL} \leq \text{MIC} \leq 4096 \mu\text{g/mL}$), với *Escherichia coli* và *Salmonella* spp., có MIC = 6400 µg/mL. Huỳnh Kim Diệu và Nguyễn Thu Han Ni (2017), Huỳnh Kim Diệu và Võ Thị Tuyết (2014) cũng thông báo cao chiết cây cứt lợn (tên thường gọi khác là Xuyên Chi) và cây Phong huệ có tác dụng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*.

Do đặc điểm cấu tạo của hệ thống nuôi bể hở, việc nhiễm vi sinh vật là rất cao như đã nói ở trên cũng có thể là môi trường giàu dinh dưỡng được sử dụng cho nuôi tảo đã là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn tự nhiên (đã có mặt trong bể nuôi) xảy ra cùng với sự phát triển của tảo trong bể nuôi (Cole, 1982; Reynold, 1994; Stenuite và cộng sự, 2009). Do đó, cần phải có các phương pháp nuôi cấy và quản lý bể nuôi thích hợp thì mới đảm bảo sinh khối nuôi đạt được các yêu cầu về chất lượng sinh khối. Để giảm nhiễm vi sinh vật, có thể sử dụng các môi trường nuôi chọn lọc cho nuôi trồng một số vi tảo như môi trường có độ kiềm cao (cho nuôi *Spirulina*), độ mặn cao (cho nuôi *Dunaliella*) và dinh dưỡng xác định (cho nuôi *Chlorella*) (Lee, 1986). Để kiểm soát sự lây nhiễm vi sinh vật/ vi khuẩn trong nuôi trồng vi tảo nói chung và vi khuẩn lam *Spirulina* nói riêng đòi hỏi phải có kiến thức và hiểu biết về quần thể vi khuẩn xuất hiện trong môi trường nuôi và xung quanh vị trí nuôi cũng như các tương tác giữa quần thể vi sinh vật nêu trên với sự sinh trưởng của vi tảo đích cần nuôi, để từ đó có thể giúp giảm thiểu các rủi ro và bất lợi của các hệ thống nuôi hở gây ra (Lakaniemi và cộng sự, 2012).

Các biện pháp hiện nay đang được sử dụng để kiểm soát ô nhiễm vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy tảo là khử trùng môi trường nuôi cấy bằng tia cực tím (UV), bổ sung kháng sinh, thuốc bảo vệ thực vật, các chất chống oxy hóa cao như ozon, clorin,

hydrogen peroxid. Mặc dù các biện pháp nêu trên cho hiệu quả xử lý nhiễm vi sinh vật ở các mức độ khác nhau, nhưng chúng cũng tồn tại rất nhiều hạn chế khi áp dụng cho nuôi trồng vi tảo bằng các hệ thống bể hở ở ngoài trời (Moreno-Garrido và Canavate, 2001; Li và cộng sự, 2006).

Hiện nay, sử dụng các dịch chiết từ thực vật và thảo dược được xem như là một trong các giải pháp khả thi nhất trong công tác kiểm soát sự lây nhiễm của vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy tảo ở quy mô công nghiệp. Sử dụng dịch chiết từ thực vật và thảo dược sẽ hạn chế được việc sử dụng quá nhiều kháng sinh, tránh được sự tồn dư kháng sinh trong sản phẩm, tốt cho sức khỏe con người và giảm được rào cản về dư lượng kháng sinh trong việc thương mại hóa sản phẩm.

Chính vì vậy, việc tìm kiếm một chế phẩm có nguồn gốc thảo dược có nồng độ thích hợp được bổ sung vào môi trường nuôi vi khuẩn lam *Spirulina platensis* nhằm khắc phục được các nhược điểm nêu trên là rất cần thiết, góp phần làm giảm giá thành sản phẩm được tạo ra từ sinh khối tảo này.

Bản chất kĩ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đưa ra một quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi đơn giản, dễ thực hiện trên quy mô nuôi lớn nhưng lại có hiệu quả diệt khuẩn cao. Chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có hiệu quả diệt khuẩn cao trong quá trình nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis*, không ảnh hưởng đến chất lượng sinh khối tảo nuôi trồng được và góp phần giảm giá thành sản phẩm được tạo ra từ sinh khối tảo. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị dịch chiết từ lá bàng (dịch chiết B): bổ sung nước vào lá bàng khô (lá rơi từ cây, có màu đỏ, không có lỗ thủng nào trên lá) theo tỉ lệ nước:lá bàng khô là 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; tiếp tục bổ sung nước vào phần bã theo tỉ lệ nước:bã là 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; lặp lại 4 lần quá trình nêu trên và thu toàn bộ dịch trong; dịch chiết trong này được cô đặc bằng cách đun cách thủy cho bay hơi đến khi thu được thể tích cuối cùng sao cho tỉ lệ dịch chiết:nguyên liệu lá bàng khô ban đầu là 2,5mL:1g (thể tích:khối lượng) và được bảo quản ở -20°C;

(ii) chuẩn bị dịch chiết từ lá ổi (dịch chiết O): nghiền lá ổi tươi (lá bánh tẻ) bằng máy xay sinh tố, bổ sung nước cất vào lá ổi trên theo tỉ lệ nước:lá ổi là 70mL:30g (thể tích:khối lượng); khuấy liên tục với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ, ở điều kiện 100°C và thu toàn bộ dịch chiết bằng cách lọc qua giấy lọc thô; dịch chiết

trong này được đun cách thủy cho đến khi bay hơi thu được thể tích cuối cùng sao cho tỉ lệ dịch chiết:nguyên liệu lá ổi ban đầu là 1mL:3g (thể tích: khối lượng) và được bảo quản ở -20°C ; và

(iii) tạo chế phẩm: phối trộn dịch chiết từ lá bàng ở bước (i) và dịch chiết từ lá ổi ở bước (ii) theo tỉ lệ phối trộn là 1:1 (thể tích:thể tích) thu được chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Tác dụng ức chế vi khuẩn *B. amyloliquefacience* của dịch chiết B, dịch chiết O và Sittodin.

Hình 2: Tác dụng ức chế vi khuẩn *B. subtilis* của dịch chiết B, dịch chiết O và Sittodin.

Hình 3: Tác dụng ức chế vi khuẩn *P. baetica* của dịch chiết B, dịch chiết O và Sittodin.

Hình 4: Tác dụng ức chế 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis* và *P. baetica* của chế phẩm.

Hình 5: Ảnh minh họa tác dụng ức chế sinh trưởng của 2 loài vi khuẩn *B. subtilis* và *P. baetica* của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau.

Hình 6: Kết quả thử nghiệm bổ sung chế phẩm trong môi trường nuôi cấy *S. platensis* ở cấp độ bình tam giác 250mL. (A): Ảnh hình thái *S. platensis* chụp dưới kính hiển vi quang học; B: Ảnh bình nuôi cấy tảo *S. platensis* sau khi được bổ sung chế phẩm ở các nồng độ khác nhau; C: Ảnh phân lập vi khuẩn trong môi trường nuôi *S. platensis* được bổ sung chế phẩm ở các nồng độ khác nhau.

Hình 7: Kết quả thử nghiệm bổ sung chế phẩm trong môi trường nuôi cấy *S. platensis* ở quy mô bình nhựa 10 lít. (A): Ảnh hình thái *S. platensis* được chụp dưới kính hiển vi quang học; (B): Ảnh bình nuôi cấy tảo *S. platensis* sau khi được bổ sung chế phẩm ở các nồng độ khác nhau; (C): Ảnh phân lập vi khuẩn trong môi trường nuôi *S. platensis* được bổ sung chế phẩm ở nồng độ 0,2‰ và 0,5‰. Các hàng từ trái sang phải: bình nuôi không được bổ sung chế phẩm, bình nuôi được bổ sung chế phẩm có nồng độ 0,2‰ và bổ sung chế phẩm có nồng độ 0,5‰

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị dịch chiết từ lá bàng (dịch chiết B):

Lá bàng khô sau khi kết thúc chu kỳ sống trên cây và rụng xuống được lựa chọn lá có màu đỏ, không có một lỗ nào trên bản lá và được phơi khô trong điều kiện tự nhiên cho đến khi lá khô hoàn toàn. Để sản xuất dịch chiết lá bàng bằng cách bổ sung VmL nước vào lá bàng khô theo tỉ lệ nước:lá bàng khô là 10mL:1g (thể tích:khối

lượng), đun sôi (100°C) trong thời gian 30 phút. Nước được đun sôi sẽ giúp tách chiết nhanh và triệt để các hợp chất có trong lá bàng. Cách chiết này rất nhanh chóng và đơn giản cho phép thu được dịch trong màu vàng cánh gián; tiếp tục bổ sung VmL nước vào phần bã theo tỉ lệ nước:bã là 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi (100°C) trong thời gian 30 phút, thu dịch trong. Quá trình chiết được lặp lại liên tục 4 lần để thu toàn bộ dịch trong. Thực nghiệm của chúng tôi cho thấy quá trình đun sôi được lặp lại 4 lần liên tiếp thì đã tách chiết gần như hết các chất có hoạt tính từ lá bàng (được thể hiện bằng dịch chiết đến lần thứ tư thì không còn thu được dịch màu vàng cánh gián là màu đặc trưng của dịch chiết nữa). Toàn bộ dịch trong thu được sau 4 lần đun sôi được trộn lẫn vào với nhau. Dịch chiết trong này được đun cách thủy cho bay hơi đến khi thu được thể tích cuối cùng $V_1\text{mL}$ ($V_1\text{mL}$ dịch chiết:nguyên liệu lá bàng khô ban đầu theo tỉ lệ 2,5mL:1g (thể tích:khối lượng)). Quá trình này nhằm cô đặc dịch thu được đồng thời làm tăng nồng độ của các chất có hoạt tính sinh học có trong dịch chiết. Dịch chiết được bảo quản ở -20°C , gọi là dịch chiết B;

(ii) Chuẩn bị dịch chiết từ lá ổi (dịch chiết O):

Sản xuất dịch chiết từ lá ổi bằng cách nghiền lá ổi tươi (lá không già và cũng không non - lá bánh tẻ) bằng máy xay sinh tố, bổ sung $V_2\text{mL}$ nước cất vào lá ổi trên theo tỉ lệ 70mL: 30g lá (thể tích: khối lượng). Khuấy liên tục với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ, ở điều kiện 100°C . Máy say sinh tố được sử dụng để nghiền lá ổi tươi, kết hợp với khuấy từ liên tục nhằm làm tăng diện tích tiếp xúc giữa nước và lá ổi. Do đó, giúp cho quá trình chiết sẽ nhanh và triệt để hơn. Thu toàn bộ dịch chiết trong bằng cách lọc qua giấy lọc thô. Dịch trong này được đun cách thủy cho bay hơi đến khi thu được thể tích cuối cùng $V_3\text{mL}$ ($V_3\text{mL}$ dịch chiết:nguyên liệu lá ổi ban đầu theo tỉ lệ 1mL: 3g (thể tích: khối lượng)). Quá trình này nhằm cô đặc dịch thu được đồng thời làm tăng nồng độ của các chất có hoạt tính sinh học có trong dịch chiết. Dịch chiết thu được được bảo quản ở -20°C , gọi là dịch chiết O;

(iii) Tạo chế phẩm:

Dịch chiết từ lá bàng ở bước (i) và dịch chiết từ lá ổi ở bước (ii) được phối trộn theo tỉ lệ phối trộn là 1:1 (thể tích:thể tích) để thu được chế phẩm.

– Kiểm tra khả năng kháng khuẩn của chế phẩm ở các nồng độ 5% và 10% trên đĩa thạch, nồng độ 0,2‰ và 0,5‰ trên môi trường LB lỏng và ở trong các hệ thống nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* quy mô bình 250mL và 10 lít, trong đó:

– Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Nuôi cấy 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* trong môi trường LB lỏng đến khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt 10^8 tế bào/mL, lắc đều bình chứa các vi khuẩn nêu trên, dùng pipet hút 100 μL dung dịch vi khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch. Dùng que cấy thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch

khô. Sau 10 - 15 phút, đục 4-5 giếng với đường kính khoảng 10mm, bổ sung 100 μ L dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm vào các giếng riêng biệt, giữ các đĩa thí nghiệm ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ cho tới khi dịch chiết từ các giếng khuếch tán ra môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Sau đó, đặt các đĩa nêu trên vào tủ ấm 37°C trong 24 giờ. ĐC (+) là dung dịch kháng sinh ampicillin (5mg/mL); ĐC (-) là nước cất. Hoạt tính ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật theo công thức: BK (mm) = D-d; trong đó D = đường kính vòng vô khuẩn và d = đường kính lỗ khoan thạch. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình. Kết quả thu được dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm ở các nồng độ 5 và 10% dịch chiết có khả năng diệt cả 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis* và *P. baetica*.

Môi trường LB thạch có thành phần gồm: 5g/L cao nấm men, 10g/L trypton, 5g/L NaCl, agar 15g/L, khử trùng ở 121°C, 15 phút trước khi sử dụng. Ba loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis* và *P. baetica* đã được phòng Công nghệ Tảo - Viện Công nghệ sinh học phân lập trong các hệ thống nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở Công ty Cổ phần khoa học xanh Hidumi pharma, Quỳnh Lương, Nghệ An - có tổng diện tích nuôi trồng 3 ha, có các hệ thống nuôi trồng ở quy mô công nghiệp với các hệ thống nuôi giống cấp 1, giống cấp 2, giàn photobioreactor, bể nuôi có thể tích dịch môi trường nuôi từ 10 - 200m³. Vì vậy, các loài vi sinh vật phân lập được từ các hệ thống nuôi này rất đặc trưng cho các vi sinh vật gây nhiễm cho quá trình nhân nuôi vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô công nghiệp.

Trong lá bàng có chứa một số flavonoid (chẳng hạn kameferol hay quercetin) cũng như các chất tanin (như punicalin, punicalagin, tercatin), các chất saponin và phytosterol (Duke, 2008). Trong đó, thành phần tanin có trong lá bàng có thể ức chế biểu hiện của một số vi sinh vật gây hại (Akharaiyi và cộng sự, 2011). Lá ổi chứa tinh dầu (0,38%) trong đó có so-caryophyllen (33,53%), veridifloren (13,00%), farnesen (11,65%), dl-limonen (9,84%), d-cadinen (1,75%), α -copaen (2,80%), α -humulen (3,74%) và s-cadinol (0,08%). Trong lá ổi non và búp non còn có 7-10% tanin pyrogalic, khoảng 3% nhựa. Tinh dầu ổi có hoạt tính kháng khuẩn cao chống lại cả hai loài vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Weli và cộng sự, 2019). Do vậy, trong dịch chiết B và O có hoạt chất kháng khuẩn.

– Tác dụng diệt khuẩn của chế phẩm trong môi trường LB lỏng: Các khuẩn lạc đơn của 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis* và *P. baetica* được nuôi trong môi trường LB lỏng, ở máy lắc ổn nhiệt 37°C có tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12-14 giờ cho đến khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt 10⁸ tế bào/mL. Sau khi kết thúc nuôi các bình chứa khuẩn được lắc đều bằng tay rồi dùng pipet hút 50 μ L dung dịch vi khuẩn và nhỏ vào lọ penicilin vô trùng chứa 5mL môi trường LB lỏng có bổ sung chế phẩm ở

các nồng độ 0,1%, 0,2%, 0,5% và 1%. Dung dịch kháng sinh ampicillin (5mg/mL) được bổ sung vào môi trường LB là công thức ĐC (+) hoặc nước cất là công thức ĐC (-). Các bình thí nghiệm có chứa vi khuẩn được nuôi trong máy lắc ổn nhiệt ở 37°C có tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12-14 giờ. Khả năng ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo độ đục tế bào - đo mật độ quang OD bằng máy quang phổ Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Nhật Bản) ở bước sóng 600nm (OD_{600nm}). Kết quả chế phẩm ở các nồng độ 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% có tác dụng ức chế 3 loài vi khuẩn thử nghiệm *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis* và *P. baetica*.

Môi trường LB lỏng có thành phần gồm: 5g/L cao nấm men, 10g/L trypton, 5g/L NaCl, khử trùng ở 121°C trong 15 phút trước khi sử dụng.

– Kiểm tra tác dụng kháng khuẩn và diệt vi sinh vật lây nhiễm của chế phẩm trong nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô pilot, cấp độ bình tam giác 250mL: bổ sung chế phẩm ở các nồng độ 0,1%, 0,2%, 0,5% và 1% vào các bình tam giác 250mL có chứa 100mL môi trường SOT nuôi cấy vi khuẩn lam *S. platensis*. ĐC (-) là công thức không bổ sung chế phẩm và ĐC (+) là công thức được bổ sung sittodin (1 lít sittodin/15000000m³ môi trường). Các công thức thí nghiệm có mật độ giống ban đầu $OD_{556nm} = 0,3$. Môi trường ban đầu của thí nghiệm (tại thời điểm 0 ngày) được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB thạch. Kết quả là không phát hiện thấy vi khuẩn trên đĩa thạch, điều này chứng tỏ tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm mẫu sạch và không bị nhiễm vi khuẩn. Thí nghiệm được tiến hành nuôi tĩnh, ở nhiệt độ phòng, chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ. Sau 15 ngày nuôi cấy, tảo sinh trưởng phát triển bình thường, môi trường của các công thức trên cũng được sử dụng làm nguồn mẫu để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB thạch. Kết quả đã xác định chế phẩm ở các nồng độ 0,2%, 0,5% và 1% không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo nhưng lại có tác dụng ức chế và ngăn ngừa phát triển của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy tự nhiên.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn lam *S. platensis* (SOT) gồm: 16,8g/L NaHCO₃; 0,5g/L K₂HPO₄; 2,5g/L NaNO₃; 1g/L K₂SO₄; 1g/L NaCl; 0,2g/L MgSO₄.7H₂O; 0,03g/L CaCl₂.2H₂O; 0,08g/L Na₂EDTA; 0,01g/L FeSO₄.7H₂O và 1mL/L vi lượng gồm 2,85g/L H₃BO₃; 1,81g/L MnCl₂.4H₂O; 0,22g/L ZnSO₄.7H₂O; 0,08g/L CuSO₄.5H₂O; 0,015g/L MoO₃; 44mg/L Co(NO₃)₂. 6H₂O khuấy đều cho tan hoàn toàn, khử trùng ở 121°C, 15 phút trước khi sử dụng.

– Kiểm tra tác dụng kháng khuẩn và diệt vi sinh vật lây nhiễm của chế phẩm trong nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô pilot, cấp độ bình 10 lít: bổ sung chế phẩm ở các nồng độ ĐC (0%), 0,2% và 0,5% vào các bình nhựa 10 lít có chứa 7 lít môi trường SOT cho nuôi cấy vi khuẩn lam *S. platensis*. ĐC là công thức không bổ sung chế phẩm (0%). Các công thức thí nghiệm có mật độ giống vi khuẩn lam ban đầu có $OD_{556nm} = 0,3$. Môi trường ban đầu của thí nghiệm (tại thời điểm 0 ngày) và sau 10

ngày thí nghiệm sẽ được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB thạch. Kết quả là không phát hiện thấy vi khuẩn trên đĩa thạch ở thời điểm 0 ngày. Điều này chứng tỏ, tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm mẫu sạch và không bị nhiễm vi khuẩn. Thí nghiệm được tiến hành nuôi sục khí với tốc độ dòng khí là 0,5 lít/lít/phút, tại nhiệt độ phòng, chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ. Sau 10 ngày nuôi cấy, tảo sinh trưởng phát triển bình thường, môi trường của các công thức trên cũng được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB. Kết quả đã xác định chế phẩm ở các nồng độ 0,2%, 0,5% đã không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo nhưng lại có tác dụng ức chế/ngăn ngừa sự phát triển của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy tự nhiên.

Việc sử dụng bình 10 lít để thử khả năng kháng và diệt vi sinh vật của chế phẩm là phù hợp với quy mô giống cấp 2 ở các Công ty nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* hiện nay như ở Công ty Cổ phần khoa học xanh Hidumi Pharma, Quỳnh Lương, Nghệ An. Với các bình nuôi 10 lít này thực tế môi trường nuôi rất dễ bị nhiễm vi sinh vật. Do đó, kết quả thu được rất hữu ích và hiệu quả để có thể sử dụng chế phẩm trong xử lý tạp nhiễm vi sinh vật ở các quy mô lớn hơn của vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở Việt Nam.

Như vậy, chế phẩm theo sáng chế chứa dịch chiết từ lá bàng và từ lá ổi ở các nồng độ (5% và 10%) trên môi trường thạch và nồng độ 0,2% và 0,5% được bổ sung cho môi trường nuôi cấy lỏng đã có tác dụng kháng khuẩn và vi sinh vật chính xuất hiện trong nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô công nghiệp của Việt Nam. Chế phẩm theo sáng chế được gọi tên là chế phẩm CPBO.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị dịch chiết từ lá bàng (dịch chiết B):

Sản xuất dịch chiết từ lá bàng bằng cách bổ sung 200mL nước vào 20g lá bàng khô theo tỉ lệ 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; tiếp tục bổ sung 200mL nước vào phần bã theo tỉ lệ 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi (100°C) trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; lặp lại 4 lần thu để toàn bộ dịch trong được khoảng 800mL. Dịch chiết trong này được đun cách thủy cho đến khi nước bay hơi để thu được thể tích cuối cùng 50mL và được bảo quản ở -20°C, gọi là dịch chiết B;

(ii) chuẩn bị dịch chiết từ lá ổi (dịch chiết O):

Sản xuất dịch chiết lá ổi bằng cách nghiền lá ổi tươi (lá bánh tẻ) bằng máy xay sinh tố, bổ sung 70mL nước cất vào 30g lá ổi tươi theo tỉ lệ 70mL:30g lá (thể tích: khối lượng). Khuấy liên tục với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ, ở 100°C và thu toàn bộ dịch chiết bằng cách lọc qua giấy lọc thô. Tổng thể tích dịch chiết trong

thu được 60mL và tiến hành đun cách thủy để nước bay hơi cho đến thể tích cuối cùng là 10mL và dịch nêu trên được bảo quản ở -20°C, gọi là dịch chiết O;

(iii) Tạo chế phẩm:

Dịch chiết từ lá bàng ở bước (i) và dịch chiết từ lá ổi ở bước (ii) được phối trộn theo tỉ lệ phối trộn là 1mL:1mL (thể tích:thể tích) thu được chế phẩm.

Ví dụ 2: Kiểm tra khả năng kháng khuẩn của chế phẩm ở các nồng độ 5% và 10% trên đĩa thạch, nồng độ 0,2‰ và 0,5‰ trong môi trường LB lỏng và ở hệ thống nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* quy mô bình 250mL và 10 lít.

- Kiểm tra tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Nuôi cấy 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* trong môi trường LB lỏng đến khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt 10^8 tế bào/ mL, lắc đều bình chứa khuẩn, dùng pipet man hút 100 μ L dung dịch vi khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch, dùng que cấy thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch khô. Sau 10 - 15 phút, đục 4 - 5 giếng với đường kính khoảng 10mm, bổ sung 100 μ L dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm vào các giếng riêng biệt. Giữ các đĩa thí nghiệm ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ cho tới khi dịch chiết từ các giếng khuếch tán ra môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Sau đó, đặt các đĩa vào tủ ấm 37°C trong 24 giờ. ĐC (+) là môi trường nuôi được bổ sung dung dịch kháng sinh ampicillin (5 mg/mL); ĐC (-) là môi trường nuôi được bổ sung nước cất. Hoạt tính ức chế vi khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật theo công thức: BK (mm) = D-d; trong đó, D = đường kính vòng vô khuẩn và d = đường kính lỗ khoan thạch. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình. Kết quả thu được được thể hiện trên bảng 1. Dịch chiết B ở các nồng độ 5% và 10% có khả năng diệt cả 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* với bán kính vùng ức chế (mm) đạt 0 và 2; 7 và 12; 18 và 25 tương ứng. Dịch chiết O ở các nồng độ 5% và 10% có khả năng diệt cả 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* với bán kính vùng ức chế (mm) đạt 15 và 20; 7 và 13; 2 và 13 tương ứng. Chế phẩm ở các nồng độ 5% và 10% có khả năng diệt cả 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* với bán kính vùng ức chế (mm) đạt 7 và 15; 10 và 17; 15 và 25 tương ứng.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế vi khuẩn của dịch chiết B, dịch chiết O và chế phẩm

Mẫu	Vi sinh vật thử hoạt tính					
	<i>B. amyloliquefacience</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>P. baetica</i>	
	Nồng độ chế phẩm sử dụng (%)					
	5	10	5	10	5	10
Dịch chiết B	-	2,0±0,1	7,0±0,3	12,0±0,3	18,0±0,4	25,0±0,6
Dịch chiết O	15,0±0,2	20,0±0,5	7,0±0,3	13,0±0,3	2,0±0,1	13,0±0,4
Chế phẩm	7,0±0,3	15,0±0,4	10,0±0,4	17,0±0,4	15,0±0,4	25,0±0,5

- Kiểm tra tác dụng diệt khuẩn của chế phẩm trong môi trường LB lỏng: Các khuẩn lạc đơn của 3 loài vi khuẩn *B. amyloliquefacience*, *B. subtilis*, *P. baetica* được bổ sung vào môi trường LB lỏng, được lắc ở máy lắc ổn nhiệt ở 37°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12-14 giờ cho đến khi mật độ tế bào vi khuẩn đạt 10^8 tế bào/mL. Sau đó, tiến hành lắc đều các bình chứa vi khuẩn và dùng pipet hút 50 μ L dung dịch vi khuẩn nhỏ vào lọ penicilin vô trùng chứa 5mL môi trường LB lỏng có bổ sung chế phẩm ở các nồng độ 0,1‰, 0,2‰, 0,5‰, 1‰. Dung dịch kháng sinh ampicillin (5mg/mL) được bổ sung vào môi trường nuôi là ĐC (+) hoặc nước cất được bổ sung vào môi trường nuôi là ĐC (-). Các bình chứa vi khuẩn được nuôi trong tủ ổn nhiệt ở 37°C có tốc độ lắc 200 vòng/ phút trong 12-14 giờ. Khả năng ức chế vi khuẩn của dịch chiết được đánh giá bằng cách đo độ đục của dịch nuôi cấy tế bào bằng máy quang phổ Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Nhật Bản) – đo mật độ quang ở bước sóng 600nm. Kết quả chế phẩm ở các nồng độ 0,1‰, 0,2‰, 0,5‰, 1‰ có tác dụng ức chế các loài vi khuẩn thử nghiệm (Bảng 2). Phần trăm ức chế dao động từ lần lượt là 10, 15, 35, 50% (loài *B. amyloliquefacience*); 18, 20, 40, 90% (loài *B. subtilis*) và 20, 24, 45, 89% (loài *P. baetica*).

Bảng 2. Phần trăm ức chế vi khuẩn của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau

Loài vi khuẩn thử nghiệm	Nồng độ chế phẩm CPBO					
	ĐC (+)	ĐC (-)	0,1‰	0,2‰	0,5‰	1‰
<i>B. amyloliquefacience</i>	100	0	10,2 $\pm$ 0,3	15,4 $\pm$ 0,3	35,5 $\pm$ 0,5	50,5 $\pm$ 0,8
<i>B. subtilis</i>	100	0	18,3 $\pm$ 0,4	20,3 $\pm$ 0,5	40,6 $\pm$ 0,7	90,4 $\pm$ 0,9
<i>P. baetica</i>	100	0	20,4 $\pm$ 0,4	24,4 $\pm$ 0,5	45,7 $\pm$ 0,8	89,7 $\pm$ 0,8

- Kiểm tra tác dụng kháng và diệt vi sinh vật lây nhiễm của chế phẩm trong nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô pilot cấp độ bình tam giác 250mL: bổ sung chế phẩm ở các nồng độ 0,1‰, 0,2‰, 0,5‰, 1‰ vào các bình tam giác 250mL có chứa 100mL môi trường SOT nuôi cấy vi khuẩn lam *S. platensis*. ĐC (-) là công thức không bổ sung chế phẩm và ĐC (+) là công thức được bổ sung sittodin (1 lít sittodin/15000000m³ môi trường). Các công thức thí nghiệm có mật độ giống ban đầu OD_{556 nm} = 0,3. Môi trường ban đầu của thí nghiệm (tại thời điểm 0 ngày) được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB thạch. Kết quả thu được cho thấy đã không phát hiện thấy vi khuẩn. Điều này chứng tỏ tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm mẫu sạch và không bị nhiễm vi khuẩn. Thí nghiệm được tiến hành ở dạng nuôi tĩnh, ở nhiệt độ phòng, chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ. Sau 15 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào OD_{556 nm} đạt được của các công thức ĐC (-), ĐC (+), và công thức bổ sung 0,1‰, 0,2‰, 0,5‰, 1‰ của chế phẩm đạt được tương ứng là 2,12; 2,58; 2,50; 2,68; 2,56; 2,15. Đồng thời môi trường của các công thức trên cũng được sử dụng để phân lập vi

khuẩn trên môi trường LB. Kết quả Bảng 3 đã xác định được với mật độ vi khuẩn tương ứng là 2×10^3 , 30, 70, 0, 0, 0 CFU/mL. Điều đó chứng tỏ rằng chế phẩm CPBO ở các nồng độ 0,2%, 0,5%, 1% đã không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo nhưng lại có tác dụng ngăn ngừa khả năng phát triển của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy tự nhiên.

Bảng 3. Mật độ vi khuẩn trong môi trường nuôi tảo được bổ sung chế phẩm ở các nồng độ khác nhau ở bình tam giác 250mL

Công thức thí nghiệm	Nồng độ chế phẩm CPBO					
	ĐC (-)	ĐC (+)	0,1‰	0,2‰	0,5‰	1‰
Sinh trưởng của tảo (OD_{556nm})	$2,12 \pm 0,05$	$2,58 \pm 0,07$	$2,50 \pm 0,07$	$2,68 \pm 0,06$	$2,56 \pm 0,07$	$2,15 \pm 0,07$
Mật độ vi khuẩn (CFU/mL; $\times 10^3$)	$2,3 \pm 0,1$	$30,4 \pm 0,2$	$70,5 \pm 0,3$	0	0	0

- Kiểm tra tác dụng kháng khuẩn và diệt vi sinh vật lây nhiễm của chế phẩm trong nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* ở quy mô pilot cấp độ bình 10 lít: bổ sung chế phẩm ở các nồng độ ĐC (0‰), 0,2‰, 0,5‰ vào các bình nhựa 10 lít có chứa 7 lít môi trường SOT nuôi cấy vi khuẩn lam *S. platensis*. Các công thức thí nghiệm có mật độ giống ban đầu $OD_{556 nm} = 0,3$. Môi trường ban đầu của thí nghiệm (tại thời điểm 0 ngày) được sử dụng làm nguyên liệu để phân lập vi khuẩn trên môi trường LB thạch. Kết quả thu được đã cho thấy không phát hiện được vi khuẩn. Điều này chứng tỏ tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm mẫu sạch và không bị nhiễm vi khuẩn. Thí nghiệm được tiến hành nuôi sục khí với tốc độ dòng khí là 0,5 lít/lít/phút, nhiệt độ phòng, chu kỳ sáng/tối là 12 giờ/12 giờ. Sau 10 ngày nuôi cấy, mật độ tế bào $OD_{556 nm}$ của các công thức bổ sung chế phẩm ở các nồng độ ĐC (0‰); 0,2‰; 0,5‰ đạt được tương ứng là 1,81; 1,76 và 1,78 (Bảng 4). Đồng thời môi trường của các công thức trên cũng được phân lập vi khuẩn trên môi trường LB lỏng. Kết quả đã xác định được với mật độ vi khuẩn tương ứng là 9×10^3 , 0, 0 CFU/mL. Điều đó chứng tỏ rằng chế phẩm ở các nồng độ 0,2‰, 0,5‰ không ảnh hưởng đến sinh trưởng nhưng lại có tác dụng ngăn ngừa khả năng lây nhiễm của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy tự nhiên.

Bảng 4. Mật độ vi khuẩn trong môi trường nuôi tảo được bổ sung chế phẩm ở các nồng độ khác nhau ở bình nhựa 10 lít

Công thức thí nghiệm	Nồng độ chế phẩm CPBO		
	ĐC	0,2‰	0,5‰
Sinh trưởng của tảo (OD_{556nm})	$1,81 \pm 0,04$	$1,76 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,06$
Mật độ vi khuẩn (CFU/mL; $\times 10^3$)	$9,2 \pm 0,2$	0	0

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Hiện nay, nuôi trồng vi khuẩn lam *S. platensis* đã được mở rộng trên quy mô công nghiệp. Một số khó khăn thường gặp trong quá trình nuôi trồng đó là nhiễm vi sinh vật, động vật nguyên sinh và tảo tạp khác nhau, v.v., đã và đang ảnh hưởng đến chất lượng và năng suất sinh khối tảo nuôi trồng được; thường làm mất đến 40-50% tổng sản lượng sinh khối đạt chất lượng làm thực phẩm cho người. Việc sản xuất ra chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và từ lá ổi có nguồn gốc từ thảo dược rất đơn giản, dễ thực hiện, có hiệu quả cao trong diệt các loài vi khuẩn điển hình cũng như các vi sinh vật thường xuất hiện trong môi trường nuôi nhưng lại không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo cũng như năng suất tảo nuôi trồng được. Đặc biệt, chế phẩm có sử dụng lá bàng khô - lá sau khi đã hoàn thành chu kỳ sống và rụng xuống đất - có ý nghĩa sinh học rất lớn đối với cây bàng và môi trường sống và lá ổi (lá bánh tẻ). Chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt vi khuẩn trên môi trường thạch ở nồng độ 5% và 10%; trong môi trường LB lỏng và môi trường nuôi cấy tảo được bổ sung chế phẩm nêu trên ở các nồng độ 0,2‰ đến 0,5‰ cho hiệu quả kháng khuẩn rất cao mà lại không gây độc hại cho môi trường nuôi cũng như tích lũy trong sinh khối tảo nuôi trồng được. Các chế phẩm có nguồn gốc hữu cơ, hoàn toàn thân thiện với môi trường và có giá thành rẻ. Do đó, trong quá trình nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* có thể sử dụng chế phẩm này ở các quy mô công nghiệp nhằm cung cấp sinh khối tảo đảm bảo chất lượng ứng dụng làm thực phẩm chức năng cho con người.

Tài liệu tham khảo

1. Akharaiyi FC, Ilori RM, Adesida JA. 2011. Antibacterial effect of *Terminalia catappa* on some selected pathogenic bacteria. Int J Pharm Biomed Res, 2(2): 64-67.
2. Nguyễn Thiện Chí, Nguyễn Thị Ngọc Châm, Phạm Khánh Ngọc, Đỗ Duy Phúc, Dương Tùng Kha, Nguyễn Thị Thu Thủy. 2016. Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu lá trầu không (*Piper betel* L.), họ Hồ tiêu (Piperaceae). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Phần A: Khoa học tự nhiên và Môi trường, 45: 28-32.
3. Chu W. 2012. Biotechnological applications of microalgae. International e-Journal of Science, Medicine & Education. 6: 24–37.
4. Cole JJ. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. Annual Review of Ecology and Systematics 13: 291-314.
5. Costa JAV, Colla LM, Filho PD. 2003. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences. 58 (1-2):76–80.
6. Deamici MK, Santos LO, Costa JAV. 2018. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of Spirulina: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. Bioresource Technology, Volume 249, February 2018, Pages 168-174.
7. Huỳnh Kim Diệu và Võ Thị Tuyết. 2014. Đánh giá đa dạng di truyền và tính kháng khuẩn củ cây Phong huệ (*Zephyranthes rosea* (Spreng) Lindl). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Số chuyên đề Nông nghiệp, 2014 (2): 29-35.
8. Huynh Kim Dieu, Nguyen Thi Han Ni. 2017. The genetic diversity and the antibacterial activity of *Ageratum conyzoides* Linn. Can Tho University Journal of Science, 7: 45-50
9. Huỳnh Kim Diệu, Phan Thị Tư. 2015. Đánh giá sự đa dạng di truyền và tính kháng khuẩn của cây lược vàng (*Callissia fragrans* Lindl.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 38 (2): 6-12.
10. Duke JA. 2008. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases-Albizia lebbeck. Retrieved. 2008-FEB-23.
11. Triệu Thị Thanh Hằng, Nguyễn Công Tráng, Cao Tuấn Đức và Lê Thị Thúy Vy, 2018. Khả năng kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản của dịch trích từ lá và hạt cây trâm bầu (*Combretum quadrangulare*) trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 54(2): 151-157.
12. Hoekstra DT, Volschenk H, Collins M, McMaster LD. 2011. An investigation of *Clostridium* species present in nutraceutical preparations of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) for human consumption. Journal of Applied Phycology. 23(4):777–787.

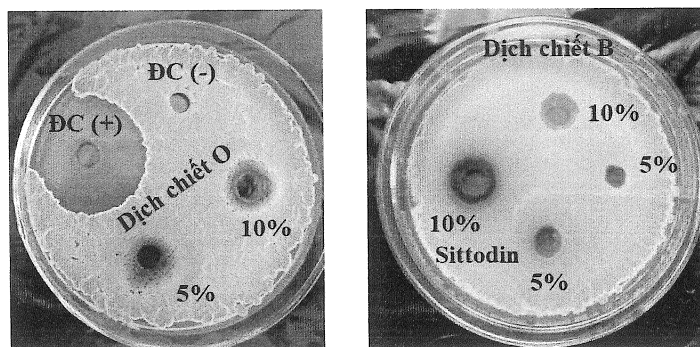
13. Đặng Diễm Hồng. 2017. Nhiên liệu sinh học từ vi tảo biển và một số ứng dụng ở Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. pp 484.
14. Lakaniemi AM, Intihar VM, Puhakka JA. 2012. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. Microb Biotechnol. 5: 69-78.
15. Lee YK. 1986. Enclose bioreactor for mass cultivation of photo microorganism: the future trend. Trend in Biotechnology. 4: 186.
16. Li JL, Zhang XP, Wu SZ, Zheng WF. 2006. Effects of nutrient concentrations on the growth and accumulation of exopolysacchrides of spaceflight *Dunaliella salina*. J Wuhan Bot Res 24 (2): 149–153.
17. Mogale M. 2016. Identification and quantification of bacteria associated with cultivated *Spirulina* and impact of physiological factors. Thesis for the degree of Master of Science in Engineering. University of Cape Town. pp. 184.
18. Moreno-Garrido I, Canavate, JP, 2001. Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*. Aquacult Eng 24: 107–114.
19. Reynolds CS, 1994. The Ecology of Phytoplankton Ecology (biodiversity and conservation). Cambridge: Cambridge University Press.
20. Soni RA, Sudhakar K, Rana S. 2017. *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review. Trends in Food Science & Technology 69: 157-171.
21. Stenuite S, Pirlot S, Tarbe AL, Sarmento H, Lecomte M, Thill S, Leporcq B, Sinyinza D, et al. 2009. Abundance and production of bacteria, and relationship to phytoplankton production, in a large tropical lake (Lake Tanganyika). Freshwater Biology. 54(6):1300–1311.
22. Trịnh Thị Trang, Nguyễn Thanh Hải. 2016. Tác dụng ức chế vi khuẩn in vitro của cao khô dịch chiết lá trà không (Piper betle) đối với vi khuẩn *Aeromonas* sp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên các rô phi. Tạp chí KH Nông nghiệp Việt Nam 14 (6): 869-8761.
23. Vardaka E, Kormas KA, Katsiapi M, Genitsaris S, Moustaka-Gouni M. 2016. Molecular diversity of bacteria in commercially available “*Spirulina*” food supplements. PeerJ 4: e1610 <https://doi.org/10.7717/peerj.1610>.
24. Wang L, Yuan D, Li Y, Ma M, Hu Q, Gong Y. 2016. Contaminating microzooplankton in outdoor microalgal mass culture systems: An ecological viewpoint. Algal Research 20: 258-266.
25. Weli A, Al-Kaabi A, Al-Sabahi J, Said S, Hossain MA, Al-Riyami S, 2019. Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. Journal of King Saud University-Science, 31(4), 993-998.

YÊU CẦU BẢO HỘ

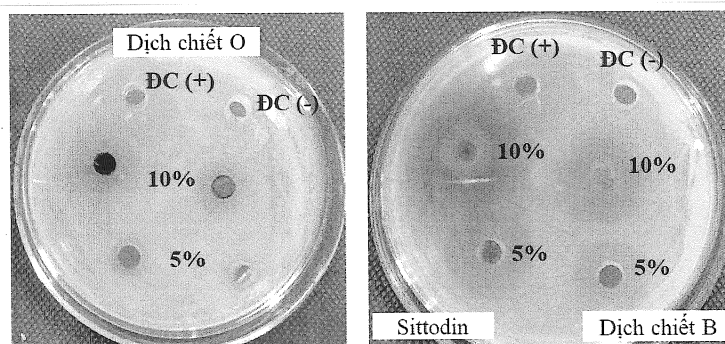
1. Quy trình sản xuất chế phẩm chứa dịch chiết từ lá bàng và lá ổi có khả năng diệt khuẩn trong nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina platensis* ở quy mô công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dịch chiết từ lá bàng: bổ sung nước vào lá bàng khô (lá rơi từ cây, có màu đỏ, không có lỗ thủng nào trên lá) theo tỉ lệ nước:lá bàng khô là 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; tiếp tục bổ sung nước vào phần bã theo tỉ lệ nước:bã là 10mL:1g (thể tích:khối lượng), đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút, thu dịch trong; lặp lại 4 lần quá trình nêu trên và thu toàn bộ dịch trong; dịch chiết trong này được cô đặc bằng cách đun cách thủy cho bay hơi đến khi thu được thể tích cuối cùng sao cho tỉ lệ dịch chiết:nguyên liệu lá bàng khô ban đầu là 2,5mL:1g (thể tích:khối lượng) và được bảo quản ở -20°C;
- (ii) chuẩn bị dịch chiết từ lá ổi: nghiền lá ổi tươi (lá bánh tẻ) bằng máy xay sinh tố, bổ sung nước cất vào lá ổi trên theo tỉ lệ nước:lá ổi là 70mL:30g (thể tích:khối lượng); khuấy liên tục với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 72 giờ, ở điều kiện 100°C và thu toàn bộ dịch chiết bằng cách lọc qua giấy lọc thô; dịch chiết trong này được đun cách thủy cho đến khi bay hơi thu được thể tích cuối cùng sao cho tỉ lệ dịch chiết:nguyên liệu lá ổi ban đầu là 1mL:3g (thể tích:khối lượng) và được bảo quản ở -20°C; và
- (iii) tạo chế phẩm: phối trộn dịch chiết từ lá bàng ở bước (i) và dịch chiết từ lá ổi ở bước (ii) theo tỉ lệ phối trộn là 1:1 (thể tích: thể tích) để thu được chế phẩm.

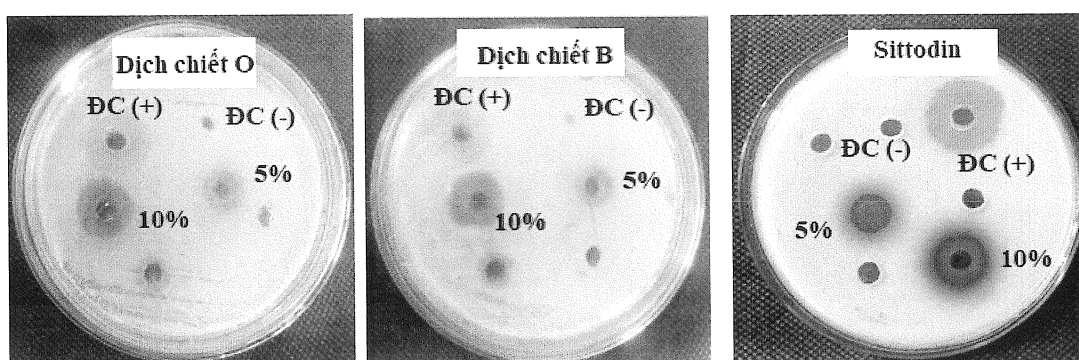
Hình 1



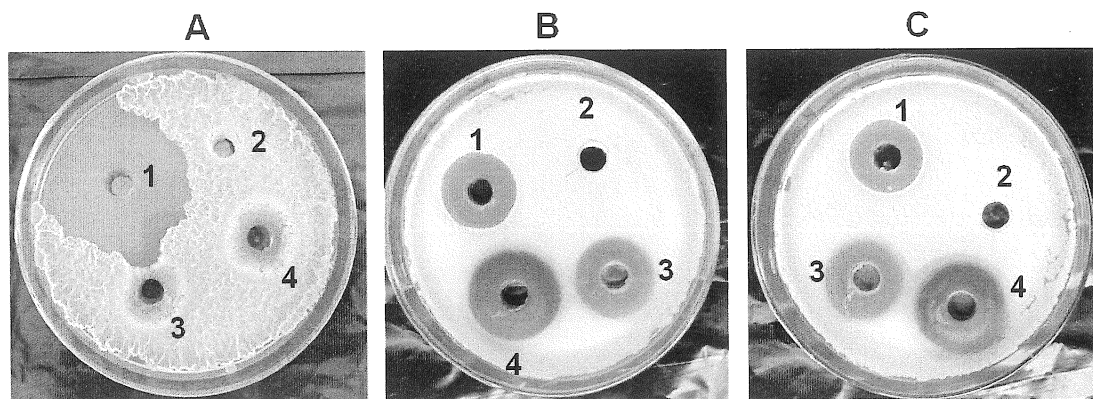
Hình 2



Hình 3

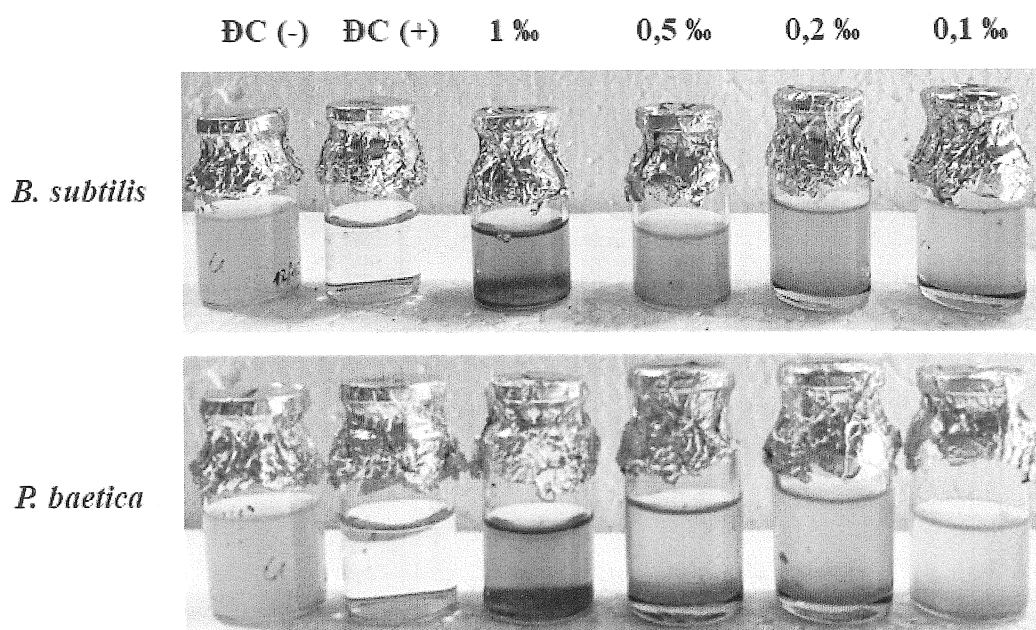


Hình 4

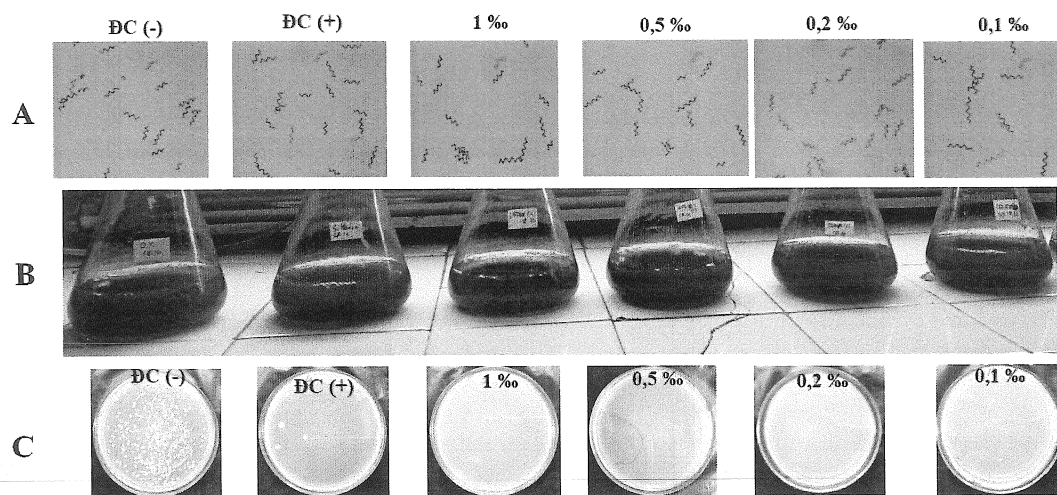


Ghi chú: (1): ĐC (+); (2): ĐC (-); (3): 5% chế phẩm; (4): 10% chế phẩm.

Hình 5



Hình 6



Hình 7

