



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0044931

(51)^{2020.01} C12N 1/06

(13) B

(21) 1-2021-01905

(22) 12/09/2019

(86) PCT/EP2019/074424 12/09/2019

(87) WO 2020/053362 19/03/2020

(30) 1858285 14/09/2018 FR

(45) 25/04/2025 445

(43) 26/07/2021 400A

(71) KYANOS BIOTECHNOLOGIES (FR)

263 Rue de Juncassa, 31700 Beauzelle, France

(72) HOFFMANN, Pierre-Alain (FR); GLEYESSES, Evelyne (FR).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI SINH VẬT QUAN TÂM VÀ HỆ THỐNG THIẾT BỊ NUÔI CẤY

(21) 1-2021-01905

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp (20) để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28), bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, trong môi trường nuôi cấy chứa nước (30), các vi sinh vật tạp nhiễm (32) phát triển tự nhiên trong môi trường nuôi cấy (30) này, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước: bước (21) là lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy (30) chứa vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32); bước (22) là phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32) trong phần môi trường nuôi cấy (30) nói trên; bước (24) là phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm (32) đã được tách theo cách này để tạo ra dịch phân giải (35); và bước (25) là đưa lại dịch phân giải (35) nói trên vào môi trường nuôi cấy (30).

Sáng chế cũng đề cập đến hệ thống thiết bị (27) để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế có thể áp dụng cho lĩnh vực nuôi cấy sinh khối vi sinh vật bằng phương pháp tự dưỡng và dị dưỡng.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm, bằng phương pháp dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, và hệ thống thiết bị nuôi cấy đặc biệt thích nghi để thực hiện phương pháp nuôi cấy nói trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Dị dưỡng là nhu cầu của sinh vật sống được nuôi dưỡng bằng các thành phần hữu cơ đã có từ trước. Thuật ngữ dị dưỡng đối lập với thuật ngữ tự dưỡng là chế độ dinh dưỡng của các sinh vật sống có thể được nuôi dưỡng chỉ từ thực phẩm vô cơ khi có nguồn năng lượng bên ngoài, ví dụ như ánh sáng (quang tự dưỡng).

Về phần của nó, tạp dưỡng là kiểu dinh dưỡng của các sinh vật sống có đặc điểm là chúng có khả năng được nuôi dưỡng bằng cách tự dưỡng hoặc bằng dị dưỡng hoặc bằng cả hai kiểu dinh dưỡng đồng thời hoặc sự quang hợp của vi khuẩn nguyên thủy.

Khi tìm cách sản xuất hoặc sử dụng một chủng thuần, các phương pháp dị dưỡng hoặc tạp dưỡng môi trường mở hiện không được áp dụng. Thật vậy, môi trường mở nói chung liên quan đến sự xuất hiện của các vi sinh vật tạp nhiễm khác nhau trong môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng đến năng suất nguyên liệu của phương pháp nuôi cấy do (các) vi sinh vật tạp nhiễm tiêu thụ các chất dinh dưỡng được dự định cho các vi sinh vật quan tâm. Các vi sinh vật tạp nhiễm này cũng ảnh hưởng đến chất lượng mong đợi của sản phẩm cuối cùng (sinh khối của các vi sinh vật quan tâm) chỉ đơn giản là do sự có mặt đáng kể của chúng.

Nguy cơ tạp nhiễm này hiện được kiểm soát nhờ phương pháp ngăn cách và sự khử trùng dụng cụ. Tuy nhiên, chi phí đầu tư và vận hành của các phương pháp nuôi cấy này để chúng được thực hiện trong điều kiện vô trùng là đáng kể và có tác động trực tiếp đến chi phí sản xuất của các vi sinh vật quan tâm được đề cập hoặc của các chất chuyển hóa của chúng.

Do đó, sẽ có lợi khi tìm ra giải pháp sản xuất vi sinh vật quan tâm với năng suất chấp nhận được ở quy mô công nghiệp, trong môi trường nuôi cấy mở hoặc kín, mà không cần quan tâm đến các điều kiện khử trùng của môi trường và hệ thống thiết bị nuôi cấy đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm, bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, trong môi trường nuôi cấy chứa nước, các vi sinh vật tạp nhiễm phát triển tự nhiên trong môi trường nuôi cấy này, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước:

- bước lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm;
- bước phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm trong phần môi trường nuôi cấy nói trên;
- bước phân giải vi sinh vật tạp nhiễm đã được tách để tạo ra dịch phân giải;
- bước đưa lại dịch phân giải nói trên vào môi trường nuôi cấy.

Phương pháp nuôi cấy này có ưu điểm là cho phép nuôi cấy vi sinh vật quan tâm trong môi trường mở hoặc kín mà không ảnh hưởng đến năng suất của vi sinh vật quan tâm bởi vì các chất tạp nhiễm thường phá rối việc nuôi cấy trong môi trường mở lại rất hữu ích cho sự phát triển của (các) vi sinh vật quan tâm theo phương pháp của sáng chế. Thật vậy, dịch phân giải của vi sinh vật tạp nhiễm là nguồn dinh dưỡng có thể tiêu hóa được cho vi sinh vật quan tâm, đặc biệt là cacbon hữu cơ. Việc nuôi cấy môi trường mở được tạo thuận lợi bởi phương pháp nuôi cấy này, các chi phí đầu tư và vận hành của phương pháp này được giảm thiểu một cách thuận lợi ở chỗ các điều kiện vô trùng là không cần thiết.

Theo các phương án thực hiện được ưu tiên, sáng chế còn tuân theo các đặc điểm sau, được thể hiện riêng biệt hoặc trong từng tổ hợp khả thi về mặt kỹ thuật của chúng.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, bước phân tách vật lý bao gồm bước lọc hoặc tách bằng trọng lực để thu được một mặt là vi sinh vật quan tâm và mặt khác là vi sinh vật tạp nhiễm một cách riêng biệt.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, vi sinh vật quan tâm đã được tách bằng bước phân tách được đưa lại vào môi trường nuôi cấy, một mình hoặc trong hỗn hợp với dịch phân giải.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, môi trường nuôi cấy chứa nước ban đầu không có cacbon hữu cơ.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, trong đó phương pháp nuôi cấy là bằng cách tạt dưỡng, và trong đó môi trường nuôi cấy chứa nước ban đầu không có cacbon hữu cơ, vi sinh vật quan tâm được để lại trong môi trường nuôi cấy tự dưỡng trong thời gian t trước bước lấy mẫu.

Tốt hơn là, thời gian t được chọn để thu được nồng độ vi sinh vật quan tâm trong môi trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ $5 \cdot 10^5$ tế bào trên một mililit đến $1 \cdot 10^7$ tế bào trên một mililit. Hơn nữa, việc nuôi cấy bằng phương pháp tự dưỡng trong thời gian t giúp xác nhận trạng thái sinh lý chính xác của vi sinh vật quan tâm một cách thuận lợi và thiết lập dữ liệu tham chiếu về hiệu suất sinh trưởng của chúng.

Việc chuyển từ kiểu tự dưỡng sang kiểu tạt dưỡng được thực hiện bằng cách trộn dịch phân giải của vi sinh vật tạt nhiễm với vi sinh vật quan tâm, dịch phân giải này đặc biệt cung cấp nguồn dinh dưỡng cacbon hữu cơ cho vi sinh vật quan tâm. Kiểu dị dưỡng càng được củng cố bởi bước cung cấp cacbon hữu cơ, được cung cấp bởi một nguồn không phải là dịch phân giải của vi sinh vật tạt nhiễm, trong môi trường nuôi cấy.

Do đó, theo một phương án thực hiện cụ thể, phương pháp này bao gồm bước cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy. Việc cung cấp cacbon hữu cơ này có thể được thực hiện trực tiếp trong môi trường nuôi cấy, trong dịch phân giải, cho vi sinh vật quan tâm được phân tách bằng cách tách vật lý, trong hỗn hợp dịch phân giải/vi sinh vật quan tâm đã tách riêng, hoặc kết hợp ít nhất hai loại của chúng.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, phương pháp nuôi cấy bao gồm bước cô đặc các vi sinh vật tạt nhiễm được phân tách bằng bước phân tách vật lý. Bước cô đặc các vi sinh vật tạt nhiễm có ưu điểm là nó cho phép phân giải một số lượng lớn hơn các vi sinh vật tạt nhiễm trong bước phân giải.

Theo một ví dụ về phương án thực hiện cụ thể, bước cô đặc bao gồm bước lọc hoặc tách bằng trọng lực để một mặt thu được các vi sinh vật tạt nhiễm được cô đặc và mặt khác là môi trường nuôi cấy không có vi sinh vật tạt nhiễm một cách riêng

biệt. Điều này có lợi thế là cho phép tái sử dụng môi trường nuôi cấy mà không có vi sinh vật tạp nhiễm. Hơn nữa, điều này đặc biệt có lợi thế là làm giảm chi phí phân giải do sự giảm thể tích các vi sinh vật tạp nhiễm được phân giải sau khi cô đặc.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, môi trường nuôi cấy bao gồm một số vi sinh vật quan tâm khác nhau, phương pháp này bao gồm ngược dòng từ bước phân tách vật lý, bước trước đó là phân lập một loại vi sinh vật quan tâm được chọn hoặc một tập hợp các vi sinh vật quan tâm khác nhau được chọn trong phần được lấy mẫu này, sao cho khi phần này trải qua quá trình phân tách vật lý, nó chỉ bao gồm một loại vi sinh vật quan tâm được chọn hoặc tập hợp các vi sinh vật quan tâm khác nhau được chọn nói trên.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, phương pháp nuôi cấy bao gồm chu kỳ lặp lại các bước của nó. Theo một ví dụ về phương án thực hiện, phương pháp này bao gồm chu kỳ lặp lại của ít nhất các bước lấy mẫu, phân tách vật lý, phân giải và đưa trở lại. Tốt hơn là, chu kỳ lặp lại nói trên cũng bao gồm bước cô đặc và/hoặc bước cung cấp cacbon hữu cơ.

Do sự kết hợp của các kiểu dinh dưỡng trong một phương pháp nuôi cấy theo chu kỳ, phương pháp theo sáng chế có thể được mô tả là phương pháp nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm bằng phương pháp dinh dưỡng vòng.

Theo một ví dụ về phương án thực hiện được ưu tiên, ít nhất một vi sinh vật quan tâm nói trên là vi khuẩn lam *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hệ thống thiết bị nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm, bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, bao gồm:

- ít nhất một ngăn nuôi cấy mở hoặc kín được thiết kế để nhận môi trường nuôi cấy chứa nước, ít nhất một vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm nói trên;
- ít nhất một dụng cụ tách được thiết kế để thực hiện ít nhất một bước phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm trong một phần của môi trường nuôi cấy;
- dụng cụ phân giải được thiết kế để thực hiện việc phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm được tách ra bằng quá trình phân tách vật lý để tạo ra dịch phân giải;
- phương tiện vận chuyển được thiết kế cho ít nhất:
 - o bước lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy chứa vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm;

- bước đưa lại dịch phân giải nói trên vào ngăn nuôi cấy.

Các ưu điểm, mục đích và đặc điểm cụ thể của hệ thống thiết bị theo sáng chế là tương tự như của phương pháp theo sáng chế, chúng không được lặp lại ở đây.

Theo các phương án thực hiện được ưu tiên, sáng chế còn tuân theo các đặc điểm sau, được thể hiện riêng biệt hoặc trong từng tổ hợp khả thi về mặt kỹ thuật của chúng.

Theo một phương án cụ thể, phương tiện vận chuyển còn được thiết kế để hợp nhất dịch phân giải với vi sinh vật quan tâm được phân lập bằng cách tách vật lý, để tạo thành hỗn hợp, và đưa hỗn hợp này trở lại ngăn nuôi cấy.

Theo một phương án cụ thể, phương tiện vận chuyển còn được thiết kế để cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy trực tiếp trong ngăn nuôi cấy, trong dịch phân giải, trong hỗn hợp dịch phân giải/vi sinh vật quan tâm đã phân tách hoặc cho vi sinh vật quan tâm được phân tách bằng cách tách vật lý. Nguồn cung cấp cacbon hữu cơ này bắt nguồn từ một nguồn không phải là dịch phân giải của vi sinh vật tạp nhiễm.

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị nuôi cấy bao gồm ít nhất một hệ thống cô đặc được thiết kế để cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm được phân lập bằng cách tách vật lý.

Theo một phương án cụ thể, phương tiện vận chuyển bao gồm các phương tiện:

- để tạo ra dòng thứ nhất của môi trường nuôi cấy bao gồm các vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm, từ ngăn nuôi cấy đến dụng cụ phân tách;
- để tạo ra dòng thứ hai của vi sinh vật quan tâm chảy ra từ dụng cụ phân tách;
- để tạo ra dòng thứ ba của vi sinh vật tạp nhiễm từ dụng cụ phân tách đến hệ thống cô đặc;
- để tạo ra dòng thứ tư của vi sinh vật tạp nhiễm được cô đặc từ hệ thống cô đặc đến dụng cụ phân giải;
- để tạo ra dòng thứ năm của môi trường nuôi cấy không có vi sinh vật tạp nhiễm từ hệ thống cô đặc đến ngăn nuôi cấy;
- để tạo ra dòng thứ sáu của dịch phân giải từ dụng cụ phân giải đến ngăn nuôi cấy;
- để tạo ra dòng thứ bảy của cacbon hữu cơ chảy ra từ bể cacbon hữu cơ;

- để hợp nhất dòng thứ hai, dòng thứ sáu và dòng thứ bảy để tạo thành dòng thứ tám duy nhất đến gần nuôi cấy.

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị nuôi cấy bao gồm dụng cụ để xả vi sinh vật tạp nhiễm. Tốt hơn là nó bao gồm dụng cụ để xả các vi sinh vật tạp nhiễm đã được cô đặc.

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị nuôi cấy bao gồm dụng cụ để xả môi trường nuôi cấy không có vi sinh vật tạp nhiễm và vi sinh vật quan tâm.

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị nuôi cấy bao gồm dụng cụ thu gom vi sinh vật quan tâm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi đọc phần mô tả sau đây, được đưa ra bằng ví dụ không giới hạn, và tham chiếu đến các hình vẽ.

Fig.1 minh họa các bước có trong phương pháp nuôi cấy theo sáng chế theo các phương án thực hiện.

Fig.2 minh họa hệ thống thiết bị nuôi cấy theo sáng chế theo một phương án.

Fig.3 là đồ thị biểu diễn sự tiến triển của nồng độ khối lượng *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) theo thời gian trong môi trường nuôi cấy theo phương án thực hiện của phương pháp theo sáng chế bằng cách tự dưỡng hoặc bằng cách tạp dưỡng với việc đưa trở lại các dịch phân giải cô đặc khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ môi trường nuôi cấy là môi trường bao gồm các chất dinh dưỡng cho phép sự phát triển của vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm.

Thuật ngữ "phần" là thể tích được lấy mẫu trên một đơn vị thời gian, ví dụ, mỗi ngày hoặc mỗi giờ. Do đó, thuật ngữ "phần" có thể được coi là tỷ lệ hàng ngày hoặc hàng giờ, tức là, thể tích được lấy mẫu tương ứng mỗi ngày hoặc mỗi giờ, trong môi trường nuôi cấy. Thể tích này tốt hơn là, mỗi ngày, lớn hơn hoặc bằng một lần thể tích của môi trường nuôi cấy và tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng ba lần thể tích của môi trường nuôi cấy. Tốt hơn nữa, phần được lấy mẫu tương ứng với thể tích được lấy mẫu mỗi giờ lớn hơn hoặc bằng 1/24 tổng thể tích của môi trường nuôi cấy.

Thể tích này được lấy mẫu hàng ngày có thể giúp duy trì một lượng vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm tương thích với hoạt động chính xác của phương pháp theo sáng chế.

Lưu ý rằng các hình vẽ là không đúng tỷ lệ.

Nói một cách tổng quát hơn, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các phương án thực hiện và các phương án được mô tả ở trên bởi các ví dụ không giới hạn, mà trái lại mở rộng tới các cải biến bất kỳ đối với phạm vi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mỗi đặc điểm của một phương án có thể được thực hiện một cách thuận lợi riêng biệt hoặc kết hợp với đặc điểm bất kỳ khác của phương án bất kỳ khác.

Fig.1 minh họa phương pháp 20 để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm, bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, trong môi trường nuôi cấy chứa nước, các vi sinh vật tạp nhiễm phát triển tự nhiên trong môi trường nuôi cấy nói trên, theo một phương án thực hiện cụ thể. Phương pháp này bao gồm bước 21 lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy bao gồm vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm. Tốt hơn là, phương pháp 20 được thực hiện bằng cách tạp dưỡng, môi trường nuôi cấy chứa nước ban đầu không có cacbon hữu cơ và vi sinh vật quan tâm được để trong môi trường nuôi cấy tự dưỡng trong thời gian t trước bước 21.

Phương pháp 20 bao gồm bước 22 là phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm trong phần môi trường nuôi cấy.

Phương án của bước phân tách vật lý 22 có thể dựa trên sự khác biệt về hình thái hoặc kiểu hình giữa vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm. Ví dụ, nó có thể bao gồm sự khác biệt về kích thước, hình dạng, tính chất bề mặt, mật độ, xu hướng kết tụ hoặc keo tụ.

Theo một ví dụ về phương án thực hiện, bước phân tách vật lý 22 bao gồm bước lọc hoặc tách bằng trọng lực để một mặt thu được các vi sinh vật tạp nhiễm được cô đặc và mặt khác là môi trường dinh dưỡng. Ví dụ về việc lọc được sử dụng trong phương án thực hiện được ưu tiên là lọc tiếp tuyến hoặc lọc chính diện. Quá trình lọc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng màng lọc.

Phương pháp 20 còn bao gồm bước tùy ý 23 là cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm được phân lập ở bước 22.

Bước tùy ý 23 là cô đặc vi sinh vật tạp nhiễm có thể dựa trên đặc điểm hình

thái hoặc kiểu hình của vi sinh vật tạp nhiễm. Ví dụ, nó có thể bao gồm kích thước, hình dạng của chúng, các tính chất bề mặt của chúng, mật độ của chúng, xu hướng kết tụ hoặc keo tụ của chúng.

Theo một phương án thực hiện được ưu tiên, bước cô đặc 23 bao gồm bước lọc hoặc tách bằng trọng lực để một mặt thu được các vi sinh vật tạp nhiễm được cô đặc và mặt khác là môi trường nuôi cấy không có vi sinh vật tạp nhiễm một cách riêng biệt. Đối với phân tách vật lý, theo một phương án thực hiện cụ thể, ví dụ về việc lọc được sử dụng là lọc tiếp tuyến hoặc lọc chính diện, và đặc biệt là quá trình lọc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng màng lọc.

Phương pháp 20 bao gồm bước 24 là phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm được tách ra bằng quá trình phân tách vật lý để tạo ra dịch phân giải. Có lợi là dịch phân giải này là các chất dinh dưỡng mà vi sinh vật quan tâm có thể tiêu hóa được, đặc biệt là cacbon hữu cơ. Theo một phương án thực hiện cụ thể, bước phân giải 24 có thể bao gồm phân giải hóa học và/hoặc phân giải bằng nhiệt và/hoặc phân giải cơ học, đối với các vi sinh vật tạp nhiễm.

Phương pháp 20 cũng bao gồm bước 25 đưa lại dịch phân giải nói trên vào môi trường nuôi cấy.

Theo một ví dụ về phương án được ưu tiên, bước 25 được thực hiện sao cho dịch phân giải được đưa lại vào môi trường nuôi cấy trong hỗn hợp với vi sinh vật quan tâm đã được phân lập bằng bước phân tách vật lý 22.

Cuối cùng, phương pháp 20 bao gồm bước tùy ý 26 là cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy. Cacbon hữu cơ này bắt nguồn từ nguồn không phải là dịch phân giải của vi sinh vật tạp nhiễm. Thật vậy, nguồn cung cấp cacbon hữu cơ ở bước 26 này là nguồn cung cấp bổ sung cho việc cung cấp các chất dinh dưỡng (trong đó có cacbon hữu cơ) có trong dịch phân giải của vi sinh vật tạp nhiễm.

Tốt hơn là, bước 26 cung cấp cacbon hữu cơ trong môi trường nuôi cấy được thực hiện bằng cách đưa cacbon hữu cơ nói trên vào hỗn hợp dịch phân giải và vi sinh vật quan tâm, vào một mình dịch phân giải, vào vi sinh vật quan tâm đã được phân lập bằng bước phân tách vật lý 22 hoặc trực tiếp vào môi trường nuôi cấy chứa nước.

Theo phương án thực hiện được ưu tiên, phương pháp này bao gồm chu kỳ lặp lại từ các bước 21 đến 26, các bước 23 và 26 còn lại là tùy ý.

Theo một ví dụ về phương án thực hiện trong đó phương pháp nuôi cấy là bằng

cách dị dưỡng, bước 26 cung cấp cacbon hữu cơ được đưa vào chu kỳ C1 gồm các bước 21 đến 25, sau khi thực hiện ít nhất một chu kỳ C1, do đó tạo ra chu kỳ C2 gồm các bước 21 đến 26 mà sau đây được lặp lại nhiều lần nếu cần.

Theo một ví dụ về phương án thực hiện, trong đó phương pháp nuôi cấy 20 là bằng cách tạp dưỡng, với môi trường nuôi cấy chứa nước ban đầu không có cacbon hữu cơ và vi sinh vật quan tâm được nuôi cấy tự dưỡng trong thời gian t trước bước 21, bước 26 cung cấp cacbon hữu cơ được đưa vào từ việc thực hiện chu kỳ thứ nhất gồm các bước từ 21 đến 25, trước bước lấy mẫu 21, do đó bắt đầu phương pháp 20 với chu kỳ C2, bước 26 được thực hiện bằng cách cung cấp cacbon hữu cơ trực tiếp vào môi trường nuôi cấy chứa nước ít nhất là trong chu kỳ thứ nhất C2.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, phương pháp nuôi cấy 20 bao gồm bước (không được thể hiện trên các hình vẽ) là làm trong dịch phân giải thu được bằng bước phân giải 24, cô đặc và/hoặc điều chỉnh độ pH của dịch phân giải, trước bước đưa trở lại 25.

Fig.2 minh họa hệ thống thiết bị 27 để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm 28 bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng. Hệ thống thiết bị này không nhất thiết phải ở trong điều kiện vô trùng, trước hoặc trong quá trình sử dụng để nuôi cấy.

Hệ thống thiết bị 27 bao gồm ngăn nuôi cấy mở hoặc kín 29 được thiết kế để nhận môi trường nuôi cấy chứa nước 30, ít nhất một vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32 nói trên.

Ngoài ra, hệ thống thiết bị 27 còn bao gồm ít nhất một dụng cụ tách 33 được thiết kế để thực hiện ít nhất một lần phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32 trong một phần của môi trường nuôi cấy 30.

Hệ thống thiết bị 27 bao gồm dụng cụ phân giải 34 được thiết kế để thực hiện phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm 32 được phân tách để tạo ra dịch phân giải 35.

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị này còn bao gồm ít nhất một hệ thống cô đặc 36 được thiết kế để cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm 32 được phân tách trước khi phân giải chúng.

Hệ thống thiết bị 27 bao gồm các phương tiện vận chuyển được thiết kế cho ít nhất:

- bước lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy 30 chứa vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32;

- bước đưa lại dịch phân giải 35 vào ngăn nuôi cấy 29.

Tốt hơn nữa, các phương tiện vận chuyển còn được thiết kế để hợp nhất dịch phân giải 35 với vi sinh vật quan tâm được phân tách 28, để tạo thành hỗn hợp và đưa lại hỗn hợp này vào ngăn nuôi cấy 29.

Tốt hơn là, các phương tiện vận chuyển được thiết kế để cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy 30 trực tiếp trong ngăn nuôi cấy 29 hoặc cho dịch phân giải 35 hoặc cho vi sinh vật quan tâm 28 được phân tách bằng cách phân tách vật lý hoặc cho hỗn hợp dịch phân giải 35 và vi sinh vật quan tâm 28 hoặc kết hợp của ít nhất hai trong số đó.

Theo một phương án được ưu tiên, phương tiện vận chuyển bao gồm các phương tiện:

- để tạo ra dòng thứ nhất 37 của môi trường nuôi cấy 30 bao gồm vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32, từ ngăn nuôi cấy 29 đến dụng cụ phân tách 33;
- để tạo ra dòng thứ hai 38 của vi sinh vật quan tâm 28 chảy ra từ dụng cụ tách 33;
- để tạo ra dòng thứ ba 39 của vi sinh vật tạp nhiễm 32 từ dụng cụ tách 33 đến hệ thống cô đặc 36;
- để tạo ra dòng thứ tư 40 của vi sinh vật tạp nhiễm đã được cô đặc 32 từ hệ thống cô đặc 36 đến dụng cụ phân giải 34;
- để tạo ra dòng thứ năm 41 của môi trường nuôi cấy 30 không có vi sinh vật tạp nhiễm, từ hệ thống cô đặc 36 đến ngăn nuôi cấy 29;
- để tạo ra dòng thứ sáu 42 của dịch phân giải 35 từ dụng cụ phân giải 34 đến ngăn nuôi cấy 29;
- để tạo ra dòng thứ bảy 43 của cacbon hữu cơ;
- để hợp nhất dòng thứ hai 38, dòng thứ sáu 42 và dòng thứ bảy 43 để tạo thành dòng thứ tám duy nhất 44 đến ngăn nuôi cấy 29.

Theo một ví dụ về phương án cụ thể, hệ thống thiết bị 27 bao gồm bể chứa cacbon hữu cơ 45. Tốt hơn là dòng thứ bảy 43 được tạo ra sao cho nó đi ra khỏi bể 45.

Dòng thứ năm 41 tốt hơn là không có vi sinh vật quan tâm.

Theo một phương án cụ thể, phương tiện để tạo ra các dòng chảy khác nhau

bao gồm ít nhất một động cơ và/hoặc bơm (không được minh họa trong các hình vẽ).

Theo một phương án cụ thể, hệ thống thiết bị 27 bao gồm dụng cụ thứ nhất 46 để xả vi sinh vật tạp nhiễm 32, dụng cụ thứ hai 47 để xả môi trường nuôi cấy 30 không có vi sinh vật quan tâm và vi sinh vật tạp nhiễm và dụng cụ 48 để thu gom vi sinh vật tạp nhiễm 28.

Phương pháp 20 để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm 28, bằng cách di dưỡng hoặc tạp dưỡng, sau đây được mô tả chi tiết theo một phương án thực hiện, trong đó hệ thống thiết bị 27 theo sáng chế được đặc biệt sử dụng theo một trong các phương án của nó:

Môi trường nuôi cấy chứa nước 30 và vi sinh vật quan tâm 28 được đưa trước đó vào ngăn nuôi cấy 29. Tốt hơn là để vi sinh vật quan tâm 28 trong môi trường nuôi cấy tự dưỡng trong thời gian t.

Sau đó, cacbon hữu cơ được đưa trực tiếp vào ngăn nuôi cấy 29 theo bước 26, thông qua dòng thứ bảy 43 của dòng cacbon hữu cơ chảy ra từ bể 45. Sau đó, quá trình nuôi cấy chuyển thành tạp dưỡng và vi sinh vật tạp nhiễm 32 phát triển trong môi trường nuôi cấy 30 với vi sinh vật quan tâm 28.

Trong bước 21, việc lấy mẫu một phần môi trường nuôi cấy 30 bao gồm vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32 được thực hiện bằng cách tạo ra dòng thứ nhất 37 của môi trường nuôi cấy 30 từ ngăn 29 đến dụng cụ tách 33.

Trong dụng cụ tách 33, bước 22 phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm 28 và vi sinh vật tạp nhiễm 32 trong phần môi trường nuôi cấy 30 đã lấy mẫu được thực hiện. Tốt hơn là bước 22 này được thực hiện bằng phương pháp lọc màng tiếp tuyến.

Sau bước phân tách vật lý 22, dòng thứ hai 38 của vi sinh vật quan tâm 28 chảy ra từ dụng cụ tách 33 được tạo ra, cũng như dòng thứ ba 39 của vi sinh vật tạp nhiễm 32 từ dụng cụ tách 33 đến hệ thống cô đặc 36.

Trong hệ thống cô đặc 36, bước tùy ý 23 là cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm 32 đã phân tách bởi bước 22 sẽ diễn ra. Tốt hơn là bước 23 này được thực hiện bằng phương pháp lọc màng tiếp tuyến. Bước 23 này có thể được coi là bước phân tách vật lý thứ hai để tách, một mặt, các vi sinh vật tạp nhiễm 32 theo cách cô đặc và mặt khác, môi trường nuôi cấy 30 không có vi sinh vật tạp nhiễm 32 và vi sinh vật quan tâm 28.

Sau bước 23 này, dòng thứ tư 40 của vi sinh vật tạp nhiễm đã cô đặc 32 được

tạo ra từ hệ thống cô đặc 36 đến dụng cụ phân giải 34, và dòng thứ năm 41 của môi trường nuôi cấy 30 không có vi sinh vật tạp nhiễm 32 và vi sinh vật quan tâm 28, được tạo ra từ hệ thống cô đặc 36 vào ngăn nuôi cấy 29.

Trong dụng cụ phân giải 34, bước 24 của quá trình phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm đã phân tách và cô đặc 32 sẽ diễn ra, để tạo ra dịch phân giải 35.

Dòng thứ ba 39 được nhắm đích trực tiếp đến dụng cụ phân giải 34 trong phương án thực hiện mà bước cô đặc 23 không diễn ra. Trong phương án thực hiện cụ thể như vậy, bước phân giải 24 được thực hiện đối với các vi sinh vật tạp nhiễm đã tách 32 có nguồn gốc trực tiếp từ dụng cụ tách 33 thông qua dòng thứ ba 39.

Sau đó, trong bước đưa trở lại 25, dịch phân giải 35 được đưa lại vào môi trường nuôi cấy 30 trong ngăn nuôi cấy 29 bằng cách tạo ra dòng thứ sáu 42 của dịch phân giải 35. Tốt hơn là, dòng thứ hai 38 của vi sinh vật quan tâm 28 và dòng thứ sáu 42 của dịch phân giải 35 được hợp nhất để tạo thành hỗn hợp dòng vào ngăn 29.

Chu kỳ C2 của phương pháp nuôi cấy này có thể được lặp lại nhiều lần.

Sau chu kỳ C2 thứ nhất, trong các bước 26 của mỗi chu kỳ C2 tiếp theo, dòng thứ bảy 43 của cacbon hữu cơ chảy ra từ bể 45 được tạo ra tốt hơn là được hợp nhất với dòng thứ hai 38 và dòng thứ sáu 42 để tạo thành dòng thứ tám duy nhất 44 của hỗn hợp dòng vào ngăn 29, trong đó nó được đưa trở lại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ áp dụng cho việc nuôi cấy *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) bằng cách tập dưỡng trong môi trường mở

Vi sinh vật được sử dụng

Vi sinh vật quan tâm 28 được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) đã phân lập. AFA là vi khuẩn lam được quan tâm trong công nghiệp và thương mại.

Vi sinh vật tạp nhiễm 32 làm mẫu được tạo thành bởi hỗn hợp của 5 chủng trực khuẩn có đặc điểm hình thái và kiểu hình khác nhau. Hỗn hợp này là ở dạng dung dịch vi khuẩn sống, được cô đặc và ở dạng chế phẩm lỏng. Ví dụ, có thể sử dụng dung dịch được bán trên thị trường dưới tên tham khảo "Bactilit™" của công ty CG PACKAGING.

Để đơn giản hóa phương pháp, ban đầu vi sinh vật tạp nhiễm 32 được đưa vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn lam với tỷ lệ một tế bào vi sinh vật quan tâm 28 cho một tế bào vi sinh vật tạp nhiễm 32. Hơn nữa, cần lưu ý rằng một sợi được coi như một tế bào vi khuẩn lam, bất kể kích thước của nó.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường BG11 (thành phần chi tiết được cung cấp trong bảng A đến bảng D), tự nhiên để nuôi cấy bằng cách tự dưỡng, hoặc, được bổ sung bột whey với nồng độ cuối cùng là $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ để nuôi cấy bằng cách tập dưỡng.

Sản phẩm	Nồng độ g/L
Na_2MgEDTA	0,1
Sắt amoni xitrat	0,6
Axit xitric, H_2O	0,6
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	3,6
Nước thẩm thấu, khử trùng 20 phút ở 121°C hoặc lọc (bảo quản ở 4°C)	

Bảng A: thành phần của dung dịch gốc 1

Sản phẩm	Nồng độ g/L
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	7,5
Nước thẩm thấu, khử trùng 20 phút ở 121°C hoặc lọc (bảo quản ở 4°C)	

Bảng B: thành phần của dung dịch gốc 2

Sản phẩm	Nồng độ g/L
K_2HPO_4	0,6
Nước thẩm thấu, khử trùng 20 phút ở 121°C hoặc lọc (bảo quản ở 4°C)	

Bảng C: thành phần của dung dịch gốc 3

Sản phẩm	Nồng độ g/L hoặc mL/L
Dung dịch gốc 1 (mL)	10
Dung dịch gốc 2 (mL)	10
Dung dịch gốc 3 (mL)	10
Na ₂ CO ₃ (g)	0,02
NaNO ₃ (g)	1,5
Nước thẩm thấu, điều chỉnh pH đến 9, khử trùng 20 phút ở 121°C	

Bảng D: thành phần của dung dịch môi trường dinh dưỡng BG11

Các điều kiện cho thao tác nuôi cấy

Dịch nuôi cấy AFA được tạo ra trong phòng máy lạnh trong đó nhiệt độ được điều chỉnh ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Ngăn nuôi cấy thủy tinh bosilicat 29 (tổng thể tích = 250mL, thể tích dịch nuôi cấy = 200mL, độ cao hiệu dụng = 70mm, đường kính hiệu dụng = 60mm) được trang bị cánh khuấy (dụng cụ khuấy di động kiểu cánh quạt nước, đường kính dụng cụ di động = 30mm, tốc độ khuấy = 60 vòng/phút).

Ánh sáng được cung cấp bởi bảng đốt phát sáng (độ rọi bức xạ của bức xạ kích hoạt quang hợp được đo trên thành ngoài của bình phản ứng = $200 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$).

Tốc độ cấy dịch nuôi cấy được đặt ở 5.10^5 và 1.10^6 tế bào. mL^{-1} .

Các hoạt động đơn nhất và các điều kiện hoạt động để phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm khỏi các vi sinh vật tạp nhiễm và để cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm

Liên quan đến sự phân tách vật lý giữa *Aphanizomenon Flos-Aquae* và vi sinh vật tạp nhiễm mẫu (các chủng trực khuẩn khác nhau trong một hỗn hợp), phương pháp được sử dụng bao gồm lọc màng tiếp tuyến thứ nhất.

Việc cô đặc vi sinh vật tạp nhiễm mẫu dẫn đến việc sử dụng sự phân tách vật lý thứ hai giữa vi sinh vật tạp nhiễm nói trên và môi trường nuôi cấy BG11 được thực hiện bằng cách lọc màng tiếp tuyến thứ hai.

Lần lọc thứ nhất sử dụng màng có độ rỗng $5\text{ }\mu\text{m}$. Đối với lần lọc tiếp tuyến thứ nhất, có thể sử dụng màng có độ rỗng từ $0,65\text{ }\mu\text{m}$ đến $20\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn là từ $1,2\text{ }\mu\text{m}$ đến $20\text{ }\mu\text{m}$, tốt hơn là từ $3\text{ }\mu\text{m}$ đến $20\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn nữa là từ $5\text{ }\mu\text{m}$ đến $20\text{ }\mu\text{m}$.

Quá trình lọc thứ hai sử dụng màng có độ rỗng $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Đối với lần lọc tiếp tuyến thứ hai, có thể xác định ngưỡng độ rỗng nhỏ hơn $5\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn là nhỏ hơn $3\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn là nhỏ hơn $1,2\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn là nhỏ hơn $0,65\text{ }\mu\text{m}$, và tốt hơn là nhỏ hơn $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

Liên quan đến tốc độ thấm được áp dụng cho lần lọc tiếp tuyến thứ nhất (tức là tốc độ lấy mẫu của một phần môi trường nuôi cấy), tốt hơn là lựa chọn tốc độ hàng ngày lớn hơn hoặc bằng một lần thể tích của hệ thống thiết bị nuôi cấy 27, và tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng ba lần thể tích của hệ thống thiết bị nuôi cấy 27.

Liên quan đến tốc độ tiếp tuyến được áp dụng trong lần lọc tiếp tuyến thứ nhất, tốt hơn là áp dụng tốc độ nhỏ hơn hoặc bằng $2,1\text{ m.s}^{-1}$ và tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng $0,7\text{ m.s}^{-1}$.

Các hoạt động đơn nhất và các điều kiện hoạt động để phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm

Liên quan đến quá trình phân giải các vi sinh vật tạp nhiễm, sử dụng phương pháp phân giải bằng kiềm nóng. Thể tích natri cacbonat 5N được thêm vào dung dịch vi sinh vật tạp nhiễm đã cô đặc để đạt được nồng độ cuối cùng là 0,1N. Dung dịch này sau đó được giữ ở 70°C trong 10 phút trước khi được làm lạnh.

Kết quả thu được

Trước bước lấy mẫu 21 của phương pháp nuôi cấy, vi sinh vật quan tâm được để lại trong dịch nuôi cấy tự dưỡng trong môi trường nuôi cấy 30 trong thời gian t để xác nhận trạng thái sinh lý chính xác của chủng và thiết lập dữ liệu tham chiếu về hiệu suất sinh trưởng. Sau thời gian t , phương pháp được bắt đầu theo cách tuần hoàn lặp lại theo chu kỳ C2 với bước 26 là cung cấp cacbon hữu cơ và bước 23 là cô đặc.

Trong phương pháp tự dưỡng, một quan sát nhanh có thể chứng minh rằng chủng đang phát triển với giai đoạn thứ nhất, lên đến 100 giờ, tương ứng với sự tăng trưởng theo cấp số nhân, sau đó, giai đoạn thứ hai là tăng trưởng tuyến tính, trong khoảng từ 100 giờ đến 600 giờ. Cuối cùng, một giai đoạn giảm tốc được quan sát thấy

sau 600 giờ. Những xu hướng này thường được quan sát thấy trong trường hợp tăng trưởng không cân bằng, tức là trong trường hợp yếu tố môi trường trở nên hạn chế. Yếu tố này có thể bao gồm yếu tố dinh dưỡng (cơ chất, sản phẩm chuyển hóa) hoặc các yếu tố hóa lý. Trong trường hợp này, có thể giả thuyết rằng năng lượng ánh sáng có thể trở nên giới hạn đối với mật độ tế bào nhất định (hiện tượng bóng râm).

Bằng cách áp dụng phép hồi quy tuyến tính, có thể xác định phương trình đại diện của tốc độ tăng trưởng, đó là: $y = 0,002x + 0,4453$.

Cũng có thể đánh giá năng suất thể tích của chủng nhờ các phép đo nồng độ khối lượng của vi sinh vật quan tâm.

Nồng độ tế bào trong dịch nuôi cấy được ước tính bằng cách đo độ hấp thụ của mẫu chất lỏng. Phép đo độ hấp thụ của môi trường được thực hiện ở bước sóng 600 nm bằng quang phổ kế. Độ hấp thụ (hay mật độ quang) này được coi là có mối quan hệ tuyến tính với nồng độ (định luật Beer-Lambert, $Abs = \epsilon.l.C$) đối với các giá trị từ 0,1 đến 0,4 đơn vị. Việc pha loãng được thực hiện sao cho nằm trong phạm vi hiệu lực này.

Nồng độ tế bào theo khối lượng cũng được đo bằng cách đo chất rắn được tạo huyền phù (suspended solid-SS). Nồng độ chất rắn được tạo huyền phù ([SS]) được ước tính bằng cách cân khối lượng khô của thể tích huyền phù tế bào đã biết. Sau đó được lọc trên màng có kích thước lỗ 0,45 μm ($\varnothing = 4,7$ cm) trước đó đã được làm khô ở 60°C và 200 mm Hg trong 24 giờ và cân. Sau khi lọc, màng và cặn tế bào được làm khô trong cùng điều kiện và sau đó được cân. Sự khác biệt về khối lượng so với thể tích có thể thu được nồng độ chất rắn được tạo huyền phù trong huyền phù đã lọc.

Sự phát triển của vi sinh vật được đánh giá theo thời gian nhân đôi (hoặc thời gian sinh sản, t_g) và năng suất thể tích (r_x).

Các thông số sinh trưởng tự dưỡng của chủng AFA là nồng độ chất rắn được tạo huyền phù tối đa ($[SS]_{max}$) là 0,75 g.L⁻¹ và năng suất thể tích tối đa (r_x max) là 26.10⁻³ g.L⁻¹.j⁻¹.

Khi phương pháp theo sáng chế được thực hiện bằng cách tạp dưỡng, tức là, khi chu kỳ C2 thứ nhất được bắt đầu với bước 26 là cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy, sự tăng năng suất được quan sát thấy mặc dù tiêu thụ một số cacbon hữu cơ được cung cấp bởi các vi sinh vật tạp nhiễm. Thật vậy, việc bổ sung dịch phân giải của vi sinh vật tạp nhiễm vào dịch nuôi cấy giúp cung cấp cacbon hữu cơ dễ tiêu

hóa cao và do đó, giúp tái sử dụng một số cacbon hữu cơ ban đầu được tiêu thụ bởi các vi sinh vật tạp nhiễm.

Tính toán sự tăng hiệu suất sản xuất khi nuôi cấy AFA với phương pháp nuôi cấy bằng cách tạp dưỡng

Nồng độ khối lượng của AFA được ghi lại theo thời gian (mỗi giờ trong 150 giờ) trong môi trường nuôi cấy BG11 tự nhiên (tự dưỡng: đối chứng). Song song, nồng độ khối lượng của AFA được ghi lại theo thời gian trong môi trường nuôi cấy BG11 trong các thử nghiệm thực hiện của phương pháp nuôi cấy theo sáng chế được thực hiện bằng phương pháp tạp dưỡng, bước đưa lại dịch phân giải vào môi trường nuôi cấy được thực hiện với các nồng độ dịch phân giải khác nhau (0,1g/L hoặc 1g/L hoặc 5g/L) theo các thử nghiệm.

Sự tiến triển của nồng độ khối lượng của AFA theo thời gian có thể được thấy trong đồ thị trên Fig.3.

Những kết quả này chỉ ra rằng việc bổ sung dịch phân giải có thể làm tăng năng suất và nồng độ AFA tối đa trong các dịch nuôi cấy. Tác dụng này càng rõ ràng hơn khi nồng độ dịch phân giải cao với các giá trị từ 0,1 đến 5 g/L.

Phân tích hệ số tỷ lệ cho thấy rằng việc bổ sung 5g/L dịch phân giải (tương ứng với 165 mg cacbon hữu cơ trên mỗi lít) có thể làm tăng hiệu giá AFA tối đa lên 111 mg AFA mỗi lít. Điều này tương đương với hiệu suất sản xuất dị dưỡng của vi sinh vật quan tâm là 0,6 gam AFA trên một gam cacbon hữu cơ do dịch phân giải cung cấp.

Phân tích động học cho thấy rằng việc bổ sung 5g/L dịch phân giải có thể làm tăng năng suất AFA trong tối đa 29 giờ nuôi cấy từ 26,4 mg AFA trên mỗi lít trên mỗi giờ lên 91,2 mg AFA trên mỗi lít trên mỗi giờ, tức là +340%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp (20) để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28), bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, trong môi trường nuôi cấy chứa nước (30), vi sinh vật tạp nhiễm (32) phát triển tự nhiên trong môi trường nuôi cấy (30) nói trên, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm các bước:

- bước (21) là lấy mẫu mỗi ngày một phần môi trường nuôi cấy (30) chứa vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32), phần này tương ứng với thể tích lớn hơn hoặc bằng một lần thể tích của môi trường nuôi cấy (30);
- bước (22) là phân tách vật lý vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32) trong phần môi trường nuôi cấy (30) nói trên;
- bước (24) là phân giải vi sinh vật tạp nhiễm (32) đã tách để tạo ra dịch phân giải (35);
- bước (25) là đưa lại dịch phân giải (35) nói trên vào môi trường nuôi cấy (30).

2. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm 1, trong đó vi sinh vật quan tâm (28) đã được tách bằng bước phân tách (22) được đưa lại vào môi trường nuôi cấy (30), một mình hoặc trong hỗn hợp với dịch phân giải (35).

3. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, bao gồm bước (26) là cung cấp cacbon hữu cơ vào môi trường nuôi cấy (30).

4. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm 3, bằng cách tạp dưỡng, trong đó môi trường nuôi cấy chứa nước (30) ban đầu không có cacbon hữu cơ và vi sinh vật quan tâm (28) được để trong dịch nuôi cấy tự dưỡng trong thời gian t trước bước (26) là cung cấp cacbon hữu cơ và bước lấy mẫu (21).

5. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, bao gồm bước (23) là cô đặc vi sinh vật tạp nhiễm (32) đã được tách bằng bước phân tách vật lý (22).

6. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong

đó môi trường nuôi cấy (30) bao gồm một số vi sinh vật quan tâm (28) khác nhau, phương pháp (20) này bao gồm ngược dòng từ bước phân tách vật lý (22), bước trước đó là phân lập một loại vi sinh vật quan tâm (28) được chọn hoặc một tập hợp các vi sinh vật quan tâm (28) khác nhau được chọn trong phần được lấy mẫu nói trên, sao cho khi phần này trải qua quá trình phân tách vật lý, nó chỉ chứa một loại vi sinh vật quan tâm (28) được chọn nói trên hoặc tập hợp các vi sinh vật quan tâm (28) khác nhau được chọn nói trên.

7. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm chu kỳ lặp lại của các bước của phương pháp.

8. Phương pháp nuôi cấy (20) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28) nói trên là vi khuẩn lam *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA).

9. Hệ thống thiết bị (27) để nuôi cấy ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28), bằng cách dị dưỡng hoặc tạp dưỡng, khác biệt ở chỗ hệ thống thiết bị này bao gồm:

- ít nhất một ngăn nuôi cấy mở hoặc đóng (29) được thiết kế để nhận môi trường nuôi cấy chứa nước (30), ít nhất một vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32) nói trên;
- ít nhất một dụng cụ tách (33) được thiết kế để thực hiện ít nhất một lần phân tách vật lý đối với vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32) trong một phần của môi trường nuôi cấy (30);
- dụng cụ phân giải (34) được thiết kế để thực hiện phân giải vi sinh vật tạp nhiễm (32) đã được tách bằng quá trình phân tách vật lý để tạo ra dịch phân giải (35);
- phương tiện vận chuyển được thiết kế ít nhất là để:
 - o lấy mẫu mỗi ngày một phần môi trường nuôi cấy (30) chứa vi sinh vật quan tâm (28) và vi sinh vật tạp nhiễm (32), phần này tương ứng với thể tích lớn hơn hoặc bằng một lần thể tích của môi trường nuôi cấy (30);
 - o đưa lại dịch phân giải (35) vào ngăn nuôi cấy (29).

10. Hệ thống thiết bị nuôi cấy (27) theo điểm 9, trong đó phương tiện vận chuyển còn

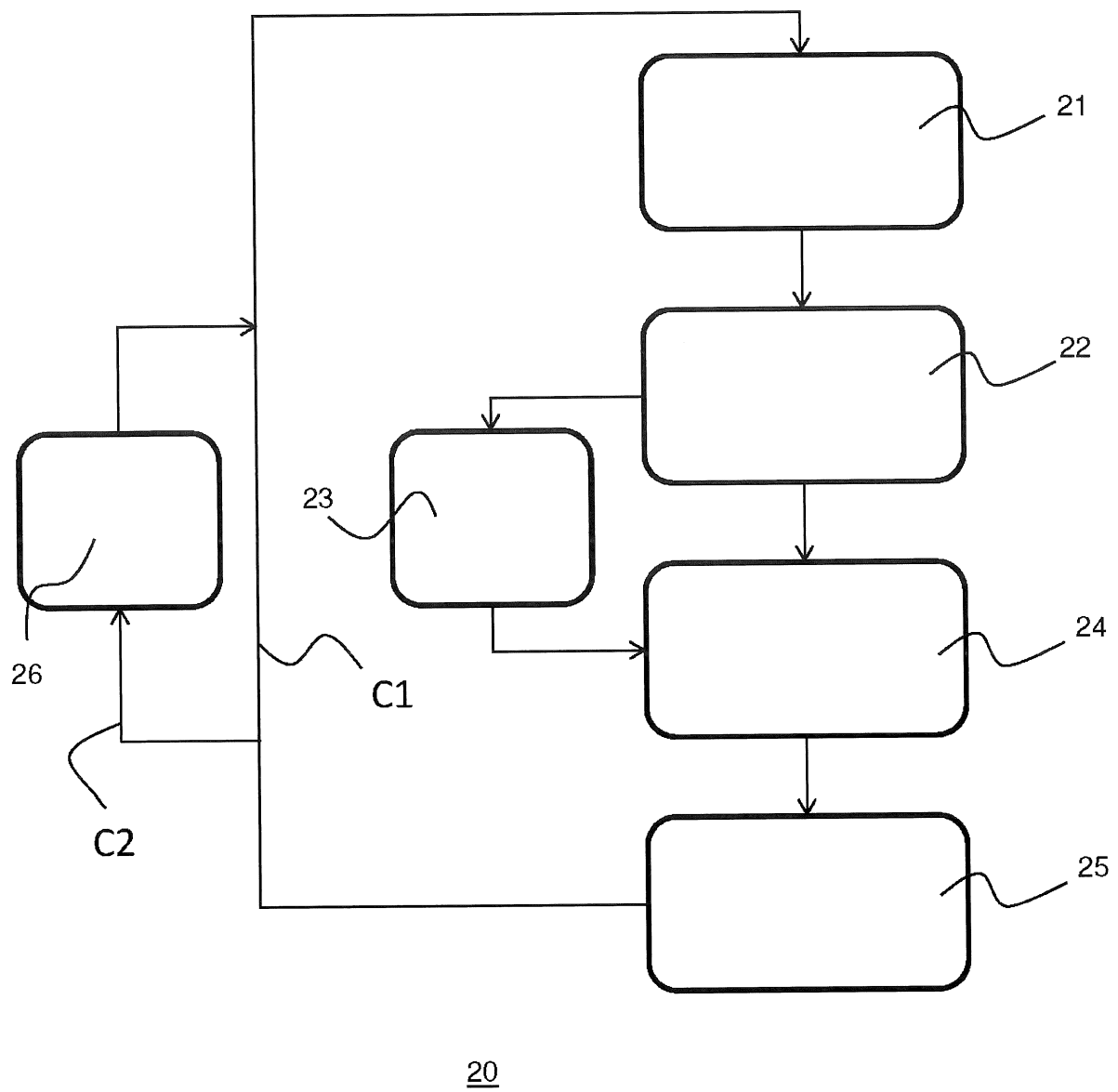
được thiết kế để:

- hợp nhất dịch phân giải (35) với vi sinh vật quan tâm (28) đã được tách, để tạo thành hỗn hợp và đưa lại hỗn hợp này vào ngăn nuôi cấy (29);
- cung cấp cacbon hữu cơ cho môi trường nuôi cấy (30) trực tiếp vào ngăn nuôi cấy (29), vào dịch phân giải (35) hoặc vào hỗn hợp hoặc cho vi sinh vật quan tâm (28) đã được tách bằng phân tách vật lý.

11. Hệ thống thiết bị nuôi cấy (27) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 10, bao gồm ít nhất một hệ thống cô đặc (36) được thiết kế để cô đặc các vi sinh vật tạp nhiễm đã tách (32).

12. Hệ thống thiết bị nuôi cấy (27) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, bao gồm dụng cụ (46) để xả vi sinh vật tạp nhiễm (32), dụng cụ (47) để xả môi trường nuôi cấy (30) không có vi sinh vật tạp nhiễm (32) và vi sinh vật quan tâm (28) và dụng cụ (48) để thu gom vi sinh vật quan tâm (28).

1/3

**Fig. 1**

2/3

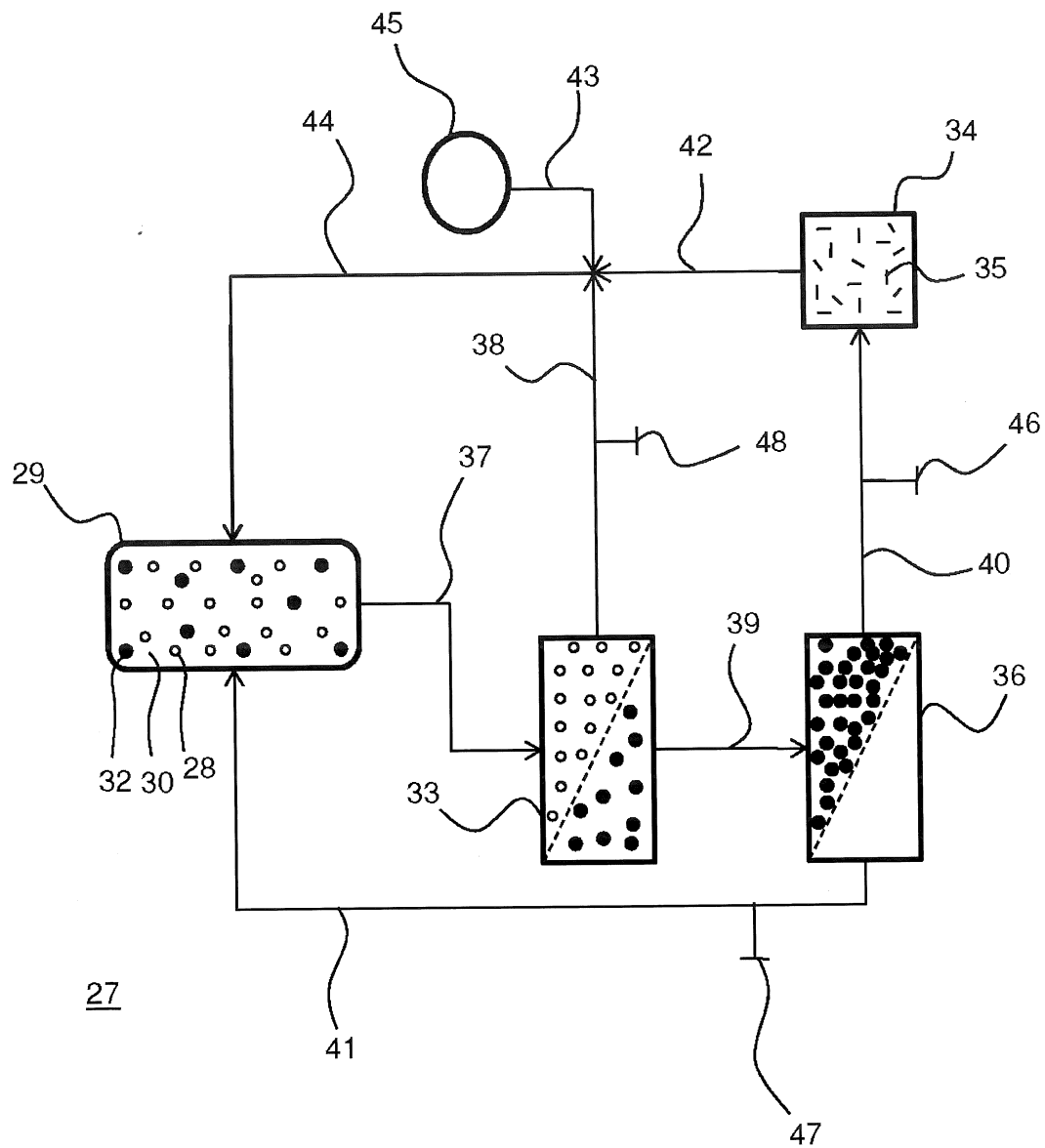


Fig. 2

3/3

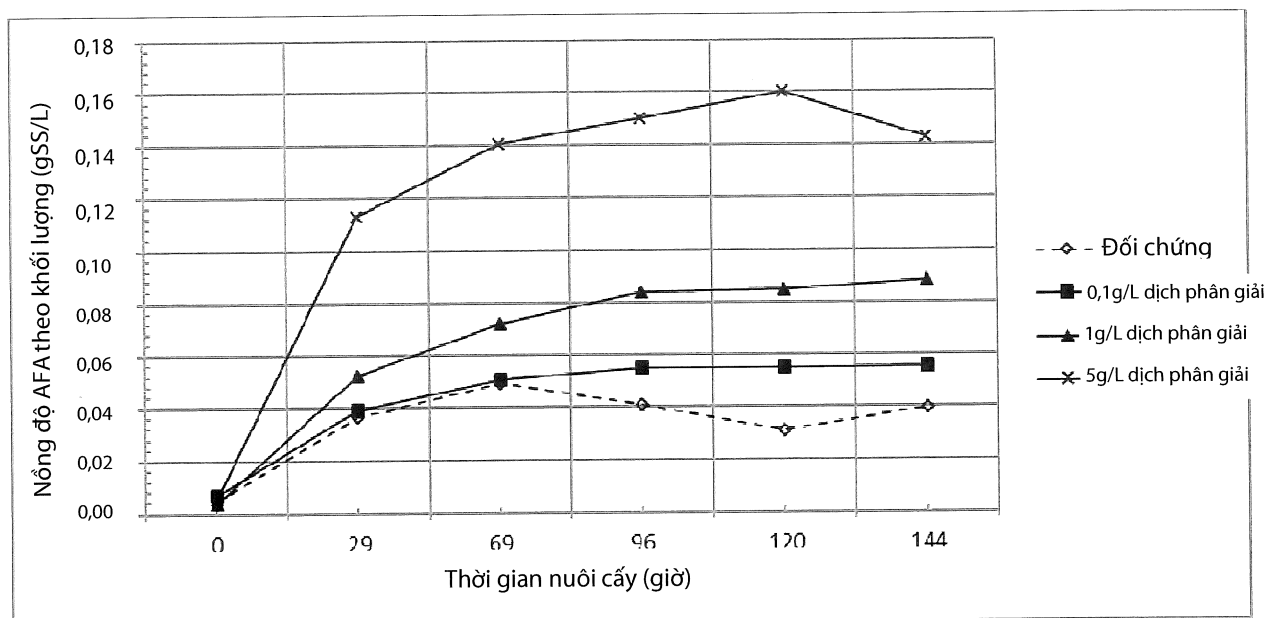


Fig. 3