



(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) 
2-0002245

(51)⁷ **A01G 33/00, A01H 4/00, 13/00**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00289

(22) 16.08.2016

(45) 27.01.2020 382

(43) 26.02.2018 359

(73) **VIỆN NGHIÊN CỨU HẢI SẢN (VN)**
224 Lê Lai, Ngõ Quyền, thành phố Hải Phòng

(72) **Đào Duy Thu (VN), Nguyễn Văn Nguyên (VN), Phạm Thị Mát (VN), Nguyễn Tiến
Thắng (VN)**

(54) **QUY TRÌNH TẠO MÔ SẸO DẠNG SỢI TRONG NUÔI CẤY MÔ RONG SỤN
KAPPAPHYCUS ALVAREZII**

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tạo mô sẹo dạng sợi trong nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*, trong đó quy trình này bao gồm các bước: i) chuẩn bị rong nguyên liệu, (ii) tạo nguyên liệu vô trùng và (iii) cảm ứng tạo mô sẹo và chăm sóc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo mô sẹo dạng sợi trong nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đối với rong sụn *Kappaphycus alvarezii*, nhân giống bằng nuôi cấy mô không những sản xuất được số lượng lớn giống mà còn cải thiện được chất lượng rong. Theo Reddy *et al.*, 2003 và Yong *et al.*, 2014, tốc độ tăng trưởng của rong sụn giống nuôi cấy mô cao hơn rong giống thường từ 1,5-1,8 lần. Hàm lượng carageenan rong sụn nuôi cấy mô là 67% cao hơn rõ rệt so với rong giống thường là 51%.

Trong công nghệ nuôi cấy mô rong sụn, tạo mô sẹo dạng sợi là bước quan trọng nhất vì mô sẹo dạng sợi là nguồn nguyên liệu đầu vào cho việc tái sinh thành tản rong giống. Hiện nay, nuôi cấy mô rong sụn thường được áp dụng theo quy trình của Reddy, 2005 (US6.858.430 B1). Theo quy trình này, việc tạo mô sẹo phải thông qua bước xử lý ngâm rong nguyên liệu 48 giờ trong hỗn hợp nước biển + 2% PES + 3% hỗn hợp kháng sinh (gồm penicillin-G 1g, streptomycin sulphat 2g, kanamycin 1g, nystatin 25mg, neomycin 200mg pha hỗn hợp trong 100ml nước cất). Khi áp dụng ở Việt Nam, quy trình này cho tỷ lệ mẫu cấy sạch rất cao (trên 90% thậm chí đạt 100%). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu chết rất cao, tỷ lệ hình thành mô sẹo rất thấp và mô sẹo hình thành không đạt tiêu chuẩn để tái sinh thành tản giống. Khi giảm nồng độ hỗn hợp kháng sinh không cho hiệu quả tốt hơn, ngược lại tỷ lệ nhiễm khuẩn ở mẫu cấy tăng lên đáng kể.

Xuất phát từ thực tiễn này, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu nhằm tìm kiếm giải pháp tạo mô sẹo mới đảm bảo tăng hiệu quả tạo mô sẹo cả về chất và lượng làm nguyên liệu tái sinh thành tản rong giống. Sau hai năm nghiên cứu, quy trình tạo mô sẹo dạng sợi ở rong sụn sử dụng dung dịch Javen (Sodium hypochlorite solution) làm dung dịch vô trùng thay cho hỗn hợp kháng sinh đã được hoàn thành.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được thực hiện để giải quyết vấn đề cụ thể nêu trên. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tạo mô sẹo dạng sợi trong nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*.

Mục đích của giải pháp hữu ích là tạo ra được mô sẹo dạng sợi chất lượng cao, ít tạp nhiễm làm nguyên liệu đầu vào cho quá trình tái sinh mô sẹo dạng sợi thành nhiều tản rong sụn giống phục vụ trồng thương phẩm.

Quy trình tạo mô sẹo dạng sợi trong nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii* theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

i. Chuẩn bị rong nguyên liệu

Chọn tản rong kích thước lớn, màu đặc trưng ngoài tự nhiên đem về nuôi trong bể kính với chế độ chiếu sáng tự nhiên, nhiệt độ 25-30°C, độ mặn 28-32‰, sục khí nhẹ và liên tục. Hàng tuần tiến hành rửa rong, thay nước mới và bổ sung muối NH_4Cl và KH_2PO_4 với lượng 1mg/L.

Sau một tháng lưu giữ, các tản rong sạch, khỏe mạnh chuyển sang nuôi thích nghi trong phòng thí nghiệm ít nhất 01 tuần dưới ánh sáng đèn huỳnh quang 25-35 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12, nhiệt độ $23\pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục. Dùng dao tách lấy những nhánh rong có đường kính lớn hơn 3mm, rửa sạch 2 lần bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng làm nguyên liệu cho bước tiếp theo.

ii. Tạo nguyên liệu vô trùng

Từng nhánh trên được cắt bỏ phần ngọn, soi qua kính soi nổi phóng đại 40 lần để lựa chọn lấy những đoạn có bề mặt nhẵn bóng, không bị sinh vật bám và tảo ký sinh. Cắt đoạn rong lựa chọn thành từng đoạn 5-6 cm và ngâm vào nước biển đã tiệt trùng.

Dùng bút lông (cọ vẽ) rửa nhẹ nhàng bề mặt từng đoạn rong 5-6cm với chất tẩy rửa sau đó tráng qua nước biển đã tiệt trùng rồi ngâm trong dung dịch Povidon iot 2% trong 3 phút và rửa lại bằng nước biển đã tiệt trùng.

Tiếp theo, các đoạn rong được ngâm trong dung dịch Javen (NaOCl) nồng độ 0,25% trong 5-10 giây, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước biển đã tiệt trùng.

iii. *Cảm ứng tạo mô sẹo và chăm sóc*

Từng đoạn rong 5-6cm được lau khô rồi tiếp tục cắt thành từng đoạn ngắn 2-3mm. Từng đoạn 2-3mm được lau sạch chất nhầy ở vết cắt rồi cấy trên đĩa petri chứa 20ml môi trường PES 2% và thạch (agar) 1-1,5%. Mỗi đĩa petri cấy 9-10 mẫu, đậy nắp, quấn parafin và đặt úp trên kệ nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$, ánh sáng $5 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12.

Sau 4-6 tuần, tiến hành cấy chuyển mẫu cấy đã phát sinh mô sẹo sang đĩa petri có môi trường PES mới. Sau 2-3 tháng, mô sẹo tạo ra phát triển khắp bề mặt vết cắt hoặc mẫu cấy thì tiến hành cắt lấy mô sẹo để nhân nhanh thành các mô sẹo khác hoặc tái sinh thành tản giống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: thể hiện rong sụn nguyên liệu nuôi cấy mô (hình 1A) và các đoạn rong sau lựa chọn dưới kính giải phẫu (hình 1B).

Hình 2: thể hiện hình ảnh minh họa việc xử lý với Povidon iot (hình 2A) và dung dịch Javen (hình 2B).

Hình 3: thể hiện hình ảnh minh họa quá trình cắt (hình 3A) và cấy mẫu tạo mô sẹo (hình 3B).

Hình 4: thể hiện hình ảnh mô sẹo tạo ra trên bề mặt vết cắt các mẫu cấy (hình 4A) và hình ảnh mô sẹo ở hai đầu mẫu cấy (hình 4B) và toàn bộ mẫu cấy (hình 4C).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích sẽ được mô tả một cách chi tiết các bước và các điều kiện cần thiết để thực hiện quy trình tạo mô sẹo dạng sợi.

Cụ thể, quy trình tạo mô sẹo dạng sợi theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

i) Chuẩn bị rong nguyên liệu

Chọn tản rong sụn nguyên vẹn có chiều dài trên 0,3m, màu sáng bóng đặc trưng (nâu hoặc xanh) từ ngoài biển đem về nuôi các trong bể đặt ở râm mát, ngoài trời tránh chiếu sáng trực tiếp vào tản rong. Nhiệt độ nước trong bể kính duy trì từ 25-30°C, độ mặn 28-32‰, sục khí nhẹ và liên tục.

Hàng tuần tiến hành rửa các tản rong, loại bỏ phần chết và tảo bám đồng thời thay nước mới toàn bộ và bổ sung muối NH_4Cl và KH_2PO_4 với lượng 1mg/L. Sau ít nhất một tháng lưu giữ, lựa chọn những tản rong sạch, màu sáng bóng chuyển sang nuôi thích nghi trong phòng thí nghiệm ít nhất 1 tuần dưới ánh sáng đèn huỳnh quang $25\text{-}35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12, nhiệt độ $23\pm 1^\circ\text{C}$, sục khí nhẹ, liên tục.

Sau thời gian nuôi thích nghi phòng thí nghiệm, chọn tản rong màu sáng bóng, không bệnh, không mất ngọn làm nguyên liệu. Dùng dao sắc tách lấy những nhánh rong có đường kính lớn hơn 3mm từ tản rong đã chọn, sau đó rửa sạch 2 lần bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng làm rong nguyên liệu cho bước tiếp theo.

ii) Tạo nguyên liệu vô trùng

Tại phòng thí nghiệm, từng nhánh rong nguyên liệu trên được cắt bỏ phần ngọn có đường kính nhỏ hơn 3mm, sau đó đem soi dưới kính soi nổi ở độ phóng đại 40 lần để cắt lấy những đoạn có bề mặt nhẵn bóng, không bị sinh vật bám và tảo ký sinh. Các đoạn rong lựa chọn được tiếp tục cắt thành từng đoạn 5-6 cm và ngâm vào nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng.

Dùng bút lông (cọ vẽ) rửa nhẹ nhàng toàn bộ bề mặt từng đoạn rong 5-6cm với chất tẩy rửa ở nồng độ 0,5% từ 1- 3 phút/đoạn. Sau đó, rong được tráng qua nước biển đã tiệt trùng rồi ngâm trong dung dịch Povidon iod 2% (0,5% w/v) trong 3 phút và rửa lại bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng.

Tiếp theo, các đoạn rong được ngâm trong dung dịch Javen (NaOCl) nồng độ 0,25% trong 5-10 giây sau đó nhanh chóng rửa lại 3 lần bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng để loại bỏ Javen bám trên đoạn rong. Trong quá trình ngâm Javen, chú ý lắc đều tay để dung dịch Javen ngấm vào khe, kẽ trên bề mặt của đoạn rong. Toàn bộ quá trình từ bước ngâm Povidon iod phải được thực hiện trong buồng cấy vô trùng.

iii) Cắm ống tạo mô sẹo và chăm sóc

Trong buồng cấy vô trùng, từng đoạn rong 5-6cm sau quá trình xử lý trên được lau khô bằng giấy thấm đã tiệt trùng rồi cắt thành từng đoạn ngắn 2-3mm (gọi là mẫu cấy), loại bỏ hai phần đầu của đoạn rong. Từng mẫu cấy được lau sạch chất nhầy ở vết

cắt rời cây trên đĩa petri (loại có đường kính 9cm của Đức) chứa 20ml môi trường PES 2% và thạch (agar) 1-1,5%. Mỗi đĩa petri cấy 9-10 mẫu và để khoảng cách giữa các mẫu tương đối đều nhau đảm bảo việc hấp thu dinh dưỡng triệt để. Các đĩa sau đó được đậy nắp, quấn parafin và đặt úp trên kệ nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, ánh sáng $5-7\text{ }\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12.

Việc phát sinh mô sẹo sẽ bắt đầu sau khoảng 5 ngày nuôi cấy. Sau 4-6 tuần, tiến hành cấy chuyển mẫu cấy đã phát sinh mô sẹo sang đĩa petri có môi trường PES mới. Sau 2-3 tháng, mô sẹo tạo ra phát triển khắp bề mặt vết cắt hoặc mẫu cấy thì tiến hành cắt lấy mô sẹo để nhân nhanh thành các mô sẹo khác hoặc tái sinh thành tản giống.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Phần ví dụ dưới đây nhằm minh họa cho giải pháp hữu ích, tuy nhiên phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích không nhằm giới hạn bởi các nội dung nêu trong phần ví dụ này.

Ví dụ tạo 10 đĩa mô sẹo rong sụn (tương đương 90-100 mẫu cấy 2-3mm)

i) Chuẩn bị rong nguyên liệu

Rong sụn *Kappaphycus alvarezii* được thu từ vùng biển Cam Ranh- Khánh Hòa đem nuôi trong bể tuần hoàn nước trong nhà kính. Chế độ chiếu sáng tự nhiên, nhiệt độ ổn định $25-30^{\circ}\text{C}$ và sục khí nhẹ và liên tục. Độ mặn nước biển nuôi rong duy trì $28\pm 1\text{‰}$. Hàng tuần rửa rong, thay nước, bổ sung dinh dưỡng (NH_4Cl , KH_2PO_4) với lượng 1mg/L. Sau một tháng lưu giữ ở nhà kính, lựa chọn những tản rong sạch, khỏe chuyển sang nuôi thích nghi trong phòng thí nghiệm 3 tuần dưới ánh sáng đèn huỳnh quang $25-35\text{ }\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12, nhiệt độ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, sục khí liên tục.

Sau khi thích nghi phòng thí nghiệm, lựa chọn 01 tản rong kích thước lớn (lớn hơn 0,3m, nặng 0,5kg), màu nâu đặc trưng, không dập nát, không mất ngọn làm nguyên liệu (Hình 1A) sau đó tách lấy nhánh có đường kính lớn hơn 3mm ra khỏi tản rong. Từng nhánh rong được soi qua kính giải phẫu với độ phóng đại 40 lần để xác định và cắt bỏ những vùng bị tổn thương, bị sinh vật bám và tảo ký sinh. Sau khi kiểm

tra dưới kính, các nhánh rong được rửa sạch 2 lần bằng nước biển 28‰ đã tiệt trùng (Hình 1B).

ii) Tạo nguyên liệu vô trùng

Lấy 200ml nước biển đã hấp tiệt trùng, bổ sung 1ml nước rửa chén tinh chất Lô Hội của Hàn Quốc, đổ vào khay rửa và khuấy đều. Các nhánh rong lựa chọn ở bước đầu tiên được cắt thành từng đoạn 5-6 cm, loại bỏ phần ngọn và ngâm trong các cốc đựng chứa 200ml nước biển đã tiệt trùng. Chọn lấy 10 đoạn đẹp nhất lần lượt đem cọ sạch bề mặt bằng bút lông (cọ vẽ) trong khay đựng chất tẩy rửa vừa chuẩn bị trên với tốc độ 1 đoạn/phút rồi ngâm lại trong bình tam giác chứa 200ml nước biển đã tiệt trùng. Mười đoạn rong sau khi tẩy rửa được tráng lại nước biển đã tiệt trùng rồi đem ngâm trong 200ml dung dịch Povidon iod (HD PHARMA) 2% (0,5% w/v) trong 3 phút và rửa lại bằng nước biển đã tiệt trùng trong buồng cấy vô trùng (Hình 2A). Tiếp theo, các đoạn rong này được ngâm và lắc nhẹ trong bình tam giác chứa 200ml dung dịch Javen (NaOCl) nồng độ 0,25% trong 5-10 giây sau đó nhanh chóng rửa lại 3 lần và ngâm trong bình tam giác chứa 200ml nước biển đã tiệt trùng (Hình 2B).

iii) Cầm ứng tạo mô sẹo và chăm sóc

Từng đoạn rong 5cm được lau khô bằng giấy thấm đã tiệt trùng, sau đó cắt bỏ 4mm ở hai đầu rồi cắt dứt khoát thành đoạn ngắn 2-3mm bằng dao mổ vô trùng (Hình 3A). Từng đoạn 2-3mm được lau sạch chất nhầy ở vết cắt rồi cấy trên đĩa Petri (Đức) chứa môi trường PES 2% và thạch 1,5% đã chuẩn bị sẵn. Mỗi đĩa Petri cấy 9-10 mẫu ở các khoảng cách tương đối đều nhau để đảm bảo hấp thu đủ dinh dưỡng (Hình 3B). Các đĩa được đậy nắp, quấn parafin và đặt úp trên kệ, nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ duy trì bằng điều hòa nhiệt độ, ánh sáng huỳnh quang $5 \mu\text{mol photon m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12. Sau 4-6 tuần, tiến hành cấy chuyển mẫu cấy đã phát sinh mô sẹo sang đĩa Petri có môi trường PES mới. Sau 2-3 tháng, mô sẹo tạo ra phát triển khắp bề mặt vết cắt hoặc mẫu cấy (Hình 4A-B).

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình tạo mô sẹo theo giải pháp hữu ích sẽ phát sinh mô sẹo sau 5 ngày nuôi cấy. Sau 2-3 tháng nuôi cấy, mô sẹo tạo ra có thể sử dụng để tái sinh thành cây rong mới. Kết quả thử nghiệm cho thấy quy trình tạo mô sẹo như trên cho tỷ lệ mẫu

cấy vô khuẩn đạt khoảng 80%. Tỷ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo đạt trên 80-90%, trong đó mô sẹo loại tốt đạt trên 50%. Kết quả này cao hơn rõ rệt so với việc áp dụng quy trình thông thường sử dụng hỗn hợp kháng sinh. Ngoài ra, việc khử trùng bằng dung dịch Javen còn tiết kiệm thời gian (thời gian rút ngắn từ 48 giờ xuống chỉ còn 5-10 giây) và giúp giảm chi phí rất nhiều do giá các loại thuốc kháng sinh (penicillin-G, streptomycin sulphat, kanamycin, nystatin và neomycin) cao gấp nhiều lần so với dung dịch Javen.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo mô sẹo dạng sợi trong nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*, trong đó quy trình này gồm các bước sau:

i) chuẩn bị rong nguyên liệu

chọn tản rong kích thước lớn, màu đặc trưng ngoài tự nhiên đem về nuôi trong bể kính với chế độ chiếu sáng tự nhiên, nhiệt độ nước trong bể từ 25-30°C, độ mặn 28-32‰, sục khí nhẹ, hàng tuần tiến hành rửa rong, thay nước mới và bổ sung muối NH_4Cl và KH_2PO_4 với lượng 1mg/L; sau một tháng lưu giữ, các tản rong sạch, khỏe mạnh chuyển sang nuôi thích nghi trong phòng thí nghiệm ít nhất 1 tuần dưới ánh sáng đèn huỳnh quang 25-35 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12, nhiệt độ $23\pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục; dùng dao tách lấy những nhánh rong có đường kính lớn hơn 3mm, rửa sạch 2 lần bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng làm nguyên liệu cho bước tiếp theo;

ii) tạo nguyên liệu vô trùng

từng nhánh rong trên được cắt bỏ phần ngọn, soi qua kính soi nổi phóng đại 40 lần để lựa chọn lấy những đoạn có bề mặt nhẵn bóng, không bị sinh vật bám và tảo ký sinh, cắt đoạn rong lựa chọn thành từng đoạn 5-6 cm và ngâm vào nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng;

dùng bút lông (cọ vẽ) rửa nhẹ nhàng bề mặt từng đoạn rong 5-6cm với chất tẩy rửa ở nồng độ 0,5% từ 1- 3 phút/đoạn, sau đó tráng qua nước biển đã tiệt trùng rồi ngâm trong dung dịch Povidon iot 2% trong 3 phút và rửa lại bằng nước biển đã tiệt trùng; tiếp theo, các đoạn rong được ngâm trong dung dịch Javen (NaOCl) nồng độ 0,25% trong 5-10 giây, sau đó rửa lại 3 lần bằng nước biển có độ mặn 28-32‰ đã tiệt trùng;

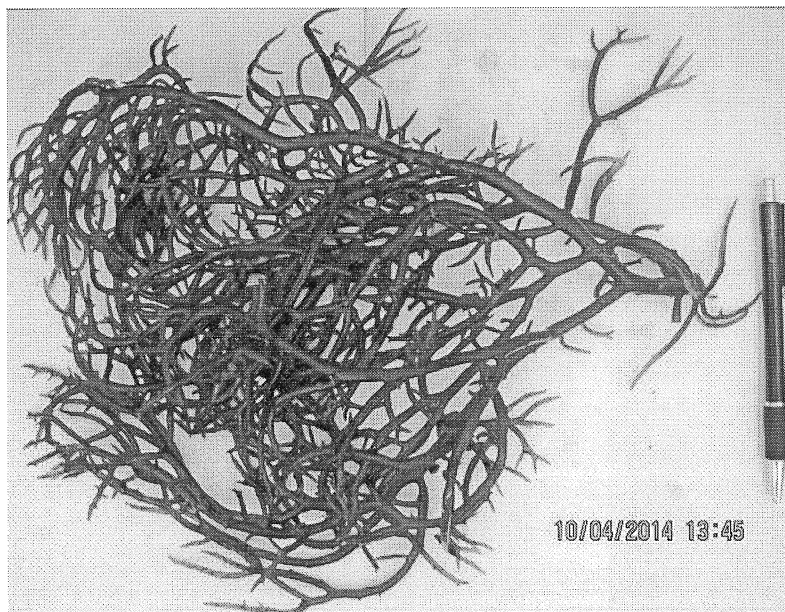
iii) cảm ứng tạo mô sẹo và chăm sóc

từng đoạn rong 5-6cm thu được ở bước ii) được lau khô rồi tiếp tục cắt thành từng đoạn ngắn 2-3mm, từng đoạn này được lau sạch chất nhầy ở vết cắt rồi cấy trên đĩa petri chứa 20 ml môi trường PES 2% và thạch 1-1,5%; mỗi đĩa petri cấy 9-10 mẫu.

đậy nắp, quấn parafin và đặt úp trên kệ nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, ánh sáng $5\text{ }\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D= 12:12;

sau 4-6 tuần tiến hành cấy chuyển mẫu cây đã phát sinh mô sẹo sang đĩa petri có môi trường PES mới, sau 2-3 tháng, mô sẹo tạo ra phát triển khắp bề mặt vết cắt hoặc mẫu cấy thì tiến hành cắt lấy mô sẹo để nhân nhanh thành các mô sẹo khác hoặc tái sinh thành tản giống.

Hình 1A



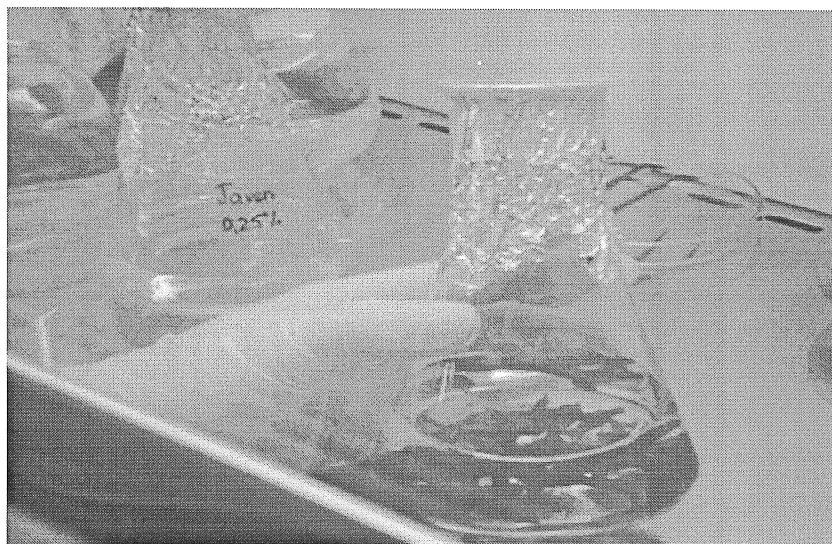
Hình 1B



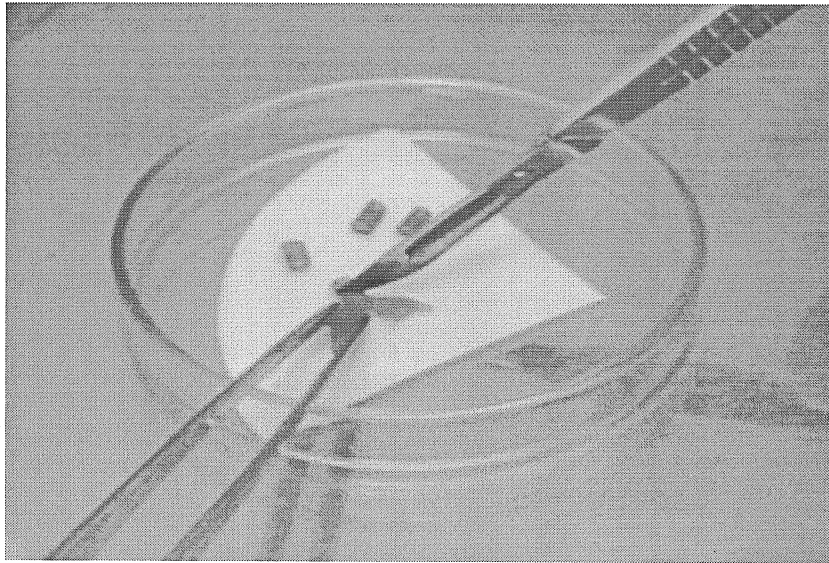
Hình 2A



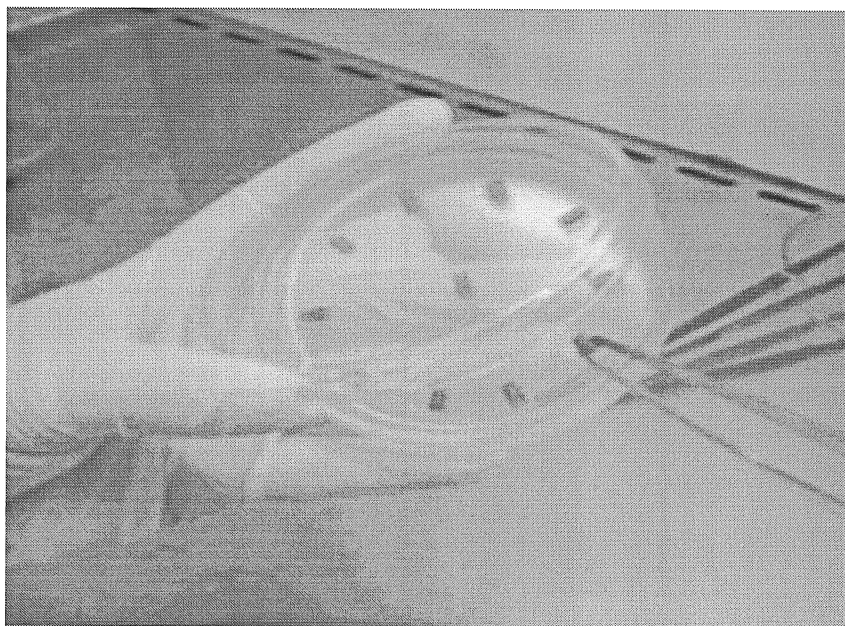
Hình 2B



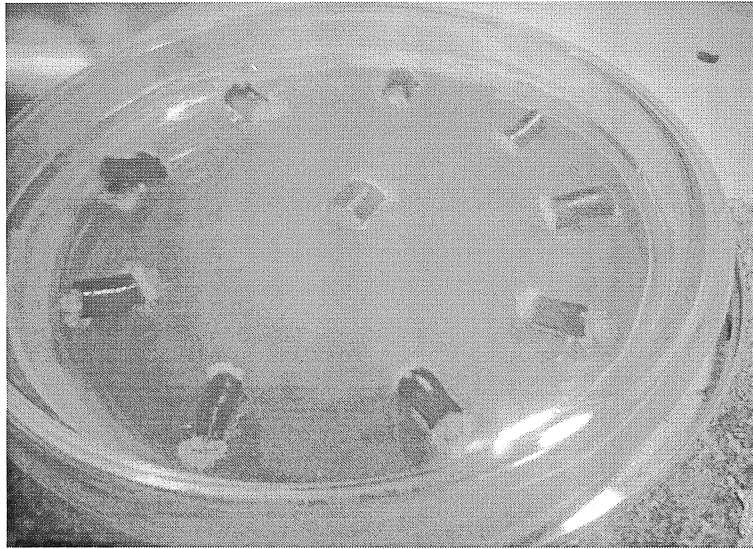
Hình 3A



Hình 3B



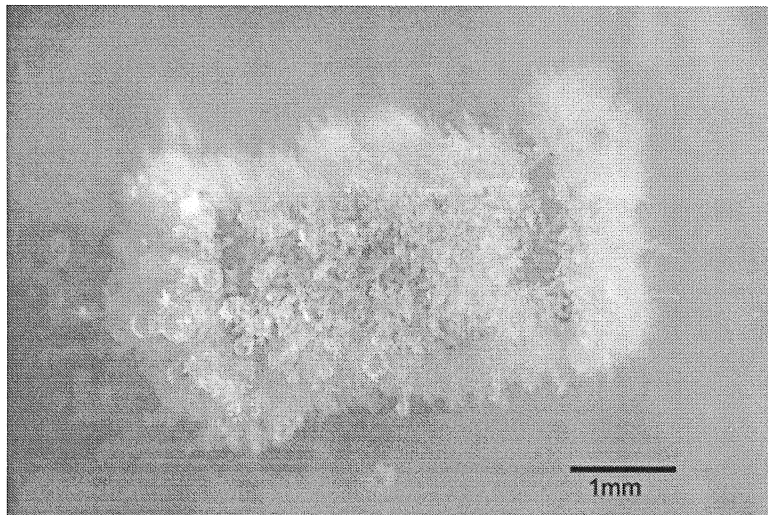
Hình 4A



Hình 4B



Hình 4C



CÔNG THỨC MÔI TRƯỜNG PES

Theo Provasoli L (1968) Jap Soc Plant Physiol. Tokyo 63-75

Bước 1: Tạo các dung dịch gốc theo công thức sau:

PES gốc

NaNO ₃	: 350 mg
Glycerin Phosphat . Na	: 50 mg
Fe EDTA (2 Na)	: 18,8 mg
* Hỗn hợp kim loại gốc	: 25 ml
* Hỗn hợp vitamin gốc	: 1 ml
Tris	: 500 mg
Chỉnh pH về	: 7,8
Nước cất	: 100 ml

Pha các vitamin gốc

Biotin	: 50 mg/100 ml
Cyanocobalmin	: 10 mg/100 ml
Thiamin HCl	: 500 mg/100 ml

* Hỗn hợp vitamin gốc

Biotin gốc	: 1 ml
Cyanocobalmin gốc	: 10 ml
Thiamin HCl gốc	: 10 ml
Nước cất	: 79 ml

*** Hỗn hợp kim loại gốc**

EDTA – Na ₂	: 1 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	: 48,5 mg
(hoặc FeCl ₃)	: 29,2 mg)
MnCl ₂ .4H ₂ O	: 143 mg
ZnCl ₂	: 10 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	: 4 mg
(hoặc CoCl ₂)	: 2,2 mg)
H ₃ BO ₃	: 1,176 g
Nước cất	: 1000 ml

Bước 2: Tạo môi trường PES: Cho 20 ml dung dịch PES gốc vào 1 lít nước biển.