



(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)



**2-0002645**

(51) **A01K 61/20**  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2021-00018 (22) 10/11/2017  
(67) 1-2017-04495  
(45) 25/06/2021 399 (43) 27/05/2019 374A  
(73) Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế (VN)  
102 Phùng Hưng, Thành Phố Huế, Thừa Thiên Huế  
(72) Nguyễn Ngọc Phước (VN); Lê Văn Bảo Duy (VN).

---

(54) **QUY TRÌNH NUÔI LUÂN TRÙNG PROALES SIMILIS LÀM THỨC ĂN CHO ẤU  
TRÙNG CÁ BIỂN**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* có kích thước rất nhỏ khoảng 40-80  $\mu\text{m}$  để làm thức ăn cho ấu trùng cá biển. Trong đó giải pháp hữu ích sử dụng thức ăn kết hợp tảo *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* và các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* BHTS10, *Lactobacillus brevis* BHTS2, *Pediococcus acidilactici* BHTS12, *Pediococcus pentosaceus* BHTS4, *Lactobacillus fermentum* BHTS6 và *Bacillus subtilis* BHTS3 theo tỷ lệ thích hợp cho phép rút ngắn thời nuôi luân trùng *Proales similis* và giảm tỷ lệ tạp nhiễm, thu được luân trùng *Proales similis* với mật độ 500 000 cá thể/lít. Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thu được luân trùng *Proales similis* để ứng dụng làm thức ăn cho ấu trùng cá biển.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nuôi trồng vi sinh vật và thủy sản, cụ thể giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* để làm thức ăn cho ấu trùng cá biển.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Luân trùng hay còn gọi là rotifer đóng vai trò nguồn thức ăn cơ bản cho cá giai đoạn ấu trùng và được ứng dụng trong sản xuất giống đối với nhiều loài cá biển có cỡ miệng nhỏ như cá đĩa, cá mú, cá tráp, chình biển và một số loài cá cảnh. Cá biển ở giai đoạn sắp hết noãn hoàng bắt đầu sử dụng thức ăn bên ngoài, khoảng từ 3 đến 5 ngày tuổi, thường có cỡ miệng rất nhỏ, ví dụ cá đĩa có kích thước miệng từ 80 đến 120  $\mu\text{m}$  nên cần có loại thức ăn có kích thước phù hợp. Trong giai đoạn này, đường ruột của ấu trùng cá biển vẫn còn thiếu một số loại enzym tiêu hóa như lipaza, proteaza nên phải lấy enzym từ thức ăn bên ngoài. Do đó, nguồn thức ăn bên ngoài cần đủ nhỏ để phù hợp với kích cỡ miệng của cá và đầy đủ các thành phần dinh dưỡng để ấu trùng cá có thể tiêu hóa được.

Các loài luân trùng thuộc họ Brachionidae thường được nuôi để sử dụng làm thức ăn cho ngành công nghiệp sản xuất giống cá biển. Tùy theo kích thước mà luân trùng được chia thành 3 nhóm: nhóm có kích thước siêu nhỏ SS (90–110  $\mu\text{m}$ ), loại nhỏ S (100–120  $\mu\text{m}$ ) và loại lớn L (130–340  $\mu\text{m}$ ). Năm 2009, Wullur và cộng sự đã phát hiện dòng luân trùng *Proales similis* có kích thước cơ thể vô cùng nhỏ, chỉ từ 40-80  $\mu\text{m}$ , nhỏ hơn cả dòng siêu nhỏ SS ở trên và có thể làm thức ăn phù hợp cho ấu trùng các loài cá biển có kích thước miệng nhỏ.

Ở cá đĩa và các loài cá miệng nhỏ khác, trong giai đoạn từ 3 đến 5 ngày tuổi, các loại luân trùng cỡ lớn (*Brachionus* sp.) không phù hợp, do đó, các loài luân trùng cỡ siêu nhỏ đóng vai trò cốt yếu trong nguồn thức ăn của ấu trùng cá. Luân trùng *Proales similis* là một ứng viên sáng giá sử dụng làm thức ăn cho ấu trùng cá biển do kích thước và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng. Hiện ngành nuôi cá biển có cỡ

miệng nhỏ vẫn gặp nhiều khó khăn, do chủ yếu là vì thiếu nguồn cung cấp thức ăn cho giai đoạn cá vừa hết noãn hoàng, dẫn đến tỉ lệ sống rất thấp.

Theo nghiên cứu của Wullur và cộng sự (2009) cho thấy có thể dùng tảo *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* để nuôi *Proales similis* từ mật độ 25 cá thể/mL lên 2500 cá thể/mL trong 11 ngày ở độ mặn 25‰, nhiệt độ 25°C có sục khí mạnh. Tiếp đó, Duy và cộng sự, (2017) đã sử dụng nhóm vi khuẩn lactic và hỗn hợp hai loại tảo *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* để nuôi *Proales similis* ở quy mô thể tích 100 lít và đã cho thấy việc bổ sung nhóm vi khuẩn lactic có tác dụng tốt để luân trùng phát triển. Tuy nhiên, quá trình này nuôi kéo dài, mất từ 11 đến 14 ngày cho mỗi chu kỳ nhân như theo báo cáo của Đại học Nagasaki, Nhật Bản. Một khó khăn trong việc nuôi luân trùng siêu nhỏ là do tạp nhiễm động vật nguyên sinh, nhiễm khuẩn do thời gian nuôi kéo dài.

Do đó, cần có quy trình nuôi luân trùng siêu nhỏ (*Proales similis*) sao cho có thể tăng mật độ và rút ngắn thời gian nuôi, giảm khả năng bị tạp nhiễm để có khả năng ứng dụng phát triển sử dụng luân trùng siêu nhỏ hỗ trợ cho ngành nuôi trồng thủy sản, cụ thể là tạo thức ăn cho ấu trùng cá biển trong giai đoạn nhân giống cá.

### **Bản chất kỹ thuật giải pháp hữu ích**

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* làm thức ăn cho ấu trùng cá biển, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) nhân giống khởi động bằng cách bổ sung 50 ml luân trùng *Proales similis* giống với mật độ 200 000 cá thể/lít vào 1 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 5ml/l thức ăn cho luân trùng, 20 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500000 cá thể/lít;

b) nhân giống cấp một bằng cách chuyển 1 lít môi trường nuôi thu được từ bước a) nhân giống khởi động sang bể nuôi chứa 10 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 10 ml/l thức ăn cho luân trùng, 30 mg/l nấm men bánh mỳ và

hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500000 cá thể/lít;

c) nhân giống cấp hai bằng cách chuyển 10 lít môi trường nuôi thu được từ bước b) nhân giống cấp một sang bể nuôi chứa 80 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 15 ml/l thức ăn cho luân trùng, 40 mg/l nấm men bánh mỳ, thời gian nuôi trong 6 ngày; và

d) nhân giống sản xuất và thu thành phẩm bằng cách chuyển 80 lít môi trường nuôi thu được từ bước c) nhân giống cấp hai sang bể nuôi chứa 300 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 20 ml/l thức ăn cho luân trùng, 50 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 30% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít;

trong đó thức ăn cho luân trùng bao gồm hỗn hợp vi sinh có trong nước muối sinh lý với mật độ  $10^6$  tế bào/ml và được phối trộn theo tỷ lệ % thể tích sau:

- tảo <i>Nannochloropsis oculata</i> :	55
- tảo <i>Chlorella vulgaris</i> :	15
- vi khuẩn <i>Lactobacillus plantarum</i> BHTS10:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus brevis</i> BHTS2:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus acidilactici</i> BHTS12:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus pentosaceus</i> BHTS4:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i> BHTS6:	5
- vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> BHTS3:	5.

#### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án thực hiện này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ.

Luân trùng được sử dụng để nuôi theo giải pháp hữu ích có tên khoa học *Proales similis*, đây là loài luân trùng có kích thước rất nhỏ, chỉ khoảng từ 40 đến 80 µm có

phân bố và được phân lập từ tự nhiên và tốt nhất đã được nuôi thuần hóa để làm quen trong điều kiện nuôi nhân tạo. *Proales similis* đã được chứng minh phù hợp dùng làm thức ăn cho ấu trùng cá biển.

Các loài tảo được sử dụng theo giải pháp hữu ích, cụ thể gồm các loài tảo *Nannochloropsis oculata*, tảo *Chlorella vulgaris* là đã biết và được sử dụng rộng rãi. Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* BHTS10, vi khuẩn *Lactobacillus brevis* BHTS2, vi khuẩn *Pediococcus acidilactici* BHTS12, vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* BHTS4, vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* BHTS6 và vi khuẩn *Bacillus subtilis* BHTS3 là các biến chủng được lưu giữ trong ống nghiệm và cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản - Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế. Nấm men bánh mỳ được sử dụng là loại nấm men có bán trên thị trường sử dụng trong lên men sản xuất bánh mỳ có bán trên thị trường ở dạng chế phẩm bột.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* làm thức ăn cho ấu trùng cá biển, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) nhân giống khởi động; b) nhân giống cấp một; c) nhân giống cấp hai; và d) nhân giống sản xuất và thu thành phẩm.

Trong bước nhân giống khởi động bằng cách bổ sung 50 ml luân trùng *Proales similis* giống với mật độ 200 000 cá thể/lít vào 1 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 5ml/l thức ăn cho luân trùng, 20 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

Trong bước nhân giống cấp một bằng cách chuyển 1 lít môi trường nuôi thu từ bước nhân giống khởi động sang bể nuôi chứa 10 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 10 ml/l thức ăn cho luân trùng, 30 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

Trong bước nhân giống cấp hai bằng cách chuyển 10 lít môi trường nuôi thu được từ bước nhân giống cấp một sang bể nuôi chứa 80 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm

6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 15 ml/l thức ăn cho luân trùng, 40 mg/l nấm men bánh mỳ, thời gian nuôi trong 6 ngày.

Trong bước nhân giống sản xuất và thu thành phẩm bằng cách chuyển 80 lít môi trường nuôi thu được từ bước nhân giống cấp hai sang bể nuôi chứa 300 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 20 ml/l thức ăn cho luân trùng, mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 30% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

Thức ăn cho luân trùng theo giải pháp hữu ích được sản xuất trên cơ sở sinh khối của hai loài tảo và sáu loài lợi khuẩn như sau:

Mẫu tảo *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* giống lần lượt được nuôi trong môi trường Walne bao gồm 32,94 ppm nitơ và 7,89 ppm phospho và các khoáng bao gồm sắt clorua ( $\text{FeCl}_3$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , EDTA,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , vitamin B1 và  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Tảo được thu hoạch sau 5 ngày nuôi bằng cách ly tâm thu sinh khối. Tảo được rửa bằng nước muối sinh lý và chuẩn độ đến mật độ  $10^6$  tế bào/ml.

Mẫu vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* BHTS10, *Lactobacillus brevis* BHTS2, *Pediococcus acidilactici* BHTS12, *Pediococcus pentosaceus* BHTS4, *Lactobacillus fermentum* BHTS6 và *Bacillus subtilis* BHTS3 được thu nhận từ phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản - Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế được nuôi cấy như sau:

Cấy lần lượt *Lactobacillus plantarum* BHTS10, *Lactobacillus brevis* BHTS2, *Lactobacillus fermentum* BHTS6, *Pediococcus acidilactici* BHTS12 và *Pediococcus pentosaceus* BHTS4 giống gốc lên môi trường thạch MRS bao gồm: pepton 10g/L, cao thịt bò 10g/L, cao nấm men 5g/L, glucoza 20g/L, di-kali hydro phosphat 2g/L, natri axetat 5g/L, magie sulphat 0,2g/L, mangan sulphat 0,05g/L, thạch 15g/L và tween 80 1g/L.

Khuẩn lạc thuần của từng chủng vi khuẩn thu được trên môi trường thạch được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường MRS lỏng bao gồm: pepton 10g/L, cao thịt bò

10g/L, cao nấm men 5g/L, glucoza 20g/L, di-kali hydro phosphat 2g/L, natri axetat 5g/L, magie sulphat 0,2g/L, mangan sulphat 0,05 g/L, tween 80 1g/L trong điều kiện pH=8, thời gian nuôi 24 giờ. Sau đó ly tâm môi trường thu sinh khối vi khuẩn ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút. Vi khuẩn sau khi ly tâm được chuẩn độ trong dung dịch nước muối sinh lý. Nồng độ OD của dung dịch vi khuẩn được điều chỉnh về OD=1 ở 600 nm bằng máy quang phổ, tương đương là  $10^6$  tế bào/mL. Nồng độ vi khuẩn trong từng mẫu được đo bằng phương pháp của Miles và Misra (1938). Dung dịch chứa mẫu vi khuẩn này ( $10^6$  tế bào/mL) được sử dụng để phối trộn tạo thức ăn cho luân trùng theo giải pháp hữu ích.

Cấy giống gốc *Bacillus subtilis* BHTS3 lên môi trường thạch MA bao gồm cao nấm men 3g/L, pepton 5g/L, thạch 15g/L, sau đó khuẩn lạc được nuôi cấy tăng sinh bằng môi trường TSB (tryptic soy broth) bổ sung 1,5% NaCl (thành phần: trypton 17g/L, cao đậu nành 3g/L, glucoza 2,5g/L, di-kali phosphat 2,5g/L, NaCl 15g/L). Nuôi cấy trong điều kiện pH=8 trong 24 giờ. Sinh khối vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút. Vi khuẩn sau khi ly tâm được chuẩn độ trong môi trường nước muối sinh lý. Nồng độ OD của dung dịch vi khuẩn được điều chỉnh về OD=1 ở 600 nm bằng máy quang phổ, tương đương là  $10^6$  tế bào vi khuẩn/mL. Nồng độ vi khuẩn trong từng mẫu được đo bằng phương pháp của Miles và Misra (1938). Dung dịch chứa mẫu vi khuẩn này ( $10^6$  tế bào/mL) được sử dụng để phối trộn tạo thức ăn cho luân trùng theo giải pháp hữu ích.

Thức ăn cho luân trùng được sử dụng bao gồm hỗn hợp vi sinh có trong nước muối sinh lý với mật độ  $10^6$  tế bào/ml thu được ở trên được phối trộn theo tỷ lệ % thể tích sau:

- tảo <i>Nannochloropsis oculata</i> :	55
- tảo <i>Chlorella vulgaris</i> :	15
- vi khuẩn <i>Lactobacillus plantarum</i> BHTS10:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus brevis</i> BHTS2:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus acidilactici</i> BHTS12:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus pentosaceus</i> BHTS4:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i> BHTS6:	5
- vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> BHTS3:	5.

Sản phẩm sau khi phối trộn được trộn đều thu được dung dịch chứa tảo và vi khuẩn có ích (lợi khuẩn) được sử dụng làm thức ăn cho động vật cho luân trùng theo giải pháp hữu ích.

### Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

#### Ví dụ 1. Sản xuất thức ăn cho luân trùng

Lần lượt cấy tảo *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* giống vào môi trường Walne bao gồm 32,94 ppm nitơ và 7,89 ppm phospho và các khoáng bao gồm sắt clorua ( $\text{FeCl}_3$ ),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , EDTA,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , vitamin B1 và  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Tảo được thu hoạch sau 5 ngày nuôi bằng máy ly tâm Sanyo (Nhật Bản), tốc độ 400 vòng/phút trong 15 phút thu sinh khối. Tảo được rửa bằng nước muối sinh lý và chuẩn độ đến mật độ  $10^6$  tế bào/ml.

Cấy lần lượt *Lactobacillus plantarum* BHTS10, *Lactobacillus brevis* BHTS2, *Lactobacillus fermentum* BHTS6, *Pediococcus acidilactici* BHTS12 và *Pediococcus pentosaceus* BHTS4 giống gốc được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản - Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế lên môi trường thạch MRS bao gồm: pepton 10g/L, cao thịt bò 10g/L, cao nấm men 5g/L, glucoza 20g/L, di-kali hydro phosphat 2g/L, natri axetat 5g/L, magie sulphat 0,2g/L, mangan sulphat 0,05g/L, thạch 15g/L và tween 80 1g/L.

Khuẩn lạc của từng chủng được cấy vào môi trường MRS lỏng bao gồm: pepton 10g/L, cao thịt bò 10g/L, cao nấm men 5g/L, glucoza 20g/L, di-kali hydro phosphat 2g/L, natri axetat 5g/L, magie sulphat 0,2g/L, mangan sulphat 0,05 g/L, tween 80 1g/L trong điều kiện pH=8, thời gian nuôi 24 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được ly tâm trên thiết bị ly tâm Sanyo (Nhật Bản) ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút thu sinh khối. Vi khuẩn sau khi ly tâm được chuẩn độ trong dung dịch nước muối sinh lý. Nồng độ OD của dung dịch vi khuẩn được điều chỉnh về OD=1 ở 600 nm bằng máy quang phổ, tương đương là  $10^6$  tế bào/mL.

Cấy giống gốc *Bacillus subtilis* BHTS3 lên môi trường thạch MA bao gồm cao nấm men 3g/L, pepton 5g/L, thạch 15g/L, sau đó khuẩn lạc được cấy vào môi trường MRS lỏng bao gồm pepton 10g/L, cao thịt bò 10g/L, cao nấm men 5g/L, glucoza 20g/L, di-kali hydro phosphat 2g/L, natri axetat 5g/L, magie sulphat 0,2g/L, mangan



sulphat 0,05 g/L, tween 80 1g/L) TSB (tryptic soy broth) bổ sung 1,5% NaCl (thành phần: trypton 17g/L, cao đậu nành 3g/L, glucoza 2,5g/L, di-kali phostphat 2,5g/L, NaCl 15g/L). Nuôi cấy trong điều kiện pH=8 trong 24 giờ. Thu sinh khối vi khuẩn bằng máy ly tâm Sanyo (Nhật Bản) ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 15 phút. Vi khuẩn sau khi ly tâm được chuẩn độ trong môi trường nước muối sinh lý. Nồng độ OD của dung dịch vi khuẩn được điều chỉnh về OD=1 ở 600 nm bằng máy quang phổ, tương đương là  $10^6$  tế bào vi khuẩn/mL.

Phối trộn 550 ml tảo *Nannochloropsis oculata*, 150 ml tảo *Chlorella vulgaris*, 50 ml vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* BHTS10, 50 ml vi khuẩn *Lactobacillus brevis* BHTS2, 50 ml vi khuẩn *Pediococcus acidilactici* BHTS12, 50 ml vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* BHTS4, 50 ml vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* BHTS6, 50 ml vi khuẩn *Bacillus subtilis* BHTS3 thu được ở trên, trộn đều để thu được 1 lít thức ăn cho luân trùng ở dạng lỏng.

#### Ví dụ 2. Nuôi luân trùng *Proales similis*

Cấy 50 ml luân trùng *Proales similis* giống đã được phân lập và nuôi thuần hóa 12 đời với mật độ 200.00 cá thể/lít vào 1 lít nước biển có độ mặn 25‰, sục khí để duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL. Chia đều 5ml thức ăn cho luân trùng thu được từ ví dụ 1, 20 mg nấm men bánh mỳ và cấp thành 6 lần/ngày. Hàng ngày thay mới 200 ml nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ để loại tạp chất và thức ăn dư. Sau 6 ngày, mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

Chuyển toàn bộ môi trường đã nuôi sang bể nuôi chứa 10 lít nước biển có độ mặn 25‰. Tiếp tục sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL. Chia đều 100 ml thức ăn cho luân trùng thu được từ Ví dụ 1, 300 mg nấm men bánh mỳ và cấp thành 6 lần/ngày. Hàng ngày thay mới 2 lít nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰. Sau 6 ngày mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

Chuyển 10 lít môi trường nuôi thu được từ bước nhân giống cấp một sang bể nuôi chứa 80 lít nước biển có độ mặn 25‰. Tiếp tục sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL. Chia 1,2 lít thức ăn cho luân trùng, 3,2 g nấm men bánh mỳ và cấp thành 6 lần/ngày, nuôi trong 6 ngày.

Chuyển 80 lít môi trường thu được ở trên sang bể nuôi chứa 300 lít nước biển có độ mặn 25‰. Duy trì điều kiện sục khí để lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL. Chia đều

lít thức ăn cho luân trùng thu được từ Ví dụ 1, 15 kg nấm men bánh mỳ và cấp thành 6 lần/ngày. Hàng ngày thay mới khoảng 100 lít nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰. Sau 6 ngày nuôi, thu được luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít.

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* theo giải pháp hữu ích cho phép nuôi được luân trùng có kích thước rất nhỏ khoảng 40-80 µm để làm thức ăn cho ấu trùng cá biển. Bằng cách kết hợp hai loài tảo là *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* cùng sáu chủng vi khuẩn bao gồm *Lactobacillus plantarum* BHTS10, *Lactobacillus brevis* BHTS2, *Pediococcus acidilactici* BHTS12, *Pediococcus pentosaceus* BHTS4, *Lactobacillus fermentum* BHTS6 và *Bacillus subtilis* BHTS3 theo tỷ lệ thích hợp, quy trình cho phép rút ngắn thời nuôi luân trùng *Proales similis* và giảm tỷ lệ tạp nhiễm.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thu được luân trùng *Proales similis* với mật độ 500 000 cá thể/lít cho phép tăng năng suất và hiệu quả trên một thể tích nuôi, phù hợp nhân nuôi luân trùng *Proales similis* để ứng dụng và chủ động nguồn thức ăn cho ấu trùng cá biển.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Quy trình nuôi luân trùng *Proales similis* làm thức ăn cho ấu trùng cá biển, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Nhân giống khởi động bằng cách bổ sung 50 ml luân trùng *Proales similis* giống với mật độ 200 000 cá thể/lít vào 1 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 5ml/l thức ăn cho luân trùng, 20mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít;

b) Nhân giống cấp một bằng cách chuyển 1 lít môi trường nuôi thu được từ bước a) nhân giống khởi động sang bể nuôi chứa 10 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 10 ml/l thức ăn cho luân trùng, 30 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 20% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít;

c) Nhân giống cấp hai bằng cách chuyển 10 lít môi trường nuôi thu được từ bước b) nhân giống cấp một sang bể nuôi chứa 80 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 15 ml/l thức ăn cho luân trùng, 40 mg/l nấm men bánh mỳ, thời gian nuôi trong 6 ngày; và

d) Nhân giống sản xuất và thu thành phẩm bằng cách chuyển 80 lít môi trường nuôi thu được từ bước c) nhân giống cấp hai sang bể nuôi chứa 300 lít nước biển có độ mặn 25‰ trong điều kiện sục khí duy trì lượng oxy hòa tan trên 6mg/mL, thức ăn được cấp làm 6 lần/ngày với tổng lượng bao gồm 20 ml/l thức ăn cho luân trùng, 50 mg/l nấm men bánh mỳ và hàng ngày thay mới 30% thể tích nước bằng nước biển sạch có độ mặn 25‰ cho đến khi mật độ luân trùng *Proales similis* đạt 500 000 cá thể/lít;

trong đó thức ăn cho luân trùng bao gồm hỗn hợp vi sinh có trong nước muối sinh lý với mật độ  $10^6$  tế bào/ml và được phối trộn theo tỷ lệ % thể tích sau:

- tảo <i>Nannochloropsis oculata</i> :	55
- tảo <i>Chlorella vulgaris</i> :	15
- vi khuẩn <i>Lactobacillus plantarum</i> BHTS10:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus brevis</i> BHTS2:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus acidilactici</i> BHTS12:	5
- vi khuẩn <i>Pediococcus pentosaceus</i> BHTS4:	5
- vi khuẩn <i>Lactobacillus fermentum</i> BHTS6:	5
- vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> BHTS3:	5.