



(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)



2-0002360

(51)⁷ **C12N 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00126

(22) 18/04/2018

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/07/2018 364A

(73) Viện Công nghệ sinh học (VN)

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Nhà A10, số 18 Hoàng Quốc Việt,
Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Thị Liên (VN); Đỗ Thị Tố Uyên (VN); Hoàng Thị Yến (VN); Lê Thị Nhi Công
(VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP KHÔNG LƯU
HUỖNH LÀM THỨC ĂN TƯƠI SỐNG CHO CON GIỐNG CÁC LOÀI HAI MẢNH VỎ
VÀ CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp chứa các
chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và
Rhodopseudomonas sp. 517 làm thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ,
trong đó quy trình này bao gồm các bước: (i) tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp,
(ii) nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10 ml, (iii) trộn hỗn
hợp vi khuẩn và nhân giống trong bình thủy tinh 500ml, (iv) nhân giống trong bình nhựa
trong 5, 10 và 20 lít và (v) nhân giống sang bình có thể tích lớn 50, 100 và 1000 lít để thu
chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm vi khuẩn tía
quang hợp chứa các chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. 311,
Rhodobacter sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 làm thức ăn
tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ thu được từ quy trình này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sản xuất chế phẩm làm thức ăn trong chăn nuôi, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh làm thức ăn tươi sống cho sản xuất con giống các loài hai mảnh vỏ và chế phẩm thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong sản xuất con giống thủy sản, nguồn thức ăn là yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng con giống. Các loại thức ăn thủy sản truyền thống được sử dụng chủ yếu ở nước ta là: vi tảo, nấm men, bột ngũ cốc, thức ăn tổng hợp, v.v... Trong đó, vi tảo và một số động vật phù du như rotifer, artemia đã được nghiên cứu và sử dụng làm nguồn thức ăn tươi sống cho con giống của nhiều loại thủy sản nuôi có giá trị. Nguồn thức ăn tươi sống này có chứa các thành phần dinh dưỡng cao và chứa hàng loạt các hoạt chất sinh học như vitamin, carotenoit, steron, v.v., đặc biệt là các axit béo không no. Hơn nữa, nguồn thức ăn này ít gây ô nhiễm nước trong các hệ nuôi làm giảm dịch bệnh, tăng tỷ lệ sống sót và nâng cao chất lượng con giống (Brown, 2002). Các loại tảo thường được sử dụng phổ biến như: *Nannochloropsis* spp., *Chlorella* spp. và *Chaetoceros calcitrans*. Tuy nhiên, việc sản xuất sinh khối các loài tảo này trong điều kiện nhân tạo cho năng suất không ổn định vì chúng thường bị nhiều điều kiện ngoại cảnh bất lợi tác động. Trước những bất cập đó, việc tìm kiếm các đối tượng mới để bổ sung vào tập hợp thức ăn tươi sống đã và đang được quan tâm nghiên cứu.

Từ các nghiên cứu sinh thái cho thấy trong tự nhiên nhiều sinh vật (vi tảo, vi khuẩn) tham gia vào chuỗi thức ăn của nhiều loài thủy sản (Fig 1). Trong đó vi tảo và vi khuẩn thường làm thức ăn cho các loài nhuyễn thể hai mảnh vỏ và cho các loài cá, giáp xác và bào ngư (Lee và cộng sự, 1997).

Dựa vào hiện tượng tự nhiên này người ta đã quan tâm nghiên cứu vi khuẩn tía quang hợp với vai trò tương tự vi tảo làm nguồn thức ăn sống trong nuôi tôm, nhuyễn thể và một số động vật phù du (Xu và cộng sự, 1992; Michiharu và cộng sự, 1995; Sasikala và cộng sự, 1995; Azad và cộng sự, 2002). Tế bào của vi khuẩn tía quang hợp thường chứa hàm lượng cao protein (50 – 74%), hàm lượng cacbonhydrat chiếm 10 –

27%, lipid từ 0,6 – 22% và chất khoáng 4 – 16% trọng lượng khô (Azad và cộng sự, 2001; Kim và Lee, 2000; Ponsanol và cộng sự, 2003). Thành phần và hàm lượng các axit amin không thay thế của các loài vi khuẩn tía quang hợp này được so sánh tương đương với thịt, đậu và trứng gà thể hiện trên Bảng 1 (Ponsanol và cộng sự, 2003; Sasikala, Ramana, 1995).

Bảng 1. Hàm lượng và thành phần các axit amin trong tế bào của một số loài vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh so với một số nguồn protein đơn bào khác (Ponsanol và cộng sự, 2003)

Nguồn Protein	Axit amin (% Protein)						
	I leu	Leu	Lys	Meth	Phe	Thre	Val
Vi khuẩn tía quang hợp							
<i>Rb. capsulatus</i>	5,2	8,0	5,4	3,2	5,2	5,1	7,2
<i>Rb. sphaeroides</i>	3,8	7,1	5,6	3,0	4,7	5,0	6,5
<i>Rps. palustris</i>	4,3	7,2	5,2	3,3	4,2	4,8	6,5
<i>Rps. acidophila</i>	4,4	7,0	4,8	3,4	4,4	4,8	7,0
<i>Rc. gelatinosus</i>	4,0	7,0	5,0	3,0	4,8	5,0	6,4
<i>R. rubrum</i>	4,1	6,6	5,0	3,0	5,1	5,4	7,0
<i>R. tenue</i>	4,3	7,7	5,0	3,4	5,2	4,8	7,3
Các nguồn protein khác							
<i>Chlorella</i> sp.	4,4	8,0	5,0	0,5	4,8	4,1	5,4
<i>C. vulgaris</i>	2,4	4,4	2,7	0,3	2,6	2,3	3,0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3,8	8,4	5,7	1,7	5,1	5,1	5,7
<i>Spirulina maxima</i>	6,0	8,0	4,6	1,4	5,0	4,6	6,5
<i>Cellulomonas</i> sp.	4,7	11,2	6,8	1,9	4,4	5,4	10,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,2	7,0	7,4	1,0	4,3	5,2	6,3
Protein của thịt	3,4	6,4	5,0	1,3	3,6	3,4	5,0
Protein của trứng	6,6	8,8	6,4	3,1	5,8	5,0	7,4
Protein của đậu tương	5,4	7,7	6,3	1,3	4,9	3,9	5,2
Tiêu chuẩn theo FAO	4,0	7,0	5,5	3,5	6,0	4,0	5,0

Khi so sánh thành phần dinh dưỡng với một số loài tảo, nấm men được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, Kobayashi và Kobayashi M (1995) cho thấy hàm lượng protein và lipit gần như tương đương với vi tảo và cao hơn so với nấm men (Bảng 2).

Bảng 2. Thành phần dinh dưỡng của vi khuẩn tía quang hợp, tảo, nấm men (g/100g sinh khối khô) (Kobayashi, 1995)

Thành phần	Vi khuẩn tía quang hợp	Tảo	Nấm men
Protein	60,95	55,52	50,50
Lipit	9,91	8,07	1,1
Chất xơ	2,92	12,09	2,1
Cacbonhydrat	20,83	21,04	39,3
Tro	5,39	3,28	7,0

Tế bào của vi khuẩn tía quang hợp còn chứa các vitamin nhóm B như: B1, B2, B6 và đặc biệt là B12 (30 -79mg vitamin B12/kg sinh khối khô) (Sasaki và cộng sự, 1991), nhóm E, các axit pholic, axit pantothenic, carotenoid (0,09 – 0,80mg/g sinh khối khô), coenzym Q (Kobayashi và Kurata, 1978). Ngoài ra, vi khuẩn tía quang hợp còn có khả năng tổng hợp một số chất kháng sinh, kháng khuẩn và kháng virut. Do vậy, sử dụng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh có thể gia tăng tính chống chịu bệnh của vật nuôi (Okamoto và cộng sự, 1988; Sasikala và Ramana, 1995).

Vì có thành phần dinh dưỡng cao như vậy, cho nên theo nhiều nhà nghiên cứu, vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh có thể là một trong những nguồn protein đơn bào (single cell protein - SCP) lý tưởng trong sản xuất thức ăn cho gia súc, gia cầm và trong nuôi trồng thủy sản (Loo, 2012; Loo và cộng sự, 2013). Kobayashi và Yoshida (1983) đã bổ sung vi khuẩn tía quang hợp vào thức ăn để nuôi một số động vật phù du (*Artemia salina*, *Brine shimp*) và làm thức ăn cho ấu trùng thủy sản. Kết quả là trọng lượng, chiều dài và đặc biệt là mức độ sống sót của động vật phù du khi nuôi bằng vi khuẩn tía quang hợp gia tăng đáng kể so với công thức đối chứng (không bổ sung vi khuẩn tía quang hợp) (Sasikala và Ramana, 1995).

Lee và cộng sự (1997) đã nuôi *Brachionus plicatilis* bằng vi khuẩn tía quang hợp, *Chlorella* và men bánh mỳ. Kết quả cho thấy rằng khi nuôi bằng vi khuẩn tía quang hợp tốc độ tăng trưởng của *B. plicatilis* cao hơn so với các nguồn thức ăn khác (Lee et al., 1997). Azat và cộng sự (2002) đã bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh loài *R. sulfidophilum* vào thức ăn truyền thống (tảo *S.costatum*)

để nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*). Kết quả sau 9 ngày nuôi cho thấy, chiều dài của tôm sú khi bổ sung dịch nuôi (chứa 1% sinh khối khô) vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh (loài *R. sulfidophilum*) đạt $6,13 \pm 0,05$ mm và khi bổ sung dịch nuôi (chứa 2% sinh khối khô) vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh đạt $6,88 \pm 0,18$ mm, tỷ lệ sống sót là 46%, cao hơn nhiều so với không bổ sung dịch nuôi vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh (Azad và cộng sự, 2002). Kết quả tương tự khi nhóm tác giả Chumpol và cộng sự tại Thái Lan đã sử dụng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh bổ sung vào thức ăn nuôi tôm công nghiệp đã làm tăng tỷ lệ sống sót (85%) so với thức ăn không bổ sung (80%). Theo kết quả phân tích mô bệnh học gan tụy cho thấy tôm hoàn toàn khỏe mạnh. Nhóm tác giả cũng đã kết luận bổ sung chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp như protein đơn bào ở mức tối ưu là nguồn protein hiệu quả để tăng cường sự sinh trưởng cũng như sự sống sót của tôm. Hơn nữa, nhóm tác giả này đã phân lập và tuyển chọn được chủng S3W10 và SS15 có khả năng sinh enzym: amylaza, gelatinaza và vitamin B12 khá tốt, 3 chủng SS15, TKW17 và STW181 có khả năng ức chế *Vibrio* spp. cao như *V. harveyi*, *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus*. Tác giả dùng các chủng lựa chọn để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm, kết quả cho thấy hoạt tính enzym tiêu hóa và khả năng sinh trưởng của tôm tăng so với công thức đối chứng và đặc biệt làm giảm tỷ lệ chết đối với tôm bị phơi nhiễm virus *V. parahaemolyticus* (là virus gây hoại tử gan và tụy cấp tính). Với những ưu điểm trên thì chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp có tiềm năng lớn sử dụng làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản.

Tại Việt Nam, vi khuẩn tía quang hợp đã bắt đầu được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây (Đỗ Thị Tố Uyên và cộng sự, 1997; Trần Văn Nhị và cộng sự, 1999; Vũ Thị Minh Đức và cộng sự, 2000). Tại phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học, nhóm vi khuẩn này đã và đang được chú trọng tìm kiếm, thu nhận để ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau như xử lý nước thải đậm đặc hữu cơ (Đỗ Thị Tố Uyên và cộng sự, 1997; 2003; Trần Văn Nhị và cộng sự, 1999), phân hủy các hydrocacbon mạch vòng (Đinh Thị Thu Hằng và cộng sự, 2003), thu nhận các hoạt chất sinh học có giá trị (Đỗ Thị Tố Uyên và cộng sự, 2005), ứng dụng để xử lý sunphit trong đáy ao nuôi trồng thủy sản (Đỗ Thị Liên và cộng sự 2008; 2009; 2010). Tuy nhiên, việc nghiên cứu để ứng dụng đối tượng này làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản còn rất ít được quan tâm, cho đến nay, ở Việt Nam chưa có công bố nào

về quy trình sản xuất chế phẩm các chủng vi khuẩn tía quang hợp làm thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm kiếm nguồn thức ăn tươi sống có giá trị dinh dưỡng để bổ sung vào tập hợp thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ. Để đạt được mục đích đó, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp chứa các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 được phân lập tại Việt Nam làm thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ, trong đó quy trình này bao gồm các bước: (i) tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp, (ii) nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10ml, (iii) trộn hỗn hợp vi khuẩn và nhân giống trong bình thủy tinh 500ml, (iv) nhân giống trong bình nhựa trong 5, 10 và 20 lít và (v) nhân giống sang bình có thể tích lớn 50, 100 và 1000 lít để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm thu được từ quy trình này, trong đó chế phẩm này có chứa các chủng vi khuẩn tía quang hợp có giá trị dinh dưỡng cao như protein, các axit béo không no và các axit amin đặc biệt là các axit amin không thay thế. Chế phẩm thu được đạt mật độ cao (khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml) và được sử dụng làm thức ăn tươi sống cho con giống động vật hai mảnh vỏ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig 1 là sơ đồ thể hiện chuỗi thức ăn trong các thủy vực tự nhiên.

Fig 2 là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp.

Fig 3 là hình ảnh thể hiện artemia được nuôi bằng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp (A) và sinh khối tảo (B).

Fig 4 là hình ảnh thể hiện hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử của 4 chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn làm thức ăn cho con giống các loài hai mảnh vỏ.

Fig 5 là hình ảnh thể hiện 4 chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn không đối kháng nhau.

Fig 6 là hình ảnh thể hiện ấu trùng hào ăn vi tảo (A) và ăn vi khuẩn tía quang hợp (B).

Fig 7 là hình ảnh thể hiện ngao giống cấp 1 ăn vi tảo (A) và ăn vi khuẩn tía quang hợp (B).

Fig 8 là hình ảnh thể hiện hình ảnh ấu trùng tu hài ăn vi khuẩn tía quang hợp.

Fig 9 là hình ảnh thể hiện chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp làm thức ăn cho con giống động vật hai mảnh vỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh chứa các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 làm thức ăn sống cho sản xuất con giống các loài hai mảnh vỏ được thể hiện trên Fig. 2 và trình bày một cách chi tiết dưới đây. Quy trình này bao gồm các bước:

(i) Tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp:

Bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh được lựa chọn để sản xuất chế phẩm sử dụng trong quy trình theo sáng chế là các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517. Các chủng này được phân lập từ các ao nuôi tôm và bãi nuôi ngao tại ven biển Nam Định và tuyển chọn dựa trên khả năng sống sót của artemia khi nuôi bằng thức ăn vi khuẩn tía quang hợp so với các nguồn thức ăn truyền thống. Artemia là một trong những động vật phù du được sử dụng làm thức ăn tươi sống trong sản xuất giống của nhiều loài thủy sản nuôi kinh tế. Sau khi ấp nở, artemia được sử dụng làm thức ăn trong vòng 24 – 48 giờ. Tuy nhiên, để sử dụng làm thức ăn cho một số giai đoạn sau của con giống đặc biệt là tôm và cá giống người ta thường duy trì artemia thêm thời gian để gia tăng về kích thước, trọng lượng và giá trị dinh dưỡng. Khả năng sử dụng các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh làm thức ăn tươi sống cho artemia được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3. Biến động tỷ lệ sống sót của actemia khi nuôi bằng các nguồn thức ăn khác nhau

Nguồn thức ăn	Mức độ sống sót của actemia (%)				
	Thời gian (ngày)				
	1	2	3	4	5
Chủng ND310	57,3	33,1	20,0	11,40	9,0
Chủng 311	93,2	82,4	70,9	46,8	37,1
Chủng ANT218	81,6	70,9	53,5	26,0	14,8
Chủng NDT6	96,0	93,0	73,0	50,0	23,3

Chủng ND923	94,6	80,7	66,2	37,0	10,8
Chủng ND32	99,2	70,8	49,0	27,0	17,3
Chủng 86	98,7	96,5	84,3	43,5	34,0
Chủng ND210	94,0	50,1	22,5	9,0	0,0
Chủng ND10	71,0	29,0	16,0	5,0	0,0
Chủng LA10	52,7	28,2	20,0	11,8	2,7
Chủng ND34	73,8	64,3	48,9	18,6	13,8
Chủng 517	93,8	88,5	79,2	60,0	40,0
TATH	93,3	60,5	50,0	36,7	12,0
Tảo NAN	97,7	78,8	47,5	36,9	22,5
Không ăn	95,0	22,7	10,6	1,86	0,0

Chú thích: NAN: *Nannochloropsis* spp. TATH: thức ăn tổng hợp.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy khi nuôi bằng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh tỷ lệ sống sót của artemia tương đương hoặc cao hơn so với các công thức sử dụng thức ăn là vi tảo hay thức ăn tổng hợp. Hình ảnh quan sát bộ máy tiêu hóa của artemia trên kính hiển vi còn cho thấy bộ máy tiêu hóa có màu xanh lục khi chúng được nuôi bằng tảo và có màu đỏ tía khi chúng ăn chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp (Fig 3). Kết quả này khẳng định vi khuẩn tía quang hợp đã được artemia sử dụng làm thức ăn để phát triển và chúng tôi cũng lựa chọn được 4 chủng vi khuẩn tía quang hợp bao gồm *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 để sản xuất chế phẩm và xác định giá trị dinh dưỡng của chúng.

Ngoài chỉ tiêu được artemia sử dụng làm thức ăn, giá trị dinh dưỡng của 4 chủng lựa chọn còn được xác định thông qua hàm lượng protein, thành phần các axit amin và thành phần chất béo. Kết quả so sánh giá trị dinh dưỡng của 4 chủng lựa chọn với giá trị dinh dưỡng của 2 chủng vi tảo *Nannochloropsis* spp. và *Chlorella* spp. được trình bày trên Bảng 4.

Bảng 4. So sánh giá trị dinh dưỡng của 4 chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn với vi tảo *Chlorella* sp. và *Nanochloropsis* sp.

Chủng Thành phần	Chủng 86	Chủng 311	Chủng 517	Chủng NDT6	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Nanochloropsis</i> sp.
Axit amin g/100g sinh khối khô						
Aspartic	5,05	4,39	4,76	4,29	4,74	8,4
Glutamic	6,80	5,67	6,30	7,32	4,62	6,48
Serin	1,69	1,54	1,82	1,77	2,12	3,31
Histidin	1,19	1,06	1,20	1,20	1,06	0,61
Glycin	3,02	2,59	3,12	3,22	2,28	5,11
Threonin	2,26	2,09	2,45	2,21	2,28	5,28
Alanin	3,81	3,47	4,11	4,01	2,98	1,54
Arginin	2,59	2,32	2,81	2,78	3,24	3,57
Tyrosin	1,92	1,69	1,88	1,95	0,96	1,06
Cystein + Cystin	0,37	0,37	0,35	0,30	-	-
Valin	2,42	2,09	2,32	2,25	3,02	6,90
Methionin	1,14	1,07	1,32	1,40	0,27	2,64
Phenylalanin	1,90	1,59	1,81	1,86	2,65	1,92
Isoleucin	1,98	1,61	1,74	1,71	2,44	1,47
Leucin	3,56	3,01	3,49	3,56	2,44	5,57
Lysin	5,67	4,35	5,38	5,65	2,71	4,07
Prolin	0,98	0,87	1,00	0,93	2,12	4,2
Axit amin tổng số	46,35	45,86	39,78	46,41	37,65	62,13
Lipit tổng số (%TLK)	11,93	13,75	7,98	9,51	4,42	8,6
Tổng axit béo no (% axit béo)	24,71	17,24	17,63	18,31	22,1	14,68
Tổng axit béo không no (% axit béo)	72,73	81,69	80,54	81,38	77,99	85,32

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy tế bào của 4 chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn có hàm lượng protein, thành phần axit amin tương đối cao. Đặc biệt là các axit amin không thay thế như: alanin, leusin, lysin, methionin, v.v., và hàm lượng axit béo không no tổng số của chúng cao hơn so với tảo *Chlorella* sp. và thấp hơn không đáng kể so

với tảo *Nanochloropsis* sp.. Kết quả này đã khẳng định rằng có thể sử dụng các chủng vi khuẩn tía quang hợp thay thế cho vai trò của vi tảo trong ươm nuôi giống thủy hải sản.

Bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh được lựa chọn để sản xuất chế phẩm sử dụng trong quy trình theo sáng chế là các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 do Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân lập và lưu giữ. Ba chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 được phân lập từ bãi nuôi ngao Xuân Thủy, Nam Định, và chủng *Rhodobacter* sp. NDT6 được phân lập tại cửa biển Ba Lạt, Nam Định.

Hai chủng NDT6 và 86 mang đặc trưng của chi *Rhodobacter*: dịch huyền phù tế bào của chúng có màu đỏ đậm với cực đại tại 804 và 856nm. Tế bào có dạng hình cầu, kích thước 0,7 – 0,9µm, sinh sản bằng cách nhân đôi, chúng có dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào. Hình thái tế bào hai chủng 517 và 311 mang đặc điểm của chi *Rhodopseudomonas*: tế bào có dạng hình que bất đối xứng, dịch huyền phù của chúng có màu nâu vàng. Chủng 517 có cực đại tại 802, 856 và 878nm. Chủng 311 có cực đại tại 802, 854 và 876nm. Chúng đều sinh sản bằng cách nảy chồi.

Cả 4 chủng lựa chọn đều không quan sát thấy sự tích lũy giọt lưu huỳnh trong tế bào (thuộc vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh). Mặc dù cực đại hấp thụ dịch huyền phù tế bào của các chủng khác nhau nhưng đều nằm trong vùng 800 – 900nm là đặc trưng của phổ hấp thụ của *bacteriochlorophyll a* trong tế bào nguyên. Hình thái tế bào của 4 chủng lựa chọn được thể hiện trên Fig 4.

Bốn chủng sử dụng trong sáng chế được nuôi trong phòng thí nghiệm trong điều kiện kỵ khí có chiếu sáng, tuy nhiên, để sản xuất chế phẩm ở quy mô lớn cũng như sản xuất tại các trại giống để thuận tiện cho việc làm thức ăn tươi sống, cả 4 chủng lựa chọn được tiến hành nuôi ở các điều kiện hiếu khí, vi hiếu khí và kỵ khí có chiếu sáng để đánh giá khả năng tích lũy sinh khối. Kết quả được trình bày trên Bảng 5.

Bảng 5. Mức độ tích lũy sinh khối (theo ΔOD_{800}) của 4 chủng lựa chọn ở các điều kiện sinh trưởng khác nhau

Điều kiện nuôi Chủng	Hiếu khí (oxy = 6,1mg/l)	Vi hiếu khí (oxy = 0,9mg/l)	Kỵ khí (oxy = 0,05mg/l)
NDT6	0,96	1,21	1,09
86	0,96	1,15	0,95
517	0,83	1,12	1,07
311	0,77	1,01	1,21

Kết quả cho thấy: khả năng tích lũy sinh khối của cả 4 chủng ở điều kiện vi hiếu khí tương đương so với ở điều kiện kỵ khí và cao hơn so với điều kiện hiếu khí. Như vậy, ngoài khả năng sinh trưởng kỵ khí sáng, cả 4 chủng lựa chọn đều sinh trưởng tốt ở điều kiện vi hiếu khí. Đặc điểm này có ý nghĩa quan trọng trong sáng chế khi sản xuất chế phẩm vi khuẩn tia quang hợp ở quy mô pilot cũng như ở các trại sản xuất con giống thủy hải sản để phục vụ làm thức ăn tươi sống.

Để có thể sản xuất chế phẩm từ 4 chủng vi khuẩn tia quang hợp trong sáng chế có năng suất cao và chi phí thấp, chúng tôi nuôi cấy chúng trên môi trường chứa một số nguồn cơ chất dễ tìm kiếm, có giá thành thấp như bột gạo, bột ngô và bột đậu tương với nồng độ 2g/l. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng. Kết quả được trình bày trên Bảng 6.

Bảng 6. Mức độ tích lũy sinh khối của các chủng lựa chọn trên nguồn cơ chất khác nhau

Môi trường Chủng	DSMZ 27	Bột đậu tương	Bột đậu tương lên men	Bột ngô	Bột gạo
NDT6	$2,51 \times 10^{11}$	$2,07 \times 10^{12}$	$6,53 \times 10^{11}$	$1,16 \times 10^{10}$	$8,65 \times 10^9$
86	$6,83 \times 10^{11}$	$4,23 \times 10^{12}$	$3,51 \times 10^{11}$	$1,45 \times 10^{10}$	$3,73 \times 10^9$
517	$6,56 \times 10^{12}$	$5,51 \times 10^{11}$	$1,27 \times 10^{12}$	$5,67 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$
311	$1,81 \times 10^{12}$	$1,51 \times 10^{11}$	$1,82 \times 10^{11}$	$4,26 \times 10^9$	$5,61 \times 10^8$

Bốn chủng lựa chọn có khả năng tích lũy sinh khối trên môi trường có cơ chất và bột đậu tương lên men đều cao hơn hoặc tương đương so với trên môi trường hóa chất (DSMZ-27). Khả năng tích lũy sinh khối của chúng trên môi trường bột ngô và bột gạo kém hơn. Như vậy, trong sáng chế chúng tôi có thể sử dụng nguồn cơ chất bột đậu tương để thay thế môi trường hóa chất trong việc sản xuất chế phẩm ở quy mô pilot và đi triển khai sản xuất tại các trại giống thủy sản.

Các chủng này hiện được lưu giữ trong môi trường thạch nghiêng DSMZ-27. Điều kiện bảo quản 4°C tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với số hiệu lưu giữ là *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517.

(ii) Nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10ml:

Bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp từ các ống thạch nghiêng giữ giống được nhân nuôi riêng trong các bình penicillin có thể tích 10ml chứa môi trường DSMZ-27 dạng lỏng, ủ ở điều kiện kỵ khí, có chiếu sáng bằng đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm, sau khoảng 3- 5 ngày, mật độ tế bào sẽ đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml tiếp tục nhân giống ở bước (iii).

(iii) Trộn hỗn hợp vi khuẩn và nhân giống trong bình thủy tinh 500ml

Mỗi chủng vi khuẩn tía quang hợp đều có những ưu việt riêng. Do vậy, với mục đích tạo hỗn hợp chủng có tỷ lệ tương đương nhau để chúng phát huy hết các đặc tính của mỗi chủng về giá trị dinh dưỡng, khả năng chống chịu ở điều kiện bất lợi, ở bước này chúng tôi đã trộn bốn chủng để sản xuất chế phẩm với tỷ lệ như nhau (1:1:1:1). Sau đó, nhân nuôi hỗn hợp giống sang các bình có thể tích 500ml chứa môi trường dịch thể DSMZ-27 với tổng thể tích giống hỗn hợp 10% (v/v), ủ dung dịch nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng bằng đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm. Sau 5-7 ngày mật độ tế bào đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml có thể sử dụng làm nguồn giống cấp 1. Cả bốn chủng lựa chọn không đối kháng nhau kết quả được thể hiện ở Fig 5.

(iv) Nhân giống trong bình nhựa trong 5, 10 và 20 lít

Nhân nuôi giống từ bình thể tích 500ml sang các bình nhựa trong có thể tích 5 lít, 10 lít và 20 lít chứa môi trường bột đậu tương (2g/l) với tỷ lệ giống 10% (v/v). Các bình giống được đặt dưới ánh sáng mặt trời với nhiệt độ 28 ± 5 . Sau khoảng 5-7 ngày mật độ tế bào trong các bình giống đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml có thể sử dụng để nhân giống ở các bể lớn hơn.

(v) Nhân giống sang bể có thể tích lớn 50, 100 và 1000 lít

Nhân nuôi giống từ bình thể tích 5, 10 và 20 lít sang các bể có thể tích 50, 100 và 1000 lít chứa môi trường bột đậu tương (2g/l) với tỷ lệ giống 10% (v/v). Các bể được nuôi ở điều kiện tự nhiên đặt dưới ánh sáng mặt trời với nhiệt độ 28 ± 5 . Sau khoảng 6-7 ngày kiểm tra nếu mật độ tế bào trong các bình giống đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml thì có thể sử dụng làm thức ăn tươi sống cho con giống động vật hai mảnh vỏ và được gọi là chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp. Chế phẩm này là dạng dịch lỏng có màu đỏ

nâu đến đỏ tía (tùy thuộc vào điều kiện khí hậu như nhiệt độ, ánh sáng) với mật độ tế bào đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml, lúc này chế phẩm đạt được hàm lượng dinh dưỡng như hàm lượng protein, thành phần axit amin tương đối cao. Chế phẩm được bảo quản ở điều kiện tự nhiên trong thời gian 10 ngày.

Kiểm tra mật độ tế bào của chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa petri (CFU/ml). Mật độ được xác định theo phương pháp pha loãng như sau: mẫu được pha loãng liên tục bằng nước cất vô trùng từ 10^1 đến 10^{10} . Dùng pipet vô trùng lấy 50 μ l dung dịch ở các nồng độ thích hợp nhỏ lên bề mặt đĩa thạch chứa môi trường DSMZ-27, dùng que gạt vô trùng dàn đều dịch đó trên mặt thạch. Đặt các đĩa thạch chứa mẫu vi khuẩn tía quang hợp trong điều kiện khí quyển nito, dưới ánh sáng đèn sợi đốt 60w, tiến hành đếm số khuẩn lạc sau 5-7 ngày.

Số lượng khuẩn lạc (CFU) xuất hiện trên đĩa được đếm và tính theo công thức:

$$\text{CFU/ml} = a \times 1/v \times n$$

Trong đó: n là độ pha loãng mẫu, a là số khuẩn lạc đếm được trên bề mặt đĩa thạch, v là thể tích mẫu được cấy, 1/v thể tích mẫu quy về 1ml.

Sau khi khuẩn lạc mọc trên các đĩa ở độ pha loãng thích hợp được đếm và tính theo công thức, mật độ tế bào đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml thì tiến hành thu chế phẩm sử dụng làm thức ăn cho con giống động vật hai mảnh vỏ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp ở quy mô 100 lít

Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp ở quy mô 100 lít bao gồm các bước:

(i) Bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 đã được tuyển chọn và giữ giống trong ống thạch nghiêng ở nhiệt độ 4°C.

(ii) Bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 từ các ống thạch nghiêng giữ giống được nhân nuôi riêng trong các bình penicillin có thể tích 10ml chứa môi trường DSMZ-27 dạng lỏng (mỗi chủng cấy 3 bình penicillin chứa 10ml môi trường DSMZ-27) ở điều kiện kỵ khí dưới ánh sáng đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm, sau khoảng 3-5 ngày, xác định mật độ tế bào đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml thì tiếp tục tiến hành bước (iii).

(iii) Trộn 4 chủng để sản xuất chế phẩm với tỷ lệ như nhau (1:1:1:1) thu được 120ml hỗn hợp bốn chủng. Tiếp tục nhân nuôi hỗn hợp giống sang 2 bình có thể tích 500ml, mỗi bình chứa 450ml môi trường DSMZ-27 dịch thể và bổ sung 50ml thể tích giống

đối với mỗi bình, ủ ở điều kiện chiếu sáng dưới đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm. Sau 5-7 ngày kiểm tra mật độ tế bào đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml thì có thể sử dụng làm nguồn giống cấp 1 và tiếp tục tiến hành bước (iv).

(iv) Nhân nuôi giống từ hai bình thể tích 500ml sang 2 bình nhựa trong có thể tích 5 lít chứa 4500ml môi trường chứa 10g bột đậu tương với 500ml hỗn hợp giống mỗi bình và đặt dưới ánh sáng mặt trời. Sau 5-7 ngày kiểm tra mật độ tế bào đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml thì có thể tiến hành bước (v).

(v) Nhân giống sang bể kính chứa 90 lít môi trường chứa 200g bột đậu tương với 10 lít hỗn hợp giống. Sau 6-7 ngày kiểm tra mật độ tế bào đạt khoảng 10^8 - 10^9 CFU/ml thì có thể có thể thu chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp được sản xuất và thể hiện trên Fig 9.

Ví dụ 2: Sử dụng chế phẩm theo sáng chế làm thức ăn cho ngao, hào và tu hài giống

Sử dụng chế phẩm theo sáng chế đạt mật độ khoảng 10^9 CFU/ml làm thức ăn cho ấu trùng của động vật hai mảnh vỏ. Đối với ngao sau khi ấp nở 2 ngày tuổi, ấu trùng có mật độ ban đầu khoảng 5 ấu trùng/ml thì theo thể tích bể nuôi tính toán cho ăn khoảng 200.000 tế bào/cá thể/lần, ngày cho ăn 3 lần. (Ví dụ đối với bể nuôi ấu trùng ngao 1m^3 sẽ cho ăn chế phẩm theo sáng chế 1 lít pha loãng trong 10 lít nước rải đều trên bề mặt bể nuôi/lần, ngày cho ăn 3 lần theo cách tương tự). Đối với nuôi hào giống mật độ 3 con/ml được cho ăn khoảng 130 tế bào/cá thể/lần, ngày cho ăn 3 lần. Đối với cho tu hài giống sẽ cho ăn giống như nuôi hào.

Ấu trùng ngao, hào và tu hài được nuôi bằng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp đang trong giai đoạn sinh trưởng được đánh giá tỷ lệ sống sót, kích thước của ấu trùng theo thời gian và có sự so sánh với thức ăn truyền thống là vi tảo *Chlorella* sp. và *Nanochloropsis* sp.. Để theo dõi khả năng sống sót và sinh trưởng của ấu trùng ngao, hào và tu hài, mật độ của chúng được theo dõi bằng cách sử dụng micropipet lấy mẫu ở các vị trí khác nhau của thí nghiệm (mỗi mẫu $50\mu\text{m}$) sau đó được cố định và đếm trên kính hiển vi quang học.

Giai đoạn ấu trùng:

Đối với ấu trùng ngao: thử nghiệm được tiến hành tại trại giống thủy sản Cửu Dung (Nam Định). Phương pháp nuôi ngao được sự hỗ trợ của các cán bộ kỹ thuật tại trại giống. Thí nghiệm được tiến hành khi cho ấu trùng ngao ăn chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp thu được từ hỗn hợp 4 chủng và so sánh với thức ăn truyền thống là hỗn hợp hai loài vi tảo *Chlorella* sp. và *Nanochloropsis* sp.. Tỷ lệ sống sót của ấu trùng

ngao theo thời gian khi được cho ăn bằng vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp được trình bày trên Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả theo dõi ấu trùng ngao theo thời gian khi ăn các loại thức ăn khác nhau

Đợt thí nghiệm	Nguồn thức ăn	Thời gian theo ngày tuổi (ấu trùng $\times 10^2$)		
		4	6	8
1	Vi tảo	1,71	0,62	0,22
	Vi khuẩn tía quang hợp	1,71	0,82	0,44
2	Vi tảo	1,23	0,41	0,15
	Vi khuẩn tía quang hợp	1,23	0,72	0,35
3	Vi tảo	1,35	0,46	0,18
	Vi khuẩn tía quang hợp	1,35	0,66	0,42

Trong cả 3 đợt thí nghiệm khác nhau tỷ lệ sống sót của ấu trùng ngao (đến 8 ngày tuổi) nuôi bằng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp có tỷ lệ sống sót tương đương khi nuôi bằng vi tảo.

Đối với ấu trùng hào: Trong thí nghiệm này chúng tôi bắt đầu theo dõi hào từ giai đoạn ấu trùng đỉnh vỏ thẳng (ngày thứ 2 sau đẻ) đến hậu ấu trùng đỉnh vỏ lồi và chuyển sang giai đoạn sống bám cố định (quá trình nuôi hào được sự hỗ trợ của cán bộ kỹ thuật của trại giống). Thức ăn nuôi hào là chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp và so sánh với vi tảo *Chlorella* sp. và *Nanochloropsis* sp.. Theo thời gian nuôi tỷ lệ sống sót của hào so với thời điểm ban đầu và kích thước sinh trưởng của chúng được trình bày trên Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả xác định % sống sót của ấu trùng hào theo thời gian khi ăn thức ăn vi khuẩn tía quang hợp và vi tảo

Ngày tuổi	Mức độ sống sót của hào so với ban đầu (%)		Kích thước (μm)	
	Thức ăn vi khuẩn tía quang hợp	Thức ăn tảo	Thức ăn vi khuẩn tía quang hợp	Thức ăn tảo
1	100	100	20	20
3	98,0	97,8	50	50
5	97,2	97,3	65	65
8	95,4	96,0	100	100
10	87,8	87,7	140	140
12	78,4	79,0	160	160
14	65,4	65,6	200	200
20	58,3	59,2	215	21
26	55,3	54,9	254	258

Kết quả cho thấy: từ giai đoạn ấu trùng đỉnh vỏ thẳng đến giai đoạn sống bám cố định, tốc độ biến thái, tỷ lệ sống sót của hàu giống tương tự nhau khi nuôi bằng hai loại thức ăn là chế phẩm vi tảo và chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp (55,3% và 54,9%, tương ứng). Mức gia tăng kích thước của chúng cũng tương đương nhau (khoảng 254 và 258µm tương ứng). Hình ảnh các loại thức ăn tích tụ trong hệ tiêu hóa của hàu giống khi chúng ăn vi tảo (màu xanh) và khi chúng ăn vi khuẩn tía quang hợp (màu đỏ) có thể thấy ở Fig 6.

Đối với ấu trùng tu hài: chỉ tiêu quan trọng nhất ở giai đoạn này là khả năng biến thái. Chúng tôi cũng tiến hành thử nghiệm tương tự với ấu trùng ngao và hàu bằng 2 loại thức ăn vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp. Kết quả quan sát trên kính hiển vi cho thấy kích thước của tu hài khi nuôi bằng chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp tương đương với khi nuôi bằng vi tảo. Sau 6 – 7 ngày đã quan sát được sự biến thái của ấu trùng từ giai đoạn đỉnh vỏ thẳng (ấu trùng hình chữ D) sang giai đoạn đỉnh vỏ lồi ở cả hai công thức thí nghiệm và được thể hiện trên Fig 8.

Đối với con giống:

Đối với ngao giống cấp 1: Ngao giống cấp 1 là ngao ấu trùng đã nuôi được 10 ngày tuổi. Thí nghiệm được tiến hành như trên với hai loại thức ăn là vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp. Tỷ lệ sống sót của ngao giống cấp 1 theo thời gian khi nuôi bằng hai loại thức ăn trên được trình bày trên Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả xác định khả năng sống sót của ngao giống cấp 1 theo thời gian khi ăn thức ăn vi khuẩn tía quang hợp và vi tảo

Đợt thí nghiệm	Nguồn thức ăn	Mức độ sống sót của ngao giống theo thời gian		
		12	24	36
1	Vi tảo	960	820	400
	Vi khuẩn tía quang hợp	980	870	440
2	Vi tảo	850	680	370
	Vi khuẩn tía quang hợp	850	730	360
3	Vi tảo	920	715	560
	Vi khuẩn tía quang hợp	920	740	547

Từ Bảng 9 cho thấy: ở cả 3 đợt thí nghiệm khác nhau, tỷ lệ sống sót của ngao giống được nuôi bằng vi khuẩn tía quang hợp và vi tảo xấp xỉ như nhau. Hình ảnh tích

tụ các loại thức ăn trong hệ tiêu hóa của ngao giống khi sử dụng chế phẩm vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp được trình bày trên Fig 7.

Đối với tu hài giống: Thí nghiệm được tiến hành đối với tu hài 25 ngày tuổi được cho ăn bằng vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp. Kết quả xác định tỷ lệ sống sót của tu hài giống theo thời gian khi nuôi bằng vi khuẩn tía quang hợp so sánh với vi tảo được trình bày trên Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả xác định % sống sót của tu hài giống theo thời gian khi ăn thức ăn vi khuẩn tía quang hợp và vi tảo

Ngày nuôi	Mức độ sống sót (%) của tu hài giống khi cho ăn bằng	
	Vi khuẩn tía quang hợp	Vi tảo
1	100	100
3	92,3	92,5
5	92,1	92,0
7	90,5	86,9
9	87,1	84,7
11	85,2	82,4
13	83,3	80,8
15	81,2	78,8
17	80,3	78,1

Kết quả thu được khi nuôi tu hài giống 25 ngày tuổi khi cho ăn bằng vi tảo và vi khuẩn tía quang hợp khả năng sống sót của chúng là tương đương nhau.

Với các kết quả thu được cho thấy sử dụng chế phẩm theo sáng chế để nuôi ấu trùng các con giống như ngao, hào, tu hài thì khả năng sống sót, tốc độ biến thái và sự gia tăng kích thước tương đương với khi sử dụng vi tảo. Đối với con giống như ngao và tu hài khi cho ăn bằng thức ăn vi khuẩn tía quang hợp khả năng sống sót tương đương vi tảo và như vậy chế phẩm theo sáng chế có triển vọng làm thức tươi sống cho con giống như tu hài, ngao, v.v., vì giai đoạn này chúng cần lượng thức ăn lớn. Chúng tôi có thể kết luận sử dụng chế phẩm các chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn để bổ sung hoặc thay thế vi tảo để sản xuất con giống động vật hai mảnh vỏ như ngao, hào và tu hài.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế được tạo ra từ bốn chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng tích lũy sinh khối cao, dễ dàng sản xuất chế phẩm trên nguồn cơ chất có giá

thành thấp, không bị ảnh hưởng của các điều kiện ngoại cảnh đến năng suất nuôi trồng. Hơn thế nữa, tế bào của các chủng vi khuẩn tía quang hợp được lựa chọn có hàm lượng protein, thành phần axit amin tương đối cao. Đặc biệt là các axit amin không thay thế như: Alanin, Leusin, Lysin, Methionin, v.v., và hàm lượng axit béo không no tổng số của chúng cao hơn so với tảo *Chlorella sp.* và thấp hơn không đáng kể so với tảo *Nanochloropsis sp.*. Thử nghiệm làm thức ăn đối với ấu trùng ngao, tu hài và hào thì tốc độ biến thái và khả năng sống sót của chúng tương đương với khi chúng ăn bằng vi tảo. Như vậy có thể sử dụng các chủng vi khuẩn tía quang hợp lựa chọn làm thức ăn tươi sống bổ sung hoặc thay thế cho vi tảo trong ương nuôi giống thủy hải sản, khắc phục tình trạng thiếu thức ăn tươi sống tại các trại nuôi do năng suất nuôi vi tảo không ổn định dẫn đến ảnh hưởng chất lượng và hiệu quả của con giống.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh chứa các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 làm thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(i) tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp: chọn các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 có thành phần dinh dưỡng cao;

(ii) nhân giống từ ống thạch nghiêng sang môi trường lỏng trong bình 10ml: cấy riêng mỗi chủng tuyển chọn được ở bước (i) từ ống thạch nghiêng đưa sang 10ml môi trường DSMZ-27 dạng dịch; sau đó, dịch nuôi cấy của mỗi chủng được ủ ở điều kiện kỵ khí và chiếu sáng bằng đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm, trong thời gian khoảng 3-5 ngày;

(iii) trộn hỗn hợp vi khuẩn và nhân giống trong bình thủy tinh 500ml: trộn các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 được nhân giống ở bước (ii) với tỷ lệ 1:1:1:1, sau đó nuôi cấy dịch chứa 450ml môi trường DSMZ-27 và 50ml hỗn hợp vi khuẩn ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng bằng đèn sợi đốt trong phòng thí nghiệm, trong thời gian khoảng 5-7 ngày;

(iv) nhân giống trong bình nhựa trong 5, 10 và 20 lít: nhân giống bằng cách sử dụng môi trường chứa 2g/l bột đậu tương và bổ sung 10% hỗn hợp vi khuẩn tía quang hợp thu được ở bước (iii) ở điều kiện ánh sáng tự nhiên trong thời gian khoảng 5-7 ngày; và

(v) nhân giống sang bể có thể tích lớn 50, 100 và 1000 lít để thu chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp: nhân giống bằng cách sử dụng môi trường chứa 2g/l bột đậu tương và bổ sung 10% hỗn hợp vi khuẩn tía quang hợp thu được ở bước (iv) ở điều kiện ánh sáng tự nhiên trong thời gian khoảng 6-7 ngày.

2. Chế phẩm vi khuẩn tía quang hợp chứa các chủng *Rhodopseudomonas* sp. 311, *Rhodobacter* sp. NDT6, *Rhodobacter* sp. 86 và *Rhodopseudomonas* sp. 517 làm thức ăn tươi sống cho con giống các loài hai mảnh vỏ thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này là dạng dịch lỏng với mật độ tế bào đạt 10^8 - 10^9 CFU/ml.

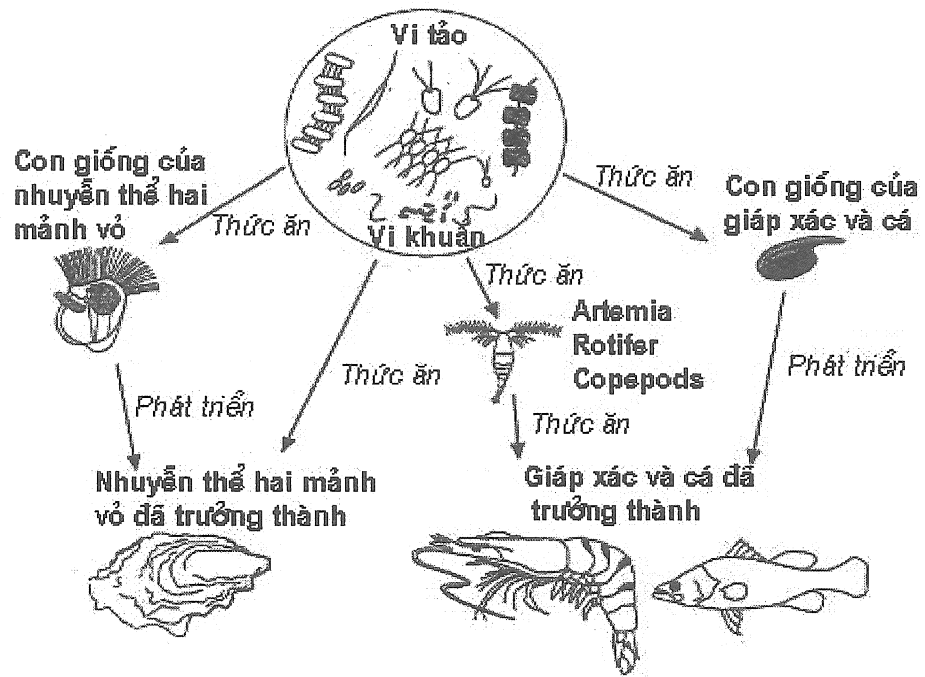


Fig 1

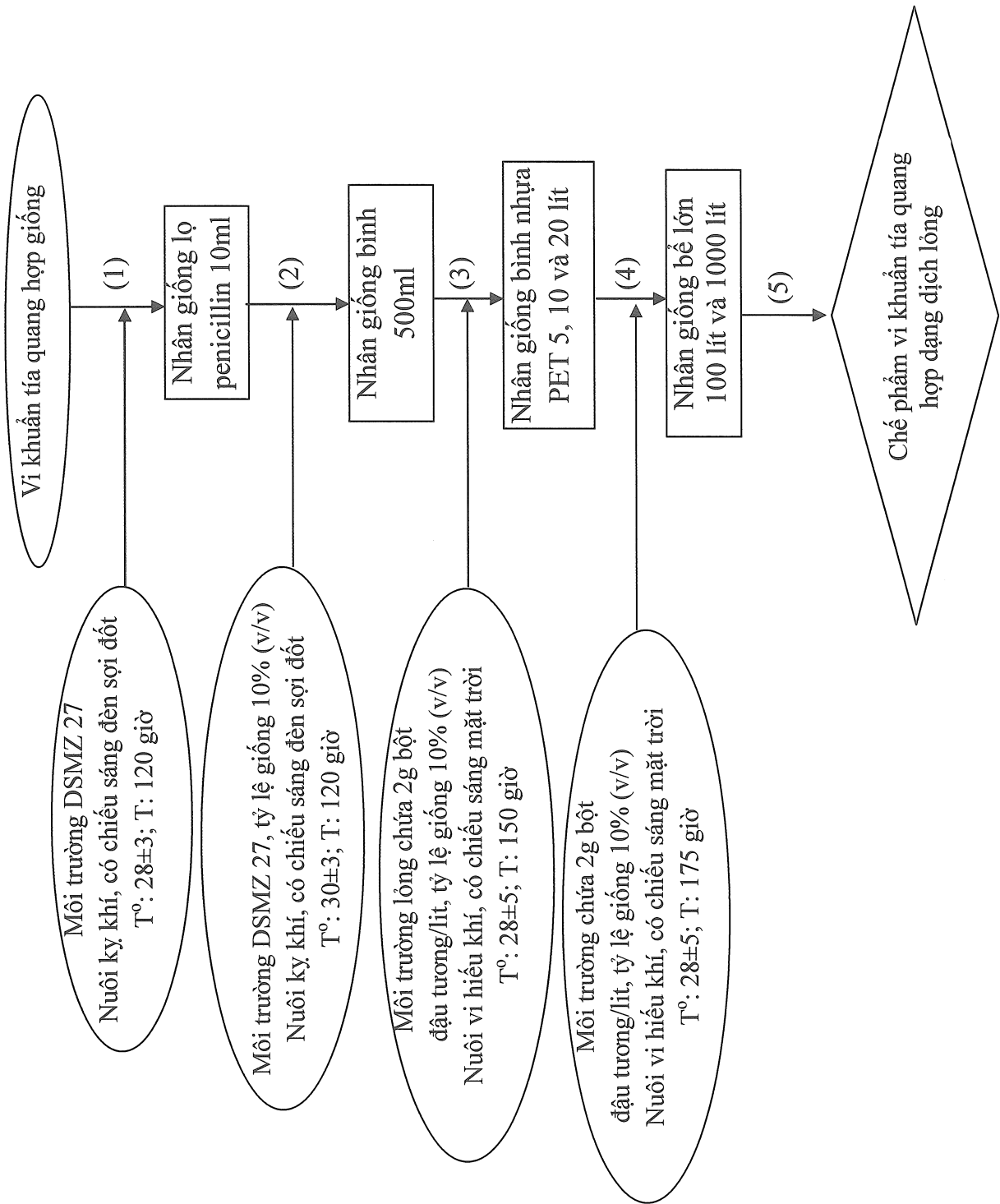


Fig 2

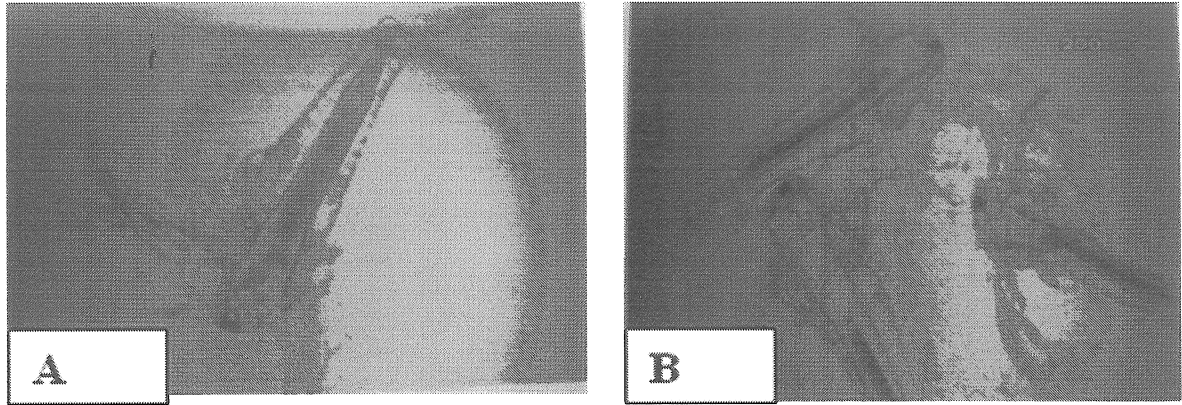


Fig 3

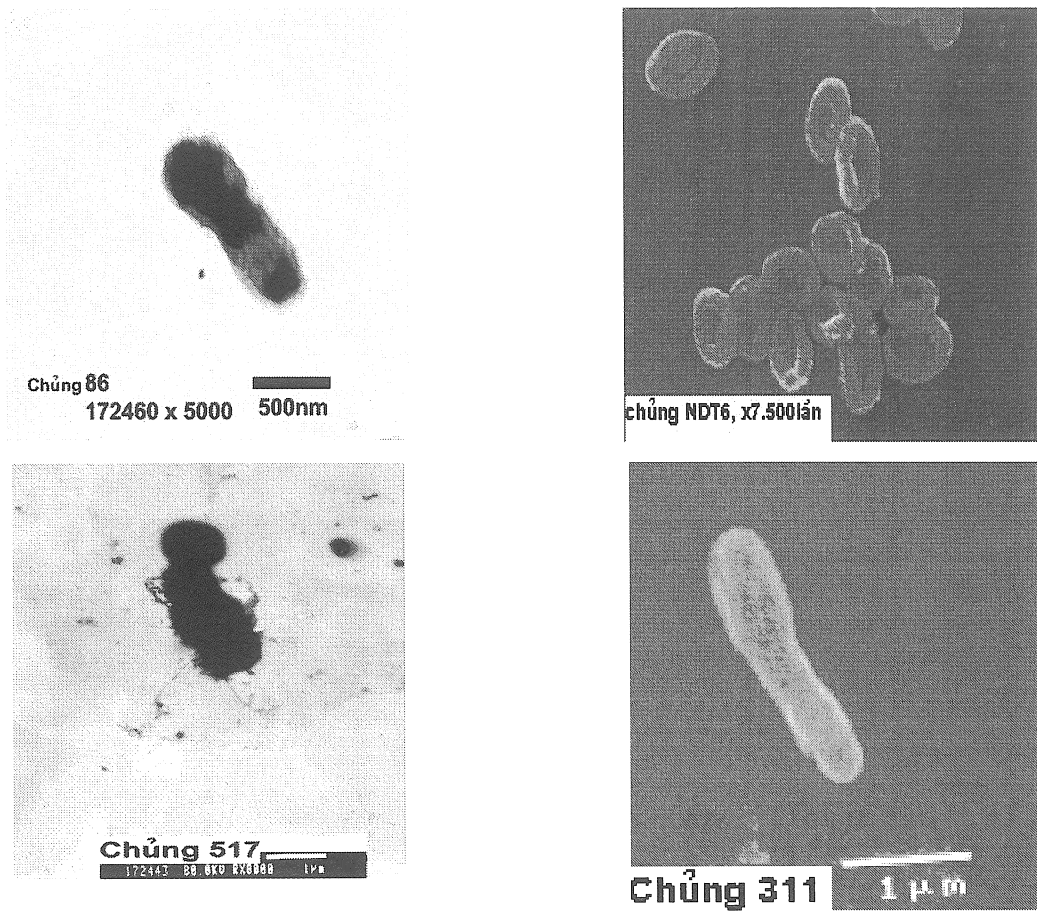


Fig 4

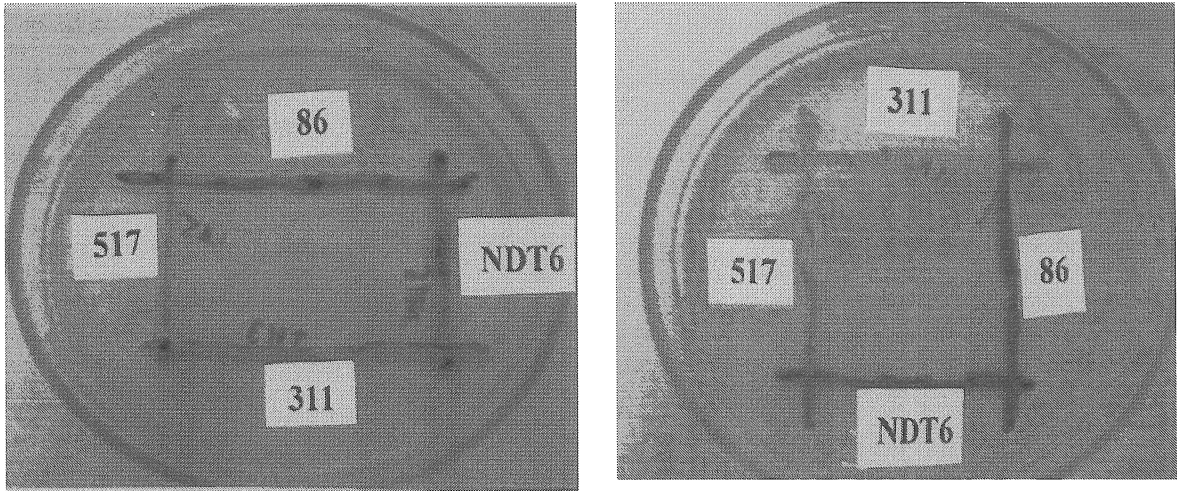


Fig 5

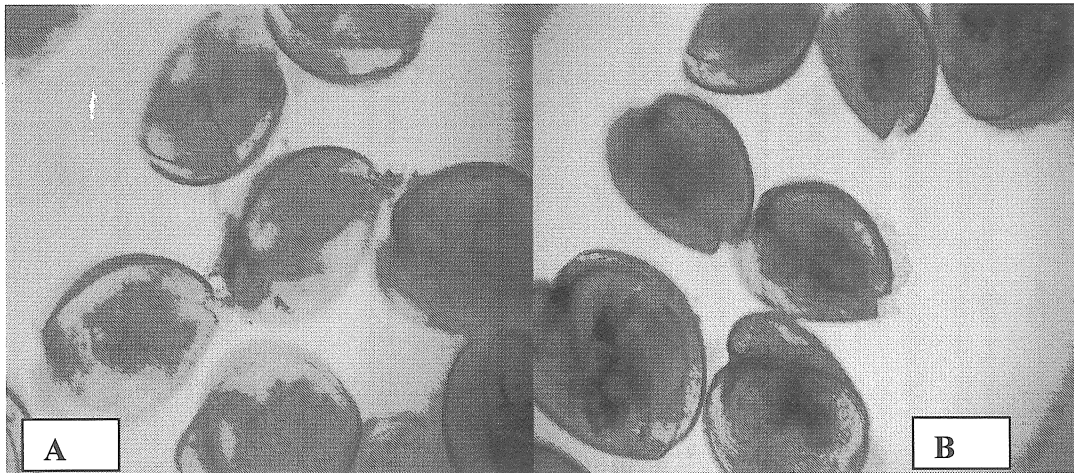


Fig 6

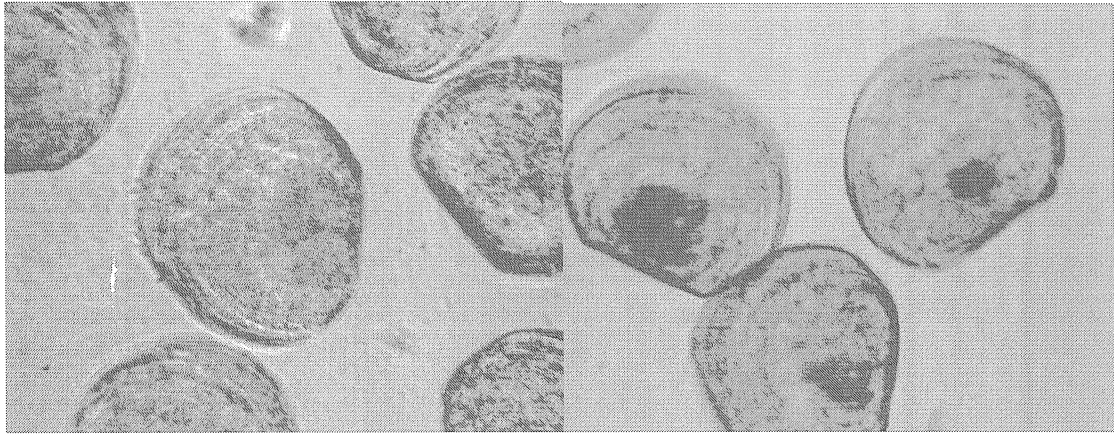


Fig 7

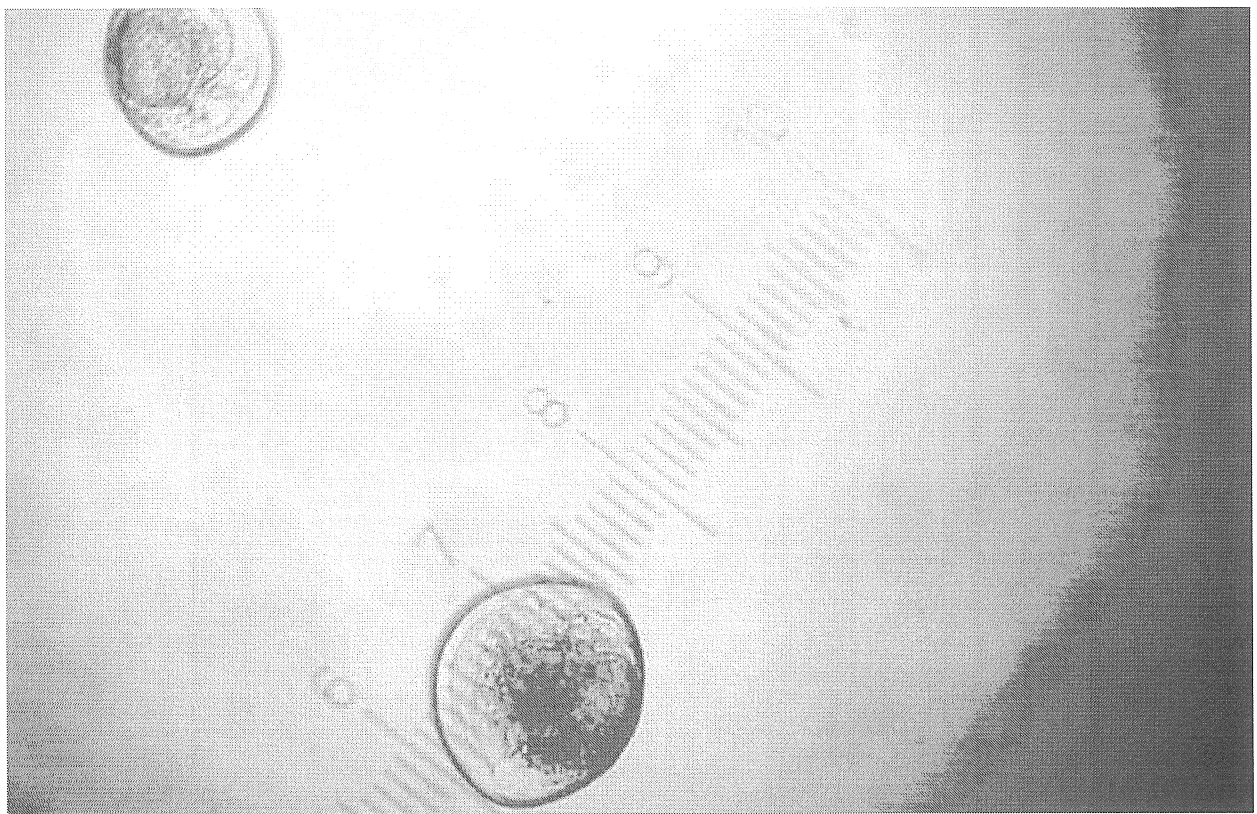


Fig 8



Fig 9