

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU MẶN CÁC CHỦNG *SPIRULINA PLATENSIS* NƯỚC NGỌT VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NUÔI RỄ TIỀN CHO CHỦNG TIỀM NĂNG

Lưu Thị Tâm¹, Lê Thị Thơm^{1,2}, Nguyễn Cẩm Hà^{1,2}, Hoàng Thị Minh Hiền¹, Ngô Thị Hoài Thu¹, Đặng Diễm Hồng^{1,2,3,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Thủy Lợi

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ddhong60vn@yahoo.com; ddhong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 29.9.2020

Ngày nhận đăng: 11.01.2021

TÓM TẮT

Vi khuẩn lam *Spirulina* đã được nuôi trồng rộng rãi để khai thác các sản phẩm như protein, vitamin, sắc tố phycocyanin... có giá trị dinh dưỡng và dược lý cao. Tuy nhiên, việc thương mại hoá sản phẩm này còn gặp khó khăn do giá thành sinh khối cao chủ yếu do thành phần môi trường dinh dưỡng đắt tiền. Trong nghiên cứu này, từ 11 chủng *S. platensis* nước ngọt, bằng nuôi cấy sàng lọc, chúng tôi đã phát hiện 7 chủng có khả năng sinh trưởng tốt trên môi trường nước biển với độ mặn dao động từ 5 - 30‰ trong đó, chủng *S. platensis* ST được chọn cho các nghiên cứu sâu hơn. Nước biển tự nhiên cần được tiền xử lý để loại bỏ các ion dễ gây tủa các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi như Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} ... trước khi sử dụng. Chủng ST sinh trưởng tốt nhất trong môi trường nước biển tự nhiên 30‰ có bổ sung 3 g/L $NaNO_3$, 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,05 g/L $FeSO_4$. Năng suất sinh khối chủng ST đạt cao nhất là 0,487 g/L, tốc độ sinh trưởng (μ) là 0,122/ngày; hàm lượng protein và phycocyanin đạt lần lượt là 48,6% và 127,5 mg/g sinh khối khô. Không có sự sai khác giữa các giá trị nêu trên của môi trường này so với môi trường SOT pha bằng nước cất ($P > 0,05$). Sinh khối chủng ST đảm bảo chất lượng làm nguyên liệu sản xuất thực phẩm chức năng. Kết quả nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học cho việc sử dụng môi trường nước lợ/biển giá rẻ để nuôi sinh khối loài vi khuẩn lam có giá trị kinh tế này.

Từ khóa: *Spirulina platensis*, chịu mặn, phycocyanin, sản xuất sinh khối, vi khuẩn lam

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lam *Spirulina* (*Arthrospira*), tên thường gọi là tảo xoắn, tảo mặt trời, từ lâu đã được sử dụng làm thực phẩm chức năng cho người và thức ăn gia súc gia cầm, nuôi trồng thủy, hải sản, trong nông - công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm (Liu *et al.*, 2016; FAO, 2008). Đặc điểm sinh hóa nổi bật của nó là hàm lượng protein rất cao, chiếm khoảng 50 - 70 % sinh khối khô, sinh khối giàu các nguyên tố khoáng đa và vi lượng, các axit béo không bão hòa đa nối đôi và các sắc tố (carotenoid, phycocyanin...) có hoạt tính sinh học cao

(Fayyad *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017; Jang, Park, 2016).

Spirulina có thể được nuôi trồng bằng nước ngọt và cả nguồn nước thải (Đặng Diễm Hồng, 2019; Nguyễn Thị Nga *et al.*, 2017). *Spirulina* được trồng trong nước sạch dưới điều kiện kiểm soát chặt chẽ có thể được sử dụng làm thực phẩm dinh dưỡng cho con người (Đặng Diễm Hồng, 2019). Khi *Spirulina* được nuôi trong nước thải có thể sử dụng làm thức ăn gia súc và nguyên liệu sản xuất nhiên liệu (Chinnasamy *et al.*, 2010). Ở Việt Nam có nhiều công ty đã nuôi trồng thành công vi khuẩn lam *Spirulina* trong môi trường

nước ngọt trên quy mô lớn trong các hệ thống bể hở hoặc hệ thống nuôi kín, với năng suất sinh khối đạt 17,07 - 21,75 kg sinh khối khô/ngày, năng suất tính theo diện tích đạt tối đa 4 - 5 g sinh khối khô/m²/ngày, sản lượng trung bình đạt 400 - 700 kg sinh khối khô/tháng (Đặng Diễm Hồng, 2019). Một số ít báo cáo đã nuôi trồng thành công loài *Spirulina* bằng nước biển. Theo công bố của Sandeep và đồng tác giả (2013), loài *Spirulina* được nuôi thành công trong môi trường nước biển tại Haryana, Ấn Độ (nồng độ muối là 11 g/L) có bổ sung thêm NaHCO₃ (8g/L) và NaCl (2 g/L). Kết quả nghiên cứu cho thấy, sinh trưởng của *Spirulina* không có sự khác biệt nhiều so với đối chứng (có hàm lượng muối là 5 g/L). Hơn nữa, các thành phần dinh dưỡng khác như protein, sắc tố (phycocyanin) trong sinh khối tảo thu được cũng gần tương đương so với công thức đối chứng.

Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có công bố nào về việc nuôi trồng loài vi khuẩn lam này trong môi trường biển/nước lợ tự nhiên. Hơn nữa, quá trình “nhiễm mặn” đang diễn ra liên tục do biến đổi khí hậu, dẫn đến nguồn nước ngọt ngày càng cạn kiệt. Do vậy, việc có được các chủng giống tảo có khả năng sống, thích ứng được với độ mặn cao được xem là một trong các giải pháp tiềm năng và bền vững, có ý nghĩa cả về khoa học và thực tiễn trong thời điểm hiện nay. Kết quả nghiên cứu này sẽ cung cấp những cơ sở khoa học ban đầu cho việc sử dụng bền vững nguồn nước mặn/nước lợ sẵn có để nuôi trồng vi khuẩn lam *Spirulina* có giá trị kinh tế cao, từ đó sẽ giúp giảm chi phí sản xuất và hạ giá thành các sản phẩm từ đối tượng tiềm năng này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

11 chủng vi khuẩn lam nước ngọt *Spirulina platensis* (được ký hiệu là *S. platensis* BM, ST, CNT, CNT1, C1, M135, TL, IET, DL, KIT và TV) thuộc bộ sưu tập giống của Phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam được dùng cho nghiên cứu. Hình thái tế bào của các chủng nêu trên được mô tả chi tiết trong công bố của

Đặng Diễm Hồng (2019). Các chủng này được lưu giữ và nuôi cấy dưới điều kiện nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ với quang chu kỳ sáng:tối là 12:12 giờ.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là những hóa chất thông dụng và đảm bảo độ tinh khiết cho từng thí nghiệm.

Xác định sinh trưởng của vi khuẩn lam *S. platensis*

Sinh trưởng của tảo xác định thông qua mật độ quang hấp thụ ở bước sóng 556 nm (OD_{556nm}) bằng máy quang phổ (Shimadzu, Nhật Bản) và tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ (/ngày) (Đặng Diễm Hồng, 2019). Sinh khối khô dạng bột của *S. platensis* được xác định bằng phương pháp sấy nhiệt để phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm của chúng tôi. Cụ thể: 10 mL dịch nuôi sau thu hoạch được lọc qua giấy lọc GF/C Whatman (GE, đường kính 55 mm), sau đó rửa sinh khối lại bằng nước cất 3 lần để loại bỏ muối và sấy khô ở nhiệt độ 60°C, có thổi khí trong 12 giờ đến khối lượng không đổi (Đặng Diễm Hồng, 2019; Safak *et al.*, 2017).

Đo huỳnh quang chlorophyll a

Đo các thông số huỳnh quang chlorophyll a của mẫu vi khuẩn lam *S. platensis* được thực hiện bằng máy Mini - PAM II Chlorophyll fluorometer (HWG, Đức). Quy trình thực hiện được trình bày chi tiết trong công bố của Luu Thị Tâm và đồng tác giả (2021).

Phân tích hàm lượng sắc tố (chlorophyll a, carotenoid) và phycocyanin

Sắc tố (chlorophyll a và carotenoid) được tách chiết bằng dung môi acetone 80%. Phycocyanin được tách chiết bằng đệm phosphate theo mô tả của Dương Trọng Hiền (1999). Phương pháp này dựa vào tính tan của phân tử sắc tố trong dung môi. Do phân tử chlorophyll có chứa Mg trong vòng pyron mang tính tan trong nước và kết hợp với protein màng, trong khi đó đuôi dài cacbon của gốc rượy phytol lại mang tính kỵ nước và giống cấu trúc lipid của màng thylakoid, nên phân tử chlorophyll chủ yếu hoà tan trong dung môi hữu cơ. Quy trình tách

chiết và xác định hàm lượng sắc tố và phycocyanin được trình bày trong công bố của Đặng Diễm Hồng (2019).

Phân tích hàm lượng protein, carbohydrate và lipid tổng số

Hàm lượng protein được tách chiết bằng phương pháp sốc nhiệt độ (Soni et al, 2006) và định lượng theo phương pháp Bradford (1976), chi tiết của quy trình này được mô tả trong công bố của Đặng Diễm Hồng (2019). Hàm lượng lipid được xác định theo phương pháp của Bligh and Dyer (1959). Hàm lượng carbohydrate của vi khuẩn lam *S. platensis* được xác định dựa trên công bố của Miler (1959) với một số cải tiến như mẫu sinh khối *Spirulina* được nghiền bằng cát thủy tinh trước khi thủy phân bằng axit, phản ứng đường khử được thực hiện trong các ống eppendorf 1,5 mL có đục lỗ trên nắp và để trong nồi nước đun sôi.

Sàng lọc sơ bộ khả năng chịu mặn của các chủng *S. platensis* nước ngọt dưới điều kiện phòng thí nghiệm

11 chủng *S. platensis* nước ngọt trong thử nghiệm này được nuôi trên môi trường SOT có bổ sung thêm NaCl để đạt nồng độ muối cuối cùng trong môi trường là 5, 10, 15, 20, 25 và 30‰ ở trong các lọ penicillin (4 mL dịch nuôi/lọ). Đối chứng là môi trường SOT pha bằng nước cất. Thành phần môi trường SOT gồm: 16,8 g/L NaHCO₃; 0,5 g/L K₂HPO₄; 2,5 g/L NaNO₃; 1 g/L K₂SO₄; 1g/L NaCl; 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,04 g/L CaCl₂; 0,01g/L FeSO₄; 0,08 g/L Na₂-EDTA; Dung dịch A₅- 1 ml. Thành phần dung dịch A₅ gồm: 2,85 g/L H₃BO₃; 1,81g/L MnCl₂.4H₂O; 0,22g/L ZnSO₄.7H₂O; 0,08 g/L CuSO₄.5H₂O; 0,015 g/L MoO₃ pha trong 1 L nước cất (Đặng Diễm Hồng, 2019). Giá trị OD_{556 nm} gieo ban đầu là 0,3 cho tất cả các chủng nuôi cấy. Thử nghiệm được tiến hành trong 50 ngày. Sàng lọc sơ bộ khả năng chịu mặn thông qua quan sát màu sắc dịch tảo, hình thái sợi ở điểm cuối của thử nghiệm.

Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng *S. platensis* tiềm năng trong môi trường nước biển tự nhiên

Sau khi lựa chọn được chủng *S. platensis*

chịu mặn tiềm năng, chúng tôi tiến hành đánh giá lại khả năng sinh trưởng của chủng này trong môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên có độ mặn khác nhau (5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35‰). Thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác 250 mL (chứa 150 ml dịch nuôi/bình). Giá trị OD_{556 nm} gieo ban đầu là 0,3 cho tất cả công thức thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy như sau: nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 60 μmol/m²s với quang chu kỳ sáng:tối là 12:12 giờ. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần và các bình nuôi được lắc tay 2 lần/ ngày trong suốt quá trình thí nghiệm. Lấy mẫu 3 - 5 ngày/lần để xác định sinh trưởng bằng cách đo mật độ quang OD_{556 nm}, đo huỳnh quang chlorophyll a. Hàm lượng sắc tố và thành phần sinh hoá của sinh khối thu được sẽ được phân tích tại điểm cuối sau khi kết thúc thí nghiệm.

Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *S. platensis* chịu mặn tiềm năng

Với mục tiêu tìm được môi trường dinh dưỡng vừa tốt cho sinh trưởng của chủng *Spirulina* chịu mặn, vừa rẻ tiền và dễ dàng thực hiện, chúng tôi đã tiến hành 8 công thức thí nghiệm như sau: (CT1) Môi trường SOT pha bằng nước cất (SOT 0‰); (CT2) Môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên (NBTN 30‰) (SOT 30‰); (CT3) NBTN 30‰; (CT4) NBTN 30‰ + NaHCO₃ (2 g/L); (CT5) NBTN 30‰ + NaHCO₃ (2 g/L) + NaNO₃ (3 g/L); (CT6) NBTN 30‰ + NaNO₃ (3 g/L) + K₂HPO₄ (0,5 g/L) + FeSO₄ (0,05 g/L); (CT7) NBTN 30‰ + urea (0,2 g/L); (CT8) NBTN 30‰ + dung dịch Hyponex high grade 7:10:6 (1 mL/L môi trường, đây là dung dịch phân bón pha sẵn của Nhật Bản (có tỷ lệ N:P:K= 10v: 7v:6v). Điểm khác biệt so với thí nghiệm trước là nước biển tự nhiên được tiền xử lý bằng cách bổ sung NaHCO₃ và chỉnh pH về giá trị 9,2; để ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ để tủa các ion Mg²⁺, SO₄²⁻, Ca²⁺; sau đó lọc loại bỏ cặn tủa thu dịch trong phía trên. Việc tiền xử lý nước biển là cần thiết trong nuôi cấy vi khuẩn lam *Spirulina* nước mặn do đặc thù môi trường nuôi của loài này có pH cao (9 - 10), nếu không loại bỏ các ion Mg²⁺, SO₄²⁻, Ca²⁺ trước khi sử dụng thì các ion này sẽ gây tủa các thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi, từ đó làm giảm

hàm lượng các chất dinh dưỡng đưa vào môi trường. Điều kiện nuôi cấy và theo dõi sinh trưởng của chủng *S. platensis* như trình bày ở trên.

Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê ANOVA một thành phần ở mức ý nghĩa $P \leq 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc sơ bộ khả năng chịu mặn của các chủng *S. platensis* nước ngọt

Chúng tôi đã tiến hành sàng lọc sơ bộ khả năng chịu mặn của 11 chủng *S. platensis* nước ngọt trong môi trường SOT có bổ sung thêm NaCl ở nồng độ từ 5 - 30 ‰ trong các lọ penicillin. Kết quả sàng lọc khả năng chịu mặn của các chủng này sau 50 ngày nuôi được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Kết quả chỉ ra ở bảng 1 và hình 1 đã cho thấy tất cả 11 chủng *S. platensis* nước ngọt đều có khả năng sinh trưởng tốt ở môi trường SOT có độ mặn từ 0 - 15‰. Không có sự sai khác về hình thái tế bào giữa các công thức nuôi này. Tuy nhiên, khi tăng độ mặn lên 30‰, chỉ có 7/11 chủng có khả năng chịu mặn và sinh trưởng tốt, bao gồm các chủng *S. platensis* BM, ST, CNT, C1, M135, TL, IET. Hình thái tế bào của các

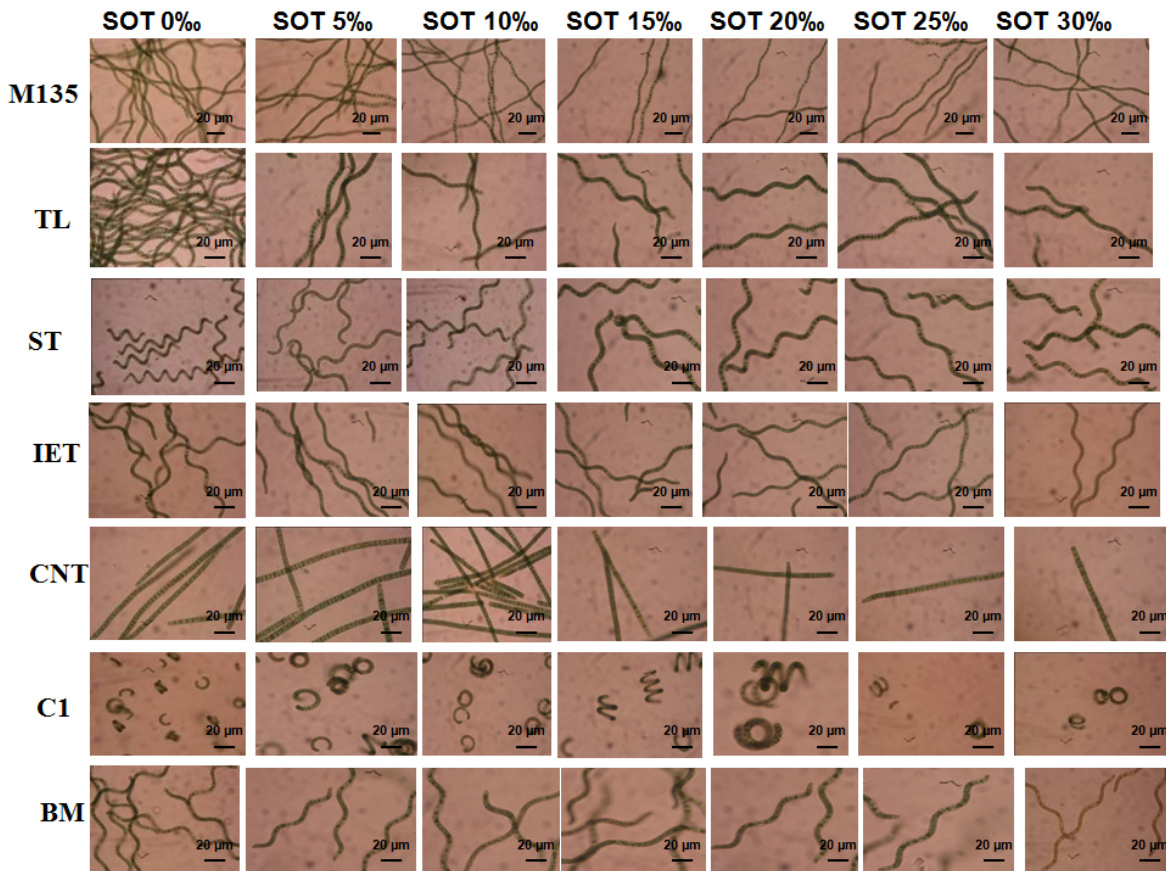
chủng này ở độ mặn 30‰ cũng không có sự sai khác so với đối chứng.

Như vậy, chúng tôi đã sàng lọc sơ bộ được 7 chủng *S. platensis* nêu trên có khả năng chịu mặn tốt, trong đó chủng *S. platensis* ST có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong tất cả các dải độ mặn thử nghiệm. Hơn nữa, chủng ST có khả năng chịu nhiệt tốt và đã được nuôi sinh khối thành công trên quy mô lớn tại Công ty Cổ phần Khoa học xanh Hidumi Pharma, Quỳnh Lương, Nghệ An (Đặng Diễm Hồng, 2019). Do đó, chúng tôi lựa chọn chủng ST cho các nghiên cứu sâu hơn. Chủng ST có khả năng chịu được dải độ mặn rộng từ 0 - 30‰ có thể là do: (i) Tế bào *Spirulina* có không bào khí nên có khả năng nổi trên bề mặt nước, giúp hạn chế khả năng tiếp xúc của tế bào với môi trường nuôi; (ii) Trong điều kiện mặn, chủng ST có thể tăng cường tổng hợp các đường tan giúp cân bằng áp suất thẩm thấu giữa phần trong và phần ngoài tế bào; (iii) Chủng ST có bơm đẩy Na^+ ra khỏi ngoài tế bào kết hợp với tổng hợp glycinebetain, tăng hoạt tính của H^+ -ATPase, cytochrome oxidase và hoạt động của bơm Na^+/H^+ antiporter để điều chỉnh áp suất thẩm thấu (tương tự như công bố của Gabbay-Azaria & Tel-Or (1991) về khả năng chịu mặn của loài *Spirulina subsalsa*). Tuy nhiên, để hiểu rõ hơn cơ chế chịu mặn của chủng ST cần có những nghiên cứu sâu hơn trong tương lai về vấn đề này.

Bảng 1. Sàng lọc sơ bộ khả năng chịu mặn của các chủng *S. platensis* nước ngọt trong môi trường SOT có bổ sung nồng độ NaCl khác nhau.

Chủng giống <i>S. platensis</i>	Môi trường SOT						
	0‰	5‰	10‰	15‰	20‰	25‰	30‰
BM	+++	+++	++	++	++	++	+
ST	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CNT1	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
CNT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C1	+++	+++	+++	+++	++	++	++
M135	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TL	+++	+++	++	++	++	++	+
IET	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
DL	+++	+++	+++	+++	-	-	-
KIT	+++	+++	+++	++	+	-	-
TV	+++	+++	++	++	+	-	-

Ghi chú: +++, rất tốt; ++, tốt; +, bình thường; -, chết.



Hình 1. Ảnh minh họa hình thái tế bào của vi khuẩn lam *S. platensis* trong môi trường SOT có độ mặn khác nhau sau 50 ngày nuôi (độ phóng đại 2000 lần).

Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng *S. platensis* ST tiềm năng trong môi trường nước biển tự nhiên có độ mặn khác nhau

Kết quả về khả năng chịu mặn của chủng *S. platensis* ST được nuôi trong môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên có độ mặn từ 5 - 35‰ được chỉ ra ở hình 2 và 3.

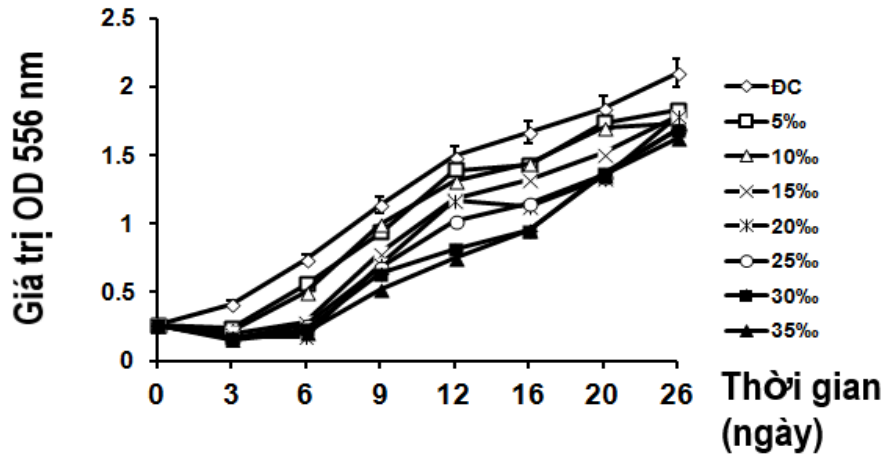
Kết quả chỉ ra ở hình 2 cho thấy chủng ST sinh trưởng tốt nhất trong môi trường SOT 0‰, với giá trị OD_{556 nm} đạt 2,11 ± 0,17 sau 26 ngày nuôi. Ở các công thức có độ mặn khác nhau (từ 5 - 35‰), chủng này vẫn có khả năng sinh trưởng tốt nhưng sinh trưởng của chủng ST giảm dần khi độ mặn tăng, với giá trị OD_{556 nm} lần lượt đạt 1,84 ± 0,11; 1,79 ± 0,08; 1,73 ± 0,10; 1,71 ± 0,05; 1,69

± 0,08; 1,63 ± 0,12 và 1,62 ± 0,07 ở công thức SOT có độ mặn lần lượt tương ứng là 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35‰. Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về sinh trưởng của chủng ST giữa các độ mặn nêu trên (P > 0,05). Ở trong môi trường SOT nước mặn (35‰), sinh trưởng của chủng ST giảm khoảng 20% so với môi trường SOT nước ngọt. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về hình thái tế bào của chủng ST ở các độ mặn khác nhau. Ở thời điểm 6 ngày đầu tiên, dịch tảo trong các môi trường có độ mặn khác nhau bị lắng tủa xuống đáy bình nuôi (Hình 3). Tuy nhiên, từ ngày thứ 10 trở đi, dịch tảo trở nên huyền phù hơn. Kết quả này cho thấy chủng ST có khả năng chịu mặn trong dải độ mặn tương đối rộng, có quá trình thích nghi và có khả năng

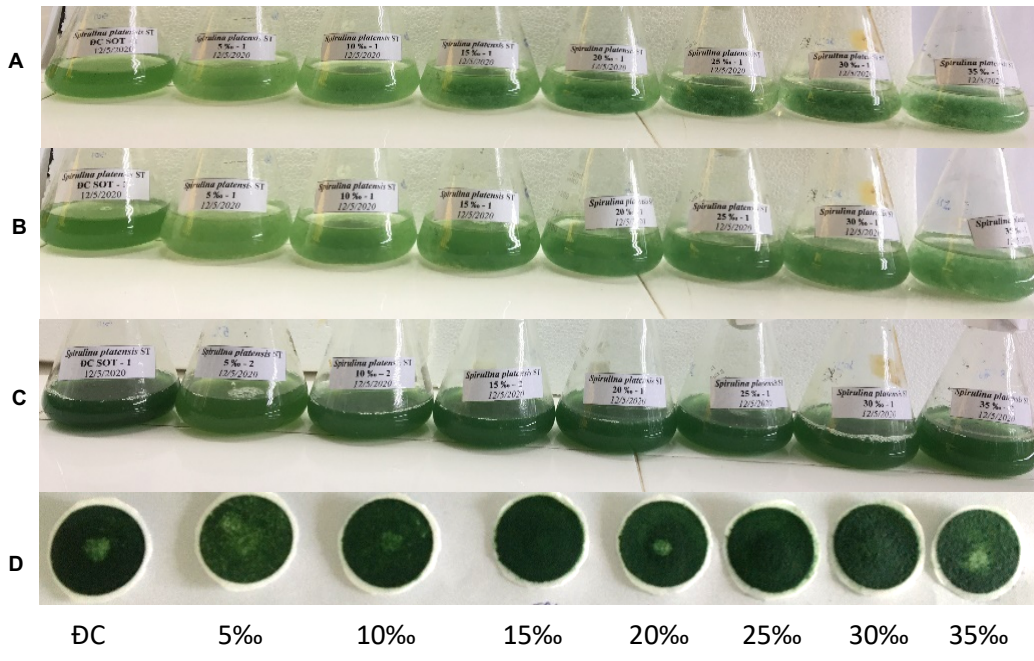
sinh trưởng tốt trong môi trường nước biển tự nhiên. Ảnh minh họa các bình nuôi tảo trong thí nghiệm được chỉ ra ở hình 3.

Chúng tôi cũng tiến hành đánh giá ảnh hưởng của điều kiện mặn bất lợi lên quang hợp của vi khuẩn lam *S. platensis* ST thông qua đo huỳnh

quang chlorophyll a bằng máy Mini - PAM II Chlorophyll fluorometer. Đây là một thông số quan trọng được sử dụng để đánh giá được tình trạng bộ máy quang hợp của thực vật cũng như khả năng chống chịu của chúng dưới các điều kiện bất lợi của môi trường. Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở hình 4.



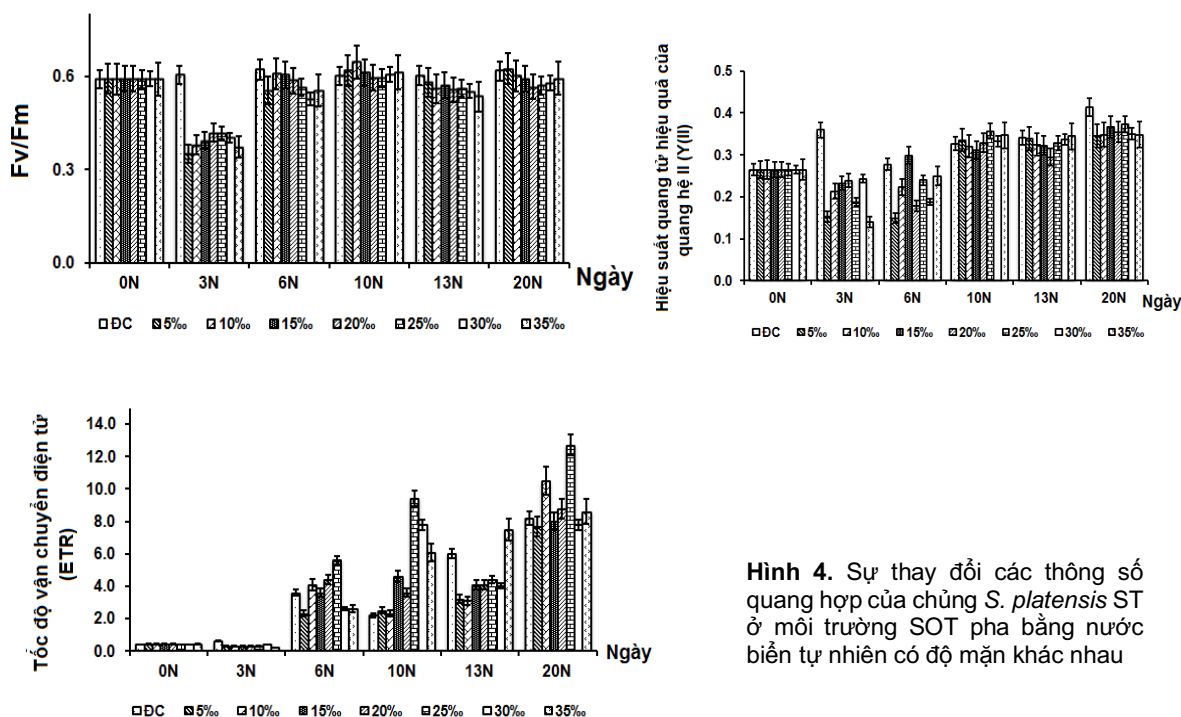
Hình 2. Sinh trưởng của chủng *S. platensis* ST trong môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên có độ mặn khác nhau.



Hình 3. Ảnh minh họa bình nuôi chủng *S. platensis* ST ở môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên có độ mặn khác nhau. A, 3 ngày; B, 6 ngày; C, 20 ngày; D, Sinh khối tươi (10 mL).

Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy: khi nuôi chủng ST trong môi trường có độ mặn khác nhau đã kéo dài pha thích nghi của vi khuẩn lam *S. platensis* ST, dẫn đến sinh trưởng của chủng này có xu hướng giảm nhẹ trong 3 ngày đầu, được thể hiện qua mức giảm về hiệu quả sử dụng năng lượng ánh sáng được hấp thụ ở quang hệ II (PSII) được sử dụng trong phản ứng quang hóa (Fv/Fm). Giá trị Fv/Fm trong các công thức độ mặn ở giai đoạn này dao động từ 0,35 - 0,418, thấp hơn 30 - 37% so với giá trị tương ứng ở công thức đối chứng tại cùng thời điểm. Điều này cho thấy đã có tổn thương ở trung tâm

phản ứng của quang hệ II của chủng ST. Giai đoạn này có thể coi là giai đoạn thích nghi dần của vi khuẩn lam *Spirulina* với môi trường mặn. Tuy nhiên, từ ngày nuôi thứ 6, giá trị Fv/Fm lại tăng dần và đạt giá trị tương đương so với công thức đối chứng. Kết quả này cho thấy hoạt tính quang hợp và sinh trưởng của chủng ST đã được phục hồi và thích nghi được với điều kiện môi trường nước mặn. Các kết quả thu được của chúng tôi cũng tương đồng với công bố của Sili và đồng tác giả (2012) khi công bố độ mặn cao đã làm giảm hơn 3% hiệu suất quang hợp của *Spirulina* (Sili et al., 2012).



Hình 4. Sự thay đổi các thông số quang hợp của chủng *S. platensis* ST ở môi trường SOT pha bằng nước biển tự nhiên có độ mặn khác nhau

Tương tự, giá trị về hiệu suất lượng tử hiệu quả của quang hệ II (YII) ở công thức đối chứng có xu hướng tăng dần khi kéo dài thời gian nuôi cấy, có nghĩa rằng hiệu quả hấp thụ năng lượng ánh sáng ở PSII vẫn được duy trì tốt. Trong khi đó, ở công thức có độ mặn khác nhau, giá trị này thấp hơn so với công thức đối chứng tại thời điểm 20 ngày. Như vậy, hiệu suất lượng tử hiệu quả của PSII đã bị giảm khi môi trường nuôi có độ mặn tăng.

Ngược lại, tốc độ vận chuyển điện tử (ETR) ở các công thức khác nhau không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học trong 3 ngày đầu tiên ($P > 0,05$). Từ ngày nuôi thứ 6, giá trị này lại có xu hướng tăng dần khi kéo dài thời gian nuôi. Giá trị này ở công thức có độ mặn khác nhau lại cao hơn so với công thức đối chứng, điều này cho thấy khả năng vận chuyển điện tử trong mạch vận chuyển điện tử quang hợp đã được tăng cường trong điều kiện môi trường nuôi có độ mặn cao giúp cho cơ

thể tảo có thể chống chịu và thích nghi được với điều kiện nuôi. Kết quả của quá trình nêu trên đã dẫn đến sinh trưởng của tảo ở các độ mặn khác nhau vẫn được duy trì và phát triển.

Chúng tôi cũng tiến hành phân tích chất lượng của sinh khối chủng ST nuôi ở các độ mặn khác nhau thông qua hàm lượng protein, carbohydrate và lipit. Kết quả thu được được chỉ ra ở bảng 2.

Khi nuôi chủng *S. platensis* ST trong môi trường có độ mặn khác nhau, hàm lượng protein trong sinh khối của chúng có xu hướng giảm dần, giá trị này giảm 5,11; 7,36; 9,53; 10,02; 11,25; 12,07 và 28,43% tương ứng với công thức môi trường SOT có độ mặn từ 5, 10, 15, 20, 25, 30 và 35‰. Kết quả này cũng tương đồng với công bố của Rafiqul và đồng tác giả (2003) khi công bố độ mặn cao ảnh hưởng tiêu cực lên tốc độ sinh trưởng, năng suất sinh khối và hàm lượng protein của vi khuẩn lam *Spirulina*. Sili và đồng tác giả

(2012) cũng công bố hàm lượng protein của sinh khối *S. platensis* nuôi trong nước biển giảm 13% so với trong môi trường Zarrouk. Như vậy, mặc dù chủng ST có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường có độ mặn khác nhau từ 5 - 35‰ nhưng chỉ nên nuôi sinh khối chủng này trong môi trường có độ mặn $\leq 30‰$ để đảm bảo chất lượng sinh khối thu được.

Hàm lượng lipit và carbohydrate lại có xu hướng tăng dần và cao hơn so với giá trị tương ứng ở công thức đối chứng khi độ mặn tăng từ 5 - 30‰. Tuy nhiên, khi độ mặn quá cao (35‰) thì hàm lượng các chất này lại giảm. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cũng tương đồng với công bố của Fafiqul và đồng tác giả (2003) về nồng độ muối cao có ảnh hưởng tích cực lên hàm lượng carbohydrate và lipit của *Spirulina*. Tuy nhiên, khi nồng độ muối quá cao sẽ ảnh hưởng tiêu cực lên sinh trưởng cũng như năng suất sinh khối của loài vi khuẩn lam này, từ đó dẫn đến hàm lượng các chất thứ cấp cũng bị giảm đi.

Bảng 2. Hàm lượng protein, carbohydrate và lipit của sinh khối chủng *S. platensis* ST nuôi ở các độ mặn khác nhau.

Thông số	Protein (% SKK)	Carbohydrate (% SKK)	Lipit (% SKK)	
0‰	48,9 ± 0,3	15,31 ± 0,09	7,75 ± 0,05	
5‰	46,4 ± 0,4	18,94 ± 0,13	10,70 ± 0,09	
10‰	45,3 ± 0,1	27,87 ± 0,06	8,01 ± 0,06	
Môi trường SOT	15‰	44,2 ± 0,2	22,51 ± 0,11	8,16 ± 0,04
20‰	44,0 ± 0,5	18,18 ± 0,05	8,72 ± 0,03	
25‰	43,4 ± 0,1	16,39 ± 0,07	8,93 ± 0,05	
30‰	43,0 ± 0,4	16,58 ± 0,10	8,66 ± 0,10	
35‰	35,0 ± 0,3	8,00 ± 0,03	6,87 ± 0,07	

Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho sinh trưởng của chủng *S. platensis* ST

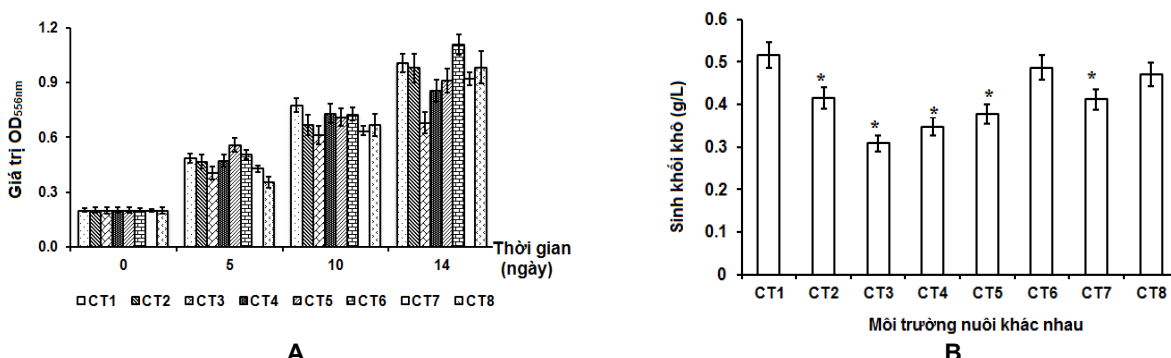
Kết quả về lựa chọn môi trường nước biển thích hợp cho sinh trưởng của chủng ST trong điều kiện phòng thí nghiệm được chỉ ra ở Hình 5 và 6.

Kết quả chỉ ra ở Hình 5A cho thấy: sau 14 ngày nuôi, chủng ST có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường nước biển tự nhiên 30‰ có

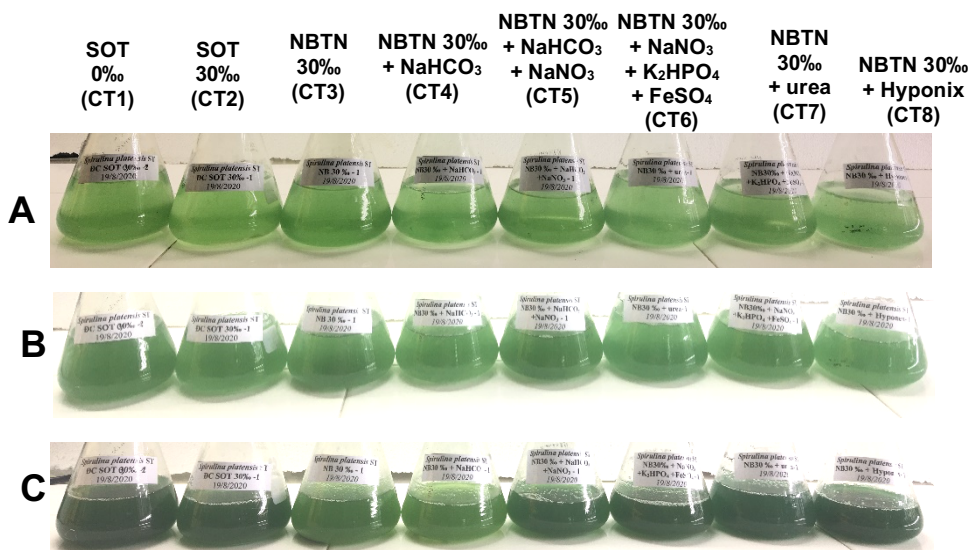
bổ sung thêm 3 g/L NaNO₃, 0,5 g/L K₂HPO₄, 0,05 g/L FeSO₄ (CT6), tiếp theo là các công thức đối chứng SOT pha bằng nước cất (CT1), NBTN 30‰ + Hyponix (CT8), NBTN 30‰ + SOT (CT2), NBTN 30‰ + urea (CT7), NBTN 30‰ + NaHCO₃ + NaNO₃ (CT5), NBTN 30‰ + NaHCO₃ (CT4) và NBTN 30‰ (CT3), với giá trị OD_{556nm} đạt lần lượt là 1,107 ± 0,05; 1,009 ± 0,07; 0,985 ± 0,10; 0,98 ± 0,03; 0,92 ± 0,09; 0,911 ± 0,10; 0,855 ± 0,11 và 0,68 ± 0,04. Không có sự

khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học về sinh trưởng của chủng ST giữa CT2, CT6, CT7 ($P > 0,05$) nhưng giữa công thức CT1, CT6 và CT3 lại có sự sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$). Màu sắc dịch tảo (quan sát bằng mắt thường) cũng không có sự sai khác nhiều giữa các môi trường nuôi khác nhau (trừ CT3 và CT4). Dịch tảo ở trạng thái huyền phù ở tất cả các công thức môi trường nuôi khác nhau.

Điều này cho thấy việc tiền xử lý nước biển trước khi sử dụng là cần thiết, giúp tảo sinh trưởng tốt hơn. Kết quả thu được của chúng tôi cũng tương đồng với công bố của Sandeep và đồng tác giả (2013) về sinh trưởng của *S. platensis* trong môi trường nước biển 15‰ + $\text{NaHCO}_3 - 8\text{g/L} + \text{NaCl} - 2\text{g/L}$ đã bị giảm 15% so với nuôi trong môi trường NRC cải tiến.



Hình 5. Sinh trưởng (A) và sinh khối khô (B) của chủng *S. platensis* ST ở các môi trường nuôi khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy. CT1, SOT 0‰; CT2, SOT 30‰; CT3, Nước biển tự nhiên, NBTN 30‰; CT4, NBTN 30‰ + 2g/L NaHCO_3 ; CT5, NBTN 30‰ + 2g/L NaHCO_3 + 3g/L NaNO_3 ; CT6, NBTN 30‰ + 3g/L NaNO_3 + 0,5 g/L K_2HPO_4 + 0,05 g/L FeSO_4 ; CT7, NBTN 30‰ + 0,2 g/L urea; CT8, NBTN 30‰ + 1 mL/L Hyponix (N:P:K, 10v:7v:6v).

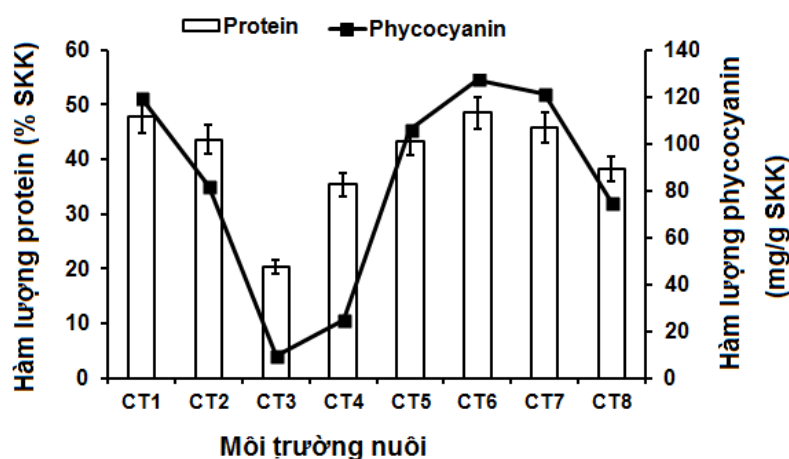


Hình 6. Ảnh minh họa bình nuôi chủng *S. platensis* ST ở các môi trường nuôi khác nhau. A, 3 ngày; B, 6 ngày; C, 14 ngày.

Kết quả thu được chỉ ra ở hình 5B đã cho thấy sinh khối khô của chủng ST đạt cao nhất ở công thức CT1, với giá trị đạt 0,516 g/L, tiếp theo là công thức CT6, CT8, CT2, CT7, CT5, CT4, CT3, với giá trị tương ứng là 0,487; 0,471; 0,416; 0,412; 0,348; 0,377 và 0,309 g/L. Không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê sinh học về hàm lượng sinh khối khô của chủng ST giữa CT1 và CT6, CT8 ($P > 0,05$) nhưng có sự sai khác có nghĩa giữa CT1 và CT2, CT3, CT4, CT5, CT7 ($P < 0,05$). Điều này cho thấy chủng ST có thể sinh trưởng tốt trong môi trường nước biển 30‰ có bổ sung thêm các hóa chất rẻ tiền như urea, phân NPK hay các chất vô cơ như NaNO_3 , KH_2PO_4 và FeSO_4 . Kết quả thu được trong nghiên cứu này cũng tương đồng với công bố của Murugan và Rajesh (2014) về nuôi vi khuẩn lam *S. platensis*

(dạng sợi) và *S. platensis* var lonar trong môi trường nước biển có nồng độ NaCl 18‰. Nước biển tự nhiên được tiền xử lý với NaHCO_3 và Na_2CO_3 sau đó làm giàu bằng 0,5 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L NaNO_3 và 0,05 g/L FeSO_4 . Kết quả sau 14 ngày nuôi cho thấy cả hai chủng đều sinh trưởng tốt trên môi trường nêu trên, với năng suất sinh khối và hàm lượng phycocyanin đều tương đương với môi trường Zarrouk.

Hình 6 là ảnh minh họa các bình nuôi sinh khối *S. platensis* ST ở các môi trường nước biển 30‰ có bổ sung thêm các hóa chất khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy. Chất lượng sinh khối của chủng *S. platensis* ST ở các môi trường nuôi cũng được đánh giá thông qua hàm lượng protein và phycocyanin. Kết quả chi tiết được chỉ ra ở hình 7.



Hình 7. Hàm lượng protein và phycocyanin của chủng *S. platensis* ST ở các môi trường nuôi khác nhau sau 14 ngày nuôi. CT1, SOT 0‰; CT2, SOT 30‰; CT3, Nước biển tự nhiên, NBTN 30‰; CT4, NBTN 30‰ + 2g/L NaHCO_3 ; CT5, NBTN 30‰ + 2g/L NaHCO_3 + 3g/L NaNO_3 ; CT6, NBTN 30‰ + 3g/L NaNO_3 + 0,5 g/L K_2HPO_4 + 0,05 g/L FeSO_4 ; CT7, NBTN 30‰ + 0,2 g/L urea; CT8, NBTN 30‰ + 1 mL/L hyponix (N:P:K, 10v:7v:6v).

Kết quả chỉ ra ở hình 7 cho thấy hàm lượng protein và phycocyanin phụ thuộc nhiều vào thành phần dinh dưỡng trong môi trường, đặc biệt là hàm lượng nitơ có trong môi trường nuôi cấy, không phụ thuộc nhiều vào độ mặn của môi trường nuôi. Điều này được chứng minh qua hàm lượng protein và phycocyanin của sinh khối chủng ST đạt cao nhất ở công thức CT6 với giá trị tương ứng đạt 48,56% sinh khối khô và 127,5 mg/g sinh

khối khô. Tiếp theo là công thức CT1, CT7, CT2, CT5, CT8, CT4 và CT3 với hàm lượng protein lần lượt đạt 47,79; 45,86; 43,67; 43,38; 38,16; 35,40 và 20,42% sinh khối khô. Hàm lượng sắc tố phycocyanin cũng đạt cao nhất ở công thức CT6 với giá trị đạt 127,52 mg/g sinh khối khô, tiếp đó là CT7, CT1, CT5, CT2, CT8, CT4 và CT3, với giá trị tương ứng đạt 121,41; 119,56; 106,13; 81,64; 75,03; 24,81 và 9,27 mg/g sinh khối khô.

Ở công thức CT3 (nuôi bằng NBTN 30%), mặc dù sinh trưởng của tảo giảm không nhiều so với công thức đối chứng nhưng hàm lượng protein và phycocyanin giảm mạnh so với các công thức khác sau 14 ngày nuôi. Điều này có thể do thời điểm này dinh dưỡng trong môi trường nuôi CT4 đã bị cạn kiệt, đặc biệt là nguồn nitrogen. Hơn nữa, màu sắc dịch tảo ở công thức này cũng chuyển sang màu lam nhạt (Hình 6).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã sàng lọc được 7 chủng *Spirulina platensis* nước ngọt có khả năng chịu mặn từ 5 - 30‰ và lựa chọn được 01 chủng *S. platensis* ST để nghiên cứu sâu hơn. Chủng ST sinh trưởng tốt nhất trong môi trường nước biển tự nhiên 30‰ có bổ sung thêm NaNO₃ (3 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), FeSO₄ (0,05 g/L), với năng suất sinh khối, hàm lượng protein và hàm lượng phycocyanin không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với công thức đối chứng (môi trường SOT pha bằng nước cất). Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng môi trường nước biển rẻ tiền để nuôi sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* có giá trị làm thực phẩm chức năng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí của đề tài cơ sở cấp Viện Công nghệ sinh học “Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn lam *Spirulina* chịu mặn cho nuôi thu sinh khối làm thực phẩm chức năng”. Mã số: CS20 - 20”, do TS. Lưu Thị Tâm làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.

Bradford MM (1976) Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das K (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour Technol* 101: 3097-3105.

FAO (2008) A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animal and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* No. 1034.

Fayyad RJ, Mohammed Ali AN, Dwaish AS, Abed Al- Abboodi AK (2019) Anticancer activity of *Spirulina platensis* methanolic extracts against L20B and MCF7 human cancer cell lines. *Plant Archives*, 19(11): 1419-1426.

Gabbay-Azaria R, Tel-Or E (1991) Regulation of intracellular Na⁺ content during NaCl upshock in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa* cells. *Bioresour Technol* 38(2-3): 215-220.

Đặng Diễm Hồng (chủ biên) (2019). Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam. Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ. 750 trang.

Jang IS, Park SJ (2016) A *Spirulina maxima*-derived peptide inhibits HIV-1 infection in a human T cell line MT4. *Fish Aquatic Sci*, 19: 37.

Lee J, Park A, Kim MJ, Lim HJ, Rha YA, Kang HG (2017) *Spirulina* extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti - ROS production. *Nutrients*, 9: 1363.

Liu Q, Huang Y, Zhang R, Cai T, Cai Y (2016). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin. *Evid Based Complement Altern Med*, 14: 7803846.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.

Murugan T, Rajesh R (2014) Cultivation of two species of *Spirulina* (*Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var *lonar*) on sea water medium and extraction of C-phycocyanin. *Eur J Exp Biol* 4(2):93-97.

Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Nhung, Lê Thị Thom, Đặng Diễm Hồng (2017) Sử dụng các môi trường rẻ tiền để nuôi *Spirulina platensis* BM đạt hiệu suất sinh khối tốt. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 15(4A): 143-149.

Rafiqul IM, Hassan A, Sulebele G, Orosco CA, Roustaian P, Jalal KCA (2003) Salt stress culture of blue green algae *Spirulina fusiformis*. *Pak J Biol Sci* 6(7):648-650.

Sili C, Torzillo G, Vonshak A (2012) *Arthrospira (Spirulina)*. In Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands: 677-705.

Sandeep KP, Shukla SP, Harikrishna V, Muralidhar AP, Vennila A, Purushothaman CS, Ratheesh Kumar R(2013) Utilization of inland saline water for *Spirulina* cultivation. *J Water Reuse Desal* 3(4): 346-356.

Safak SC, Edis K, Semra C (2017) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Spirulina platensis* and biodiesel

production. *Aquac Int* 25: 1485-1493.

Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, Madamwar D (2006) Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoriaquadripunctulata* - isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem* 41(9):2017-2023.

Luu Thi Tam, Nguyen Cam Ha, Le Thi Thom, Jiang-yu Zhu, Manito Wakisaka, Dang Diem Hong (2021). Ferulic acid extracted from rice bran as a growth promoter for the microalga *Nannochloropsis oculata*. *J Appl Phycol*, 33: 37-45.

ASSESSING THE SALT TOLERANCE OF *SPIRULINA PLATENSIS* FRESHWATER STRAINS AND EXAMINING CHEAP CULTURE MEDIA FOR CULTIVATION OF THE POTENTIAL STRAIN

Luu Thi Tam¹, Le Thi Thom^{1,2}, Nguyen Cam Ha^{1,2}, Hoang Thi Minh Hien¹, Ngo Thi Hoai Thu¹, Dang Diem Hong^{1,2,3}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*ThuyLoi University*

SUMMARY

Spirulina cyanobacteria have been widely cultivated to exploit products such as crude protein, vitamins, phycocyanin pigment... with high nutritional and pharmacological values. However, the commercialization of these products is still a challenging issue due to high biomass cost, which is mainly caused by expensive nutrients in the culture medium. In this study, from 11 freshwater *S. platensis* strains, by culture screening, we found 7 strains being capable of profitable growth on inexpensive seawater with salinity ranging from 5 - 30‰, and selected ST strain as the potential strain for further study. Natural seawater must be pretreated to remove ions that easily cause precipitation of nutrients in the culture medium such as Mg²⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻... before using. The ST strain showed the best growth in the natural seawater medium with 30‰ salinity containing 3 g/L NaNO₃, 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.05 g/L FeSO₄. This strain reached the highest biomass yield at 0.487 g/L and the specific growth rate (μ) of 0.12 x day⁻¹; protein and phycocyanin contents reached 48.6% and 127 mg/g of dry biomass, respectively. There was no difference in the mentioned above values with biological statistical significance between this medium and SOT medium in distilled water. The ST strain biomass was qualified to be used for the production of functional foods. Results of this study provided scientific basis for the use of marine and brackish waters to produce biomass of this highly economic cyanobacterium.

Keywords: *Spirulina platensis*, salt tolerance, phycocyanin, biomass production, cyanobacteria