

Bài báo nghiên cứu

**NUÔI CÂY *Haematococcus pluvialis*
GIAI ĐOẠN SINH DƯỠNG KIỂU BÁN LIÊN TỤC
TRONG HỆ THỐNG PSBR PHƯƠNG NGHIÊNG****Trần Bảo Xuyên, Nguyễn Thị Thanh Tuyền, Đỗ Thành Trí***

Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Đỗ Thành Trí – Email: tridt@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 05-5-2023; ngày nhận bài sửa: 05-9-2023; ngày duyệt đăng: 07-9-2023

TÓM TẮT

Bên cạnh việc nuôi kiểu huyền phù để tăng sinh vi tảo *Haematococcus pluvialis* giai đoạn sinh dưỡng để làm nguồn giống cho các giai đoạn và quy mô nuôi kế tiếp, việc nuôi kiểu cố định trong hệ thống PSBR phương nghiêng đã được phát triển trong thời gian gần đây. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên vi tảo *H. pluvialis* được nuôi kiểu bán liên tục trong các hệ thống PSBR kích thước $0,05 \text{ m}^2 \times 3$ để tăng sinh khối giai đoạn sinh dưỡng, cung cấp nguồn tảo cho các hệ thống PSBR lớn hơn. Việc thay mới môi trường dinh dưỡng với tỉ lệ 30% (tương đương 1,5 L) mỗi ngày cho thấy sinh khối có thể đạt tới 76 g.m^{-2} sau 20 ngày nuôi tảo cố định bán liên tục. Tần suất thu hoạch cách nhau 10 ngày và tỉ lệ thu sinh khối tảo 90% mỗi lần thu hoạch cho hiệu quả cao nhất. Tổng lượng sinh khối tảo đang ở giai đoạn sinh dưỡng thu hoạch được là 104 g.m^{-2} .

Từ khóa: astaxanthin; chlorophyll; bán liên tục; *H. Pluvialis*; PSBR; pha xanh

1. Giới thiệu

Vi tảo nước ngọt *Haematococcus pluvialis* hiện đang được nghiên cứu và nuôi cấy ở nhiều quy mô khác nhau để sản xuất astaxanthin (Khoo et al., 2019; Li et al., 2011; Panis & Carreon, 2016). Tế bào tảo *H. pluvialis* có thể tích lũy astaxanthin đạt tới 6% trong khối lượng khô. Đặc biệt, toàn bộ astaxanthin tự nhiên có nguồn gốc từ vi tảo này đều thể hiện hoạt tính sinh học cao, khả năng chống oxy hóa vượt trội và có vai trò trong việc trung hòa các gốc tự do. Hiện nay, vi tảo này được nuôi với nhiều mô hình khác nhau. Cũng như đa số vi tảo khác, *H. pluvialis* cũng được nuôi cấy và thu hoạch theo mẻ (nuôi cấy không liên tục) trong các hệ thống nuôi huyền phù hoặc nuôi cố định (Mantzorou & Ververidis, 2019; Oslan et al., 2021; Wen et al., 2020; Wu et al., 2021). Nuôi cấy bán liên tục (semi-continuous) với sinh khối tảo không được thu hoạch hoàn toàn một lần nên có thể thu được nhiều tảo hơn so với nuôi cấy theo mẻ (Imamoglu et al., 2010). Một số nghiên cứu nuôi cấy bán liên tục đối

Cite this article as: Tran Bao Xuyen, Nguyen Thi Thanh Tuyen, & Do Thanh Tri (2023). Semi-continuous cultivation of the green stage biomass of *Haematococcus pluvialis* in new angled PSBRs. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(12), 2127-2138.

với tảo *H. pluvialis* cũng đã được tiến hành trong các hệ thống huyền phù (Fabregas et al., 2001; Imamoglu et al., 2010). Tuy nhiên, việc nuôi cấy liên tục với vi tảo *H. pluvialis* gặp nhiều trở ngại do đặc điểm chu kỳ sống của chúng. Trong chu kỳ sinh trưởng, tế bào xanh lục (dạng sinh dưỡng) sẽ chuyển sang trạng thái nghỉ (dạng bào tử nang tích lũy nhiều astaxanthin) sau một thời gian nuôi (Lorenz & Cysewski, 2000). Khi chuyển sang pha đỏ, bào tử nang không tăng sinh mà chỉ nảy mầm trở lại dạng sinh dưỡng khi gặp điều kiện thuận lợi. Do đó, các nghiên cứu nhằm tăng sinh khối *H. pluvialis* một cách liên tục chỉ có thể áp dụng đối với tảo dạng sinh dưỡng với thời gian duy trì khoảng 15-31 ngày nên được gọi là bán liên tục (Fabregas et al., 2001; Imamoglu et al., 2010).

Trong kiểu nuôi tảo cố định trong hệ thống phản ứng quang sinh học có chất nền xốp (Porous Substrate Photobioreactor, PSBR), sự đồng sản xuất sinh khối và astaxanthin trong hệ thống biofilm PSBR cho thấy có thể duy trì trong 31 ngày. Tuy nhiên, khi lớp biofilm ngày càng dày thì tốc độ tăng sinh có hiện tượng chậm lại (Kiperstok et al., 2016). Năng suất sinh khối có thể được tăng cao trong các hệ thống PSBR nếu tiến hành nghiên cứu tối ưu việc nuôi cấy theo hướng bán liên tục. Trong đó, lớp biofilm sẽ được thu hoạch dần với một tỉ lệ nhất định, đảm bảo cho phần vi tảo còn lại trong hệ thống tiếp tục tăng sinh khối và được thu hoạch ở lần tiếp theo.

Hiện nay, hệ thống PSBR phương nghiêng đã và đang được phát triển ở Việt Nam cho thấy khả năng đồng sản xuất sinh khối vi tảo *H. pluvialis* và astaxanthin (Do et al., 2021). Gần đây, các khảo sát bước đầu của chúng tôi đã giúp tìm ra được các loại vật liệu mới có thể dùng làm lớp chất nền cho quá trình nuôi vi tảo *H. pluvialis* trong biofilm. Các loại vật liệu mới này rất bền trong môi trường nước và vẫn đảm bảo cung cấp đủ dinh dưỡng cho sinh trưởng của vi tảo, hạn chế tối đa hiện tượng nhiễm trong quá trình nuôi. Thời gian nuôi tảo trên các vật liệu mới này trong hệ thống PSBR có thể tăng lên tới 40 ngày, gấp 4 lần so với vật liệu chất nền là giấy chịu nước (Tran et al., 2022). Đây chính là điều kiện tiên quyết cho mô hình nuôi bán liên tục vi tảo trong các hệ thống PSBR. Ngoài ra, với phương thức nuôi cấy tảo giai đoạn sinh dưỡng hiện tại, việc thu tảo theo mẻ một lần gây tổn kém công chuẩn bị và lượng môi trường dinh dưỡng sử dụng cho mỗi đợt nuôi còn cao. Từ các phân tích trên, nghiên cứu này được thực hiện để xác định tỉ lệ thay mới môi trường khi nuôi *H. pluvialis* giai đoạn sinh dưỡng bán liên tục trong hệ thống PSBR phương nghiêng. Bên cạnh đó, tần suất thu hoạch và tỉ lệ thu sinh khối khô (SKK) trong biofilm vi tảo ở mỗi lần thu cũng được xác định.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi tảo, phương pháp giữ giống và tăng sinh vi tảo

Tảo lục *H. pluvialis* CCAC 0125 (bộ sưu tập tảo của Đại học Cologne, Đức). Tảo giống được duy trì trên môi trường BG11-H, có bổ sung agar 1%. Tảo được nuôi giữ ở điều kiện sau: nhiệt độ 20°C, cường độ ánh sáng trắng thấp khoảng 30 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ từ đèn huỳnh quang (Philips Electronics and Lighting, Inc.), chu kỳ sáng/tối là 14h/10h. Tảo sẽ

được cấy chuyển giữ giống sau mỗi 3-4 tuần. Môi trường BG11-H được sử dụng để nuôi huyền phù, tăng sinh vi tảo trong các bình tam giác 500 mL, 2.000 mL, ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng cao hơn, $60 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.1. Phương pháp cố định vi tảo thành các biofilm

Vi tảo *H. pluvialis* CCAC 0125 sau khi được nuôi tăng sinh sẽ được sử dụng cho nghiên cứu nuôi bán liên tục giai đoạn sinh dưỡng trong hệ thống PSBR. Đây là hệ thống PSBR quy mô $0,05 \text{ m}^2 \times 3$ được thiết lập theo mô tả hệ thống của (Tran et al., 2022). Hệ thống PSBR được khử trùng bằng HClO 1% trước khi sử dụng. Huyền phù tảo cô đặc được quét bằng cọ mềm vô trùng lên trên lớp chất nền để tạo biofilm với mật độ ban đầu là $6,5 \text{ g.SKK.m}^{-2}$ (Do et al., 2021). Dịch tảo cô đặc được thu nhận bằng cách li tâm huyền phù tảo. Thời gian li tâm là 5 phút, tốc độ 4000 vòng/phút bằng máy li tâm lớn ROTANTA 460 RC (Hettich, Germany). Sau khi li tâm, các tế bào tảo dưới đáy ống li tâm được thu lại và chuyển sang ống li tâm 50 mL. Lượng huyền phù tảo cần được li tâm là 2 L để thu được 24 mL tảo cô đặc có mật độ SKK là $0,0165 \text{ g.mL}^{-1}$. Dịch tảo *H. pluvialis* cô đặc sẽ được cố định thành các biofilm hình chữ nhật lớn kích thước $9 \times 36 \text{ cm}$, tương đương diện tích là 324 cm^2 . Song song với các biofilm kích thước lớn, tảo cũng được cố định thành các biofilm hình tròn bán kính 1 cm (diện tích là $3,14 \text{ cm}^2$) để thuận tiện cho việc thu mẫu trong quá trình nuôi nhằm thu số liệu về SKK và hàm lượng các sắc tố.

2.2. Bố trí các thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành trên hệ thống PSBR (Tran et al., 2022) trong nghiên cứu này bao gồm:

a. *Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ thay mới dinh dưỡng lên vi tảo H. pluvialis pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục trong PSBR phương nghiêng*: vi tảo *H. pluvialis* được nuôi kiểu cố định trong hệ thống PSBR. Hệ thống này gồm 4 buồng (chamber) nhỏ, mỗi buồng có diện tích bề mặt nuôi cấy là $0,05 \text{ m}^2 \times 3$. Các nghiệm thức (NT) thí nghiệm đều được bắt đầu nuôi với 5 L môi trường BG11-H. Mỗi buồng sẽ được bố trí một nghiệm thức với 3 lần lặp lại, các yếu tố thí nghiệm sẽ được đảm bảo đồng nhất; buồng 1 (NT1): với lượng môi trường bổ sung và rút ra hằng ngày là 10% thể tích nuôi cấy ban đầu (0,5 L); buồng 2 (NT2): 20% thể tích nuôi cấy ban đầu (1 L); buồng 3 (NT3): 30% thể tích nuôi cấy ban đầu (1,5 L); buồng 4 (NT4): 40% thể tích nuôi cấy ban đầu (2 L). Thời gian nuôi cấy bán liên tục là 20 ngày với điều kiện nuôi: nhiệt độ từ $23 \pm 3^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng $80 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ từ hệ thống đèn LED trắng, chu kỳ sáng/tối là 14/10 giờ, bổ sung CO_2 $3,6 \text{ mg.phút}^{-1}$ (Do et al., 2021). Thí nghiệm này theo dõi kết quả tăng SKK (g.m^{-2}) và năng suất trung bình hằng ngày SKK ($\text{g.m}^{-2}.\text{ngày}^{-1}$).



Hình 1. Vị trí 4 chamber trong hệ thống PSBR

b. *Thí nghiệm xác định tần suất thu hoạch sinh khối tảo H. pluvialis pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục trong PSBR:* Trong thí nghiệm này, tảo được thu hoạch 90% SKK trong các biofilm, thời gian thu hoạch SKK (g.m^{-2}) cách nhau 5 ngày hoặc 10 ngày nuôi và số lần lặp lại thí nghiệm là 3 ($n=3$). Nói cách khác, tổng số lần thu hoạch trong 20 ngày nuôi bán liên tục là 4 lần hoặc 2 lần. Chỉ tiêu so sánh giữa các nghiệm thức là tổng lượng SKK thu được sau các lần thu hoạch.

c. *Thí nghiệm xác định tỉ lệ thu hoạch trong mỗi lần thu sinh khối tảo H. pluvialis pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục trong PSBR:* Tảo được thu hoạch với 2 tỉ lệ là 75% hoặc 90% tổng SKK (g.m^{-2}) trong biofilm ở thời điểm thu hoạch vào ngày thứ 10 và ngày thứ 20. Tảo được thu hoạch bằng cách dùng thước nhựa mềm để cạo, thu lớp biofilm. Phần sinh khối tảo còn lại được tiếp tục nuôi tăng sinh cho lần thu hoạch tiếp theo. Chỉ tiêu so sánh giữa các nghiệm thức là tổng lượng SKK thu được sau các lần thu hoạch.

2.3. Phương pháp xác định SKK, hàm lượng các sắc tố và hình thái của vi tảo trong biofilm

a. *Phương pháp xác định SKK vi tảo:* Vào các thời điểm thu hoạch (ngày 5 hoặc ngày 10 hoặc ngày 15 hoặc ngày 20), tảo tươi trong các biofilm được cạo bằng thước nhựa mềm để thu sinh khối và sấy ở nhiệt độ 80°C . Thu lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức trong mỗi lần thu mẫu.

b. *Phương pháp xác định tỉ lệ carotenoid/chlorophyll trong vi tảo:* Để xác định tỉ lệ carotenoid/chlorophyll, một mg vi tảo đã được sấy khô cho vào trong ống li tâm 2 mL, thêm 0,5 mL acetone 90%, nghiền kỹ bằng bi thép không gỉ đường kính 0,5 cm lắc mạnh liên tục trong 3 giờ trong tối để các tế bào vỡ hết (khi kiểm tra dưới kính hiển vi) giải phóng sắc tố; thêm 1 mL acetone 90% rồi đem li tâm $800 \times g$ trong 30 giây, thu phần dịch nổi; tiếp tục thêm 0,5 mL acetone 90% và lặp lại quy trình cho đến khi phần dịch thu được là không màu; thêm acetone 90% để thu được thể tích sau cùng là 2,0 mL (bù lại lượng acetone bay hơi trong quá trình thao tác) trong ống li tâm đầy nắp kín. Quy trình được thực hiện trong tối hoặc ánh sáng khuếch tán yếu để tránh sự phân giải sắc tố. Mẫu được đo OD ở các bước sóng 665, 645, 630, 480 nm, lượng sắc tố (mg.L^{-1}) được xác định theo phương trình:

$Chlorophyll = Chl\ a + Chl\ b = (11,6\ Abs_{665} - 1,31\ Abs_{645} - 0,14\ Abs_{630}) + (20,7\ Abs_{645} - 4,34\ Abs_{665} - 4,42\ Abs_{630})$; $Carotenoid = 4,0\ Abs_{480}$.

c. *Phương pháp xác định hình thái vi tảo*: mẫu vi tảo trong biofilm được lấy và huyền phù trong dung dịch đẳng trương, cố định trong dung dịch chứa 2% formaldehyde để đưa lên tiêu bản tạm thời. Kính hiển vi quang học KRUSS (Đức) được sử dụng để quan sát hình thái và chụp hình tế bào tảo ở vật kính $\times 40$.

2.4. *Phương pháp xử lý số liệu và vẽ biểu đồ, đồ thị*

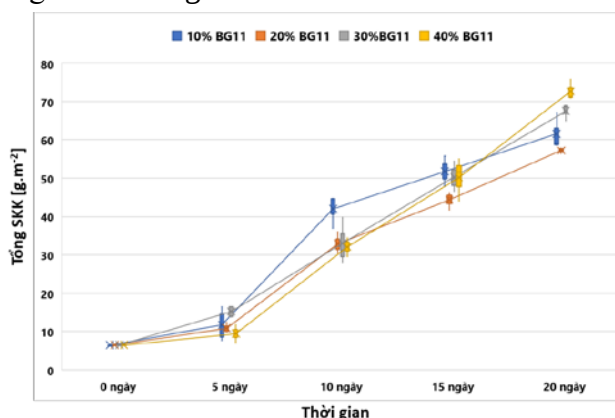
Các số liệu trong quá trình thí nghiệm được thu thập và nhập liệu vào phần mềm Microsoft Excel 365 để xử lý sơ bộ và vẽ biểu đồ, đồ thị. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R phiên bản 4.1.3. Phân tích Tukey's HSD được sử dụng để xác định sự sai khác giữa các nghiệm thức.

3. *Kết quả và thảo luận*

3.1. *Ảnh hưởng của tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng lên vi tảo H. pluvialis pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục bằng hệ thống PSBR*

a. *Ảnh hưởng của tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng lên sự tăng sinh khối*

Kết quả tăng SKK pha sinh dưỡng của vi tảo *H. pluvialis* trong 20 ngày được thể hiện trong Hình 2. Ở cả 4 nghiệm thức bổ sung môi trường BG 11-H từ 10-40%, sinh khối tảo đều tăng chậm trong 5 ngày đầu. Đây chính là giai đoạn tiềm phát, các tế bào tảo trong biofilm thích nghi với điều kiện môi trường nuôi cố định trong PSBR phương nghiêng. Sau giai đoạn thích nghi, sinh khối tảo tăng nhanh từ ngày 5 đến ngày 20 ở tất cả các nghiệm thức bổ sung môi trường dinh dưỡng.

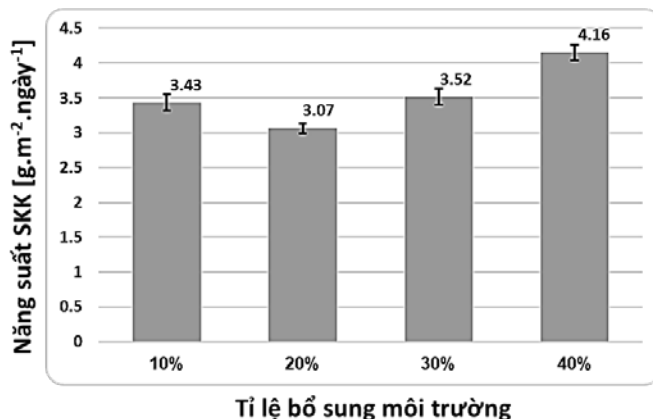


Hình 2. SKK của tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng khi được nuôi cố định bán liên tục trong PSBR phương nghiêng ở các chế độ bổ sung môi trường dinh dưỡng khác nhau

Ở ngày thứ 20, tổng SKK đạt được cao nhất ở 2 nghiệm thức bổ sung 30% và 40% môi trường, đạt lần lượt là 67,5 và 72,6 g.m⁻² và sự sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa 2 nghiệm thức này ($p > 0,05$, $n = 3$). Sự bổ sung môi trường dinh dưỡng ở mức 10% và 20%, cho kết quả tổng SKK thấp hơn, đạt lần lượt là 61,6 và 57,2 g.m⁻².

Năng suất SKK trung bình của vi tảo được tính cho giai đoạn sinh khối tảo tăng tuyến tính từ ngày 5 đến ngày 20 (Hình 3). Kết quả cho thấy tốc độ tăng sinh đạt cao nhất là

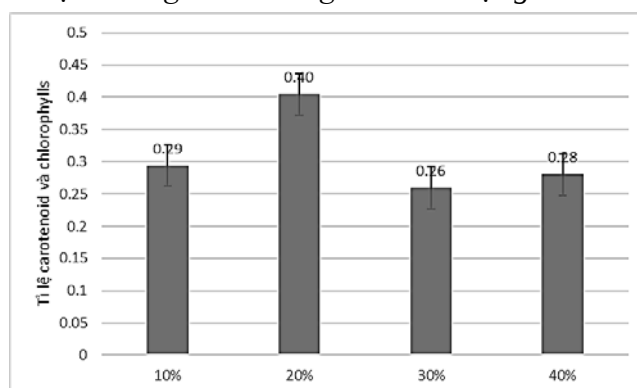
4,16g.m⁻².ngày⁻¹ ở nghiệm thức bổ sung 40% môi trường mỗi ngày, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với các nghiệm thức còn lại ($p<0,05$, $n=3$). Trong khi đó, năng suất này không có sự khác biệt đáng kể ở các nghiệm thức bổ sung BG 11-H từ 10 – 30% ($p<0,05$, $n=3$).



Hình 3. Năng suất SKK của tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng được nuôi cố định bán liên tục trong PSBR phương nghiêng ở các tỉ lệ bổ sung môi trường dinh dưỡng khác nhau

Trong giai đoạn 5 ngày đầu, khi chiều dày lớp biofilm vi tảo còn thấp thì tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng không ảnh hưởng đến sự tăng sinh của vi tảo vì lúc này lượng dinh dưỡng cung cấp cho vi tảo còn dư thừa. Tuy nhiên, vào cuối quá trình nuôi, việc bổ sung dinh dưỡng ở mức cao 30-40% giúp đảm bảo việc cung cấp đầy đủ cho sự tăng sinh của vi tảo ở giai đoạn sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục.

b. Ảnh hưởng của tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng lên hàm lượng các sắc tố vi tảo H. pluvialis

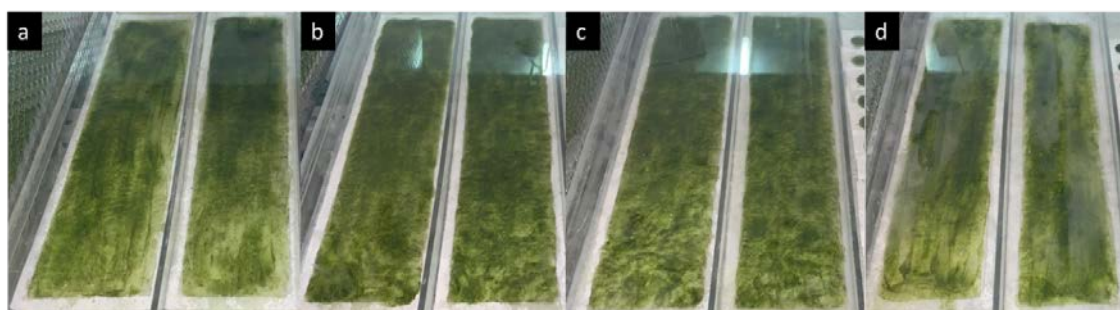


Hình 4. Tỉ lệ carotenoid/chlorophyll trong SKK tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng được nuôi bán liên tục trong PSBR phương nghiêng ở các tỉ lệ bổ sung môi trường khác nhau

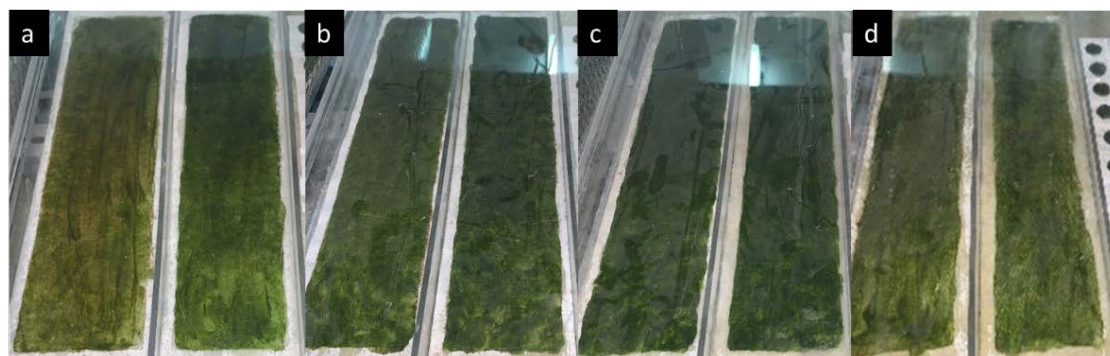
Tỉ lệ carotenoid/chlorophyll và hình thái tế bào được sử dụng để xác định tế bào tảo *H. pluvialis* có đang ở giai đoạn sinh dưỡng hay không. Tỉ lệ này trong SKK vi tảo được thể hiện ở Hình 4. Theo đó, tỉ lệ carotenoid/chlorophyll có giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung môi trường 20% mỗi ngày, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 3 nghiệm thức còn lại ($p<0,05$, $n=3$). Tuy nhiên, giá trị này không vượt quá giá trị 0,45 trong mọi trường hợp. Tế bào *H. pluvialis* được xem là đang ở giai đoạn sinh dưỡng khi hàm lượng carotenoid/chlorophyll nhỏ hơn 1 (Kobayashi et al., 1997; Shah et al., 2016).

*c. Ảnh hưởng của tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng lên hình thái tế bào tảo *H. pluvialis* trong biofilm*

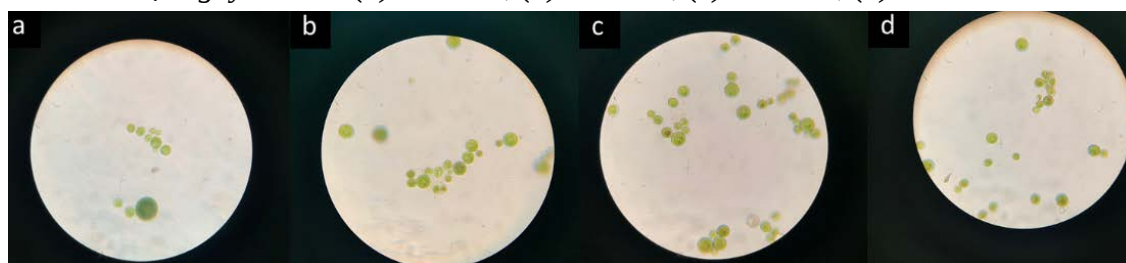
Sau 5 ngày nuôi trong hệ thống PSBR phương nghiêng, chiều dày và màu sắc biofilm vi tảo *H. pluvialis* không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức bổ sung môi trường với tỉ lệ khác nhau (Hình 5). Điều này phù hợp với kết quả xác định tổng SKK vi tảo tại thời điểm này. Vào ngày thứ 20, chiều dày lớp biofilm tăng đáng kể và có thể nhận thấy bằng mắt thường, đặc biệt ở 2 nghiệm thức thay môi trường với tỉ lệ 30% và 40% (Hình 6c và 6d). Trong khi đó, ở nghiệm thức thay môi trường tỉ lệ 10%, bề mặt biofilm vi tảo có hiện tượng chuyển đỏ (Hình 6a). Điều đó cho thấy tỉ lệ thay đổi môi trường thấp gây ra sự thiếu hụt dinh dưỡng cần cho sinh trưởng của vi tảo ở pha sinh dưỡng. Sự thiếu hụt dinh dưỡng làm cho các tế bào vi tảo trên bề mặt bắt đầu chuyển sang pha tích lũy astaxanthin và có màu đỏ (Kiperstok et al., 2016; Zhang et al., 2014).



Hình 5. Bề mặt biofilm vi tảo *H. pluvialis* khi nuôi trong hệ thống PSBR quy mô 0,05m² tại ngày thứ 5: (a) NT 10%, (b) NT 20%, (c) NT 30%, (d) NT 40%



Hình 6. Bề mặt biofilm vi tảo *H. pluvialis* khi nuôi trong hệ thống PSBR tại ngày thứ 20: (a) NT 10%, (b) NT 20%, (c) NT 30%, (d) NT 40%

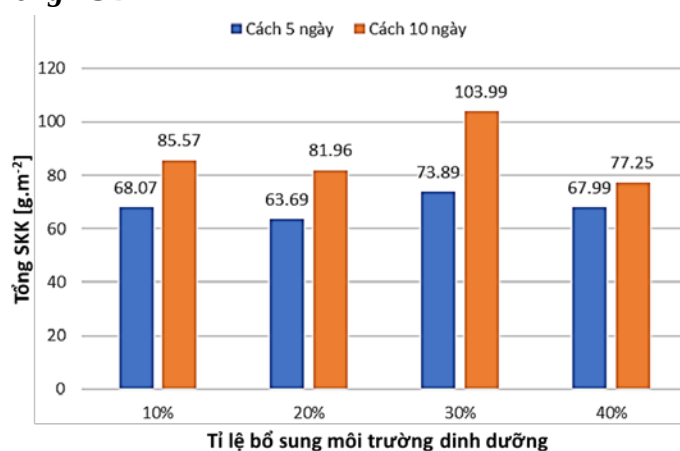


Hình 7. Hình thái vi tảo *H. pluvialis* khi nuôi ở các nghiệm thức với tỉ lệ bổ sung môi trường khác nhau: (a) NT 10%, (b) NT 20%, (c) NT 30%, (d) NT 40%

Kết quả kiểm tra hình thái vi tảo *H. pluvialis* cho thấy các tế bào đều ở trạng thái pha xanh, giai đoạn palmella không có roi trong chu kỳ phát triển của tảo (Hình 7). Điều này phù hợp với kết quả xác định hàm lượng sắc tố trong SKK của vi tảo.

Như vậy, với mục tiêu thu sinh khối tảo vẫn ở giai đoạn sinh dưỡng để chuẩn bị cho việc nuôi cấy tiếp theo trong các hệ thống PSBR quy mô lớn, tỉ lệ thay mới môi trường 30-40% là phù hợp. Các tỉ lệ thay mới này đảm bảo cung cấp đủ dinh dưỡng cho sự sinh trưởng vi tảo nhưng vẫn duy trì tế bào ở trạng thái palmella không có roi, đây là trạng thái mà tế bào có thể nhanh chóng chuyển sang giai đoạn tích lũy astaxanthin khi nuôi tiếp ở cường độ ánh sáng cao trong hệ thống PSBR quy mô lớn (Oslan et al., 2021).

3.1. Kết quả xác định tần suất thu hoạch sinh khối tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục trong PSBR



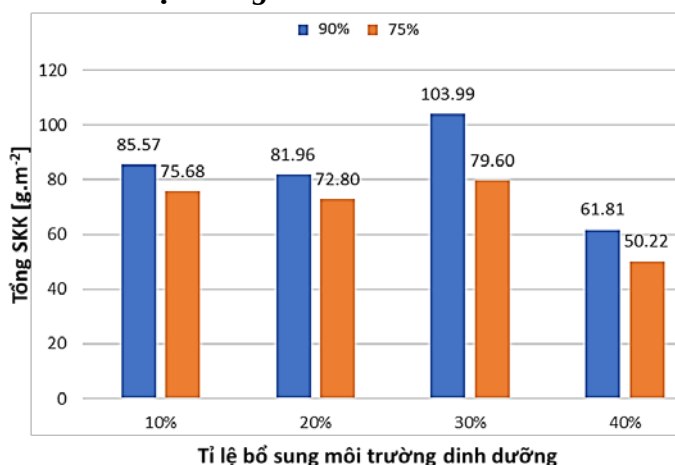
Hình 8. Tổng SKK tảo *H. pluvialis* thu được khi nuôi bán liên tục trong PSBR phương nghiêng với tần suất thu hoạch 5 ngày một lần và 10 ngày một lần

Sự khác nhau về tổng SKK thu hoạch được với tần suất thu cách nhau 5 ngày và 10 ngày được thể hiện trong Hình 8. Nhìn chung, sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi so sánh tổng lượng tảo thu được ở 2 tần suất thu hoạch tảo ở tất cả các trường hợp tỉ lệ bổ sung môi trường dinh dưỡng ($p < 0,05$, $n = 3$). Việc thu hoạch tảo với tần suất 10 ngày thu một lần cho kết quả tổng SKK cao hơn từ 10 đến 30 g.m⁻² so với thu cách 5 ngày một lần. Trong đó, với tỉ lệ thay môi trường 30% mỗi ngày cho kết quả tổng SKK thu được cao nhất, đạt mức 104 g.m⁻² với 2 lần thu ở ngày thứ 10 và ngày thứ 20.

Kết quả trên ngược với kết quả nghiên cứu trong mô hình dự đoán của Li và cộng sự (2019), lượng sinh khối tảo tăng tỉ lệ thuận với tần suất thu hoạch vi tảo, nghĩa là số lần thu hoạch nhiều hơn trong cùng một chu kỳ nuôi tảo. Tuy nhiên, trong mô hình này, loài vi tảo được sử dụng trong mô hình là tảo *Halochlorella rubescens* (Li et al., 2019). Còn đối với tảo *H. pluvialis*, việc thu hoạch thường xuyên, cách mỗi 5 ngày, làm cho lớp biofilm mỏng hơn nên nhiều tế bào bị tiếp xúc thường xuyên với ánh sáng nên bị chuyển pha và làm giảm khả năng sinh trưởng. Trong khi đó, khi khoảng thời gian thu hoạch cách nhau 10 ngày, lớp biofilm được duy trì dày hơn. Điều này tạo điều kiện cho nhiều tế bào bên dưới bề mặt

biofilm tiếp tục duy trì pha sinh dưỡng và tăng sinh (Kiperstok et al., 2017). Nếu mục tiêu là thu astaxanthin thì việc tăng tần suất thu hoạch tảo sẽ giúp tăng năng suất astaxanthin đáng kể (Li et al., 2019). Tuy nhiên, nếu mục tiêu là thu hoạch tảo giai đoạn sinh dưỡng để cung cấp tảo giống cho nuôi ở quy mô lớn hơn thì tần suất thu hoạch tảo *H. pluvialis* cần được kéo dài hơn.

3.2. Kết quả xác định tỉ lệ thu hoạch trong mỗi lần thu sinh khối tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng khi nuôi bán liên tục trong PSBR



Hình 9. Tổng SKK tảo *H. pluvialis* thu được khi nuôi bán liên tục trong PSBR phương nghiêng với tỉ lệ thu 75% và 90% mỗi lần thu hoạch tảo

Theo kết quả thu được thể hiện ở Hình 9, tổng SKK tảo khi thu với tỉ lệ 90% đạt cao hơn so với nghiệm thức chỉ thu hoạch với tỉ lệ 75% vào hai thời điểm ngày 10 và ngày 20. Việc thu hoạch tảo với tỉ lệ 90% cho kết quả tổng SKK cao hơn từ 11 đến 24 g.m⁻² so với chỉ thu hoạch với tỉ lệ 75%. Trong đó, với tỉ lệ thay môi trường 30%, tổng SKK đạt cao nhất 2 lần thu vào ngày thứ 10 và ngày thứ 20, với mỗi lần thu hoạch 90% SKK.

Như vậy, từ các phân tích sự thay đổi lượng SKK và tỉ lệ chlorophylls thu được có thể thấy việc bổ sung môi trường dinh dưỡng BG11-H với tỉ lệ 30% làm vi tảo *H. pluvialis* pha xanh lục sinh trưởng tốt nhất trong hệ thống PSBR quy mô nhỏ.

Trong môi trường nuôi cấy huyền phù của *H. pluvialis*, ánh sáng trắng cường độ thấp thường được sử dụng để phát triển tảo ở pha sinh dưỡng xanh lục. Tuy nhiên, năng suất sinh khối xanh trong môi trường nuôi cấy huyền phù vẫn thấp sau thời gian canh tác kéo dài và giảm khi tăng thể tích nuôi cấy do hiệu ứng che bóng (Li et al., 2020; Zhang et al., 2009). Điều đó giải thích cho năng suất sinh khối tảo xanh chỉ đạt 2,2-2,9 g.m⁻².ngày⁻¹ đối với các hệ thống nuôi huyền phù có thể tích 3 L trở lên (Li et al., 2020; Zhang et al., 2009). Khi so với cùng kiểu nuôi cố định trong biofilm, sinh khối tảo *H. pluvialis* pha sinh dưỡng trong hệ thống phương nghiêng đạt mức 2,3-6,6 g.m⁻².ngày⁻¹ tùy cường độ ánh sáng liên tục từ 20-100 μmol photon m⁻².s⁻¹ với thời gian nuôi 7-10 ngày (Kiperstok et al., 2016; Zhang et al., 2014). Tuy nhiên, vi tảo chỉ được thu hoạch tảo một lần theo kiểu nuôi theo mẻ nên tổng

lượng sinh khối thu hoạch được thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu này ở nghiệm thức thay mới môi trường với tỉ lệ 30%.

Trong cùng hệ thống PSBR phương nghiêng, nghiên cứu trước đây của chúng tôi với 1 lần thu hoạch cho kết quả tổng SKK sau 10 ngày nuôi là $71,9 \text{ g.m}^{-2}$ (Do et al., 2021). Như vậy, với việc nuôi bán liên tục, thời gian nuôi kéo dài 20 ngày, tổng số lần thu hoạch cho mỗi lần khởi động và vận hành toàn bộ hệ thống nuôi PSBR là 2 lần. Tổng SKK thu được đạt mức 104 g.m^{-2} , tăng thêm 45% so với trước đây. Ngoài ra, với tỉ lệ thay mới môi trường là 30% (1,5 L/ngày) thì tổng lượng môi trường sử dụng là 32 L sau 20 ngày nuôi, tiết kiệm hơn đáng kể so với mức 40 L cho chu kì nuôi chỉ 10 ngày (Do et al., 2021). Các tế bào tảo thu được ở cả 2 lần thu vẫn duy trì ở trạng thái sinh dưỡng đảm bảo cho khả năng tăng sinh tiếp tục trong hệ thống PSBR phương nghiêng quy mô thí điểm.

4. Kết luận

Tỉ lệ bổ sung và thay mới môi trường BG11-H 30% thể tích môi trường nuôi cấy ban đầu trong hệ thống PSBR phương nghiêng (tương đương 1,5 L trong 5 L) làm cho vi tảo *H. pluvialis* tăng sinh và duy trì ở giai đoạn pha sinh dưỡng. Sinh khối tảo xanh nên được thu vào ngày 10 và ngày 20 với lượng thu tối đa (90%) ở mỗi lần thu tảo để đạt tổng sinh khối cao nhất. Nhằm tiết kiệm tối đa chi phí nuôi vi tảo, tỉ lệ bổ sung dinh dưỡng mỗi ngày ở mức 30% là đủ để thu được hiệu quả nuôi cấy *H. pluvialis* pha xanh lục bán liên tục cao nhất trong PSBR.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Do, T.-T., Ong, B.-N., Le, T.-L., Nguyen, T.-C., Tran-Thi, B.-H., Bui, T. T. H., Melkonian, M., & Tran, H.-D. (2021). Growth of *Haematococcus pluvialis* on a Small-Scale Angled Porous Substrate Photobioreactor for Green Stage Biomass. *Applied Sciences*, 11(4), Article 1788. <https://doi.org/10.3390/app11041788>
- Do, T.-T., Tran-Thi, B.-H., Ong, B.-N., Le, T.-L., Nguyen, T.-C., Quan, Q.-D., Le, T.-C., Tran, D.-L., Melkonian, M., & Tran, H.-D. (2021). Effects of red and blue light emitting diodes on biomass and astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* in pilot scale angled twin-layer porous substrate photobioreactors. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 63(2), 81-88. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.63\(2\).81-88.81-88](https://doi.org/10.31276/VJSTE.63(2).81-88.81-88)
- Fabregas, J., Otero, A., Maseda, A., & Dominguez, A. (2001). Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol*, 89(1), 65-71. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00289-9)
- Imamoglu, E., Dalay, M. C., & Sukan, F. V. (2010). Semi-continuous cultivation of *Haematococcus pluvialis* for commercial production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), 764-772. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8627-7>

- Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 288, Article 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
- Kiperstok, A. C., Melkonian, M., & Becker, B. (2016). Optimizing immobilized cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production [Ph.D. Thesis, Universität zu Köln]. <http://kups.ub.uni-koeln.de/id/eprint/6728>
- Kiperstok, A. C., Sebestyén, P., Podola, B., & Melkonian, M. (2017). Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. *Algal Research*, 21, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.025>
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94-97. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82794-8)
- Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., Wang, C., Zheng, X., Chen, D., & Yang, S. (2020). Enhanced Biomass and Astaxanthin Production of *Haematococcus pluvialis* by a Cell Transformation Strategy with Optimized Initial Biomass Density. *Marine Drugs*, 18(7), Article 341. <https://doi.org/10.3390/md18070341>
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 29(6), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>
- Li, T., Podola, B., Schultze, L. K. P., & Melkonian, M. (2019). Design scenario analysis for porous substrate photobioreactor assemblies. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1623-1636. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1700-2>
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160-167. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5)
- Mantzorou, A., & Ververidis, F. (2019). Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment*, 651, 3187-3201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>
- Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Abdul Rahim, A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. B., Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), Article 256. <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
- Panis, G., & Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18, 175-190. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>
- Shah, M. M., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci*, 7, Article 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Tran, H. D., Ong, B. N., Ngo, V. T., Tran, D. L., Nguyen, T. C.,... Melkonian, M. (2022). New

- Angled Twin-Layer Porous Substrate Photobioreactors for Cultivation of *Nannochloropsis oculata*. *Protist*, Article 125914. <https://doi.org/10.1016/J.PROTIS.2022.125914>
- Wen, X., Wang, Z., Ding, Y., Geng, Y., & Li, Y. (2020). Enhancing the production of astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds. *Aquaculture International*, 28(2), 625-638. <https://doi.org/10.1007/S10499-019-00483-2/TABLES/3>
- Wu, K., Ying, K., Zhou, J., Hanotu, J., Zhu, X., & Cai, Z. (2021). Optimizing the growth of *Haematococcus pluvialis* based on a novel microbubble-driven photobioreactor. *Iscience*, 24, Article 103461. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103461>
- Zhang, B. Y., Geng, Y. H., Li, Z. K., Hu, H. J., & Li, Y. G. (2009). Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 295(3), 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.043>
- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., & Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresour Technol*, 158, 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.044>

SEMI-CONTINUOUS CULTIVATION OF THE GREEN STAGE BIOMASS OF *Haematococcus pluvialis* IN NEW ANGLED PSBRs

Tran Bao Xuyen, Nguyen Thi Thanh Tuyen, Do Thanh Tri*

Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

*Corresponding author: Do Thanh Tri – Email: tridt@hcmue.edu.vn

Received: May 05, 2023; Revised: September 05, 2023; Accepted: September 07, 2023

ABSTRACT

Besides suspension cultivation, immobilized cultivation in small-scale angled PSBRs has been developed recently to proliferate the green stage biomass of *Haematococcus pluvialis* for large-scale PSBRs. In this study, *H. pluvialis* biofilms were cultured semi-continuously in PSBRs to increase the biomass of the vegetative stage. Renewal of the nutrient medium at a ratio of 30% (equivalent to 1.5 L) per day resulted in an increase in algal biomass of 76 g.m⁻² after 20 days of semi-continuous cultivation. The harvesting interval of 10 days apart and the algae biomass collection ratio of 90% achieved the highest efficiency. The total harvested biomass of algae at the vegetative stage was 104 g.m⁻² after 20 days of semi-continuous immobilized cultivation.

Keywords: astaxanthin; chlorophyll; green stage; *H. pluvialis*; PSBR; semi-continuous