



KHẢO SÁT PHƯƠNG PHÁP THU HỒI SINH KHỐI VI KHUẨN LAM *PLANKTOTHRIX SPIROIDES* WANG & LI 2013 VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP IAA

Nguyễn Thị Thu Liên^{1*}, Lương Quang Đốc¹, Phan Thị Thúy Hằng¹, Dương Thị Thủy²,
Hoàng Thị Quỳnh², Nguyễn Thị Ánh Nguyệt², Đặng Thị Mai Anh², Vũ Thị Nguyệt²

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

² Viện Khoa học Công nghệ Năng lượng và Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Thu Liên <nthuliencnsh@gmail.com>

(Ngày nhận bài: 4-9-2024; Ngày chấp nhận đăng: 10-12-2024)

Tóm tắt. Nghiên cứu này khảo sát các phương pháp thu hồi sinh khối chủng vi khuẩn lam *Planktothrix spiroides* (PHO), một nguồn tiềm năng cho sản xuất phân bón sinh học nhờ khả năng sinh tổng hợp IAA. Các phương pháp kết bông khác nhau đã được thử nghiệm, bao gồm thay đổi pH, sử dụng FeCl₃ và chitosan. Kết quả cho thấy pH = 8 là điều kiện lý tưởng để kết bông sinh khối PHO (hiệu suất đạt 83% sau 1 giờ). Sử dụng FeCl₃ ở nồng độ 200 mg/L đạt hiệu suất thu hồi sinh khối 95% chỉ sau 15 phút. Phương pháp sử dụng chitosan một chất kết bông tự nhiên, thân thiện với môi trường - mang lại hiệu quả cao, 93,33% sinh khối được thu hồi chỉ sau 10 phút ở tốc độ khuấy 40 rpm với nồng độ chitosan 25 mg/L. Phương pháp sử dụng chitosan không chỉ đảm bảo hiệu suất kết bông cao mà không làm thất thoát quá nhiều hàm lượng IAA trong dịch nuôi cũng như trong sinh khối PHO. Tỷ lệ hao hụt ước tính vào khoảng dưới 1% trong dịch nuôi và 6% trong sinh khối.

Từ khoá: chitosan, *Planktothrix spiroides*, kết bông sinh khối, thu hồi sinh khối

Investigation of Cyanobacterium *Planktothrix spiroides* (Wang & Li 2013) Biomass Recovery Method and Evaluation of IAA Biosynthesis Ability

Nguyen Thi Thu Lien^{1,*}, Luong Quang Doc¹, Phan Thi Thuy Hang¹, Duong Thi Thuy²,
Hoàng Thi Quynh², Nguyen Thi Anh Nguyet², Dang Thi Mai Anh², Vu Thi Nguyet²

¹ University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

² Institute of Energy Science and Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and
Technology, 18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay, Hanoi, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Thu Lien <nthuliencnsh@gmail.com>

(Submitted: September 4, 2024; Accepted: December 10, 2024)

Abstract. This study investigates methods for recovering the cyanobacterium *Planktothrix spiroides* (PHO) biomass, a potential source for biofertilizer production due to its ability to biosynthesize IAA. Various flocculation methods were tested, including pH adjustment and the use of FeCl₃ and chitosan. The results indicate that pH 8 is the optimal condition for flocculating PHO biomass, achieving an efficiency of 83% after 1 hour. Using FeCl₃ at a concentration of 200 mg/L resulted in a 95% biomass recovery within 15 minutes. The use of chitosan—a natural and environmentally friendly flocculant—also yielded high efficiency, with 93.33% of biomass recovered after 10 minutes at a stirring speed of 40 rpm and a chitosan concentration of 25 mg/L. The chitosan-based method not only ensures high flocculation efficiency but also minimizes the loss of IAA content in the culture medium as well as in the PHO biomass. The loss rate is estimated to be less than 1% in the culture medium and 6% in the biomass.

Keywords: chitosan, *Planktothrix spiroides*, biomass flocculation, biomass recovery

1 Đặt vấn đề

Vi tảo nói chung và vi khuẩn lam (VKL) nói riêng đang nổi lên như một nguồn tài nguyên quý giá với nhiều ứng dụng tiềm năng, đặc biệt là trong sản xuất phân bón sinh học [1]. Tuy nhiên, do kích thước quá nhỏ, việc thu hồi sinh khối nhóm sinh vật này gặp nhiều thách thức, đòi hỏi phải có các phương pháp hiệu quả, chi phí thấp và phù hợp cho sản xuất quy mô lớn. Hiện nay, các phương pháp thu hồi sinh khối như ly tâm, lọc qua lưới và lắng đang được áp dụng, nhưng các phương pháp này thường đòi hỏi chi phí cao do yêu cầu về thiết bị chuyên dụng, hoặc hiệu suất thấp. Để cải thiện hiệu quả lắng, việc sử dụng các chất kết bông đã được đề xuất, bao gồm các loại muối vô cơ khác nhau như Al₂(SO₄)₃, AlCl₃, Fe₂(SO₄)₃, FeCl₃, ... và các polymer tự nhiên như chitosan [2, 3]. Trong quá trình này, các tế bào vi tảo sẽ tương tác với các ion mang điện tích dương dẫn đến hiện tượng kết cụm, giúp chúng nặng hơn và dễ dàng lắng xuống đáy. Việc lựa chọn chất kết bông là rất quan trọng vì nó ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình lắng và chất lượng của sản phẩm sau thu hoạch. Chất kết bông dạng polymer tự nhiên được ưa chuộng hơn so với chất keo tụ tổng hợp [4] Trong đó, chitosan và các dẫn xuất của nó đã trở thành những chất kết bông tiềm năng trong các ứng dụng đòi hỏi sự an toàn và bền vững nhờ những ưu điểm

vượt trội như tính sẵn có, thân thiện với môi trường, không độc hại, khả năng phân hủy sinh học và tương thích sinh học [5]. Chitosan có khả năng keo tụ tốt, nhờ vào mật độ điện tích cation cao và chuỗi polymer dài, giúp hình thành kết tủa trong điều kiện trung tính và kiềm [6, 7].

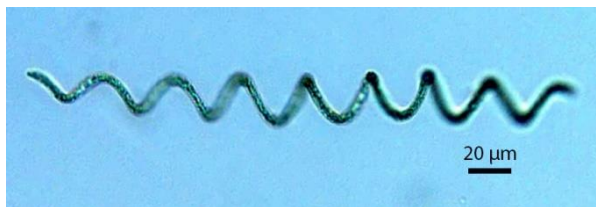
Trước bối cảnh nhu cầu lương thực toàn cầu ngày càng tăng và những tác động tiêu cực của phân bón hóa học đối với môi trường, việc phát triển chất kích thích sinh học và phân bón sinh học đang được xem là giải pháp tiềm năng cho nông nghiệp bền vững. Các chất kích thích sinh học khi được sử dụng ở liều thấp trong sản xuất nông nghiệp (đối với hạt giống, cây trồng hoặc đất) sẽ có khả năng điều chỉnh và tăng cường các quá trình sinh lý của cây trồng. Các chất kích thích sinh học tác động đến sinh lý của thực vật thông qua các con đường khác nhau, cải thiện sự tăng trưởng, năng suất, chất lượng, sự hấp thu chất dinh dưỡng, và khả năng chịu đựng các yếu tố bất lợi. Phân sinh học chứa vi sinh vật sống hoặc các chất tự nhiên có khả năng cải thiện tính chất hóa học và sinh học của đất, kích thích sự phát triển của cây và phục hồi độ phì nhiêu của đất. Hiện nay, sử dụng các chất kích thích sinh học và phân bón sinh học trong sản xuất nông nghiệp và đặc biệt là nông nghiệp hữu cơ rất được chú ý, quan tâm [8, 9].

Việc sử dụng VKL làm nguồn phân bón sinh học đã được sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới nhằm giải quyết các vấn đề môi trường phát sinh từ lạm dụng các hoá chất trong sản xuất nông nghiệp [10]... Nhiều loài VKL có khả năng sinh tổng hợp các hormone tăng trưởng thực vật như gibberellins, cytokinin, auxin hoặc acid abscisic có thể kể tên như *Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Calothrix*, *Plectonema*, *Gloeotheca*, *Anabaena*, *Cylindrospermu*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lymnothrix*, *Pseudoanabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Synechocystis*... [11, 12]. Gần đây, hai chủng VKL phân lập từ các thủy vực nước ngọt Thừa Thiên Huế, *Arthrospira* sp. (ARH) (nay định danh thành *Planktothrix spiroides*) và *Oscillatoria* sp. (OSK), được xác định có khả năng tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA), một phytohormone quan trọng thúc đẩy sự phát triển của thực vật, cho thấy tiềm năng trong sản xuất phân bón sinh học [13]. Nghiên cứu này tập trung vào việc khảo sát sử dụng các điều kiện khác nhau để thu hồi sinh khối VKL *Planktothrix spiroides*, được phân lập từ thủy vực nước ngọt ở tỉnh Thừa Thiên Huế, nhằm xác định các điều kiện thu hồi hiệu quả sinh khối VKL này cho mục đích đánh giá khả năng sinh IAA, góp phần vào phát triển phân bón sinh học.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Chủng VKL *Planktothrix spiroides* Wang & Li 2013 (ký hiệu PHO; Hình 1) được phân lập từ thủy vực nước ngọt ở tỉnh Thừa Thiên Huế và hiện đang lưu giữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ hóa sinh môi trường, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng khoa học công nghệ, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.



Hình 1. Hình thái chủng VKL *Planktothrix spirooides* (PHO) được phân lập từ thủy vực nước ngọt ở Thừa Thiên Huế

2.2 Phương pháp

Nuôi cấy vi khuẩn lam

VKL được nhân sinh khối trong môi trường Z8 [14] lỏng có bổ sung L-tryptophan (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) với pH = 6,5-7,0, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng từ 1500-2500 Lux, chu kỳ chiếu sáng là 12 giờ sáng:12 giờ tối. Nhiệt độ được điều chỉnh bằng máy điều hòa nhiệt độ từ 25-30 °C. Sinh trưởng của VKL và sự sạch tảo được kiểm tra hàng tuần bằng phương pháp đếm mật độ tế bào sử dụng buồng đếm Sedgewick- Rafter [15] và kiểm tra sự nhiễm các tế bào tảo lạ bằng quan sát dưới kính hiển vi quang học. VKL được nuôi trong bình 500 mL (giống) - 5000 mL (sinh khối) với thể tích nuôi 250 mL-2500 mL. Sinh khối đạt mật độ 10^5 - 10^6 tế bào/mL được sử dụng để tiến hành thí nghiệm thu hồi sinh khối.

Bố trí thí nghiệm khảo sát các điều kiện thu hồi sinh khối vi khuẩn lam

Thu hồi bằng lắng tự nhiên

Sinh khối VKL trong các bình nhựa dung tích 5000 mL được thu hồi bằng cách để lắng. Tiến hành lấy mẫu tảo ở phần nước bên trên (cách mặt nước 5 cm) để xác định hiệu suất lắng. Sau khi xác định thời gian lắng đạt hiệu suất thích hợp, gạn nước trong và tiến hành lọc tế bào tảo qua lưới lọc với kích thước mắt lưới < 10 μm .

Kết bông bằng thay đổi pH

Đánh giá ảnh hưởng của pH đến sự kết bông khi điều chỉnh pH bằng cách sử dụng HCl 0,5 N hoặc NaOH 0,5 N. Ảnh hưởng của pH đến hiệu quả kết bông được kiểm tra ở một khoảng pH từ 5 đến 10.

Kết bông bằng cách sử dụng các hợp chất FeCl_3

Pha chế dung dịch gốc FeCl_3 ở nồng độ 10 g/L. Tiến hành thí nghiệm với nồng độ dao động từ 0, 10, 50, 70, 100, 150, 200, 250 và 300 mg/L FeCl_3 . Lấy mẫu tảo ở phần nước bên trên (cách mặt nước 5 cm) sau mỗi khoảng thời gian nhất định từ lúc bắt đầu cho chất kết bông vào bình chứa tảo cho đến khi hiệu suất lắng đạt $\geq 90\%$ (hoặc tế bào bị vỡ).

Kết bông bằng cách sử dụng chitosan

Chitosan thương mại (90% dạng bột) có nguồn gốc từ vỏ cua (sản phẩm của Jiangsu Gubei Biological Technology Co., Ltd.). Dung dịch chitosan gốc được pha bằng cách hòa tan bột chitosan

(90%) trong acid acetic (4%) với tỉ lệ 1 g/L, lắc cho đến khi tan hết. Thí nghiệm được tiến hành ở các nồng độ chitosan 25, 50, 75, 100 mg/L.

Sau khi cho chitosan vào dịch nuôi, mẫu được khuấy với các tốc độ 10, 20, 30, 40, 50 rpm, rồi để lắng và xác định hiệu suất thu hồi sử dụng máy khuấy từ. Thể tích thí nghiệm 200 mL sử dụng cốc 250 mL.

Xác định hiệu suất thu hồi sinh khối

– Thu mẫu dịch nuôi trước và sau khi thu hồi sinh khối: Lấy mẫu tảo ở phần nước bên trên (cách mặt nước 5 cm) sau mỗi khoảng thời gian nhất định từ lúc bắt đầu cho chất kết bông vào bình chứa tảo cho đến khi hiệu suất lắng đạt $\geq 90\%$ (hoặc tế bào bị vỡ).

– Chất lượng tảo trong quá trình lắng được đánh giá thông qua chỉ tiêu là tỷ lệ tế bào còn nguyên vẹn (intact cells). Mẫu tảo lắng thu được sau mỗi khoảng thời gian nhất định được pha loãng với nước sạch để đạt mật độ phù hợp và đếm các tế bào còn nguyên vẹn bằng buồng đếm Sedgewick Rafter (dung tích 1 mL với 1000 ô đếm) ở vật kính x10 dưới kính hiển vi quang học hiệu Olympus. Tế bào tảo còn nguyên vẹn được xác định là tế bào còn đầy đủ vách và không bị vỡ hoặc bị biến đổi hình dạng.

Hiệu suất thu hồi được xác định theo công thức của Harith và cs. [16]:

$$\text{Hiệu suất thu hồi (\%)} = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_i} \right] \times 100 \quad (1)$$

trong đó: C_i : mật độ tế bào trước khi cho chất kết bông; C_f : mật độ của tế bào sau khi lắng.

Đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA

Hàm lượng IAA trong môi trường dịch nuôi và sinh khối của chủng *P. spiroides* (PHO) được đo trước và sau khi sử dụng chitosan nhằm xác định khả năng bảo toàn IAA tạo ra bởi chủng VKL này sau khi sử dụng chitosan kết bông sinh khối. Quy trình xác định IAA dựa trên phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Salkowski, đo độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 530 nm trên máy quang phổ (Evolution 60S) [17, 18].

Trước khi sử dụng chitosan, sinh khối PHO được thu bằng cách ly tâm ở 10.000 rpm trong 10 phút. Sau khi sử dụng chitosan để kết bông, dịch nuôi cũng được ly tâm để loại bỏ toàn bộ tế bào PHO. Mẫu dịch nổi (1 ml) sau ly tâm được trộn với 2 ml thuốc thử Salkowski (2% FeCl_3 0,5 M trong dung dịch HClO_4 đặc) và được ủ trong 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ quang. Đối với sinh khối PHO, sau khi thu hồi, mẫu được nghiền nát để phá vỡ tế bào, thêm nước cất theo tỷ lệ 1:1, ly tâm hỗn hợp chiết xuất ở 10.000 rpm trong 10 phút để thu dịch chiết. Dịch chiết này tiếp tục được xử lý với thuốc thử Salkowski và đo độ hấp thụ quang. Giá trị OD của các mẫu được so sánh và đối chiếu với đồ thị chuẩn để định tính và định lượng IAA theo đơn vị $\mu\text{g IAA/mL}$. Đồ thị chuẩn được xây dựng dựa trên kết quả đo phổ OD của IAA

trình khiết ở các nồng độ từ 0 đến 40 $\mu\text{g/mL}$. Sau đó vẽ thành đồ thị đường chuẩn IAA trên Excel trong hệ trục tọa độ Oxy với trục tung là phổ OD có giá trị từ 0 đến 1, trục hoành là nồng độ IAA có giá trị từ 0 đến 1 $\mu\text{g/mL}$ [18].

Xử lý số liệu

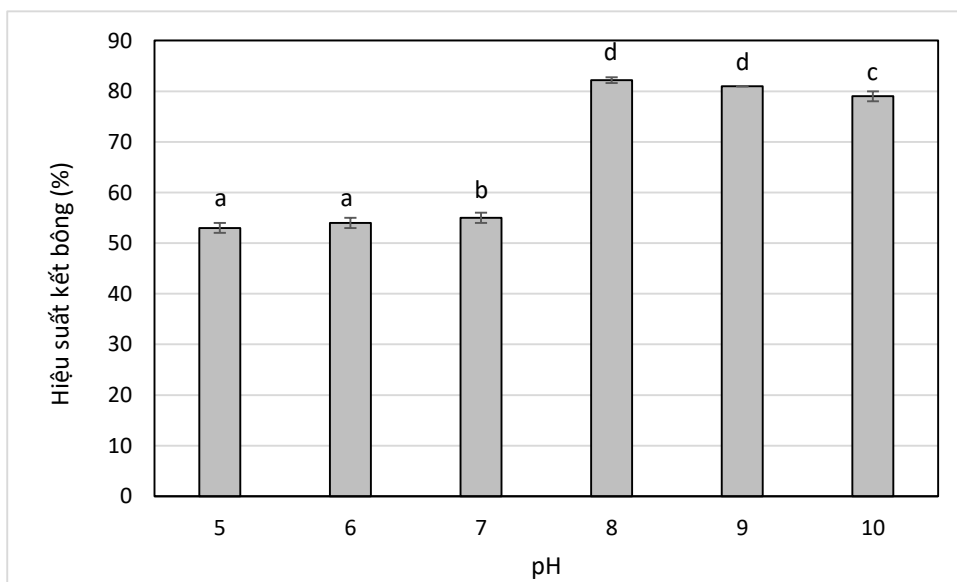
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các tính toán và thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel 2021, phân tích sự tác động các yếu tố thí nghiệm đến hiệu suất kết bông bằng ANOVA một nhân tố và đánh giá sự khác biệt hiệu suất kết bông trung bình sau phân tích ANOVA bằng phân tích Duncan, mức ý nghĩa được chọn $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của pH đến hiệu quả kết bông

Sử dụng phương pháp kết bông bằng thay đổi pH là có lợi vì các tế bào kết bông gây ra bởi pH giống hệt với các tế bào vi tảo không kết bông. Bên cạnh đó kỹ thuật thu hoạch này đơn giản và chi phí thấp. Bởi vậy chúng tôi đã thử nghiệm ảnh hưởng của pH đến sự kết bông của chủng PHO. Đối với các thử nghiệm pH acid 2, 3, 4 các tế bào bị phá vỡ, không còn nguyên vẹn, vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của pH đến sự kết bông của chủng PHO được thử nghiệm ở khoảng pH từ 5 đến 10. Kết quả ảnh hưởng của pH được ghi nhận sau 1 giờ thí nghiệm thể hiện ở Hình 2.

Kết quả cho thấy pH acid và trung tính cho hiệu suất kết bông thấp, cụ thể là ở pH 5 - 7 hiệu suất kết bông chỉ đạt hơn 50%. Hiệu suất kết bông tăng vượt trội khi pH môi trường ở các mức 8 và 9, lần lượt đạt 83% và 81%, khác biệt rõ so với các mức còn lại ($p < 0,05$). Tiếp tục tăng



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến hiệu suất kết bông của chủng PHO (các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$)

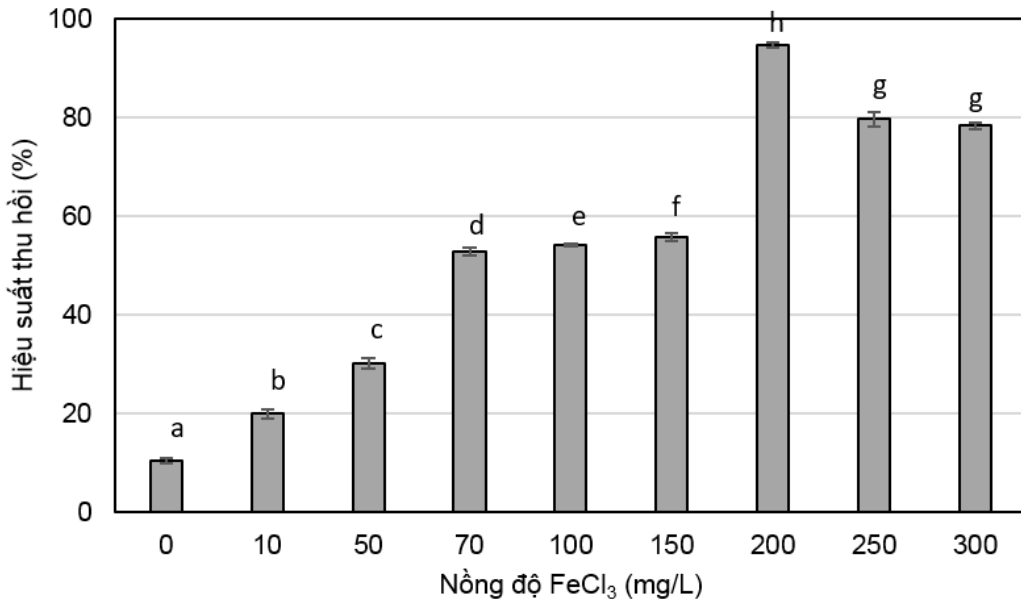
pH lên 10 không cho thấy tăng thêm hiệu quả trong quá trình keo tụ của chủng PHO mà còn suy giảm đáng kể ($p < 0,05$) xuống mức 79% so với pH mức 8 và 9 (Hình 2). Phương pháp này đã được một số tác giả nghiên cứu như: Wu và cs. đã quan sát thấy pH 10,5 cho kết quả kết bông 90% cho các loài nước ngọt *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.* và *Chlorococcum sp.* và pH 9,0 - 9,3 cho kết quả kết bông 90% cho các loài tảo biển *Nannochloropsis sp.* và *Phaeodactylum tricornutum* [19]. Horiuchi và cs. ghi nhận hiệu quả kết bông 96% trong các loài tảo biển *Dunaliella tertiolecta* khi pH được điều chỉnh đến 8,6 [20]. Theo Monila và cs., cation đóng một vai trò quan trọng trong sự kết bông [21]. Việc mất điện tích bề mặt không cho phép các tế bào vi tảo đẩy nhau ra và các khối được hình thành dẫn đến sự kết bông và do tác động của lực hấp dẫn sẽ lắng xuống đáy của bề mặt. Đối với chủng PHO ở điều kiện pH 8 - 9 là điều kiện phù hợp để thu sinh khối kết bông.

Ảnh hưởng của các hợp chất vô cơ (FeCl_3) đến hiệu suất kết bông của PHO

Sự kết bông bằng các hợp chất vô cơ được thử nghiệm với chủng tảo PHO bằng cách bổ sung FeCl_3 , FeSO_4 , AlCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ vào dung dịch huyền phù tảo thí nghiệm ở các nồng độ từ 0 cho đến khi tính hiệu quả của chúng không đổi (Số liệu chưa công bố). Kết quả cho thấy PHO có hiệu suất kết bông tốt nhất đối với FeCl_3 (nồng độ 150 mg/L). Với các loại muối còn lại, tế bào bị vỡ phần lớn khi xử lý hoặc có hiệu quả kết tụ thấp. Vì vậy trong phần này chúng tôi chỉ trình bày kết quả thử nghiệm đối với các nồng độ FeCl_3 khác nhau (với khoảng lựa chọn thí nghiệm từ 0 - 300 mg/L) để chọn ra nồng độ phù hợp.

Kết quả thử nghiệm cho thấy hiệu suất kết bông cao nhất đạt 95% được ghi nhận sau 15 phút khi sử dụng nồng độ 200 mg/L FeCl_3 ($p < 0,05$). Trong khi đó, ở mẫu đối chứng không bổ sung FeCl_3 , hiệu suất kết bông chỉ đạt 10%. Khi tăng nồng độ FeCl_3 lên 250 mg/L và 300 mg/L, hiệu suất kết bông giảm xuống lần lượt là 81,7% và 79%. Điều này cho thấy hiệu suất kết bông giảm khi nồng độ FeCl_3 vượt quá 200 mg/L. Ở các nồng độ 50, 70 và 100 mg/L, hiệu suất kết bông đều thấp hơn 60% (Hình 3).

Một số nghiên cứu trước đây người ta cũng đã ghi nhận hiệu quả cao của FeCl_3 trong việc kết bông sinh khối vi tảo. Cụ thể, Godos và cs. đã sử dụng FeCl_3 để kết tụ sinh khối vi tảo *Chlorella* nuôi trong môi trường nước thải, đạt hiệu suất thu hồi sinh khối trên 90% ở nồng độ 250 mg/L [22]. Koley và cs. cũng tiến hành thí nghiệm với *Scenedesmus obliquus*, cho thấy hiệu suất kết bông đạt 80,2% sau 1 giờ ở nồng độ 200 mg/L và 65,3% ở 150 mg/L, cao hơn nhiều so với hiệu suất chỉ 17% ở mẫu đối chứng không bổ sung FeCl_3 . Tương tự với *C. vulgaris*, hiệu suất kết bông lần lượt đạt 77,2 và 79,2% khi cho 150 và 200 mg/L FeCl_3 [23]. Chatsungnoen và Chisti báo cáo rằng, khi bổ sung 200 mg/L FeCl_3 hiệu suất kết bông của *C. vulgaris* đạt mức ổn định 60%, và tăng lên trên 90% khi tăng liều kết bông đến 300 - 500 mg/L đối với sinh khối nồng độ 1 g/L. Ở nồng độ sinh khối thấp hơn 0,54 g/L, hiệu suất kết bông cao hơn (> 90%) đã được ghi nhận đối với *Scenedesmus sp.* trong vòng 1 giờ với liều lượng 150 mg/L FeCl_3 [24]. Với ưu điểm khi sử dụng các muối kim



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ FeCl₃ đến hiệu suất thu hồi của chủng PHO (các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, Duncan’s test, P < 0,05).

loại để kết bông sinh khối trong quá trình thu hồi là nồng độ sử dụng thấp nên chúng đã được ứng dụng nhiều trong thu hồi sinh khối vi tảo cho các mục đích ngoài thực phẩm, như làm phân bón [16].

Ảnh hưởng của chitosan đến khả năng kết bông

Nghiên cứu đã khảo sát hiệu suất kết bông sinh khối của chitosan khi được bổ sung vào dịch nuôi cấy để cải thiện quá trình thu hoạch sinh khối. Quá trình khuấy được áp dụng nhằm giúp đẩy nhanh tiếp xúc giữa chitosan và tế bào tảo. Hiệu suất kết bông được khảo sát ở tốc độ khuấy 10, 20, 30, 40 và 50 rpm với các hàm lượng chitosan khác nhau (25, 50, 75 và 100 mg/L), được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng chitosan và tốc độ khuấy đến hiệu suất kết bông

Hàm lượng chitosan (mg/L)	Hiệu suất kết bông (%)				
	Tốc độ khuấy trung bình (vòng/phút - rpm)				
	10	20	30	40	50
25	47,67 ± 2,52 ^a	80,00 ± 1,00 ^b	84,67 ± 0,58 ^c	91,33 ± 1,53 ^d	48,67 ± 3,21 ^a
50	44,33 ± 5,13 ^a	73,67 ± 1,53 ^b	91,67 ± 2,08 ^c	93,33 ± 3,79 ^c	48,67 ± 3,21 ^a
75	42,33 ± 6,43 ^a	80,00 ± 1,00 ^b	83,67 ± 1,53 ^b	90,00 ± 1,00 ^c	32,00 ± 2,00 ^d
100	44,33 ± 6,03 ^a	80,00 ± 1,00 ^{bc}	84,67 ± 0,58 ^{cd}	86,67 ± 2,08 ^d	32,00 ± 3,00 ^e

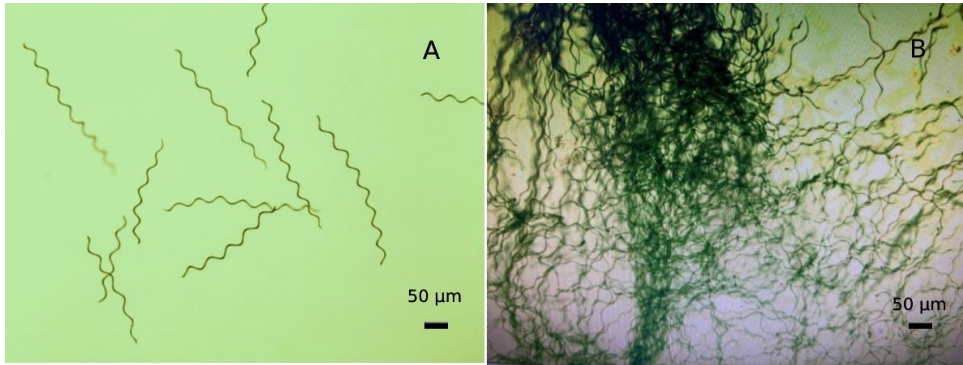
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt giá trị trung bình có ý nghĩa thống kê ở mỗi hàm lượng chitosan khác nhau khi được khuấy ở các tốc độ 10 – 50 vòng/phút, Duncan’s test, p < 0,05.

Kết quả cho thấy, sau 10 phút khuấy, hiệu suất kết bông cao nhất đạt được ở tốc độ khuấy 40 rpm, với hiệu suất thu hồi sinh khối là 91,33% với hàm lượng chitosan bổ sung 25 mg/L và cao nhất đạt 93,33% với hàm lượng chitosan bổ sung 50 mg/L ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng chitosan lên thì hiệu suất thu hồi lại giảm dần. Tiếp theo, ở các tốc độ 20 và 30 vòng/phút khả năng keo tụ cũng đạt khá cao, với tốc độ 30 vòng/phút hiệu suất thu hồi dao động từ 83,67% đến 91,67%, còn với tốc độ 20 rpm hiệu suất thu hồi thấp hơn dao động từ 73,67% đến 80%.

Ngược lại, ở tốc độ khuấy quá chậm (10 rpm) và quá nhanh (50 rpm), hiệu suất kết bông giảm rõ rệt. Ở tốc độ chậm (10 rpm) hiệu suất thu hồi thấp nhất dao động từ 42,33% đến 47,67%, hiệu suất thu hồi cao nhất khi hàm lượng chitosan bổ sung vào 25 mg/L. Còn ở tốc độ nhanh (50 rpm), hiệu suất giảm ở tất cả nồng độ chitosan (dao động từ 32% đến 48,67%), do các khối kết tụ lại bị phân tách khi khuấy quá nhanh. Trong khi đó, khuấy quá chậm có thể làm giảm năng lượng cung cấp cho quá trình kết tụ, khiến các khối kết bông không đạt được kích thước tối ưu để lắng xuống [25]. Khuấy chậm giúp rút ngắn khoảng cách giữa các hạt và tăng sự kết hợp của các hạt rắn trong dung dịch để tạo thành các khối kết tụ, phát triển thành khối có kích thước lớn. Sau khi khối lượng và kích thước khối bông đạt mức tối đa, quá trình lắng đọng xảy ra thành 2 lớp trong thùng chứa, đó là lớp nước trong ở trên và lớp bông sinh khối ở dưới [6, 26]. Hàm lượng chitosan có ảnh hưởng đến hiệu quả kết bông đối với từng loài vi tảo khác nhau và từng điều kiện khác nhau. Trong nghiên cứu với *Chlorella vulgaris*, sinh khối phục hồi cao nhất (99,1%) được xác định ở điều kiện hàm lượng chitosan 10 mg/L [27]. Đối với *Scenedesmus obliquus* hiệu suất kết bông đạt 91% đối với hàm lượng chitosan 20 mg/L [23]. Trong một nghiên cứu gần đây cũng đã báo cáo hàm lượng từ 10-50 mg/L chitosan là tối ưu đối với tảo *Chlorella vulgaris* [28]. Một số nghiên cứu khác cũng đã phối hợp tối ưu điều kiện kết bông bằng chitosan với thay đổi pH, thời gian [27] hay điện phân [29]. Trong nghiên cứu này điều kiện tối ưu là bổ sung hàm lượng chitosan 25 mg/L, tốc độ khuấy 40 rpm để thu hồi sinh khối chủng PHO. Điều kiện này được lựa chọn để thu hồi sinh khối chủng VKL PHO cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm tách chiết IAA để làm phân bón sinh học.



Hình 4. Sinh khối tảo trước và sau khi keo tụ bằng chitosan (hàm lượng chitosan = 25mg/L; mật độ VKL = 10^5 tế bào/mL)



Hình 5. Hình ảnh hiển vi sợi VKL trước (A) và sau (B) khi kết bông: sợi còn nguyên vẹn và màu sắc không biến đổi

Kết quả phân tích hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy và sinh khối

Để đánh giá khả năng bảo toàn IAA của phương pháp kết bông bằng chitosan nhằm phục vụ thu hồi sinh khối VKL cho mục đích làm phân bón, hàm lượng IAA trong dịch nuôi và sinh khối của PHO được đo trước và sau khi sử dụng chitosan (Bảng 2). Kết quả phân tích hàm lượng IAA cho thấy rằng hàm lượng IAA trong mẫu dịch nuôi cấy trước và sau khi xử lý bằng chitosan không có sự chênh lệch đáng kể (Paired T-test, $P = 0,98$), với tỷ lệ hao hụt dưới 1%. Trong sinh khối, hàm lượng IAA cũng không thay đổi đáng kể sau khi sử dụng chitosan (Paired T-test, $P = 0,19$) (từ $46,86 \pm 1,56$ xuống $44,09 \pm 0,96$, tỷ lệ hao hụt dưới 6%), cho thấy phương pháp kết bông bằng chitosan không chỉ cho hiệu suất kết bông cao trong thời gian ngắn mà còn có khả năng bảo toàn hàm lượng IAA.

Các polymer sinh học đó được sử dụng trong các ứng dụng khác nhau trong y sinh học, chế biến thực phẩm và xử lý nước thải [30]. Đặc biệt trong thu hồi sinh khối vi tảo, chitosan đã được ứng dụng rộng rãi như một hợp chất không độc hại và có thể phân hủy sinh học, hoạt động đồng thời như một chất keo tụ và chất tạo bông, vì trong điều kiện pH thích hợp, các nhóm amino của nó được proton hóa, tạo ra điện tích dương trung hòa điện tích âm của màng tế bào [31]. Dựa vào hiệu suất phục hồi mà chitosan được đề xuất là ứng viên tiêu biểu cho quá trình thu hồi sinh khối vi tảo không những đối với nuôi cấy ở nước ngọt mà còn ở môi trường nước mặn [32]. Không thấy sự khác biệt đáng kể giữa hàm lượng carbohydrate, chlorophyll-a và β -caroten giữa sinh khối thu hồi bằng lắng tự nhiên và lắng với chitosan đối với 2 loài vi tảo *Nanochloropsis oculata* và *Chlorella minutissima* [33]. Nghiên cứu của Zhu và cs. cũng cho thấy việc sử dụng chitosan cũng

Bảng 2. Kết quả phân tích hàm lượng IAA trước và sau khi xử lý kết bông bằng chitosan (hàm lượng chitosan = 25mg/L; mật độ VKL = 10^5 tế bào/mL)

Mẫu	IAA ($\mu\text{g/mL}$)		Paired T-test
	Trước	Sau	
Dịch nuôi cấy	$21,89 \pm 1,54$	$21,84 \pm 1,58$	$t_{\text{stat}} = 0,029 < t_{\text{crit}} = 4,303,$ $p = 0,98 > 0,05$
Sinh khối tươi	$46,86 \pm 1,56$	$44,09 \pm 0,96$	$t_{\text{stat}} = 0,1936 < t_{\text{crit}} = 4,303,$ $p = 0,19 > 0,05$

không ảnh hưởng đến hàm lượng lipid chiết được của vi tảo *Chlorella vulgaris* [34]. Việc sử dụng chitosan như một chất kết bông sinh học còn cho thấy không gây ra bất kỳ tác động có hại nào đối với bốn loài vi tảo (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. và *Teraselimus* sp., ngay cả khi được sử dụng ở nồng độ cao và đã dẫn đến sự phục hồi đáng kể nhất được ghi nhận [33]. Mặc dù chưa có nhiều nghiên cứu phân tích hàm lượng chất kích thích sinh trưởng trước và sau xử lý bằng chitosan được ghi nhận, kết quả nghiên cứu ban đầu của nghiên cứu này đã bổ sung thêm tiềm năng ứng dụng chitosan trong việc thu hồi sinh khối tảo tạo dịch phân bón lỏng, đặc biệt đối loài *Planktothrix spiroides*.

4 Kết luận

Chủng VKL *Planktothrix spiroides* (PHO) đạt hiệu suất kết bông sinh khối tối ưu ở pH = 8 (hiệu suất đạt 83% sau 1 giờ). Việc sử dụng FeCl₃ ở nồng độ 200 mg/L cho kết quả thu hồi sinh khối hiệu quả nhất, đạt 95% sau 15 phút. Kết bông bằng chitosan cũng cho hiệu quả cao, đạt 93,33% sau 10 phút với tổng độ khuấy 40 rpm ở hàm lượng chitosan bổ sung 25 mg/L. Đặc biệt, kết bông bằng chitosan không chỉ cho hiệu quả thu hồi sinh khối cao mà còn bảo toàn được hàm lượng IAA trong cả dịch nuôi và sinh khối. Tỷ lệ hao hụt ước tính vào khoảng dưới 1% trong dịch nuôi và 6% trong sinh khối. Điều này cho thấy phương pháp kết bông bằng chitosan là lựa chọn tốt cho quá trình thu hồi sinh khối vi tảo để sản xuất phân bón sinh học.

Lời cảm ơn

Công trình này là một phần kết quả của đề tài khoa học và công nghệ cấp nhà nước. Tên đề tài “Nghiên cứu tuyển chọn vi khuẩn lam sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (KTSTTV) dùng cho sản xuất phân bón, Mã số ĐT: ĐTĐL.CN-46/21. Các tác giả chân thành cảm ơn Bộ khoa học và công nghệ đã cấp kinh phí và tạo điều kiện để thực hiện đề tài.

Tài liệu tham khảo

1. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006), Commercial applications of microalgae *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 87–96.
2. Christenson, L., Sims, R. (2011), Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, *Biotechnol Adv.*, 686–702.
3. Shankha, K., Satyapal, P., Sourav-Kumar, B. & Nirupama, M. (2017), Development of a harvesting technique for large scale microalgal harvesting for biodiesel production, *R.S.C. Advances*, 7, 7227–7237.
4. Lee, C. S., Robinson, J. & Chong M. F. (2014), A review on application of flocculants in wastewater treatment, *Process Saf. Environ. Prot.*, 92, 489–508.

5. Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H. & Li, A. (2016), A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment, *Water Res.*, 95, 59–89.
6. Renault F., Sancey B., Badot P. M. & Crini G. (2009), Chitosan for coagulation/flocculation processes - an eco-friendly approach, *Eur. Polym. J.*, 45, 1337–1348.
7. Rinaudo, M. (2006), Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.*, 31 603–32.
8. Singh H., Khattar J. S., Ahluwalia AS (2014), Cyanobacteria and agricultural crops, *Int. J. Plant Res.*, 27(1), 37.
9. Win, TT., Barone, GD., Secundo, F., Fu, P. (2018), Algal Biofertilizers and Plant Growth Stimulants for Sustainable Agriculture, *Industrial Biotechnology*, 14(4), 203–211.
10. Kawalekar, J. S. (2013), Role of Biofertilizers and Biopesticides for Sustainable Agriculture, *Journal of Bio Innovation*, 2, 73–78.
11. Romaneko, K. O., Kosakovskaya, I. V. & Romanenko, P. O. (2016), Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes, Pt II. Cytokinins and gibberellins, *Inter. J. Algae*, 18(2), 179–201.
12. Varalakshmi, P., Malliga, P. (2012), Evidence of production of indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) on the growth of *H. annuus.*, *Inter. J. Sci. Res. Publ.* 2(3), 1–15.
13. Nguyễn Thị Thu Liên, Hoàng Dương Thu Hương, Ngô Thị Diễm My, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Phạm Thị Diễm Thi, Lê Thị Tuyết Nhân (2020), Sàng lọc khả năng sinh chất điều hoà sinh trưởng IAA ở một số chủng vi khuẩn lam dạng sợi phân lập ở Thừa Thiên Huế, *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2020, Thừa Thiên Huế 27-10-2020, Tạp chí Đại học Huế*.
14. Kotai, J. (1972), Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae, *Norwegian Institute for Water Research, Oslo B*, 11(69), 1–5.
15. Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (2010), *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, France, UNESCO, 110 pp. (Intergovernmental Oceanographic Commission Manuals and Guides; 55). DOI: <https://doi.org/10.25607/OBP-1371>.
16. Harith, T. Z., Yusoff, M. F., Mohamed, S. M., Din, M. S. M. & Ariff, B. A. (2009), Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaeroceros calcitrans*, cells, *Afr. J. Biotechnol*, 8 (21), 5971–5978.
17. Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S. Y., Hashidoko, Y. (2010), Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly axitic tropical peat soil., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11), 2202–2208.
18. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 10784:2015 về Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol-axetic (IAA).

19. Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T. (2012), Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium, *Bioresour. Technol.*, 110, 496–502.
20. Horiuchi, J., Ohba, I., Tada, K., Kobayashi, M., Kanno, T. (2003), Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH Control, *J Biosci Bioengg*, 95, 412–415.
21. Molina, G. E., Belarbi, E. H., Acien-Fernandez, F. G., Robles-Medina, A., Yusuf, C. (2003), Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnol. Adv.*, 20, 491–515.
22. Godos, I., Guzman, H. O., Soto, R., García-Encina, P. A., Becares, E., Muñoz, R., Vargas, V. A. (2011), Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggyery wastewater treatment, *Bioresour. Technol.*, 102, 923–927.
23. Koley, S., Prasad, S., Bagchi, S.K. & Mallick N. (2017), Development of a harvesting technique for large-scale microalgal harvesting for biodiesel production, *R.S.C. Adv.*, 7, 7227–7237.
24. Chatsungnoen, T., Chisti, Y. (2016), Harvesting microalgae by flocculation-sedimentation, *Algal Res.*, 13, 271–283.
25. Qasim, S. R. (2017), *Wastewater treatment plants: planning, design, and operation* (Boca Raton: CRC Press).
26. Bina, B., Ebrahimi, A. & Hesami, F. (2014), The effectiveness of chitosan as coagulant aid in turbidity removal from water, *Int. J. Environ. Health Eng.*, 3(8).
27. Elcik, H., Karadag, D., Kara, A.I., Cakmakci, M. (2023), Microalgae Biomass Harvesting Using Chitosan Flocculant: Optimization of Operating parameters by Response Surface Methodology, *Separations*, 10, 507. <https://doi.org/10.3390/separations10090507>.
28. Machado, A. C., Esteves, A. F., Pires, J. C. (2024), *Chlorella vulgaris* Harvesting: Chemical Flocculation with Chitosan, Aluminum Sulfate, and Ferric Sulfate, *Appl. Sci.*, 14(2), 598.
29. Zhu, L., Pan, G., Xu, H., Kong, L., Guo, W., Yu, J., Robert, J., Mortimer, G., Shi, W. (2021) Enhanced chitosan flocculation for microalgae harvesting using electrolysis, *Algal Research*, 55, 102268.
30. Yang, R., Li, H., Huang, M., Yang, H., Li, A. (2016), A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment, *Water Res.*, 95, 59–89.
31. Giannuzzi, L., Bacciadone, J., Salerno, G. L. (2022), A Promising Use of Trimethyl Chitosan for Removing *Microcystis aeruginosa* in Water Treatment Processes, *Microorganisms*, 10, 2052.
32. Akis, S., Inan, B., Ozcimen, D.B. (2023), Effect of process parameters on chitosan-mediated microalgae flocculation, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 37(2), 97–105.
33. Duraisamy N., Muthu S., Thangavel K., Krishnan K., Sathasivam S. A bioflocculant made from chitosan and modified shrimp wastes might collect fresh and saltwater microalgae, *Biotech. Res. Asia.*, 21(1), 99–107.

34. Zhu, L., Li, Z., Hiltunen, E. (2018), Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction, *Biotechnol Biofuels*, 11,183.