

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐÈN LED ĐẾN SINH TRƯỞNG, HÀM LƯỢNG SẮC TỐ VÀ KHẢ NĂNG THÍCH ỨNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG TẢO XOẮN *ARTHROSPIRA PLATENSIS* TRONG MÙA ĐÔNG Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM

Nguyễn Đức Bách^{1*}, Nguyễn Phan Khuê^{1,2}, Phí Thị Cẩm Miện¹, Kim Anh Tuấn¹, Nguyễn Thị Hiền¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm R&D Chiếu sáng, Công ty cổ phần Bóng đèn phích nước Rạng Đông

*Tác giả liên hệ: ndbach@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 13.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 13.07.2020

TÓM TẮT

Ánh sáng đèn LED đỏ và xanh với các tỉ lệ khác nhau ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng, thời gian thế hệ, năng suất sinh khối và hàm lượng sắc tố chlorophyll a, carotenoid và phycocyanin của các chủng tảo xoắn *Spirulina*. Ánh sáng LED đỏ 660nm tác động tích cực đến sinh trưởng và tăng hàm lượng các sắc tố bao gồm chlorophyll a và phycocyanin. Ánh sáng LED xanh không phù hợp để nhân sinh khối nhưng có thể ngăn ngừa và loại bỏ động vật nguyên sinh. Bổ sung đèn LED đỏ hoặc tỉ lệ đỏ xanh (7:3) có tác dụng kích thích tảo sinh trưởng trong mùa đông và kiểm soát được hiện tượng tạp nhiễm. Tất cả 5 chủng tảo xoắn *Arthrospira platensis* Sp2, Sp6, Sp9, UTEX-1928 và NIES-46 đều có khả năng thích ứng với mùa đông lạnh miền Bắc Việt Nam, trong đó chủng Sp9 có khả năng thích ứng tốt nhất với tốc độ sinh trưởng và năng suất sinh khối cao nhất phù hợp với miền Bắc Việt Nam.

Từ khóa: *Arthrospira platensis*, tảo xoắn *Spirulina*, đèn LED, miền Bắc, chlorophyll a, phycocyanin, carotenoid.

Influence of Light Emitting Diode on the Growth, Pigment Content and the Adaptability of some *Arthrospira platensis* Strains Cultured in Winter in the North Vietnam

ABSTRACT

The influence of different LED lighting condition with the red and blue light on the growth rate, generation time, biomass productivity and the content of pigments including chlorophyll a, carotenoids and phycocyanin of 5 strains of *Arthrospira platensis* Sp2, Sp6, Sp9, UTEX-1928 and NIES-46 were investigated. The red light at 660 nm has shown a positive effect on the growth and increase the pigment contents of chlorophyll a and phycocyanin while the blue light was unsuitable for biomass production but inhibited and eliminated protozoa contamination. The additional lighting of red LEDs or a red-blue ratio (7:3) enhanced photosynthesis of microalgae in the winter and efficiently controlled contamination. The adaptability of 5 strains was investigated in winter in North Vietnam. Of these strains, the Sp9 was the best adaptable strain and shown the highest growth rate and biomass productivity.

Keywords: *Arthrospira platensis*, LED, North Vietnam, chlorophyll a, phycocyanin, carotenoid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tảo xoắn *Spirulina* có tên khoa học *Arthrospira platensis* là loài tảo lam quang tự dưỡng được nghiên cứu và nuôi trồng ở quy mô lớn tại nhiều quốc gia trên thế giới (Vonshak, 1997). Tảo xoắn giàu các sắc tố phycocyanin, β -carotene, chlorophyll a, axit béo không no và các nguyên tố vi lượng như kẽm, sắt, canxi. Do vậy, tảo xoắn được sử dụng rộng rãi trong nhiều

lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, thực phẩm chức năng, hóa dược, thuốc và mỹ phẩm (Vonshak, 1997; Ahsan & cs., 2008; Menegotto & cs., 2016).

Khi nuôi tảo ở quy mô lớn, nhiệt độ và cường độ chiếu sáng là hai yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của tảo (Vonshak, 1994). Việc nuôi tảo xoắn sẽ thuận lợi ở những vùng khí hậu ổn định, có thời gian chiếu sáng trong ngày cao. Cho đến nay, nhiều

công ty lớn như Sosa Texcoco ở Lake Texcoco (Mexico), Earthrise Farms ở California (Mỹ), Siam Algae ở Bangkok (Thailand), Blue Continent (Đài Loan), Nippon (Nhật Bản), Cyanotech ở Hawaii (Mỹ) và Hainan Simai Enterprising ở Hainan (Trung Quốc) đã nuôi tảo với sản lượng tới hàng trăm tấn/năm (Vonshak, 1997; Vonshak, 2006; Ahsan & cs., 2008). Ở Việt Nam, nhiều vùng có điều kiện khí hậu phù hợp để nuôi tảo xoắn ở quy mô lớn như khu vực miền Trung và miền Nam như Ninh Thuận, Bình Thuận, Lâm Đồng, Nghệ An, Huế và Đà Nẵng (Kim Lệ Chân & cs., 2018). Ở khu vực miền Bắc Việt Nam, do thời tiết biến động thất thường, kèm theo mùa đông lạnh với nhiệt độ và cường độ ánh sáng thấp nên ảnh hưởng rất lớn đến việc nuôi tảo xoắn. Do vậy, để nuôi được tảo xoắn chủ động và thành công ở miền Bắc, cần phải có các chủng giống thích ứng rộng với nhiệt độ đi kèm với các biện pháp kỹ thuật.

Gần đây, nghiên cứu ảnh hưởng đèn LED đến hàm lượng các sắc tố phycocyanin, β -carotene, chlorophyll *a* ở tảo xoắn đã được thử nghiệm (Markou, 2014; Park & cs., 2018; Võ Hồng Trung & cs., 2017). Đèn LED có tác động kích thích tăng trưởng (Kim Lệ Chân & cs., 2018) và tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh

học (Prates & cs., 2018; Kilimtzidi & cs., 2019; Raqiba, 2019).

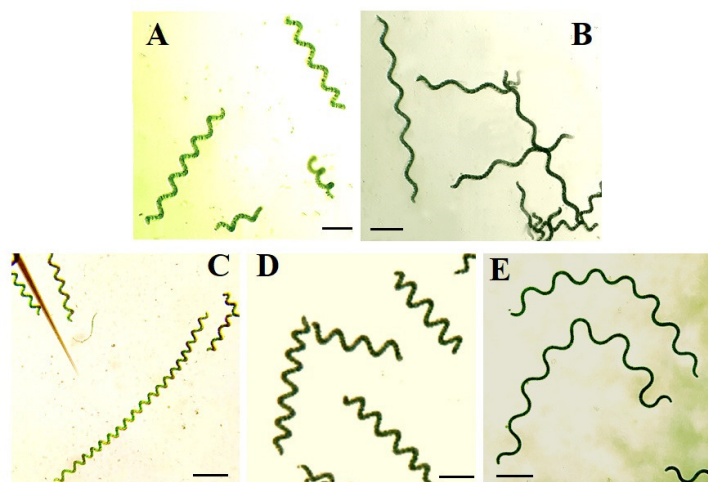
Nghiên cứu này đánh giá khả năng thích ứng của một số chủng giống tảo xoắn *A. platensis* trong các điều kiện nuôi khác nhau, đồng thời thử nghiệm ảnh hưởng của các ánh sáng đèn LED khác nhau đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp sắc tố của các chủng tảo xoắn trong điều kiện mùa đông ở miền Bắc Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng tảo giống và môi trường nuôi

Các chủng giống tảo xoắn *A. platensis* ký hiệu Sp2, Sp6 và Sp9 được phân lập, tuyển chọn và lưu giữ tại Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Chủng UTEX-1928 từ ngân hàng chủng giống của Mỹ (The University of Texas at Austin) và chủng NIES-46 nhập từ ngân hàng chủng giống của Nhật Bản (Microbial Culture Collection/National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan) được sử dụng làm đối chứng. Các chủng giống được nuôi và lưu giữ trong môi trường Zarrouk (Zarrouk, 1966), lỏng và thạch đặc (bổ sung agar 14 g/l) với cường độ chiếu sáng 1.500lux bằng đèn huỳnh quang, chu kỳ sáng tối 16:8.



Ghi chú: Chủng Sp2 hình thoi (fusiform), tảo có cao độ xoắn và chiều dài sợi (trichome) khác nhau (A); Chủng Sp6 xoắn ốc nhưng chiều dài sợi khác nhau, đường kính xoắn và cao độ xoắn thấp (B); Chủng Sp9 dạng sợi xoắn ốc mảnh, sợi dài. Chủng UTEX-1928 có dạng tương tự như Sp2 (D); NIES-47 dạng xoắn với bước xoắn dần rộng, sợi dài (E). Thang đo 10µm.

Hình 1. Các dạng hình thái của 5 chủng tảo xoắn

Bảng 1. Thông số kỹ thuật của đèn LED sử dụng trong thí nghiệm

Đèn LED	Hiệu suất quang thông Eff. (lm/W)	Flux (lm)	PPF ($\mu\text{mol/s}$)	PAR (W/m^2)	Đỉnh (nm)
T8 Deluxe 36W Huỳnh quang	88	3.200	43,18	9,38	-
Đỏ (R) 25W	16,83	416,12	41,37	7,50	660
Xanh (B) 25W	23,23	527,97	26,64	6,79	467
Hỗn hợp Đỏ: Xanh (7:3) 25W	41,21	1010,4	27,33	5,61	467/660
Hỗn hợp Đỏ: Xanh (6:4) 25W	31,92	796,40	32,39	7,04	467/660

2.1.2. Đèn LED

Đèn LED cung cấp bởi Trung tâm R&D Chiếu sáng, Công ty cổ phần Bóng đèn phích nước Rạng Đông gồm: đèn huỳnh quang ánh sáng trắng (toàn phần) T8 Deluxe 36W 1,2m, đèn LED đỏ (R) và xanh (B) (Bảng 1, Hình 2). Khoảng cách 30cm được đặt từ nguồn sáng tới bình nuôi tảo hoặc bề mặt tảo nuôi trong bể dài raceway diện tích 40m^2 ($20 \times 2\text{m}$).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nhân giống trong phòng thí nghiệm

Tảo được nuôi trong bình thủy tinh Pyrex 2L bằng môi trường Zarrouk (Zarrouk, 1966) ở $31,5 \pm 2^\circ\text{C}$ chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang và sục khí tốc độ 20 lít/phút. Mật độ tảo ban đầu tương ứng với mật độ quang $\text{OD}_{750} = 0,1$. Chu kỳ sáng tối 16:8 được áp dụng trong phòng thí nghiệm, thời gian chiếu sáng ở các bể raceway trong nhà lưới theo điều kiện tự nhiên.

2.2.2. Xác định tốc độ sinh trưởng

Tốc độ sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua khối lượng khô, hàm lượng chlorophyll *a*, và OD_{750} . Năng suất sinh khối được xác định theo phương trình: $PX = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, trong đó X_t là sinh khối (g/l) ở thời gian t (tính theo ngày) và X_0 là lượng sinh khối (g/L) ở thời điểm t_0 . Tốc độ sinh trưởng riêng hay đặc trưng (μ) được xác định $\mu = \ln(X_t/X_0)/(t - t_0)$ khi tảo đang sinh trưởng ở trong pha logarit. Thời gian thế hệ (doubling time) $T_d = \ln(2)/\mu$ (tính theo ngày).

2.2.3. Tương quan giữa khối lượng khô và mật độ quang OD_{750}

Khối lượng khô (g/l) được xác định như sau: lấy 100ml dịch huyền phù tảo ly tâm ở tốc độ

6.000g trong 30 phút ở 5°C (Centrifuge 5403, Eppendorf) để thu sinh khối. Sinh khối sau đó được rửa bằng nước cất trong 2 phút và ly tâm, cuối cùng thu bằng cách lọc qua giấy lọc (Whatman GF/C filter No. 1, $11\mu\text{m}$) và sấy khô ở 60°C tới khối lượng không đổi và cân bằng cân phân tích (SHIMADZU UV-1800).

Mối tương quan giữa khối lượng khô và mật độ quang OD_{750} được xây dựng dựa vào các giá trị mật độ quang của các dịch tảo pha loãng liên tục 2, 4, 8, 16 và 32 lần. Đồ thị tương quan giữa khối lượng khô và OD_{750} được xây dựng theo phương trình tuyến tính dạng $y = ax + b$ với hệ số tương quan R (Silva & cs., 2009; Melinda & cs., 2011).

2.2.4. Đánh giá khả năng thích ứng của các chủng tảo xoắn trong mùa đông

Các thí nghiệm được thực hiện trong vụ đông xuân (từ tháng 10 đến cuối tháng 2) năm 2019 và 2020 (nhiệt độ ban ngày dao động từ $16-20^\circ\text{C}$ và ban đêm từ $12-15^\circ\text{C}$), cường độ ánh sáng từ 5-15kLux. Khả năng thích ứng của các chủng được xác định dựa vào khả năng sống và hiệu ứng ức chế quang hợp bởi ánh sáng (photoinhibition).

2.2.5. Ảnh hưởng của ánh sáng LED xanh đến kiểm soát tạp nhiễm

Đèn LED xanh ở bước sóng 467nm được chiếu bổ sung vào các mẫu nhiễm nguyên sinh động vật *Nuclearia* sp. với các khoảng thời gian liên tục từ 30 đến 180 phút/ngày trong khi vẫn duy trì chiếu sáng đèn huỳnh quang. Tác động của ánh sáng đến mức độ nhiễm được đánh giá bằng cách quan sát mẫu dưới kính hiển vi sau các khoảng thời gian 1, 2, 3 và 4 ngày.

2.2.6. Ảnh hưởng của đèn LED trong điều kiện nuôi mùa đông

Thí nghiệm được tiến hành trong các bể dài (raceway) vào vụ đông xuân với nhiệt độ bể nuôi ban ngày dao động trong khoảng 17-25°C, ban đêm từ 12 đến 18°C. Tảo được nuôi trong bể diện tích 40m², chiều sâu nuôi 20cm, tốc độ dòng 20 cm/giây. Ảnh hưởng của đèn LED được đánh giá dựa vào tốc độ sinh trưởng riêng (μ), thời gian thế hệ và năng suất trung bình/ngày. Đèn LED ánh sáng đỏ (R), ánh sáng xanh (B) và hỗn hợp với tỉ lệ 7R:3B được chiếu bổ sung liên tục trong 10 giờ/ngày từ 8h sáng đến 18h hàng ngày khi nhiệt độ trong bể nuôi lớn hơn 17°C. Ảnh hưởng của đèn LED được đánh giá thông qua tốc độ sinh trưởng và mức độ tạp nhiễm.

2.2.7. Xác định hàm lượng các sắc tố

a. Chlorophyll và carotenoid

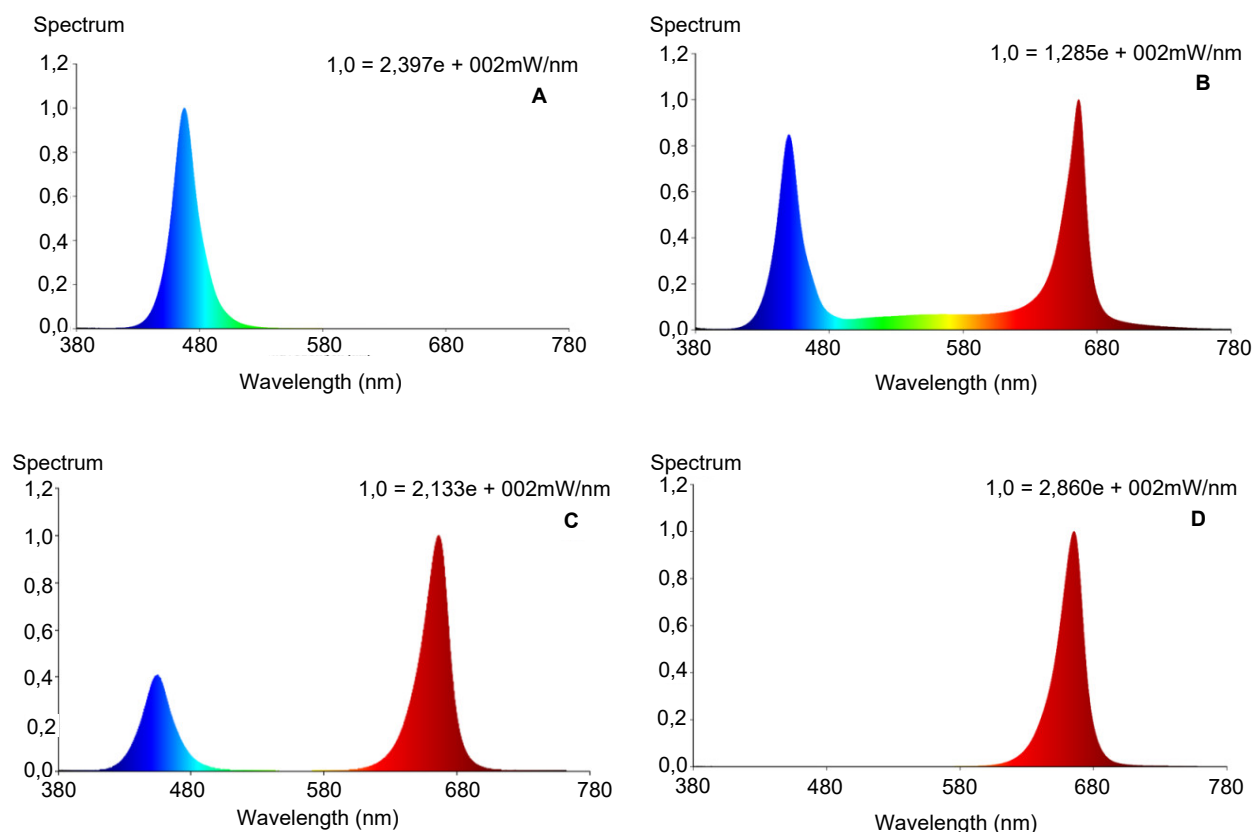
Hàm lượng chlorophyll a (Chl_a) được xác

định theo Park & cs. (2018) có cải tiến như sau: 2g tảo khô được trong 15ml hỗn hợp acetone và nước theo tỉ lệ thể tích (9:1), bổ sung 0,01%, butylated hydroxytoluene, 1% Na₂SO₄ và 1% NaHCO₃. Dung dịch mẫu được đặt trong đá lạnh và phá bằng sóng siêu âm 3 lần, mỗi lần 2 phút và cách nhau 5 phút sau đó ly tâm 6.000g ở 4°C trong 10 phút (5430R, Eppendorf, Germany). Hàm lượng Chl_a được xác định ở bước sóng 662nm (Shimadzu, UV-2600, Japan) với hệ số tắt phân tử gam ở bước sóng 662nm là 11,406 μg/ml. Hàm lượng (μg/ml) Chl_a, chlorophyll b (Chl_b), và carotenoid tổng số (C_t) được xác định theo phương pháp của Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987) bởi các phương trình sau:

$$\text{Chl}_a = 11,24 \times \text{OD}_{662} - 2,04 \times \text{OD}_{645}$$

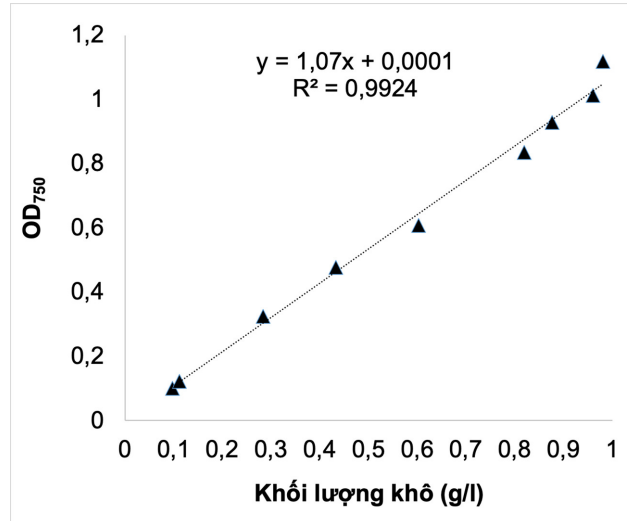
$$\text{Chl}_b = 20,13 \times \text{OD}_{645} - 4,19 \times \text{OD}_{662}$$

$$\text{C}_t = (1.000 \times \text{OD}_{470} - 1,90 \times \text{Chl}_a - 6.31 \times \text{Chl}_b)/214$$

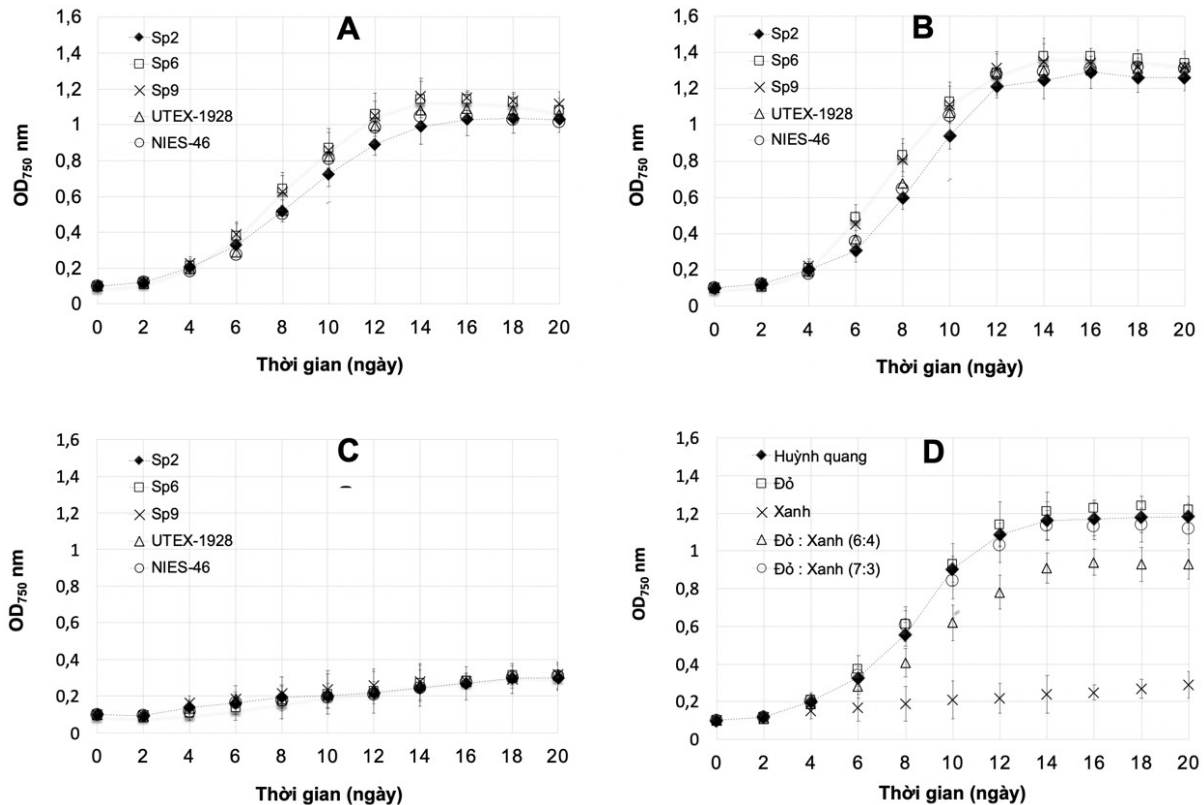


Ghi chú: A: Đèn LED xanh; B: Đèn LED đỏ xanh tỉ lệ 6:4; C: Đèn LED đỏ xanh tỉ lệ 7:3; D: Đèn LED đỏ.

Hình 2. Phổ ánh sáng đèn LED đỏ và xanh sử dụng trong thí nghiệm



Hình 3. Mối tương quan giữa khối lượng khô và độ hấp thụ quang học của tảo *A. platensis*



Ghi chú: Tảo được nuôi trong phòng thí nghiệm. A: LED huỳnh quang T8 Deluxe 36W; B: LED đỏ. C: LED xanh; D: Chủng giống Sp9 nuôi dưới đèn huỳnh quang (ánh sáng trắng), đỏ, xanh ở các tỉ lệ đỏ: xanh 6:4 và 7:3.

Hình 4. Đường cong sinh trưởng của các chủng tảo xoắn

Hàm lượng Chl_a, C_t cuối cùng được quy đổi và tính theo lượng sinh khối tảo khô (mg/g). Hàm lượng Chl_b chiếm tỉ lệ rất nhỏ so với Chl_a ở tảo xoắn.

b. Phycocyanin

Hàm lượng phycocyanin (PC) được xác định theo Yoshikawa (Yoshikawa, 2008). Bột tảo khô (2g) được ngâm trong dung dịch đệm phosphate

0,1M chứa Na_2HPO_4 và ly tâm 20 phút ở 10°C , tốc độ 3.400g. Dịch chứa PC được thu lại và đo OD ở bước sóng 620, 650 và 280 nm. Hàm lượng PC được xác định theo công thức:

$$\text{PC (mg/ml)} = [A_{620} - (0,72 \times A_{650})]/6,29$$

$$\text{Allophycocyanin (mg/ml)} = [A_{650} - (0,191 \times A_{620})]/5,79 \text{ (Castro \& cs., 2015).}$$

Độ sạch của PC (c-phycocyanin) được đánh giá dựa vào tỉ lệ $\text{OD}_{620}/\text{OD}_{280}$. Nếu tỉ lệ trong khoảng từ 0,65 đến 0,82 được coi là sạch (Herrera & cs., 1989).

2.2.8. Phân tích số liệu

Đồ thị được vẽ bằng Excel (2016). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần để phân tích giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Sai khác giữa các giá trị trung bình được phân tích bằng ANOVA với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Hậu kiểm (Tukey's test) để xác định sự khác nhau giữa cặp các giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tương quan giữa mật độ quang và khối lượng tảo khô

Do tảo xoắn *A. platensis* có cấu trúc sợi với kích thước khác nhau gồm nhiều tế bào liên kết với nhau nên việc xác định mật độ tế bào bằng cách đếm dưới kính hiển vi sẽ không phù hợp. Nghiên cứu gần đây cho thấy độ hấp thụ quang ở bước sóng 750nm tương quan chặt với sinh khối (Melinda & cs., 2011). Trong nghiên cứu này, tại mật độ tảo có giá trị $\text{OD}_{750} = 1,15$, khối lượng tảo khô quy đổi tương đương 0,975 g/l. Trên cơ sở pha loãng ở các mức khác nhau, mối tương quan tuyến tính giữa các giá trị OD và khối lượng tảo đã được xác lập ở bước sóng 750nm (Hình 3).

Việc nghiên cứu mối tương quan này có ý nghĩa trong thực tiễn sản xuất và là cơ sở để bổ sung môi trường dinh dưỡng đảm bảo cho tảo sinh trưởng tốt qua các lần thu hoạch.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng

Khi chiếu ánh sáng trắng ($33,33\mu\text{ photon/m}^2/\text{s}$), chủng Sp9 và Sp6 có tốc độ sinh trưởng riêng (μ) cao nhất 0,147/ngày vào ngày

thứ 8 đến 10, thời gian nhân đôi 4,7 ngày. Không có sự sai khác ý nghĩa về tốc độ sinh trưởng của các chủng giống Sp2, UTEX-1928 và NIES-46 (Hình 4). Khi chiếu sáng bằng ánh sáng LED đỏ, các chủng sinh trưởng nhanh và đạt ở pha logarit vào ngày thứ 7 đến 12. Chủng sp9 có tốc độ sinh trưởng riêng cao nhất 0,158/ngày. Thời gian nhân đôi $T_d = 4,4$ ngày (Hình 5).

Tốc độ sinh trưởng của chủng Sp2 thấp nhất trong tất cả các điều kiện chiếu sáng. Đèn LED đỏ có ảnh hưởng tích cực tới tốc độ sinh trưởng và thời điểm cân bằng vào khoảng ngày thứ 12-13 ở tất cả các chủng giống, trong khi đèn huỳnh quang thời điểm này vào ngày thứ 14 (Hình 5B). Ánh sáng xanh không phù hợp cho sinh trưởng của tảo, mật độ chỉ tăng 3 lần sau 20 ngày nuôi (Hình 5C). Tốc độ sinh trưởng riêng của chủng Sp9 trong điều kiện ánh sáng đỏ và xanh tương ứng là 0,158 và 0,022 (gấp 7,1 lần). Khi so sánh với ánh sáng huỳnh quang, đèn LED đỏ: xanh (6:4) cho tốc độ sinh trưởng thấp hơn chứng tỏ tỉ lệ ánh sáng xanh cao sẽ ức chế sinh trưởng của tảo. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây (Markou, 2014; Tian & cs., 2018; Wang & cs., 2007). Ánh sáng đỏ kích thích tăng trưởng, tăng hàm lượng sắc tố Chl_a và phycocyanin do các sắc tố hấp thụ tối đa vùng ánh sáng này. Do đó, ánh sáng đỏ phù hợp cho cả hai loại sắc tố Chl_a và phycocyanin, giúp tảo sinh trưởng tốt hơn.

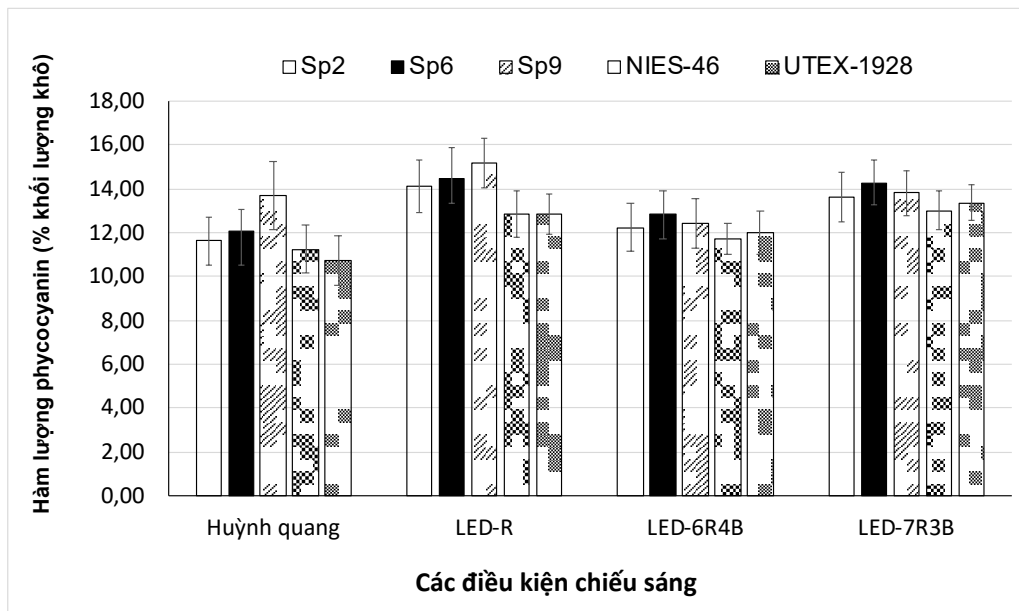
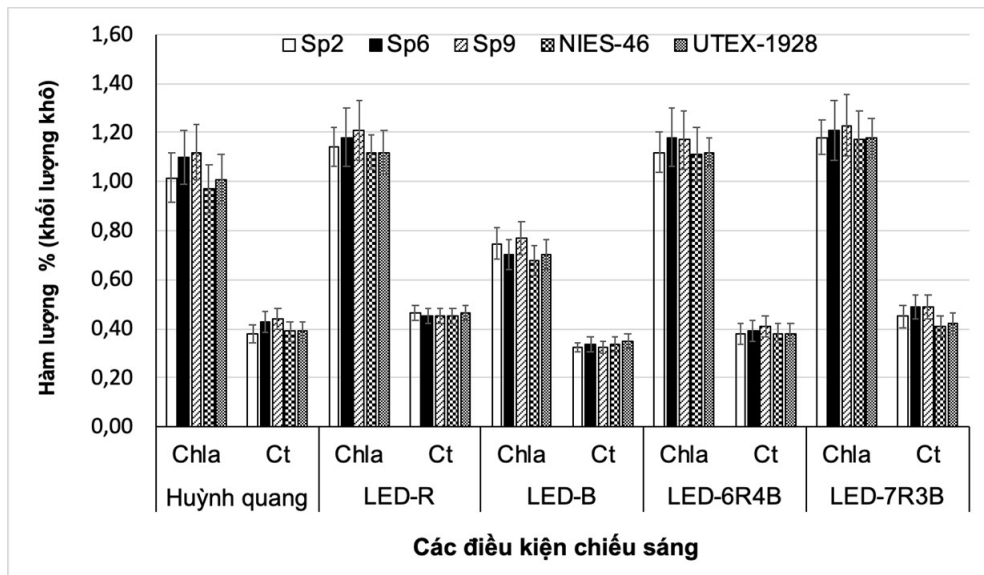
3.4. Ảnh hưởng của ánh sáng tới hàm lượng các sắc tố

Ở tảo xoắn, sắc tố quang hợp chủ yếu là chlorophyll a và một số sắc tố hỗ trợ như carotenoid và phycocyanin do đó hàm lượng chlorophyll sẽ tăng tỉ lệ với tốc độ sinh trưởng. Khi chủng Sp9 được chiếu sáng bằng ánh sáng đỏ (đỉnh 660nm) hàm lượng chlorophyll a chiếm 1,21% và carotenoid chiếm 0,41% khối lượng khô, cao hơn so với chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang tương ứng là 1,15% và 0,44%. Mặc dù ánh sáng xanh không phù hợp cho sinh trưởng nhưng tỉ lệ giữa hàm lượng carotenoid/ chlorophyll a ở các điều kiện chiếu sáng thì ánh sáng xanh kích thích tổng hợp nhiều carotenoid hơn, đặc biệt khi

so sánh giữa chiếu sáng bằng ánh sáng xanh với tỉ lệ đỏ xanh (6:4) và (7:3) (Hình 5). Các kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu tương tự đối với các chủng giống tảo xoắn khác trong vùng ánh sáng đỏ và xanh (Miguel, 1990; Park & cs., 2018; Thaweet, 2012).

Ánh sáng đỏ kích thích tăng hàm lượng phycocyanin từ 1,17 đến 1,20 lần so với ánh sáng huỳnh quang, trong đó chủng Sp9 có hàm lượng phycocyanin cao nhất lên tới ngưỡng 16%

khối lượng khô trong phòng thí nghiệm (Hình 5) và đạt 14% khi nuôi ở bể raceway (số liệu chưa công bố). Việc kết hợp giữa ánh sáng đỏ và xanh tỉ lệ 7:3 có tác dụng làm tăng hàm lượng phycocyanin nhưng hiệu quả thấp hơn so với ánh sáng đỏ ($\alpha = 0,05$). Kết quả này cũng tương tự với một số nghiên cứu khi sử dụng ánh sáng LED để điều khiển hàm lượng phycocyanin và sinh khối tảo xoắn (Prates & cs., 2018; Tian & cs., 2018).



Ghi chú: Hàm lượng chlorophyll a và carotenoid (A), hàm lượng phycocyanin (B).

Hình 5. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED đến hàm lượng các sắc tố của các chủng tảo xoắn



Ghi chú: Mẫu tảo bị nhiễm *Nuclearia* sp. (A), vị trí tấn công của *Nuclearia* sp. làm đứt gãy sợi tảo (mũi tên) (B), các đám tan rã của *Nuclearia* sp. sau 2 ngày xử lý bằng ánh sáng xanh, mỗi ngày chiếu 30 phút (C).

Hình 6. Hiện tượng nhiễm *Nuclearia* sp. trong các bể nuôi

Hiệu ứng tăng cường tổng hợp phycocyanin cũng quan sát thấy trong các nghiên cứu khác khi sử dụng đèn LED đỏ và xanh (Bachchhav & cs., 2016; Kilimtzi & cs., 2019). Việc sử dụng đèn LED vẫn chưa được áp dụng nhiều ở quy mô lớn, chủ yếu là do chi phí đầu tư cao nên một số nơi sử dụng màng nylon lọc sáng để có bước sóng nhất định khi nuôi tảo nhằm tăng phycocyanin và một số sắc tố khác (Evmorfia & cs., 2019).

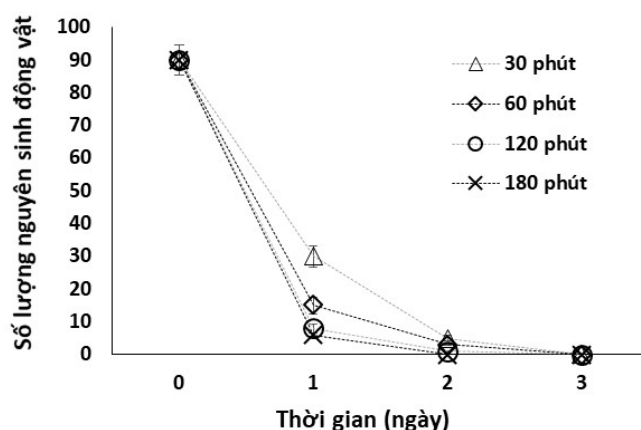
3.5. Ảnh hưởng của ánh sáng tới kiểm soát tập nhiễm

Hiện tượng tập nhiễm ít khi xảy ra ngay cả khi nuôi trong điều kiện hở do môi trường nuôi tảo có pH kiềm, từ 9,5 đến 11,0 nên hầu hết vi khuẩn cũng như các loài tảo khác bị ức chế. Tuy nhiên, tập nhiễm có thể xảy ra ở các bể nuôi kéo dài trong thời gian dài, giống bị thoái hóa, tiếp xúc với các nguồn lây nhiễm hoặc sử dụng nguồn giống bị nhiễm. Tảo xoắn thường bị nhiễm nhóm luân trùng (rotifer) và động vật nguyên sinh (amoebae) điển hình là *Branchionus* sp. và *Amoeba* sp. hoặc *Nuclearia* sp. (John & cs., 2017). *Nuclearia* sp. lây nhiễm nhanh và làm tảo chết trong vài ngày với các dấu hiệu đứt gãy sợi.

Ngay khi tiếp xúc với *A. platensis*, *Nuclearia* sp. thường di chuyển theo dạng trượt amip và bám các lông roi vào sợi tảo, sau khoảng thời gian từ 3 đến 5 phút, bản thân tảo *A. platensis* có sự vận động nhẹ theo dạng co

giật và đứt gãy sợi, giải phóng nguyên sinh chất ra vùng xung quanh (Hình 6B). Dường như phần nguyên sinh chất sẽ là nguồn dinh dưỡng cho *Nuclearia* sp.

Sau khi chiếu đèn LED xanh 30 phút ở ngày thứ nhất, tất cả các *Nuclearia* sp. có trong mẫu bị biến đổi hình thái, dạng vận động amip bị ngừng lại, không xuất hiện các lông và roi trên bề mặt màng tế bào. Hiện tượng tan rã tế bào thành các đám nhỏ quan sát được ở ngày thứ 2. Sau ngày thứ 3, không phát hiện được các tế bào *Nuclearia* sp. (Hình 6C). Sau 4 ngày chiếu sáng bổ sung bằng đèn LED xanh, ở tất cả các công thức thí nghiệm không thấy sự phục hồi của *Nuclearia* sp. trong suốt quá trình nuôi. Nguyên nhân của hiện tượng này là do nguyên sinh động vật bị thay đổi tính thấm của màng bởi ánh sáng xanh. Cơ chế phân tử do vùng ánh sáng xanh làm thay đổi tính thấm đối với bơm Na^+/K^+ (Finlay & cs., 2007). Đây là kênh vận chuyển ion qua màng rất quan trọng do đó khiến cho nguyên sinh động vật ngừng vận động dẫn đến bị ức chế và chết. Nghiên cứu của Roh & cs. (2018) khi thử nghiệm ánh sáng xanh ở 405 và 465nm đã thấy tác dụng ức chế nguyên sinh động vật nhiễm ở cá. Các kết quả này gợi ý, ánh sáng xanh có tác dụng tích cực trong việc kiểm soát hiện tượng nhiễm nguyên sinh động vật khi nuôi tảo xoắn trong điều kiện nuôi công nghiệp do tác nhân vật lý này an toàn, chi phí thấp, dễ dàng áp dụng ở quy mô lớn.



Ghi chú: Đèn LED xanh 467nm được chiếu bổ sung từ 30 đến 180 phút/ngày. *Nuclearia* sp. được đếm dưới kính hiển vi.

Hình 7. Ảnh hưởng của ánh sáng LED xanh trong kiểm soát lây nhiễm

Bảng 2. Ảnh hưởng của đèn LED đến tốc độ sinh trưởng và năng suất tảo trong vụ đông xuân

Chỉ tiêu sinh trưởng	Nguồn sáng	Sp2	Sp6	SP9	UTEX-128	NIES-46
Tốc độ sinh trưởng riêng (μ) (*)	ĐC	$0,094 \pm 0,012^a$	$0,097 \pm 0,014^a$	$0,113 \pm 0,012^b$	$0,098 \pm 0,012^a$	$0,109 \pm 0,013^b$
	R	$0,124 \pm 0,017^c$	$0,135 \pm 0,013^d$	$0,139 \pm 0,014^d$	$0,132 \pm 0,012^d$	$0,133 \pm 0,014^d$
	7R:3B	$0,125 \pm 0,012^c$	$0,138 \pm 0,011^d$	$0,141 \pm 0,015^d$	$0,133 \pm 0,009^d$	$0,129 \pm 0,015^c$
Thời gian thế hệ/ngày	ĐC	$7,37 \pm 0,82^a$	$7,14 \pm 0,85^a$	$6,13 \pm 0,91^b$	$7,07 \pm 0,85^a$	$6,35 \pm 0,72^b$
	R	$5,58 \pm 0,62^c$	$5,13 \pm 0,86^c$	$4,98 \pm 0,16^d$	$5,25 \pm 0,62^c$	$5,21 \pm 0,72^c$
	7R:3B	$5,54 \pm 0,61^c$	$5,02 \pm 0,72^c$	$4,91 \pm 0,56^d$	$5,21 \pm 0,71^c$	$5,37 \pm 0,56^c$
Năng suất trung bình (g/l/ngày) (**)	ĐC	$0,082 \pm 0,010^a$	$0,084 \pm 0,012^a$	$0,092 \pm 0,011^a$	$0,086 \pm 0,011^a$	$0,089 \pm 0,009^a$
	R	$0,112 \pm 0,009^b$	$0,114 \pm 0,017^b$	$0,121 \pm 0,019^b$	$0,109 \pm 0,015^b$	$0,114 \pm 0,018^b$
	7R:3B	$0,103 \pm 0,007^b$	$0,112 \pm 0,015^b$	$0,119 \pm 0,021^b$	$0,112 \pm 0,012^b$	$0,112 \pm 0,009^b$

Ghi chú: ĐC: Đối chứng (điều kiện ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới). Đèn LED với ánh sáng đỏ (R) và hỗn hợp ánh sáng đỏ và ánh sáng xanh (B) theo tỉ lệ khác nhau. (*): giai đoạn sinh trưởng logarit (từ ngày thứ 9 đến ngày 10) sau khi cấy giống. (**): ngày 14 tính từ khi cấy giống. Các ký hiệu a,b,c và d thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ khi so sánh cặp các giá trị trung bình.

3.6. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn LED đến tốc độ sinh trưởng và năng suất tảo trong vụ đông xuân

Khí hậu miền bắc Việt Nam điển hình có mùa đông lạnh với nhiệt độ ban ngày từ 15-20°C và nhiệt độ ban đêm có thể dưới 12°C. Ngoài ra, thời gian chiếu sáng và cường độ ánh sáng giảm đi kèm với mưa phùn nên rất khó khăn khi nuôi tảo vào mùa đông. Ngoài ra, hiện tượng quang ức chế (photoinhibition) diễn ra rõ rệt với nhiều chủng giống.

Kết quả thử nghiệm chiếu sáng đèn LED đỏ và đỏ xanh với tỉ lệ 7R:3B trong vụ đông (Bảng 2) cho thấy, tốc độ sinh trưởng riêng (μ) ở các công thức bổ sung đèn LED đỏ cao hơn nhiều so với ánh sáng tự nhiên. Giá trị OD_{750} đạt 1,18 tại ngày thứ 15 ở công thức chiếu ánh sáng đỏ cao hơn từ 1,2 đến 1,3 lần và thời gian thế hệ được rút ngắn trong khoảng từ 1-2 ngày so với chỉ sử dụng ánh sáng tự nhiên. Đối với chủng Sp9 khi bổ sung ánh sáng đỏ trong vụ đông xuân đã tăng năng suất 1,3 lần so với đối chứng.

Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng, hàm lượng sắc tố và khả năng thích ứng của một số chủng tảo xoắn *Arthrospira platensis* trong mùa đông ở miền Bắc Việt Nam



Ghi chú: Tảo giống nuôi trong ống thủy tinh đường kính 70 mm, chiều cao 600 mm với ánh sáng huỳnh quang (A) và đèn LED (B) trong phòng thí nghiệm. Chiếu bổ sung đèn LED ở bể raceway trong nhà lưới vào vụ đông xuân (C).

Hình 8. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng của tảo xoắn trong vụ đông xuân

Trong điều kiện nuôi ngoài trời vào mùa đông, đèn LED đỏ và LED đỏ: xanh (7:3) cho hiệu quả tích cực, rút ngắn thời gian sinh trưởng và năng suất sinh khối tăng từ 1,2 đến 1,3 lần. Theo tính toán, lợi ích từ việc tăng năng suất do sử dụng đèn đỏ vào mùa đông đem lại hiệu quả kinh tế cao hơn khi so sánh với đối chứng chỉ sử dụng ánh sáng tự nhiên. Chi phí năng lượng cho đèn LED là không đáng kể, và chi phí đầu tư đèn LED có thể thu hồi sau từ 5-6 lần thu hoạch (số lượng không công bố). Mặc dù việc chiếu sáng bổ sung có tác dụng tích cực đến quang hợp, nhưng khi nhiệt độ xuống thấp dưới 13°C sẽ dẫn đến hiện tượng quang ức chế khi cường độ chiếu sáng lớn hơn 20kLux (tương đương 370μ photon/s/m²). Trong điều kiện này, tảo có xu hướng vón tạo thành các hạt thay vì ở dạng huyền phù đồng nhất (số liệu không chỉ ra ở đây). Do đó khi nhiệt độ ngoài trời dưới 13°C cần chú ý đến hiện tượng quang ức chế dẫn đến tảo ngừng sinh trưởng hoặc chết. Việc chiếu sáng đèn LED đỏ bổ sung tốt nhất vào ban ngày khi nhiệt độ môi trường trong bể nuôi đã tăng lên. Nghiên cứu tương tự trong điều kiện tự nhiên khi nhiệt độ xuống thấp cũng được đề cập trong một số nghiên cứu (Vonshak, 1994; Vonshak, 1997; Vonshak, 2006; Kilimtzidi & cs., 2019).

4. KẾT LUẬN

Các chủng tảo khảo sát đều có khả năng thích ứng tốt trong điều kiện miền Bắc Việt Nam, trong đó, chủng tảo Sp9 có khả năng thích ứng tốt nhất có thể đưa vào sản xuất. Ánh sáng đèn LED có tác động khác nhau đến sinh trưởng và hàm lượng sắc tố. Ánh sáng đỏ có tác động tích cực đến sinh trưởng và tổng hợp sắc tố bao gồm cả chlorophyll *a* và phycocyanin. Ánh sáng xanh mặc dù không có tác dụng tích cực đến sinh trưởng của tảo xoắn ở tất cả các chủng khảo sát nhưng có tác dụng ức chế và loại bỏ các tác nhân tạp nhiễm thuộc nhóm động vật nguyên sinh (*Nuclearia* sp.). Khi nuôi tảo vào mùa đông, việc chiếu sáng bổ sung bằng đèn LED đỏ hoặc tỉ lệ đỏ: xanh 7:3 có tác dụng tăng cường quang hợp và kiểm soát được hiện tượng tạp nhiễm. Như vậy, trong thực tiễn sản xuất tảo xoắn có thể điều khiển hàm lượng sắc tố phycocyanin bằng cách sử dụng các nguồn ánh sáng đỏ ở bước sóng 660nm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội cấp kinh phí cho đề tài: “Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi tảo *Spirulina platensis* phù hợp với điều kiện khí hậu miền Bắc Việt Nam,

xây dựng quy trình công nghệ nhân giống và nuôi thu sinh khối tảo khô”, thuộc chương trình Công nghệ sinh học, mã số: 01C-06/02-2018-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahsan M., Mashuda P.T.C., Huntington M. & Hasan R. (2008). A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034.
- Bachchhav M.B., Kulkarni M.V. & Ingale A.G. (2016). Enhanced phycocyanin production from *Spirulina platensis* using light emitting diode. Journal of The Institution of Engineers (India): Series E. 98(1): 41-45.
- Castro G.F.P., Rizzo R.F., Passos T.S., Santos B.N.C., Dias J.R., Domingues K.G. & Araújo L. (2015). Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. Food Science and Technology (Campinas). 35(1): 18-24.
- Silva A.F., Lourenço S.O. & Chaloub R.M. (2009). Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). Aquatic Botany. 91(4): 291-297.
- Evmořia K., Sara C.B., Giorgos M., Koen G., Dries V., Koenraad M., Finlay B. & Fenchel T. (2007). Enhanced phycocyanin and protein content of *Arthrospira* by applying neutral density and red light shading filters: a small-scale pilot experiment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 94(6): 2047-2054.
- Finlay B. J. & Fenchel T. (1986). Photosensitivity in the ciliated protozoon *Loxodes*: Pigment granules, absorption and action spectra, blue light perception, and ecological significance. Journal of Eukaryotic Microbiology. 33(4): 534 - 542.
- Herrera A., Napoleone A. & Hohlberg A. (1989). Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. Journal of Applied Phycology. 1: 325-331.
- John G.D., Yingchun G. & Qiang H. (2017). Microzooplanktonic grazers - A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. Algal Research. 27: 356-365.
- Kilimtzidi E., Giorgos Markou S.C.B, Koen G., Dries V. & Koenraad M. (2019). Enhanced phycocyanin and protein content of *Arthrospira* by applying neutral density and red light shading filters: a small-scale pilot experiment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 94(6): 2047-2054.
- Kim Lê Chân, Trần Sương Ngọc, Huỳnh Thị Ngọc Hiền & Trương Quốc Phú (2018). Ảnh hưởng của màu sắc ánh sáng lên sự phát triển của tảo *Spirulina platensis*. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B): 75-81.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148: 350-382.
- Markou G. (2014). Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172(5): 2758-2768.
- Melinda J.G., Rob Van Hille C.G. & Susan T.L.H. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. Journal of Microbiological Methods. 85(2): 119-123.
- Menegotto A.L.C., Luciane C. & Cristiane C.E. (2016). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. Journal of the Science of Food and Agriculture. 97(3):724-732.
- Miguel O. (1990). Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. Journal of Applied Phycology. 2: 97-104.
- Park W.S., Kim H.J., Li M., Lim D.H., Kim J., Kwak J.J., Kang C.M., Ferruzzi M.G. & Ahn M.J. (2018). Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. Molecules. 23(8): 2065.
- Prates D.D., Radmann E.M., Duarte J.H., Morais M.G. & Costa J.A.V. (2018). *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. Bioresource Technology. 256: 38-43.
- Raqiba H.S.G. (2019). Light Emitting Diode (LED) Illumination for enhanced growth and cellular composition in three microalgae. Advances in Microbiology Research. 3(1): 1-6.
- Roh H.J., Kim A., Kang G. & Kim D.H. (2018). Blue light-emitting diode light at 405 and 465 nm can inhibit a protozoan infection in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 493. 10.1016/j.aquaculture.2018.04.045.
- Thaweedet C., Siripen T. & Richard L. (2012). Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. Journal of Agricultural Technology. 8(5): 1593-1604.
- Tian F., Buso D., Wang T., Lopes M., Niangoran U. & Zissis G. (2018). Effect of red and blue LEDs on the production of phycocyanin by *Spirulina Platensis* Based on photosynthetically active radiation. Journal of Science and Technology in Lighting. 41(0): 148-152.

- Vonshak A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis.
- Vonshak A. (1994). Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Biomass and Bioenergy. 6(5): 399-403.
- Vonshak A. (2006). Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga, *Spirulina platensis* grown outdoors. Plant Cell and Environment. 15(6): 613-616.
- Võ Hồng Trung, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trần Huỳnh Phong & Nguyễn Thị Hồng Phúc (2017). Ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng lên sự tăng trưởng, hàm lượng carbohydrate và protein ở *Spirulina* sp. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh. 14(12): 117-126.
- Wang C.Y., Fu C.C. & Liu Y.C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. Biochemical Engineering Journal. 37(1): 21-25.
- Yoshikawa O. (2008). Single-laboratory validation of a method for the determination of c-phycocyanin and allophycocyanin in *Spirulina (Arthrospira)* supplements and raw materials by spectrophotometry. Journal of AOAC International. 91(3): 524-529.
- Zarrouk C. (1966). Contribution a l'étude d'une cyanobactérie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. PhD thesis, University of Paris, France.