

ĐẶC TÍNH SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) CỦA *SYNECHOCYSTIS* M8 DƯỚI ĐIỀU KIỆN QUANG - TẠP DƯỠNG

GROWTH CHARACTERISTICS AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) SYNTHESIS CABILITY
OF *SYNECHOCYSTIS* M8 UNDER PHOTO-HETEROTROPHIC CONDITIONS

Nguyễn Thị Phương Dung^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Phương³, Bùi Thị Thu Uyên⁴,
Đỗ Thế Khánh⁵, Lưu Ngọc Sinh⁶, Trần Đăng Thuần^{4,*}

DOI: <http://doi.org/10.57001/huiv5804.2025.196>

TÓM TẮT

Synechocystis được biết đến là một loài vi khuẩn lam được nghiên cứu rộng rãi trên thế giới để sản xuất các hợp chất thứ cấp như nhựa sinh học poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), phenylpropanoids, và terpene. Tuy nhiên, những nghiên cứu về *Synechocystis* ở Việt Nam là rất hạn chế. *Synechocystis* (*S. salina* M8) là một chủng được phân lập và tinh sạch từ môi trường nước nông nghiệp Việt Nam. Nghiên cứu này sử dụng *S. salina* M8 để khảo sát tăng trưởng của vi khuẩn lam trong một số môi trường nhân tạo (BG-11), môi trường nước thải sinh hoạt và khả năng sản xuất nhựa sinh học PHB. Kết quả cho thấy, *S. salina* M8 sinh trưởng tốt trong môi trường BG-11 dưới chế độ quang dưỡng và môi trường nước thải sinh hoạt dưới chế độ tạp dưỡng trong điều kiện sục khí. Năng suất sinh khối của *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 và môi trường nước thải sinh hoạt đạt tương ứng 1,15 và 1,34g/L dưới cùng điều kiện ánh sáng 13500lux và sục không khí. Hàm lượng PHB đo được của *S. salina* M8 sau 6 ngày nuôi cấy trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt đạt tương ứng 4,52 và 6,34%. Hiệu quả xử lý các chất COD, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ đạt tương ứng trên 67,3; 82,6; 58,5 và 89,5%. Kết quả cho thấy, tuy hàm lượng PHB tổng hợp bởi M8 còn tương đối thấp, nhưng chứa nhiều tiềm năng để tối ưu quá trình tạp dưỡng và quang dưỡng nâng cao năng suất sinh khối và hàm lượng PHB.

Từ khóa: Nước thải sinh hoạt, PHB, quang dưỡng, *Synechocystis salina* M8, sinh khối, tạp dưỡng

ABSTRACT

Synechocystis is known as a cyanobacterium that has been widely studied in the world for the production of secondary compounds such as poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) bioplastics, phenylpropanoids, and terpenes. However, studies on *Synechocystis* in Vietnam are very limited. *Synechocystis* (*S. salina* M8) is a strain isolated and purified from agricultural water in Vietnam. This study used *S. salina* M8 to investigate the growth of cyanobacteria in some artificial media (BG-11), domestic wastewater, and the ability to accumulate PHB. The results showed that *S. salina* M8 grew well in BG-11 medium under phototrophic and domestic wastewater medium under mixotrophic cultivations. The biomass yield of *S. salina* M8 in BG-11 medium and domestic wastewater medium reached 1.15 and 1.34g/L, respectively, under the same light conditions of 13500lux and aeration. The PHB content measured of *S. salina* M8 after 6 days of culture in BG-11 medium and domestic wastewater medium reached 4.52 and 6.34% respectively. The treatment efficiency of COD, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ reached 67.3, 82.6, 58.5 and 89.5% respectively. The results showed that although the PHB content synthesized by *S. salina* M8 was still relatively low, it owns a promising potential to further optimize for improvement of biomass yield and PHB content.

Keywords: Domestic wastewater, poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), phototrophs, *Synechocystis salina* M8, biomass, mixotrophic.

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

²Khoa Khoa học Ứng dụng, Trường Đại học Công nghệ Giao thông Vận tải

³Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

⁴Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁵Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân Y

⁶Khoa Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Thủ đô Hà Nội

*Email: tdangthuan@ich.vast.vn

Ngày nhận bài: 20/02/2025

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 18/5/2025

Ngày chấp nhận đăng: 28/5/2025

1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, việc khai thác tiềm năng của vi khuẩn lam (cyanobacteria) trong xử lý nước thải đồng thời kết hợp sản xuất nhựa sinh học PHB (poly- β -hydroxybutyrate) đã thu hút được nhiều sự quan tâm của nhiều nhà khoa học. Các nghiên cứu quốc tế đã chứng minh rằng vi khuẩn lam không chỉ có khả năng xử lý hiệu quả nước thải, mà còn tích lũy được PHB trong điều kiện thiếu dinh dưỡng, đặc biệt là khi được nuôi cấy trong môi trường nước thải.

Trong nghiên cứu của Sudesh & Iwata [1] và các công trình tiếp theo như Markou & Nerantzis [2], vai trò của vi khuẩn lam trong loại bỏ dinh dưỡng (N, P) đã được chứng minh rõ ràng. Trong môi trường nước thải, nhiều loài vi khuẩn lam có thể sinh trưởng tốt mà không cần bổ sung dinh dưỡng vô cơ từ bên ngoài. Các nghiên cứu như của Troschl và các cộng sự đã khẳng định khả năng của các loài *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., và *Aphanothece* sp. trong tổng hợp PHB, nghiên cứu đã tiến hành sản xuất PHB ở quy mô 200 L và đạt năng suất lên tới 12 - 20% trọng lượng khô tế bào trong điều kiện tối ưu, qua đó chứng minh khả năng thương mại hóa sản phẩm từ vi khuẩn lam [3]. Một số nghiên cứu đã phát triển mô hình nuôi cấy vi khuẩn lam ở quy mô thí điểm kết hợp xử lý nước thải - sản xuất sinh khối - thu hồi PHB như trong nghiên cứu của Markl và cộng sự cũng nhấn mạnh rằng vi khuẩn lam có tiềm năng lớn trong sản xuất nhựa sinh học do không cần nguồn cacbon hữu cơ bổ sung, tận dụng được ánh sáng mặt trời và CO₂ - các nguồn tài nguyên dồi dào và rẻ tiền. Điều này làm giảm đáng kể chi phí sản xuất PHB so với vi khuẩn dị dưỡng [4].

Nghiên cứu của Diana Gomes Gradissimo chỉ ra vi khuẩn lam rất tiềm năng trong xử lý nước thải thực phẩm, đây là hướng đi đáng quan tâm trong phát triển nền kinh tế tuần hoàn [5]. Theo nghiên cứu của Nattawut Krasaesueb và cộng sự, chủng *Synechocystis* sp. được nuôi trong nước thải giàu NH₄⁺ và PO₄³⁻ đã cho hiệu suất loại bỏ chất dinh dưỡng là 96,99% đối với phosphate, 80,10% đối với nitrate, 67,90% đối với nitrite và 98,07% đối với amoni [6]. Điều này chứng minh tiềm năng của vi khuẩn lam trong xử lý sinh học nước thải đô thị và công nghiệp. Vi khuẩn lam có khả năng tích lũy PHB trong điều kiện thiếu dinh dưỡng (như nitrogen, phosphorus) hoặc thừa carbon. *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Spirulina platensis*, *Nostoc muscorum* là những chủng phổ biến đã được nghiên cứu trong sản xuất PHB [3].

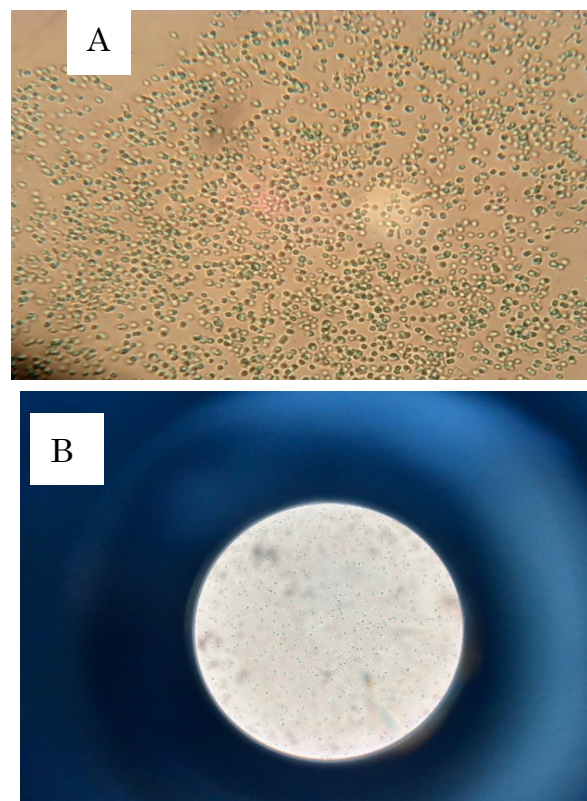
Theo nghiên cứu của Panda và cộng sự, hàm lượng PHB có thể đạt đến 10 - 15% trọng lượng khô tế bào trong điều

kiện tối ưu hóa [7]. Nghiên cứu do Koch và cộng sự thực hiện nhằm tối đa hóa hàm lượng PHB trong *Synechocystis* sp. PCC 6803 thông qua chiến lược kỹ thuật di truyền kết hợp điều kiện nuôi cấy tối ưu [8]. Mục tiêu chính là nâng cao tỉ lệ PHB trong tế bào mà không ảnh hưởng tiêu cực đến sinh trưởng hoặc khả năng chuyển hóa dinh dưỡng của tế bào, theo đó chúng biến đổi dị gen pha A và pha B từ *Cupriavidus necator*, hai gen này có liên quan đến con đường tổng hợp PHB, được đưa vào *Synechocystis* sp. PCC 6803 dưới sự điều khiển của promoter mạnh PpsbA2. Pha A mã hóa β -ketothiolase và pha B mã hóa acetoacetyl-CoA reductase, hai enzyme quan trọng trong quá trình tổng hợp PHB. Kết quả nghiên cứu của chúng biến đổi đạt hàm lượng PHB lên đến 63% trọng lượng khô tế bào (CDW) sau 3 tuần nuôi cấy trong điều kiện thiếu nitrogen và photpho, cao hơn đáng kể so với mức ~15% CDW ở chủng hoang dại, sinh khối đạt 1,2g/L, hiệu suất chuyển hoá carbon hữu cơ khoảng 27% [8, 9].

Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát tăng trưởng của *S. salina* M8 trong môi trường chuẩn BG-11 và nước thải sinh hoạt trong điều kiện không sục khí và sục khí, tiết trùng và không tiết trùng và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối của vi khuẩn lam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn tảo giống và phương pháp nhân giống



Hình 1. Hình thái của vi khuẩn lam *S. salina* M8(A-B)

Vi khuẩn lam *S. salina* M8. (hình 1) được cung cấp bởi Phòng Công nghệ Hóa sinh, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Điều kiện lưu giữ M8 được nuôi duy trì dưới ánh sáng 4.500lux, nhiệt độ 27°C, sục khí 0,1vvm, trong chai trung tính Duran 1000mL chứa 500 mL môi trường BG-11 có thành phần hóa học bao gồm: NaNO₃ (1,5g/L); K₂HPO₄ (0,04g/L); Citric acid (0,006g/L); MgSO₄·7H₂O (0,075g/L); CaCl₂·2H₂O (0,036g/L); Ferric ammonium citrate (0,006g/L); EDTA (0,001g/L); vi lượng A5 (1mL/L) (dung dịch vi lượng A5 gồm H₃BO₃ (2,86g/L); MnCl₂·4H₂O (1,81g/L); ZnSO₄·4H₂O (0,222g/L); Na₂MoO₄ (0,39g/L); CuSO₄·5H₂O (0,079g/L), Co(NO₃)₂·6H₂O (0,0494g/L)). Môi trường BG-11 có tỷ lệ N/P = 35:1.

2.2. Nguồn nước thải sinh hoạt

Nước thải sinh hoạt được lấy tại điểm thải của tại vị trí 20°56'20.6"N 105°46'10.0"E (X = 2316900, Y = 590600) thuộc thôn Nhân Trạch, phường Phú Lương, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam. Nước thải được lấy theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 5999:1995 (ISO 5667/10: 1992) về chất lượng nước - lấy mẫu - hướng dẫn lấy mẫu nước thải; Bảo quản theo tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 6663-3:2016 (ISO 5667-3:2012) về chất lượng nước - Lấy mẫu - Phần 3: Bảo quản và xử lý mẫu nước. Nước thải đựng vào can 5 - 10L và đưa về Phòng thí nghiệm Công nghệ Hóa sinh, Viện Hóa học và được sơ chế bằng phương pháp lọc qua giấy lọc có kích thước lỗ 3 - 7μm để loại bỏ rác, hạt lơ lửng trước khi tiến hành các thí nghiệm. Các thông số COD, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻, TN, TP được đo ngay sau khi mẫu được đưa về phòng thí nghiệm. Kết quả phân tích chất lượng nước thải đầu vào gồm pH = 7,5 ± 0,2; COD = 27,42 ± 0,51mg/L; NO₃⁻ = 0,03 ± 0,002mg/L; NH₄⁺ = 19,45 ± 0,27mg/L; TN = 19,48 ± 0,45mg/L; TP = 1,47 ± 0,03mg/L. Tỷ lệ C:N:P ban đầu của nước thải sinh hoạt là 19:13:1.

2.3. Nuôi vi khuẩn lam *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt

Vi khuẩn lam giống *S. salina* M8 được nuôi duy trì trong chai Duran 1000mL như mô tả trong Mục 2.1 trong vòng 6-8 ngày để đạt mật độ tế bào trên 2,5 × 10⁵TB/mL (tương đương OD₇₅₀ = 2,5Abs hoặc 1,0g/L). Sau đó mẫu vi khuẩn lam giống M8 được cấy vào trong chai Duran 1000mL chứa môi trường BG-11 hoặc nước thải sinh hoạt đã tiệt trùng hoặc không tiệt trùng ở tỷ lệ giống 20% (v/v), nuôi dưới điều kiện sục khí (0,1vvm) và khuấy từ (150 vòng/phút), pH ban đầu được điều chỉnh về 7, điều kiện ánh sáng là 0, 4.500, 9.000, 13.500, và 19.600lux. Bình phản ứng được trang bị ba đầu ống inox 304 (Φ6) để sục khí, lấy mẫu và thoát khí. Đầu inox 304 sục khí được nối với ống silicon kết nối với đồng hồ đo lưu lượng khí đến máy sục khí Fujimac.

2.4. Phương pháp đánh giá tăng trưởng của tảo

2.4.1. Đo mật độ quang, phương pháp trọng lượng

Sự phát triển của vi khuẩn lam được theo dõi hàng ngày bằng cách đo mật độ quang học ở bước sóng 750nm (OD₇₅₀) bằng máy đo UV-vis của Shimadzu, Nhật Bản. Khối lượng tế bào khô (DCW) được xác định bằng cách lấy 10mL mẫu từ dịch vụ nuôi cấy vi khuẩn lam, lọc qua màng lọc (0,45μm) và sấy khô ở 105°C trong 24 giờ để thu được khối lượng sinh khối đã làm khô. Nồng độ sinh khối (g/L) được tính toán từ trọng lượng khô vi khuẩn tạo ra trên một lít. Tốc độ tăng trưởng cụ thể (μ, ngày⁻¹) của dòng vi khuẩn lam được xác định bằng công thức sau:

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_2}{X_1}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Trong đó, X₁ và X₂ là nồng độ sinh khối vi khuẩn lam (g/L) được đo tại thời gian nuôi t₁ và t₂ (ngày).

2.4.2. Đo độ pH, nhiệt độ

Các thông số môi trường như pH và nhiệt độ đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và khả năng tổng hợp PHB của vi khuẩn lam. pH môi trường được đo bằng máy đo pH cầm tay hoặc giấy đo pH để theo dõi sự thay đổi theo thời gian. Nhiệt độ của hệ thống nuôi cấy được kiểm soát và đo bằng nhiệt kế điện tử hoặc cảm biến nhiệt tích hợp.

2.4.3. Phương pháp phân tích mẫu nước thải trong phòng thí nghiệm

- TCVN 6202:2008 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định Phospho, phương pháp đo phổ dùng amoni moliphat;

- TCVN 6180:1996 ISO 7890-3:1998 (E): Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định Nitrat, phương pháp trắc phổ dùng axit sunfosalixylic;

- TCVN 6179-1:1996 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định amoni;

- TCVN 6491:1996 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định nhu cầu oxy hoá học.

2.4.4. Phương pháp thu hoạch vi khuẩn lam

Việc thu hoạch vi khuẩn lam sau quá trình nuôi cấy được thực hiện bằng phương pháp lắng tự nhiên, ly tâm hoặc lọc màng. Ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 5 phút giúp thu được sinh khối vi khuẩn lam dưới dạng paste. Sinh khối sau đó được sấy lạnh đến khối lượng không đổi và nghiền thành bột, bảo quản dưới 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu chiết PHB.

2.4.5. Phương pháp chiết xuất và định lượng PHB

Bột sinh khối được phân tán trong metanol, giữ qua đêm ở 4°C để loại bỏ sắc tố và sau đó được ly tâm ở 4.000 vòng/phút. Bã sinh khối thu được, được sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi. PHB được chiết xuất trong cloroform nóng, sau đó kết tủa với diethyl ete lạnh và ly tâm ở tốc độ 11.000 vòng/phút trong 10 phút. PHB thô được rửa bằng axeton, hòa tan trong cloroform nóng rồi sau đó kết tủa với diethyl ete lạnh và ly tâm ở tốc độ 11.000 vòng/phút trong 10 phút vài lần để thu PHB sạch. Mẫu PHB sau ly tâm được sấy giảm áp ở 60°C đến khối lượng không đổi và bảo quản trong lọ thủy tinh dưới 4°C để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Để định lượng PHB, mẫu PHB sạch được cân và chuyển vào lọ thủy tinh 12mL. Mỗi lọ chứa 2mL cloroform và 2mL metanol đã axit hóa (chứa 3% axit sunfuric theo thể tích và 0,25mg/mL axit benzoic làm chất chuẩn nội). Các lọ được đậy kín bằng nắp lót Teflon, lắc và ủ ở 100°C trong 3,5 giờ. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, thêm 1mL nước khử ion để tách hỗn hợp thành pha nước và pha hữu cơ. Hỗn hợp được lắc xoáy trong 30 giây và để lắng cho đến khi tách pha hoàn toàn. Sau đó, lớp hữu cơ được lấy mẫu và phân tích bằng máy sắc ký khí Agilent 8890 GC được trang bị cột HP-5 (Agilent Technologies, Santa Clara, Mỹ) và đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID). Chương trình nhiệt độ lò được thiết lập như sau: 160°C trong 4 phút, 200°C trong 4 phút và 275°C trong 6 phút. Đường chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng muối natri axit DL-3-hydroxybutyric, với các nồng độ chuẩn từ 0,1 đến 2,0mg/mL để xác định hàm lượng PHB bằng sắc ký khí (GC-FID). Hàm lượng PHB (wt%) được tính bằng cách chuẩn hóa khối lượng PHB được phát hiện theo trọng lượng khô ban đầu của tế bào (wPHB/wCDW hoặc %) [10].

Hàm lượng PHB được xác định tương ứng theo phương trình:

$$A_{PHB} = \frac{C_{PHB} \times V}{m} \quad (2)$$

Trong đó A_{PHB} là hàm lượng PHB tính theo sinh khối khô (mg/g, hoặc %); C_{PHB} là nồng độ PHB trong dịch chiết vi khuẩn lam (mg/mL) định lượng bằng GC-FID; V là thể tích dịch chiết vi khuẩn lam chứa PHB (mL); m là khối lượng khô của sinh khối vi khuẩn lam được sử dụng (g).

Ngoài ra phổ FT-IR của PHB được đo trên máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) (Spectrum Two FT-IR Spectrometer, Perkin Elmer, Anh).

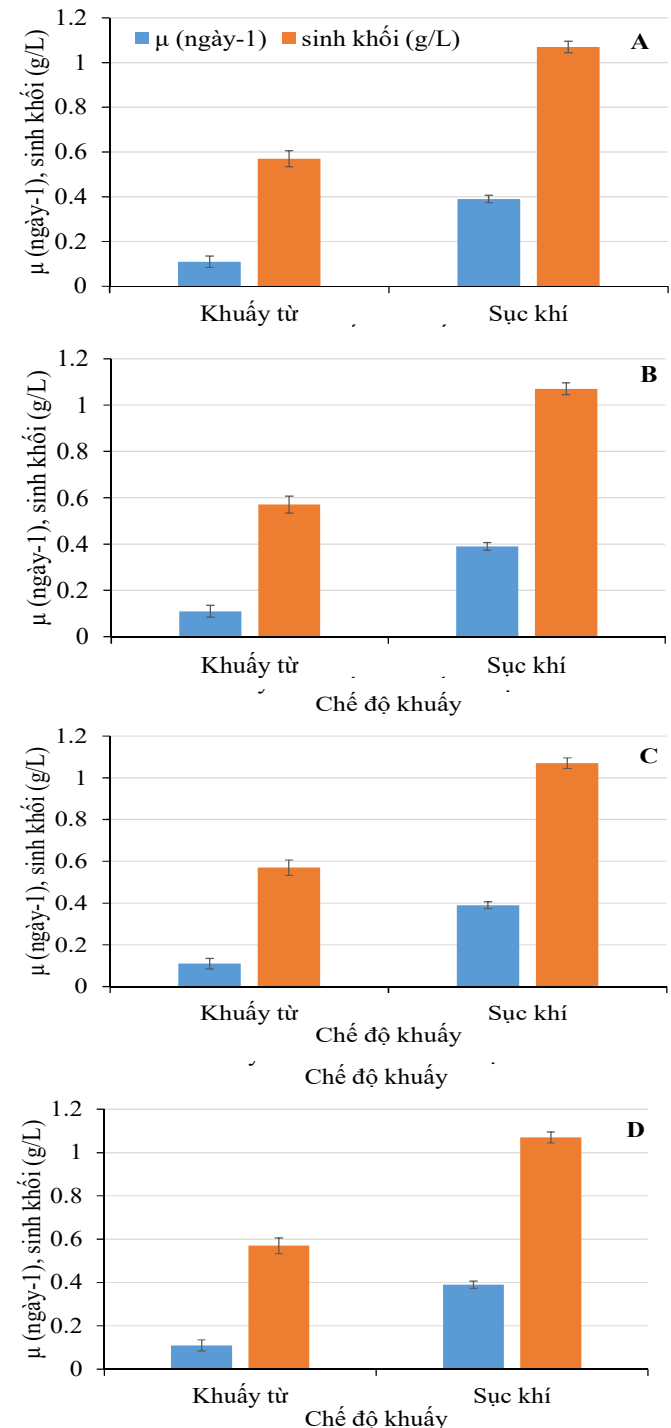
2.4.6. Phân tích số liệu

Thí nghiệm được thực hiện hai lần lặp lại và kết quả đo được trình bày bằng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Số

liệu thô được xử lý trên phần mềm Excel 2016 của Microsoft.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi và chế độ khuấy trộn đến tăng trưởng của *Synechocystis salina* M8



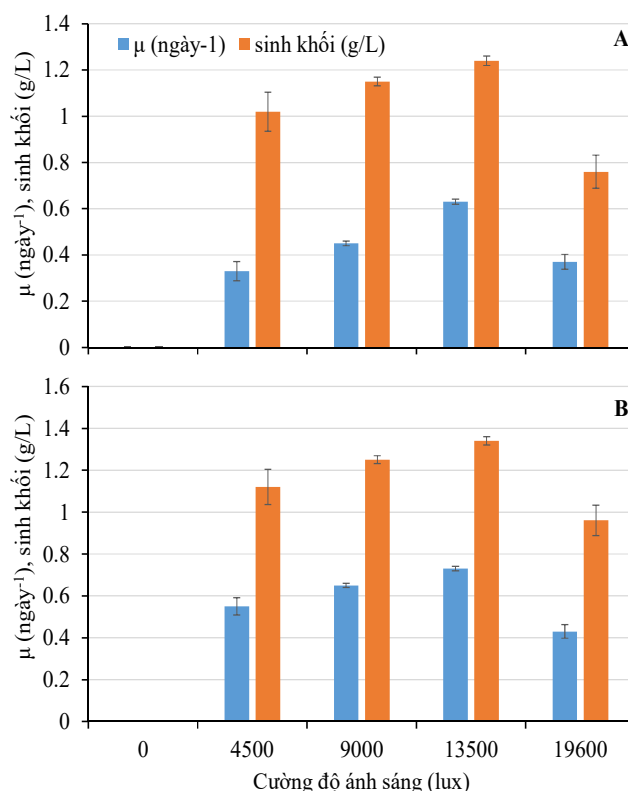
Hình 2. Tăng trưởng riêng và sinh khối của *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 tiết trùng (A), không tiết trùng (B), nước thải tiết trùng (C) và nước thải thô (D) dưới hai chế độ khuấy trộn là khuấy từ và sục khí. Số liệu được đo tại ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy dưới điều kiện ánh sáng 13.500lux, nhiệt độ 27°C

Môi trường nuôi chứa dinh dưỡng cho vi khuẩn lam sinh trưởng, nhưng đồng thời cũng chứa các vi sinh vật cộng sinh hoặc có hại cho vi khuẩn lam. Do đó, môi trường nuôi có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình phát triển của *Synechocystis salina* M8. Số liệu trong hình 2 thể hiện tốc độ tăng trưởng riêng và năng suất sinh khối M8 nuôi trong môi trường chuẩn BG-11 và nước thải sinh hoạt trong điều kiện tiết trùng và không tiết trùng, chế độ nuôi khuấy từ và sục khí. Kết quả trực quan cho thấy, môi trường chuẩn BG-11 và nước thải sinh hoạt tiết trùng và không tiết trùng không có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của M8. Trong khi đó, chế độ khuấy trộn có ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng và năng suất sinh khối của M8. Cụ thể, tốc độ tăng trưởng riêng và năng suất sinh khối của M8 trong BG-11 tiết trùng và không tiết trùng đạt lần lượt là $0,11 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,57 \text{ g/L}$ (hình 2A) và $0,17 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,74 \text{ g/L}$ (hình 2B) ở chế độ khuấy từ 150 vòng/phút. Khi chế độ sục khí ở tốc độ $0,1 \text{ vmm}$, tốc độ tăng trưởng riêng và năng suất sinh khối của M8 tăng lên đến $0,39 \text{ ngày}^{-1}$ và $1,07 \text{ g/L}$ (hình 2A) và $0,33 \text{ ngày}^{-1}$ và $1,03 \text{ g/L}$ (hình 2B) cho tương ứng BG-11 tiết trùng và không tiết trùng. Tương tự như vậy, trong nước thải sinh hoạt tiết trùng và không tiết trùng, M8 đạt được tốc độ tăng trưởng riêng và năng suất sinh khối là $0,23 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,77 \text{ g/L}$ (hình 2C) và $0,31 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,83 \text{ g/L}$ (hình 2D) trong điều kiện khuấy từ. Đối với sục khí, M8 trong nước thải tiết trùng và không tiết trùng đạt tốc độ tăng trưởng riêng và năng suất sinh khối tương ứng là $0,41 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,98 \text{ g/L}$ (hình 2C) và $0,55 \text{ ngày}^{-1}$ và $1,12 \text{ g/L}$ (hình 2D). Như vậy, khi sục khí tốc độ tăng trưởng riêng của M8 trong cả hai môi trường nuôi tăng lên gần 3 lần, và năng suất sinh khối tăng lên 2 lần so với chế độ chỉ khuấy từ. Kết quả này cho thấy, M8 sống tốt trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt thô. Điều này có một ý nghĩa rất lớn trong ứng dụng M8 để xử lý nước thải mà không yêu cầu tiết trùng, và tiết kiệm được rất nhiều năng lượng. Mặt khác, sục khí làm tăng tốc độ tăng trưởng của M8 và năng suất sinh khối. Điều này là hợp lý vì vi khuẩn lam cần thực hiện quá trình quang hợp dùng CO_2 của không khí để tổng hợp sinh khối. Quá trình chỉ khuấy trộn bằng khuấy từ không làm tăng khả năng phân tán CO_2 từ không khí, chỉ có tính chất khuấy trộn tế bào vi khuẩn lam trong môi trường nuôi. Khuấy trộn bằng sục khí có hai ưu điểm là giúp tế bào vi khuẩn lam được trao đổi chất tốt với dinh dưỡng, đồng thời tăng tốc quá trình khuếch tán và hòa tan CO_2 từ không khí để tạo ra ion HCO_3^- phục vụ quá trình quang hợp của tảo [11].

3.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đến tăng trưởng và hiệu quả loại bỏ COD, nitrogen và phosphorus trong nước thải của *S. salina* M8

Ánh sáng là yếu tố trọng yếu trong sự phát triển của vi khuẩn lam quang dưỡng và tảo. Kết quả thể hiện

rõ trên hình 3 cho thấy, khi không có ánh sáng, M8 không có sự phát triển khi nuôi trong cả môi trường chuẩn BG-11 và nước thải sinh hoạt. Khi tăng cường độ ánh sáng từ 4.500 lux lên 13.500 lux , thì tốc độ tăng trưởng riêng và sinh khối của M8 nuôi trong môi trường BG-11 tăng từ $0,33$ lên $0,62 \text{ ngày}^{-1}$ và $1,02$ lên $1,24 \text{ g/L}$, sau đó giảm xuống tương ứng $0,37 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,76 \text{ g/L}$ khi cường độ ánh sáng tăng lên tới 19.600 lux (hình 3A). Trong nước thải sinh hoạt thô, *S. salina* M8 đạt được tốc độ tăng trưởng riêng tăng từ $0,55$ lên $0,73 \text{ ngày}^{-1}$ và $1,12$ lên $1,34 \text{ g/L}$, sau đó giảm tương ứng xuống $0,43 \text{ ngày}^{-1}$ và $0,96 \text{ g/L}$ khi cường độ ánh sáng tăng lên tới 19.600 lux . Như vậy, *S. salina* M8 có thể sinh trưởng tốt ở điều kiện ánh sáng mạnh 13.500 lux , tương đương $230 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$.



Hình 3. Tăng trưởng riêng và sinh khối của *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 không tiết trùng (A), và nước thải thô (B) dưới điều kiện ánh sáng khác nhau. Số liệu được đo tại ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy dưới điều kiện nhiệt độ 27°C

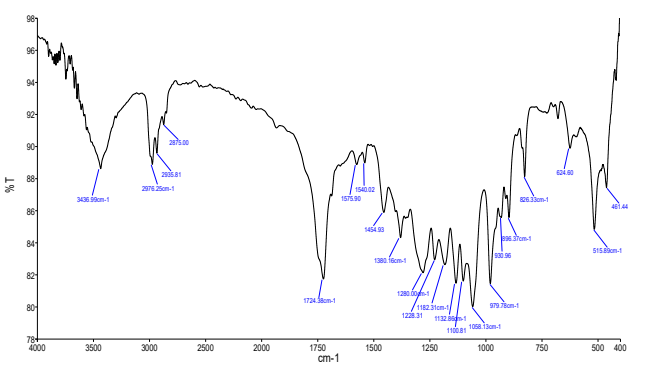
Hiệu suất loại bỏ NO_3^- , PO_4^{3-} bởi *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 đạt tương ứng 87,4 và 85,2%. Trong môi trường nước thải sinh hoạt thô, M8 đạt được hiệu suất loại bỏ COD, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} lần lượt là 67,3; 82,6; 58,5; và 89,5% (bảng 1). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nattawut Krasaesueb và cộng sự, chủng *Synechocystis* sp. được nuôi trong nước thải giàu NH_4^+ và PO_4^{3-} đã cho hiệu suất loại bỏ chất dinh dưỡng là 96,99% đối với phosphate; 80,10% đối với nitrate; 67,90% đối với nitrite và 98,07% đối với amoni [6].

Bảng 1. Hiệu suất loại bỏ COD, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ bởi *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 và nước thải dưới điều kiện cường độ ánh sáng 13.500lux

Chỉ tiêu	BG-11		Hiệu suất (%)	Nước thải		Hiệu suất (%)
	Vào	Ra		Vào	Ra	
COD (mg/L)	ND	ND	ND	27,42 ± 0,51	8,97 ± 0,05	67,3 ± 0,21
NH ₄ ⁺ (mg/L)	ND	ND	ND	19,45 ± 0,27	3,38 ± 0,01	82,6 ± 0,17
NO ₃ ⁻ (mg/L)	247,1 ± 2,71	31,13 ± 0,19	87,4 ± 1,36	0,03 ± 0,002	0,01 ± 0,00	58,5 ± 0,26
TN (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	7,13 ± 0,31	1,06 ± 0,04	85,2 ± 0,95	1,47 ± 0,03	0,15 ± 0,03	89,5 ± 0,51
TP (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
COD: Nhu cầu oxy hóa học			TP: Tổng phosphorus			
TN: Tổng nitrogen			ND: Không xác định			

3.3. Hàm lượng và đặc tính của PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* M8

Sinh khối *S. salina* M8 được thu hoạch bằng li tâm, sấy khô và nghiền thành bột. PHB được chiết và tinh sạch. Kết quả đo phổ FT-IR xác nhận rằng PHB đã được tổng hợp và tinh sạch thành công từ sinh khối vi tảo *S. salina* M8 được thể hiện trên hình 4. Các đỉnh pic có cường độ cao được ghi nhận ở 1724cm⁻¹ và 1280cm⁻¹. Các pic này biểu thị carbonyl (C = O) và C-O-C không đối xứng dao động kéo dài tương ứng là đặc trưng của liên kết este có trong phân tử PHB. Các dải hấp phụ khác thu được ở 1380, 1454, 2976 - 2875 và 3436cm⁻¹ biểu thị các nhóm chức -CH₃, -CH₂, -CH và nhóm O-H tương ứng. Dải hấp thụ ở bước sóng 1132cm⁻¹ đến 826cm⁻¹ là được gắn vào rung động kéo dài C-O và C-C của cấu trúc PHB vô định hình. Các đỉnh gần như giống hệt nhau ở 1380, 1724, 2976, 2935, 3436cm⁻¹, biểu thị các nhóm chức năng khác nhau của PHB chiết từ sinh khối vi khuẩn lam *Spirulina subsalsa* [12] và *Nostoc muscorum* NCCU- 442 [13] đã được công bố. Những đặc điểm này xác nhận rằng sản phẩm được tổng hợp từ sinh khối vi khuẩn *Synechocystis* M8 là poly(3-hydroxybutyrate) và đã được loại bỏ tạp chất protein/lipid bằng quá trình chiết tách với chloroform.



Hình 4. Phổ FT-IR của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

Hàm lượng PHB tính theo khối lượng khô của sinh khối *S. salina* M8 nuôi trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt thô đo được bằng GC-FID đạt tương ứng 4,52 và 6,34% (bảng 2). Mặc dù môi trường BG-11 là môi trường giàu dinh dưỡng và thuận lợi cho sự sinh trưởng của *S. salina* M8 nhưng lại không kích thích cơ chế tích lũy PHB. Hàm lượng PHB thường được tích lũy cao hơn trong điều kiện thiếu hụt một số chất dinh dưỡng nhất định như nitrogen hoặc phosphorus, trong khi vẫn còn nguồn Carbon dồi dào. Trong nước thải sinh hoạt có tỷ lệ C:N:P mất cân đối, dẫn đến *S. salina* M8 tích lũy PHB như một dạng lưu trữ Carbon. Ngoài ra, nước thải sinh hoạt có thể chứa các hợp chất hữu cơ dễ phân hủy, kích thích quá trình tích trữ Carbon thừa dưới dạng PHB. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với một số công bố gần đây đối với các chủng vi khuẩn lam *Oscillatoria* sp. và *Anabaena* sp. cho thấy khả năng xử lý các hợp chất hữu cơ và vô cơ trong nước thải công nghiệp mà vẫn tích lũy được PHB tới 8 - 10% trọng lượng khô [13, 14]. Trong khi đó, nghiên cứu của Panda và cộng sự chỉ ra hàm lượng PHB tích lũy trong tế bào vi khuẩn lam có thể đạt đến 10 - 15% trọng lượng khô tế bào trong điều kiện tối ưu hóa [7].

Bảng 2. Hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* M8 nuôi trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt

Môi trường nuôi	Hàm lượng PHB (%)
BG-11	4,52 ± 0,04
Nước thải sinh hoạt	6,34 ± 0,11

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã sơ bộ khảo sát tăng trưởng và định lượng hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8 trong một số môi trường dinh dưỡng BG-11 và nước thải sinh hoạt. Kết quả cho thấy, *S. salina* M8 sinh trưởng tốt trong môi trường BG-11 dưới chế độ quang dưỡng và môi trường nước thải sinh hoạt dưới chế độ tạp dưỡng trong điều kiện sục khí. Năng suất sinh khối của *S. salina* M8 trong môi trường BG-11 và môi trường nước thải sinh hoạt đạt

tương ứng 1,15 và 1,34g/L dưới cùng điều kiện ánh sáng 13.500lux và sục không khí 0,1vvm. Hàm lượng PHB đo được của *S. salina* M8 sau 6 ngày nuôi cấy trong môi trường BG-11 và nước thải sinh hoạt đạt tương ứng 4,52 và 6,34%. Hiệu quả xử lý các chất COD, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} đạt tương ứng trên 67,3; 82,6; 58,5 và 89,5%. Kết quả cho thấy, tuy hàm lượng PHB được tổng hợp bởi M8 còn tương đối thấp, nhưng chứa nhiều tiềm năng và cần có các nghiên cứu tiếp theo để tối ưu hoá giữa hiệu suất xử lý nước thải và hàm lượng tích lũy PHB thông qua các quá trình tập dưỡng và quang dưỡng, từ đó nâng cao năng suất sinh khối cũng như hàm lượng PHB thu được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. Sudesh, T. Iwata, "Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics," *Clean - Soil, Air, Water*, 36, 433-442, 2008.
- [2]. G. Markou, E. Nerantzis, "Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions," *Biotechnology Advances*, 31, 1532-1542, 2013.
- [3]. C. Troschl, K. Meixner, B. Drosch, "Cyanobacterial PHA Production-Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant," *Bioengineering* (Basel), 4, 2017.
- [4]. E. Markl, M. Lackner, H. Grünbichler, "Cyanobacteria for PHB Bioplastics Production: A Review," in: Y.K. Wong (Ed.) *Algae*, IntechOpen, Rijeka, 2018.
- [5]. D. Gomes Gradissimo, L. Pereira Xavier, A. Valadares Santos, "Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy," *Molecules*, 25, 4331, 2020.
- [6]. N. Krasaesus, A. Incharoensakdi, W. Khetkorn, "Utilization of shrimp wastewater for poly-β-hydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain ΔSphU cultivated in photobioreactor," *Biotechnology Reports*, 23, e00345, 2019.
- [7]. B. Panda, P. Jain, L. Sharma, N. Mallick, "Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803," *Bioresource Technology*, 97, 1296-1301, 2006.
- [8]. M. Koch, J. Bruckmoser, J. Scholl, W. Hauf, B. Rieger, K. Forchhammer, "Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC," *Microb Cell Fact*, 19, 231, 2020.
- [9]. M. Koch, J. Bruckmoser, J. Scholl, W. Hauf, B. Rieger, K. Forchhammer, "Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: development of a new photosynthetic overproduction strain," *Environmental Science, Biology, Engineering*, 2020.
- [10]. J. Myung, Z. Wang, T. Yuan, P. Zhang, J.D. Van Nostrand, J. Zhou, C.S. Criddle, "Production of Nitrous Oxide from Nitrite in Stable Type II Methanotrophic Enrichments," *Environmental Science & Technology*, 49, 10969-10975, 2015.

[11]. C.V.T. Do, N.T.T. Nguyen, T.D. Tran, M.H.T. Pham, T.Y.T. Pham, "Capability of carbon fixation in bicarbonate-based and carbon dioxide-based systems by *Scenedesmus acuminatus* TH04," *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107858, 2021.

[12]. A. Shrivastav, S.K. Mishra, S. Mishra, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India," *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 255-260, 2010.

[13]. S. Ansari, T. Fatma, "Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization," *PLoS One*, 11, e0158168, 2016.

[14]. R. Afreen, S. Tyagi, G.P. Singh, M. Singh, "Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System," *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 624885, 2021.

AUTHORS INFORMATION

**Nguyen Thi Phuong Dung^{1,2}, Nguyen Thi Thu Phuong³,
Bui Thi Thu Uyen⁴, Do The Khanh⁵, Luu Ngoc Sinh⁶,
Tran Dang Thuan⁴**

¹Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

²Faculty of Applied Sciences, University of Transport Technology, Vietnam

³Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry, Vietnam

⁴Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

⁵Institute of Pharmacy Training, Vietnam Military Medical University, Vietnam

⁶Faculty of Environmental Engineering, Hanoi Metropolitan University, Vietnam