

# ĐỊNH DANH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM SINH TRƯỞNG CỦA CHỦNG VI KHUẨN LAM *Arthrospira platensis* PHÂN LẬP TỪ HỒ VĂN QUÁN

Nguyễn Đức Bách<sup>1\*</sup>, Chu Đức Hà<sup>2</sup>, Vũ Lê Diệu Hương<sup>1</sup>, Phí Thị Cẩm Miện<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc Gia Hà Nội

\*Tác giả liên hệ: [ndbach@vnua.edu.vn](mailto:ndbach@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 06.04.2021

Ngày chấp nhận đăng: 05.05.2021

## TÓM TẮT

Tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) là loài vi khuẩn lam được nuôi phổ biến làm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và thức ăn thủy sản do giàu protein, sắc tố, vitamin, axit béo không no và các nguyên tố vi lượng. Ở Việt Nam, nghiên cứu về tảo xoắn *Spirulina* bắt đầu từ cuối những năm 1980, tập trung chủ yếu đánh giá các yếu tố môi trường và kỹ thuật nuôi. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập, định danh và xác định các đặc điểm sinh học của loài tảo xoắn có nguồn gốc bản địa còn hạn chế. Với mục tiêu khai thác nguồn gen bản địa, một chủng vi khuẩn lam phân bố ở hồ Văn Quán (Hà Nội) đã được phân lập, định danh và xác định đặc điểm sinh trưởng trong các môi trường Hoagland, BBM, BG11, ½ Chu-10 và Zarrouk. Phân tích đặc điểm hình thái sử dụng kính hiển vi quang học và điện tử quét kết hợp với phân tích vùng trình tự 16S rRNA, cho thấy chủng vi khuẩn lam phân lập đã được xác định thuộc loài *Arthrospira platensis*. Ngoài trừ môi trường Zarouck, loài vi khuẩn lam này có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường BG11 và BBM. Nghiên cứu tạo nền tảng ban đầu để khai thác nguồn gen bản địa cho thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và thức ăn nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: *Arthrospira platensis*, hồ Văn Quán, môi trường BG11, phân lập, tảo xoắn *Spirulina*.

## Isolation and Characterization of the Strain *Arthrospira platensis* Isolated from Van Quan Lake

### ABSTRACT

*Spirulina* (*Arthrospira platensis*) is a species of Cyanobacteria and is widely cultivated for functional foods, cosmetics and aquaculture feed due to its rich protein, pigments, vitamins, unsaturated fatty acids and trace elements. In Vietnam, *Spirulina* was first studied in the late 1970s, mainly focused on investigating environmental and nutritive factors as well as culture techniques. However, very few studies on isolation, identification and characterization of native strain have been done. With the aim of exploiting the indigenous genetic resources, a strain of Cyanobacteria distributed in Van Quan lake (Hanoi) was isolated, identified and cultured in the medium of Hoagland, BBM, BG-11, ½ Chu-10 and Zarrouk. By morphological analysis using optical and electron scanning microscopy combined with 16S rRNA sequence analysis, the isolated strain was identified as *Arthrospira platensis*. As the results attained, except for Zarrouk media, this species can grow well in in BG-11 and BBM media. The study provided an initial scientific basis for exploiting indigenous genetic resources for functional foods, cosmetics and aquaculture feeds.

Keywords: *Arthrospira platensis*, BG11 medium, isolation, *Spirulina*, Van Quan lake.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Arthrospira* là một chi thuộc nhóm vi khuẩn lam với cấu trúc dạng sợi xoắn đa bào phân bố rộng ở hầu hết các thủy vực trên thế

giới. Cho đến nay, 2 loài tảo xoắn thuộc chi *Arthrospira* được nuôi trồng trên quy mô lớn ở nhiều quốc gia trên thế giới là *A. maxima* và *A. platensis*. Tên gọi tảo xoắn *Spirulina* mang tính lịch sử là tên gọi chung của 2 loài

*A. maxima* và *A. platensis*. Tảo xoắn được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, hóa dược, thức ăn nuôi trồng thủy sản do giàu protein (60-65%), sắc tố phycocyanin,  $\beta$ -carotene, chlorophyll a và axit béo không no ( $\gamma$ -linolenic acid/GLA) và các nguyên tố vi lượng như kẽm, sắt, canxi (Menegotto & cs., 2016; Ahsan & cs., 2008; Vonshak, 1997).

Về mặt lịch sử, ngay từ cuối thế kỷ XIX, Gomont đã đề cập đến cả 2 chi *Arthrospira* và *Spirulina* (Gomont, 1982), nhưng sau đó chi *Arthrospira* không được coi là một chi riêng rẽ và được hợp nhất cùng với chi *Spirulina* (Geitler, 1925). Gần đây, bằng cách so sánh đồng thời các đặc điểm hình thái và trình tự DNA, *Arthrospira* và *Spirulina* đã được xác định lại thành 2 chi riêng rẽ (Komárek & cs., 2014; Sili & cs., 2012). Ngoài khác nhau về đặc điểm hình thái và di truyền, sự khác biệt giữa 2 chi còn thể hiện ở khả năng tổng hợp  $\gamma$ -linolenic acid (GLA), *Arthrospira* có khả năng tổng hợp axit  $\gamma$ -linolenic acid (GLA), trong khi đó *Spirulina* không tổng hợp được GLA (Vonshak, 1997).

Trên thế giới, các chủng tảo xoắn được đưa vào sản xuất ở quy mô công nghiệp được biết đến chủ yếu là *Spirulina platensis* Gomont, *S. platensis* NIES-39, *S. platensis* Geitler, *S. platensis* (Nordstedt) Geitler, *S. maxima* (*S. geitleri*) (Setch. et Gardner), *Arthrospira fusiformis* (Voronichin) và *A. maxima*. Trong số các loài thuộc chi *Arthrospira*, 2 loài *A. platensis* và *A. maxima* được phát hiện ở các hồ nhiệt đới và cận nhiệt đới có pH kiềm với nồng độ carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) và bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) cao (Habib & cs., 2008). Loài *A. platensis* được phát hiện ở châu Phi, châu Á và Nam Mỹ, trong khi đó loài *A. maxima* mới chỉ được phát hiện ở Trung Mỹ (Vonshak, 1997).

Cho đến nay ở Việt Nam, nghiên cứu về các vi khuẩn lam chủ yếu tập trung vào việc nuôi để thu sinh khối tảo xoắn *Spirulina* (Nguyễn Thuý Nga & cs., 2020; Nguyễn Đức Bách & cs., 2020; Đặng Đình Kim & cs., 2011) và đánh giá sự phân bố của một số loài thuộc chi *Anabaena*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Synechocystis*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, *Microcystis*, *Aphanocapsa*, *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Phormidium* và *Oscillatoria* với mục

tiêu sử dụng làm phân bón giàu nitơ cho các ruộng lúa (Nguyễn Xuân Hoà & cs., 2020; Nguyễn Thị Hạnh Nguyên & cs., 2019; Nguyễn Đình San & cs., 2015) và nghiên cứu về khả năng sinh độc tố ở các hồ (Dương Thị Thuý & cs., 2012). Mặc dù sự phân bố của tảo lam ở nhiều thủy vực nước ngọt đã được đề cập, tuy nhiên việc phân lập và định tên các loài thuộc chi *Arthrospira* ở Việt Nam còn hạn chế. Trong một số năm gần đây, nhóm nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng đã khảo sát và phân lập một số chủng vi khuẩn lam thuộc loài *A. platensis* (Đặng Diễm Hồng, 2019). Qua khảo sát sơ bộ các mẫu nước thu thập từ một số thủy vực nước ngọt ở Hà Nội cho thấy sự đa dạng các loài vi khuẩn lam trong đó có loài thuộc chi *Arthrospira*. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập, định danh một loài thuộc chi *Arthrospira* tại hồ Văn Quán (Hà Nội) và đánh giá sơ bộ đặc điểm sinh trưởng làm cơ sở để khai thác nguồn gen này làm thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và thức ăn nuôi trồng thủy sản.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Thu thập mẫu tảo

Chủng tảo xoắn được thu thập ở tầng nước mặt ven hồ Văn Quán, quận Hà Đông, Hà Nội, bằng cách sử dụng lưới vớt tảo kích thước lỗ 20-30 $\mu\text{m}$ . Thời điểm thu mẫu từ 10-11 giờ sáng (6/2020). Mẫu tảo sau khi thu thập được quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX41, Nhật Bản) ở độ khuếch đại 100 và 400 lần (tương ứng vật kính 10X và 40X) để đánh giá đặc điểm hình thái.

#### 2.1.2. Môi trường nuôi tảo

Để phân lập và nuôi chủng tảo phân lập, 4 môi trường được sử dụng bao gồm môi trường Hoagland (Hoagland & cs., 1933), môi trường Bold's Basal Medium/BBM (Nichols & cs., 1965), môi trường 1/2 Chu-10 (Stein, 1973), môi trường BG11 (Waterbury & cs., 1991) và môi trường Zarrouk (Zarrouk, 1966). Các môi trường thạch sử dụng để phân lập được bổ sung agar với hàm lượng 15 g/l. Thành phần của các môi trường được tổng hợp trong bảng 1.

**Bảng 1. Thành phần các môi trường Hoagland, BBM, 1/2 Chu-10, BG11 và Zarrouk**

Thành phần	Môi trường (mg/l)				
	Hoagland	BBM	½ Chu-10	BG11	Zarrouk
KNO <sub>3</sub>	300	-	-	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	20	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	18,87	-	-	-
Fe (chelate)	22,5	-	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	4,98 <sup>(1)</sup>	-	-	10
NaNO <sub>3</sub>	-	250	-	1.500	2.500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	-	75	250	40	660
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	175	-	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	1.000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	25	-	36	30
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	-	6	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	36,63	1,25 g	75	-
MgCl <sub>2</sub>	240	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub>	-	-	0,147	1,81	-
NaCl	-	-	-	-	1000
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	17.000
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	-	-	20	-
Na <sub>2</sub> EDTA	-	63,61 <sup>(2)</sup>	0,05	1	80
KOH	-	31 <sup>(2)</sup>	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	0,01	-	-
Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O	-	0,49	-	0,0494	0,044
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	1,57	0,01	-	0,079
Fe <sub>2</sub> (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>3</sub>	5	-	-	-	-
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	40	-	-
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	11,42	0,124	2,86	2,86
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> .24H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	0,096
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,016	1,44	-	-	1,81
MoO <sub>3</sub>	-	0,71	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	1,19	0,006	0,39	0,39
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	15	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	-	-	-	-	0,023
NiSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	0,048
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	0,018
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	0,04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22	8,82	0,022	-	0,222
Vitamin B1	-	-	50µg	-	-
Vitamin B7	-	-	2,5µg	-	-
Vitamin B12	-	-	2,5µg	-	-
Biotin	-	-	2,5µg	-	-
pH	6,8-7,0 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	6,6-6,7 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	8,3-8,5 (KOH)	7,5 (KOH)	9,0

Ghi chú: <sup>(1)</sup> Dung dịch gốc được pha bởi 4,98g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O trong 1 lít nước được axit hoá bằng 1ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; <sup>(2)</sup> Dung dịch gốc 50g EDTA và 31g KOH hoà tan trong 1 lít H<sub>2</sub>O.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phân lập và làm thuần

Mẫu tảo sau khi thu thập được rửa 4 lần trong các môi trường lỏng vô trùng (Hoagland, BBM, BG11, 1/2 Chu-10 và Zarrouk) bằng cách ly tâm ở tốc độ 1.500g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng (25°C). Cặn tế bào sau đó được pha loãng và cấy trải trên các môi trường thạch tương ứng trong cùng ngày thu mẫu. Mẫu tảo nuôi trên các đĩa Petri được giữ ở nhiệt độ phòng (25-28°C) và chiếu sáng với chu kỳ sáng tối (16:8) bằng đèn huỳnh quang, cường độ 1.500Lux. Trong quá trình nuôi, khuẩn lạc được quan sát trực tiếp bằng kính hiển vi soi nổi (Nikon SMZ745, Nhật Bản). Hình thái vi tảo được quan sát bằng cách lấy mẫu từ khuẩn lạc đơn và soi dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX41, Nhật Bản) ở độ phóng đại 100 và 400 lần. Các sợi tảo đơn riêng rẽ sau đó được phân lập bằng cách sử dụng micropipette khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (Robert, 2015). Sợi tảo đơn sau đó được cấy trải trên các môi trường thạch, sau đó tiếp tục được pha loãng và nuôi trong điều kiện như mô tả. Quá trình được lặp lại cho tới khi khuẩn lạc chứa các sợi tảo thuần với đặc điểm hình thái đồng nhất và không còn nhiễm khuẩn hoặc nấm. Trong quá trình phân lập, để hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn, các loài tảo thuộc nhóm nhân chuẩn (eukaryote) và nấm, kháng sinh cycloheximide được bổ sung ở nồng độ từ 25 µg/ml. Để thu được chủng thuần khiết, sau mỗi 5 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng, chủng phân lập được rửa bằng cách ly tâm 3 lần trong môi trường BG-11 (vô khuẩn), sau đó cặn tế bào được hoà tan lại trong môi trường BG-11 bổ sung hỗn hợp kháng sinh neomycin (50 µg/ml) và cycloheximide (20 µg/ml) và nuôi lắc nhẹ (100 vòng/ phút) trên máy lắc (HY-5A, Trung Quốc) trong tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó dịch huyền phù được ly tâm và tái hoà tan bằng môi trường BG-11 có bổ sung cycloheximide 25 µg/ml chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang cường độ ánh sáng 1.500Lux. Quá trình được lặp lại nhiều lần cho đến khi chủng tảo phân lập thuần khiết (Gang-Guk & cs., 2008; Rout & cs., 2013).

### 2.2.2. Mô tả đặc điểm hình thái

Chủng tảo xoắn sau khi phân lập được nuôi từng bước trong các bình nón thuỷ tinh có thể tích 50ml sau đó tăng dần thể tích và sau đó được nuôi trong bình thuỷ tinh Pyrex từ 200ml đến 2 lít ở nhiệt độ phòng (25 ± 3°C), chiếu sáng liên tục bằng đèn huỳnh quang T8 Deluxe 36W (Rạng Đông) và được sục bằng khí nén (lọc vô khuẩn qua màng lọc 0,25µm) với tỉ lệ khí sục 10-15% (thể tích khí sục so với thể tích huyền phù tảo trong 1 phút). Trong quá trình nuôi, thể tích huyền phù tảo chiếm khoảng 1/3 đến thể tích bình nuôi. Khi mật độ tảo đo ở bước sóng 750nm ( $OD_{750}$ ) đạt từ 0,8-1,0 sẽ được cấy chuyển sang bình mới. Trong các thí nghiệm, mật độ tảo ban đầu được đặt ở  $OD_{750} = 0,1$  (đo tại bước sóng 750nm). Hình thái của chủng vi tảo phân lập sau khi làm thuần được mô tả dựa vào quan sát dưới kính hiển vi quang học (độ khuếch 100X và 400X) và kính hiển vi điện tử quét (độ khuếch đại từ 1.000X đến 5.000X). Để quan sát cấu trúc siêu hiển vi của chủng tảo phân lập, mẫu tảo tươi được cố định và quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương S-4800 (M: x25-x800.000, d: 1nm, U: 0,5-30kV). Hình thái vi khuẩn lam *Arthrospira* được mô tả theo nghiên cứu của Vonshak (Vonshak & cs., 1997).

### 2.2.3. Xác định môi trường nuôi phù hợp và tốc độ sinh trưởng riêng của chủng vi tảo phân lập

Chủng tảo xoắn sau khi làm thuần được thử nghiệm nuôi trong 4 môi trường (Bảng 1) để xác định môi trường nuôi phù hợp dựa vào khối lượng sinh khối khô (g/l) và tốc độ sinh trưởng riêng ( $\mu$ ) tính toán từ đường cong sinh trưởng. Tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam được xác định gián tiếp thông qua khối lượng sinh khối khô và mật độ quang đo ở bước sóng 750nm (Melinda & cs., 2011). Năng suất sinh khối (PX) 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 ( $\mu$ ) khi tảo đang sinh trưởng ở trong pha logarit được xác định theo phương trình

$\mu = \ln(X_t/X_0)/(t - t_0)$ . Thời gian nhân đôi thế hệ (doubling time)  $T_d = \ln(2)/\mu$  (tính theo ngày).

#### 2.2.4. Xác định mối tương quan giữa khối lượng tảo khô và mật độ quang $OD_{750}$

Để xác định khối lượng khô trong huyền phù tảo tương ứng ở các mức độ hấp thụ quang tại bước sóng 750nm ( $OD_{750}$ ) khác nhau, đồ thị tương quan giữa khối lượng tảo khô và mật độ quang  $OD_{750}$  được xây dựng. Bước sóng ánh sáng 750nm được sử dụng trên cơ sở nghiên cứu khảo sát tương quan của bước sóng ánh sáng với khối lượng khô (Melinda & cs., 2011). Dịch huyền phù tảo ở giai đoạn cuối pha sinh trưởng logarit được đo quang phổ ở bước sóng 750nm, đồng thời lấy 100ml dịch huyền phù tế bào này ly tâm ở tốc độ 6.000g trong 10 phút ở 10°C (Centrifuge 5403, Eppendorf, Đức) để thu tế bào. Tế bào được thu hồi bằng cách lọc qua giấy lọc (Whatman GF/C filter No. 1, 11 $\mu$ m, 80mm đường kính). Giấy lọc chứa sinh khối tảo được sấy khô ở 60°C cho tới khi khối lượng không đổi (khoảng 10 giờ) sau đó cân cả khối lượng của giấy lọc bằng cân phân tích (SHIMADZU AUX 120, Nhật Bản). Khối lượng khô thực của tảo được tính bằng sự chênh lệch giữa khối lượng của giấy lọc có chứa tảo tươi trước và sau khi đã sấy khô theo đơn vị g/l ( $m_0$ ). Dịch huyền phù tảo được pha loãng liên tiếp 2, 4, 8, 16 và 32 lần, ở mỗi mức độ pha loãng dịch huyền phù tảo được đo quang phổ ở bước sóng 750nm. Khối lượng tảo khô ở các mức độ pha loãng tương ứng ( $m_2$ ,  $m_4$ ,  $m_8$ ,  $m_{16}$ ,  $m_{32}$ ) được suy diễn dựa vào khối lượng khô được xác định từ dịch huyền phù gốc ban đầu ( $m_0$ ). Mối tương quan giữa độ hấp thụ quang học với khối lượng khô sẽ được xây dựng theo phương trình tuyến tính.

#### 2.2.5. Tách DNA và phân tích trình tự 16S rRNA

DNA tổng số được tách từ tảo tươi theo quy trình sử dụng CTAB (Doyle & cs., 1987). Hút 1,5ml huyền phù tảo ly tâm trong ống eppendorf 2ml và ly tâm ở tốc độ 10.000g trong 15 phút để thu tế bào. Tế bào sau đó được rửa 2 lần bằng cách ly tâm trong dung dịch đệm TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,4). Tế bào

được nghiền thành bột mịn trong cối chày sứ sử dụng nitơ lỏng. Bột mịn được đưa vào ống eppendorf 2ml và bổ sung 1ml dung dịch đệm chiết (100mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4M NaCl; 2% CTAB; 20mM EDTA và 0,4%  $\beta$ -mercaptoethanol bổ sung trước khi dùng). DNA tổng số được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 1% và nhuộm Ethidium bromide cùng DNA thang chuẩn 1kb (Promega). Nồng độ DNA được xác định đo quang phổ tại 2 bước sóng 260nm và 280nm sử dụng máy (UV-VIS SHIMADZU UV-1800, Nhật Bản). Tỷ lệ  $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$  được coi là sạch. Nồng độ DNA được xác định theo công thức = 50  $\mu$ g/ml  $\times OD_{260} \times$  hệ số pha loãng (Barbas & cs., 2007). Hàm lượng DNA được sử dụng cho PCR được xác định bằng thực nghiệm dựa trên việc pha loãng từ DNA tổng số.

Trình tự 16S rRNA được nhân bằng PCR sử dụng cặp môi CYA106F (CGGACGGGTGA GTAACGCGTGA) và CYA781R (GACTACT GGGTATCTAATCC CA TT) cho vùng 16S rRNA của vi khuẩn lam (Nübel & cs., 1997). Chu kỳ nhiệt PCR biến tính ở 96°C trong 4 phút, tiếp đó là 35 chu kỳ với nhiệt độ biến 94°C trong 30 giây, gắn môi 56°C trong 30 giây, tổng hợp 72°C trong 30 giây và kéo dài tổng 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% (w/v). Sản phẩm PCR được gửi đọc trình tự trực tiếp sử dụng cặp môi nêu trên. Trình tự nucleotide được đăng ký trên ngân hàng gen NCBI.

Trình tự nucleotide của vùng 16S rRNA được so sánh với các trình tự bằng công cụ Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) để xác định các trình tự của các loài có mối quan hệ gần gũi. Dựa vào kết quả Blastn, 10 vùng trình tự có mức giống nhau lớn nhất với trình tự truy vấn được sử dụng để xây dựng cây tiến hoá bằng chương trình Mega-X với thuật toán Maximum Likelihood (ML), thông số kiểm định (Bootstrap replication = 1000), tham số mô hình (Kimura-2-parameter/K2P), tốc độ biến đổi ở các vị trí theo phân bố Gamma, các thông số khác được đặt mặc định trong chương MEGA-X ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (Kumar & cs., 2018).

### 2.2.6. Phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần để phân tích giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Chương trình Microsoft Excel (2016) được sử dụng để vẽ các đồ thị. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được phân tích bằng phân tích phương sai (ANOVA) với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ . Hậu kiểm Tukey's test được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa cặp các giá trị trung bình trong các công thức thí nghiệm.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập chủng vi khuẩn lam

Sau khi pha loãng và cấy trên môi trường thạch từ 3 đến 4 tuần, chủng vi khuẩn lam đã bắt đầu hình thành các khuẩn lạc nhỏ có thể quan sát được, sau đó các khuẩn lạc lan rộng trên bề mặt đĩa thạch với màu xanh đặc trưng. Trong số 5 môi trường thử nghiệm, chủng vi khuẩn lam có thể phát triển được trong 4 môi trường bao gồm Hoagland, BBM, 1/2 Chu-10 và BG-11. Khi so sánh sự xuất hiện và kích thước của khuẩn lạc, tảo sinh trưởng nhanh hơn ở 2 môi trường BG-11 và BBM. Ở môi trường BG-11 và BBM sau 3-4 tuần đã xuất hiện khuẩn lạc, trong khi đó môi trường Hoagland và 1/2 Chu-10 tảo phát triển rất chậm, sau 4 đến 6 tuần mới thấy xuất hiện khuẩn lạc. Môi trường Zarrouk không phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn lam này. Sau 7 tuần không quan sát thấy sự hình thành khuẩn lạc. Sự sinh trưởng kém của chủng phân lập trong môi trường Zarrouk có thể do sự thay đổi giữa môi trường nước tự nhiên tại hồ Văn Quán với môi trường Zarrouk có thể dẫn đến sốc hoặc chậm thích nghi trong điều kiện phân lập.

Trong những năm gần đây, nhóm nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng đã khảo sát và phân lập được một số chủng vi khuẩn lam thuộc chi *Arthrospira* ở nhiều thủy vực nước ngọt của Việt Nam hiện đang được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam (ký hiệu là *S. platensis* BM, CNT, DL, TL, ST và CNT1 và IET) (Đặng Diễm Hồng, 2019). Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Xuân Hoà đã phân lập và làm thuần được 7 chủng vi khuẩn lam trên môi trường BG11 có bổ sung nitơ (BG11-N) có

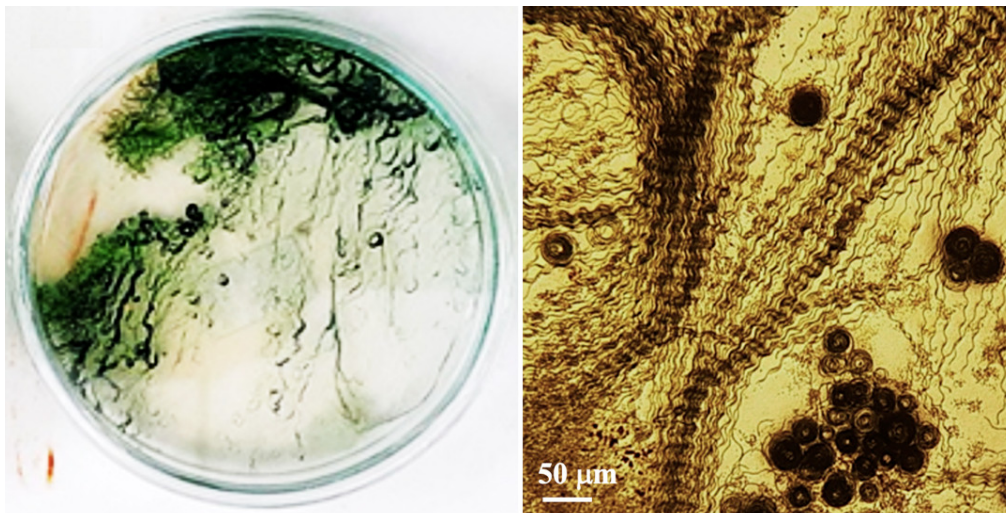
khả năng cố định nitơ để sản xuất phân bón sinh học cho lúa. Nhóm nghiên cứu này cũng phát hiện các loài vi khuẩn lam phân bố ở các thủy vực nước ngọt thường sinh trưởng thích hợp nhất ở khoảng nhiệt độ từ 20-30°C, pH từ 6,0 đến 7,0 (Nguyễn Xuân Hòa & cs., 2020).

Bằng cách pha loãng liên tục, tách riêng từng sợi vi khuẩn lam và cấy trên các đĩa 2 môi trường thạch BBM và BG-11. Trong quá trình phân lập, điều thú vị là chủng vi khuẩn lam có thể tồn tại ở 2 dạng sợi xoắn với bước xoắn rộng và dạng cuộn tròn. Ban đầu sự tồn tại của 2 dạng hình thái được cho là của 2 chủng khác nhau. Tuy nhiên trong quá trình nuôi, dạng cuộn tròn chỉ quan sát được trên môi trường thạch (Hình 1). Trong môi trường nuôi lỏng, chủng vi khuẩn lam chỉ tồn tại duy nhất dạng hình thái sợi dài dạng sóng. Hiện tượng tương tự này cũng đã được mô tả trong một số nghiên cứu đánh giá khả năng thay đổi hình thái của tảo xoắn (Martin & cs., 2008; Noor & cs., 2008).

### 3.2. Hình thái tế bào

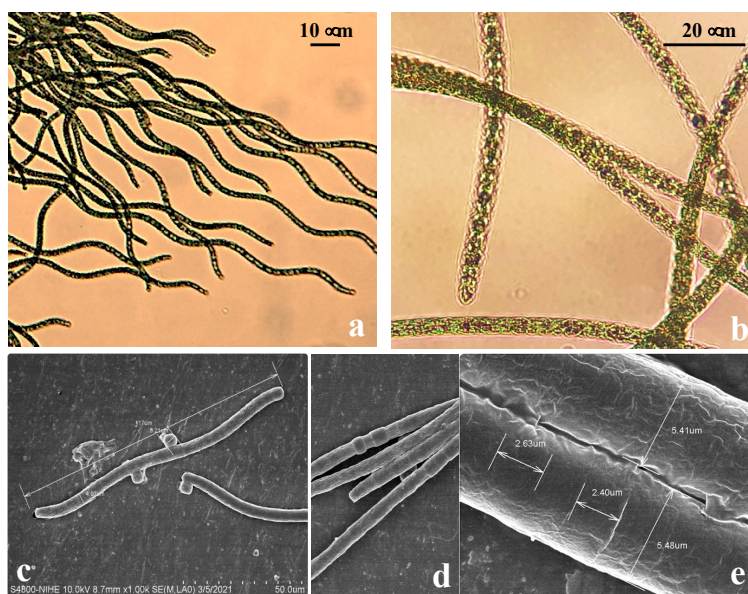
Phân tích chi tiết hơn về hình thái, nhờ quan sát ở độ phóng đại 400 và 1.000 lần dưới kính hiển vi quang học cho thấy chủng vi tảo có dạng xoắn đặc trưng có chiều rộng khoảng 5 $\mu$ m, chiều dài dao động từ 50 đến lớn hơn 400 $\mu$ m. Khi nuôi trong môi trường lỏng, dạng cấu trúc xoắn vẫn giữ ổn định điển hình của chi *Arthrospira*. Khi phân tích hình thái ở mức phân giải cao hơn sử dụng kính hiển vi điện tử (SEM), sợi vi tảo được cấu tạo bởi các tế bào dạng hình trụ (trichomes) nối với nhau và có các tế bào ở phần cuối sợi thắt nhỏ lại (Hình 2b). Bằng chứng rõ rệt nhất để phân biệt giữa vi khuẩn lam thuộc chi *Arthrospira* và *Spirulina* là cấu trúc vách ngăn giữa các tế bào (Hình 2d, e).

Khảo sát thực tế ở một số thủy vực nước ngọt, đặc biệt là các hồ ở khu vực nội ngoại thành Hà Nội cho thấy nhiều loài vi khuẩn lam có hình thái tương tự với chủng được phân lập ở Hồ Văn Quán (Hà Nội) (số liệu chưa công bố). Điều này chứng tỏ loài vi khuẩn lam thuộc chi *Arthrospira* có khả năng phân bố rộng và thích nghi tốt trong điều kiện tự nhiên.



Ghi chú: Chủng tảo xoắn hình thành sợi mọc lan trên bề mặt đĩa môi trường thạch sau 8 tuần trên môi trường BG-11 (trái), dạng sợi xoắn và dạng sợi cuộn tròn trên môi trường thạch quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 50 lần (trái). Thang đo 20µm.

**Hình 1. Hình thái sợi của chủng tảo xoắn *Arthrospira platensis* phân lập**



Ghi chú: Dạng sợi uốn sóng với cấu trúc tế bào tách biệt (trichomer) bởi cấu trúc màng (a); hình thái xoắn ở độ phóng đại 400 lần (b); hình dạng tế bào được cố định và quan sát dưới kính hiển vi SEM (c); các tế bào riêng rẽ tạo thành các dạng cấu trúc đốt từng tế bào (d); kích thước sợi và từng tế bào riêng rẽ ở độ phóng đại 5.000 lần (e).

**Hình 2. Hình thái hiển vi của chủng tảo xoắn phân lập**

### 3.3. Tách DNA nhân đoạn gen 16S rRNA và xác định trình tự

DNA tổng số của chủng vi khuẩn lam được tách theo phương pháp cải tiến sử dụng CTAB (Doyle & cs., 1987) và chạy điện di trên gel

agarose 1% (Hình 3a). Kết quả PCR với cặp mồi CYA106F và CYA781R thu được 1 băng đặc hiệu duy nhất, có kích thước khoảng 650bp (Hình 3), Như vậy, cặp mồi CYA106F và CYA781R cũng phù hợp với chủng vi khuẩn lam phân lập (Nübel & cs., 1997).

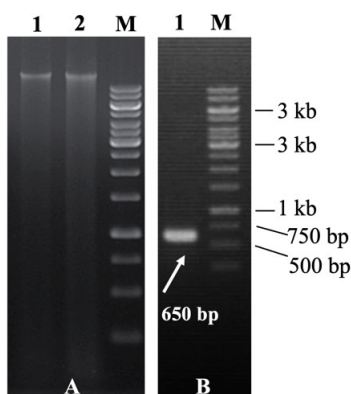


### 3.4. So sánh vùng trình tự 16S rRNA và xác định mối quan hệ tiến hoá của chủng vi khuẩn lam phân lập

Trình tự sau khi thu được và loại bỏ các trình tự nucleotide bị nhiễu ở cả 2 đầu có chiều dài 555bp được đăng ký vào ngân hàng NCBI (MW791382). Kết quả Blastn sử dụng trình tự truy vấn (query) với ngân hàng dữ liệu nucleotide trong NCBI cho thấy, trình tự thu được có mức giống đến 99% với trình tự 16S rRNA của các chủng khác nhau thuộc loài *A. platensis* trong cơ sở dữ liệu ngân hàng gen NCBI (Hình 3).

Dựa vào kết quả Blastn, 10 trình tự có mức giống nhau cao nhất với vùng trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn lam phân lập

(MN615886.1, LC455668.1, MH318616.1, MG098079.1, CP013008.1, KC217542.1, JX872527.1, MW628543.1, KC1985869.1, KC195870.1) được sử dụng để so sánh trình tự và xây dựng cây tiến hoá bằng chương trình Mega-X (Hình 4). Kết quả phân tích cho thấy, cây có gốc chia thành 3 nhóm, nhóm thứ nhất gồm 9 trình tự tất cả đều thuộc loài *A. platensis*, nhóm thứ 2 là loài vi khuẩn lam phân lập được ở hồ Văn Quán (Hà Nội) tách riêng thành một nhóm (*A. platensis* VQ VN), nhóm thứ 3 là loài *A. platensis* YZ (CP013008.1) với vùng trình tự bắt cặp với trình tự truy vấn từ vị trí 2643707 đến 2464259 trong genome (Hình 4). Khoảng cách giữa loài *A. platensis* VQ VN rất nhỏ so với nhóm thứ nhất gồm 9 loài (giá trị bootstrap 98%).



Ghi chú: (A): Giếng 1 và 2 tương ứng 5 và 10 $\mu$ l DNA tổng số; (B): Giếng 1 sản phẩm PCR được nhân bằng cặp mồi *CYA106F* và *CYA781R* có kích thước khoảng 650bp, M: Thang chuẩn 1kb (Promega).

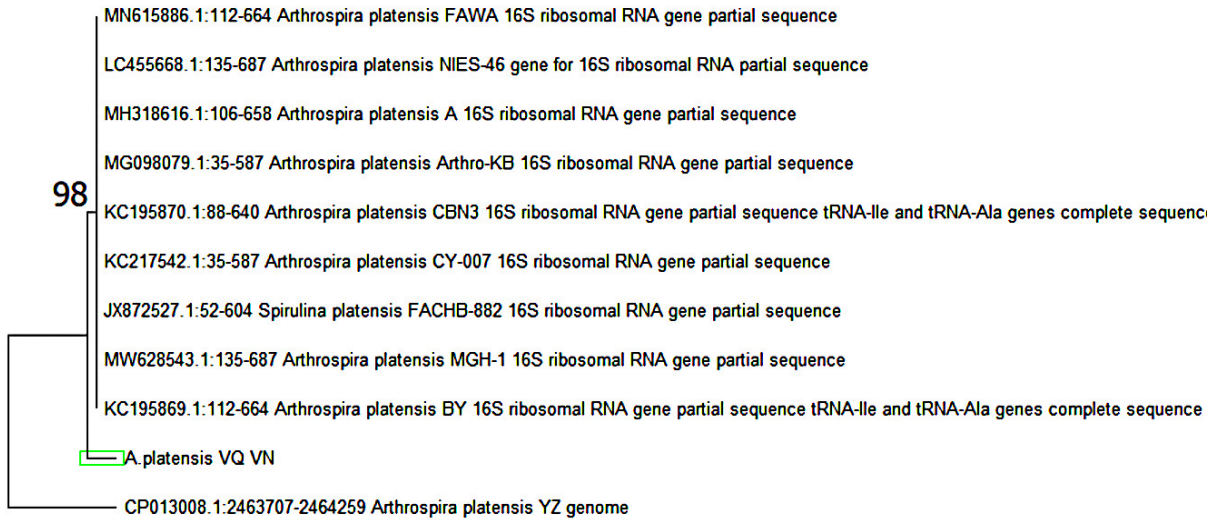
**Hình 2. Điện di DNA tổng số và sản phẩm PCR một đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn lam**

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	New MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis FAWA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	1441	<a href="#">MN615886.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis NIES-46 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	1485	<a href="#">LC455668.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	759	<a href="#">MH318616.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis Arthro-KB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	639	<a href="#">MG098079.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis YZ genome</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	2044	99%	0.0	100.00%	6520772	<a href="#">CP013008.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis CY-007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	639	<a href="#">KC217542.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Spirulina platensis FACHB-882 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	663	<a href="#">JX872527.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis MGH-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	1485	<a href="#">MW628543.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis BY 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete se...</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	1994	<a href="#">KC195869.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Arthrospira platensis CBN3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete...</a>	<a href="#">Arthrospira plate...</a>	1022	1022	99%	0.0	100.00%	1930	<a href="#">KC195870.1</a>

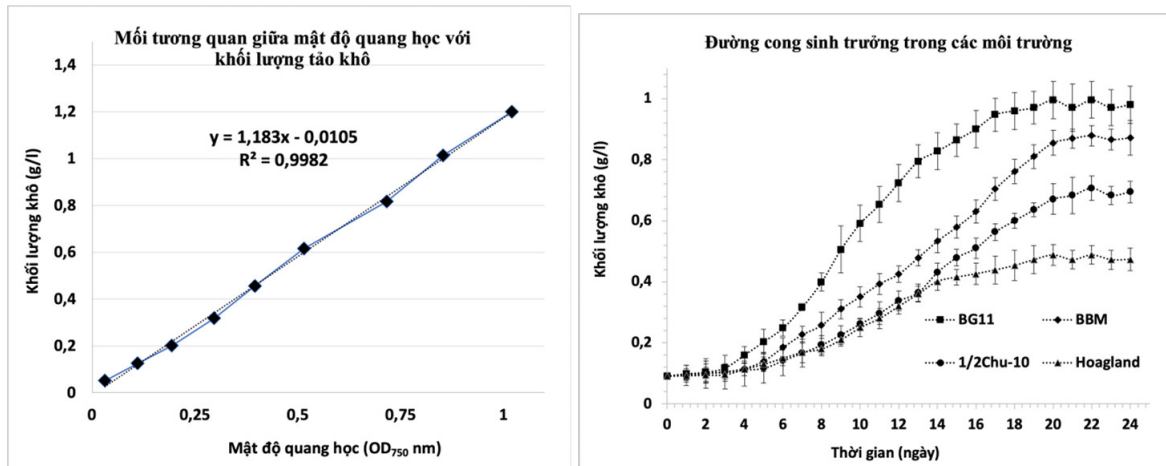
Ghi chú: Thông số chương trình Blastn đặt mặc định với 10 trình tự có mức giống nhau cao nhất với trình tự truy vấn được hiển thị.

**Hình 3. Blastn vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn lam với ngân hàng cơ sở dữ liệu NCBI**





Hình 4. Mối quan hệ tiến hoá giữa chủng vi khuẩn lam *A. platensis* VQ-VN với 10 loài *A. platensis* trong cơ sở dữ liệu NCBI



Hình 5. Mối tương quan giữa mật độ quang học với khối lượng tảo khô và đường cong sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam phân lập trong 4 môi trường nuôi

Bằng cách kết hợp phân tích đặc điểm hình thái và so sánh trình tự vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn lam phân lập ở hồ Văn Quán (Hà Nội) đã xác định được chủng vi khuẩn này thuộc loài *A. platensis* và được đặt tên là *A. platensis* VQ-VN. Theo các công trình công bố và nghiên cứu trên thế giới, vi khuẩn lam thuộc loài *A. platensis* có thể được làm nguồn dinh dưỡng và thực phẩm chức năng cho người và động vật. Cho đến nay, nghiên cứu về vi khuẩn lam *A. platensis* ở Việt Nam đã được nhóm nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng & cs. (2019) đã khảo sát và phân lập được một số chủng vi khuẩn ở các thủy vực trong nước. Một

số nhóm nghiên cứu đã phân lập, làm thuần và xác định đặc điểm cơ bản của các chủng vi khuẩn lam thuộc 2 bộ Chroococcales và Nostocales, bao gồm 4 chi *Anabaena*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* và *Mastigocladus* (Nguyễn Xuân Hòa & cs., 2020; Nguyễn Thị Hạnh Nguyễn & cs., 2019). Nghiên cứu về vi khuẩn lam độc nước ngọt cũng được nhóm nghiên cứu của Đặng Đình Kim thực hiện khảo sát ở nhiều thủy vực nước ngọt (Đặng Đình Kim & cs., 2014).

Thực tế vi khuẩn lam (cyanobacteria) là một ngành rất lớn gồm rất nhiều loài khác nhau, sự hiểu biết về thành phần loài cũng như các đặc điểm sinh học của các loài thuộc ngành

vi khuẩn còn hạn chế. Việc phân loại bằng hình thái ở vi khuẩn lam nhìn chung gặp nhiều khó khăn bởi vì ngay cả với chi *Arthrospira* có thể bắt gặp cấu trúc sợi có chứa cả tế bào dị hình (heterocyst) (Fujisawa & cs., 2010). Ngoài ra, khi phân tích hệ gen của *Arthrospira* cho thấy một số gen chịu trách nhiệm cho việc hình thành các tế bào dị hình như *patU*, *hetR*, *hetF* và cố định N vẫn có mặt trong genome của *Arthrospira* (Furmaniak & cs. 2017). Ngay cả một số loài thuộc chi *Planktothrix* cũng có cấu trúc dạng sợi xoắn gồm các tế bào ngăn cách với nhau (trichome) (Liu & cs., 2013). Chính vì vậy, việc kết hợp phân tích hình thái, sinh lý thì phân tích trình tự DNA và xây dựng cây tiến hoá để xác định loài một trong những tiêu chí quan trọng cho phân loại. Ngoài trình tự 16S rRNA, việc phân tích các trình tự khác như *cpcBA*-IGS và *rpoC1* kết hợp với phân tích phổ axit béo, các gen liên quan đến khả năng sinh độc tố (cyanotoxin) là cần thiết (Liu & cs., 2013).

### 3.5. Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam phân lập trong phòng thí nghiệm

Mặc dù tốc độ phát triển của khuẩn lạc chủng vi khuẩn lam *A. platensis* VQ-VN trên các môi trường Hoagland và 1/2 Chu-10 tương đối chậm, tuy nhiên để đánh giá khả năng phát triển của chủng này trong điều kiện nuôi lỏng, cả 4 môi trường Hoagland, BBM, BG-11 và 1/2 Chu-10 đều được thử nghiệm. Tảo được nuôi qua từng bước cấy chuyển với thể tích nhỏ sau đó chuyển sang nuôi trong bình thuỷ tinh Duran thể tích 2 lít trong điều kiện phòng thí nghiệm chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang cường độ 2.500Lux, chu kỳ chiếu sáng 16:8, nhiệt độ  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  và tốc độ sục không khí 10% (thể tích/phút). Khả năng thích ứng và sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam phân lập được xác định dựa vào mật độ quang của huyền phù tảo ở bước sóng 750nm (Melinda & cs., 2011) và khối lượng tảo khô. Mối tương quan giữa khối lượng khô và mật độ quang học ở bước sóng 750nm ( $OD_{750}$ ) được trình bày ở hình 5.

Kết quả thử nghiệm trong 4 môi trường cho thấy, chủng vi khuẩn lam phân lập có khả năng

sinh trưởng tốt trong 2 môi trường BG1-1 và BBM. Thời gian sinh trưởng của tảo để đạt mật độ tối đa từ 14 đến 16 ngày. Khối lượng tảo khô khi nuôi trong môi trường BG11 và BBM tương ứng đạt 0,96 và 0,89 g/l. Môi trường Hoagland và 1/2 Chu-10 không thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam này, thời gian từ thời điểm cấy giống cho tới khi đạt mật độ tối đa cũng trong khoảng từ 16-18 ngày, tuy nhiên mật độ tảo rất thấp so với cùng điều kiện ở môi trường BG11 (Hình 6). Khối lượng tảo khô thu được khi nuôi trong 2 môi trường Hoagland và 1/2 Chu-10 chỉ đạt 0,68 và 0,41 g/l.

Tốc độ sinh trưởng riêng ( $\mu/\text{ngày}$ ) của chủng vi khuẩn lam ở giai đoạn sinh trưởng logarit trong 4 môi trường BG-11, BBM, 1/2 Chu-10 và Hoagland tương ứng lần lượt là  $0,211 \pm 0,023$ ;  $0,185 \pm 0,022$ ;  $0,169 \pm 0,016$  và  $0,134 \pm 0,012$  ( $P < 0,01$ ). Thời gian nhân đôi thế hệ trong 4 môi trường tương ứng lần lượt là 3,28; 3,74; 4,10 và 5,17 ngày. Khi so sánh tốc độ sinh trưởng riêng của chủng *A. platensis* VQ-VN với các chủng tảo xoắn *A. platensis* hoặc *A. maxima* đang được nuôi phổ biến hiện nay trong môi trường Zarouck hoặc các môi trường giàu  $\text{HCO}_3^-$  có tốc độ sinh trưởng riêng trung bình trong khoảng từ 0,2 đến 0,5 tương ứng với thời gian thế hệ từ 3,46 đến 1,38 ngày (Ilknur, 2010; De Souza & cs., 2021). Như vậy, trong điều kiện thử nghiệm, tốc độ sinh trưởng của chủng *A. platensis* VQ-VN chậm hơn đáng kể. Do đó, cần tiếp tục đánh giá các tham số về môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi bao gồm ánh sáng, nhiệt độ và tốc độ sục khí.

Với kết quả khảo sát thu được, môi trường BG-11 và BBM phù hợp cho sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam *A. platensis* VQ-VN, trong đó môi trường BG-11 là tốt nhất. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu phân lập và làm thuần 7 chủng vi khuẩn lam trong môi trường BG-11 bổ sung nitơ (Nguyễn Xuân Hòa & cs., 2020). Kết quả nghiên cứu phân lập, xác định tên khoa học chủng vi khuẩn lam phân bố ở hồ Văn Quán (Hà Nội) tạo cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm di truyền, sinh lý, hoá sinh của chủng vi khuẩn này trong các điều kiện sinh trưởng khác nhau.

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn lam phân lập tại hồ Văn Quán (Hà Nội) được phân lập và xác định tên loài là *A. platensis* bằng cách kết hợp giữa mô tả hình thái và phân tích trình tự một đoạn gen 16S rRNA. Chủng vi khuẩn lam phân lập *A. platensis* VQ-VN sinh trưởng tốt nhất trong môi trường BG-11 với tốc độ sinh trưởng riêng đạt  $0,211 \pm 0,023$  và thời gian thế hệ 3,28 ngày.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được cấp kinh phí từ Dự án “Nâng cao chất lượng giáo dục đại học” tài trợ bởi Ngân hàng Thế giới (Worldbank) giai đoạn 2020-2021.

#### 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.
- Barbas CF., Burton D.R., Scott J.K. & Silverman G.J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. CSH Protoc. doi: 10.1101/pdb.ip47.
- Đặng Diễm Hồng (2019). Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam (Chương 4). Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 750tr.
- Đặng Đình Kim, Dương Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Liên, Đào Thanh Sơn, Lê Thị Phương Quỳnh & Đỗ Hồng Lan Chi (2014). Vi khuẩn lam độc nước ngọt. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 327tr. ISBN 9876049132186.
- Đặng Đình Kim, Trần Văn Tựa, Nguyễn Tiến Cư, Đỗ Tuấn Anh, Đặng Thị Thom, Hoàng Trung Kiên, Lê Thu Thủy, Vũ Thị Nguyệt, Mai Trọng Chính & Nguyễn Văn Vượng (2011). Nghiên cứu sử dụng CO<sub>2</sub> từ khí thải đốt than để nuôi vi tảo *Spirulina platensis* Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 49(4): 65-72.
- De Souza D.S., Valadao R.C. & De Souza E.R.P. (2021). Enhanced *Arthrospira platensis* biomass production combined with anaerobic cattle wastewater bioremediation. Bioenerg. Res. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10258-4>.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.
- Dương Thị Thủy, Hồ Tú Cường, Đặng Đình Kim & Lê Thị Phương Quỳnh (2012). Biến động hàm lượng độc tố microcystin trong môi trường nước hồ Hoàn Kiếm. Tạp chí Sinh học. 34(1): 94-98.
- Fujisawa T., Narikawa R., Okamoto S., Ehira S., Yoshimura H., Suzuki I., Masuda T., Mochimaru M., Takaichi S., Awai K., Sekine M., Horikawa H., Yashiro I., Omata S., Takarada H., Katano Y., Kosugi H., Tanikawa S., Ohmori K., Sato N., Ikeuchi M., Fujita N. & Ohmori M. (2010). Genomic structure of an economically important Cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. DNA Res. 2: 85-103.
- Furmaniak M.A., Misztak A.E., Franczuk M.D., Wilmotte A., Waleron M. & Waleron K.F. (2017). Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine. Front Microbiol. 8: 2541. doi:10.3389/fmicb.2017.02541.
- Gang-Guk C., Myong-Sook B., Chi-Yong A. & Hee-Mock O. (2008). Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. Biotechnol Lett. 30(1): 87-92. doi: 10.1007/s10529-007-9523-2.
- Geitler L. (1925). Cyanophyceae (ed. Pascher, A.). Gustav Fischer. pp. 1-450.
- Gomont M. (1892). Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées), Deuxième partie. Lyngbyées. Anns. Sci. Nat. Bot. 7(16): 91-264.
- Hoagland D.R. & Snyder W.C. (1933). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions. (a) Effects of deficiencies of boron and certain other elements, (b) susceptibility to injury from sodium salts. Proceedings of the American Society for Horticultural Science. 30: 288-294.
- Ilknur A. (2012). Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. Aquacult Int 20: 413-422. doi 10.1007/s10499-011-9473-5.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J.R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) using a polyphasic approach. Preslia 86: 295-335.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35: 1547-1549
- Liu Y., Wang Z., Lin S., Yu G. & Li R. (2013). Polyphasic characterization of *Planktothrix spiroides* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming alga superficially resembling *Arthrospira*. Phycologia 52: 326-332. doi: 10.2216/13-146.1

- Martin M., Paul J.S., Nicholas H., Amha B. & Brian A.W. (2006). Phenotypic analysis of *Arthrospira* (Spirulina) strains (cyanobacteria). *Phycologia*. 45(2):148-157.
- 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.
- Nguyễn Đình San (2015). Phân lập một số chủng vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm để cung cấp nguyên liệu cho sản xuất phân bón sinh học. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nghệ An*. 5: 16-21.
- Nguyễn Thị Hạnh Nguyên & Nguyễn Hữu Hiệp (2019). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lam (cyanobacteria) có khả năng cố định đạm ở ruộng lúa tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 55(2): 20-26.
- Nguyễn Thúy Nga, Nguyễn Ngọc Châu & Đoàn Thị Thái Yên (2020). Ảnh hưởng của tỉ lệ N:P hỗn hợp nước thải đến tốc độ sinh trưởng tảo xoắn *Spirulina* và hiệu quả loại bỏ N, P sau nuôi tảo. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 141: 080-085.
- Nguyễn Xuân Hoà & Lê Thị Thu Hương (2020). Phân lập, tuyển chọn một số loài vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ làm giống để sản xuất phân bón sinh học cho sản xuất lúa. *Tạp chí Khoa học Đất*. 58: 38-42.
- Nichols H.W. & Bold H.C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. J. *Phycology*. 1: 34-38.
- Noor P., Akhatar N., Múnhi J.L. & Begum S. (2008). *Spirulina* culture in Bangladesh XII. Effects of different culture media, different culture vessels and different cultural conditions on coiled and straight filament characteristics of *Spirulina*. *Bangladesh J Sci ind Res*. 43(3): 369-376.
- Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 63(8): 3327-3332. doi: 10.1128/AEM.63.8.3327-3332.1997.
- Robert A. Andersen. (2005). Chapter 6. Traditional microalgae isolation techniques, in *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic Press.
- Rout N.P., Khandual S., Gutierrez-Mora A., Gallardo-Valdéz J., Rodriguez-Garay B., Ibarra-Montoya J. Luis & Vega-Valero G. (2013). Isolation, identification and germplasm preservation of different native *Spirulina* species from Western Mexico. *American Journal of Plant Sciences*. 4: 65-71.
- Sili C., Torzillo G. & Vonshak A. (2012). *Arthrospira* (Spirulina) (ed. B. A. Whitton, B. A.) (ed). Springer. pp. 677-705.
- Stein J. (1973). *Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press.
- Vonshak A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis.
- Waterbury J.B. & Stanier R.Y. (1991). Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. *The Prokaryotes*. 7: 221-223.
- 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. University of Paris, France.