

# TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG NUÔI VI TẢO *THALASSIOSIRA WEISSFLOGII* (GRUNOW) FRYXELL & HASLE 1977

## OPTIMIZING THE NUTRITIONAL MEDIUM FOR CULTIVATION OF *THALASSIOSIRA WEISSFLOGII* (GRUNOW) FRYXELL & HASLE 1977

Trịnh Đăng Mậu<sup>1,2\*</sup>, Trần Thị Tường Vy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nhóm nghiên cứu và giảng dạy Môi trường và Tài nguyên Sinh vật (DN-EBR), Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng, Đà Nẵng, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ / Corresponding author: tdm@ued.udn.vn

(Nhận bài / Received: 03/2/2023; Sửa bài / Revised: 20/3/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 02/4/2023)

**Tóm tắt** - Vi tảo *Thalassiosira weissflogii* là nguồn sản xuất nhiên liệu và các dẫn xuất sinh học tiềm năng, là một nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng trong ngành nuôi trồng thủy hải sản. Sự phát triển của vi tảo bị ảnh hưởng bởi các yếu tố dinh dưỡng. Do vậy, việc tối ưu hóa các thông số này là cần thiết để phát triển quy trình sản xuất sinh khối hiệu quả. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để tối ưu hóa 3 yếu tố dinh dưỡng chính đối bao gồm Nito (N), Photpho (P) và Silic (Si) nhằm tối đa tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii*. Kết quả cho thấy, N là yếu tố dinh dưỡng tác động chủ đạo đến sự sinh trưởng của vi tảo. Một bộ điều kiện tối ưu cũng đã được đề xuất từ mô hình, cụ thể là nồng độ N = 11,815 mg/L, nồng độ P = 0,841 mg/L và nồng độ Si = 9,173 mg/L, tốc độ sinh trưởng tối đa đạt được là 0,276 ngày<sup>-1</sup>.

**Từ khóa** - Dinh dưỡng; phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM); sinh trưởng; tối ưu hóa; *Thalassiosira weissflogii*

### 1. Đặt vấn đề

Trong 5 năm qua, xuất khẩu tôm Việt Nam tăng trưởng 5%/năm với kim ngạch xuất khẩu tôm chiếm khoảng 45% tổng kim ngạch xuất khẩu thủy sản. Theo Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP) đánh giá triển vọng ngành tôm đến năm 2025, xuất khẩu tôm đạt kim ngạch 5,6 tỷ USD, tăng trưởng 9% hàng năm [1]. Với tiềm năng phát triển đó, các công ty sản xuất tôm cần có các chiến lược nuôi cấy ổn định nhằm đảm bảo sản lượng cũng như chất lượng của sản phẩm tôm đầu ra. Trong quy trình nuôi, việc đảm bảo tỷ lệ sống, chất lượng cũng như năng suất con giống cao được xem là chìa khóa quan trọng cho sự thành công. Các yếu tố này lại phụ thuộc rất nhiều vào nguồn thức ăn cho con giống.

Trong giai đoạn ương giống, thức ăn tự nhiên (tảo và động vật phù du) được ví như sữa mẹ vì chúng giúp tsảng tỷ lệ sống sót và thúc đẩy quá trình lột xác, phát triển của con giống [2]. Trong số đó, vi tảo *T. weissflogii* là nguồn thức ăn tự nhiên giàu dinh dưỡng được sử dụng phổ biến, với thành phần chứa khoảng 10-20% protein, 25-30% carbohydrate và đến 30-45% lipid. Việc sử dụng tảo trong nuôi giống đã được chứng minh có tác động tích cực đến khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển của tôm, kích thích tăng trưởng và tăng cường miễn dịch, nâng cao tính chống chịu với điều kiện ngoại cảnh bất lợi [3], [4].

**Abstract** - *Thalassiosira weissflogii* microalgae are valued not only as sources of biofuels and bio derivatives, but also as important and nutritious food sources in the aquaculture industry, particularly in shrimp seed production. To develop the efficient biomass production processes, it is necessary to optimize the nutritional parameters of the growth medium specific to each species. In this study, response surface methodology (RSM) was used to optimize nitrogen (N), phosphorus (P), and silicon (Si) concentrations for maximizing the growth rate of *T. weissflogii* microalgae. The results indicate that N was the main nutrient parameter affecting microalgae growth, with a regression coefficient of 0.03 (p-value < 0.05). An optimal set of conditions, including N concentration of 11.815 mg/L, P concentration of 0.841 mg/L, and Si concentration of 9.173 mg/L, was recommended by the model, predicting a maximum growth rate of 0.276 day<sup>-1</sup>.

**Key words** - Nutrition; Response surface method (RSM); growth; optimization; *Thalassiosira weissflogii*

Hiện nay, hầu hết các cơ sở sản xuất ở Việt Nam đều sử dụng tảo *T. weissflogii* làm thức ăn cho tôm trong giai đoạn ấu trùng [4]. Tuy nhiên, vẫn tồn tại một số hạn chế trong sản xuất sinh khối *T. weissflogii* như: Dễ bị tạp nhiễm protozoa, nấm ký sinh, vi sinh vật,... gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi tảo cũng như chất lượng của ấu trùng các sinh vật biển khi ăn phải các loài này [5]. Một trong những nguyên nhân dẫn đến tình trạng trên có thể là do chưa có điều kiện nuôi (nhiệt độ, pH, ánh sáng,...) chưa phù hợp và đặc biệt là môi trường nuôi vi tảo *T. weissflogii* chưa tối ưu.

Do đó, trong nghiên cứu này, thành phần chính trong môi trường dinh dưỡng bao gồm N, P, và Si đã được nghiên cứu tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) nhằm thúc đẩy vi tảo *T. weissflogii* sinh trưởng với tốc độ cao nhất. Về cơ bản, phương pháp này xây dựng một phương trình hồi quy dạng đa thức bậc 2 từ dữ liệu thực nghiệm tại những tổ hợp các khoảng yếu tố thuận lợi (biến ảnh hưởng) để tìm ra một điểm tối ưu nhất cho thông số mục tiêu (biến phụ thuộc) - trong nghiên cứu này là tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* [6]. Kết quả từ nghiên cứu này mang sẽ là cơ sở khoa học để hướng đến việc ổn định sản xuất sinh khối vi tảo *T. weissflogii* ở quy mô lớn, phục vụ cho sự phát triển bền vững của ngành thủy sản nói chung.

<sup>1</sup> DN-EBR Teaching Research Team, The University of Danang, Vietnam (Mau Trinh-Dang, Tuong Vy Tran Thi)

<sup>2</sup> The University of Danang - University of Science and Education, Danang, Vietnam (Mau Trinh-Dang)

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Giống tảo *Thalassiosira weissflogii* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ tảo, khoa Sinh - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

### 2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ N, P, Si đến sinh trưởng và tích lũy các hợp chất của vi tảo *T. weissflogii* được nuôi cấy trong môi trường ESAW [7]. Các điều kiện nuôi cấy gồm cường độ ánh sáng 3000 lux với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng: 8 giờ tối ở 25°C, độ mặn 25 - 30 ‰, pH= 8,2 và sục khí liên tục 24/24 giờ được duy trì ổn định trong suốt thí nghiệm. Các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của N, P, Si được bố trí với 4 mức nồng độ khác nhau thể hiện trong Bảng 1. Thí nghiệm được tiến hành trong vòng 5 ngày. Mật độ được theo dõi hằng ngày.

**Bảng 1.** Bố trí thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ N, P, Si đến sinh trưởng và tích lũy các hợp chất của vi tảo *T. weissflogii*

Thí nghiệm	Đối chứng	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2	Nghiệm thức 3
N (mg/L)	7,68	3,84	15,36	23,04
P (mg/L)	0,70	0,35	1,40	2,10
Si (mg/L)	2,96	1,48	5,92	8,88

### 2.3. Phương pháp xác định tốc độ sinh trưởng

Đường cong sinh trưởng được xây dựng dựa vào sự biến động số lượng tế bào theo ngày. Tốc độ sinh trưởng được tính theo công thức (1):

$$\mu = [\ln(N_t/N_0)] \div (t - t_0) \quad (1)$$

Trong đó,  $\mu$  (/ngày) là tốc độ sinh trưởng trung bình;  $N_0$  và  $N_t$  (tế bào/mL) là mật độ tế bào tương ứng ở thời điểm bắt đầu ( $t_0$ ) và thời điểm khảo sát ( $t$ ) của thí nghiệm.

### 2.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM)

RSM là tập hợp các kỹ thuật toán học và thống kê được ứng dụng rộng rãi trong mô hình hóa và phân tích các quá trình mà trong đó biến đáp ứng chịu ảnh hưởng bởi nhiều biến độc lập. Thí nghiệm được thực hiện theo mô hình bố trí thí nghiệm BBD - Box Behnken Design. Trong nghiên cứu này, có 3 biến độc lập được lựa chọn bao gồm nồng độ N, nồng độ P, nồng độ Si và biến đáp ứng là tốc độ sinh trưởng của vi tảo. Kết quả từ RSM là một mô hình thống kê biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ sinh trưởng vào các yếu tố được mã hóa dưới dạng phương trình đa thức bậc hai có dạng (2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Trong đó:

Y: Tốc độ sinh trưởng ước đoán ( $\text{ngày}^{-1}$ );

$X_i$  và  $X_j$  lần lượt là các biến độc lập thứ  $i$  và  $j$  được mã hóa ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y;

$\beta_i$ : Hệ số hồi quy bậc 1, mô tả ảnh hưởng của biến độc lập  $X_i$  với Y;

$\beta_{ii}$ : Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của biến  $X_i$  với Y;

$\beta_{ij}$ : Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời của biến  $X_i$  và  $X_j$  với Y.

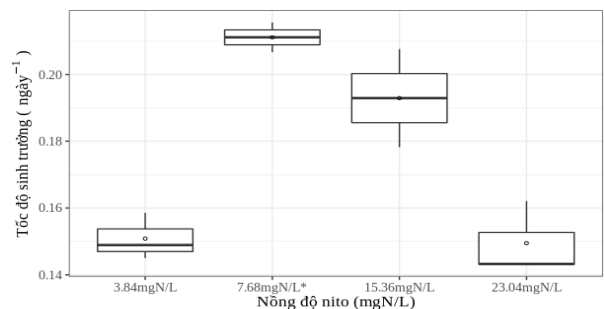
### 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được thống kê mô tả. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiệm thức được đánh giá bằng phân tích phương sai ANOVA và phân tích hậu định Tukey's Test. Bố trí thí nghiệm tối ưu hoá dạng BBD cùng xây dựng mô hình bề mặt đáp ứng sử dụng *package {rsm}* [8] và các phương pháp thống kê được thực hiện trên phần mềm R [9].

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của nitơ đến sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii*

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự thay đổi nồng độ N trong môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* ( $p\text{-value} = 0,0004 < 0,05$ ) (Hình 1). Trong đó, ở nồng độ N bằng 7,68 mgN/L, tốc độ sinh trưởng cao nhất, đạt  $0,21 \pm 0,004 \text{ ngày}^{-1}$ . Tốc độ sinh trưởng của tảo *T. weissflogii* giảm khi tăng dần nồng độ N lên 15,36 và 23,04 mgN/L, tương ứng đạt  $0,19 \pm 0,02$  và  $0,14 \pm 0,01 \text{ ngày}^{-1}$ . Ngoài ra, khi giảm nồng độ N trong môi trường dinh dưỡng xuống 3,84 mgN/L thì tốc độ sinh trưởng của tảo cũng giảm xuống còn  $0,15 \pm 0,007 \text{ ngày}^{-1}$ .



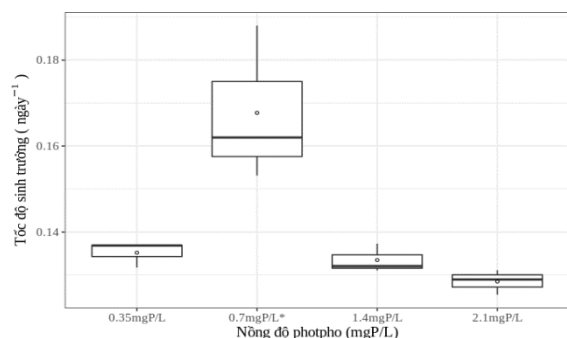
**Hình 1.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* ở các nghiệm thức N khác nhau (\*: Nồng độ N trong môi trường chuẩn)

Kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu của nhóm tác giả Hernández-Sandoval và cộng sự [10]. Nhóm tác giả báo cáo, tốc độ sinh trưởng cao nhất của loài vi tảo *T. weissflogii* ghi nhận được là  $0,312 \text{ ngày}^{-1}$  tại môi trường có 6,23 mgN/L. Tuy nhiên, khi nguồn dinh dưỡng N tăng (12,46 mgN/L) hoặc giảm (1,54 mgN/L) thì sức sinh trưởng của vi tảo cũng suy giảm đi 16,1%, chỉ còn  $0,26 \text{ ngày}^{-1}$  [10]. Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Huertas và cộng sự, cũng cho thấy, một kết quả tương tự trên vi tảo *Nannochloropsis* sp. [11]. Môi trường nghèo Nitơ thường dẫn đến năng suất sinh khối của tế bào thấp hơn bình thường vì nitơ là chất dinh dưỡng đa lượng quan trọng cho sự phát triển và chuyển hóa các hợp chất trong tế bào vi tảo và là yếu tố cơ bản cho sự hình thành protein, axit nucleic và ATP - chất mang năng lượng cho tế bào [12]. Vì thế, khi cung cấp đầy đủ lượng N thì sức sinh trưởng của vi tảo cũng tăng. Tuy nhiên, Nitơ dư thừa trong môi trường cũng gây ức chế đến sự sinh trưởng của tảo [13].

### 3.2. Ảnh hưởng của photpho đến sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii*

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ P đến sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* cho thấy, việc thay đổi nồng độ P trong

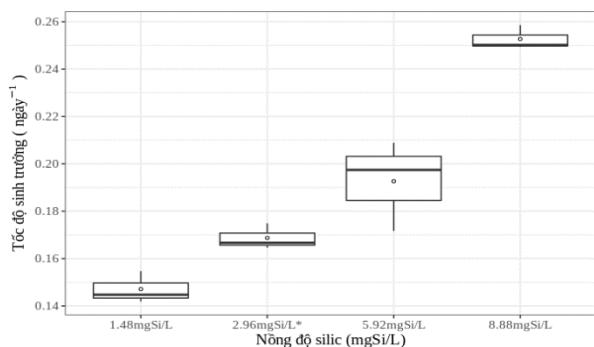
môi trường so với nghiệm thức đối chứng là không mang lại kết quả tích cực (Hình 2). Tại môi trường dinh dưỡng chứa 0,7 mgP/L (ĐC), tảo có tốc độ sinh trưởng cao nhất, đạt  $0,168 \pm 0,002 \text{ ngày}^{-1}$ , cao hơn đáng kể so với môi trường bổ sung dư thừa P (lần lượt là  $0,133 \pm 0,002$  ở nghiệm thức 1,4 mgP/L và  $0,128 \pm 0,002$  ở nghiệm thức 2,1 mgP/L) ( $p\text{-value} = 0,004$ ). Vi tảo trong môi trường thiếu hụt P có sự suy giảm về tốc độ tăng trưởng, chỉ đạt  $0,135 \pm 0,003 \text{ ngày}^{-1}$  (Hình 2).



**Hình 2.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* ở các nồng độ P khác nhau (\*: Nồng độ P trong môi trường ESAW)

Photpho là một chất dinh dưỡng đa lượng đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất của tế bào bằng cách hình thành nên các thành phần cấu trúc và chức năng cần thiết cho quá trình phát triển và sinh trưởng bình thường của vi tảo [13]. P được xem là yếu tố giới hạn của vi tảo vì nếu thiếu P thì tảo không phát triển được. Tương tự như N, khi môi trường chứa quá nhiều P gây ức chế sinh trưởng của vi tảo. Trong nghiên cứu này, vi tảo *T. weissflogii* sinh trưởng tốt trong môi trường có chứa 0,7 mgP/L. Trong một nghiên cứu trên một loài vi tảo biển khác là *Chaetoceros calcitrans*, Tantanasarit và cộng sự đã kết luận rằng với ngưỡng P là 1,161 mgP/L trong môi trường thì phù hợp hơn cho sự sinh trưởng của loài vi tảo này so với ngưỡng 0,387 mgP/L [14].

### 3.3. Ảnh hưởng của silic đến sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii*



**Hình 3.** Tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* ở các nghiệm thức Si khác nhau (\*: Nồng độ Si trong môi trường ESAW)

Kết quả cho thấy, khi thay đổi nồng độ Si trong môi trường dinh dưỡng từ 1,48 đến 8,88 mgSi/L, tốc độ sinh trưởng của tảo *T. weissflogii* cũng sẽ tăng đáng kể theo tỉ lệ thuận ( $p\text{-value} = 1,2 \times 10^{-5} < 0,05$ ) (Hình 3). Tốc độ sinh trưởng thấp nhất ghi nhận được trong thí nghiệm này là ở nghiệm thức bổ sung 1,48 mgSi/L ( $0,14 \pm 0,006 \text{ ngày}^{-1}$ ). Sự sinh trưởng của tảo càng mạnh khi bổ sung càng nhiều

Si. Ở nghiệm thức bổ sung lượng Si là 8,88 mgSi/L thì tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* đạt cao nhất với giá trị  $0,25 \pm 0,01 \text{ ngày}^{-1}$ , cao gấp 1,67 lần so với đối chứng. Ở môi trường giới hạn Si (1,48 mgSi/L).

Nguồn cung cấp Si có thể chuyển hóa trong môi trường nuôi là rất cần thiết cho sự phát triển nhanh chóng và tích lũy sinh khối vì Si là thành phần chính để xây dựng thành tế bào của vi tảo *T. weissflogii* nói riêng và tảo cát nói chung [15]. Môi trường giới hạn Si không chỉ ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp thành tế bào mà còn ảnh hưởng đến chu kỳ tế bào và tần suất phân chia tế bào của vi tảo. Trong môi trường giới hạn Si, tế bào ngừng phân chia ở pha G của chu kỳ tế bào khi không có đủ nguồn Si để hình thành vỏ [16]. Nồng độ Si giúp vi tảo *T. weissflogii* đạt tốc độ sinh trưởng cao nhất trong nghiên cứu này là 8,88 mgSi/L. Theo nghiên cứu của McNair và cộng sự, dưới điều kiện thiếu hụt Si, *T. pseudonana* có thể tiếp tục phát triển trong một thời gian ngắn bằng cách làm giảm nồng độ Si trong vỏ của nó [17]. Mặc dù, các loại tảo cát khác có thể phản ứng khác nhau, nhưng trong trường hợp không có Si thì *T. weissflogii* cũng như hầu hết các loài tảo cát khác sẽ ngừng phát triển [18].

### 3.4. Tối ưu hóa tỷ lệ nồng độ nitơ, photpho, silic trong môi trường nuôi cấy vi tảo *T. weissflogii*

Dựa trên kết quả từ các thí nghiệm riêng lẻ trên, một thí nghiệm kiểu BBD nhằm khảo sát tổ hợp dinh dưỡng tối ưu cho vi tảo *T. weissflogii* đã được thiết kế với 21 nghiệm thức với chi tiết nồng độ các chất được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả cho thấy, với các tổ hợp như vậy, tốc độ sinh trưởng có thể dao động trong khoảng thấp nhất từ  $0,145 \text{ ngày}^{-1}$  (nghiệm thức số 16) đến cao nhất đạt  $0,298 \text{ ngày}^{-1}$  (nghiệm thức số 18) (Bảng 2).

Từ kết quả thí nghiệm trên, mô hình hồi quy bậc 2 đầy đủ (công thức 3) dự đoán tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* dựa trên 3 yếu tố dinh dưỡng N, P, Si đã được xây dựng bằng RSM. Các thông số của mô hình và giá trị kiểm định được thể hiện ở Bảng 3:

$$Y = 0,2593 + 0,0303x_1 + 0,0053x_2 + 0,0074x_3 + 0,0139x_1x_2 - 0,0064x_1x_3 + 0,0061x_2x_3 - 0,0165x_1^2 - 0,0256x_2^2 - 0,0225x_3^2 \quad (3)$$

Kết quả phân tích cho thấy, 70,62% sự biến động trong tốc độ sinh trưởng của tảo *T. weissflogii* có thể được giải thích bằng sự thay đổi tổ hợp giá trị của ba biến khảo sát là nồng độ nitơ, photpho và silic với độ tin cậy 99,99% ( $p\text{-value} = 0,003 < 0,05$ ). Giá trị lack of fit =  $0,3287 > 0,05$  chứng tỏ rằng, sự chênh lệch giữa các tốc độ sinh trưởng dự đoán theo mô hình và tốc độ sinh trưởng từ số liệu thực nghiệm là không có sự khác biệt đáng kể, tức là mô hình này có thể được sử dụng để dự đoán tốc độ sinh trưởng dựa trên giá trị nồng độ N, P, Si bổ sung vào môi trường.

Trong mô hình này, cả 3 yếu tố dinh dưỡng đều có ảnh hưởng lớn đến tốc độ sinh trưởng ( $p\text{-values} < 0,05$ ), trong đó nitơ có ảnh hưởng lớn nhất với hệ số ảnh hưởng theo hàm bậc 1 là 0,0303 và bậc 2 là -0,0165. P và Si ảnh hưởng tốc độ sinh trưởng ở một mức độ thấp hơn với hệ số ảnh hưởng theo hàm bậc 2 lần lượt là -0,0256 và -0,0225. Trong khi đó, những ảnh hưởng tương tác của các cặp yếu tố dinh dưỡng là không có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 2.** Thiết kế Box-Behnken với các giá trị thử nghiệm của tốc độ sinh trưởng ở vi tảo *T. weissflogii*

STT	Mã code			Điều kiện thực tế			Tốc độ sinh trưởng (ngày <sup>-1</sup> )
	N (mg/L)	P (mg/L)	Si (mg/L)	N (mg/L)	P (mg/L)	Si (mg/L)	
1	-1	-1	+1	3,84	0,35	13,32	0,192
2	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,270
3	-1	-1	-1	3,84	0,35	4,44	0,172
4	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,298
5	+1	+1	+1	11,52	1,05	13,32	0,246
6	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,244
7	+1	-1	+1	11,52	0,35	13,32	0,184
8	-1	+1,5	+1	3,84	1,05	13,32	0,189
9	+1	-1	-1	11,52	0,35	4,44	0,199
10	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,273
11	-1	+1,5	-1	3,84	1,05	4,44	0,154
12	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,246
13	+1	+1	-1	11,52	1,05	4,44	0,227
14	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,244
15	0	+1,5	0	7,68	1,225	8,88	0,200
16	-0,5	0	0	1,92	0,7	8,88	0,145
17	0	0	+1,5	7,68	0,7	15,54	0,219
18	+1,5	0	0	13,44	0,7	8,88	0,298
19	0	0	-1,5	7,68	0,7	2,22	0,197
20	0	0	0	7,68	0,7	8,88	0,242
21	0	-1,5	0	7,68	0,175	8,88	0,202

**Bảng 3.** Các hệ số hồi quy trong mô hình đa thức bậc hai ước tính tốc độ sinh trưởng của *T. weissflogii* dựa trên N, P, Si

Biến hồi quy	Hằng số hồi quy	p - value
$\beta$	0,2593	7,227x10 <sup>-12</sup> ***
N ( $x_1$ )	0,0303	0,0008164 ***
P ( $x_2$ )	0,0053	0,4433373
Si ( $x_3$ )	0,0074	0,2913307
N:P ( $x_1: x_2$ )	0,0139	0,1227654
N:Si ( $x_1:x_3$ )	-0,0064	0,4586246
P:Si ( $x_2:x_3$ )	0,0061	0,4760011
N <sup>2</sup> ( $x_1$ ) <sup>2</sup>	-0,0165	0,0430863 *
P <sup>2</sup> ( $x_2$ ) <sup>2</sup>	-0,0256	0,0045427 **
Si <sup>2</sup> ( $x_3$ ) <sup>2</sup>	-0,0225	0,0097650 **
<b>Các thông số của mô hình</b>		
<b>Adjusted R-square</b>	<b>p-value</b>	<b>Lack of fit</b>
0,7062	0,002878	0,3287

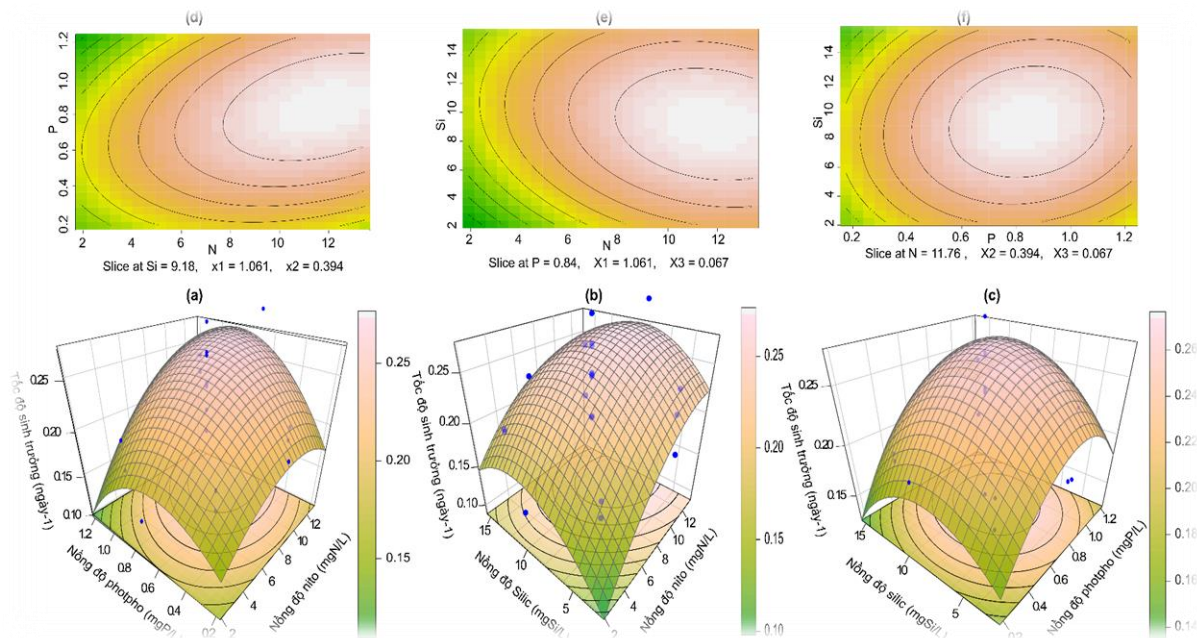
Giá trị có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy: (\*): 95%; (\*\*): 99%; (\*\*\*): 99,99%

Một bộ điều kiện tối ưu cũng đã được đề xuất từ mô hình, cụ thể là  $x_1 = 1,077$ ,  $x_2 = 0,403$  và  $x_3 = 0,066$ , tương ứng với nồng độ N = 11,815 mg/L, nồng độ P = 0,841 mg/L và nồng độ Si = 9,173 mg/L. Với các giá trị này, tốc độ sinh trưởng tối đa được dự đoán đạt 0,276 ngày<sup>-1</sup> theo công thức (1).

Mô hình bề mặt đáp ứng ba chiều được vẽ để thể hiện trực quan sự tương tác giữa các tham số và để xác định khoảng nồng độ tối ưu của từng yếu tố dinh dưỡng (Hình

4). Có thể thấy, tốc độ sinh trưởng tăng lên khi tăng đồng thời nồng độ của N, P và Si trong môi trường dinh dưỡng. Tuy nhiên, nồng độ N, P, Si tăng đến mức độ tối đa thì tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* bắt đầu giảm. Cụ thể, khi cố định Si ở nồng độ 9,17 mgSi/L, tốc độ sinh trưởng đạt cực đại trong khoảng nồng độ từ 10-13 mgN/L và 0,7-1 mgP/L (Hình 4a). Ở nồng độ N là 11,82 mgN/L, khi tăng nồng độ P trong khoảng 0,7-0,9 mgP/L và Si từ 7-10 mgSi/L thì tốc độ sinh trưởng đạt cực đại (Hình 4b). Tương tự, ở nồng độ P cố định là 0,84 mgP/L, khi nồng độ N trong khoảng 10-13 mgN/L và Si trong khoảng 7-11 mgSi/L thì tảo có tốc độ sinh trưởng tốt nhất (Hình 4).

Sabu và cộng sự cũng đã sử dụng RSM để tối ưu hóa các thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy nhằm tăng cường sản xuất sinh khối và hàm lượng lipid trong tảo cát *Navicula phyllepta* [19]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Silic có vai trò quan trọng trong sản xuất sinh khối, trong khi ure, photphat và nhiệt độ cho thấy tác động đồng thời đến hàm lượng lipid. Các giá trị dự đoán thu được từ mô hình là: 4,89 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, 0,90 mM ure, 0,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và nhiệt độ 30,8°C tạo sinh khối 1,18 g/L, trong khi 4,69 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, 0,76 mM ure, 0,13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và nhiệt độ 25°C cho hàm lượng lipid thu được là 0,16 g/L. Để xác minh dự đoán mô hình, một thí nghiệm bổ sung với tổ hợp điều kiện tối ưu đã được thực hiện và thu được sinh khối là 1,2 ± 0,08 g/L, cao hơn 1,62 lần (tăng 64%) so với trong các điều kiện chưa được tối ưu (0,74 ± 0,08 g/L). Tổng hàm lượng lipid thu được là 0,11 ± 0,003 g/L, cao hơn 1,2 lần (tăng 22%) so với trong điều kiện không được tối ưu hóa (0,09 ± 0,009 g/L) [19].



**Hình 4.** Đường đồng mức (a), (b), (c) và mô hình đáp ứng bề mặt 3D (d), (e), (f) biểu diễn sự phụ thuộc của tốc độ sinh trưởng của vi tảo *T. weissflogii* bởi các biến độc lập: nồng độ N, P, Si bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM).

#### 4. Kết luận

Tóm lại, trong các thí nghiệm riêng lẻ, tảo có tốc độ sinh trưởng tốt nhất ở môi trường có nồng độ N là 7,68 mgN/L ( $\mu=0,21 \pm 0,004$  ngày<sup>-1</sup>), photpho là 0,7 mgP/L ( $\mu=0,168 \pm 0,02$  ngày<sup>-1</sup>), và Silic là 8,88 mgSi/L ( $\mu=0,25 \pm 0,01$  ngày<sup>-1</sup>). Mô hình mô tả sự ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố dinh dưỡng N, P, Si đến tốc độ sinh trưởng được thể hiện bằng phương trình:

$$\begin{aligned} \mu = & 0,2593 + 0,0303N + 0,0053P + 0,0074Si \\ & + 0,0139NP - 0,0064NSi + 0,0061PSi - 0,0165N^2 \\ & - 0,0256P^2 - 0,0225Si^2 \end{aligned}$$

Kết quả từ RSM cũng đề xuất tổ hợp điều kiện tối ưu là  $x_1=1,077$ ,  $x_2=0,403$  và  $x_3=0,066$ , tương ứng với nồng độ N = 11,815 mg/L, nồng độ P = 0,841 mg/L và nồng độ Si = 9,173 mg/L (1). Với các giá trị này, tốc độ sinh trưởng tối đa được dự đoán đạt 0,276 ngày<sup>-1</sup>.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Xuan, "Shrimp remains the 'trump card' of seafood exports in the coming years | Business | Vietnam+ (VietnamPlus)", *Vietnamplus*. [Online] Available: <https://www.vietnamplus.vn/tom-van-la-at-chu-bai-cua-xuat-khau-thuy-san-trong-nhung-nam-toi/766701.vnp> [accessed Mar. 03, 2023].
- [2] A. Muller-Feuga, R. Robert, C. Cahu, J. Robin, and P. Divanach, "Uses of microalgae in aquaculture", *Live Feeds Mar. Aquac.*, vol. 1, pp. 253–299, 2003.
- [3] P. Kiatmetha, W. Siangdang, B. Bunnag, S. Senapin, and B. Withyachumnarnkul, "Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*", *Aquac. Int.*, vol. 19, pp. 599–609, 2011.
- [4] T. D. Mai, K. J. Lee-Chang, I. D. Jameson, T. Hoang, N. B. A. Cai, and H. Q. Pham, "Fatty acid profiles of selected microalgae used as live feeds for shrimp postlarvae in Vietnam", *Aquac. J.*, vol. 1, no. 1, pp. 26–38, 2021.
- [5] Grobbelaar, Johan U. "Microalgal biomass production: challenges and realities", *Photosynthesis research*, vol. 106, pp. 135–144, 2010.
- [6] S. J. M. Breig and K. J. K. Luti, "Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures", *Mater. Today Proc.*, vol. 42, pp. 2277–2284, 2021.

- [7] J. A. Berges, D. J. Franklin, and P. J. Harrison, "Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades", *J. Phycol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1138–1145, 2001.
- [8] R. V. Lenth, "Response-surface methods in R, using rsm", *J. Stat. Softw.*, vol. 32, pp. 1–17, 2010.
- [9] R. R Core Team, "R: A language and environment for statistical computing", 2013.
- [10] F. E. Hernández-Sandoval *et al.*, "Effects on Cell Growth, Lipid and Biochemical Composition of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) Cultured under Two Nitrogen Sources", *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 3, p. 961, 2022.
- [11] E. Huertas, O. Montero, and L. M. Lubián, "Effects of dissolved inorganic carbon availability on growth, nutrient uptake and chlorophyll fluorescence of two species of marine microalgae", *Aquac. Eng.*, vol. 22, no. 3, pp. 181–197, 2000.
- [12] H. Y. El-Kassas, "Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* sp. grown under nutrient stress conditions", *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 39, no. 4, pp. 233–239, 2013.
- [13] Q. Hu, "Environmental effects on cell composition", *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.*, pp. 114–122, 2013.
- [14] C. Tantanararit, A. J. Englande, and S. Babel, "Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom *Chaetoceros calcitrans* under high nutrient concentrations", *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, vol. 446, pp. 67–75, 2013.
- [15] T. Mock *et al.*, "Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 5, pp. 1579–1584, 2008.
- [16] M. A. Brzezinski, R. J. Olson, and S. W. Chisholm, "Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms", *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, pp. 83–96, 1990.
- [17] H. M. McNair, M. A. Brzezinski, and J. W. Krause, "Diatom populations in an upwelling environment decrease silica content to avoid growth limitation", *Environ. Microbiol.*, vol. 20, no. 11, pp. 4184–4193, 2018.
- [18] M. Hildebrand *et al.*, "Nanoscale control of silica morphology and three-dimensional structure during diatom cell wall formation", *J. Mater. Res.*, vol. 21, no. 10, pp. 2689–2698, 2006.
- [19] S. Sabu, I. S. B. Singh, and V. Joseph, "Optimisation of critical medium components and culture conditions for enhanced biomass and lipid production in the oleaginous diatom *Navicula phyllepta*: a statistical approach", *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, pp. 26763–26777, 2017.