

BỘ GIÁO DỤC VÀ
ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ PHƯƠNG DUNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SINH KHỐI GIÀU NHỰA PHÂN HUỶ
SINH HỌC (PHB) TỪ NƯỚC THẢI SINH HOẠT
BẰNG VI KHUẨN LAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU,
LUYỆN KIM VÀ MÔI TRƯỜNG**

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ
ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG DUNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SINH KHỐI GIÀU NHỰA PHÂN HỦY
SINH HỌC (PHB) TỪ NƯỚC THẢI SINH HOẠT
BẰNG VI KHUẨN LAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU,
LUYỆN KIM VÀ MÔI TRƯỜNG**

Ngành: Kỹ thuật môi trường

Mã số: 9 52 03 20

Xác nhận của Học viện
khoa học và Công nghệ

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung

Người hướng dẫn chính

A blue ink signature of PGS. TS Trần Đăng Thuận.

PGS. TS Trần Đăng Thuận

Người hướng dẫn phụ

A blue ink signature of TS. Phan Quan Thăng.

TS. Phan Quan Thăng

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “*Nghiên cứu sản xuất sinh khối giàu nhựa phân huỷ sinh học (PHB) từ nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam*” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tài liệu tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự đồng ý, cho phép của các tác giả khác khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 04 tháng 5 năm 2026

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Thị Phương Dung

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, nơi đã đào tạo, hướng dẫn và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án tiến sĩ. Sự đồng hành và môi trường học thuật chuyên sâu tại Học viện là nền tảng vững chắc để tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, tập thể cán bộ, chuyên viên phòng Vật liệu tiên tiến - Viện Hóa học; phòng Phân tích độc chất - Viện Khoa học công nghệ năng lượng và Môi trường thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ thiết bị, cơ sở vật chất cũng như chuyên môn kỹ thuật trong quá trình thực hiện các thí nghiệm thực nghiệm, đóng góp quan trọng cho kết quả nghiên cứu của luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban lãnh đạo Trường Đại học Công nghệ Giao thông vận tải, Khoa Khoa học ứng dụng và Bộ môn Hoá học - Môi trường đơn vị đã cử tôi đi học và luôn tạo điều kiện thuận lợi về thời gian, chuyên môn và tinh thần, vật chất trong suốt thời gian tôi theo học nghiên cứu sinh.

Đặc biệt, Tôi trân trọng và gửi lời biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Trần Đăng Thuận và TS. Phan Quang Thăng - hai nhà khoa học đã trực tiếp hướng dẫn, tận tâm đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thiện luận án. Sự định hướng chuyên môn sâu sắc, những góp ý quý báu và tinh thần trách nhiệm cao của các thầy là nguồn động lực lớn giúp tôi vượt qua mọi khó khăn trong quá trình thực hiện đề tài luận án.

Tôi cũng xin cảm ơn các nhà khoa học, các chuyên gia đã luôn hỗ trợ, cho tôi các ý kiến góp ý quý báu liên quan đến nghiên cứu của luận án cũng như những đánh giá chất lượng để bản luận án được hoàn thiện hơn và tạo động lực để tôi hoàn thành tốt nhiệm vụ nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc đến những người thân trong gia đình, đồng nghiệp và bạn bè - điểm tựa tinh thần vững chắc, luôn quan tâm, động viên khích lệ, ủng hộ và giúp đỡ, sát cánh cùng tôi trong suốt chặng đường học tập và nghiên cứu khoa học.

Nghiên cứu sinh



Nguyễn Thị Phương Dung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	xi
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
4. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu.....	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của Luận án	3
6. Những đóng góp mới của Luận án	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	5
1.1. Tổng quan về vi khuẩn lam	5
1.1.1. Khái niệm, đặc điểm sinh học và phân loại vi khuẩn lam.....	5
1.1.2. Vi khuẩn lam <i>Synechocystis salina</i>	6
1.1.3. Vi khuẩn lam <i>Spirulina sp</i>	8
1.1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam	9
1.1.5. Tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn lam	11
1.2. Vai trò của vi khuẩn lam trong xử lý nước thải sinh hoạt.....	12
1.2.1. Thực trạng phát sinh và hậu quả của ô nhiễm do nước thải sinh hoạt	12
1.2.2. Phương pháp xử lý nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam	13
1.3. Vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học	16
1.3.1. Tổng quan về nhựa phân huỷ sinh học	16
1.3.2. Nhựa sinh học PHB và tiềm năng sản xuất từ vi khuẩn lam.....	17
1.3.2.1. Khái niệm, đặc điểm, và ứng dụng của nhựa phân huỷ sinh học PHB	17
1.3.2.2. Vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học PHA/PHB	19
1.3.3. Phương pháp sản xuất và tiêu chí đánh giá chất lượng PHB	29
1.4. Ứng dụng phương pháp thống kê trong sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sản xuất sinh khối và PHB của vi khuẩn lam..	31
1.5. Phương pháp chiết tách, tinh sạch và phân tích đặc tính vật liệu PHB.....	32
1.5.1. Phương pháp chiết tách, tinh sạch PHB	32
1.5.2. Phương pháp nghiên cứu đặc tính của vật liệu nhựa sinh học PHB	34

1.6. Các nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải trên thế giới và tại Việt Nam.....	35
1.6.1. Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải trên Thế giới	35
1.6.2. Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải tại Việt Nam	37
1.6.3. Đánh giá tổng quan các nghiên cứu trên Thế giới và tại Việt Nam	38
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.1. Đối tượng, hoá chất và thiết bị nghiên cứu	41
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	41
2.1.2. Hoá chất.....	42
2.1.3. Thiết bị thí nghiệm	43
2.2. Phương pháp nghiên cứu	43
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm.....	43
2.2.1.1. Phương pháp nhân giống vi khuẩn lam	45
2.2.1.2. Sàng lọc vi khuẩn lam tăng trưởng nhanh và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối	45
2.2.1.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy bởi vi khuẩn lam trong môi trường quang dưỡng.....	46
2.2.1.4. Tối ưu hóa tăng trưởng sinh khối và hàm lượng PHB sản xuất bởi <i>S. salina</i> M8	48
2.2.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi đến khả năng sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam	50
2.2.1.6. Sản xuất sinh khối và tích lũy PHB của vi khuẩn lam trong nước thải sinh hoạt với hệ thống quang sinh dạng ống quy mô 30 L.....	51
2.2.2. Phương pháp phân tích	52
2.2.2.1. Phân tích đặc tính nước thải và đánh giá hiệu quả xử lý.....	52
2.2.2.2. Phương pháp đánh giá tăng trưởng vi khuẩn lam và thu hoạch sinh khối	54
2.2.2.3. Phương pháp chiết xuất, định lượng và đặc tính của PHB.....	55
2.2.3. Phân tích xử lý số liệu	57
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	58
3.1. Kết quả lựa chọn chủng vi khuẩn lam tăng trưởng nhanh và hàm lượng tích lũy PHB cao trong sinh khối	58

3.2. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng tích lũy PHB bởi <i>S. salina</i> M8	60
3.2.1. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối bởi <i>S. salina</i> M8	63
3.2.2. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến hàm lượng tích lũy PHB bởi <i>S. salina</i> M8	70
3.3. Kết quả về tối ưu hóa sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy bởi vi khuẩn lam <i>S. salina</i> M8	73
3.3.1. Tối ưu hoá sinh khối khô tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8	74
3.3.2. Tối ưu hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8.....	79
3.3.3. Kết quả thí nghiệm kiểm chứng mô hình tối ưu và đánh giá độ tin cậy của mô hình hồi quy bậc hai sinh khối khô và hàm lượng PHB	87
3.4. Kết quả về ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi đến sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt của <i>S. salina</i> M8	88
3.4.1 Kết quả phân tích đặc tính của mẫu nước thải sinh hoạt.....	89
3.4.2. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ C:N:P đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi <i>S. salina</i> M8	90
3.4.2.1. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ C:N:P đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB bởi <i>S. salina</i> M8.....	90
3.4.2.2. Đánh giá hiệu quả xử lý chất ô nhiễm trong nước thải của <i>S. salina</i> M8 tại các tỷ lệ C:N:P	92
3.4.3. Kết quả về ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi <i>S. salina</i> M8	100
3.4.3.1. Kết quả về ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB bởi <i>S. salina</i> M8	100
3.4.3.2. Đánh giá hiệu quả xử lý chất ô nhiễm trong nước thải của <i>S. salina</i> M8 tại pH =7	102
3.4.4. Kết quả về ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi <i>S. salina</i> M8.....	103
3.4.5. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ giống <i>S. salina</i> M8 ban đầu đến sinh trưởng của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải	106
3.4.6. Kết quả về khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải tiết trùng và không tiết trùng	108
3.5. Thử nghiệm sản xuất sinh khối và PHB từ <i>S. salina</i> M8 nuôi trong nước thải sinh hoạt thô với hệ thống quang sinh 30 L	112

3.6. Kết quả về nghiên cứu chiết tách và đặc trưng vật liệu nhựa sinh học PHB từ sinh khối <i>S. salina</i> M8.....	123
3.6.1. Kết quả về ảnh hưởng của các yếu tố chiết tách đến hiệu suất thu hồi PHB.....	123
3.6.1.1. Kết quả về ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách.....	123
3.6.1.2. Kết quả về ảnh hưởng của thời gian chiết tách	124
3.6.1.3. Kết quả về ảnh hưởng của thể tích dung môi chiết chloroform	125
3.6.1.4. Cơ chế hòa tan PHB trong chloroform và phương pháp thu hồi - xử lý dung môi	126
3.6.1.5. Sinh khối còn lại sau thu hồi PHB	126
3.6.2. Đặc tính của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết suất từ sinh khối <i>S. salina</i> M8	128
3.6.2.1 Đặc tính cấu trúc phân tử của vật liệu nhựa sinh học PHB thông qua phổ FT-IR	128
3.6.2.2. Đặc tính cấu trúc của vật liệu nhựa sinh học PHB thông qua phổ ¹ H-NMR và ¹³ C-NMR	129
3.6.2.3. Đặc tính phổ nhiệt học qua phân tích TGA và DSC của vật liệu nhựa sinh học PHB	131
3.6.2.4. Khối lượng phân tử trung bình của PHB tinh sạch từ <i>S. salina</i> M8	134
3.6.2.5. Hình thái bề mặt của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết tách từ <i>S. salina</i> M8..	136
3.7. Đánh giá tổng hợp mô hình tuần hoàn kết hợp xử lý nước thải – thu hồi sinh khối – sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB.....	137
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	139
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ	141
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	142

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
1	ATP	Adenosine Triphosphate	Phân tử cung cấp năng lượng cho tế bào hoạt động
2	BOD	Biochemical Oxygen Demand	Nhu cầu oxy sinh hoá
3	BNNMT	Ministry of Agriculture and Environment	Bộ Nông nghiệp và Môi trường
4	BBD	Box-Behnken design	thiết kế Box–Behnken
5	CDW	Cell Dry Weight	Trọng lượng khô tế bào
6	COD	Chemical oxygen demand	Nhu cầu oxy hoá học
7	EPS	Exopolysaccharides	Ngoại bào
8	GDP	Gross Domestic Product	Tổng sản phẩm trong nước
9	HDPE	High Density Polyethylene	Hợp chất nhựa dẻo có tỷ trọng cao
10	LDPE	Low Density Polyethylene	Hợp chất nhựa dẻo có tỷ trọng thấp
11	NF	Nanofiltration membrane technology	Công nghệ màng lọc nano
12	NTSH	Domestic wastewater	Nước thải sinh hoạt
13	OD _{750nm}	Optical density measured at a wavelength of 750 nm	Mật độ quang học ở bước sóng 750 nm
14	PHB	Polyhydroxybutyrate	Polyhydroxybutyrate
15	PLA	Acid polylactic	Acid polylactic
16	PHA	Polyhydroxyalkanoateses	Polyhydroxynalkanoateses
17	PLC	Polycaprolactone	Tổng hợp polyester
18	PE	Polyethylene	Polyethylene
19	PP	Polypropylene	Polypropylene

STT	Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
20	PBS	Polybutylene succinate	Polybutylene succinate
21	PBD	Plackett–Burman	Plackett–Burman
22	QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
23	RSM	Response Surface Methodology	Phương pháp bề mặt đáp ứng
24	<i>S. salina</i>	<i>Synechocystis salina</i>	<i>Synechocystis salina</i>
25	TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
26	TN	Total Nitrogen	Tổng Nitrogen
27	TP	Total Phosphorus	Tổng Phosphorus
28	TSS	Total Suspended Solids	Tổng chất rắn lơ lửng
29	UNEP	United Nations Environment Programme	Chương trình Môi trường Liên Hợp Quốc
30	VKL	Cyanobacteria	Vi khuẩn lam
31	VFAs	Volatile fatty acids	Acid béo dễ bay hơi
32	WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số vi khuẩn lam và phân bố trong tự nhiên [13].....	6
Bảng 2.1. Các yếu tố và mức mã hóa theo khoảng khảo sát của biến số trong thiết kế Plackett-Burman	47
Bảng 2.2. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Plackett-Burman nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi <i>S. salina</i> M8	47
Bảng 2.3. Các yếu tố và mức mã hóa theo khoảng khảo sát của biến số trong thiết kế Box–Behnken	48
Bảng 2.4. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Box–Behnken nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi <i>S. salina</i> M8	49
Bảng 3.1. Kết quả sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy của <i>Spirulina</i> sp.2, <i>Spirulina</i> sp.4 và <i>S. salina</i> M8 sau 8 ngày nuôi (n =3)	59
Bảng 3.2. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Plackett-Burman nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi <i>S. salina</i> M8	61
Bảng 3.3. Phân tích ANOVA các biến ảnh hưởng đến sinh khối sản xuất bởi <i>S. salina</i> M8.....	64
Bảng 3.4. Phân tích ANOVA các biến ảnh hưởng đến hàm lượng PHB sản xuất bởi <i>S. salina</i> M8.....	71
Bảng 3.5. Kết quả đo tăng trưởng sinh khối và tích lũy PHB trong sinh khối <i>S. salina</i> M8 theo thiết kế Box–Behnken	74
Bảng 3.6. Phân tích ANOVA đối với sinh khối khô của <i>S. salina</i> M8 cho các thí nghiệm dựa trên thiết kế Box-Behnken.....	75
Bảng 3.7. Bảng hệ số tương quan các biến tương ứng của mô hình hồi quy sinh khối khô của <i>S. salina</i> M8	77
Bảng 3.8. Phân tích ANOVA đối với hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8 cho các thí nghiệm dựa trên thiết kế Box-Behnken.....	79
Bảng 3.9. Hệ số tương quan các biến tương ứng của mô hình hồi quy hàm lượng PHB của <i>S. salina</i> M8	82
Bảng 3.10. Tổng hợp kết quả tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8.....	86
Bảng 3.11. Kết quả tính toán theo mô hình hồi quy và đo thực tế từ thí nghiệm kiểm chứng hàm lượng sinh khối và PHB bởi <i>S. salina</i> M8 (n = 2).....	88
Bảng 3.12. Kết quả phân tích chất lượng nước thải sau khi xử lý sơ bộ sử dụng trong các nghiên cứu thực nghiệm (n = 3)	90
Bảng 3.13. Nồng độ các chất ô nhiễm trong nước thải sau khi xử lý bởi <i>S. salina</i> M8 tại các tỷ lệ C:N:P khác nhau (n = 3).....	93

Bảng 3.14. Hàm lượng COD đầu vào (sau điều chỉnh) tại các tỷ lệ và hiệu suất xử lý (n = 3).....	97
Bảng 3.15. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi <i>S. salina</i> M8 tại tỷ lệ C:N:P = 70:7:1 (n = 3).....	99
Bảng 3.16. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi <i>S. salina</i> M8 tại pH = 7 (n = 3)	102
Bảng 3.17. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi <i>S. salina</i> M8 tại cường độ ánh sáng 13.500 lux (n = 3).....	105
Bảng 3.18. Kết quả về khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải tiệt trùng và không tiệt trùng	109
Bảng 3.19. So sánh định lượng sinh khối và hàm lượng PHB do <i>S. salina</i> M8 và các chủng vi khuẩn lam khác tạo ra trong các loại nước thải khác nhau.....	117
Bảng 3.20. Hiệu suất loại bỏ các chất ô nhiễm bởi <i>S. salina</i> M8 trong nước thải sinh hoạt hệ 30 L (n=3).....	119
Bảng 3.21. Tổng hợp so sánh hàm lượng PHB sản xuất bởi một số chủng thuộc loài <i>Synechocystis</i>	127

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình thái của <i>S. salina</i> M8	7
Hình 1.2. Bốn loài tảo có khả năng sinh PHB: A) <i>Athrospira</i> ; B) <i>Jasorvensis</i> ; C) <i>Synechocystis</i> PCC 6803; D) <i>Nostoc muscorum</i> [70].....	19
Hình 1.3. Cơ chế sinh tổng hợp PHB của vi khuẩn lam [78].....	22
Hình 2.1. Hình thái của vi khuẩn lam: <i>Spirulina</i> sp.2 (A), <i>Spirulina</i> sp.4 (B) và <i>S. salina</i> M8 (C-D)	42
Hình 2.2. Sơ đồ trình tự nghiên cứu thu hồi sinh khối, sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB kết hợp xử lý nước thải sinh hoạt bằng <i>S. salina</i> M8.....	44
Hình 3.1. Nồng độ sinh khối (A), tốc độ tăng trưởng riêng và hàm lượng PHB (B) trong sinh khối của 3 chủng vi khuẩn lam	60
Hình 3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa - lý đối với tăng trưởng sinh khối của <i>S. salina</i> M8.....	64
Hình 3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa - lý đối với hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối của <i>S. salina</i> M8.....	71
Hình 3.4. Đồ thị đường viền của sinh khối khô <i>S. salina</i> M8 biểu diễn theo hai biến	78
Hình 3.5. Đồ thị kết quả tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8	79
Hình 3.6. Đồ thị tối ưu 2D về tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8	83
Hình 3.7. Đồ thị bề mặt 3D về tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8	84
Hình 3.8. Sinh trưởng và tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải đã tiệt trùng với các tỷ lệ C:N:P khác nhau.....	91
Hình 3.9. Nồng độ N-NH ₄ ⁺ trong nước thải trước và sau xử lý bởi <i>S. salina</i> M8.....	94
Hình 3.10. Nồng độ T-N trong nước thải trước và sau xử lý	95
Hình 3.11. Nồng độ P-PO ₄ ³⁻ trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi <i>S. salina</i> M8 ...	96
Hình 3.12. Nồng độ T-P trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi <i>S. salina</i> M8	97
Hình 3.13. Nồng độ COD trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi <i>S. salina</i> M8.....	98
Hình 3.14. Sinh trưởng và tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải ở các giá trị pH khác nhau.....	101
Hình 3.15. Nồng độ và hiệu suất xử lý chất ô nhiễm trong nước thải bởi <i>S. salina</i> M8	102
Hình 3.16. Sinh trưởng và tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải ở cường độ ánh sáng khác nhau	103

Hình 3.17. Nồng độ và hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi <i>S. salina</i> M8 ở cường độ ánh sáng 13.500 lux.....	106
Hình 3.18. Sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy bởi <i>S. salina</i> M8 ở tỷ lệ giống đầu vào khác nhau.....	107
Hình 3.19. Sinh trưởng và hàm lượng PHB của <i>S. salina</i> M8 trong nước thải tiết trùng và không tiết trùng	109
Hình 3.20. Sự sinh trưởng và hàm lượng tích lũy PHB của <i>S. salina</i> M8 nuôi trong nước thải ở hệ thống quang sinh dạng ống đứng 30 L (n=3).....	115
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối <i>S. salina</i> M8 (n =3).....	123
Hình 3.22. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối <i>S. salina</i> M8 (n =3)	124
Hình 3.23. Ảnh hưởng của thể tích chloroform đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối <i>S. salina</i> M8 (n =3)	125
Hình 3.24. Phổ FT-IR của PHB chiết từ sinh khối <i>S. salina</i> M8	129
Hình 3.25. Phổ ¹ H-NMR và phổ ¹³ C-NMR của vật liệu nhựa sinh học PHB	130
Hình 3.26. Phổ TGA/DTG của vật liệu nhựa sinh học PHB.....	131
Hình 3.27. Phổ DSC của PHB chiết từ sinh khối <i>S. salina</i> M8	133
Hình 3.28. Khối lượng phân tử của PHB chiết và tinh sạch từ sinh khối <i>S. salina</i> M8	135
Hình 3.29. Hình thái SEM của PHB chiết từ sinh khối <i>S. salina</i> M8	136
Hình 3.30. Mô hình nghiên cứu quy trình xử lý nước thải và tinh chiết vật liệu nhựa sinh học PHB từ sinh khối của <i>S. salina</i> M8	138

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Vi khuẩn lam (cyanobacteria – VKL) là vi sinh vật quang dưỡng có khả năng sử dụng CO₂ và đồng hóa hiệu quả nitrogen, phosphorus trong môi trường nước. Nhờ khả năng thích nghi với điều kiện nước thải giàu dinh dưỡng, vi khuẩn lam được xem là đối tượng tiềm năng cho các giải pháp xử lý ô nhiễm gắn với thu hồi sinh khối giá trị cao.

Nước thải sinh hoạt đang là nguồn gây ô nhiễm môi trường nước nghiêm trọng tại Việt Nam. Tỷ lệ nước thải sinh hoạt được xử lý đạt quy chuẩn còn thấp, trong khi tại các đô thị lớn mỗi ngày phát sinh một khối lượng rất lớn nước thải chưa qua xử lý. Nước thải sinh hoạt thường chứa hàm lượng cao các chất hữu cơ và dinh dưỡng như COD, nitrogen, ammoni, phosphorus và chất rắn lơ lửng. Nếu không được xử lý hiệu quả, các chất này sẽ gây ra hiện tượng phú dưỡng, suy giảm chất lượng nguồn nước và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng.

Các công nghệ xử lý sinh học truyền thống (hiếu khí, kỵ khí) tuy được áp dụng rộng rãi nhưng còn hạn chế do tiêu hao năng lượng, phát sinh bùn thải thứ cấp và ít tạo ra giá trị kinh tế gia tăng. Trong khi đó, vi sinh vật quang dưỡng, đặc biệt là vi khuẩn lam, cho phép loại bỏ đồng thời COD, nitrogen và phosphorus thông qua quang hợp và đồng hóa dinh dưỡng, đồng thời chuyển hóa các chất ô nhiễm thành sinh khối có giá trị. Cách tiếp cận này mở ra hướng tích hợp xử lý nước thải với thu hồi sinh khối phục vụ sản xuất vật liệu sinh học phân hủy, phù hợp với định hướng kinh tế tuần hoàn.

Cùng với các vấn đề về xử lý nước thải, ô nhiễm nhựa cũng đang trở thành thách thức toàn cầu. Việc phụ thuộc lâu dài vào nhựa tổng hợp từ dầu mỏ đã tạo ra lượng lớn rác thải khó phân hủy, tích tụ trong đất, nước và đại dương, gây tổn hại đa dạng sinh học và ảnh hưởng sức khỏe con người. Vì nhựa đã được phát hiện trong nước uống, hải sản và thậm chí cả cơ thể người, đặt ra nhu cầu cấp thiết về vật liệu thay thế bền vững, an toàn và có khả năng phân hủy sinh học.

Trong số các polymer sinh học, polyhydroxybutyrate (PHB) thuộc nhóm polyhydroxyalkanoates (PHA) được đánh giá là vật liệu tiềm năng nhờ khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn, tính tương thích sinh học cao và các đặc tính cơ học tương đương polypropylene. Tuy nhiên, việc sản xuất PHB ở quy mô công nghiệp hiện nay vẫn gặp nhiều hạn chế do chi phí cao, chủ yếu xuất phát từ việc sử dụng vi khuẩn dị dưỡng đòi hỏi nguồn carbon tinh khiết, điều kiện lên men hiếu khí và mức tiêu thụ năng lượng lớn [1].

Nhằm khắc phục các hạn chế này, nhiều nghiên cứu gần đây đã chuyển hướng sang khai thác vi khuẩn lam quang dưỡng như một đối tượng sản xuất PHB thay thế.

Khác với vi khuẩn dị dưỡng, vi khuẩn lam có khả năng sử dụng CO₂ làm nguồn carbon, ánh sáng làm nguồn năng lượng, đồng thời tận dụng hiệu quả các dạng dinh dưỡng (N, P) có sẵn trong nước thải sinh hoạt làm môi trường nuôi cấy. Cách tiếp cận này không chỉ góp phần giảm chi phí sản xuất PHB mà còn cho phép tích hợp quá trình xử lý nước thải với thu hồi vật liệu sinh học, phù hợp với định hướng công nghệ xanh và kinh tế tuần hoàn. Thực tế, nhiều chủng vi khuẩn lam đã được ghi nhận có khả năng tích lũy PHB đáng kể trong sinh khối, bao gồm *Nostoc muscorum* [1], *Spirulina platensis*, *Cylindrospermum* sp., *Oscillatoria* sp. *Plectonema* sp. [2, 3] và *Synechocystis* sp. [4] Những kết quả này cho thấy vi khuẩn lam là công cụ sinh học kép đầy triển vọng, vừa góp phần xử lý ô nhiễm môi trường nước, vừa tạo ra polymer sinh học phân hủy hoàn toàn, có tiềm năng thay thế một phần nhựa hóa thạch truyền thống.

Xuất phát từ những tiềm năng trên, nghiên cứu sinh lựa chọn đề tài luận án tiến sĩ: “**Nghiên cứu sản xuất sinh khối giàu nhựa phân hủy sinh học (PHB) từ nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam**”. Luận án nhằm hướng tới phát triển mô hình tích hợp xử lý nước thải sinh hoạt với thu hồi sinh khối giàu PHB, góp phần thúc đẩy kinh tế xanh, theo định hướng nền kinh tế tuần hoàn và giảm thiểu tác động môi trường do nhựa truyền thống gây ra.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Lựa chọn được chủng vi khuẩn lam có khả năng sinh trưởng nhanh, thích nghi tốt trong môi trường nuôi cấy quang dưỡng đồng thời cho năng suất sinh khối và hàm lượng tích lũy nhựa phân hủy sinh học PHB cao.

- Ứng dụng chủng vi khuẩn lam được lựa chọn trong xử lý nước thải sinh hoạt kết hợp sản xuất sinh khối giàu PHB trong hệ thống quang sinh dạng ống ở quy mô 30L, điều kiện ngoài trời; đồng thời thu hồi sinh khối và tinh sạch PHB từ sinh khối để phân tích các đặc tính cơ bản của vật liệu PHB, qua đó chứng minh tiềm năng thay thế nhựa truyền thống, góp phần phát triển công nghệ sinh học xanh theo định hướng kinh tế tuần hoàn.

3. Nội dung nghiên cứu

+ **Nội dung 1:** Lựa chọn chủng vi khuẩn lam có tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi tốt trong môi trường nuôi cấy quang dưỡng, đồng thời cho năng suất sinh khối và hàm lượng tích lũy PHB cao.

+ **Nội dung 2:** Nghiên cứu tối ưu hoá các điều kiện hoá lý ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn lam được lựa chọn. Các yếu tố hoá lý bao gồm: pH, nhiệt độ, cường độ ánh sáng, tốc độ sục khí, nồng độ carbon, nồng độ phosphate,... nhằm nâng cao hiệu suất sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy.

+ **Nội dung 3:** Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi đến khả năng sinh trưởng, tích lũy hàm lượng PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt của chủng vi khuẩn lam được lựa chọn trong quy mô phòng thí nghiệm.

+ **Nội dung 4:** Ứng dụng thử nghiệm chủng vi khuẩn lam đã lựa chọn để sản xuất sinh khối giàu PHB kết hợp với xử lý nước thải sinh hoạt trong hệ thống quang sinh dạng ống với quy mô 30 L ngoài trời, đồng thời đánh giá hiệu quả hoạt động của hệ thống thông qua tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải.

+ **Nội dung 5:** Thu hồi sinh khối của vi khuẩn lam, chiết tách và tinh sạch PHB đồng thời nghiên cứu đặc tính vật liệu sinh học nhằm làm rõ tiềm năng ứng dụng của nhựa phân huỷ sinh học PHB và từng bước thay thế một phần cho nhựa truyền thống.

4. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

4.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Vi khuẩn lam: *S. salina* M8, *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4, các chủng này lấy từ bộ sưu tập giống được lưu giữ và nuôi cấy tại Phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hoá học, Viện Hàn Lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam (số18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội).

- Vật liệu nhựa phân huỷ sinh học PHB được tinh chiết từ vi khuẩn lam;

- Nước thải sinh hoạt được thu thập tại cống thoát nước thải của khu dân cư thuộc ngõ 66 phố Triều Khúc, phường Thanh Xuân Nam, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội (nay là phường Thanh Liệt, thành phố Hà Nội).

4.2. Phạm vi nghiên cứu:

Các thí nghiệm được thực hiện ở quy mô PTN và hệ quang sinh dạng ống 30 L ngoài trời tại Viện Hoá học và Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường, Viện Hàn Lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam (số18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội).

4.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp khảo sát, lấy mẫu.

- Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm.

- Phương pháp phân tích.

- Phương pháp tổng hợp, xử lý và đánh giá số liệu.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của Luận án

*** Ý nghĩa khoa học**

- Nghiên cứu được triển khai trên cơ sở kết hợp giữa công nghệ xử lý sinh học và sản xuất vật liệu sinh học, thông qua ứng dụng vi khuẩn lam có khả năng quang dưỡng và tích lũy PHB. PHB là loại nhựa phân huỷ sinh học tiềm năng thay thế nhựa

hóa thạch nhờ tính tương thích sinh học và khả năng phân hủy tự nhiên. Việc khai thác vi khuẩn lam – nhóm sinh vật có khả năng cố định CO₂, đồng hóa dinh dưỡng (N, P) từ nước thải và tạo sinh khối giá trị – mở ra hướng tiếp cận sinh học bền vững trong công nghệ môi trường.

- Kết quả nghiên cứu bổ sung cơ sở thực nghiệm và luận cứ khoa học cho mô hình công nghệ tích hợp xử lý nước thải – thu hồi sinh khối – sản xuất nhựa sinh học PHB, đồng thời làm rõ tiềm năng ứng dụng vi khuẩn lam trong công nghệ môi trường. Nghiên cứu này không chỉ thúc đẩy các hướng tiếp cận liên ngành giữa công nghệ sinh học, hóa sinh và môi trường mà còn cung cấp dữ liệu khoa học quan trọng cho phát triển vật liệu sinh học phân hủy hoàn toàn, từng bước thay thế dần cho nhựa truyền thống có nguồn gốc từ nhiên liệu hóa thạch.

*** Ý nghĩa thực tiễn**

- Đề tài có ý nghĩa thực tiễn khi hướng đến xây dựng và thử nghiệm mô hình thiết bị quang sinh dạng ống với quy mô nhỏ, ứng dụng trong xử lý nước thải sinh hoạt thực tế. Mô hình này vừa mang lại hiệu quả cao trong xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải, vừa tạo ra sinh khối giàu PHB – vật liệu sinh học thân thiện với môi trường.

- Kết quả nghiên cứu bước đầu làm cơ sở cho việc mở rộng ứng dụng chủng vi khuẩn lam được lựa chọn trong xử lý nước thải đô thị, nước thải chăn nuôi, chế biến thủy sản,... theo quy mô công nghiệp và theo hướng dòng liên tục.

6. Những đóng góp mới của Luận án

- Xác định và tối ưu hóa được các điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao đồng thời sinh khối và hàm lượng PHB bằng phương pháp thiết kế thực nghiệm thống kê [5].

- Triển khai thử nghiệm thành công ở hệ thống quang sinh dạng ống quy mô 30 L ngoài trời, đồng thời đạt hiệu quả xử lý nước thải cao với COD và BOD₅ đạt 99,6%, tổng N đạt 90,3% và tổng P đạt 95,9% [6, 7].

- Xây dựng được quy trình kết hợp xử lý nước thải sinh hoạt với tích lũy PHB bằng vi khuẩn lam *S. salina* M8, đạt sinh khối khô 3,4 g/L và hàm lượng PHB tối đa 50,2% khối lượng khô [6].

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về vi khuẩn lam

1.1.1. Khái niệm, đặc điểm sinh học và phân loại vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam thuộc nhóm vi khuẩn gram âm. Chúng có đặc điểm sinh học đa dạng (đơn bào, tập đoàn, dạng sợi), có khả năng cố định nitrogen (N_2) và chứa sắc tố phycobilisome, có vai trò nền tảng trong hệ sinh thái và sự tiến hóa, là sinh vật quang hợp sản xuất oxygen (tạo ra phần lớn oxygen trong khí quyển) và cố định nitrogen từ không khí thành dinh dưỡng cho đất, nước. Chúng giúp ổn định đất, làm thức ăn cho động vật thủy sinh, và được ứng dụng trong nông nghiệp (phân bón sinh học), công nghệ sinh học (nhựa sinh học, nhiên liệu sinh học); lục lạp của thực vật và tảo nhân chuẩn được cho là có nguồn gốc từ vi khuẩn lam thông qua quá trình nội cộng sinh [8, 9]. Các đặc điểm sinh học của vi khuẩn lam đã được nhận diện là có cấu trúc tế bào không có nhân hoàn chỉnh và các bào quan có màng bao bọc. Thành tế bào chứa peptidoglycan và thường có một lớp vỏ nhầy bao quanh. Hệ sắc tố chứa diệp lục tố a (màu lục), carotenoids (vàng/cam) và các phycobiliprotein (như phycocyanin tạo màu lam đặc trưng). Hình dạng tồn tại dưới dạng đơn bào, tập đoàn hoặc các sợi đa bào. Vi khuẩn lam có khả năng đặc biệt như một số loài có khả năng cố định đạm từ không khí (nhờ tế bào chuyên biệt gọi là dị bào). Vi khuẩn lam chủ yếu sinh sản vô tính bằng cách phân đôi tế bào, phân đoạn sợi (hormogonia) hoặc hình thành bào tử. Phần lớn vi khuẩn lam sinh trưởng theo cơ chế quang tự dưỡng, sử dụng ánh sáng mặt trời để chuyển hóa CO_2 và nước thành các hợp chất hữu cơ, đồng thời giải phóng oxygen thông qua hai hệ quang hóa (photosystem I và II). Trong điều kiện thuận lợi về ánh sáng, CO_2 , nước và khoáng chất, vi khuẩn lam có khả năng tổng hợp và tích lũy sinh khối với hiệu suất cao [10]. Ngoài ra, một số chủng còn có khả năng sinh trưởng theo cơ chế dị dưỡng hoặc quang dị dưỡng, giúp mở rộng khả năng thích nghi sinh lý. Về hình thái và phân loại, vi khuẩn lam có sự đa dạng cao, tồn tại dưới dạng đơn bào, tập hợp tế bào hoặc dạng sợi, với hình dạng từ cầu, que đến xoắn ốc. Dựa trên đặc điểm hình thái và sinh lý, vi khuẩn lam được chia thành năm phân nhóm chính: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* và *Stigonematales*; các nghiên cứu phát sinh loài hiện đại đã làm rõ hơn mối quan hệ tiến hóa giữa các nhóm này [11-13]. Phân bố các loài vi khuẩn lam theo môi trường sống được trình bày chi tiết trong **Bảng 1.1**.

Bảng 1.1. Một số vi khuẩn lam và phân bố trong tự nhiên [13]

Loài	Bộ	Môi trường sống
Dạng đơn bào		
<i>Microcystis</i> sp.	Chroococcales	Nước ngọt
<i>Synechococcus</i> sp.	Chroococcales	Nước mặn
<i>Synechocystis</i> sp.	Chroococcales	Nước ngọt
<i>Hyella caespitosa</i>	Pleurocapsales	Nước mặn
Dạng sợi		
<i>Lyngbya majuscula</i>	Oscillatoriales	Nước mặn (nhiệt đới)
<i>Oscillatoria</i> sp.	Oscillatoriales	Nước ngọt
<i>Anabaena</i> sp.	Nostocales	Nước ngọt
<i>Nostoc</i> sp.	Nostocales	Các lưu vực ngọt-mặn
<i>Fischerella muscicola</i>	Stigonematales	Nước ngọt

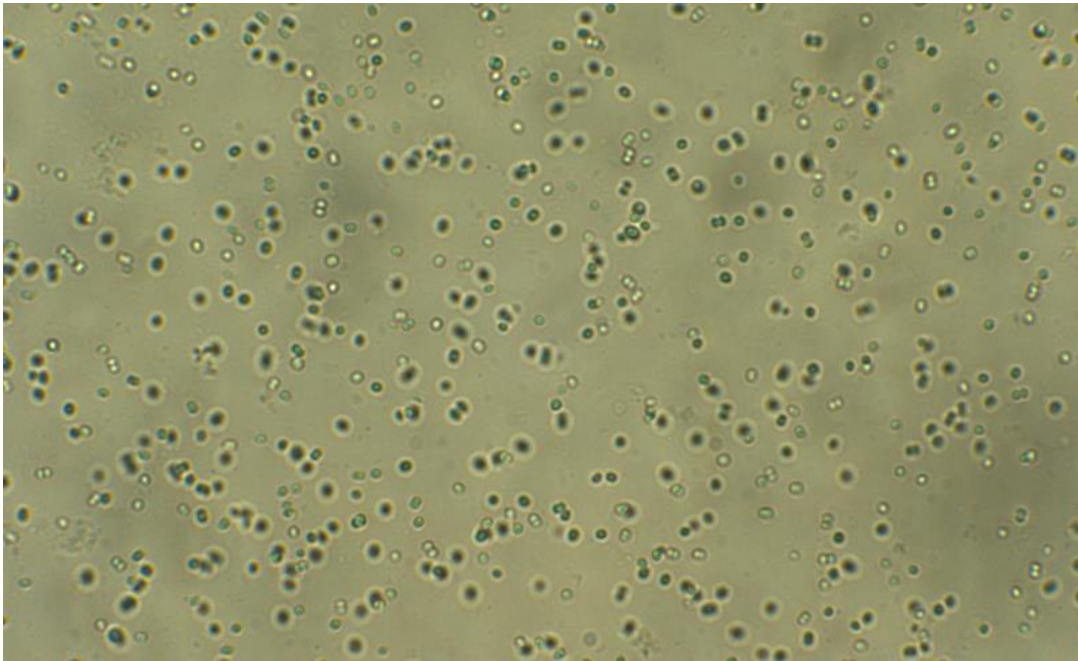
Về sinh thái, vi khuẩn lam phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái nước ngọt, nước mặn và trên cạn, với khả năng thích nghi cao trước các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ, pH và độ mặn. Nhờ tốc độ sinh trưởng nhanh và khả năng đồng hóa dinh dưỡng mạnh, trong điều kiện dư thừa nitrogen và phosphorus, vi khuẩn lam có thể phát triển bùng phát và gây hiện tượng “tảo nở hoa” tại các thủy vực. Trong điều kiện ấm, giàu dinh dưỡng (N, P), vi khuẩn lam phát triển nhanh, tạo lớp màng váng trên bề mặt nước [14]. Chính các đặc điểm sinh lý, sinh thái và khả năng tích lũy sinh khối nên vi khuẩn lam được xem là nguồn nguyên liệu sinh học đầy tiềm năng cho sản xuất các vật liệu sinh học phân hủy, đặc biệt là nhựa sinh học có khả năng thay thế nhựa có nguồn gốc hóa dầu.

1.1.2. Vi khuẩn lam *Synechocystis*

Synechocystis là một loài vi khuẩn lam đơn bào, thuộc chi *Synechocystis*, được biết đến với khả năng quang hợp mạnh nhờ sở hữu hệ sắc tố a-chlorophyll và phycocyanin, đồng thời có khả năng thích nghi với môi trường có sự biến động về thành phần dinh dưỡng như nước thải. Loài này thuộc nhóm vi khuẩn quang hợp oxygen, có tế bào hình cầu hoặc hình bầu dục, đường kính dao động trong khoảng 0,7–8 μm , không cố định đạm và có thể có hoặc không có lớp nhầy bao quanh tế bào [15]. Các tế bào thường tồn tại ở dạng đơn lẻ hoặc kết cụm nhỏ, với hệ màng thylakoid phân bố đều trong bào tương – đặc điểm điển hình của vi khuẩn lam đơn bào và có thể quan sát rõ dưới kính hiển vi điện tử truyền qua [16]. Những đặc điểm hình thái và cấu trúc này góp phần đảm bảo hiệu quả quang hợp, khả năng hấp thu dinh dưỡng và thích nghi với các điều kiện môi trường biến động, đặc biệt trong môi trường nước thải giàu dinh dưỡng.

Trong chi *Synechocystis*, có các loài *salina* hoặc sp.:

-
- Ngành: Cyanobacteria
 - Lớp: Cyanophyceae
 - Bộ: Synechococcales
 - Họ: Merismopediaceae
 - Chi: *Synechocystis*
 - Loài: *Synechocystis salina*, *Synechocystis* sp... [15]



Hình 1.1. Hình thái của *Synechocystis* [15]

Synechocystis được đánh giá là một chi vi khuẩn lam có tiềm năng sinh học cao, nhờ khả năng sinh trưởng linh hoạt trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau, bao gồm cả môi trường nước lợ và nước thải. Thông qua quá trình quang hợp oxygen sử dụng a-chlorophyll, chủng này hấp thụ năng lượng ánh sáng để chuyển hóa CO₂ thành năng lượng hóa học, đồng thời tạo ra oxygen và các hợp chất hữu cơ phục vụ sinh trưởng tế bào và tích lũy sinh khối. Đáng chú ý, *Synechocystis* có khả năng tích lũy PHA, tồn tại chủ yếu dưới dạng PHB - một polymer sinh học có khả năng phân hủy hoàn toàn thành CO₂, nước bởi các enzyme vi sinh vật. PHB được tổng hợp trực tiếp từ nguồn carbon vô cơ, qua đó giúp giảm phụ thuộc vào nguyên liệu hóa thạch và tránh cạnh tranh với chuỗi cung ứng lương thực, tạo lợi thế rõ rệt so với các quy trình sản xuất nhựa sinh học truyền thống. Bên cạnh PHB, *Synechocystis* còn là nguồn tiềm năng để khai thác nhiều hợp chất sinh học có giá trị gia tăng như phycocyanin, carotenoid, phycobiliprotein và các chất chống oxy hóa. Việc ứng dụng các kỹ thuật chiết tách hiện đại, điển hình là phương pháp hỗ trợ siêu âm, đã được chứng minh giúp nâng cao hiệu suất thu hồi, mở rộng triển vọng ứng dụng của sinh khối vi khuẩn lam trong các lĩnh vực dược phẩm, mỹ phẩm và công nghiệp thực phẩm [16].

Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy tiềm năng của *Synechocystis* sp. trong xử lý nước thải công nghiệp chứa kim loại nặng. Cụ thể, *Synechocystis* sp.

PCC 6803 đã được chứng minh có khả năng loại bỏ As(III) thông qua cơ chế hấp phụ lên lớp exopolysaccharides (EPS) và chuyển hóa sinh học nhờ hệ enzyme khử arsenate (arsBHC, arsI) [17]. Các kết quả này cho thấy triển vọng ứng dụng của nhóm vi khuẩn lam này trong xử lý môi trường tại các khu vực có nguy cơ ô nhiễm cao, như khai thác khoáng sản hoặc nuôi trồng thủy sản. Trong điều kiện hạn chế nitrogen, *S. salina* còn có khả năng tích lũy lipid với hàm lượng lên tới khoảng 34% khối lượng khô, trong đó thành phần lipid giàu axit béo không no chuỗi trung bình (C16–C18), phù hợp cho sản xuất biodiesel, đặc biệt tại các vùng ven biển có nguồn nước mặn dồi dào [18]. Đồng thời, loài này có khả năng loại bỏ hiệu quả các dạng nitrogen và phosphorus (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}) trong nước thải thông qua cơ chế hấp thu vào sinh khối, với hiệu suất loại bỏ có thể đạt tới 96% đối với phosphorus và 66% đối với nitrogen trong điều kiện tối ưu [19]. Các điều kiện môi trường thuận lợi cho sinh trưởng và tổng hợp hợp chất sinh học của *S. salina* bao gồm nhiệt độ khoảng 25°C, pH trung tính đến hơi kiềm (7–9) và nồng độ NaCl thấp [20]. Nhờ khả năng kết hợp giữa xử lý nước thải và sản xuất sản phẩm sinh học, *S. salina* được xem là đối tượng tiềm năng trong các hệ thống lọc sinh học tích hợp. Trong điều kiện nuôi cấy phù hợp, sinh khối *S. salina* có thể tích lũy PHB với hiệu suất đáng kể (> 30% sinh khối khô) [21].

1.1.3. Vi khuẩn lam *Spirulina* sp

Spirulina là các chủng vi khuẩn lam dạng sợi thuộc chi *Spirulina*, được ghi nhận có khả năng sinh trưởng ổn định, thích nghi tốt với môi trường giàu dinh dưỡng và có tiềm năng ứng dụng trong xử lý nước thải kết hợp thu hồi sinh khối. Các chủng thuộc chi *Spirulina* có đặc điểm hình thái dạng sợi xoắn đặc trưng, sinh trưởng ưu thế trong môi trường kiềm và giàu bicarbonate, phù hợp với điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng hoặc bán dị dưỡng [2, 22-24]. Về sinh trưởng, các nghiên cứu cho thấy *Spirulina* có tốc độ tăng trưởng tương đối nhanh trong điều kiện ánh sáng thích hợp và pH kiềm (~8–11), nhiệt độ 25–35°C, và nguồn cacbon vô cơ (HCO_3^-) cho phép hình thành sinh khối với mật độ cao trong thời gian ngắn. Đặc điểm này tạo lợi thế cho việc ứng dụng *Spirulina* trong các hệ thống xử lý nước thải, nơi yêu cầu sinh khối vi sinh vật phát triển nhanh để hấp thu và chuyển hóa các chất dinh dưỡng hòa tan [2, 22-24]. Liên quan đến khả năng xử lý nitrogen và phosphorus, *Spirulina* có khả năng đồng hóa hiệu quả các dạng nitrogen vô cơ (NH_4^+ , NO_3^-) và phosphorus hòa tan trong quá trình sinh trưởng, thông qua việc tích hợp các nguyên tố này vào cấu trúc tế bào, protein và các hợp chất phosphoryl hóa [2, 22-24]. Nhờ đó, các chủng *Spirulina* có tiềm năng góp phần làm giảm tải dinh dưỡng trong nước thải sinh hoạt hoặc nước thải giàu N–P, đồng thời tạo ra sinh khối có giá trị sử dụng tiếp theo [2, 22-24].

1.1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam

Sự sinh trưởng của vi khuẩn lam chịu chi phối bởi các yếu tố môi trường như ánh sáng, nhiệt độ, pH và dinh dưỡng, với mức độ ảnh hưởng thay đổi theo vùng địa lý. Ở khu vực ôn đới, ánh sáng và nhiệt độ là các yếu tố giới hạn chính, trong khi tại vùng nhiệt đới, nơi điều kiện nhiệt – quang thuận lợi quanh năm, dinh dưỡng (đặc biệt là nitrate và phosphate) đóng vai trò quyết định đến tốc độ tăng trưởng và mật độ quần thể vi khuẩn lam [25, 26]. Một số yếu tố chính, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam như sau:

- Ánh sáng: là yếu tố then chốt đối với vi khuẩn lam quang tự dưỡng, cung cấp năng lượng cho quá trình quang hợp trong dải PAR (400–700 nm). Cường độ ánh sáng thích hợp giúp duy trì tăng trưởng tối ưu, trong khi ánh sáng quá cao có thể gây bão hòa và ức chế quang hóa. Trong các hệ nuôi cấy mật độ cao hoặc thể tích lớn, hiện tượng che bóng làm giảm hiệu quả quang hợp, do đó cần khuấy trộn để tăng khả năng tiếp xúc ánh sáng. Cường độ ánh sáng tối ưu phụ thuộc quy mô hệ thống, khoảng ~1.000 lux cho bình nhỏ và 5.000–10.000 lux cho các hệ thống lớn hơn [27, 28]. Độ ổn định của nước như: Môi trường nước lặng, không chảy, ít bị xáo trộn giúp vi khuẩn lam (nhờ túi khí) nổi lên bề mặt để nhận ánh sáng tốt hơn.

- Nguồn dinh dưỡng: Để duy trì khả năng sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất, vi khuẩn lam cần các nguyên tố thiết yếu, trong đó nitrogen, phosphorus và carbon đóng vai trò trung tâm. Bên cạnh đó, một số khoáng chất và nguyên tố vi lượng như magie, sắt, mangan, kẽm và đồng cũng rất cần thiết với vai trò là đồng yếu tố cho các enzym trong chuỗi phản ứng sinh hóa [29]. Trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo, các nguồn cung cấp dinh dưỡng có thể được bổ sung dưới dạng các hợp chất dễ hòa tan như urê hoặc diammonium phosphate – giúp đảm bảo tỷ lệ giữa nitrogen và phosphorus ở mức phù hợp với nhu cầu phát triển của sinh khối [30].

- Nguồn carbon: là yếu tố không thể thiếu trong quá trình tổng hợp vật chất và cấu trúc tế bào. Trong tự nhiên, vi khuẩn lam hấp thu CO₂ từ khí quyển để phục vụ quá trình quang tự dưỡng. Tuy nhiên, do nồng độ CO₂ trong không khí chỉ chiếm khoảng 0,04%, tốc độ đồng hóa carbon từ nguồn này thường bị hạn chế. Việc bổ sung CO₂ có kiểm soát từ các nguồn tập trung như khí nén công nghiệp có thể làm tăng đáng kể hiệu quả quang hợp và nâng cao năng suất sinh khối [31]. Ngoài ra, trong một số trường hợp nuôi cấy hỗn hợp hoặc trong điều kiện thiếu sáng, các dạng carbon hữu cơ như glucose, lactose hay glycerol cũng có thể được sử dụng như nguồn năng lượng bổ sung. Tuy nhiên, sự tích tụ carbon hữu cơ trong môi trường – đặc biệt do sự phân hủy của tế bào chết hoặc bài tiết sản phẩm phụ – có thể tạo điều kiện cho các loài vi khuẩn dị dưỡng phát triển, từ đó ảnh hưởng tiêu cực đến độ ổn định của hệ thống nuôi. Do đó, đối với

các mô hình tái sử dụng môi trường cũ, cần theo dõi chặt chẽ hàm lượng carbon hữu cơ hòa tan để đảm bảo môi trường vẫn phù hợp cho vi khuẩn lam phát triển bền vững [32].

- Độ pH: Vi khuẩn lam thường ưa môi trường kiềm nhẹ, với dải pH tối ưu từ 8,2 - 8,7. Giá trị pH ảnh hưởng trực tiếp đến độ hòa tan của các muối dinh dưỡng và sự sẵn có của carbon vô cơ trong nước. Sự thay đổi đột ngột của pH sẽ dẫn đến rối loạn sinh lý tế bào và suy giảm tăng trưởng, thậm chí dẫn đến thất bại trong nuôi cấy. Trong hệ thống nuôi cấy với mật độ sinh khối cao, việc bổ sung khí CO₂ không chỉ thúc đẩy quang hợp mà còn là một phương pháp hữu hiệu để kiểm soát pH, đảm bảo môi trường không vượt quá giới hạn sinh học an toàn ($\text{pH} \leq 9$) trong suốt chu kỳ tăng trưởng [33]. Tuy nhiên trong quá trình quang hợp mạnh, việc hấp thụ CO₂ mạnh vẫn có thể làm pH môi trường tăng cao, do vậy, đòi hỏi các hệ thống nuôi cấy phải có cơ chế kiểm soát pH ổn định.

- Nhiệt độ: Đa số vi khuẩn lam phát triển tốt nhất trong khoảng 25–35°C. Nhiệt độ vượt quá ngưỡng tối ưu, các protein và hệ thống quang hợp có thể bị biến tính; ngược lại, nhiệt độ thấp sẽ làm chậm quá trình trao đổi chất, kìm hãm tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn [34, 35].

- Điều kiện nuôi khắc nghiệt: Bên cạnh các vi khuẩn lam ưa nhiệt, một số loài vi khuẩn lam có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện môi trường bất lợi như độ mặn cao hoặc pH kiềm, điển hình là *Arthrospira platensis* [36-38] và *Synechocystis* [39, 40]. Các chủng này có thể được duy trì trong môi trường hóa học đặc trưng – vốn không thuận lợi cho sự phát triển của nhiều loài vi sinh vật tạp nhiễm. Nhờ đó, chúng trở thành lựa chọn phù hợp trong hệ thống nuôi cấy có nguy cơ nhiễm tạp cao. Tuy nhiên, ở quy mô công nghiệp, việc làm sạch hoàn toàn hệ thống nuôi cấy giữa các chu kỳ vẫn là thách thức lớn do hạn chế trong thiết kế thiết bị và yêu cầu kỹ thuật cao về khử nhiễm. Một giải pháp khả thi được đề xuất là áp dụng phương pháp nuôi luân phiên giữa các loài vi khuẩn lam nước ngọt và nước mặn.

- Đặc tính của loài/chủng: Việc lựa chọn chủng vi khuẩn lam để sản xuất sinh khối và các hợp chất thứ cấp như phycocyanin, PHB cần dựa trên một số tiêu chí quan trọng. Trong đó, năng suất tổng hợp – phản ánh sự kết hợp giữa hiệu suất sinh khối và hàm lượng các hợp chất thứ cấp là một trong những thông số quan trọng nhất. Bên cạnh đó, khả năng thích nghi và phục hồi trước các tác động tự nhiên cũng như biến động môi trường như nhiệt độ và ánh sáng đóng vai trò quyết định đến hiệu quả nuôi cấy. Ngoài ra, các chủng không sinh độc tố hoặc không gây hại cho môi trường cần được ưu tiên trong định hướng ứng dụng thực tiễn [41-43].

- Phương pháp nuôi cấy: Nuôi cấy vi khuẩn lam tập trung vào việc tối ưu hóa các điều kiện môi trường để đạt hiệu suất cao về cả sinh khối (biomass) và các hợp chất thứ cấp có giá trị cao như PHB. Do sản lượng sinh khối và hợp chất thứ cấp thường có hiệu

suất tích lũy thấp trong điều kiện dinh dưỡng cân bằng nên việc nuôi cấy và thu hoạch vi khuẩn lam theo chế độ dòng liên tục khó có khả thi ở quy mô công nghiệp. Thay vào đó, quy trình nuôi cấy được chia thành hai giai đoạn: giai đoạn đầu tập trung tối ưu hóa sinh khối trong môi trường cân bằng về dinh dưỡng, tiếp theo là giai đoạn kích thích tổng hợp các hợp chất thứ cấp (như PHB, phycocyanin) trong điều kiện thiếu hụt dinh dưỡng nhưng giàu carbon. Trong thực tế, phương pháp thu hoạch toàn bộ sinh khối rồi tái phân tán vào môi trường mới không mang lại hiệu quả kinh tế trong vận hành thương mại do chi phí và kỹ thuật phức tạp. Giải pháp khả thi nhất là nuôi cấy theo mẻ (batch culture) với nguồn cung cấp CO₂ dư thừa và ổn định, kết hợp để hệ thống tự tiêu thụ hoàn toàn nguồn dinh dưỡng giới hạn (như nitrogen), từ đó kích thích quá trình tích lũy các hợp chất thứ cấp. Để tối ưu hiệu quả sinh trưởng và tích lũy sản phẩm, tỷ lệ các yếu tố dinh dưỡng C:N:P cần được xác định và điều chỉnh chính xác ngay từ đầu giai đoạn nuôi cấy [44, 45].

1.1.5. Tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam có tiềm năng ứng dụng đa dạng trong nhiều lĩnh vực nhờ khả năng quang hợp, cố định nitrogen và sản sinh hợp chất sinh học. Chúng được sử dụng làm phân bón sinh học (cố định đạm), thực phẩm chức năng (*Spirulina*), sản xuất nhiên liệu sinh học, nhựa phân hủy sinh học (*Synechocystis*), xử lý môi trường.

- Ứng dụng trong công nghiệp, nông nghiệp và môi trường: Vi khuẩn lam là nguồn giàu hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị, với ưu thế sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy, sử dụng trực tiếp CO₂ và khả năng sinh tổng hợp đa dạng enzyme, sắc tố, vitamin và hợp chất kháng sinh học. Nhờ đó, vi khuẩn lam được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất chế phẩm sinh học nông nghiệp, xử lý ô nhiễm môi trường và nuôi trồng thủy sản (*Synechocystis*). Khả năng hấp thụ dinh dưỡng (NO₃⁻, PO₄³⁻), kim loại nặng và phân hủy hợp chất hữu cơ bền vững cho phép vi khuẩn lam đồng thời xử lý nước thải và tạo sinh khối có giá trị, góp phần thay thế các giải pháp hóa học truyền thống.

- Ứng dụng trong công nghiệp dược – mỹ phẩm: Vi khuẩn lam là nguồn giàu sắc tố sinh học và chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, bao gồm 1,2-Propanediol 1,3-Propanediol, Isoprene, Limonene, Ethylene, β-phellandrene, 2,3-Butanediol [46].

- Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dinh dưỡng: Nhiều chủng vi khuẩn lam đặc biệt là chủng *Spirulina sp.* được thương mại hóa dưới dạng: Thực phẩm chức năng: giàu protein (chiếm 50–70% khối lượng khô), acid amin thiết yếu, vitamin B12, sắt, kẽm và omega-3.

- Ứng dụng trong công nghiệp năng lượng và vật liệu sinh học: (i) Nhiên liệu sinh học: bao gồm ethanol, hydrogen, isobutanol, axit béo, alka(e)nes nhờ biến đổi con

đường trao đổi chất trung gian (acetyl-CoA, mevalonate) [47, 48]. (ii) Nhựa sinh học: bao gồm PHA đặc biệt là 3-hydroxybutyrate (PHB) - được tổng hợp và tích lũy nội bào ở một số loài vi khuẩn lam [49, 50]. Các polymer sinh học này có đặc tính tương đương với nhựa truyền thống PP và PE, nhưng có khả năng phân hủy sinh học trong tự nhiên, mở ra hướng thay thế bền vững cho nhựa hóa dầu truyền thống.

Vi khuẩn lam đang dần chuyển dịch từ vai trò sinh vật thủy sinh tự nhiên sang nền tảng công nghệ sinh học có giá trị ứng dụng cao trong công nghiệp hiện đại. Việc khai thác hiệu quả vi khuẩn lam không chỉ góp phần giải quyết các vấn đề môi trường như xử lý ô nhiễm nước và giảm phát thải khí nhà kính thông qua cố định CO₂, mà còn cho phép tạo ra nhiều sản phẩm có giá trị gia tăng, bao gồm nhựa sinh học, dược phẩm, thực phẩm chức năng và năng lượng tái tạo. Trong bối cảnh phát triển kinh tế tuần hoàn và bền vững, vi khuẩn lam được xem là mắt xích sinh học quan trọng trong các mô hình tích hợp, tận dụng ánh sáng mặt trời và CO₂ làm đầu vào, đồng thời chuyển hóa các dòng chất thải thành sinh khối và sản phẩm hữu ích. Do đó, nghiên cứu và ứng dụng vi khuẩn lam không chỉ mang ý nghĩa khoa học mà còn đóng góp thiết thực vào việc xây dựng các mô hình công nghiệp xanh, thân thiện với môi trường và có giá trị kinh tế - xã hội lâu dài.

1.2. Vai trò của vi khuẩn lam trong xử lý nước thải sinh hoạt

1.2.1. Thực trạng phát sinh và hậu quả của ô nhiễm do nước thải sinh hoạt

Theo thống kê toàn cầu, thế giới thải ra khoảng 359,4 tỷ m³/năm nước thải, trong đó chỉ khoảng 52% được xử lý trước khi thải ra môi trường, phần còn lại gần như xả trực tiếp, gây áp lực lớn lên hệ sinh thái thủy sinh và sức khỏe cộng đồng [51]. Quá trình đô thị hóa, công nghiệp hóa và gia tăng dân số đã làm gia tăng nhanh chóng lượng nước thải, đặc biệt khi khoảng 70% nguồn nước ngọt toàn cầu được sử dụng cho nông nghiệp. Ngoài ra, nước thải sinh hoạt và công nghiệp còn chứa kim loại nặng (Cd, Pb, Hg, As, Cr) và vi sinh vật gây bệnh (*E. coli*, *Salmonella*, *Giardia*), có khả năng tích lũy lâu dài trong môi trường và xâm nhập vào chuỗi thực phẩm. Riêng tại Ấn Độ, thiệt hại do các bệnh lây truyền qua nguồn nước ước tính lên tới 600 triệu USD mỗi năm [51]. Điều này cho thấy nhu cầu cấp thiết áp dụng các công nghệ xử lý hiệu quả nhằm loại bỏ chất hữu cơ, chất dinh dưỡng, kim loại nặng và mầm bệnh, đồng thời mở rộng khả năng tái sử dụng nước an toàn trong nông nghiệp và công nghiệp.

Tại Việt Nam, ước tính lượng nước thải sinh hoạt phát sinh khoảng 12 triệu m³/ngày. Tỷ lệ thu gom và xử lý nước thải sinh hoạt còn ở mức rất hạn chế so với lượng nước thải phát sinh trong điều kiện đô thị hóa và gia tăng dân số. Theo báo cáo của Bộ Xây dựng, chỉ khoảng 12,5–15 % nước thải đô thị được thu gom và xử lý đạt chuẩn trước khi thải ra môi trường, trong khi phần lớn nước thải còn lại được xả trực tiếp vào hệ thống sông ngòi, kênh rạch mà không qua xử lý tập trung. Hệ thống xử lý nước thải

tập trung tại Việt Nam đã được đầu tư xây dựng tại các đô thị lớn, với khoảng 80–83 nhà máy xử lý nước thải đô thị và dự án tương đương có tổng công suất thiết kế trên 2,0 triệu m³/ngày, nhưng công suất vận hành thực tế còn thấp và tỷ lệ nước thải thực tế được xử lý theo tiêu chuẩn chỉ đạt khoảng 15–18 % tổng lượng nước thải phát sinh. Tại các đô thị lớn, tiến trình mở rộng và nâng công suất các nhà máy xử lý nước thải đang được thúc đẩy. Ví dụ, tại Thành phố Hồ Chí Minh, việc mở rộng Nhà máy Xử lý nước thải Bình Hưng đã nâng công suất xử lý lên khoảng 469.000 m³/ngày, giúp tăng tỷ lệ thu gom và xử lý nước thải đô thị từ khoảng 20,6 % lên hơn 40 %. Khi Nhà máy Nhiều Lộc – Thị Nghè (công suất 480.000 m³/ngày) đi vào vận hành trong giai đoạn 2025–2026, tỷ lệ này dự kiến đạt hơn 70% [52]. Tại Hà Nội, các kế hoạch đầu tư hệ thống thu gom và xử lý nước thải cũng đang được triển khai, với nhiều dự án nhà máy và mạng lưới thoát nước được quy hoạch nhằm nâng tỷ lệ xử lý nước thải trong giai đoạn 2026–2029. Việc mở rộng năng lực xử lý nước thải đô thị đã được triển khai thông qua xây dựng và đưa vào vận hành các công trình trọng điểm. Điển hình là Nhà máy xử lý nước thải Yên Xá, một trong những dự án hạ tầng môi trường lớn nhất của thành phố và khu vực miền Bắc. Nhà máy này được thiết kế với công suất xử lý 270.000 m³/ngày đêm, sử dụng công nghệ bùn hoạt tính AO với mục tiêu thu gom và xử lý nước thải từ nhiều Quận nội đô, bao gồm các khu vực dọc sông Tô Lịch, sông Lừ và các lưu vực phụ cận. Hiện nay, Nhà máy xử lý nước thải Yên Xá đang vận hành ở công suất ban đầu khoảng 180.000 m³/ngày đêm, qua đó góp phần đáng kể nâng tỷ lệ nước thải được xử lý tại Thủ đô lên trên 50 % tổng lượng phát sinh [53].

Hậu quả của tình trạng ô nhiễm nguồn nước ở Việt Nam đang ở mức đáng báo động. Hằng năm, khoảng 9.000 người tử vong do sử dụng nguồn nước không đảm bảo vệ sinh môi trường [52]. Tỷ lệ mắc các bệnh tiêu chảy, giun sán, viêm da tại khu vực có nguồn nước ô nhiễm cao hơn 30–40% so với khu vực có nước sạch. Ngoài ra, tồn lưu nitrate (NO₃⁻) và ammonium (NH₄⁺) trong nguồn nước có thể gây các bệnh về gan, thận và ung thư. Báo cáo môi trường Quốc gia giai đoạn 2016–2020 ghi nhận khoảng 20.000 ca ung thư có nguyên nhân từ ô nhiễm nguồn nước sạch [52]. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và UNICEF (2021) cũng cho thấy 44% trẻ em Việt Nam nhiễm giun do sử dụng nguồn nước không đảm bảo; trong khi 21% dân số đang sử dụng nguồn nước bị nhiễm arsen – một độc chất nguy hiểm thường có trong thuốc trừ sâu và hóa chất nông nghiệp [52].

1.2.2. Phương pháp xử lý nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam

Các công nghệ xử lý nước thải sinh hoạt truyền thống chủ yếu dựa trên hoạt động phân hủy sinh học của các nhóm vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí. Những vi sinh vật này có vai trò phân giải hợp chất hữu cơ, chuyển hóa chúng thành CO₂, nước và sinh khối, từ đó làm giảm tải ô nhiễm thông qua các chỉ tiêu COD, BOD₅. Tuy nhiên, nhược điểm

của các phương pháp này là phát sinh lượng bùn thải lớn, đòi hỏi cung cấp oxygen, hóa chất và đặc biệt chưa tạo ra giá trị kinh tế gia tăng, khó đáp ứng tiêu chí bền vững.

Trong bối cảnh đó, xử lý nước thải bằng vi tảo và vi khuẩn lam được xem là một chiến lược sinh học tiềm năng nhờ khả năng tận dụng ánh sáng mặt trời và CO₂, đồng thời hấp thu dinh dưỡng sẵn có trong nước thải. Vi tảo và vi khuẩn lam có tốc độ sinh trưởng nhanh, dễ thích nghi với điều kiện môi trường, không cần sử dụng nước ngọt hay đất canh tác, và có năng suất sinh khối cao. Chúng vừa loại bỏ các chất ô nhiễm vô cơ (nitrogen, phosphorus) vừa tạo ra sinh khối giàu protein, carbohydrate, lipid và các hợp chất sinh học có giá trị như sắc tố, polyphosphate và PHB. So với các công nghệ truyền thống, xử lý bằng vi khuẩn lam/vi tảo phát thải bùn thấp, không cần hóa chất, đồng thời hấp thu nhiều CO₂ hơn lượng phát thải, góp phần giảm phát thải khí nhà kính, tạo ra giá trị kinh tế gia tăng từ hệ thống xử lý nước thải [1].

Trong số các vi khuẩn lam được nghiên cứu, *S. salina* M8 được quan tâm nhờ khả năng chịu áp lực thẩm thấu cao và tích lũy các hợp chất sinh học giá trị như PHB, sắc tố quang hợp và lipid [54, 55].

S. salina M8 loại bỏ ô nhiễm thông qua các quá trình hấp thu và đồng hóa dinh dưỡng vô cơ (nitrogen và phosphorus), chuyển hóa carbon hữu cơ, hấp phụ kim loại nặng và phân giải các chất ô nhiễm vi lượng nhờ hệ enzyme nội bào [56]. Cụ thể, ammonium (NH₄⁺), nitrate (NO₃⁻) và phosphate (PO₄³⁻) được hấp thu và đồng hóa để tổng hợp protein, axit nucleic và sắc tố. Trong điều kiện thiếu nitrogen hoặc phosphorus, nguồn carbon hữu cơ (acetate, glycerol) được chuyển hóa thành năng lượng và tích lũy nội bào dưới dạng PHB [55]. Bên cạnh đó, các nhóm chức như carboxyl, amino và sulfate trên bề mặt tế bào giúp cố định kim loại nặng (Cd²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺) thông qua cơ chế hấp phụ sinh học [57], trong khi nhiều chất ô nhiễm vi mô (PFAS, thuốc bảo vệ thực vật, chất kích thích tăng trưởng) có thể được phân giải nhờ hoạt tính enzyme [56]. Tuy nhiên, đặc tính của nước thải sinh hoạt phức tạp hơn so với nước thải mô phỏng trong phòng thí nghiệm. Ngoài các chất dinh dưỡng chính (COD, T-N, N-NH₄⁺, T-P), nước thải còn chứa nhiều tạp chất và hợp chất độc hại tiềm ẩn có thể ảnh hưởng đến hiệu quả xử lý và sinh trưởng của *S. salina* M8 như kim loại nặng (Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺), chất tẩy rửa, dầu mỡ và dư lượng dược phẩm. Các thành phần này có thể gây ức chế quang hợp, phá hủy cấu trúc màng, giảm hấp thu ánh sáng và tạo độc tính cho hệ vi sinh, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả xử lý và sinh trưởng của *S. salina* M8. Do vậy, việc đánh giá khả năng thích nghi của chúng trong nước thải không tiệt trùng (nước thải thô) và tối ưu hóa các thông số vận hành (ánh sáng, sục khí, tỷ lệ C:N:P) là cần thiết để đảm bảo hiệu quả xử lý và tích lũy sinh khối.

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định tiềm năng của *S. salina* trong xử lý nước thải giàu dinh dưỡng đồng thời sản xuất sinh khối. Gonçalves et al. (2016) nuôi cấy *S. salina* theo chế độ gián đoạn dưới chiếu sáng liên tục và bổ sung CO₂ ở các nồng độ khác nhau nhằm đánh giá khả năng loại bỏ dinh dưỡng trong nước thải mô phỏng. Kết quả cho thấy, tại 7% CO₂, hiệu suất loại bỏ nitrate và phosphate lần lượt đạt $95,3 \pm 4,5\%$ và $95,1 \pm 1,2\%$ sau 7 ngày; trong khi ở 3% và 10% CO₂, hiệu suất loại bỏ của cả hai chất gần như đạt 100%. Đồng thời, *S. salina* đạt năng suất sinh khối và tốc độ cố định CO₂ cao nhất lần lượt là $0,173 \pm 0,009$ g/L/ngày và $0,136 \pm 0,007$ gC/L/ngày tại 7% CO₂. Những kết quả này chứng minh *S. salina* là đối tượng tiềm năng cho các hệ thống tích hợp xử lý nước thải, sản xuất sinh khối và hấp thụ CO₂ [58].

Một nghiên cứu khác của Trentin et al., (2019) đã khảo sát khả năng xử lý nước thải đô thị của *Synechocystis sp.* trong điều kiện nuôi cấy ngoài trời. Kết quả cho thấy, loài này có thể loại bỏ tới 96% phosphorus, 66% nitrogen và 68% COD trong nước thải có hàm lượng chất dinh dưỡng cao. Đồng thời, sinh khối thu được có thể tích lũy PHB với hàm lượng đáng kể, mở ra tiềm năng sản xuất vật liệu sinh học từ quá trình xử lý nước thải [19].

Gần đây, Senatore et al., (2023) đã vận hành hệ thống phản ứng quang sinh dạng ống đứng 30 L (bán liên tục) sử dụng nước thải sinh hoạt sau xử lý bậc hai và đạt nồng độ sinh khối tối đa 1,413 g/L với năng suất 173 mg/L/ngày; khi chuyển sang điều kiện thiếu dinh dưỡng trong hệ 5 L, chủng *Synechocystis sp.* tích lũy tối đa 4,8% PHB sau 7 ngày và 44,7% lipid dưới điều kiện thiếu phosphorus kéo dài 30 ngày [54].

Điểm đáng chú ý là hệ thống được vận hành với nguồn nước thải không tiệt trùng và dưới ánh sáng nhân tạo tương đương điều kiện ngoài trời ($250 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$), phản ánh tính khả thi cao của mô hình trong các điều kiện thực tế [54]. Khả năng duy trì quần thể vi khuẩn lam trong nước thải đồng thời xử lý dinh dưỡng dư thừa và tạo ra các sản phẩm có giá trị như PHB, lipid và phycobiliprotein, nhấn mạnh tiềm năng ứng dụng của *Synechocystis sp.* trong mô hình kinh tế tuần hoàn, đặc biệt ở quy mô cộng đồng và đô thị.

Các nghiên cứu gần đây trên thế giới đã khẳng định rằng *S. salina* là một vi sinh vật có tiềm năng đáng kể trong sản xuất PHB, nhờ vào một số đặc tính sinh học nổi bật. Cụ thể, khả năng quang hợp tự dưỡng của loài này cho phép khai thác nguồn CO₂ và ánh sáng mặt trời làm nguyên liệu đầu vào, góp phần giảm thiểu chi phí vận hành trong các hệ thống sản xuất [59]. Bên cạnh đó, *S. salina* có thể sinh trưởng hiệu quả trong môi trường nước thải và ở điều kiện độ mặn cao, giúp loại bỏ yêu cầu về vô trùng nghiêm ngặt, từ đó làm đơn giản hóa quy trình nuôi cấy quy mô lớn [16].

Đặc biệt, trong các điều kiện nuôi thích hợp, hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* có thể dao động từ 7% đến 31% trọng lượng khô tế bào, tùy thuộc vào chế độ dinh dưỡng và các thông số môi trường [16, 59-61]. Để hiện thực hóa tiềm năng này ở quy mô công nghiệp, việc tối ưu các yếu tố ảnh hưởng như nguồn carbon, tỷ lệ C:N:P, cường độ và chu kỳ chiếu sáng, pH và độ mặn là cần thiết [20]. Những yếu tố này cần được khảo sát và điều chỉnh trong các hệ thống nuôi cấy quy mô lớn, điển hình là hệ thống phản ứng quang sinh dạng ống đứng.

Từ những kết quả trên, có thể thấy vi khuẩn lam hoạt động như một hệ thống xử lý nước thải trong tự nhiên mang tính nổi trội của tổng hợp các biện pháp trong đó có biện pháp hấp thụ, hấp phụ. Trong đó, biện pháp hấp thụ các chất dinh dưỡng trực tiếp các hợp chất nitrogen và phosphorus để xây dựng tế bào — nguyên nhân chính gây ra hiện tượng phú dưỡng hóa nguồn nước. Biện pháp hấp phụ kim loại nặng cũng được ghi nhận đối với do vi khuẩn lam có khả năng liên kết và loại bỏ một số các kim loại nặng độc hại thông qua cơ chế biosorption. Trong quá trình hoạt động, vi khuẩn lam cũng là nguồn cung cấp oxygen tự nhiên. Thông qua quá trình quang hợp, giải phóng oxygen hòa tan vào nước, hỗ trợ các vi khuẩn hiếu khí khác phân hủy chất hữu cơ mà không cần hệ thống sục khí cơ học, tiết kiệm được chi phí năng lượng. Sau quá trình xử lý, sinh khối vi khuẩn lam có thể thu hoạch để làm phân bón sinh học hoặc nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học (Biofuel).

Việc ứng dụng vi khuẩn lam trong xử lý nước thải sinh hoạt không chỉ mang lại hiệu quả loại bỏ chất ô nhiễm mà còn đồng thời tạo ra sinh khối có giá trị gia tăng (PHB, lipid, sắc tố). Đây là minh chứng cho định hướng công nghệ “xử lý - đồng thời sản xuất”, góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế tuần hoàn và công nghệ sinh học môi trường bền vững nhờ vào ưu điểm không sử dụng hóa chất, không tạo bùn thải độc hại và giúp hấp thụ khí CO₂ góp phần vào giảm phát thải khí nhà kính.

1.3. Vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học

1.3.1. Tổng quan về nhựa phân hủy sinh học

Nhựa sinh học bao gồm các vật liệu nhựa có nguồn gốc sinh học, khả năng phân hủy sinh học hoặc đồng thời mang cả hai đặc tính. Khả năng phân hủy phụ thuộc vào điều kiện môi trường (nhiệt độ, ánh sáng UV, pH, hoạt tính vi sinh vật) và đặc tính polymer (nhóm chức, trọng lượng phân tử, độ kết tinh, độ linh hoạt, phụ gia). Về nguồn gốc, nhựa sinh học có thể được sản xuất từ tinh bột, cellulose, dầu thực vật,... Vi khuẩn lam tổng hợp nhựa sinh học, chủ yếu là PHB – một loại thuộc nhóm PHA. Tuy nhiên, không phải nhựa có nguồn gốc sinh học đều phân hủy được. Ví dụ, polycaprolactone (PCL) tổng hợp từ dầu mỏ nhưng phân hủy sinh học, trong khi polyethylene sinh học lại khó phân hủy [62].

Trong thực tiễn, đặc biệt ở bao bì và sản phẩm dùng một lần, loại nhựa lý tưởng nhất là vật liệu vừa có nguồn gốc sinh học vừa phân hủy sinh học, nhằm giảm gánh nặng môi trường. Công nghệ nhựa sinh học được phân thành ba thế hệ:

- Thế hệ 1: sản xuất từ cây trồng trên cạn (ngô, mía, khoai tây) với các polymer điển hình như PLA và PHA; song gây cạnh tranh với đất nông nghiệp.

- Thế hệ 2: tận dụng phụ phẩm nông nghiệp (rơm rạ, bã cà phê), nhưng nguồn cung không ổn định.

- Thế hệ 3: khai thác sinh vật quang dưỡng như vi tảo và vi khuẩn lam – có tốc độ sinh trưởng nhanh, không phụ thuộc đất hay nước ngọt, thích hợp sản xuất PHB.

Các polymer sinh học có thời gian phân hủy khác nhau: PLA (28–98 ngày), PHB/PHA (18–300 ngày), PBS (28–170 ngày) [62]. Trong đó, PHB nổi bật nhờ khả năng phân hủy hoàn toàn trong điều kiện tự nhiên, tính cơ học tương đương polypropylene và tính tương thích sinh học cao [24]. Hiện nay, phần lớn PHB thương mại được sản xuất từ vi khuẩn dị dưỡng như *Cupriavidus necator*, thông qua quá trình lên men hiếu khí với nguồn carbon từ đường đơn thủy phân sinh khối thực vật. Tuy nhiên, chi phí nguyên liệu carbon chiếm tới 48% tổng chi phí sản xuất, khiến giá thành PHB (4,96–6,06 USD/kg) cao gấp 3–4 lần so với polymer tổng hợp tương tự (1,32–1,92 USD/kg) [63, 64]. Đây là một trong những lý do khiến PHB dù tiềm năng nhưng vẫn chưa đạt được quy mô thương mại rộng rãi.

Để khắc phục các vấn đề trên, xu hướng hiện nay là tích hợp xử lý nước thải với sản xuất PHB. Vi khuẩn lam có thể đồng thời hấp thu CO₂, nitrogen, phosphorus và chất hữu cơ từ nước thải để tổng hợp sinh khối và tích lũy PHB. Cách tiếp cận này giúp giảm chi phí nguyên liệu, xử lý ô nhiễm và góp phần xây dựng mô hình kinh tế tuần hoàn, bền vững và giảm phát thải carbon.

1.3.2. Nhựa sinh học PHB và tiềm năng sản xuất từ vi khuẩn lam

1.3.2.1. Khái niệm, đặc điểm, và ứng dụng của nhựa phân huỷ sinh học PHB

a. Khái niệm nhựa phân huỷ sinh học PHB

Polyhydroxybutyrate (PHB) là một loại polymer thuộc nhóm polyhydroxyankanoat (PHA), một nhóm polymer sinh học thuộc lớp polyeste. PHB được quan tâm nhờ khả năng tổng hợp và chiết xuất bằng con đường sinh học, đồng thời có thể phân hủy sinh học một cách tự nhiên. Trong nhóm PHA, poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) là dạng polymer phổ biến nhất. P3HB được nhà khoa học người Pháp Lemoigne phát hiện vào năm 1926. Tuy nhiên, bên cạnh PHB, còn có nhiều loại polymer khác cũng được sinh tổng hợp bởi các loài vi sinh vật khác nhau, bao gồm

poly-4-hydroxybutyrate (P4HB), polyhydroxyvalerate (PHV), polyhydroxyhexanoate (PHH), polyhydroxyoctanoate (PHO), cùng các đồng đẳng polymer của chúng.

b. Đặc điểm và tính chất của nhựa phân hủy sinh học PHB

- Tính chất hóa lý: PHB không tan trong nước, kháng thủy phân tốt, thấm khí O₂ hiệu quả và bền với tia UV, nhưng kém ổn định trong môi trường axit/bazơ mạnh. Tan tốt trong chloroform và các hydrocarbon clo hóa, thuận lợi cho quá trình chiết tách công nghiệp [65].

- Tính chất sinh học và độc tính: PHB được đánh giá là vật liệu có độ tương thích sinh học cao và không độc hại đối với sinh vật sống. Khi phân hủy sinh học, PHB bị vi sinh vật thủy phân hoàn toàn thành CO₂, nước và sinh khối mà không tạo ra các hợp chất trung gian độc hại, khác với nhiều loại nhựa tổng hợp có nguồn gốc hóa dầu. Nhờ đặc tính này, PHB được chứng minh là an toàn cho môi trường và cơ thể sống, đã được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y sinh như chỉ khâu tự tiêu, vật liệu cấy ghép và hệ dẫn thuốc [66]. Các nghiên cứu độc tính in vitro và in vivo cho thấy PHB không gây phản ứng viêm hoặc độc tế bào đáng kể, khẳng định tính an toàn sinh học của vật liệu [67].

- Tính chất cơ học: PHB có nhiệt độ nóng chảy khoảng 175°C, nhiệt độ chuyển pha thủy tinh khoảng 2°C và độ bền kéo đạt khoảng 40 MPa, tương đương với polyethylene (PE). Các đặc tính này cho thấy PHB có tiềm năng thay thế một phần nhựa truyền thống trong các ứng dụng yêu cầu độ bền cơ học nhất định [66].

- Đặc điểm khác: PHB có tỷ trọng lớn hơn nước nên có xu hướng lắng chìm trong môi trường thủy sinh, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân hủy sinh học, đặc biệt trong điều kiện kỵ khí. Ngoài ra, khả năng bám dính kém khi nóng chảy được xem là một ưu điểm trong một số ứng dụng như dệt may, thời trang và sản xuất vật liệu mềm phân hủy sinh học [67].

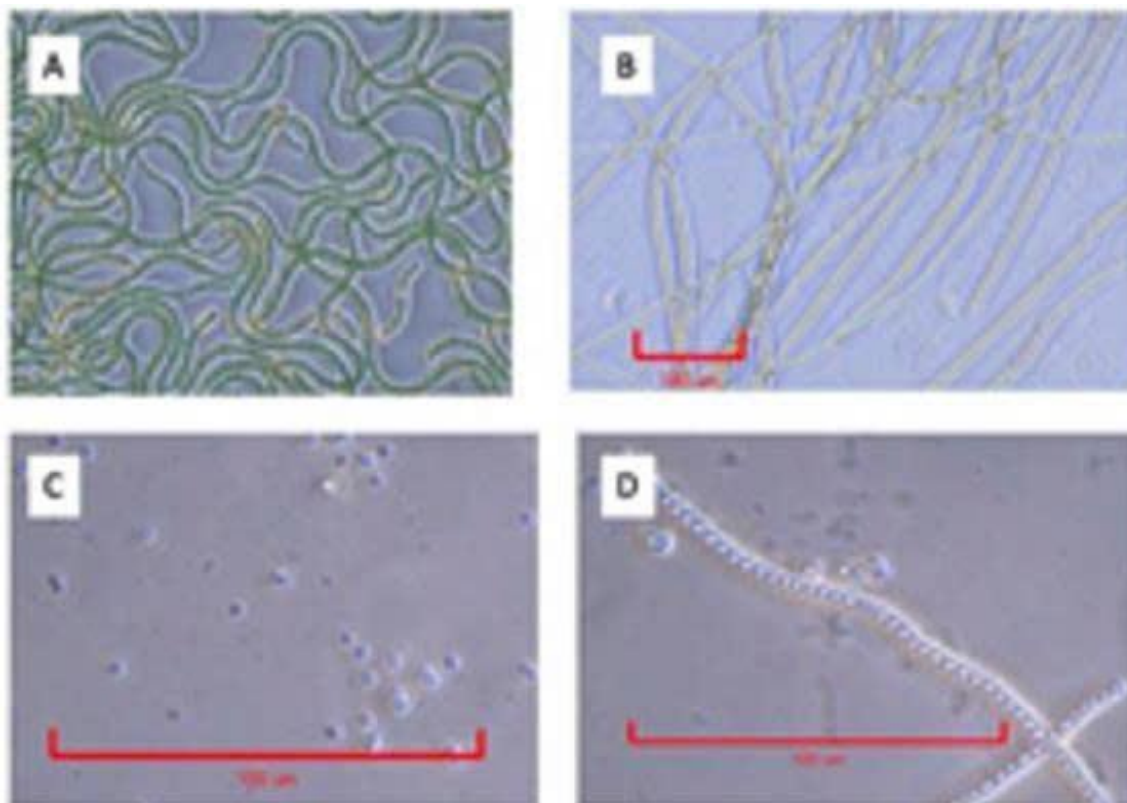
c. Ứng dụng của nhựa sinh học PHB

PHB là nhựa sinh học phân hủy hoàn toàn, có độ an toàn và tương thích sinh học cao, đã được chứng nhận không độc và phù hợp cho ứng dụng y sinh, đặc biệt trong cấy ghép mô và vật liệu y tế [68]. Nhờ các đặc tính ưu việt, PHB được ứng dụng rộng rãi trong bao bì phân hủy sinh học, y - dược (chỉ khâu tự tiêu, vật liệu cấy ghép, hệ dẫn truyền thuốc), nông nghiệp (màng phủ sinh học), điện tử và công nghiệp nhẹ, góp phần thay thế nhựa hóa dầu. Với khả năng phân hủy sinh học hoàn toàn, tính tương thích sinh học và mức độ an toàn cao, PHB được xem là vật liệu sinh học chiến lược, có tiềm năng thay thế nhựa hóa dầu trong nhiều lĩnh vực công nghiệp. Nhờ tính thân thiện với môi trường và phạm vi ứng dụng đa dạng, PHB đóng vai trò quan trọng trong thúc đẩy mô hình kinh tế tuần hoàn và định hướng phát triển bền vững [69].

1.3.2.2. Vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học PHA/PHB

a. Đặc điểm về vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học PHA/PHB

Vi khuẩn lam là nhóm vi sinh vật quang dưỡng có khả năng quang hợp giải phóng oxygen và tổng hợp các hợp chất carbon nội bào. Một sản phẩm quan trọng của chúng là PHA, đặc biệt là PHB - loại nhựa sinh học phân hủy hoàn toàn trong tự nhiên. PHB được tích lũy dưới dạng hạt dự trữ carbon và năng lượng trong điều kiện thiếu nitrogen hoặc phosphorus nhưng dư thừa nguồn carbon. Bên cạnh khả năng tạo PHB, vi khuẩn lam còn đóng vai trò đáng kể trong xử lý ô nhiễm nhờ cung cấp oxygen cho hoạt động phân hủy chất hữu cơ của vi sinh vật dị dưỡng, cố định nitrogen và tham gia phân giải các hợp chất dầu mỡ. Một số loài còn có khả năng sinh hydrogen - nguồn năng lượng tái tạo tiềm năng. Đặc biệt, nhiều chủng có thể phát triển dị dưỡng trên nguồn carbon hữu cơ, mở rộng khả năng ứng dụng trong môi trường nước thải giàu hữu cơ hoặc điều kiện ánh sáng hạn chế. Những đặc tính này cho thấy vi khuẩn lam là nguồn vi sinh vật triển vọng cho sản xuất PHB bền vững. **Hình 1.2** minh họa một số loài có khả năng tích lũy PHB.



Hình 1.2. Bốn loài tảo có khả năng sinh PHB: A) Athrospira; B) Jasorvensis; C) Synechocystis PCC 6803; D) Nostoc muscorum [70]

Vi khuẩn lam có khả năng tận dụng trực tiếp nguồn dinh dưỡng sẵn có trong nước thải giàu nitrogen và phosphorus, đồng thời hấp thụ CO₂ từ khí quyển để thực hiện quang hợp và tổng hợp PHB, giúp giảm chi phí nuôi cấy và tạo quy trình trung tính carbon

[70]. Một số ít công bố dùng nước thải đặc biệt là nước thải từ ngành sản xuất thủy sản, làm môi trường để nuôi cấy sinh khối vi khuẩn lam và tinh sạch PHB [71]. Các nghiên cứu cho rằng sử dụng nước thải làm môi trường nuôi cấy có thể làm giảm chi phí sản xuất sinh khối vi tảo từ 3 xuống 1,8 €/kg [72]. Ngoài ra, việc nuôi cấy vi khuẩn lam không cạnh tranh đất nông nghiệp, mở ra tiềm năng phát triển bền vững hơn so với nguồn nguyên liệu thực vật [73].

Tuy nhiên, sản xuất nhựa sinh học PHB bằng vi khuẩn lam vẫn đối mặt với nhiều thách thức đáng kể [74], bao gồm tốc độ sinh trưởng và tích lũy PHB tương đối chậm, chi phí thu hoạch cao do nồng độ sinh khối thường thấp, và năng suất PHB trong điều kiện quang tự dưỡng nhìn chung thấp hơn so với các vi khuẩn dị dưỡng. Do đó, việc tuyển chọn và phát triển các chủng vi khuẩn lam có khả năng sinh trưởng mạnh và tích lũy PHB cao là yêu cầu then chốt. Song song với đó, quá trình sinh tổng hợp PHB cần được tối ưu hóa thông qua các chiến lược công nghệ và sinh lý nhằm nâng cao hiệu suất tích lũy và giảm chi phí sản xuất, hướng tới một quy trình khả thi về mặt kinh tế. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự thiếu hụt nitrogen (N) và phosphorus (P), cũng như sự mất cân bằng tỷ lệ C:N trong môi trường nuôi cấy, có thể kích thích tích lũy PHB và glycogen [75]. Bên cạnh đó, các yếu tố môi trường như pH, cường độ ánh sáng, nhiệt độ, nồng độ CO₂ nguồn carbon hữu cơ và phương thức nuôi cấy cũng có ảnh hưởng quyết định đến hiệu quả tích lũy PHB ở vi khuẩn lam [2, 22-24].

Từ các nghiên cứu tổng quan có thể thấy rằng khả năng sinh trưởng, xử lý dinh dưỡng và tích lũy PHA/PHB của vi khuẩn lam có sự khác biệt đáng kể giữa các chi và các chủng khác nhau. Do đó, việc lựa chọn và đánh giá các chủng cụ thể là cần thiết nhằm làm rõ tiềm năng ứng dụng thực tiễn trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau, đặc biệt là trong môi trường nước thải giàu dinh dưỡng.

b. Một số chủng vi khuẩn lam và khả năng tích lũy PHA/PHB

b1. Vi khuẩn lam Spirulina sản xuất PHA/PHB

Bên cạnh vai trò xử lý dinh dưỡng trong nước thải, một số nghiên cứu cũng ghi nhận *Spirulina* có khả năng tổng hợp và tích lũy các hợp chất dự trữ nội bào, bao gồm PHA, trong đó có PHB, khi môi trường nuôi cấy chịu tác động của stress dinh dưỡng, đặc biệt là trong điều kiện hạn chế nitrogen hoặc phosphorus nhưng vẫn dư thừa nguồn carbon [2, 22-24]. Các nghiên cứu hiện có cho thấy khả năng tích lũy PHA/PHB ở *Spirulina* chịu ảnh hưởng mạnh của đặc điểm chủng và điều kiện nuôi cấy, và chưa có sự thống nhất về mức độ tích lũy polymer sinh học này trong các hệ thống nuôi khác

nhau [2, 22-24]. Nhiều chủng *Arthrospira* trong điều kiện quang tự dưỡng chỉ chứa PHB ở mức thấp (<5% CDW), trong khi bổ sung nguồn carbon hữu cơ hoặc điều kiện hỗn hợp có thể làm tăng đáng kể [76]. Nghiên cứu thực nghiệm cho thấy *Spirulina* sp. có thể sản xuất PHB ở mức hai chữ số phần trăm (ví dụ ~10% w/w) khi dùng các chất phụ/nước thải giàu cacbon hoặc chế phẩm phụ từ chiết xuất biopolymer, chứng tỏ khả năng lồng ghép quy trình “vòng kín” khai thác chất thải để tạo sinh khối + bioplastics [77]. Tuy nhiên, thách thức lớn là tăng tỷ lệ PHB trên khối khô và duy trì năng suất trong môi trường quy mô lớn không vô trùng. Điều này cho thấy cần có các nghiên cứu thực nghiệm cụ thể nhằm đánh giá một cách hệ thống khả năng tích lũy PHB của các chủng *Spirulina* trong những điều kiện ứng dụng định hướng xử lý nước thải.

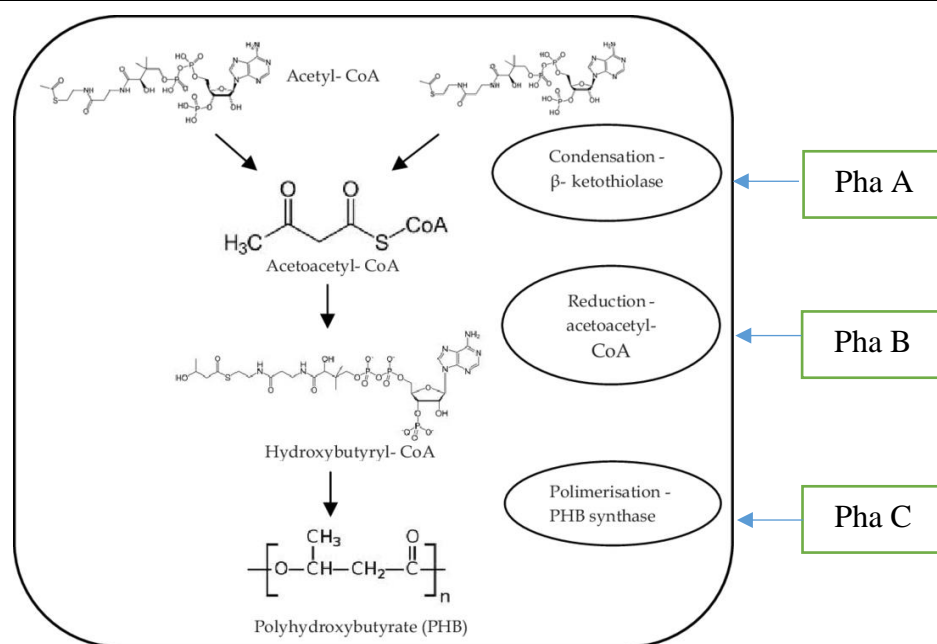
b2. Vi khuẩn lam Synechocystis sản xuất PHA/PHB

Loài *S. salina* M8 thuộc chi *Synechocystis*, được phân lập phổ biến từ các môi trường nước ven biển, có thể sinh trưởng trong điều kiện khắc nghiệt với độ mặn dao động từ 1 - 5% [16]. *S. salina* M8 có khả năng tích lũy hạt dự trữ trong bào tương, điển hình là glycogen, lipid và đặc biệt là các polymer sinh học như PHB – một dạng phổ biến nhất của PHA.

Không giống như nhiều loài vi khuẩn dị dưỡng cần nguồn hữu cơ phức tạp để phát triển, *S. salina* M8 có khả năng sử dụng trực tiếp CO₂ từ không khí, năng lượng ánh sáng mặt trời và các muối khoáng để sinh trưởng và tổng hợp PHB. Nhờ đặc điểm này, *S. salina* M8 được xem là đối tượng tiềm năng trong công nghệ sinh học, bảo vệ môi trường và phát triển kinh tế tuần hoàn, đặc biệt phù hợp với các mô hình sản xuất vật liệu sinh học từ nước thải [78].

Sự tích lũy PHA/PHB là một cơ chế sinh lý học phổ biến ở các vi sinh vật đối mặt với điều kiện thiếu hụt dinh dưỡng, đặc biệt là nitrogen (N) và phosphorus (P), trong khi vẫn tiếp tục hấp thu nguồn carbon (C) dồi dào. Trong điều kiện stress này, dòng acetyl-CoA được ưu tiên chuyển hóa thành PHB thay vì đi vào chu trình Krebs hay tổng hợp protein [78].

Cơ chế sinh tổng hợp PHB trong *S. salina*, là quá trình tích lũy polymer sinh học dạng polyester nội bào nhằm dự trữ carbon và năng lượng khi điều kiện môi trường bị căng thẳng hoặc thiếu hụt dinh dưỡng được xúc tác thông qua ba enzym chính [78]. Cơ chế sinh tổng hợp PHB của vi khuẩn lam như sau (**Hình 1.3**):



Hình 1.3. Cơ chế sinh tổng hợp PHB của vi khuẩn lam [78]

- β-Ketothiolase (PhaA): xúc tác phản ứng ngưng tụ hai phân tử acetyl-CoA thành acetoacetyl-CoA.

- Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB): khử acetoacetyl-CoA thành 3-hydroxybutyryl-CoA.

- PHA synthase (PhaC): xúc tác phản ứng trùng hợp tạo chuỗi polymer PHB [78].

Đáng chú ý, *S. salina* M8 có các gen mã hóa enzyme này nằm trong một cụm gen tương đồng với nhiều vi khuẩn sản xuất PHA hiệu suất cao như *Cupriavidus necator*, nhưng lại có ưu thế là tự dưỡng, thân thiện môi trường và có khả năng chịu mặn [78].

PHB là polymer sinh học có tính chất tương đương nhựa truyền thống PP nhưng có khả năng phân hủy hoàn toàn trong môi trường tự nhiên. Tuy nhiên, một trong những thách thức chính hiện nay trong sản xuất nhựa sinh học từ vi khuẩn lam là chi phí vận hành cao và hiệu suất tích lũy PHB còn thấp. Trước thực tế đó, các hướng nghiên cứu đang tập trung vào việc ứng dụng chủng *S. salina* M8 trong môi trường nước thải – nguồn nguyên liệu giàu carbon, nitrogen, phosphorus – nhằm tận dụng nguồn dinh dưỡng mà không yêu cầu điều kiện nuôi cấy tiệt trùng. Cách tiếp cận này không chỉ giúp giảm chi phí sản xuất mà còn phù hợp với định hướng phát triển mô hình lọc sinh học tích hợp (biorefinery), nơi kết hợp giữa xử lý môi trường và sản xuất các sản phẩm sinh học có giá trị cao theo hướng bền vững [54].

Trên cơ sở phân tích các đặc điểm sinh lý và tiềm năng ứng dụng của *Spirulina* và *Synechocystis*, trong nghiên cứu này, *Spirulina* (2 chủng là *Spirulina sp.2* và *Spirulina sp.4*) và *S. salina* (*S. salina* M8) được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu với mục đích: (i) lựa chọn ra chủng sinh trưởng tốt và hàm lượng PHB cao để nuôi, sản xuất sinh khối và PHA/PHB trong nước thải sinh hoạt; (ii) tối ưu các điều kiện hoá lý bằng phương pháp

thông kê để tăng năng suất sinh khối và hàm lượng PHB sản xuất bởi chủng vi khuẩn lam được lựa chọn; (iii) thử nghiệm sản xuất sinh khối và PHB bởi chủng vi khuẩn lam được lựa chọn trong nước thải sinh hoạt.

c. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tích lũy PHB của vi khuẩn lam trong nước thải sinh hoạt

Quá trình tích lũy PHB ở vi khuẩn lam chịu ảnh hưởng bởi đặc điểm di truyền của chủng và các điều kiện môi trường nuôi cấy, bao gồm nguồn carbon, nitrogen, phosphorus, tỷ lệ C:N:P, ánh sáng, pH, nhiệt độ và độ mặn. Carbon dư thừa thúc đẩy hình thành acetyl-CoA – tiền chất trực tiếp của PHB, trong khi sự thiếu hụt nitrogen hoặc phosphorus làm tế bào chuyển dòng carbon sang con đường tích lũy polymer dự trữ. Bên cạnh đó, các yếu tố vật lý như ánh sáng và nhiệt độ chi phối hiệu suất quang hợp và hoạt tính enzyme, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ tổng hợp PHB. Do đó, việc tối ưu hóa đồng bộ điều kiện nuôi cấy và quy trình thu hồi – tinh sạch PHB là cơ sở quan trọng cho phát triển các mô hình tích hợp xử lý nước thải và sản xuất nhựa sinh học theo định hướng bền vững.

*. *Nguồn dinh dưỡng carbon:*

Carbon đóng vai trò trung tâm trong chuyển hóa tế bào và quyết định hiệu quả tích lũy PHA/PHB ở vi khuẩn lam. Bên cạnh khả năng sử dụng CO₂ thông qua quang hợp, nhiều nghiên cứu cho thấy việc bổ sung carbon hữu cơ (acetate, glucose, fructose) giúp gia tăng đáng kể hàm lượng PHB do các hợp chất này vừa cung cấp năng lượng vừa là tiền chất trực tiếp cho sinh tổng hợp polymer. Một số nghiên cứu đã ghi nhận, chủng *Synechocystis* PCC 6803 có thể tích lũy tới 38% PHA/PHB khối lượng khô khi bổ sung acetate vào môi trường nuôi cấy [79]. Trong khi, *Aulosira fertilissima* CCC 444 đạt hàm lượng lên tới 77% PHB khi được nuôi cấy với fructose và valerate [80]. Điều này chứng tỏ carbon hữu cơ vừa là nguồn năng lượng, vừa là tiền chất trực tiếp cho quá trình sinh tổng hợp PHB. Bên cạnh nguồn carbon hữu cơ, nguồn carbon vô cơ như bicarbonate (HCO₃⁻) cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường cố định CO₂ và thúc đẩy tích lũy PHB. Price et al., (2020), cho thấy bổ sung bicarbonate giúp nâng cao sinh trưởng và hiệu quả chuyển hóa carbon thành PHB ở vi khuẩn lam [81]. Ví dụ, *Spirulina* sp. LEB 18 có thể đạt tới 31% PHB trong điều kiện giàu bicarbonate kết hợp thiếu nitrogen và phosphorus [82].

Việc tận dụng nguồn CO₂ từ khí thải công nghiệp được xem là hướng tiếp cận bền vững. Trong nghiên cứu của Gonçalves et al., (2016), ghi nhận rằng bổ sung CO₂ ở mức 3–10%, giúp hiệu suất loại bỏ nitrate, phosphate vượt 95% và sinh khối tích lũy tối đa 0,173 ± 0,009 g/L/ngày tại 7% CO₂ [58]. Cách tiếp cận này vừa nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp PHB vừa góp phần giảm phát thải khí nhà kính. Ngoài ra, các dạng carbon

hữu cơ sẵn có trong nước thải như acetate và glycerol cũng được vi khuẩn lam, đặc biệt *S. salina*, hấp thụ hiệu quả. Theo Senatore et al., (2023), cho thấy bổ sung acetate trong điều kiện thiếu N và P giúp *Synechocystis* tích lũy tới 4,8% PHB/khối lượng khô sau 7 ngày [54]. Grivalský et al., (2024) ghi nhận hàm lượng PHB tăng rõ rệt khi nuôi trong nước thải giàu acetate, đặc biệt dưới điều kiện hạn chế nitrogen [59].

Tổng hợp các kết quả cho thấy, việc cung cấp và cân bằng giữa carbon hữu cơ và vô cơ có vai trò quyết định đến sinh trưởng và hiệu suất tổng hợp PHB. Chiến lược kết hợp này được xem là hướng tối ưu cho sản xuất PHB gắn với xử lý nước thải, phù hợp với định hướng công nghệ xanh và kinh tế tuần hoàn.

*. *Nguồn nitrogen:*

Nitrogen là nguyên tố thiết yếu cho tổng hợp protein, acid nucleic và enzyme của tế bào. Vi khuẩn lam có thể sử dụng nhiều dạng nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) và một số loài một số loài còn cố định được (N_2) từ khí quyển thông qua hệ enzyme nitrogenase.

Trong điều kiện hạn chế nitrogen – thường gặp trong nước thải – quá trình tổng hợp protein bị kìm hãm, khiến vi khuẩn lam, bao gồm *S. salina*, ưu tiên chuyển dòng carbon dư thừa sang tích lũy các hợp chất dự trữ như PHB. Do đó, kiểm soát nguồn nitrogen được xem là một trong những chiến lược hiệu quả nhất để kích thích tích lũy PHA/PHB [83].

Nhiều nghiên cứu cho thấy thiếu nitrogen ở mức độ thích hợp giúp gia tăng hàm lượng PHB mà không làm suy giảm nghiêm trọng sinh trưởng. *Nostoc muscorum* có thể tích lũy tới 22% PHB/khối lượng khô trong điều kiện thiếu nitrogen [83, 84], trong khi *Synechocystis sp.* PCC 6803 đạt tới 38% PHB khi nuôi trong môi trường thiếu nitrogen có bổ sung acetate và fructose [79]. Ngoài ra, khi giảm 50% lượng nitrogen trong môi trường BG-11, hàm lượng PHB trong *Synechocystis* cũng tăng lên đáng kể mà tốc độ sinh trưởng không bị suy giảm [85]. Trong khi đó, với môi trường thiếu nitrogen và 2% CO_2 , hàm lượng PHB đạt 8% khối lượng khô tế bào [86]. Các loài vi khuẩn lam khác như *Spirulina sp.*, *Aulosira fertilissima*, và *Calothrix scytonemicola* cũng ghi nhận khả năng tích lũy hàm lượng PHB dao động từ 22 đến 77% khi được nuôi cấy trong môi trường thiếu nitrogen, cho thấy cơ chế này phổ biến ở nhiều nhóm vi khuẩn lam [80, 83]. Tuy nhiên, nếu thiếu nitrogen quá mức, sinh trưởng bị ức chế mạnh và làm giảm tổng lượng PHB thu hồi.

Ngoài nồng độ, các dạng nitrogen cũng ảnh hưởng đến tích lũy PHB. Mặc dù NH_4^+ thường thúc đẩy sinh trưởng nhanh hơn NO_3^- , nhưng lại làm giảm tích lũy PHB do nitrogen được hấp thụ và đồng hóa hiệu quả cho tổng hợp protein, hạn chế carbon dư thừa chuyển sang dạng polymer dự trữ [83, 87].

Trong bối cảnh xử lý nước thải, việc tận dụng điều kiện thiếu nitrogen tự nhiên hoặc điều chỉnh tỷ lệ C/N hợp lý không chỉ nâng cao hiệu quả loại bỏ nitrogen mà còn thúc đẩy tích lũy PHB, qua đó tích hợp xử lý ô nhiễm với sản xuất vật liệu sinh học bền vững, phù hợp định hướng công nghệ xanh và kinh tế tuần hoàn.

*. *Nguồn phosphorus*

Phosphorus là nguyên tố thiết yếu cho sinh trưởng vi khuẩn lam, tham gia cấu trúc acid nucleic, màng tế bào và các phân tử năng lượng (ATP). Tuy nhiên, khi thiếu phosphorus, nhiều chủng vi khuẩn lam điều chỉnh trao đổi chất theo hướng giảm sinh tổng hợp DNA/protein và ưu tiên tích lũy các hợp chất dự trữ carbon, đặc biệt là PHB [83]. Thiếu hụt phosphorus được xem là tín hiệu mạnh kích hoạt con đường tổng hợp PHB, nhất là khi kết hợp với nguồn carbon hữu cơ. Nhiều nghiên cứu ghi nhận hàm lượng PHB tăng mạnh trong điều kiện này, như *Aulosira fertilissima* CCC 444 đạt tới 85% khối lượng khô [88], *Nostoc muscorum* đạt 71% khi bổ sung thêm glucose và acetate [89], và *Synechocystis* PCC 6803 đạt 38% khi thiếu đồng thời nitrogen và phosphorus và bổ sung acetate và fructose [79]. Ngược lại, môi trường giàu phosphorus thường dẫn đến hàm lượng PHB thấp hơn [90].

Đối với *Synechocystis salina*, nuôi cấy trong nước thải sinh hoạt cho thấy khả năng loại bỏ 49–65% phosphate, đồng thời tích lũy khoảng 4,8% PHB khối lượng khô trong giai đoạn thiếu dinh dưỡng [54]. Việc kết hợp thiếu phosphorus với điều chỉnh nguồn carbon, ánh sáng hoặc CO₂ tiếp tục được chứng minh là chiến lược hiệu quả để gia tăng tích lũy PHB. Nhìn chung, kiểm soát phosphorus ở mức hạn chế hợp lý là yếu tố then chốt nhằm tối ưu hóa sản xuất PHB từ vi khuẩn lam, đồng thời nâng cao hiệu quả loại bỏ dinh dưỡng trong nước thải, phù hợp với định hướng công nghệ xanh và kinh tế tuần hoàn.

*. *Tỷ lệ các chất dinh dưỡng C:N:P*

Tỷ lệ giữa carbon, nitrogen và phosphorus (C:N:P) trong môi trường nuôi là yếu tố sinh lý then chốt điều phối trao đổi chất nội bào, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tích lũy PHB ở vi khuẩn lam. Khi carbon dư thừa kết hợp với thiếu hụt N và/hoặc P, tế bào ưu tiên chuyển hóa carbon thành hợp chất dự trữ như glycogen và PHB thay vì tổng hợp protein và acid nucleic.

Các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ C/N > 20 và C/P > 50 là điều kiện thuận lợi để kích hoạt con đường sinh tổng hợp PHB, trong đó acetyl-CoA được chuyển hóa thành PHB nhờ hệ enzyme PHA synthase [81]. Ví dụ, *Spirulina sp.* LEB 18 đạt tới 31% PHB khối lượng khô khi tăng tỷ lệ C/N bằng bổ sung bicarbonate [82]. Tương tự, *Aulosira fertilissima* cũng cho thấy hàm lượng PHB cao hơn khi điều chỉnh tỷ lệ N/P, đồng thời duy trì tốc độ sinh trưởng ổn định [83, 91].

Đối với *S. salina*, nghiên cứu trên nước thải sinh hoạt (C:N:P tự nhiên $\approx 100:7:1$) ghi nhận sinh khối tăng trưởng tốt và tích lũy PHB đạt 4,8% khối lượng khô sau giai đoạn thiếu dinh dưỡng [54]. Tương tự, *Synechocystis* PCC 6803 tích lũy tới 38% PHB khi bổ sung acetate và fructose trong điều kiện thiếu N và P [79].

Trong thực tế, nước thải sinh hoạt thường có hàm lượng carbon hữu cơ cao nhưng N và P biến động. Khai thác đặc điểm này, vi khuẩn lam như *S. salina* có thể đồng thời loại bỏ dinh dưỡng dư thừa và tích lũy PHB. Mô hình nuôi hai giai đoạn – giai đoạn tăng trưởng cân bằng dinh dưỡng và giai đoạn thiếu N/P để kích thích tổng hợp PHB – được xem là giải pháp hiệu quả trong sản xuất polymer sinh học từ nước thải.

*. *Các yếu tố/chất kích thích:*

Bên cạnh điều kiện dinh dưỡng, việc bổ sung các chất kích thích có thể làm tăng đáng kể khả năng tích lũy PHB ở vi khuẩn lam thông qua điều chỉnh dòng chuyển hóa carbon, hoạt tính enzyme và đáp ứng stress nội bào. Các nhóm chất kích thích chính gồm: (i) Acetate là chất kích thích phổ biến nhất được sử dụng để tăng tích lũy PHB. Dưới tác động của enzyme acetyl-CoA synthetase, acetate được chuyển hóa thành acetyl-CoA – tiền chất trực tiếp cho con đường sinh tổng hợp PHB thông qua các enzyme phaA, phaB và phaC [92]. Trong điều kiện thiếu N và P, bổ sung 5–10 mM acetate giúp *Synechocystis sp.* PCC 6803 tăng lượng PHB từ 7 lên 11% khối lượng khô tế bào (DWC) [93]. Ở chủng *Synechococcus sp.* PCC 7942 được chuyển gen tổng hợp PHB từ *Ralstonia eutropha*, hàm lượng PHB tăng đến 25% khi bổ sung 10 mM acetate [80, 94]. Kết hợp acetate + propionate cũng cho hiệu quả tích lũy PHB cao hơn so với sử dụng đơn lẻ. *Nostoc muscorum* đạt 28,2% PHB sau 14 ngày khi nuôi trong hỗn hợp 0,2% acetate + 0,4% propionate [95]. (ii) Vi lượng kim loại (Fe, Mn...): Tham gia cấu trúc enzyme và điều hòa stress oxy hóa; thiếu hụt nhẹ có thể kích hoạt tích lũy PHB như một cơ chế thích nghi. (iii) Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (auxin, cytokinin): Có khả năng kích thích biểu hiện enzyme tổng hợp PHB, làm tăng hàm lượng polymer ở *Synechocystis*, dù cơ chế vẫn đang được làm rõ [90, 96, 97]. (iv) Stress sinh học nhẹ (H_2O_2 , ánh sáng mạnh, nhiệt độ cao): Có thể kích hoạt cơ chế tích lũy polymer dự trữ nhằm bảo vệ tế bào, làm gia tăng PHB ở một số loài [84]. (v) Chiến lược nuôi cấy hỗn hợp: Hệ cộng sinh vi khuẩn lam – dị dưỡng giúp tối ưu trao đổi CO_2/O_2 và dinh dưỡng, qua đó nâng hiệu suất tích lũy PHB trong các hệ xử lý nước thải [98].

Nhìn chung, việc lựa chọn và tối ưu hóa các chất kích thích về loại, liều lượng và thời điểm bổ sung là giải pháp hiệu quả để định hướng dòng carbon vào con đường tổng hợp PHB, đồng thời nâng cao hiệu suất xử lý nước thải trong các mô hình công nghệ sinh học tích hợp.

*. *Điều kiện ánh sáng:*

Ánh sáng là yếu tố môi trường thiết yếu ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động quang hợp, sinh trưởng và tích lũy các hợp chất thứ cấp như PHB ở vi khuẩn lam. Do vi khuẩn lam là sinh vật quang dưỡng bắt buộc, đặc biệt như *S. salina*, ánh sáng không chỉ cung cấp năng lượng mà còn điều phối dòng carbon nội bào, là tiền đề cho tổng hợp PHB từ acetyl-CoA [99].

Cường độ ánh sáng vừa phải ($60\text{--}100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) thường tối ưu cho tích lũy PHB mà không gây stress quang hợp [90]. Một số nghiên cứu cho thấy ánh sáng cao hơn ($200\text{--}300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) có thể kích thích tổng hợp PHB nhờ tăng dư thừa năng lượng và dòng carbon, nhưng vượt ngưỡng chịu đựng lại làm giảm sinh trưởng và hiệu suất [54] [100].

Bên cạnh cường độ, bước sóng ánh sáng cũng có vai trò quan trọng. Ánh sáng đỏ thường thúc đẩy tích lũy PHB tốt hơn ánh sáng xanh do tăng tổng hợp phycobiliprotein và hiệu quả hấp thu năng lượng [90, 101, 102]. Trong khi đó, ánh sáng xanh dương kích thích enzyme trong chu trình Calvin, hỗ trợ cố định CO_2 và sinh tổng hợp hợp chất hữu cơ [90]. Thí nghiệm với *Spirulina platensis* cho thấy ánh sáng đơn sắc (đỏ hoặc xanh) tạo khác biệt đáng kể so với ánh sáng trắng về cả sinh trưởng và hàm lượng PHB [103]. Chu kỳ sáng - tối cũng điều hòa nhịp sinh học và biểu hiện gene tổng hợp PHB. Ở *Synechocystis sp. PCC 6803*, mức biểu hiện gene tăng cao vào giai đoạn chuyển từ sáng sang tối, cho thấy PHB đóng vai trò như cơ chất dự trữ ban ngày và được sử dụng ban đêm [104].

Hiện nay, công nghệ chiếu sáng LED đang được áp dụng trong photobioreactor, cho phép điều chỉnh phổ sáng và chu kỳ chiếu sáng linh hoạt. Cách tiếp cận này mở ra tiềm năng tối ưu hóa tích lũy PHB trên quy mô công nghiệp, đặc biệt trong các hệ thống nuôi cấy có kiểm soát [101].

*. *Độ pH:*

pH là yếu tố môi trường quan trọng, ảnh hưởng đến hoạt động enzyme, trao đổi chất và cố định carbon ở vi khuẩn lam. *S. salina* phát triển tối ưu trong khoảng pH kiềm nhẹ 7,5–9,5 [20]. Trong điều kiện quang tự dưỡng, pH 8,0–9,0 giúp tăng hấp thu bicarbonate (HCO_3^-), làm giàu CO_2 nội bào cho quang hợp và tổng hợp acetyl-CoA – tiền chất trực tiếp của PHB [105].

Trong quá trình nuôi cấy thực tế, pH của môi trường thường không ổn định do sinh khối hấp thụ ion (NH_4^+ , NO_3^- , HCO_3^- ...) hoặc sinh ra các hợp chất trao đổi (như CO_2 , acid hữu cơ). Các nghiên cứu đề xuất rằng cần kiểm soát pH bằng cách sục khí CO_2 như một phương pháp kép: duy trì pH tối ưu đồng thời cung cấp carbon vô cơ liên tục cho tăng trưởng và tích lũy PHB [83, 106]. Nghiên cứu đối với chủng *Nostoc*

muscorum cho thấy pH 8,5 kết hợp acetate–propionate giúp tích lũy PHB đạt 28,2% khối lượng khô sau 14 ngày [95]. Dữ liệu này có thể định hướng cho việc ứng dụng pH kiềm nhẹ trong nuôi *S. salina*, vốn có khả năng thích ứng với môi trường nước mặn kiềm nhẹ.

Trong photobioreactor, việc theo dõi và điều chỉnh pH bằng cảm biến CO₂ giúp hạn chế dao động bất lợi, duy trì hiệu suất quang hợp và nâng cao hàm lượng PHB. Cơ chế này không chỉ bảo vệ tế bào khỏi các dao động pH có hại, mà còn đảm bảo rằng lượng CO₂ nội bào không trở thành yếu tố hạn chế tốc độ quang hợp và tích lũy PHB [83]. Như vậy, kiểm soát pH ổn định trong khoảng 7,5–9,0 là chiến lược quan trọng để tối ưu hóa cả sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina*, đặc biệt trong môi trường nước thải.

**. Điều kiện nhiệt độ:*

Nhiệt độ là một trong những yếu tố sinh thái quan trọng chi phối tốc độ sinh trưởng và khả năng tổng hợp PHB ở vi khuẩn lam. Thông qua việc điều chỉnh hoạt tính enzyme và hiệu quả quang hợp, nhiệt độ quyết định dòng năng lượng và carbon nội bào, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình tổng hợp acetyl-CoA – tiền chất của PHB [107]. Phần lớn các loài vi khuẩn lam, bao gồm nhiều chủng *Synechocystis*, sinh trưởng tối ưu trong khoảng 25–30°C. Đây cũng là điều kiện thuận lợi nhất để duy trì hoạt động của hệ enzyme liên quan đến cố định CO₂ và tổng hợp PHB [107]. Tuy nhiên, nhiều loài có khả năng thích nghi với biên độ nhiệt rộng hơn: các chủng ưa lạnh ở Nam Cực có thể tồn tại dưới 15°C [108], trong khi một số loài ưa nhiệt như *Synechococcus* MA19 phát triển tốt ở 40°C mà không làm suy giảm hiệu suất tích lũy PHA/PHB [109].

Ngoài giới hạn tối ưu, tốc độ sinh trưởng và hàm lượng PHB thường giảm. Tuy vậy, một số nghiên cứu chỉ ra rằng nhiệt độ cao vừa phải có thể đóng vai trò như yếu tố stress sinh học, kích thích vi khuẩn chuyển carbon dư thừa thành PHB hoặc glycogen để bảo vệ tế bào [110]. Điều này được ghi nhận trong môi trường có ánh sáng cao và nguồn carbon dồi dào, khi vi khuẩn ưu tiên tích lũy carbon thay vì tổng hợp protein trong điều kiện bất lợi về nhiệt độ [109, 111]. Ngược lại, khi nhiệt độ vượt quá 35°C hoặc thấp hơn 20°C, tốc độ trao đổi chất suy giảm mạnh, dẫn đến hiệu suất tổng hợp PHB thấp. Một số nghiên cứu đã ghi nhận rằng nhiệt độ cao hơn bình thường có thể gây stress sinh học nhẹ, kích thích vi khuẩn lam chuyển hóa carbon dư thừa thành các hợp chất lưu trữ như glycogen hoặc PHB như cơ chế bảo vệ tế bào [110].

Trong nuôi cấy ngoài trời, dao động nhiệt theo ngày - đêm hoặc mùa là thách thức lớn. Việc lựa chọn các chủng thích ứng tốt như *Synechocystis salina*, kết hợp biện pháp điều hòa vi khí hậu (làm mát, mái che, tuần hoàn nước), giúp duy trì hiệu suất sinh trưởng và tích lũy PHB ổn định [107, 112].

Do đó, duy trì nhiệt độ tối ưu (25–30°C) và khai thác hợp lý tác động stress sinh học có thể trở thành chiến lược quan trọng trong tối ưu hóa sản xuất PHB từ vi khuẩn lam.

**. Độ mặn, độ muối*

Độ mặn là yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHA/PHB của vi khuẩn lam, đặc biệt với các chủng có nguồn gốc nước mặn hoặc nước lợ. Nhiều nghiên cứu cho thấy độ mặn ở mức vừa phải có thể kích thích tích lũy PHB như một cơ chế dự trữ năng lượng và thích nghi stress thẩm thấu [65, 113]. Một số nghiên cứu cho thấy rằng việc điều chỉnh nồng độ muối trong môi trường nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và năng suất PHB [114]. Cơ chế chính là sự kích hoạt điều hòa áp suất thẩm thấu thông qua tổng hợp các chất hòa tan (proline, trehalose, glycine-betaine), đồng thời dòng carbon được ưu tiên chuyển vào các polymer dự trữ như glycogen và PHB. Tuy nhiên, khi độ mặn vượt ngưỡng tối ưu, stress thẩm thấu làm suy giảm sinh trưởng, hạn chế hấp thu N và P, dẫn đến giảm hiệu suất tổng hợp PHB [16].

Từ các nghiên cứu về vi khuẩn lam trong xử lý môi trường và sản xuất polymer sinh học cho thấy khả năng sinh trưởng, xử lý nitrogen, phosphorus và tích lũy PHA/PHB có sự khác biệt rõ rệt giữa các chi và các chủng khác nhau. Trên cơ sở đó, nhiều công trình đã tập trung lựa chọn và đánh giá các chủng cụ thể nhằm làm rõ tiềm năng ứng dụng trong những điều kiện nuôi cấy khác nhau, đặc biệt là trong môi trường nước thải giàu dinh dưỡng. Trong số các đối tượng được nghiên cứu, các chủng thuộc chi *Spirulina* và *Synechocystis salina* được quan tâm nổi bật nhờ khả năng thích nghi tốt với môi trường giàu dinh dưỡng, sinh trưởng ổn định và tiềm năng ứng dụng trong các hệ thống tích hợp xử lý nước thải kết hợp thu hồi sinh khối và polymer sinh học. Những đặc tính này góp phần giảm chi phí xử lý, hạn chế nguy cơ nhiễm tạp và nâng cao tính ổn định của các hệ thống nuôi ngoài trời như raceway hoặc photobioreactor dạng ống [16, 115].

1.3.3. Phương pháp sản xuất và tiêu chí đánh giá chất lượng PHB

Trên cơ sở các đặc điểm cấu trúc và tính chất của PHB đã được trình bày, việc lựa chọn chiến lược sản xuất phù hợp cùng với hệ tiêu chí đánh giá chất lượng vật liệu là yếu tố then chốt quyết định khả năng ứng dụng thực tiễn của polymer này. Do đó, nội dung tiếp theo tập trung làm rõ các hướng tiếp cận trong sản xuất PHB, đồng thời tổng hợp các phương pháp phân tích và tiêu chí đánh giá chất lượng vật liệu.

Hiện nay, sản xuất PHB từ vi sinh vật được phát triển theo nhiều hướng khác nhau, trong đó trọng tâm là tối ưu hóa nguồn carbon, điều kiện nuôi cấy và cơ chế điều hòa

chuyển hóa nhằm nâng cao hiệu suất tích lũy polymer. Dựa trên cơ chế trao đổi chất, các hệ sản xuất có thể được chia thành hai nhóm chính: hệ dị dưỡng và hệ quang tự dưỡng.

Trong các hệ dị dưỡng, quá trình tích lũy PHB được kích hoạt khi tồn tại trạng thái mất cân bằng dinh dưỡng, cụ thể là dư thừa nguồn carbon hữu cơ trong khi nitrogen hoặc phosphorus bị hạn chế. Điều kiện này làm gián đoạn sinh trưởng tế bào và thúc đẩy chuyển hướng dòng carbon vào con đường dự trữ dưới dạng PHB. Mặc dù phương pháp này có ưu điểm về năng suất tích lũy cao và thời gian nuôi cấy ngắn, song việc phụ thuộc vào nguồn cơ chất hữu cơ tinh khiết và yêu cầu kiểm soát vô trùng nghiêm ngặt làm gia tăng chi phí sản xuất và hạn chế khả năng mở rộng quy mô [16].

Ngược lại, các hệ quang tự dưỡng, đặc biệt là vi khuẩn lam, cho phép sử dụng trực tiếp CO₂ và năng lượng ánh sáng để sinh trưởng và tổng hợp PHB, qua đó góp phần giảm chi phí nguyên liệu và phát thải carbon. Trong các hệ này, các yếu tố môi trường như cường độ ánh sáng, trạng thái dinh dưỡng, độ mặn và chế độ cung cấp CO₂ đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển quá trình tích lũy polymer. Đáng chú ý, việc sử dụng nước thải làm môi trường nuôi cấy không chỉ cung cấp nguồn dinh dưỡng sẵn có mà còn cho phép tích hợp đồng thời giữa xử lý ô nhiễm và sản xuất vật liệu sinh học, phù hợp với định hướng kinh tế tuần hoàn.

Về mặt công nghệ, quy trình sản xuất PHB từ vi khuẩn lam thường bao gồm ba giai đoạn chính: (i) nuôi cấy sinh khối trong điều kiện tối ưu nhằm đạt mật độ tế bào cao; (ii) áp dụng các tác nhân gây stress để kích thích tích lũy PHB; và (iii) thu hoạch, chiết tách và tinh sạch polymer. Trong đó, giai đoạn gây stress giữ vai trò quyết định, do liên quan trực tiếp đến cơ chế điều hòa chuyển hóa nội bào và hiệu suất tích lũy PHB. Hiệu quả của toàn bộ quy trình phụ thuộc không chỉ vào đặc tính sinh học của chủng mà còn vào điều kiện vận hành và tương tác với môi trường nuôi cấy [115].

Để đánh giá chất lượng PHB, cần kết hợp các phương pháp phân tích nhằm xác định cả cấu trúc hóa học và hàm lượng tích lũy. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) được sử dụng để nhận diện các nhóm chức đặc trưng, đặc biệt là nhóm carbonyl (C=O) và liên kết este (C-O-C), qua đó xác nhận bản chất hóa học của polymer. Bên cạnh đó, sắc ký khí với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) là phương pháp phổ biến để định lượng hàm lượng PHB trong sinh khối, cho phép đánh giá hiệu suất tích lũy dưới các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Sự kết hợp giữa các phương pháp này cung cấp thông tin toàn diện về cả cấu trúc và định lượng của vật liệu [2].

Ngoài ra, chất lượng PHB còn được đánh giá thông qua các đặc trưng vật liệu như độ tinh sạch, khối lượng phân tử, tính chất nhiệt và khả năng phân hủy sinh học. Các tiêu chuẩn quốc tế như ASTM D6400 và ISO 17088 đóng vai trò là cơ sở tham

chiều quan trọng trong việc đánh giá vật liệu nhựa sinh học, đặc biệt đối với các ứng dụng yêu cầu khả năng phân hủy hoàn toàn trong môi trường tự nhiên. Việc đối chiếu các đặc trưng của PHB với các tiêu chuẩn này cho phép xác định mức độ phù hợp của vật liệu đối với các mục đích sử dụng cụ thể.

Như vậy, việc kết hợp chiến lược sản xuất hợp lý với hệ tiêu chí đánh giá khoa học không chỉ giúp nâng cao hiệu suất tích lũy mà còn đảm bảo chất lượng PHB, tạo cơ sở cho việc phát triển các hệ thống sản xuất polymer sinh học từ vi khuẩn lam theo hướng bền vững và có khả năng ứng dụng thực tiễn.

1.4. Ứng dụng phương pháp thống kê trong sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng và tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sản xuất sinh khối và PHB của vi khuẩn lam

Thiết kế Plackett–Burman là phương pháp thiết kế thí nghiệm sàng lọc, được sử dụng nhằm xác định các yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến một quá trình hoặc kết quả nghiên cứu trong số nhiều biến độc lập tiềm năng (X_1, X_2, \dots, X_n). Ưu điểm của phương pháp này là số lượng thí nghiệm cần thực hiện tương đối ít, giúp tiết kiệm thời gian và nguồn lực nghiên cứu. Sau khi tiến hành thí nghiệm, các biến phụ thuộc được xác định theo sự thay đổi của các biến độc lập tại các mức mã hóa $-1, 0$ và $+1$; kết quả được phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) dựa trên giá trị p -value nhằm xác định các yếu tố có ảnh hưởng thống kê đến các hàm mục tiêu (Y_1, Y_2, \dots, Y_n). Trên cơ sở các yếu tố quan trọng được lựa chọn từ thiết kế Plackett–Burman, phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology – RSM) với thiết kế Box–Behnken (Box–Behnken design - BBD) được sử dụng để tối ưu hóa mức độ của các yếu tố ảnh hưởng chính. Thiết kế Box–Behnken cho phép xây dựng mô hình hồi quy đa thức bậc hai (phương trình 1.1), mô tả mối quan hệ giữa các biến độc lập và hàm mục tiêu, từ đó xác định bộ điều kiện tối ưu để hàm mục tiêu đạt giá trị cực đại thông qua các phần mềm thống kê chuyên dụng như Statistica hoặc Minitab.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1.1)$$

Trong đó: Y là giá trị hàm mục tiêu đo được theo thí nghiệm đã thiết kế theo phương pháp đáp ứng bề mặt; β là các hệ số của phương trình, và X_i và X_j lần lượt là mức không được mã hóa của các tham số i và j ; k là số lượng các yếu tố nghiên cứu; và ε là sai số thực nghiệm ngẫu nhiên. Phân tích bề mặt đáp ứng được thực hiện bằng cách sử dụng Minitab 18 (Minitab, LLC, Pennsylvania, Mỹ) để xác định mối tương quan thông qua hồi quy phi tuyến tính. Tầm quan trọng của mỗi biến được xác định bằng chỉ số p -value có giá trị nhỏ hơn 0,05.

Trong nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện sản xuất PHB bởi vi khuẩn lam, thiết kế Plackett–Burman được áp dụng nhằm sàng lọc và xác định các yếu tố hóa – lý – sinh học có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tích lũy PHB trong số nhiều biến tiềm năng. Trên cơ sở các yếu tố quan trọng được lựa chọn, phương pháp bề mặt đáp ứng với thiết kế Box–Behnken được sử dụng để tối ưu hóa mức độ của các yếu tố này, nhằm đạt năng suất PHB tối đa với số lượng thí nghiệm tối thiểu nhưng vẫn đảm bảo độ tin cậy của mô hình [116-120]. Đặc điểm nổi bật của thiết kế Box–Behnken là các thí nghiệm được bố trí tại các điểm trung gian và các điểm trung tâm của không gian thí nghiệm, không bao gồm các điểm góc, qua đó giúp tránh các điều kiện cực đoan có thể gây ức chế sinh học hoặc làm mất ổn định hệ thống. Mỗi biến độc lập được khảo sát ở ba mức mã hóa (-1 , 0 và $+1$), cho phép xây dựng mô hình hồi quy đa thức bậc hai để đánh giá đồng thời ảnh hưởng riêng lẻ và tương tác giữa các yếu tố. Tuy nhiên, thiết kế Box–Behnken không được sử dụng cho mục đích sàng lọc yếu tố, mà chỉ áp dụng khi các yếu tố quan trọng đã được xác định thông qua tổng quan tài liệu hoặc các thí nghiệm sàng lọc ban đầu như thiết kế Plackett–Burman. Hiệu quả của cách tiếp cận kết hợp Plackett–Burman và phương pháp bề mặt đáp ứng đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu. Geethu et al. (2021) và Sachan et al. (2024) đã sử dụng thiết kế Plackett–Burman để xác định các yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình tích lũy PHA, sau đó tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng, giúp gia tăng đáng kể hàm lượng và năng suất PHA/PHB thu được [121]. Nhiều công bố gần đây cũng cho thấy việc kết hợp thiết kế Plackett–Burman và RSM là công cụ hiệu quả để sàng lọc và tối ưu hóa các yếu tố hóa học, vật lý và sinh học ảnh hưởng đến hàm lượng PHA/PHB sản xuất bởi vi khuẩn lam và vi sinh vật, trong đó bước sàng lọc được thực hiện trước, tiếp theo là tối ưu hóa các yếu tố quan trọng nhằm nâng cao hiệu suất tích lũy PHA/PHB của tế bào [116-120].

1.5. Phương pháp chiết tách, tinh sạch và phân tích đặc tính vật liệu PHB

1.5.1. Phương pháp chiết tách, tinh sạch PHB

Phương pháp và quy trình biến đổi sinh khối của vi khuẩn lam để tách PHB từ tế bào cũng ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình sản xuất PHB. Chiết tách PHB chủ yếu sử dụng phương pháp hóa học với dung môi như chloroform, tuy nhiên cũng đã có thử nghiệm sử dụng phương pháp lên men hỗn hợp hoặc xử lý enzyme kết hợp để tăng hiệu suất tách chiết và giảm độc tính môi trường.

Thông thường, quá trình chiết và tinh sạch PHB từ sinh khối vi khuẩn lam có ba bước cơ bản. Bước 1: loại bỏ chlorophyll bằng các dung môi như methanol hoặc NaOCl. Bước 2: chiết PHB từ trong sinh khối của vi khuẩn lam bằng các dung môi như chloroform hoặc dichloromethane có gia nhiệt. Bước 3: kết tủa chloform bằng các dung môi như

diethyl ether hoặc methol có xử lý lạnh, sau đó kết tủa được rửa với dung môi acetone và lặp lại hoà tan trong chloroform/dichloromethane và kết tinh lại với ether hoặc methanol lạnh [122]. Kết quả được thu hoạch bằng ly tâm/lọc sau đó sấy đông khô hoặc giảm áp để thu được PHB dạng hạt [2, 123-125].

Dung môi của clo bao gồm chloroform hoặc dichloromethane thường được dùng để chiết PHA/PHB từ sinh khối vi sinh vật/vi khuẩn lam. Tuy nhiên, một số nghiên cứu mới sử dụng các dung môi có tính bền vững và ít độc tính hơn như 1,3-dioxolane cho hiệu suất 89,7% cao hơn 53,9% thu được khi sử dụng chloroform [126-128]. Butyl acetate ở 103°C, trong 30 phút, cũng được phát hiện là một giải pháp thay thế tốt cho dung môi halogen trong việc chiết PHA/PHB từ *C. necator*, với hiệu suất chiết là 96%, độ tinh khiết là 99% và trọng lượng phân tử cao hơn chloroform [129].

Một chiến lược khác để thu hồi PHA là phân hủy các thành phần tế bào xung quanh polymer. Kobayashi et al., (2015) đã đánh giá chất lỏng ion 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphorusnate như dung môi thay thế để hòa tan vi khuẩn lam và thu hồi PHA bằng cách lọc và thu hồi hơn 98% PHA bằng phương pháp lọc qua màng [130]. Các phương pháp sinh học khác cũng đã được áp dụng để thu hồi PHA. Murugan et al., (2016) đã chứng minh tính khả thi của việc thu hồi PHA bằng cách sử dụng sâu bột, chúng ăn và tiêu hóa tế bào không phải PHA và bài tiết các hạt PHA có thể được làm sạch bằng chất tẩy rửa [131]. Quá trình này làm giảm việc sử dụng dung môi, hóa chất và tái sử dụng các vật liệu tế bào còn lại không phải PHA để nuôi giun, đây có thể là nguồn protein thay thế cho thức ăn chăn nuôi. Sử dụng phương pháp này, PHA đã được chiết xuất từ *C. necator* với độ tinh khiết 100% và trọng lượng phân tử là 240 kDa [129]. *Bdellovibrio bacteriovorus* Bd3709 biến đổi gen cũng được sử dụng để thu hồi PHA với hiệu suất 80% từ vi khuẩn dị dưỡng [132]. Những vi khuẩn này có trước vi khuẩn gram âm, giải phóng các hạt PHA vào môi trường nuôi cấy. Các enzyme như protease cũng hứa hẹn sẽ phân hủy phần protein của tế bào vi tảo và tạo ra hạt PHA tự do, vì chúng rất đặc hiệu với protein và sử dụng các điều kiện nhẹ nhàng, tạo ra tốc độ phản ứng cao với ít hư hỏng sản phẩm. Ví dụ, sử dụng 2,0% bromelain trên một khối lượng sinh khối, 88% PHA được thu hồi với độ tinh khiết là 66% từ *Ralstonia eutropha* DSM545 [133].

Bên cạnh việc phát triển các phương pháp chiết tách PHA phù hợp cho vi khuẩn lam, cần đặc biệt chú trọng đến ảnh hưởng của quy trình chiết đến cấu trúc hóa học, khối lượng phân tử và tính chất vật lý của polymer, vì các yếu tố này quyết định trực tiếp chất lượng và khả năng ứng dụng của vật liệu sau thu hồi. Không chỉ hiệu suất thu hồi, mà hàm lượng PHA nội bào cũng đóng vai trò then chốt đối với độ tinh khiết và hiệu quả

chiết xuất; hàm lượng PHA thấp thường làm tăng tạp chất tế bào, đòi hỏi xử lý mạnh hơn, dẫn đến chi phí cao và suy giảm chất lượng sản phẩm.

Hiệu quả chiết và thu hồi PHA/PHB phụ thuộc vào nhiều thông số như loại dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/sinh khối, đặc tính sinh khối và phương pháp tiền xử lý [134]. Do đó, cần tối ưu đồng thời điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hàm lượng PHA nội bào và khảo sát có hệ thống các thông số chiết để xác định tổ hợp tối ưu, đảm bảo thu hồi polymer với hiệu suất và độ tinh khiết cao.

1.5.2. Phương pháp nghiên cứu đặc tính của vật liệu nhựa sinh học PHB

Vật liệu nhựa PHA/PHB tích lũy trong tế bào vi khuẩn lam thường được soi và nghiên cứu bằng kính hiển vi huỳnh quang. Vi khuẩn lam tích lũy PHB được xác định bằng phương pháp nhuộm với hai loại thuốc nhuộm khác nhau, Sudan black B và Nile blue A. Đối với Sudan black B, các tế bào vi khuẩn lam phát triển đến giai đoạn logarit được thu hoạch, cố định nhiệt trên lam kính sạch, không dính dầu mỡ và xử lý với vài giọt Sudan black B (0,3% Sudan black B trong etanol 70%). Sau 5-10 phút, các lát được ngâm trong xylen cho đến khi khử ion hoàn toàn (khoảng 10 giây), sau đó được nhuộm bằng dung dịch safranin (0,5% trong nước) trong 10 giây trước khi rửa nhẹ bằng nước. Các phiến kính được để khô và sau đó được kiểm tra bằng thấu kính ngâm dầu. Để nhuộm Nile blue A, hòa tan 1 mg Nile blue A trong dimethylsulphoxid (1 mL) để thu được dung dịch nhuộm. Hai giọt dung dịch nhuộm được thêm vào 200 μ L hỗn hợp vi khuẩn lam, sau đó được ủ ở 55°C trong 10 phút. Tế bào được chuyển sang lam kính và quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng kích thích 450-490 nm. Vi khuẩn lam sản sinh PHB được phát hiện khi quan sát thấy các hạt màu đen với màu Sudan black B và các hạt màu cam huỳnh quang rực rỡ với màu Nile blue A sau khi nhuộm [2].

- Hàm lượng của PHA/PHB trong sinh khối vi khuẩn lam hoặc vi sinh vật được nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký khí [135-137].

- Cấu trúc của PHA/PHB được phân tích và nghiên cứu bằng máy cộng hưởng từ hạt nhân phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ trên máy trong dung môi trong dung môi CDCl_3 ở nhiệt độ phòng [2].

- Khối lượng phân tử PHB: Khối lượng phân tử trung bình số (M_n), khối lượng phân tử trung bình khối (M_w) và chỉ số phân bố khối lượng (M_w/M_n) được xác định bằng thiết bị sắc ký thẩm thấu gel (GPC) [138, 139].

- Nhóm chức của PHB được phân tích bằng quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) [2];

- Đặc tính nhiệt của PHB được phân tích bằng các máy phân tích nhiệt lượng (TGA) [140-142].

1.6. Các nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải trên thế giới và tại Việt Nam

1.6.1. Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải trên Thế giới

Trong những năm gần đây, việc ứng dụng vi khuẩn lam trong xử lý nước thải đồng thời kết hợp sản xuất nhựa sinh học PHB đã thu hút sự quan tâm mạnh mẽ. Các nghiên cứu cho thấy vi khuẩn lam không chỉ loại bỏ dinh dưỡng (N, P) hiệu quả mà còn có khả năng tích lũy PHB trong điều kiện thiếu hụt dinh dưỡng, đặc biệt khi nuôi trong môi trường nước thải.

Troschl et al., (2017) 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 [143]. Kamravamanesh et al., (2017) đã tiến hành nuôi cấy *Synechocystis sp.* PCC 6714 trong hệ thống phản ứng quang sinh học với điều kiện thiếu hụt nitrogen và phosphorus. Kết quả cho thấy sự tích lũy PHB đạt $16,4 \pm 2\%$ trọng lượng khô tế bào vào ngày thứ 15 của giai đoạn thiếu hụt dinh dưỡng [61]. Markl et al., (2018) cũng khẳng định lợi thế kinh tế của vi khuẩn lam nhờ tận dụng ánh sáng mặt trời và CO₂, giảm chi phí so với vi khuẩn dị dưỡng [144].

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã mở rộng ứng dụng trên các loại nước thải khác nhau. Gomes Gradissimo (2020) đánh giá tiềm năng xử lý nước thải thực phẩm bằng vi khuẩn lam [145]. Nattawut Krasaesueb et al., (2019), 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 (NO₃⁻), 67,90% đối với nitrite (NO₂⁻) và 98,07% đối với ammonium (NH₄⁺) [146]. 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 [143].

Panda et al., (2020), hàm lượng PHB có thể đạt đến 10–15% trọng lượng khô tế bào (CDW) trong điều kiện tối ưu [147]. Nghiên cứu do Koch et al., (2020) 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 [123]. Cụ thể, khi sử dụng kỹ thuật di truyền đưa các gen *phaA* và *phaB* từ *Cupriavidus necator* vào *Synechocystis sp.* PCC 6803, dưới sự điều khiển của promoter mạnh PpsbA2. Kết quả, hàm lượng PHB

tăng vượt bậc từ 15% (chúng tự nhiên) lên 63% CDW sau 3 tuần nuôi trong điều kiện thiếu N và P, sinh khối đạt 1,2 g/L và hiệu suất chuyển hóa carbon ~27% [123, 148].

Bên cạnh biến đổi gen, nhiều nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện môi trường đã đạt kết quả đáng chú ý. Meixner et al., (2022) chứng minh stress do độ mặn kích thích tổng hợp PHB, với giá trị 6,98% CDW tại 4% NaCl sau 42 ngày [16]. Gracioso et al., (2021) ghi nhận chủng *Synechocystis* từ rừng ngập mặn tích lũy tới 31% PHB dưới ánh sáng mạnh [60]. Các yếu tố như nguồn carbon, nitrogen, phosphorus, ánh sáng và nhiệt độ đều được chứng minh ảnh hưởng mạnh tới hiệu suất PHB.

Về ứng dụng nước thải, nhiều loại nguồn đã được thử nghiệm: sinh hoạt, thủy sản, thực phẩm và dệt nhuộm. Các chủng *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* và *Phormidium* thể hiện khả năng thích nghi tốt, duy trì hiệu quả xử lý dinh dưỡng và tích lũy PHB 6–10% CDW [57]. Afreen et al., (2021) cũng khẳng định tiềm năng kết hợp xử lý nước thải công nghiệp với sản xuất PHB, khi *Oscillatoria* và *Anabaena* đạt 8–10% CDW [149].

Ở quy mô thí điểm, Senatore et al., (2023) nuôi *Synechocystis sp.* trong nước thải thứ cấp tại hệ phản ứng 30 L, đạt PHB 4,8% sau 7 ngày thiếu N và P [54]. Các nghiên cứu mới hơn của Grivalský et al., (2024) thử nghiệm tại hồ ngoài trời cho thấy khả năng loại bỏ 72% tổng nitrogen và 67% tổng phosphorus, đồng thời tích lũy 23,4% PHB [59]. Các chủng vi khuẩn lam như *Synechocystis*, *Nostoc*, *Spirulina* và *Anabaena* đã được chứng minh có khả năng tích lũy PHB trong điều kiện thiếu nitrogen hoặc phosphorus, đặc biệt khi dư thừa nguồn carbon. Nhiều nghiên cứu ghi nhận hàm lượng PHB đạt 6–10% trọng lượng khô tế bào. Với sự phát triển của sinh học phân tử, các chiến lược cải tiến di truyền đã giúp nâng cao hiệu suất tổng hợp PHB. Điển hình là việc biến nạp cụm gen *phaABC* từ vi khuẩn dị dưỡng vào *Synechocystis sp.*, giúp tăng gấp đôi sản lượng PHB so với chủng tự nhiên. Một báo cáo toàn diện năm 2024 về “Third-generation biomass for bioplastics” (sinh khối thế hệ thứ ba) cũng khẳng định tiềm năng của vi khuẩn lam như nguồn sinh khối mới cho sản xuất nhựa sinh học [150, 151]. Tuy vậy, các thách thức lớn vẫn tồn tại, bao gồm tốc độ sinh trưởng chậm, hàm lượng PHB còn thấp, quy trình chiết tách – tinh sạch phức tạp và chi phí sản xuất cao khi mở rộng quy mô [122].

Một nghiên cứu gần đây của Artai Lage et al., (2025) đã đánh giá khả năng sản xuất PHB của các chủng vi khuẩn lam phân lập từ nguồn nước tự nhiên nhằm ứng dụng trong mô hình xử lý nước thải sinh hoạt sau xử lý thứ cấp. Kết quả cho thấy *Synechocystis sp.* và *Leptolyngbya sp.* có thể tích lũy PHB ở mức 3,1% và 2,9% trọng lượng khô tế bào khi bổ sung acetate. Tuy nhiên, thành phần phức tạp của nước thải khiến hiệu suất tích lũy thấp hơn so với môi trường chuẩn. Dù còn hạn chế, nghiên cứu

đã cung cấp cơ sở khoa học quan trọng, khẳng định tiềm năng phát triển mô hình xử lý nước thải kết hợp thu hồi sinh khối để sản xuất nhựa sinh học PHB theo hướng bền vững và thân thiện với môi trường [152].

Mặc dù nhiều nghiên cứu quốc tế đã chứng minh tiềm năng tích hợp xử lý nước thải với sản xuất PHB bằng vi khuẩn lam, việc triển khai ở quy mô thương mại vẫn gặp nhiều hạn chế kỹ thuật và kinh tế. Hàm lượng PHB tích lũy còn thấp so với vi khuẩn dị dưỡng (thường < 25% khối lượng khô), tốc độ sinh trưởng chậm làm giảm năng suất tổng thể, và hệ thống nuôi ngoài trời khó kiểm soát do biến động môi trường và nguy cơ nhiễm tạp. Bên cạnh đó, phần lớn nghiên cứu mới dừng ở quy mô phòng thí nghiệm, chưa đánh giá đầy đủ các điều kiện tối ưu trong nước thải thực tế. Chi phí thu hoạch sinh khối và chiết tách PHB còn cao, trong khi thiếu các hệ thống và quy trình đồng bộ ở quy mô lớn, cản trở việc xây dựng chuỗi công nghệ khép kín và hiệu quả.

Tổng quan các công trình nghiên cứu quốc tế trong những năm gần đây đã khẳng định tiềm năng ứng dụng vi khuẩn lam trong việc kết hợp xử lý môi trường với sản xuất vật liệu sinh học phân hủy sinh học. Để hiện thực hóa mục tiêu phát triển bền vững và giảm thiểu ô nhiễm nhựa, các định hướng nghiên cứu tương lai cần tập trung vào các nội dung sau:

- Tuyển chọn và cải tiến chủng vi khuẩn lam có năng suất PHB cao thông qua kỹ thuật tiến hoá thích nghi hoặc công nghệ sinh học phân tử để tăng hiệu suất tích lũy PHB.
- Tối ưu hóa điều kiện môi trường như: nhiệt độ, ánh sáng, pH, tỷ lệ chất dinh dưỡng C, N, P và các chất kích thích sinh học.
- Phát triển quy trình thu hồi PHB hiệu quả, tiết kiệm năng lượng và thân thiện với môi trường. Xây dựng mô hình sản xuất tích hợp ở quy mô pilot hoặc công nghiệp theo định hướng kinh tế tuần hoàn.

Những kết quả đạt được và thách thức tồn tại đã khẳng định vi khuẩn lam là đối tượng tiềm năng trong công nghệ sinh học môi trường, với khả năng giải quyết đồng thời hai vấn đề toàn cầu: ô nhiễm nước và ô nhiễm nhựa có nguồn gốc hoá thạch. Do đó, nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong xử lý nước thải kết hợp sản xuất nhựa sinh học như PHB được kỳ vọng sẽ trở thành một trong những hướng đi ưu tiên trong phát triển kinh tế sinh học bền vững.

1.6.2. Nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lam trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải tại Việt Nam

Trong bối cảnh phát triển kinh tế tuần hoàn và bền vững, việc kết hợp xử lý nước thải với thu hồi sinh khối vi sinh để sản xuất nhựa sinh học PHB đang nhận được sự quan tâm ngày càng lớn. Tại Việt Nam, vi tảo và vi khuẩn lam đã được nghiên cứu và ứng dụng tương đối rộng rãi trong xử lý nước thải, bao gồm nước thải sinh hoạt, nước

thải chẵn nuôi, cũng như nước thải công nghiệp polymer và hóa chất, trong đó các chủng như *Chlorella sp.* cho thấy hiệu quả loại bỏ chất ô nhiễm và khả năng thích nghi tốt trong điều kiện môi trường khác nhau [153-160]. Các nghiên cứu trong nước bước đầu tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và nuôi cấy các chủng vi khuẩn lam và vi sinh vật bản địa có khả năng sinh trưởng trong môi trường nước thải, đồng thời đánh giá tiềm năng tích lũy PHA/PHB. Nguồn mẫu nghiên cứu ngày càng đa dạng, bao gồm ao hồ, ruộng lúa, vùng ven biển và môi trường nước mặn, nhằm mở rộng phổ thích nghi và khả năng ứng dụng. Gần đây, chủng *Salinicola sp.* TSLT21 phân lập từ Quần đảo Trường Sa được ghi nhận có khả năng tích lũy PHA đạt 30,9% sinh khối khô và chịu mặn đến 12%, với điều kiện sinh trưởng tối ưu ở 30°C, pH = 7 và NaCl 7% [161].

Song song với hướng nghiên cứu trên vi khuẩn lam, nhiều công trình trong nước cũng khai thác nước thải giàu carbon từ chế biến thực phẩm (bún, bánh tráng, hủ tiếu) để nuôi các chủng vi khuẩn dị dưỡng như *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus* và *Bacillus megaterium*, nhằm giảm chi phí nguyên liệu, đồng thời đạt hiệu quả xử lý COD và chất dinh dưỡng cao [162, 163]. Trong nghiên cứu của Hồ Kỳ Quang Minh cho thấy hai chủng *Bacillus pumilus* NMG5 và *B. megaterium* BP5 có khả năng tích lũy PHB lần lượt đạt 42,28% và 41,19% khối lượng khô tế bào sau 48 giờ, đồng thời loại bỏ COD tới khoảng 98%, tổng nitrogen và tổng phosphorus đạt trên 80% [164].

Tuy nhiên, xét riêng đối với vi khuẩn lam, các nghiên cứu tại Việt Nam về khả năng tích lũy PHA/PHB vẫn còn hạn chế và chủ yếu tập trung vào khía cạnh xử lý nước thải. Các nghiên cứu về sinh tổng hợp, thu hồi và tinh sạch PHB từ sinh khối vi khuẩn lam mới dừng ở mức khảo sát ban đầu, chưa hình thành được quy trình công nghệ chuẩn hóa từ nuôi cấy – thu sinh khối – chiết tách PHB. Bên cạnh đó, sự liên kết giữa các nhóm nghiên cứu, cơ sở đào tạo và doanh nghiệp còn hạn chế, cùng với những khó khăn về trang thiết bị, kinh phí và số lượng công bố quốc tế. Mặc dù vậy, xu hướng tích hợp xử lý nước thải với thu hồi sinh khối vi khuẩn lam để sản xuất nhựa sinh học PHB đang ngày càng được quan tâm, cho thấy tiềm năng ứng dụng phù hợp với điều kiện thực tế của Việt Nam và định hướng phát triển kinh tế tuần hoàn, bền vững trong tương lai.

1.6.3. Đánh giá tổng quan các nghiên cứu trên Thế giới và tại Việt Nam

Từ việc tổng hợp và phân tích các công trình nghiên cứu đã công bố trên Thế giới cũng như tại Việt Nam có thể nhận thấy rằng, mặc dù vi khuẩn lam đã được quan tâm nghiên cứu như một đối tượng tiềm năng cho tích lũy PHB, song các kết quả hiện có vẫn chưa đáp ứng đầy đủ yêu cầu về hiệu quả sinh trưởng và năng suất sản phẩm.

Các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước đều thống nhất rằng tồn tại mối quan hệ đánh đổi giữa tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của vi khuẩn lam: các chủng có tốc độ sinh trưởng nhanh thường tích lũy PHB ở mức thấp, trong khi các

chúng có khả năng tích lũy PHB cao lại sinh trưởng chậm. Tuy nhiên, các nghiên cứu nhằm tìm kiếm sự cân bằng tối ưu giữa hai quá trình này hiện vẫn còn rất hạn chế. Nguyên nhân chủ yếu của mâu thuẫn này xuất phát từ cơ chế tích lũy PHB, vốn thường được kích hoạt khi vi khuẩn lam rơi vào trạng thái thiếu hụt dinh dưỡng, đặc biệt là nitrogen hoặc phosphorus. Mặc dù điều kiện này thúc đẩy quá trình tích lũy PHB, nhưng đồng thời lại ức chế sự phân chia tế bào, làm giảm sinh khối và dẫn đến năng suất PHB tổng thể thấp. Do đó, việc nâng cao năng suất PHB ở vi khuẩn lam vẫn là thách thức lớn, và các nghiên cứu về tuyển chọn chủng có khả năng tích lũy PHB cao nhưng vẫn duy trì được tốc độ sinh trưởng tốt chưa được thực hiện một cách hệ thống.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn lam nhìn chung còn ở giai đoạn đầu, chủ yếu tập trung vào khảo sát, phân lập và mô tả đặc điểm hình thái, phân loại. Các nghiên cứu đánh giá khả năng tổng hợp PHB của các chủng vi khuẩn lam bản địa còn rất hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu tiếp cận theo hướng tích hợp giữa sinh trưởng sinh khối và tích lũy PHB. Hiện chưa có nhiều công trình đánh giá đồng thời các yếu tố quan trọng bao gồm tốc độ sinh trưởng, khả năng thích nghi môi trường và hàm lượng PHB trong cùng một chủng vi khuẩn lam. Bên cạnh đó, mặc dù vi khuẩn lam được biết đến với khả năng thích nghi cao, các nghiên cứu trong nước chưa tập trung nhiều vào việc tuyển chọn các chủng có khả năng sinh trưởng ổn định trong môi trường nước thải với nồng độ dinh dưỡng biến động. Đồng thời, các công bố về phương pháp tách chiết PHB từ sinh khối vi khuẩn lam theo hướng hiệu quả, chi phí thấp và phù hợp với điều kiện kỹ thuật trong nước còn rất ít. Những hạn chế này cho thấy sự thiếu hụt dữ liệu khoa học toàn diện, đồng thời đặt ra yêu cầu cần có các nghiên cứu chuyên sâu và có tính hệ thống hơn trong thời gian tới.

Đặc biệt, các nghiên cứu kết hợp nuôi cấy vi khuẩn lam với xử lý nước thải trên Thế giới cũng như tại Việt Nam hiện còn rất hạn chế. Phần lớn các công trình mới dừng lại ở việc đánh giá khả năng thích nghi của vi khuẩn lam với một số điều kiện môi trường riêng lẻ như ánh sáng, nhiệt độ hoặc độ mặn, trong khi chưa chú trọng đến việc áp dụng các áp lực chọn lọc trực tiếp nhằm định hướng và nâng cao khả năng tích lũy PHB trong quá trình nuôi cấy, đặc biệt trong môi trường nước thải.

Trên cơ sở phân tích, tổng hợp các kết quả nghiên cứu đã công bố trong và ngoài nước, luận án được định hướng tập trung vào việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn lam có khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường biến động, đồng thời tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất tích lũy PHB mà không làm suy giảm đáng kể tốc độ sinh trưởng sinh khối. Cách tiếp cận này nhằm góp phần làm rõ tiềm năng của vi khuẩn lam không chỉ ở khả năng xử lý các hợp chất ô nhiễm trong nước thải mà còn ở khả năng tạo ra sinh khối có giá trị gia tăng cao dưới dạng nhựa phân hủy sinh học PHB.

Từ các nhận định đó, luận án tiến hành ứng dụng chủng vi khuẩn lam được tuyển chọn trong hệ thống xử lý nước thải sinh hoạt, kết hợp thu hồi sinh khối giàu PHB, qua đó đánh giá khả năng tích hợp đồng thời hai mục tiêu: xử lý môi trường và sản xuất vật liệu sinh học. Cách tiếp cận này góp phần đề xuất một hướng đi mới trong phát triển công nghệ sinh học xanh, phù hợp với định hướng kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững. Bên cạnh ý nghĩa khoa học và thực tiễn, các nội dung nghiên cứu của luận án được xây dựng trên cơ sở nhận diện có hệ thống các khoảng trống nghiên cứu còn tồn tại trong các công trình đã công bố, bao gồm: thiếu các nghiên cứu tích hợp giữa sinh trưởng – tích lũy PHB - khả năng thích nghi môi trường; thiếu dữ liệu đánh giá khả năng nuôi cấy vi khuẩn lam trong nước thải không tiệt trùng; cũng như hạn chế về các phương pháp đánh giá và thu hồi PHB phù hợp với điều kiện kỹ thuật trong nước. Do đó, luận án kỳ vọng góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu khoa học và đề xuất các giải pháp khả thi cho việc ứng dụng vi khuẩn lam trong xử lý nước thải kết hợp sản xuất nhựa sinh học tại Việt Nam.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, hoá chất và thiết bị nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

i) Vi khuẩn lam

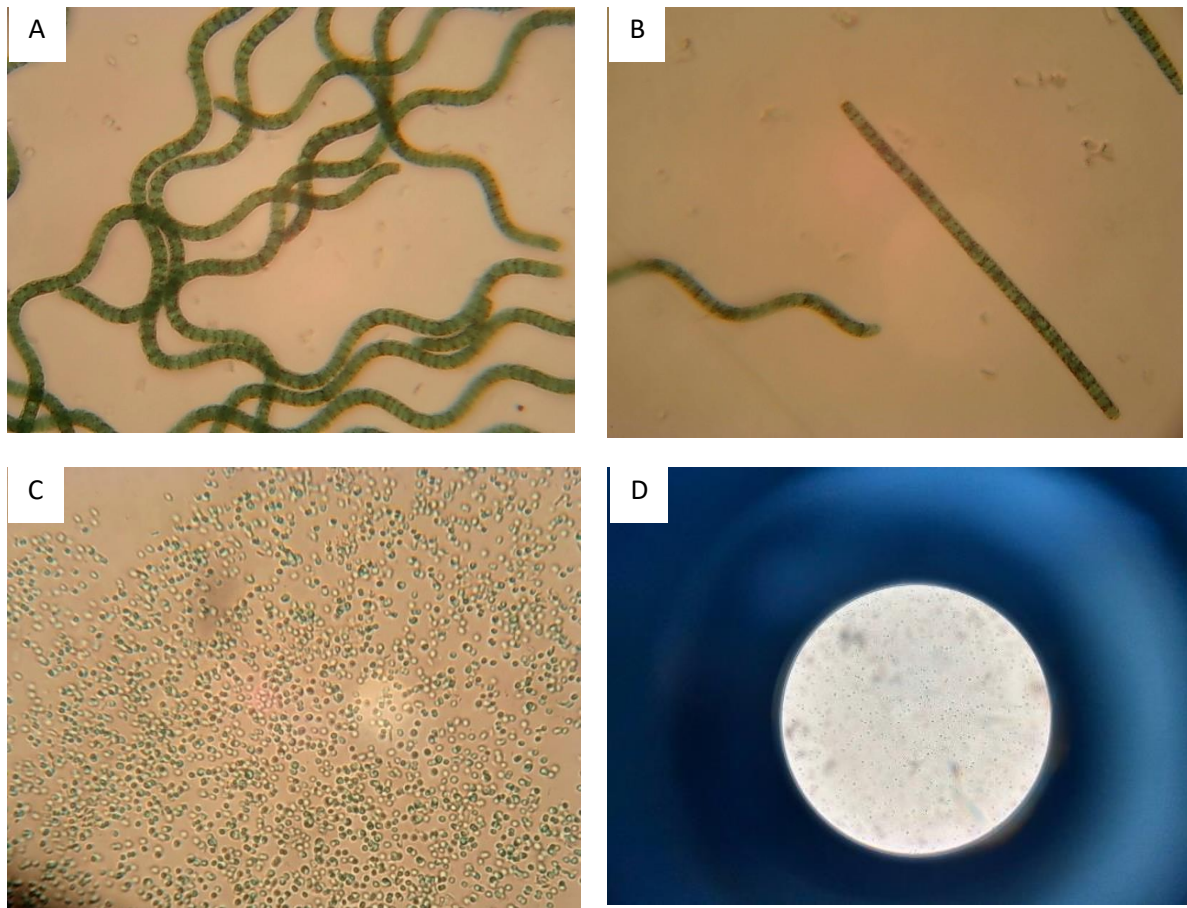
Trên cơ sở tổng quan các nghiên cứu trong và ngoài nước về ứng dụng vi khuẩn lam trong xử lý nước thải và tích lũy polymer sinh học, đồng thời xuất phát từ mục tiêu xây dựng mô hình tích hợp xử lý nước thải sinh hoạt và thu hồi sinh khối có giá trị, luận án lựa chọn ba chủng vi khuẩn lam gồm *S. salina* M8, *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 làm đối tượng nghiên cứu.

- Vi khuẩn lam *S. salina* M8 (mã truy cập PV368867) là chủng mới, được phân lập từ môi trường nước nông nghiệp ở Việt Nam và lấy từ bộ sưu tập giống được lưu giữ và nuôi cấy tại Phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hoá học, Viện Hàn Lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam (số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội). Chủng này được lựa chọn nhằm đại diện cho nhóm vi khuẩn lam đơn bào có khả năng thích nghi với điều kiện môi trường biến động, phù hợp cho các nghiên cứu đánh giá sinh trưởng, xử lý dinh dưỡng và tích lũy polymer sinh học trong hệ thống nước thải.

- Vi khuẩn lam *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 là các chủng vi khuẩn lam dạng sợi, được lưu giữ tại Phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hoá học, Viện Hàn Lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam (số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội). Các chủng này được lựa chọn nhằm đại diện cho nhóm vi khuẩn lam dạng sợi ưa kiềm, có khả năng tạo sinh khối nhanh và thuận lợi cho quá trình thu hồi sinh khối trong các hệ thống xử lý nước thải.

Việc lựa chọn đồng thời các chủng vi khuẩn lam đơn bào (*S. salina* M8) và dạng sợi (*Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4) cho phép đánh giá một cách hệ thống ảnh hưởng của đặc điểm hình thái – sinh lý đến khả năng sinh trưởng, xử lý nitrogen và phosphorus, cũng như tiềm năng tích lũy PHB trong điều kiện nước thải sinh hoạt. Sự khác biệt về đặc tính sinh học giữa các chủng là cơ sở khoa học cho việc so sánh, lựa chọn chủng vi khuẩn lam phù hợp và đề xuất định hướng ứng dụng trong mô hình tích hợp xử lý nước thải và thu hồi sản phẩm sinh học theo hướng phát triển bền vững.

Hình thái của các chủng vi khuẩn lam được sử dụng làm nghiên cứu thực nghiệm được thể hiện dưới **Hình 2.1**.



Hình 2.1. Hình thái của vi khuẩn lam: *Spirulina sp.2* (A), *Spirulina sp.4* (B) và *S. salina* M8 (C-D)

ii) Nước thải sinh hoạt

Nước thải sinh hoạt được thu thập tại cống thoát nước thải của khu dân cư thuộc ngõ 66 phố Triều Khúc, phường Thanh Xuân Nam, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội vào ngày 25/12/2023 (nay là phường Thanh Liệt, thành phố Hà Nội), trong điều kiện nhiệt độ môi trường 23°C và độ ẩm không khí 72,5%. Vị trí lấy mẫu được xác định bằng hệ tọa độ phẳng với tọa độ X = 2.321.500 và Y = 594.624.

2.1.2. Hoá chất

- Môi trường chuẩn BG-11 để nuôi vi khuẩn lam *S. salina* M8. Thành phần hoá học trong 1 lít môi trường chuẩn BG-11 bao gồm: NaNO₃ (1,5 g/L); K₂HPO₄ (0,04 g/L); Citric acid (0,006 g/L); MgSO₄·7H₂O (0,075 g/L); CaCl₂·2H₂O (0,036 g/L); Ferric ammonium citrate (0,006 g/L); EDTA (0,001 g/L); Hỗn hợp vi lượng - kim loại (mix A5): H₃BO₃: 2,86g/L; MnCl₂·4H₂O: 1,81 g/L; ZnSO₄·7H₂O: 0,222g/L; Na₂MO₄·2H₂O: 0,39g/L; CuSO₄·5H₂O: 0,079g/L; Co(NO₃)₂·6H₂O: 0,049 g/L. Môi trường BG-11 có tỷ lệ N/P = 35:1.

- Môi trường chuẩn Zarrouk để nuôi vi khuẩn lam *Spirulina sp.2*, *Spirulina sp.4*. Thành phần hoá học trong 1 lít môi trường chuẩn Zarrouk bao gồm: NaHCO₃ 16,80 g; K₂HPO₄ 0,50 g; NaNO₃ 2,50 g; K₂SO₄ 1,00 g; NaCl 1,00 g; MgSO₄·7H₂O 0,20 g; EDTA-Na₂·2H₂O 0,08 g; CaCl₂·2H₂O 0,04 g; và FeSO₄·2H₂O 0,01 g; Hỗn hợp vi lượng

- kim loại (mix A5): H_3BO_3 : 2,86g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1,81 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,222g/L; $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,39g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,079g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,049 g/L.

- Các hoá chất phân tích đặc tính của vật liệu nhựa sinh học PHB: Cloroform loại phân tích, natri hypoclorit, metanol và các chất chuẩn PHB được mua từ Merck KGaA (Darmstadt, Đức). Tất cả các thuốc thử loại phân tích còn lại được mua từ các nhà cung cấp được chứng nhận và sử dụng nguyên trạng, độ tinh khiết 95%. Điều này đảm bảo tính nhất quán của thuốc thử và giảm thiểu sự biến đổi trong quy trình chiết xuất, tinh chế và phân tích PHB (*Chi tiết danh mục các hoá chất cần thiết trong thực nghiệm được trình bày trong Bảng 1.1, Phụ lục 1*).

2.1.3. Thiết bị thí nghiệm

- Máy máy quang phổ UV/Vis (U-2900/2910, Shimadzu, Tokyo, Nhật Bản): dùng để xác định sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn lam.

- Máy sắc ký khí Agilent 8890 GC (Agilent Technologies, Santa Clara, Mỹ), trang bị cột mao quản HP-5 và đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID), dùng để định lượng hàm lượng PHB.

- Máy cộng hưởng từ hạt nhân NMR 600 MHz (Avance NEO 600 MHz, Bruker, Massachusetts, Mỹ), dùng để phân tích phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR nhằm xác định cấu trúc hóa học của PHB.

- Thiết bị sắc ký thẩm thấu gel GPC (Viscotek TDA302), dùng để xác định khối lượng phân tử trung bình số (Mn), khối lượng phân tử trung bình khối (Mw) và chỉ số phân bố khối lượng (Mw/Mn) của PHB.

- Máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FT-IR (Spectrum Two FT-IR Spectrometer, PerkinElmer, Anh), dùng để phân tích các nhóm chức đặc trưng của PHB

- Thiết bị phân tích nhiệt trọng lượng TGA (Labsys TGA1600, SETARAM, Pháp), dùng để đánh giá đặc tính và độ ổn định nhiệt của PHB.

- Máy ly tâm lạnh (Model Z206A, Hermle Đức) dùng để thu hồi sinh khối vi khuẩn lam.

- Tủ ẩm, chiếu sáng và hệ thống nuôi cấy quang sinh, dùng cho nuôi cấy và đánh giá sinh trưởng vi khuẩn lam.

- Máy siêu âm (Ultrasonic Cleaner, Anh): dùng để hỗ trợ phá vỡ tế bào vi khuẩn lam, chiết PHB

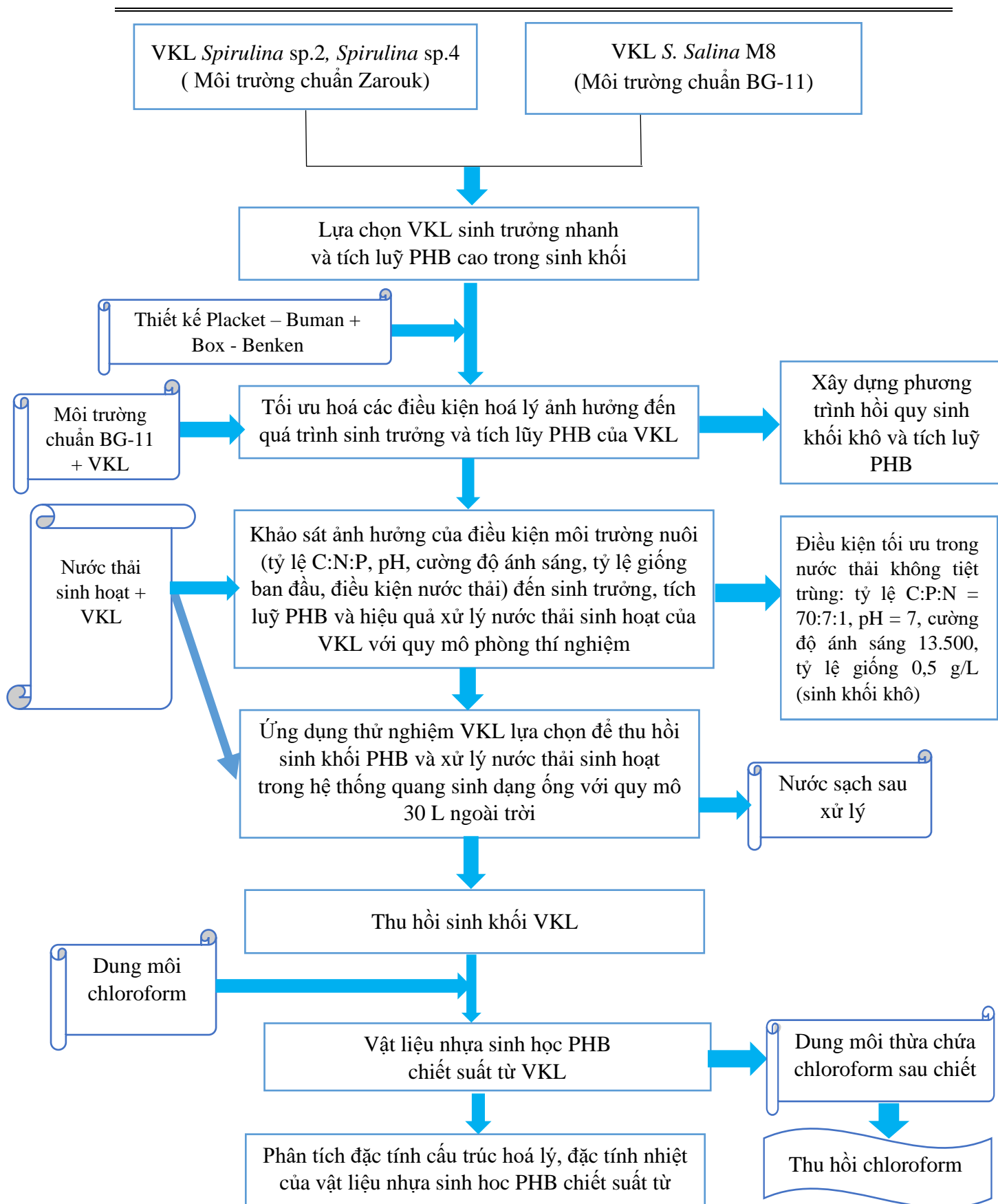
- Máy đo pH, máy đo nhiệt độ, máy đo cường độ ánh sáng và hệ thống sục khí (Hàn Quốc) dùng để kiểm soát các điều kiện nuôi cấy.

(*Chi tiết danh mục các thiết bị trong thực nghiệm được trình bày trong Bảng 1.2, Phụ lục 1*).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm

Sơ đồ tóm tắt nghiên cứu thực nghiệm được mô tả chi tiết các bước tại **Hình 2.2**



Hình 2.2. Sơ đồ trình tự nghiên cứu thu hồi sinh khối, sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB kết hợp xử lý nước thải sinh hoạt bằng *S. salina* M8

2.2.1.1. Phương pháp nhân giống vi khuẩn lam

- Giống cấp 1: Vi khuẩn lam *S. salina* M8 được bảo quản trên môi trường thạch, *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 nuôi lưu giữ trong môi trường Zarrouk, sau đó được cấy chuyển vào 20 mL môi trường chuẩn thích hợp (BG-11 cho *S. salina* M8 và Zarrouk cho *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4). Các chủng được nuôi trong bình tam giác 100 mL, đặt trên máy lắc ở tốc độ 150 vòng/phút, chiếu sáng liên tục 4500 lux trong 7 ngày để tạo giống phát triển đạt nồng độ sinh khối $\geq 1,0$ g/L.

- Giống cấp 2: Các chủng *S. salina* M8, *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 từ giống cấp 1 được tiếp tục cấy chuyển sang các bình tam giác 250 mL, với thể tích làm việc 100 mL trong các môi trường nuôi tương ứng (BG-11 cho *S. salina* M8 và Zarrouk cho *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4) (tỷ lệ tạo giống 20% (v/v), tương đương sinh khối khô 0,2 g/L). Điều kiện nuôi duy trì ở nhiệt độ 25–27°C, nguồn sáng từ đèn huỳnh quang với cường độ 4.500 Lux, chu kỳ chiếu sáng 24 giờ, trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, nuôi dưới điều kiện sục khí/CO₂ (0,1 vvm). Thời gian nuôi duy trì giống từ 6–8 ngày, cho đến khi mật độ tế bào đạt $\geq 2,5 \times 10^5$ TB/mL (tương đương OD₇₅₀ = 2,5 Abs tương đương sinh khối khô 1,0 g/L). Khi sinh khối đạt đến ngưỡng này, mẫu được sử dụng để chuyển sang giai đoạn nhân giống ở quy mô lớn hơn, phục vụ cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.

2.2.1.2. Sàng lọc vi khuẩn lam tăng trưởng nhanh và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối

Các chủng vi khuẩn lam *S. salina* M8, *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 được nhân nuôi theo quy trình mô tả tại **Mục 2.2.1.1**. Sinh khối giống sau khi thu hoạch được ly tâm trong ống Falcon 50 mL trong điều kiện vô trùng, sau đó cấy vào chai Duran 1000 mL chứa môi trường BG-11 hoặc Zarrouk đã được tiệt trùng và điều chỉnh pH, dinh dưỡng. Nồng độ giống ban đầu được thiết lập ở mức 0,2 g/L. Quá trình nuôi cấy được thực hiện dưới điều kiện sục khí bổ sung CO₂ với lưu lượng 0,1 vvm và cường độ chiếu sáng 4.500 lux. Bình phản ứng được trang bị ba đầu ống inox 304 (Φ6 mm) để sục khí, lấy mẫu và thoát khí. Đường sục khí được nối với ống silicon, kết nối qua đồng hồ đo lưu lượng đến máy sục khí Fujimac nhằm đảm bảo lưu lượng khí ổn định trong suốt quá trình nuôi. Sau thời gian nuôi từ 6–8 ngày, khi nồng độ sinh khối đạt trên 1,0 g/L, sinh khối được cấy chuyển sang bình thủy tinh 5000 mL chứa nước thải sinh hoạt đã tiệt trùng, với tỷ lệ giống/nước thải là 20% (v/v), tương ứng với nồng độ sinh khối ban đầu khoảng 0,2 g/L. Khi sinh khối tiếp tục đạt trên 1,0 g/L, dịch nuôi được sử dụng để cấy sang hệ thống nuôi quy mô 1000 mL nhằm đánh giá động học sinh trưởng, khả năng tổng hợp sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy của các chủng vi khuẩn lam.

Quá trình sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối của *S. salina* M8, *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 được so sánh và đánh giá, làm cơ sở lựa chọn chủng vi khuẩn lam có tốc độ sinh trưởng nhanh và khả năng tích lũy PHB cao cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.1.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy bởi vi khuẩn lam trong môi trường quang dưỡng

Việc lựa chọn các yếu tố hóa – lý và khoảng khảo sát tương ứng để nghiên cứu sự sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của vi khuẩn lam được xây dựng trên cơ sở kết hợp giữa đặc điểm sinh lý quang dưỡng của vi khuẩn lam, kết quả tiền thí nghiệm và điều kiện thực tiễn của quá trình nuôi cấy chủng *S. salina* M8 [121]. Các yếu tố được lựa chọn bao gồm cường độ ánh sáng, nồng độ CO₂, pH ban đầu, nhiệt độ, tốc độ sục khí, nồng độ nitrogen, nồng độ phosphorus và thời gian nuôi cấy. Đây là những biến có ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình quang hợp, trao đổi chất, sinh trưởng sinh khối cũng như cơ chế tích lũy PHB của vi khuẩn lam, đồng thời đại diện cho các nhóm tác nhân môi trường chính trong hệ nuôi cấy quang sinh.

Khoảng khảo sát của các yếu tố được xác định trên cơ sở kết quả nghiên cứu trước đó của nhóm nghiên cứu tại Phòng Vật liệu tiên tiến, Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, kết hợp với tài liệu tham khảo và kết quả khảo sát ban đầu, nhằm đảm bảo vi khuẩn lam sinh trưởng ổn định đồng thời có thể xuất hiện các đáp ứng sinh lý liên quan đến tích lũy PHB, nhưng không gây ức chế sinh trưởng hoặc mất ổn định hệ nuôi. Cụ thể, các khoảng khảo sát bao gồm: cường độ ánh sáng (4.500 - 13.500 lux), pH ban đầu (5 – 9), nhiệt độ nuôi cấy (25 - 35°C), nồng độ CO₂ (1-5%), tốc độ sục khí (0,5 - 1,5 vvm), nồng độ natri nitrate (1 - 2 g/L), nồng độ phosphate (20 - 60 mg/L) và thời gian nuôi cấy (5 - 15 ngày). Tuy nhiên, việc khảo sát riêng rẽ từng yếu tố không chỉ đòi hỏi nhiều thời gian, công sức và chi phí, mà còn khó phản ánh đầy đủ các tương tác phức hợp giữa các biến môi trường đối với sinh trưởng sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy. Do đó, nghiên cứu đã sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett–Burman nhằm đánh giá đồng thời ảnh hưởng của 08 yếu tố nêu trên và sàng lọc các biến có tác động đáng kể nhất đến quá trình nuôi cấy.

Trong thiết kế Plackett–Burman, 08 yếu tố được ký hiệu lần lượt là A–H, với các mức thí nghiệm được mã hóa ở các giá trị -1, 0 và +1 (**Bảng 2.1**). Ma trận thí nghiệm gồm 17 thí nghiệm, bao gồm 12 tổ hợp mức cao và thấp của các yếu tố, cùng với 5 thí nghiệm lặp tại điểm trung tâm nhằm đánh giá độ lặp và độ tin cậy của mô hình. Hai biến đáp ứng được theo dõi là nồng độ sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$, g/L) và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối (Y_{PHB} , %). Kết quả thu được từ thiết kế này cung cấp cơ sở định lượng để xác định các yếu tố có mức độ ảnh hưởng lớn, làm tiền đề cho giai đoạn tối ưu hóa tiếp theo bằng các mô hình đáp ứng bề mặt [116-120]. Sơ đồ bố trí các thí nghiệm được thể hiện trong **Bảng 2.2**.

Bảng 2.1. Các yếu tố và mức mã hóa theo khoảng khảo sát của biến số trong thiết kế Plackett-Burman

STT	Yếu tố	Kí hiệu biến	Đơn vị	Mức độ/Giá trị thật		
				-1	0	1
1	Cường độ ánh sáng	A	Lux	4.500	9.000	13.500
2	pH ban đầu	B	-	5	7	9
3	Nhiệt độ	C	°C	25	30	35
4	Nồng độ CO ₂	D	%	1	3	5
5	Tốc độ sục khí	E	vvm	0,5	1,0	1,5
6	Nồng độ NaNO ₃	F	g/L	1	1,5	2
7	Nồng độ K ₂ HPO ₄	G	g/L	0,02	0,04	0,06
8	Thời gian nuôi	H	ngày	5	10	15

Bảng 2.2. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Plackett-Burman nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi *S. salina* M8

STT	Mức của biến							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
6	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1

10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
13	1	1	1	-1	1	1	-1	1
14	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
15	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2.1.4. Tối ưu hóa tăng trưởng sinh khối và hàm lượng PHB sản xuất bởi *S. salina* M8

Từ kết quả khảo sát 08 yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng sinh khối và khả năng tích lũy PHB của *S. salina* M8, nghiên cứu xác định 03 yếu tố có tác động lớn nhất gồm cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ, và lựa chọn các yếu tố này để tối ưu hóa. Quá trình tối ưu được thực hiện bằng phương pháp thiết kế thực nghiệm Box–Behnken nhằm xác định điều kiện tối ưu cho ba biến độc lập: cường độ ánh sáng, pH, nhiệt độ trong khoảng khảo sát tương ứng từ 4.500 – 13.500 lux; 5 – 9; 25 – 35°C với ký hiệu biến tương ứng là A, B, C (**Bảng 2.3**). Các mức thí nghiệm được mã hóa ở ba giá trị -1, 0 và +1. Thiết kế Box–Behnken với 03 yếu tố và 03 mức độ gồm 15 thí nghiệm, trong đó điểm trung tâm được lặp lại ba lần để ước tính sai số thực nghiệm [116-120]. Kết quả nghiên cứu là hai biến độc lập sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$, g/L) và hàm lượng PHB (Y_{PHB} , %) (**Bảng 2.4**).

(Chi tiết sơ đồ thí nghiệm được trình bày trong mục 4, Phụ lục 1)

Bảng 2.3. Các yếu tố và mức mã hóa theo khoảng khảo sát của biến số trong thiết kế Box–Behnken

STT	Yếu tố	Kí hiệu biến	Đơn vị	Mức độ/Giá trị thật		
				-1	0	1
1	Cường độ ánh sáng	A	Lux	4.500	9.000	13.500
2	pH ban đầu	B	-	5	7	9
3	Nhiệt độ	C	°C	25	30	35

Bảng 2.4. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Box–Behnken nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi *S. salina* M8

STT	Mức của biến/Giá trị thật		
	A	B	C
1	4500 (-1)	7 (0)	25 (-1)
2	13500 (1)	5 (-1)	30 (0)
3	13500 (1)	7 (0)	35 (1)
4	9000 (0)	7 (0)	30 (0)
5	9000 (0)	7 (0)	30 (0)
6	13500 (1)	9 (1)	30 (0)
7	9000 (0)	9 (1)	25 (-1)
8	4500 (-1)	9 (1)	30 (0)
9	9000 (0)	9 (1)	35 (1)
10	4500 (-1)	5 (-1)	30 (0)
11	9000 (0)	7 (0)	30 (0)
12	13500 (1)	7 (0)	25 (-1)
13	4500 (-1)	7 (0)	35 (1)
14	9000 (0)	5 (-1)	35 (1)
15	9000 (0)	5 (-1)	25 (-1)

Sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$, g/L) và hàm lượng PHB (Y_{PHB} , %) được xác định bằng phương trình đa thức bậc hai (2.1) [165].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2.1)$$

Trong đó: Y là năng suất sinh khối (g/L) hoặc hàm lượng PHB (%); β là các hệ số của phương trình, và X_i và X_j lần lượt là biến mã hóa của các tham số i và j (A hoặc B hoặc C); k là số lượng các yếu tố nghiên cứu; và ε là sai số thực nghiệm ngẫu nhiên. Phân tích bề mặt đáp ứng được thực hiện bằng cách sử dụng Minitab 18 (Minitab, LLC, Pennsylvania, Mỹ) để xác định mối tương quan thông qua hồi quy phi tuyến tính. Tầm quan trọng của mỗi biến được xác định bằng phép so sánh *t*-Student.

2.2.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi đến khả năng sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam giống được nhân nuôi giống như mô tả trong **Mục 2.2.1.1**. Sau đó mẫu vi khuẩn lam giống được cấy vào trong chai Duran 1000 mL chứa môi trường nước thải (đã tiệt trùng), điều chỉnh pH, tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P, tỷ lệ giống/nước thải là 20% (v/v) (sinh khối khô 0,2 g/L), nuôi dưới điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm và cường độ chiếu sáng 4.500 lux. 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. Quá trình nuôi được thực hiện trong 6-8 ngày tiếp theo đến khi sinh khối đạt trên 1 g/L, thì cấy sang bình 5 L với tỷ lệ giống/nước thải tiệt trùng là 20% (v/v) (sinh khối khô 0,2 g/L). Khi giống đạt nồng độ trên 2,5 g/L thì sử dụng để cấy sang hệ thống nuôi 1000 mL để khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện môi trường bao gồm: tỷ lệ C:N:P, pH, cường độ ánh sáng, tỷ lệ giống ban đầu, môi trường nuôi (nước thải tiệt trùng/nước thải không tiệt trùng) đến tốc độ tăng trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt bằng vi khuẩn lam với các chỉ tiêu phân tích chất lượng nước thải sau xử lý bao gồm: COD, N - NH₄⁺, T - N, T - P, P - PO₄³⁻.

a. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ carbon/nitrogen/phosphorus (tỷ lệ C:N:P)

Việc điều chỉnh tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P được xem là yếu tố then chốt trong nuôi cấy vi khuẩn lam nhằm tối ưu đồng thời sinh trưởng sinh khối và hiệu quả xử lý nước thải. Trong nghiên cứu này, thành phần nước thải sinh hoạt được phân tích và điều chỉnh bằng acid axetic để thực nghiệm các tỷ lệ C:N:P = 100:7:1, 80:7:1, 70:7:1, 60:7:1, 50:7:1, và 47:7:1 là mẫu đối chứng 1 (nước thải tiệt trùng); nước thải điều chỉnh carbon bằng acid axetic và nitrogen bằng NaNO₃ ở các tỷ lệ 70:10:1, 70:15:1, 70:20:1, 70:30:1, 70:35:1, 70:40:1, và N/P = 35:1 là mẫu đối chứng 2 (môi trường chuẩn BG-11). Thí nghiệm tiến hành trong các bình Duran 1 L, các điều kiện thí nghiệm như sau: pH = 7, cường độ chiếu sáng 4.500 Lux, chu kỳ sáng là 24h, tỷ lệ giống/nước thải 50% (v/v) (tương ứng sinh khối khô 0,5 g/L), nhiệt độ 27°C, điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm kết hợp khuấy từ ở tốc độ 150 vòng/phút. Quá trình theo dõi trong 8 ngày, nhằm đánh giá sự phát triển sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt của chủng vi khuẩn lam lựa chọn.

b. Khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu

Thí nghiệm trong các bình Duran 1L tại các khoảng giá trị pH từ (5, 6, 7, 8, 9), với tỷ lệ giống/nước thải 50% (v/v) (sinh khối khô 0,5 g/L). Các điều kiện thí nghiệm: tỷ lệ C:N:P tối ưu, nhiệt độ 27°C, điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂,

v/v) với lưu lượng 0,1 vvm và khuấy từ (150 vòng/phút), cường độ chiếu sáng 4.500 lux, chu kỳ sáng là 24h. Sự sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt của vi khuẩn lam được theo dõi trong 8 ngày.

c. Khảo sát ảnh hưởng của cường độ ánh sáng

Cường độ ánh sáng từ 4.500, 9.000, 13.500, 19.600, và 25.000 lux được xem là phù hợp để kích thích sinh trưởng của vi khuẩn lam. Các điều kiện thí nghiệm: pH và tỷ lệ C:N:P tối ưu, tỷ lệ giống/nước thải 50% (v/v) (sinh khối khô 0,5 g/L), nhiệt độ 27°C, điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm và khuấy từ (150 vòng/phút), chu kỳ sáng là 24h. Sự sinh trưởng, tích lũy PHB trong sinh khối vi khuẩn lam và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt được theo dõi trong 8 ngày.

d. Khảo sát ảnh hưởng của nước thải tiệt trùng và nước thải không tiệt trùng

Vi khuẩn lam được lựa chọn tiến hành nuôi trong môi trường nước thải tiệt trùng bằng tia UV và nước thải thô để thí nghiệm đối chứng và đánh giá khả năng thích nghi, sinh trưởng của vi khuẩn lam. Các thí nghiệm được thực hiện trong thời gian 7-8 ngày với điều kiện: sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm và khuấy từ (150 vòng/phút), nhiệt độ 27°C, cường độ chiếu sáng 4.500 lux, chu kỳ sáng là 24h, pH và tỷ lệ C:N:P tối ưu, tỷ lệ giống 50% (v/v) (sinh khối khô 0,5 g/L).

e. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ giống vi khuẩn lam ban đầu

Tỷ lệ giống vi khuẩn lam ban đầu ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ tăng trưởng và khả năng cạnh tranh của vi khuẩn lam trong môi trường nước thải. Tỷ lệ giống/nước thải (v/v) được nghiên cứu tại các thí nghiệm tương ứng: 5, 10, 20, 30, 40, và 50% (v/v) tương đương sinh khối khô ban đầu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; và 0,5 g/L. Thời gian nuôi cấy 7-8 ngày với điều kiện nhiệt độ 27°C, sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm và khuấy từ (150 vòng/phút), cường độ chiếu sáng 4.500 lux, chu kỳ sáng là 24h, pH và tỷ lệ C:N:P tối ưu.

2.2.1.6. Sản xuất sinh khối và tích lũy PHB của vi khuẩn lam trong nước thải sinh hoạt với hệ thống quang sinh dạng ống quy mô 30 L

Vi khuẩn lam giống được nhân nuôi giống như mô tả trong **Mục 2.2.1.1**. Sau đó mẫu vi khuẩn lam giống được cấy vào trong chai Duran 1000 mL chứa nước thải sinh hoạt (đã được điều chỉnh pH và chất dinh dưỡng) và được tiệt trùng ở tỷ lệ giống 20% (v/v) (sinh khối khô 0,2 g/L), nuôi dưới điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm, điều kiện ánh sáng là 13.500 lux. 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. Quá trình nuôi được thực hiện trong 6-8 ngày tiếp theo đến khi sinh khối đạt trên 1 g/L, thì cấy sang bình 5 L với tỷ lệ giống/nước thải tiệt trùng là 20% (v/v) (sinh

khối khô 0,2 g/L). Khi giống đạt nồng độ trên 2,5 g/L thì sử dụng để cấy sang hệ thống nuôi 30 L với tỷ lệ giống/nước thải thô là 50% (v/v) (sinh khối khô 0,5 g/L), điều chỉnh tỷ lệ C:N:P và pH tối ưu, nuôi dưới điều kiện sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm. Đánh giá hiệu quả nuôi cấy qua theo dõi tốc độ tăng trưởng, sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối của vi khuẩn lam, hiệu quả xử lý nước thải trong suốt quá trình nuôi cấy bằng hệ thống quang sinh 30L [2, 123-125].

- Hệ thống quang sinh là ống nhựa trong suốt acrylic 30 L: Thiết bị chính gồm ống acrylic trong suốt với kích thước: 50 cm × 30 cm × 0,5 cm. Moto Panasonic (40W) tạo ra tốc độ quay cho cánh khuấy 100-200 vòng/phút và một cánh khuấy (SUS304) để trộn môi trường nuôi cấy [2, 123-125]. Toàn bộ hệ thống được khử trùng trước khi cấy bằng dung dịch Korsorex 2% và ethanol 70%. Khung đỡ inox 304 (40x40), đèn LED (để cấp ánh sáng khi cần). Thiết bị quang được trang bị một ống inox (304) φ4 sục khí và ống silicon φ6 để lấy mẫu và thoát khí. Đầu ống inox φ4 nối với téc CO₂/máy thổi khí qua ống silicon φ6 và các đầu lọc khí.

(Chi tiết bố trí các nội dung thí nghiệm được trình bày trong Mục 3-6, Phụ lục 1).

2.2.2. Phương pháp phân tích

2.2.2.1. Phân tích đặc tính nước thải và đánh giá hiệu quả xử lý

a. Phương pháp lấy mẫu và tiền xử lý

Nước thải sinh hoạt được thu thập tại cống thoát nước khu vực dân cư quận Thanh Xuân, Hà Nội (nay là phường Thanh Liệt, Hà Nội). 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. Mẫu được chứa trong can nhựa 20 L và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm (phòng Vật liệu tiến tiến, Viện Hóa học và phòng Phân tích độc chất, Viện Công nghệ năng lượng và Môi trường).

Trước khi sử dụng cho nuôi cấy vi khuẩn lam, nước thải được tiền xử lý nhằm loại bỏ tạp chất và điều chỉnh thành phần dinh dưỡng. Quá trình tiền xử lý mẫu bao gồm các bước sau:

- Lắng và tách cặn: Nước thải sau khi được vận chuyển về phòng thí nghiệm được để lắng tĩnh 30 phút giúp loại bỏ chất rắn và các chất hữu cơ có kích thước lớn có thể ảnh hưởng đến quá trình quang hợp của vi khuẩn lam.

- Lọc sơ cấp: Loại bỏ các hạt rắn lơ lửng bằng cách sử dụng vải lọc PTFE 10 μm.

- Điều chỉnh pH và nồng độ dinh dưỡng: Điều chỉnh pH về khoảng 7–9 (khoảng tối ưu cho vi khuẩn lam) bằng NaOH 5M/H₂SO₄ 5M. Để tối ưu hóa tỷ lệ C:N:P, thành

phần nước thải được phân tích và điều chỉnh bằng axit axetic và nitrat để đạt được tỷ lệ mong muốn, đặc biệt là tỷ lệ C:N:P = 70:7:1 phù hợp cho sự phát triển của vi khuẩn lam.

- Tiệt trùng mẫu: Sử dụng phương pháp tiệt trùng bằng UV để loại bỏ hoàn toàn vi sinh vật không mong muốn trong nước thải, tránh cạnh tranh sinh trưởng với vi khuẩn lam và có vai trò đảm bảo độ tinh khiết của sản phẩm cuối và ngăn ngừa sự phân hủy của PHB.

Việc thực hiện đúng phương pháp lấy mẫu, bảo quản và tiền xử lý mẫu sẽ giúp đảm bảo điều kiện tối ưu cho quá trình nuôi cấy vi khuẩn lam trong nước thải sinh hoạt, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho sự tích lũy PHA/PHB.

b. Phương pháp phân tích đặc tính của nước thải

- Phương pháp đo nhanh: Các thông số được đo nhanh tại hiện trường là pH và nhiệt độ.

+ pH môi trường được đo bằng máy đo pH cầm tay 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.

- Phương pháp phân tích trong phòng thí nghiệm: Các thông số được phân tích tại phòng thí nghiệm gồm: COD, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, tổng nitrogen, P- PO₄³⁻, tổng phosphorus.

+ TCVN 6202:2008 – Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định tổng Phosphorus và Phosphate, phương pháp đo phổ dùng ammonium moliphat;

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

+ TCVN 6179-1:1996 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định ammonium, phương pháp đo phổ.

+ TCVN 6491:1999 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định nhu cầu oxygen hoá học, phương pháp dicromat.

+ TCVN 9319:2012 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định tổng nitrogen sau khi phân hủy bằng UV - Phương pháp sử dụng phân tích dòng chảy (CFA và FIA) và phát hiện phổ.

(Chi tiết phương pháp phân tích các chỉ tiêu chất lượng nước thải được trình bày trong Mục 7, Phụ lục 1)

Đặc tính nước thải đầu vào là cơ sở quan trọng để lựa chọn điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lam và thiết kế các thí nghiệm. Các chỉ tiêu này phản ánh cả đặc tính dinh dưỡng (N, P) và tải lượng hữu cơ (COD, BOD₅), là cơ sở để đánh giá hiệu quả của quá trình xử lý.

c. Hiệu suất xử lý nước thải.

Hiệu suất xử lý được tính theo công thức sau (2.2):

$$E_i(\%) = \frac{C_{i-in} - C_{i-out}}{C_{i-in}} \times 100 \quad (2.2)$$

Trong đó: C_{i-in} và C_{i-out} là biểu thị nồng độ BOD₅, COD, N- NH₄⁺, N- NO₃⁻, T- N, P- PO₄³⁻ và T- P (mg/L) đầu vào và đầu ra của thí nghiệm; E_i là hiệu suất xử lý chất ô nhiễm (%).

2.2.2.2. Phương pháp đánh giá tăng trưởng của vi khuẩn lam và thu hoạch sinh khối

a. Phương pháp đánh giá tăng trưởng của vi khuẩn lam

Sự phát triển của vi khuẩn lam được theo dõi hàng ngày bằng cách đo mật độ quang học ở bước sóng 750 nm (OD₇₅₀) bằng máy đo phổ. Các giá trị OD₇₅₀ đo được chuyển đổi thành nồng độ sinh khối khô (X, g/L) bằng phương trình hiệu chuẩn tuyến tính (2.3):

$$X = 0,45 \times OD_{750} + 0,00021 \quad (R^2 = 0,9995) \quad (2.3)$$

Tốc độ tăng trưởng (μ , ngày⁻¹) của vi khuẩn lam được xác định bằng công thức sau (2.4).

$$\mu = \frac{\ln \frac{X_2}{X_1}}{t_2 - t_1} \quad (2.4)$$

Trong đó X_1 và X_2 là nồng độ sinh khối vi khuẩn lam (g/L) được đo tại thời gian nuôi t_1 và t_2 (d).

Năng suất sinh khối vi khuẩn lam được xác định theo công thức sau (2.5).

$$P = \frac{X}{t} \quad (2.5)$$

Trong đó: P là năng suất sinh khối vi khuẩn lam (g/L/ngày); X là nồng độ sinh khối vi khuẩn lam (g/L) và t là thời gian nuôi (d).

b. Phương pháp thu hoạch sinh khối vi khuẩn lam

Vi khuẩn lam được thu hoạch bằng phương pháp keo tụ với chitosan ở nồng độ 50 mg/L, pH 6,0 và lắng tự nhiên, sau đó ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 5 phút và thu được sinh khối vi khuẩn lam dưới dạng sệt. Sinh khối sau thu hoạch được trải đều trên giấy thực phẩm và cố định trên khay inox 304 để sấy ở 40°C đến khối lượng không đổi. Sinh khối khô được nghiền bằng máy nghiền mini hoặc là cối nghiền để tạo ra bột *S. salina* M8. Bột sinh khối được đóng gói và bảo quản dưới 4°C để phục vụ công việc chiết PHB. (Chi tiết quy trình thu hoạch sinh khối của vi khuẩn lam được trình bày trong Hình 1.11, Mục 8 – Phụ lục 1).

2.2.2.3. Phương pháp chiết xuất, định lượng và đặc tính của PHB

a. Phương pháp chiết và tinh sạch PHB

- **Bước 1:** Xử lý sơ bộ sinh khối, cân 2 – 5 g sinh khối *S. salina* M8 sau đó trộn đều với dung dịch NaOCl 5% tương ứng với nồng độ 50 g/L, hỗn hợp được lắc xoáy 10 phút, ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 25°C. Quá trình lặp lại cho đến khi sinh khối chuyển hẳn sang màu trắng sữa, đảm bảo loại bỏ được sắc tố diệp lục (chlorophyll) và tạp chất hữu cơ [2, 123-125].

- **Bước 2:** Chiết tách PHB, sinh khối sau khi loại bỏ sắc tố và tạp chất được trộn với chloroform theo tỷ lệ thể tích dung môi/sinh khối từ 6 – 14 mL/g, hỗn hợp được gia nhiệt 70 – 90°C trong 3 giờ, và thời gian chiết từ 50 – 70 phút. Số lần chiết được lặp lại 3 lần để tối đa hoá lượng PHB hoà tan vào dung môi. Pha chloroform thu được và kết tủa với methanol lạnh theo tỷ lệ thể tích methanol/chloroform là 2:1. Hỗn hợp được ủ lạnh ở 4°C trong 1-2 giờ, sau đó ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 10 phút để thu kết tủa PHB [122].

- **Bước 3:** Tinh sạch PHB, kết tủa thu được sau ly tâm tiếp tục được rửa và lọc, sau đó sấy giảm áp đến khối lượng không đổi. Quá trình tinh sạch PHB được lặp lại bằng cách hoà tan PHB trong dung môi chloroform nóng và kết tủa với methanol lạnh vài lần để thu PHB tinh sạch [123]. Mẫu PHB tinh sạch được sấy khô, bảo quản trong lọ thủy tinh dưới 4°C để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

(Chi tiết quy trình chiết và tinh sạch PHB từ sinh khối của vi khuẩn lam được trình bày trong Hình 1.12, Mục 9 – Phụ lục 1).

b. Phương pháp định lượng PHB

Để định lượng PHB, mẫu PHB tinh sạch được cân và chuyển vào lọ thủy tinh 12 mL. Mỗi lọ chứa 2 mL chloroform và 2 mL metanol đã axit hóa (chứa 3% axit sunfuric theo thể tích và 0,25 mg/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 1 mL 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 5,7 mg/L để xác định hàm lượng PHB bằng sắc ký khí (GC-FID) [2, 123-125].

(Phương trình đường chuẩn PHB xây dựng trên máy GC-FID được trình bày tại Hình 1.12, mục 10 – Phụ lục 1).

Hàm lượng PHB (wt%) được xác định bằng cách chuẩn hóa khối lượng PHB thu được theo khối lượng khô tế bào ban đầu (cell dry weight, CDW), và được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ $w_{\text{PHB}}/w_{\text{CDW}}$ (%). Khối lượng PHB được định lượng thông qua việc xây dựng đường chuẩn giữa diện tích pic sắc ký và nồng độ PHB (mg/L), từ đó suy ra hàm lượng PHB trong mẫu phân tích [2, 123-125].

Hàm lượng PHB, hiệu suất chiết PHB được xác định tương ứng theo các phương trình (2.6), (2.7), và (2.8).

$$A_{\text{PHB}} = \frac{C_{\text{PHB}} \times V}{m} \quad (2.6)$$

$$P_{\text{PHB}} = \frac{A_{\text{PHB}} \times X}{t} = A_{\text{PHB}} \times P \quad (2.7)$$

$$H_{\text{PHB}} = \frac{A_{\text{PHB},t}}{A_{\text{PHB},\text{max}}} \times 100\% \quad (2.8)$$

Trong đó A_{PHB} là hàm lượng PHB tính theo sinh khối khô (mg/g, hoặc % trọng lượng sinh khối khô); C_{PHB} là nồng độ PHB trong dịch chiết vi khuẩn lam (mg/L); V là thể tích dịch chiết vi khuẩn lam chứa PHB (L); m là khối lượng khô của sinh khối vi khuẩn lam được sử dụng (g); P_{PHB} là năng suất PHB (g/L/ngày); X là nồng độ sinh khối (g/L) đo được tại thời gian nuôi t (d) và P là năng suất sinh khối vi khuẩn lam (g/L/ngày); H_{PHB} là hiệu suất chiết PHB (%); $A_{\text{PHB},t}$ là hàm lượng PHB chiết theo các điều kiện thí nghiệm khác nhau (% trọng lượng sinh khối khô) và $A_{\text{PHB},\text{max}}$ là hàm lượng PHB chiết được cực đại (% trọng lượng sinh khối khô).

c. Phương pháp nghiên cứu đặc tính của PHB

- Hình thái bề mặt và cấu trúc vi mô của PHB tinh chế được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) (model JSM-6510LV, JEOL Ltd., Nhật Bản), cho phép quan sát đặc điểm hình thái, độ đồng nhất và cấu trúc bề mặt của vật liệu polymer.

- Cấu trúc của PHB được phân tích bằng Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ trên máy NMR 600 MHz (Avance NEO 600MHz, Bruker, Massachusetts, Mỹ) trong dung môi CDCl_3 ở nhiệt độ phòng [2].

- Khối lượng phân tử PHB: Khối lượng phân tử trung bình số (M_n), khối lượng phân tử trung bình khối (M_w) và chỉ số phân bố khối lượng (M_w/M_n) được xác định bằng thiết bị sắc ký thẩm thấu gel (GPC, Viscotek TDA302). Pha động là THF với tốc độ bơm 1 mL/min [138, 139].

- Nhóm chức của PHB được phân tích bằng quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) (Spectrum Two FT-IR Spectrometer, Perkin Elmer, Anh) [2].

- Đặc tính nhiệt của PHB được phân tích bằng các máy phân tích nhiệt lượng (TGA) (Labsys TGA1600, SETARAM, Pháp) [140-142].

2.2.3. Phân tích xử lý số liệu

- Dữ liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và Minitab 18 (Minitab, LLC, Pennsylvania, Mỹ).

- Phân tích bề mặt đáp ứng (RSM) được thực hiện nhằm xác định mối quan hệ giữa các biến độc lập và phản ứng đầu ra thông qua mô hình hồi quy phi tuyến.

- Các thí nghiệm sàng lọc và tối ưu hóa theo thiết kế Plackett–Burman và Box–Behnken được thực hiện với một lần lặp cho mỗi nghiệm thức, do các phương pháp thiết kế thí nghiệm này dựa trên mô hình thống kê nhằm đánh giá đồng thời ảnh hưởng của nhiều yếu tố và xây dựng phương trình hồi quy dự đoán. Sau khi xác định được các yếu tố và điều kiện tối ưu, các thí nghiệm xác nhận được tiến hành với hai lần lặp độc lập nhằm kiểm chứng độ tin cậy của mô hình dự đoán. Các số liệu thu được được xử lý bằng phương pháp thống kê mô tả, biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (Mean \pm SD). Mô hình hồi quy được đánh giá thông qua hệ số xác định (R^2) và phân tích phương sai (ANOVA), trong đó sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

- Ý nghĩa thống kê của mô hình và các yếu tố ảnh hưởng được đánh giá thông qua phân tích phương sai (ANOVA). Trong đó, F-value phản ánh mức độ phù hợp và ý nghĩa của mô hình hoặc của từng yếu tố khảo sát; giá trị F càng lớn cho thấy ảnh hưởng của yếu tố đó càng có ý nghĩa thống kê. P-value biểu thị xác suất sai khác ngẫu nhiên; các yếu tố hoặc mô hình có p-value $< 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lựa chọn chủng vi khuẩn lam tăng trưởng nhanh và hàm lượng tích lũy PHB cao trong sinh khối

Nghiên cứu tiến hành khảo sát ba chủng vi khuẩn lam gồm *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 và *S. salina* M8 nhằm đánh giá đồng thời tiềm năng sinh trưởng và tích lũy hàm lượng PHB cao trong các môi trường chuẩn tương ứng. Kết quả cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các chủng về cả động học sinh trưởng và tiềm năng tích lũy polymer. Cụ thể, chủng *S. salina* M8 tăng trưởng tốt trong môi trường BG-11 và cho kết quả sinh khối khô đạt 1,99 g/L, cao hơn so với 1,59 g/L và 1,36 g/L đo được đối với chủng *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 trong môi trường Zarrouk sau cùng một thời gian nuôi cấy 8 ngày (**Hình 3.1-A**). Tốc độ tăng trưởng riêng cực đại của *S. salina* M8 đo được là 0,58 ngày⁻¹, cao hơn so với 0,37 và 0,52 ngày⁻¹ đo được tương ứng cho *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4. Chủng *S. salina* M8 cũng thể hiện khả năng tích lũy PHB đạt 11,2% cao tương đương gấp đôi so với *Spirulina* sp.2 và *Spirulina* sp.4 tích lũy được là 4,5 và 5,6% (**Hình 3.1-B**). Những kết quả này cho thấy chủng *S. salina* M8 là vượt trội hơn so với hai chủng *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 trong cả mục tiêu sản xuất sinh khối và tích lũy PHB.

Các kết quả khảo sát ban đầu giữa *S. salina* M8 và các chủng *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 đã được phân tích sâu hơn nhằm làm rõ ý nghĩa so sánh giữa các đối tượng nghiên cứu trong định hướng sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB. Kết quả cho thấy sự khác biệt rõ rệt về đặc điểm chuyển hóa và tiềm năng tích lũy PHB giữa hai nhóm vi khuẩn lam.

Cụ thể, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chủng *Spirulina* thường có khả năng tích lũy PHB hạn chế. Ví dụ, *Spirulina platensis* chỉ đạt khoảng 0,16% PHB theo sinh khối khô trong môi trường Zarrouk [166], trong khi một số chủng khác như *Spirulina* sp. *LEB-18* có thể tích lũy cao hơn nhưng vẫn dao động trong khoảng 8,14–30,1% tùy điều kiện nuôi cấy [77, 167]. Ngược lại, các chủng thuộc chi *Synechocystis* được ghi nhận có khả năng tích lũy PHB vượt trội, với các giá trị dao động rộng từ khoảng 10% đến trên 80% sinh khối khô (như *Synechocystis* PCC 6803, PCC 6714 hay CCALA192), phụ thuộc vào điều kiện dinh dưỡng và chiến lược vận hành.

Sự khác biệt này bắt nguồn từ đặc điểm sinh lý và điều hòa chuyển hóa của từng nhóm khác biệt này phản ánh đặc điểm sinh lý đặc trưng của từng nhóm. Các chủng *Spirulina* có xu hướng ưu tiên dòng carbon cho sinh trưởng và tổng hợp các hợp chất chức năng nội bào, do đó hạn chế khả năng chuyển hướng mạnh sang tích lũy polymer dự trữ. Trong khi đó, các chủng *Synechocystis* có khả năng điều hòa chuyển hóa linh

hoạt hơn, đặc biệt trong điều kiện mất cân bằng dinh dưỡng (dư carbon, hạn chế nitrogen/phosphorus), cho phép tích lũy PHB ở mức cao như một dạng dự trữ nội bào.

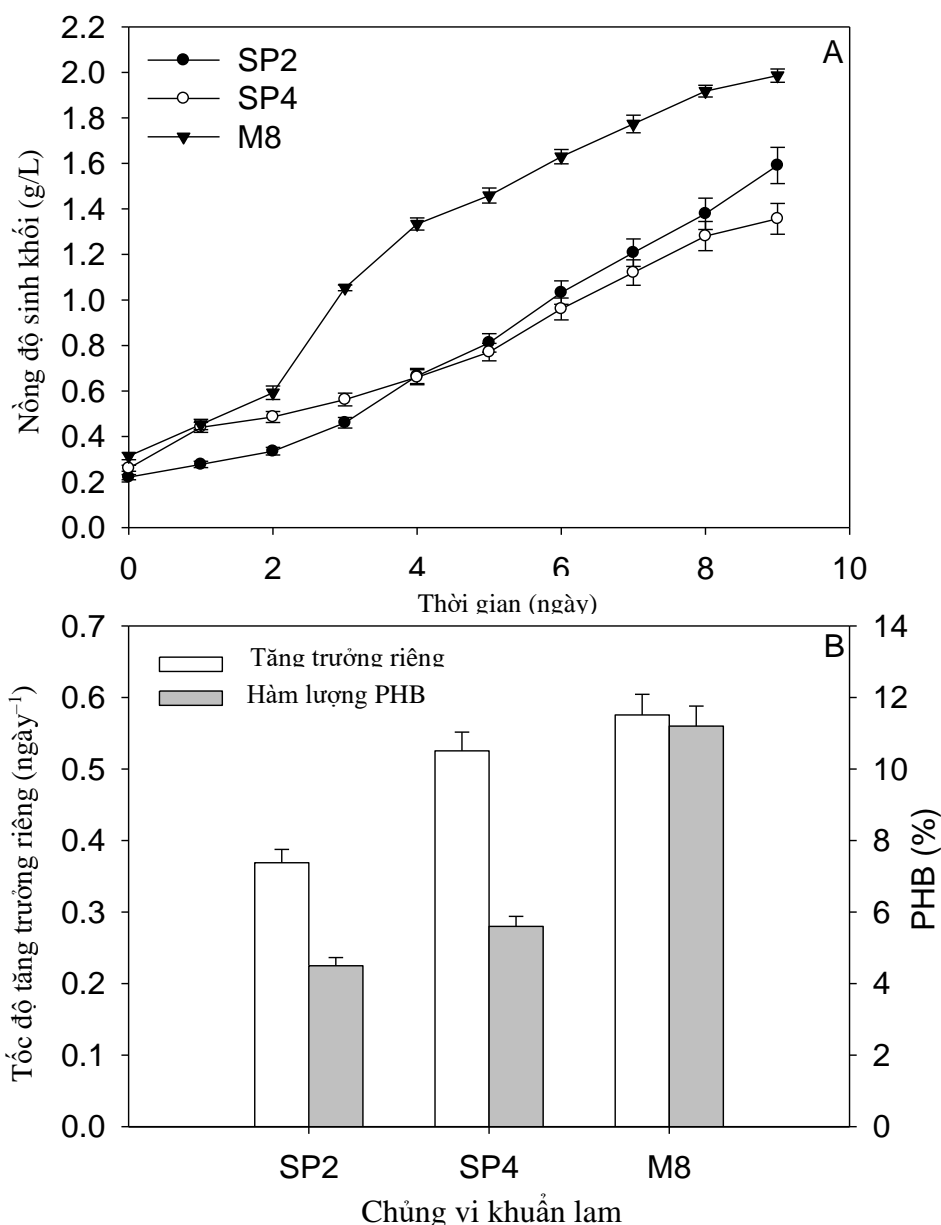
Bên cạnh đó, yếu tố môi trường nuôi cấy cũng có ảnh hưởng quan trọng đến tính khả thi ứng dụng. *Spirulina* thường được nuôi trong môi trường Zarrouk giàu bicarbonate, đòi hỏi chi phí dinh dưỡng cao, do đó không tối ưu cho mục tiêu sản xuất PHB quy mô lớn với giá thành thấp. Ngược lại, việc sử dụng môi trường BG-11 hoặc nước thải sinh hoạt có thể cung cấp nguồn dinh dưỡng với chi phí thấp hơn, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho tích lũy PHB.

Trong bối cảnh này, *S. salina* M8 thể hiện ưu thế rõ rệt khi vừa đạt năng suất sinh khối cao, vừa tích lũy PHB ở mức lớn trong điều kiện nước thải không tiệt trùng. Điều này không chỉ khẳng định tiềm năng sinh học của chủng mà còn cho thấy tính phù hợp trong định hướng ứng dụng thực tế, đặc biệt đối với các hệ thống xử lý nước thải kết hợp sản xuất vật liệu nhựa sinh học theo hướng kinh tế tuần hoàn.

Từ những số liệu thu được và các phân tích so sánh đã trình bày ở trên, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn chủng *S. salina* M8 làm đối tượng nghiên cứu nhằm phát triển mô hình tích hợp xử lý nước thải và sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB. Chủng này vừa cho năng suất sinh khối cao, vừa có khả năng tích lũy PHB vượt trội hơn trong điều kiện nuôi cấy với chi phí thấp, tạo tiền đề cho các thí nghiệm và nghiên cứu ứng dụng ở các nội dung tiếp theo.

Bảng 3.1. Kết quả sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy của *Spirulina* sp.2, *Spirulina* sp.4 và *S. salina* M8 sau 8 ngày nuôi (n =3)

Chủng vi khuẩn lam	Sinh khối (g/L)	Tốc độ tăng trưởng (ngày ⁻¹)	Hàm lượng PHB (%)
<i>Spirulina</i> sp.2	1,59 ± 0,01	0,37 ± 0,12	4,5 ± 0,1
<i>Spirulina</i> sp.4	1,36 ± 0,09	0,52 ± 0,14	5,6 ± 0,2
<i>S. salina</i> M8	1,99 ± 0,02	0,58 ± 0,04	11,2 ± 0,3



Hình 3.1. Nồng độ sinh khối (A), tốc độ tăng trưởng riêng và hàm lượng PHB (B) trong sinh khối của 3 chủng vi khuẩn lam

3.2. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối và hàm lượng tích lũy PHB bởi *S. salina* M8

Sự phát triển và sản xuất polymer quang hợp của vi khuẩn lam được điều chỉnh mạnh mẽ bởi các yếu tố lý hóa và phi sinh học. Khi các thông số này được tối ưu hóa, cả sự tích lũy sinh khối và tổng hợp nhựa sinh học đều có thể được tăng cường đáng kể. Dựa trên cơ sở này, thiết kế Plackett–Burman (PBD) đã được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng của 08 biến độc lập bao gồm cường độ ánh sáng, nồng độ CO₂, pH, nhiệt độ, tốc độ sục khí, nồng độ nitrate, nồng độ phosphate và thời gian nuôi cấy đến năng suất sinh khối và sự tích lũy PHB của *S. salina* M8, đồng thời qua đó xác định các yếu tố có ý nghĩa thống kê. Kết quả về ảnh hưởng của 08 yếu tố bao gồm: cường độ ánh sáng, pH, nhiệt độ, nồng độ CO₂, tốc độ sục khí, nồng độ nitrate, nồng độ phosphate,

và thời gian nuôi trong khoảng khảo sát tương ứng từ 4.500 – 13.500 lux; 5 – 9; 25 – 35°C; 1 – 5%, 0,5 – 1,5 vvm, 1 – 2 g/L, 20 – 60 mg/L, và 5 – 15 ngày, với ký hiệu biến tương ứng là A, B, C, D, E, F, G, và H, với các mức được mã hóa (-1, 0, và 1). Thiết kế PBD bao gồm 17 lần thí nghiệm, trong đó có 5 lần lặp lại điểm trung tâm, để đánh giá tính hợp lệ của mô hình và sai số thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu đầu ra của thiết kế là hai biến độc lập: sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$, g/L) và hàm lượng PHB (Y_{PHB} , %) được thể hiện trong **Bảng 3.2**.

Bảng 3.2. Ma trận của biến mã hóa theo thiết kế Plackett-Burman nghiên cứu sản xuất sinh khối và PHB bởi *S. salina* M8

STT	Mức của biến								$Y_{\text{sinh khối}}$ (g/L)	Y_{PHB} (%)
	A	B	C	D	E	F	G	H		
1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	0,95	8,56
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1,38	15,50
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1,53	11,50
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1,40	15,49
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1,05	17,60
6	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1,68	10,40
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1,01	13,60
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,23	5,60
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1,70	9,50
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1,39	15,70
11	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0,44	5,89
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1,62	17,36
13	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1,73	16,83

14	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0,84	6,26
15	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,93	7,73
16	0	0	0	0	0	0	0	0	1,38	15,44
17	0	0	0	0	0	0	0	0	1,41	15,26

Kết quả cho thấy sự biến động đáng kể của cả hai biến phản hồi (sinh khối và hàm lượng PHB) giữa các tổ hợp của 08 yếu tố khảo sát. Nồng độ sinh khối khô dao động trong khoảng rộng, trong đó giá trị cao nhất đạt 1,73 g/L ở thí nghiệm 13, tiếp theo là 1,70 g/L ở thí nghiệm 9. Ngược lại, sinh khối thấp nhất lần lượt ghi nhận ở thí nghiệm 8 (0,23 g/L) và thí nghiệm 11 (0,44 g/L), trong khi các thí nghiệm 14 và 15 cũng cho giá trị dưới 1 g/L. Sinh khối thấp ở các nghiệm thức này có thể được giải thích do phần lớn các yếu tố được thiết lập ở mức thấp, tạo điều kiện bất lợi cho sự sinh trưởng của *Synechocystis salina* M8.

Hàm lượng PHB cũng thể hiện sự biến thiên rõ rệt, dao động từ 5,60% (thí nghiệm 8) đến 17,6% (thí nghiệm 5), cho thấy mức độ ảnh hưởng mạnh của các yếu tố khảo sát đến quá trình tích lũy polymer. Tuy nhiên, xét trên phương diện ứng dụng, hiệu quả của quá trình không chỉ phụ thuộc vào hàm lượng PHB (%) mà còn phụ thuộc vào tổng lượng PHB thu được trên một đơn vị thể tích (g/L). Theo đó, mặc dù thí nghiệm 12 có hàm lượng PHB cao hơn (17,36%) so với thí nghiệm 13 (16,83%), nhưng do sinh khối ở thí nghiệm 13 cao hơn (1,73 g/L so với 1,62 g/L), nên tổng lượng PHB tích lũy thực tế đạt được ở hai nghiệm thức là tương đương hoặc thí nghiệm 13 có xu hướng cao hơn.

Mặt khác, sự chênh lệch về hàm lượng PHB giữa hai nghiệm thức này là không đáng kể (khoảng 3%), trong khi sự gia tăng sinh khối ở thí nghiệm 13 có ý nghĩa rõ rệt hơn về mặt năng suất tổng thể. Điều này phản ánh đặc điểm sinh lý điển hình của vi sinh vật, trong đó quá trình sinh trưởng và tích lũy PHB có mối quan hệ cạnh tranh về dòng carbon; do đó, điều kiện tối ưu cho tích lũy PHB cực đại chưa chắc trùng với điều kiện tối ưu cho sinh trưởng.

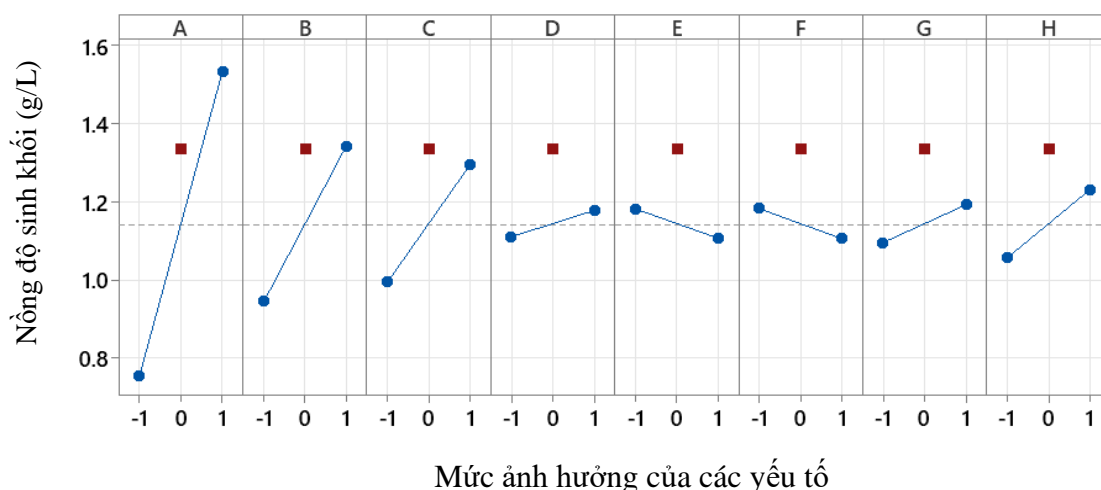
Từ đó, việc lựa chọn thí nghiệm 13 làm điều kiện đại diện là có cơ sở khoa học, vì nghiệm thức này đạt được sự cân bằng hợp lý giữa sinh trưởng và tích lũy sản phẩm. Kết quả này nhấn mạnh rằng việc xác định điều kiện tối ưu cần dựa trên tiêu chí tích hợp giữa sinh khối và hàm lượng PHB, thay vì chỉ tối đa hóa một chỉ tiêu riêng lẻ. Thí nghiệm 13 do đó được xem là phương án phù hợp hơn cho mục tiêu tối ưu hóa năng suất PHB tổng thể trong định hướng ứng dụng thực tiễn.

Sự biến động lớn về hàm lượng PHB giữa các nghiệm thức cũng phản ánh phạm vi khảo sát rộng của các yếu tố trong thiết kế Plackett–Burman, đồng thời khẳng định ảnh hưởng đáng kể của từng yếu tố đến quá trình điều hòa chuyển hóa và tổng hợp polymer trong tế bào.

3.2.1. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến tăng trưởng sinh khối bởi *S. salina* M8

Kết quả thí nghiệm trình bày trong **Bảng 3.2** được phân tích bởi phần mềm MiniTab nhằm đánh giá ảnh hưởng của từng yếu tố môi trường đến xu hướng tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8. Diễn biến dữ liệu thể hiện trên **Hình 3.2** cho thấy, trong phạm vi khảo sát cường độ ánh sáng tăng từ 4.500 đến 13.500 lux, pH tăng từ 5 đến 9, nhiệt độ tăng từ 25 đến 35°C, nồng độ CO₂ tăng từ 1 đến 3%, nồng độ phosphate tăng từ 20 đến 60 mg/L, và thời gian nuôi tăng từ 5 đến 15 ngày đều có xu hướng làm tăng hàm lượng sinh khối của *S. salina* M8.

Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab trong **Bảng 3.3**, cho thấy không phải tất cả các yếu tố trên đều có ảnh hưởng đáng kể về mặt thống kê. Cụ thể, cường độ ánh sáng (A), pH môi trường (B) và nhiệt độ nuôi cấy (C) được xác định là các yếu tố có ảnh hưởng mạnh và có ý nghĩa thống kê đến tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8 trong khoảng khảo sát. Các giá trị *p*-value đều nhỏ hơn 0,05, chứng tỏ vai trò chi phối của 03 yếu tố này trong các khoảng 4.500–13.500 lux, pH 5–9 và nhiệt độ 25–35°C. Ngược lại, các yếu tố như nồng độ CO₂ (1–5%), phosphate (20–60 mg/L) và thời gian nuôi (5–15 ngày) có giá trị *p*-value > 0,05 cho thấy không ảnh hưởng đáng kể đến tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8 trong phạm vi khảo sát. Tổng hợp các kết quả trên cho thấy cường độ ánh sáng, pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy là những yếu tố chính quyết định hiệu suất tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8 trong điều kiện thí nghiệm, đồng thời là cơ sở quan trọng cho các bước tối ưu hóa tiếp theo trong nghiên cứu.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa - lý đối với tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8

A: Cường độ ánh sáng C: Nhiệt độ E: tốc độ sục khí G: nồng độ phosphate
 B: pH D: nồng độ CO₂ F: nồng độ sodium nitrate H: thời gian nuôi cấy

Bảng 3.3. Phân tích ANOVA các biến ảnh hưởng đến sinh khối sản xuất bởi *S. salina* M8

Biến	Bậc tự do	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
A	1	1,82197	1,82197	101,37	0,000*
B	1	0,47292	0,47292	26,31	0,001*
C	1	0,26783	0,26783	14,90	0,006*
D	1	0,01363	0,01363	0,76	0,413
E	1	0,01680	0,01680	0,93	0,366
F	1	0,01776	0,01776	0,99	0,353
G	1	0,02813	0,02813	1,56	0,251
H	1	0,09004	0,09004	5,01	0,060

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê

- Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng (A): Kết quả phân tích thống kê cho thấy cường độ ánh sáng là yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất đến sinh khối của *S. salina* M8, với giá trị $F = 101,37$ và $p\text{-value} = 0,000$. Điều này khẳng định vai trò quyết định của ánh sáng đối với quá trình sinh trưởng của vi khuẩn lam trong điều kiện thí nghiệm. Về mặt sinh lý học, ánh sáng là một trong những yếu tố môi trường quan trọng nhất chi phối hoạt động quang hợp, trao đổi chất và tăng trưởng của vi khuẩn lam. Nhìn

chung, sinh khối của vi khuẩn lam tăng theo cường độ ánh sáng cho đến khi đạt ngưỡng bão hòa đặc trưng cho từng loài. Ở cường độ chiếu sáng thấp, khả năng hấp thụ năng lượng quang hợp bị hạn chế, dẫn đến giảm tốc độ cố định carbon và sinh trưởng chậm. Khi cường độ ánh sáng tăng, bộ máy quang hợp hoạt động hiệu quả hơn, thúc đẩy vận chuyển electron, gia tăng quá trình tạo ATP và từ đó nâng cao khả năng tổng hợp sinh khối [169]. Kết quả từ thiết kế sàng lọc Plackett–Burman cũng củng cố nhận định này, khi sinh khối cao hơn luôn được ghi nhận ở các thí nghiệm mà cường độ ánh sáng được mã hóa ở mức cao (+1). Xu hướng này phù hợp với vai trò đã được xác lập của ánh sáng như là động lực chính của quá trình đồng hóa carbon thông qua quang hợp ở vi khuẩn lam và vi tảo. Theo các nghiên cứu trước đây, đối với nhiều loài vi khuẩn lam, bao gồm *Synechocystis* sp. PCC 6803, điều kiện sinh trưởng tối ưu thường đạt được ở mức ánh sáng từ trung bình đến cao, phổ biến trong khoảng 50–400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [169]. Tuy nhiên, khi cường độ ánh sáng vượt quá vùng tối ưu này, hiện tượng ức chế quang hợp có thể xảy ra. Hiện tượng này liên quan đến áp lực kích thích quá mức, gây tổn thương hệ quang hợp II (PSII), làm giảm hiệu suất quang hợp và kìm hãm sự tăng trưởng của tế bào. Cơ chế ức chế quang hợp thường gắn với sự bất hoạt protein D1 của PSII, đòi hỏi các chu trình sửa chữa liên tục và tiêu tốn đáng kể năng lượng trao đổi chất [169]. Mặc dù vậy, vi khuẩn lam sở hữu các cơ chế bảo vệ và thích nghi quang hợp hiệu quả, bao gồm dập tắt không quang hóa, chuyển trạng thái và điều chỉnh động kích thước anten thu nhận ánh sáng. Các cơ chế này giúp tế bào giảm thiểu tổn thương và phục hồi khi cường độ ánh sáng trở về mức thuận lợi [169]. Nhờ đó, nhiều loài vi khuẩn lam có khả năng chịu đựng các điều kiện chiếu sáng biến động trong môi trường tự nhiên và hệ thống nuôi cấy nhân tạo, tuy nhiên chỉ trong giới hạn sinh lý nhất định. Do đó, việc xác định và duy trì cường độ ánh sáng tối ưu là yếu tố then chốt nhằm tối đa hóa năng suất sinh khối của vi khuẩn lam, đồng thời đảm bảo trạng thái quang sinh lý ổn định và bền vững cho các ứng dụng công nghệ sinh học.

- Ảnh hưởng của pH (B): Kết quả phân tích thống kê cho thấy pH có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8, với giá trị $F = 26,31$ và $p\text{-value} = 0,001 < 0,05$. Điều này khẳng định pH là một trong những yếu tố môi trường quan trọng chi phối quá trình sinh trưởng của chủng vi khuẩn lam nghiên cứu trong khoảng khảo sát. Ảnh hưởng của pH đối với vi khuẩn lam phụ thuộc mạnh vào đặc điểm sinh lý của từng loài; tuy nhiên, đa số các loài vi khuẩn lam và vi tảo quang hợp đều đạt hiệu suất sinh trưởng tối ưu trong điều kiện pH trung tính đến kiềm nhẹ, thường dao động trong khoảng 7,0–8,5. Khi pH lệch khỏi khoảng tối ưu này, sự mất cân bằng proton trong môi trường có thể làm gián đoạn các quá trình sinh lý quan trọng, bao gồm vận chuyển điện tử quang hợp, khả năng hấp thụ và cố định carbon vô cơ, cũng như hiệu quả trao đổi chất tổng thể, từ đó hạn chế sự tích lũy sinh khối. Đặc biệt, ở giá

trị pH cao (trên 10–11), quá trình chuyển hóa năng lượng ánh sáng thường bị ức chế mạnh, dẫn đến suy giảm đáng kể năng suất sinh khối. Xu hướng này đã được ghi nhận rõ ràng trong các nghiên cứu trước đây. Chẳng hạn, *Synechocystis* sp. PCC 6803 đạt sinh khối tối đa ($> 0,3$ g/L) trong khoảng pH 7,5–10, trong khi sinh khối giảm mạnh khi pH vượt quá 10 ($< 0,3$ g/L) [169]. Trong nghiên cứu hiện tại, *S. salina* M8 cũng thể hiện phản ứng tương tự, với sinh khối tăng dần khi pH tăng từ 5 lên 9 và đạt giá trị cao nhất ở vùng pH kiềm nhẹ thuộc giới hạn trên của khoảng khảo sát. Kết quả này cho thấy *S. salina* M8, tương tự nhiều loài vi khuẩn lam khác, ưa thích điều kiện pH kiềm vừa phải, nơi quá trình đồng hóa carbon và hoạt động quang hợp được tăng cường. Quan trọng hơn, phân tích thống kê đã xác nhận pH là một yếu tố quyết định có ý nghĩa đối với sự tích lũy sinh khối của *S. salina* M8, qua đó nhấn mạnh vai trò trung tâm của pH trong việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất tăng trưởng của chủng này [169].

- Ảnh hưởng của nhiệt độ (C): Phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sự tích lũy sinh khối của *S. salina* M8, với giá trị $F = 14,9$ và $p\text{-value} = 0,006$ ($< 0,05$). Mặc dù mức độ tác động không mạnh bằng cường độ ánh sáng và pH, kết quả này khẳng định nhiệt độ là một yếu tố môi trường quan trọng, góp phần điều chỉnh hiệu suất tăng trưởng của chủng *S. salina* M8 trong khoảng khảo sát. Khoảng nhiệt độ khảo sát từ 25 đến 35°C trùng hợp với dải nhiệt độ tối ưu đã được ghi nhận cho nhiều chủng thuộc chi *Synechocystis*, trong đó hoạt tính của các enzyme quang hợp, tốc độ cố định CO₂ và hiệu quả chuyển hóa năng lượng đạt mức cao, qua đó thúc đẩy tốc độ sinh trưởng cực đại và gia tăng sinh khối tích lũy. Các nghiên cứu trước đây cho thấy *Synechocystis* sp. PCC 6803 sinh trưởng tối ưu ở 30–35°C, đạt sinh khối khoảng 0,3–0,4 g/L, trong khi các điều kiện nhiệt độ thấp (18–22°C) hoặc căng thẳng nhiệt cao ($\approx 44^\circ\text{C}$) gây ức chế đáng kể quá trình sinh trưởng, làm giảm sinh khối và cản trở các quá trình sinh tổng hợp lipid [169]. Xu hướng phụ thuộc vào nhiệt độ tương tự cũng được ghi nhận đối với *S. salina* M8 trong nghiên cứu này. Ở nhiệt độ thấp nhất được khảo sát (25°C), sinh khối thu được là thấp nhất, chỉ đạt 0,23 g/L và 0,44 g/L tương ứng với các thí nghiệm số 8 và 11. Ngược lại, khi nhiệt độ được nâng lên 35°C, sinh trưởng của *S. salina* M8 được cải thiện rõ rệt, với sinh khối đạt giá trị cao nhất lần lượt là 1,70 g/L (thí nghiệm 9) và 1,73 g/L (thí nghiệm 13). Những kết quả này cho thấy *S. salina* M8, tương tự nhiều loài vi khuẩn lam khác, có khả năng thích nghi tốt với điều kiện nhiệt độ trung bình đến cao và đạt hiệu suất tăng trưởng cao. Qua đó, nhiệt độ được xác định là một yếu tố điều khiển quan trọng cần được kiểm soát chặt chẽ nhằm tối ưu hóa quá trình nuôi cấy và nâng cao năng suất sinh khối của chủng này.

- Đối với nồng độ CO₂ (D): Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy nồng độ CO₂ không có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sự tích lũy sinh khối của *S. salina* M8 trong phạm vi khảo sát, với giá trị $F = 0,76$ và $p\text{-value} = 0,413 (> 0,05)$. Điều này cho thấy, khi các yếu tố môi trường khác được xem xét đồng thời, sự thay đổi nồng độ CO₂ trong khoảng nghiên cứu không phải là yếu tố chi phối trực tiếp đối với tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8. Về mặt sinh lý, CO₂ đóng vai trò là nguồn carbon vô cơ thiết yếu cho quá trình quang hợp, và việc gia tăng nồng độ CO₂ thường giúp tăng cường tốc độ cố định carbon và sinh trưởng cho đến khi đạt ngưỡng tối ưu. Tuy nhiên, khi vượt quá ngưỡng này, CO₂ dư thừa có thể không mang lại lợi ích bổ sung, thậm chí gây ức chế do sự bão hòa của các hệ thống thu nhận carbon và cơ chế điều hòa trao đổi chất nội bào. Các nghiên cứu trước đây đã minh chứng cho hiện tượng này, chẳng hạn *Synechococcus* 11801 đạt tốc độ tăng trưởng cao nhất (0,16–0,18 h⁻¹) ở 0,5–1% CO₂, trong khi tốc độ sinh trưởng giảm rõ rệt ở nồng độ thấp hơn (0,04%) hoặc cao hơn (10%) [169]. Tương tự, *Synechocystis* sp. PCC 6803 có tốc độ sinh trưởng tối ưu ở khoảng 5% CO₂ [169]. Trong nghiên cứu này, *S. salina* M8 thể hiện khả năng sinh trưởng ổn định trong dải nồng độ CO₂ tương đối rộng từ 1–5%. Sinh khối khô ghi nhận được dao động trong khoảng 0,23–1,73 g/L tại 1% CO₂, 1,05–1,59 g/L tại 3% CO₂ và 0,44–1,68 g/L tại 5% CO₂ (**Bảng 3.2**). Đáng chú ý, ở nồng độ CO₂ 3%, sinh khối thu được luôn vượt quá 1 g/L, bất kể sự biến thiên của các yếu tố môi trường khác, gợi ý rằng mức CO₂ này tiếm cận điều kiện thuận lợi cho sinh trưởng của *S. salina* M8. Ngược lại, tại 1% và 5% CO₂, sinh khối biến động trong biên độ rộng hơn, phản ánh sự phụ thuộc rõ rệt vào tác động tổng hợp của các thông số môi trường còn lại như ánh sáng, pH và nhiệt độ. Những kết quả trên cho thấy, mặc dù *S. salina* M8 có khả năng thích nghi tốt với phổ nồng độ CO₂ rộng, nhưng CO₂ không phải là yếu tố giới hạn chính đối với sinh trưởng trong khoảng khảo sát. Hiệu suất sinh khối của chủng này chịu chi phối chủ yếu bởi sự tương tác giữa CO₂ và các yếu tố hóa – lý khác của môi trường nuôi cấy, điều này cần được xem xét trong các nghiên cứu tối ưu hóa đa biến ở quy mô lớn hơn.

- Đối với nồng độ phosphate (G): Phosphate là một trong những chất dinh dưỡng đa lượng thiết yếu đối với vi khuẩn lam, tham gia trực tiếp vào cấu trúc và chức năng của các phân tử sinh học quan trọng như axit nucleic, adenosine triphosphate (ATP) và phospholipid màng tế bào. Do đó, sự thiếu hụt phosphorus thường dẫn đến suy giảm hoạt động quang hợp, hạn chế quá trình trao đổi chất và kìm hãm sự tích lũy sinh khối (Raven, 2013; Wang và cộng sự, 2019). Trong nghiên cứu này, nồng độ phosphate được khảo sát trong khoảng 20–60 mg/L (**Bảng 3.2**). Kết quả thực nghiệm cho thấy sinh khối khô của *S. salina* M8 dao động trong khoảng 0,23–1,73 g/L (tại các thí nghiệm 8 và 13), tuy nhiên sự biến thiên này không thể hiện xu hướng phụ thuộc rõ ràng vào nồng độ

phosphate. Phân tích thống kê bằng thiết kế Plackett–Burman ghi nhận phosphate không có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sinh khối của *S. salina* M8 trong phạm vi khảo sát, với $p\text{-value} = 0,251 (> 0,05)$ (**Bảng 3.3**). Những kết quả này cho thấy, trong điều kiện thí nghiệm đã thiết lập, phosphate không phải là yếu tố giới hạn đối với sự sinh trưởng của *S. salina* M8. Điều này là do nồng độ phosphorus trong môi trường nuôi cấy đã vượt ngưỡng nhu cầu sinh lý của tế bào, do đó việc bổ sung thêm phosphate không mang lại lợi ích rõ rệt về sinh khối. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên các chủng *Synechocystis* sp. và *Scenedesmus* sp., trong đó sự gia tăng nồng độ phosphate vượt mức tối ưu không dẫn đến sự cải thiện đáng kể về tăng trưởng sinh khối, mà chỉ làm thay đổi cân bằng dinh dưỡng nội bào.

- Đối với thời gian nuôi (H): Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy thời gian nuôi cấy trong khoảng 5–15 ngày có $F\text{-value} = 5,01$ và $p\text{-value} = 0,06$. Mặc dù giá trị $p\text{-value}$ xấp xỉ ngưỡng ý nghĩa thống kê (0,05), yếu tố này vẫn chưa được xác định là có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sinh khối của *S. salina* M8 trong phạm vi khảo sát. Về mặt sinh học, thời gian nuôi cấy thường có mối liên hệ trực tiếp với mức độ tích lũy sinh khối, do quá trình cố định carbon quang hợp diễn ra liên tục theo thời gian. Trong nghiên cứu này, sinh khối của *S. salina* M8 có xu hướng tăng dần khi thời gian nuôi kéo dài từ 5 đến 15 ngày, phản ánh sự tích lũy sinh khối theo động học sinh trưởng. Tuy nhiên, mức độ gia tăng này không đủ lớn để tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, cho thấy tác động của thời gian nuôi cấy bị chi phối mạnh hơn bởi các yếu tố môi trường quyết định khác, đặc biệt là cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ. Tổng hợp các kết quả phân tích cho thấy, trong điều kiện thí nghiệm đã thiết lập, thời gian nuôi cấy và nồng độ phosphate đóng vai trò là các yếu tố hỗ trợ cho quá trình sinh trưởng, nhưng không phải là các yếu tố giới hạn quyết định năng suất sinh khối của *S. salina* M8. Điều này nhấn mạnh rằng việc tối ưu hóa các thông số môi trường chủ đạo có ý nghĩa quan trọng hơn so với việc kéo dài thời gian nuôi cấy trong chiến lược nâng cao hiệu suất sinh khối của chủng vi khuẩn lam này.

Ngược lại với ảnh hưởng của ánh sáng, pH, nhiệt độ, nồng độ CO_2 , nồng độ phosphate và thời gian nuôi cấy, sự tăng tốc độ sục khí CO_2 từ 0,5 đến 1,5 vvm và tăng nồng độ nitrate từ 1 đến 2 g/L, làm giảm nhẹ sinh khối khô của *S. salina* M8. Tuy nhiên sự giảm sinh khối khô không quá lớn và không có ý nghĩa về mặt thống kê do $p\text{-value}$ tính được đều lớn hơn 0,05 (**Bảng 3.3**), điều này được luận giải như sau:

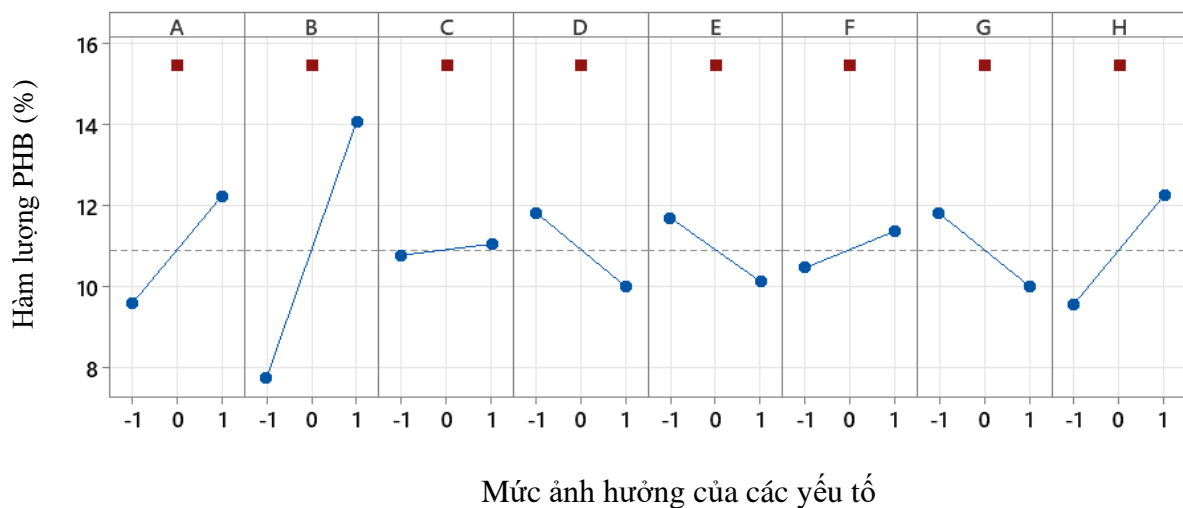
- Đối với tốc độ sục khí (E): Sục khí là một thông số vận hành quan trọng trong nuôi cấy vi khuẩn lam, có vai trò tăng cường sự hòa tan CO_2 từ pha khí vào môi trường nuôi, qua đó nâng cao nguồn carbon vô cơ sẵn có cho quá trình cố định carbon quang hợp. Đồng thời, sục khí còn cải thiện mức độ trộn lẫn của hệ thống, thúc đẩy truyền khối

và tăng cường khả năng trao đổi chất dinh dưỡng của tế bào, từ đó hỗ trợ sinh trưởng và tích lũy sinh khối. Tuy nhiên, khi tốc độ sục khí vượt quá ngưỡng thích hợp, ứng suất cắt thủy động gia tăng có thể gây tổn thương tế bào và làm suy giảm ổn định sinh lý, hiện tượng đã được ghi nhận ở một số loài vi khuẩn lam như *Microcystis* spp. dưới điều kiện sục khí cao [169]. Trong nghiên cứu này, *S. salina* M8 thể hiện khả năng sinh trưởng ổn định trong khoảng tốc độ sục khí khảo sát từ 0,5 đến 1,5 vvm. Sinh khối khô thu được dao động trong khoảng 0,23–1,70 g/L tại 0,5 vvm và đạt giá trị cực đại 1,73 g/L tại 1,5 vvm (**Bảng 3.2**). Mặt khác, phân tích thống kê cho thấy tốc độ sục khí không có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sự tích lũy sinh khối trong phạm vi nghiên cứu ($p = 0,366 > 0,05$ (**Bảng 3.2**)). Những kết quả này cho thấy *S. salina* M8 có khả năng thích nghi tốt trước sự biến đổi vừa phải của tốc độ sục khí mà không làm suy giảm sinh trưởng. Đồng thời, chúng cũng chỉ ra rằng trong điều kiện thí nghiệm đã thiết lập, sinh khối của *S. salina* M8 chịu sự chi phối mạnh mẽ hơn bởi các yếu tố môi trường quyết định khác, đặc biệt là cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ, hơn là bởi tốc độ sục khí.

- Đối với nồng độ nitrate (F): Sự sẵn có của nitrate có tác động cơ bản đến sinh lý của *Synechocystis* vì nitrogen điều chỉnh quá trình sinh tổng hợp tế bào, hiệu quả quang hợp và cân bằng carbon-nitrogen tổng thể. Thông thường, sự tăng trưởng phụ thuộc vào nitrate tuân theo động học bão hòa: tốc độ tăng trưởng cụ thể tăng lên khi nồng độ nitrate tăng cho đến khi nhu cầu N của tế bào được đáp ứng, sau đó nitrate bổ sung mang lại lợi ích không đáng kể hoặc có thể gây mất cân bằng chuyển hóa. Ngược lại, nồng độ nitrate rất thấp gây ra tình trạng thiếu nitrogen, kích hoạt sự phân phối lại dự trữ nitrogen nội bào và chuyển hướng dòng carbon khỏi quá trình hình thành sinh khối sang các chất chuyển hóa liên quan đến stress. Li và cộng sự (2025) đã chứng minh rõ ràng sự chuyển đổi này, cho thấy rằng việc cung cấp đủ nitrate (120 mg N/L; N/P = 10:1) duy trì sự tăng trưởng mạnh mẽ của *Synechocystis* và sự tiết chất chuyển hóa, trong khi môi trường có hàm lượng nitrogen thấp (54–84 mg N/L) gây ra tình trạng thiếu nitrogen nghiêm trọng, thúc đẩy sự bài tiết chất chuyển hóa quá mức và thậm chí gây ra hiện tượng tự vỡ tế bào [169]. Tỷ lệ Redfield chuẩn (C/N/P = 106:16:1; tỷ lệ khối lượng 41,1:7,23:1) xác định yêu cầu về mặt hóa học để cân bằng quá trình trao đổi chất của vi khuẩn lam. Trong nghiên cứu này, nồng độ nitrate trong môi trường BG-11 được nâng cao từ 164,71 lên 329,41 mg/L, tạo ra tỷ lệ mol N/P từ 51:1 đến 102:1 (tỷ lệ khối lượng từ 12:1 đến 24:1), vượt xa nhu cầu về mặt hóa học. Tỷ lệ N/P cao bất thường như vậy có thể đã làm rối loạn cân bằng chất dinh dưỡng nội bào, góp phần làm giảm nhẹ sinh khối khô được quan sát thấy ở nồng độ nitrate cao hơn. Tuy nhiên, sự suy giảm này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,353 > 0,05$, **Bảng 3.3**), cho thấy rằng trong phạm vi thử nghiệm, lượng nitrate dư thừa chỉ gây ra tác động ức chế nhỏ so với các yếu tố chi phối, ví dụ như cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ, được xác định thông qua sàng lọc Plackett–Burman.

3.2.2. Kết quả sàng lọc các yếu tố hóa - lý ảnh hưởng lớn đến hàm lượng tích lũy PHB bởi *S. salina* M8

Sự tích lũy PHB trong sinh khối của *S. salina* M8, thể hiện trong **Hình 3.3**, chịu ảnh hưởng mạnh mẽ bởi các điều kiện môi trường và dinh dưỡng. Biểu đồ ảnh hưởng mô tả sự thay đổi hàm lượng PHB khi các yếu tố được chuyển từ mức thấp (-1) sang mức cao (+1) qua đó phản ánh mức độ nhạy cảm của quá trình tích lũy PHB đối với từng biến khảo sát. Về bản chất, sinh tổng hợp PHB ở vi khuẩn lam được xem là một quá trình trao đổi chất thứ cấp, thường được kích hoạt trong điều kiện stress sinh lý hoặc mất cân bằng dinh dưỡng, khi dòng carbon bị chuyển hướng từ sinh trưởng tế bào sang lưu trữ polymer nội bào. Kết quả phân tích theo Plackett–Burman cho thấy cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ không chỉ là các yếu tố chi phối sự tăng trưởng sinh khối mà còn có tác động gián tiếp và đáng kể đến khả năng tích lũy PHB của *S. salina* M8. Việc tăng cường độ ánh sáng giúp nâng cao hiệu suất cố định carbon quang hợp, từ đó gia tăng nguồn tiền chất (acetyl-CoA) và năng lượng khử (NADPH) cần thiết cho con đường sinh tổng hợp PHB. Đồng thời, môi trường kiềm nhẹ (pH 8–9) tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động trao đổi chất và ổn định hệ thống quang hợp, dẫn đến sự gia tăng rõ rệt hàm lượng PHB tích lũy (>11%). Nhiệt độ cũng thể hiện ảnh hưởng tương tự, khi nhiệt độ cao hơn (lên đến 35°C) thúc đẩy hoạt tính enzym liên quan đến cả sinh trưởng và sinh tổng hợp PHB, trong khi nhiệt độ thấp hơn có thể làm chậm các phản ứng sinh hóa trong chu trình này. Bên cạnh các yếu tố vật lý, nồng độ dinh dưỡng và thời gian nuôi cấy cũng góp phần điều chỉnh sự tích lũy PHB. Cụ thể, việc tăng nồng độ nitrate từ 1 lên 2 g/L và kéo dài thời gian nuôi cấy từ 5 đến 15 ngày đều có xu hướng làm tăng hàm lượng PHB trong sinh khối.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố hóa - lý đối với hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối của *S. salina* M8

A: Cường độ ánh sáng C: Nhiệt độ E: tốc độ sục khí G: nồng độ phosphate
 B: pH D: nồng độ CO₂ F: nồng độ sodium nitrate H: thời gian nuôi cấy

Bảng 3.4. Phân tích ANOVA các biến ảnh hưởng đến hàm lượng PHB sản xuất bởi *S. salina* M8

Biến	Bậc tự do	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
A	1	20,830	20,830	4,75	0,066
B	1	119,511	119,511	27,28	0,001*
C	1	0,232	0,232	0,05	0,824
D	1	9,883	9,883	2,26	0,177
E	1	7,379	7,379	1,68	0,236
F	1	2,421	2,421	0,55	0,481
G	1	9,594	9,594	2,19	0,182
H	1	21,467	21,467	4,90	0,062

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê.

Xét từ góc độ điều hòa chuyển hóa, nồng độ nitrate cao hơn (trong phạm vi không gây ức chế) giúp duy trì hoạt động quang hợp và trao đổi chất của tế bào, đồng thời tạo điều kiện để các enzyme của con đường tổng hợp PHB (PhaA, PhaB, PhaEC) được biểu hiện và hoạt động hiệu quả. Ngược lại, tình trạng thiếu hụt nitrogen nghiêm

trọng ở *Synechocystis* đã được nghiên cứu có thể gây phá vỡ bộ máy quang hợp, làm suy giảm hàm lượng protein và enzyme, từ đó hạn chế dòng carbon vào PHB mặc dù xu hướng tích lũy chất dự trữ (glycogen/PHB) có thể tăng lên [169]. Trong trường hợp tăng nitrate nhưng sự sinh trưởng vẫn bị giới hạn bởi các yếu tố khác (ví dụ như phosphours, ánh sáng, nhiệt độ hoặc khi tế bào đạt pha ổn định), lượng carbon cố định và năng lượng khử dư thừa sẽ không được sử dụng cho tăng trưởng mà được chuyển hướng vào con đường tích lũy PHB như một “bể chứa” carbon và điện tử. Trạng thái “mất cân bằng dinh dưỡng” này cho phép *Synechocystis* ưu tiên tích lũy PHB ngay cả khi nitrogen không phải là yếu tố hạn chế chính [169]. Cơ chế này giải thích sự phù hợp cho nghiên cứu hiện tại, khi *S. salina* M8 vẫn gia tăng hàm lượng PHB ở nồng độ nitrate cao hơn, mặc dù vi khuẩn lam thường được biết đến với khả năng tích lũy polymer dự trữ dưới điều kiện stress nitrogen.

Việc kéo dài thời gian nuôi cấy góp phần làm suy giảm dần các chất dinh dưỡng trong môi trường, từ đó kích hoạt các cơ chế thích nghi của tế bào, bao gồm sự tái phân bổ dòng carbon từ các đại phân tử cấu trúc như carbohydrate và protein sang các polymer dự trữ nội bào, điển hình là PHB. Quá trình này phản ánh chiến lược sinh tồn phổ biến của vi khuẩn lam trong điều kiện dinh dưỡng không cân bằng hoặc tiến vào pha ổn định. Ngược lại, trong phạm vi khảo sát, việc gia tăng nồng độ CO₂, tốc độ sục khí và nồng độ phosphate có xu hướng làm giảm hàm lượng PHB tích lũy. Nguyên nhân chủ yếu là do các điều kiện này thúc đẩy sinh trưởng mạnh mẽ, tạo ưu thế cho quá trình hình thành sinh khối hơn là kích hoạt các con đường lưu trữ polymer. Đối với CO₂, mặc dù đây là nguồn carbon trực tiếp cho quang hợp và có thể hỗ trợ tổng hợp PHB ở một số loài, nhưng mối quan hệ giữa nồng độ CO₂ và tích lũy PHB mang tính phụ thuộc loài và chịu chi phối đồng thời bởi các yếu tố khác như mức độ nitrogen sẵn có và pH môi trường. Do đó, việc tăng CO₂ không phải lúc nào cũng dẫn đến gia tăng PHB và trong một số trường hợp còn gây ức chế quá trình tích lũy polymer [169]. Tương tự, tăng cường sục khí trong hệ nuôi cấy vi khuẩn lam thường làm giảm khả năng tích lũy PHB. Quá trình sinh tổng hợp PHB được ghi nhận là ưu tiên xảy ra trong điều kiện oxygen hòa tan thấp hoặc trạng thái trao đổi chất kém thuận lợi cho tăng trưởng, những điều kiện này có thể đạt được khi giảm mức sục khí [169]. Mặc dù vậy, mối quan hệ giữa sục khí và tích lũy PHB không hoàn toàn tuyến tính; một số nghiên cứu cho thấy hàm lượng PHB có thể tăng trong giai đoạn đầu khi sục khí được cải thiện, nhưng sau đó giảm dần khi quá trình sục khí kéo dài và sinh trưởng được duy trì ổn định. Hơn nữa, việc tăng nồng độ phosphate thường dẫn đến giảm sản xuất hoặc

tích lũy PHB trong vi khuẩn lam. Điều này là do quá trình tổng hợp PHB thường được ưu tiên trong điều kiện thiếu chất dinh dưỡng, bao gồm cả sự thiếu hụt phosphate [169].

Nhìn chung, phần lớn các yếu tố khảo sát chỉ gây ra sự biến thiên nhỏ về năng suất PHB giữa các mức độ, phù hợp với kết quả ANOVA trình bày trong **Bảng 3.4**, cho thấy ít có ý nghĩa thống kê. Trong số 08 biến số được đánh giá (A–H), chỉ có yếu tố pH (B) thể hiện ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sự tích lũy PHB của *S. salina* M8 ($p = 0,001 < 0,05$), với giá trị F-Value cao (27,28), khẳng định vai trò ảnh hưởng của pH đối với sự biến thiên hàm lượng PHB trong phạm vi thí nghiệm. Ngược lại, các yếu tố còn lại (A, C, D, E, F, G và H) đều có giá trị $p > 0,05$ và F-Value thấp (0,05–4,90), cho thấy đóng góp không đáng kể khi được xem xét riêng lẻ trong thiết kế Plackett–Burman. Mặc dù một số yếu tố có tổng bình phương tương đối cao hơn, ảnh hưởng của chúng vẫn không đạt ý nghĩa thống kê. Kết quả sàng lọc vì vậy xác định pH là yếu tố quyết định cần ưu tiên trong các nghiên cứu tối ưu hóa tiếp theo, trong khi các yếu tố còn lại có thể được cố định, trừ trường hợp xét đến các tương tác tiềm năng.

Xét tổng thể, cường độ ánh sáng, pH, nhiệt độ, CO₂, sục khí, nồng độ nitrate, phosphate và thời gian nuôi cấy cùng tham gia chi phối quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp PHB của *S. salina* M8. Sinh khối được thúc đẩy chủ yếu bởi ánh sáng cao, pH kiềm, nhiệt độ tương đối cao, nguồn CO₂ đầy đủ và sục khí ở mức vừa phải, với vai trò hỗ trợ của nitrate và phosphate. Ngược lại, sự tích lũy PHB tăng lên trong điều kiện ánh sáng mạnh, pH kiềm, nhiệt độ cao, nồng độ nitrate cao hơn, phosphate thấp hơn và thời gian nuôi cấy kéo dài, trong khi CO₂ cao và sục khí mạnh có xu hướng ức chế sự tích trữ polymer. Từ góc độ ứng dụng công nghiệp, năng suất PHB được ưu tiên hơn so với hàm lượng PHB riêng lẻ, do năng suất PHB phụ thuộc đồng thời vào sinh khối và hàm lượng PHB.

Trên cơ sở kết quả sàng lọc từ thiết kế Plackett–Burman, 03 yếu tố cường độ ánh sáng (4.500 - 13.500 lux), pH (5 - 9) và nhiệt độ (25 - 35°C) được lựa chọn cho bước tối ưu hóa sinh khối và nghiên cứu sản xuất PHB tiếp theo, trong khi các yếu tố CO₂, sục khí, nitrate, phosphate và thời gian nuôi cấy được cố định lần lượt ở mức 5%, 0,5 vvm, 1 g/L, 40 mg/L và 10 ngày.

3.3. Kết quả về tối ưu hóa sinh khối và hàm lượng PHB tích lũy bởi vi khuẩn lam *S. salina* M8

Kết quả về tăng trưởng sinh khối và tích lũy PHB trong sinh khối *S. salina* M8 với 15 thí nghiệm theo thiết kế Box–Behnken được trình bày ở **Bảng 3.5**.

Bảng 3.5. Kết quả đo tăng trưởng sinh khối và tích lũy PHB trong sinh khối *S. salina* M8 theo thiết kế Box–Behnken

STT	Mức của biến			Y _{sinh khối} (g/L)	Y _{PHB} (%)
	A	B	C		
1	4500 (-1)	7 (0)	25 (-1)	1,31	14,31
2	13500 (1)	5 (-1)	30 (0)	0,87	10,29
3	13500 (1)	7 (0)	35 (1)	1,89	18,58
4	9000 (0)	7 (0)	30 (0)	2,57	19,52
5	9000 (0)	7 (0)	30 (0)	2,51	19,23
6	13500 (1)	9 (1)	30 (0)	2,35	20,47
7	9000 (0)	9 (1)	25 (-1)	2,04	15,78
8	4500 (-1)	9 (1)	30 (0)	1,92	17,92
9	9000 (0)	9 (1)	35 (1)	2,15	20,61
10	4500 (-1)	5 (-1)	30 (0)	0,68	9,12
11	9000 (0)	7 (0)	30 (0)	2,59	20,11
12	13500 (1)	7 (0)	25 (-1)	1,39	17,96
13	4500 (-1)	7 (0)	35 (1)	1,58	18,47
14	9000 (0)	5 (-1)	35 (1)	1,03	10,76
15	9000 (0)	5 (-1)	25 (-1)	0,68	8,63

3.3.1. Tối ưu hoá sinh khối khô tích lũy bởi *S. salina* M8

Kết quả phân tích ANOVA tại **Bảng 3.6** cho thấy mô hình hồi quy Box–Behnken giải thích rõ rệt sự biến động của năng suất sinh khối *S. salina* M8. Cụ thể, giá trị F-Value của mô hình ($F = 122,94$, p -value = 0,000) cùng hệ số xác định $R^2 = 99,55\%$, R^2 hiệu chỉnh ($R^2_{adj} = 98,74\%$) và R^2 dự đoán ($R^2_{pred} = 93,53\%$) khẳng định mô hình có độ phù hợp cao và khả năng dự đoán đáng tin cậy. Hơn nữa, chỉ số Lack-of-Fit của mô hình toán có giá trị p -value = 0,172 > 0,05 và $F = 4,97$ cho thấy không có sai khác có ý nghĩa thống kê giữa giá trị dự đoán của mô hình và số liệu thực nghiệm, nghĩa là mô hình được xây dựng phù hợp với dữ liệu và số liệu đo đạc từ thí nghiệm là có độ tương thích rất cao.

Bảng 3.6. Phân tích ANOVA đối với sinh khối khô của *S. salina* M8 cho các thí nghiệm dựa trên thiết kế Box-Behnken

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
Model	9	6,48187	0,72021	122,94	0,000*
Linear	3	3,69662	1,23221	210,33	0,000*
A	1	0,12751	0,12751	21,77	0,006*
B	1	3,38000	3,38000	576,96	0,000*
C	1	0,18911	0,18911	32,28	0,002*
Square	3	2,74322	0,91441	156,09	0,000*
A×A	1	0,98723	0,98723	168,52	0,000*
B×B	1	1,26180	1,26180	215,39	0,000*
C×C	1	0,91234	0,91234	155,73	0,000*
2-Way Interaction	3	0,04203	0,01401	2,39	0,185
A×B	1	0,01440	0,01440	2,46	0,178
A×C	1	0,01323	0,01323	2,26	0,193
B×C	1	0,01440	0,01440	2,46	0,178
Error	5	0,02929	0,00586		
Lack-of-Fit	3	0,02583	0,00861	4,97	0,172
Pure Error	2	0,00347	0,00173		
Total	14	6,51116			
R ²		99,55%			
R-sq(adj)		98,74%			
R-sq(pred)		93,53%			

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê.

Ảnh hưởng của các biến tuyến tính (Linear effects): Dữ liệu cho thấy mô hình (model) và tính chất tuyến tính (linear), cường độ ánh sáng (A), pH ban đầu (B), và nhiệt độ môi trường nuôi (C) đều ảnh hưởng lớn năng suất sinh khối vì giá trị p -value $< 0,05$. pH ban đầu (B) với giá trị F -value = 576,96, p -value = 0,000. Đây là yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất. pH điều chỉnh cân bằng $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ và trạng thái ion của các muối dinh dưỡng, từ đó tác động trực tiếp đến quá trình quang hợp và đồng hóa carbon. Giá trị F vượt trội so với các biến khác cho thấy pH đóng vai trò chi phối trong tối ưu hóa sinh trưởng. Nhiệt độ nuôi (C) có các giá trị F -value = 32,28, p -value = 0,002. Nhiệt độ trong khoảng giới hạn khảo sát (25–35°C) điều chỉnh hoạt tính enzym quang hợp và tốc độ cố định CO_2 . Nhiệt độ tăng trong khoảng khảo sát làm nâng cao tốc độ tăng trưởng cực đại. Cường độ ánh sáng (A): F -value = 21,77, p -value = 0,006, ánh sáng cung cấp năng lượng cho quang hợp, tuy mức ảnh hưởng kém hơn pH và nhiệt độ. Trong dải 4.500 – 13.500 lux, cường độ ánh sáng đủ cao để kích thích tăng trưởng nhưng chưa đạt ngưỡng gây stress quang. Mặc dù tác động tích cực, mức ảnh hưởng của ánh sáng thấp hơn so với pH và nhiệt độ. Như vậy, pH ban đầu là biến tuyến tính chi phối mạnh nhất, giữ vai trò trung tâm trong điều tiết quá trình quang hợp và hấp thu dinh dưỡng, trong khi nhiệt độ và cường độ ánh sáng đóng vai trò hỗ trợ, góp phần tối ưu hóa năng suất sinh khối của *S. salina* M8.

Các biến bình phương $A \times A$, $B \times B$, và $C \times C$ tất cả đều thu được p -value $< 0,05$ và thể hiện là biến quan trọng trong mô hình và có ý nghĩa về mặt thống kê đến năng suất sinh khối của *S. salina* M8. Trong số đó, thứ tự mức độ ảnh hưởng được sắp xếp là $B \times B > A \times A > C \times C$ do F -value của ba biến đó được xếp theo thứ tự tương ứng là 215,39 $>$ 168,52 $>$ 155,73. Điều này cho thấy đáp ứng sinh khối không chỉ tăng tuyến tính khi tăng từng yếu tố mà còn xuất hiện đỉnh tối ưu; ví dụ pH quá cao hoặc quá thấp đều làm giảm sinh khối, tương tự với ánh sáng và nhiệt độ.

Tuy nhiên, các biến tương tác 2 chiều $A \times B$, $B \times C$, và $A \times C$ đều có p -value $> 0,05$ (F -value $\approx 2,3$ – $2,5$) cho thấy không có ảnh hưởng tương tác đáng kể giữa cặp biến đối với năng suất sinh khối của *S. salina* M8 trong khoảng khảo sát. Nói cách khác, tác động của từng yếu tố đến sinh khối chủ yếu độc lập, không phụ thuộc vào giá trị của các yếu tố còn lại. Tất cả số liệu thu được ở Bảng phân tích ANOVA của sinh khối chứng tỏ rằng mô hình này chính xác và đáng tin cậy. Điều này được xác nhận thêm bởi hệ số tương quan của R^2 ở các giá trị 99,55%. Các phân tích khuyến nghị rằng mô hình phù hợp tốt với dữ liệu thực nghiệm và do đó nó có thể được áp dụng để dự đoán chính xác kết quả thí nghiệm.

Bảng 3.7. Bảng hệ số tương quan các biến tương ứng của mô hình hồi quy sinh khối khô của *S. salina* M8

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	2,5567	0,0442	57,86	0,000*
A	0,1262	0,0271	4,67	0,006*
B	0,6500	0,0271	24,02	0,000*
C	0,1537	0,0271	5,68	0,002*
A×A	-0,5171	0,0398	-12,98	0,000*
B×B	-0,5846	0,0398	-14,68	0,000*
C×C	-0,4971	0,0398	-12,48	0,000*
A×B	0,0600	0,0383	1,57	0,178
A×C	0,0575	0,0383	1,50	0,193
B×C	-0,0600	0,0383	-1,57	0,178

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê.

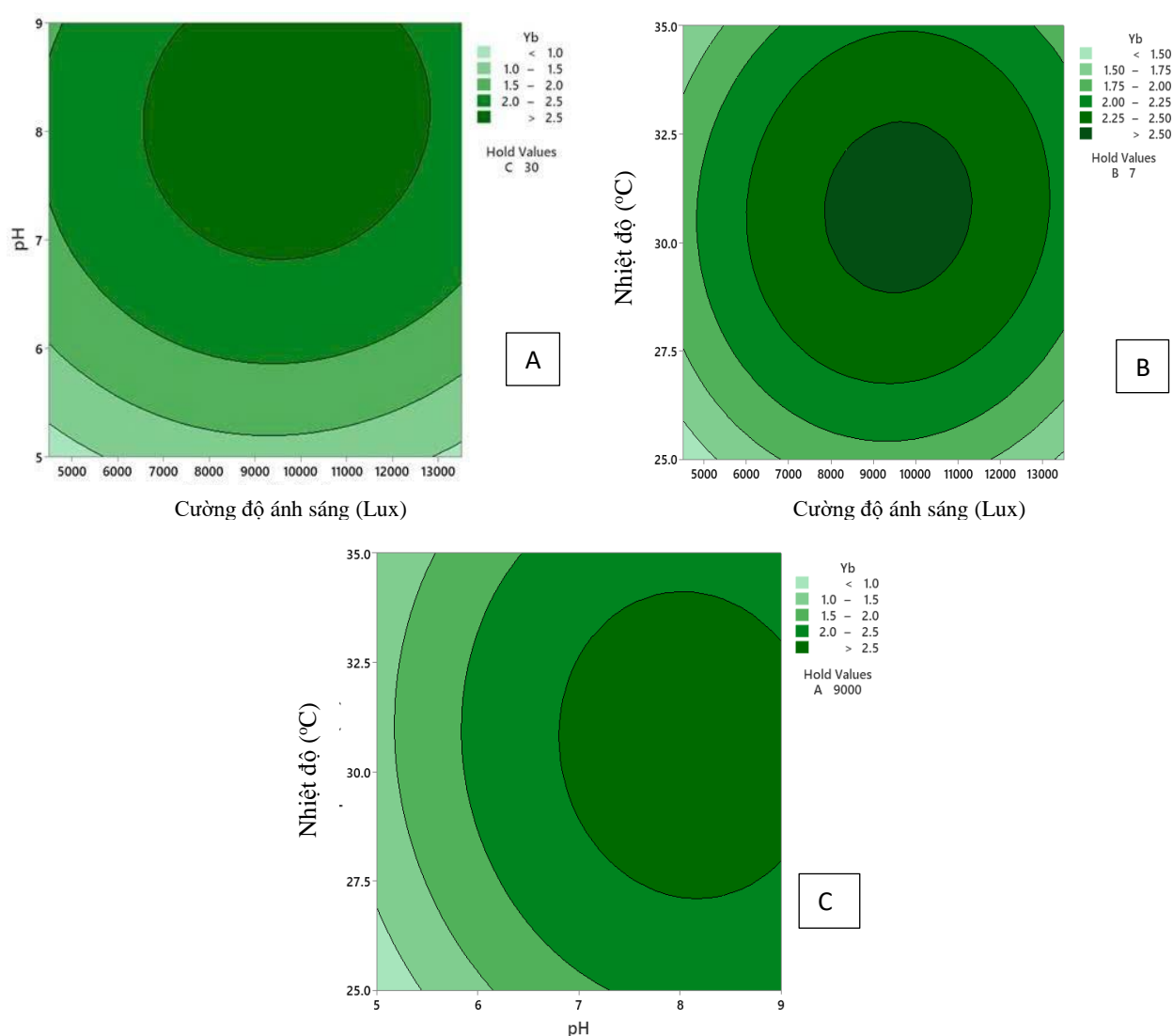
Dựa trên các hệ số hồi quy (**Bảng 3.7**), phương trình hàm hồi quy của năng suất sinh khối biểu diễn theo 03 biến cường độ ánh sáng, pH ban đầu và nhiệt độ nuôi được viết theo biến mã hóa và các hệ số tương quan của các biến theo phương trình (3.1):

$$Y_{\text{sinh khối}} = 2,5567 + 0,1262A + 0,6500B + 0,1537C - 0,5171A \times A - 0,5846B \times B - 0,4971C \times C \quad (3.1)$$

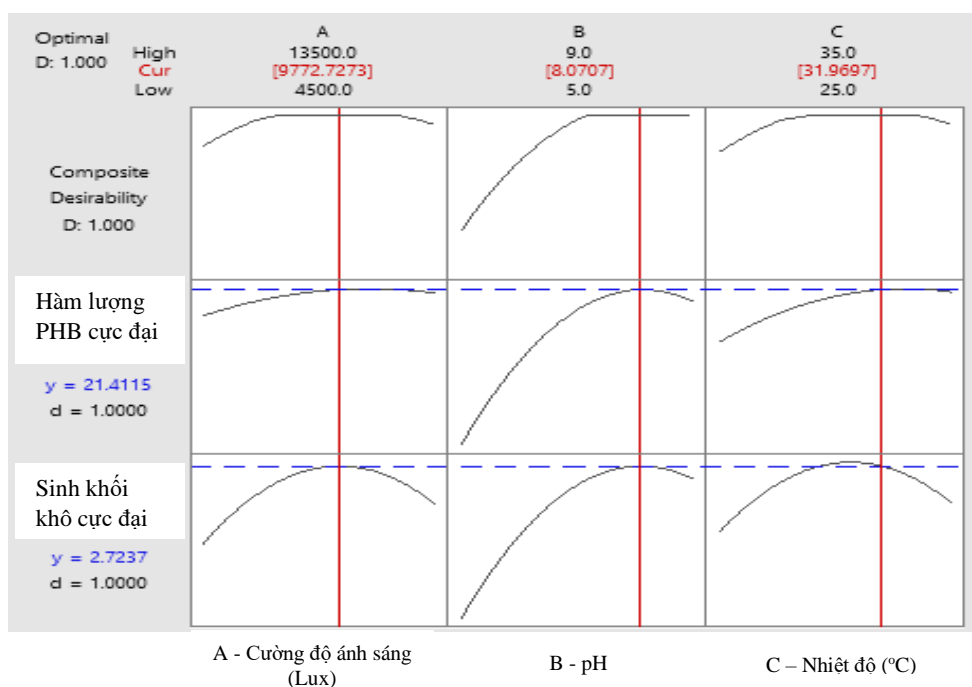
Phương trình này cho phép xác định giá trị tối ưu của từng yếu tố, đồng thời khẳng định vai trò chi phối của pH ban đầu và tầm quan trọng của các hiệu ứng phi tuyến khi tối ưu hoá năng suất sinh khối của *S. salina* M8.

Các biểu đồ đường viền năng suất sinh khối được hiển thị trong **Hình 3.4** là đồ thị 2-D mô tả mối quan hệ giữa nồng độ sinh khối *S. salina* M8 với 03 biến là cường độ ánh sáng, pH môi trường và nhiệt độ nuôi. Đồ thị đường viền thể hiện trong **Hình 3.4 - A** cho thấy nồng độ sinh khối vượt quá 2,5 g/L được dự đoán trong một phạm vi hoạt động rộng được xác định bởi cường độ ánh sáng từ 6.500–12.500 lux, giá trị pH từ 7 đến 9 và nhiệt độ gần 30°C (**Hình 3.4 - A**). Tương tự như vậy, khi pH ban đầu của

môi trường nuôi được điều chỉnh ở mức 7,0 thì sinh khối khô của *S. salina* M8 sẽ đạt trên 2,5 g/L khi thí nghiệm được thực hiện dưới điều kiện ánh sáng 8.000 – 11.000 lux và nhiệt độ nuôi được kiểm soát ở mức 29 – 32°C (**Hình 3.4 -B**). Khi đặt điều kiện ánh sáng là 9.000 lux, các thí nghiệm nuôi *S. salina* M8 dưới điều kiện pH = 7 – 9 và nhiệt độ 27,5 – 34°C sẽ đạt được sinh khối khô trên 2,5 g/L, chứng tỏ khả năng thích nghi của chủng này đối với những biến động môi trường tương đối rộng (**Hình 3.4-C**). Tối ưu hóa dựa trên mô hình đã xác định các điều kiện chính xác được dự đoán sẽ tạo ra sinh khối lớn nhất trong phạm vi thử nghiệm: cường độ ánh sáng 9.800 lux, pH ban đầu 8,0 và nhiệt độ nuôi cấy 32°C. Trong những điều kiện này, *S. salina* M8 đạt nồng độ sinh khối khô tối đa là 2,73 g/L, phù hợp với xu hướng bề mặt đáp ứng được thể hiện trong **Hình 3.5**.



Hình 3.4. Đồ thị đường viền của sinh khối khô *S. salina* M8 biểu diễn theo hai biến (A): Cường độ ánh sáng và pH (B): Nhiệt độ và cường độ ánh sáng (C): pH và nhiệt độ



Hình 3.5. Đồ thị kết quả tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8

3.3.2. Tối ưu hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8

Bảng 3.8. Phân tích ANOVA đối với hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8 cho các thí nghiệm dựa trên thiết kế Box-Behnken

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	264,158	29,351	98,72	0,000*
Linear	3	186,042	62,014	208,59	0,000*
A	1	6,994	6,994	23,52	0,005*
B	1	161,820	161,820	544,30	0,000*
C	1	17,228	17,228	57,95	0,001*
Square	3	72,684	24,228	81,49	0,000*
A×A	1	2,941	2,941	9,89	0,026*
B×B	1	67,558	67,558	227,24	0,000*
C×C	1	7,211	7,211	24,26	0,004*
2-Way Interaction	3	5,431	1,810	6,09	0,040*
A×B	1	0,476	0,476	1,60	0,261

A×C	1	3,133	3,133	10,54	0,023*
B×C	1	1,823	1,823	6,13	0.056
Error	5	1,487	0,297		
Lack-of-Fit	3	1,084	0,361	1,80	0,377
Pure Error	2	0,402	0,201		
Total	14	265,645			
R ²		99,44%			
R-sq(adj)		98,43%			
R-sq(pred)		93,13%			

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê.

Tầm quan trọng của các biến đơn, biến bình phương và biến tương tác đối với năng suất sinh khối (Y_{PHB}) được thể hiện trong **Bảng 3.8**. Dữ liệu cho thấy mô hình (model) và tính chất tuyến tính (linear), cường độ ánh sáng (A), pH ban đầu (B), và nhiệt độ nuôi (C) đều ảnh hưởng lớn đến hàm lượng PHB của *S. salina* M8 vì giá trị $p < 0,05$, thể hiện tác động có ý nghĩa thống kê. Điều quan trọng là pH thể hiện mức độ ảnh hưởng lớn nhất đối với hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* M8 do F -value = 544,30, lớn hơn rất nhiều so với 23,52 của cường độ ánh sáng (A) và 57,95 của nhiệt độ nuôi (C), 98,72 của mô hình, và 208,59 của tính chất tuyến tính. pH điều chỉnh cân bằng CO_2/HCO_3^- , ảnh hưởng trực tiếp đến cơ chế tập trung CO_2 (CCM) và hoạt tính của các enzym quang hợp như Rubisco. pH tối ưu vừa nâng cao dòng carbon vào chu trình Calvin, vừa thúc đẩy cung cấp acetyl-CoA – tiền chất trực tiếp của PHB. pH quá thấp làm giảm chuyển CO_2 sang HCO_3^- , còn pH quá cao gây kết tủa phosphate, làm giảm ATP và cofactor cần cho sinh tổng hợp PHB. Trong khi đó, yếu tố nhiệt độ (C) có F -value = 57,95, p -value = 0,001, nhiệt độ thích hợp (25–35°C) sẽ tăng hoạt tính enzym và tốc độ chuyển hóa, đặc biệt trong giai đoạn tích lũy vật chất dự trữ, qua đó hỗ trợ tổng hợp PHB. Cường độ ánh sáng (A) tương ứng có giá trị F -value = 23,52, p -value = 0,005, đây là nguồn cung cấp năng lượng cho quá trình quang dưỡng. Trong dải khảo sát (4.500–13.500 lux), tăng cường độ ánh sáng vừa đủ có thể đẩy nhanh tốc độ quang hợp, tạo nhiều NADPH và ATP – hai yếu tố quan trọng cho con đường tổng hợp PHB. Tuy nhiên, mức ảnh hưởng vẫn nhỏ hơn nhiều so với pH và nhiệt độ.

Các biến bình phương $A \times A$, $B \times B$, và $C \times C$ tất cả cũng thu được $p < 0,05$ và thể hiện là biến quan trọng trong mô hình và ảnh hưởng có ý nghĩa về mặt thống kê đến hàm lượng PHB của *S. salina* M8. Trong số đó, thứ tự mức độ ảnh hưởng được sắp xếp là $B \times B > C \times C > A \times A$ do F -value của ba biến đó được xếp theo thứ tự tương ứng là $227,24 > 24,26 > 9,89$. Biến bình phương $B \times B$ có F -value = 227,24, p -value = 0,000 – mạnh nhất, cho thấy hàm lượng PHB đạt cực đại tại một giá trị pH tối ưu, pH quá cao hoặc quá thấp đều làm giảm PHB. Biến bình phương $C \times C$ có F -value = 24,26, p -value = 0,004 – phản ánh tồn tại nhiệt độ tối ưu, vượt hoặc thấp hơn mức này đều kém hiệu quả tích lũy PHB. Biến bình phương $A \times A$ có F -value = 9,89, p -value = 0,026 – cho thấy ánh sáng cũng có ngưỡng tối ưu; quá mạnh có thể gây stress quang, ức chế tổng hợp PHB. Các hiệu ứng bậc hai chứng tỏ rằng việc điều chỉnh từng yếu tố cần xác định đỉnh tối ưu chứ không chỉ tăng/giảm tuyến tính.

Biến tương tác $A \times C$ có $p = 0,023 < 0,05$ cũng thể hiện mức độ ảnh hưởng lớn đến hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* M8. Tuy nhiên, các biến tương tác $A \times B$ và $B \times C$ đều có p -value $> 0,05$ và thể hiện ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến hàm lượng PHB trong sinh khối của *S. salina* M8. Mặt khác, chỉ số Lack-of-Fit của mô hình toán hàm lượng PHB có giá trị p -value = 0,377 $> 0,05$ và $F = 1,80$ nên mô hình và số liệu đo đạc từ thí nghiệm là có độ tương thích rất cao. Tất cả số liệu thu được ở Bảng phân tích ANOVA của hàm lượng PHB (**Bảng 3.8**) chứng tỏ rằng mô hình này chính xác và đáng tin cậy. Điều này được xác nhận thêm bởi hệ số tương quan của R^2 ở các giá trị 99,44%. Các phân tích khuyến nghị rằng mô hình phù hợp tốt với dữ liệu thực nghiệm, và do đó nó có thể được áp dụng để dự đoán chính xác kết quả PHB từ các thí nghiệm thiết kế theo Bảng Box-Behnken.

Bảng 3.9. Hệ số tương quan các biến tương ứng của mô hình hồi quy hàm lượng PHB của *S. salina* M8

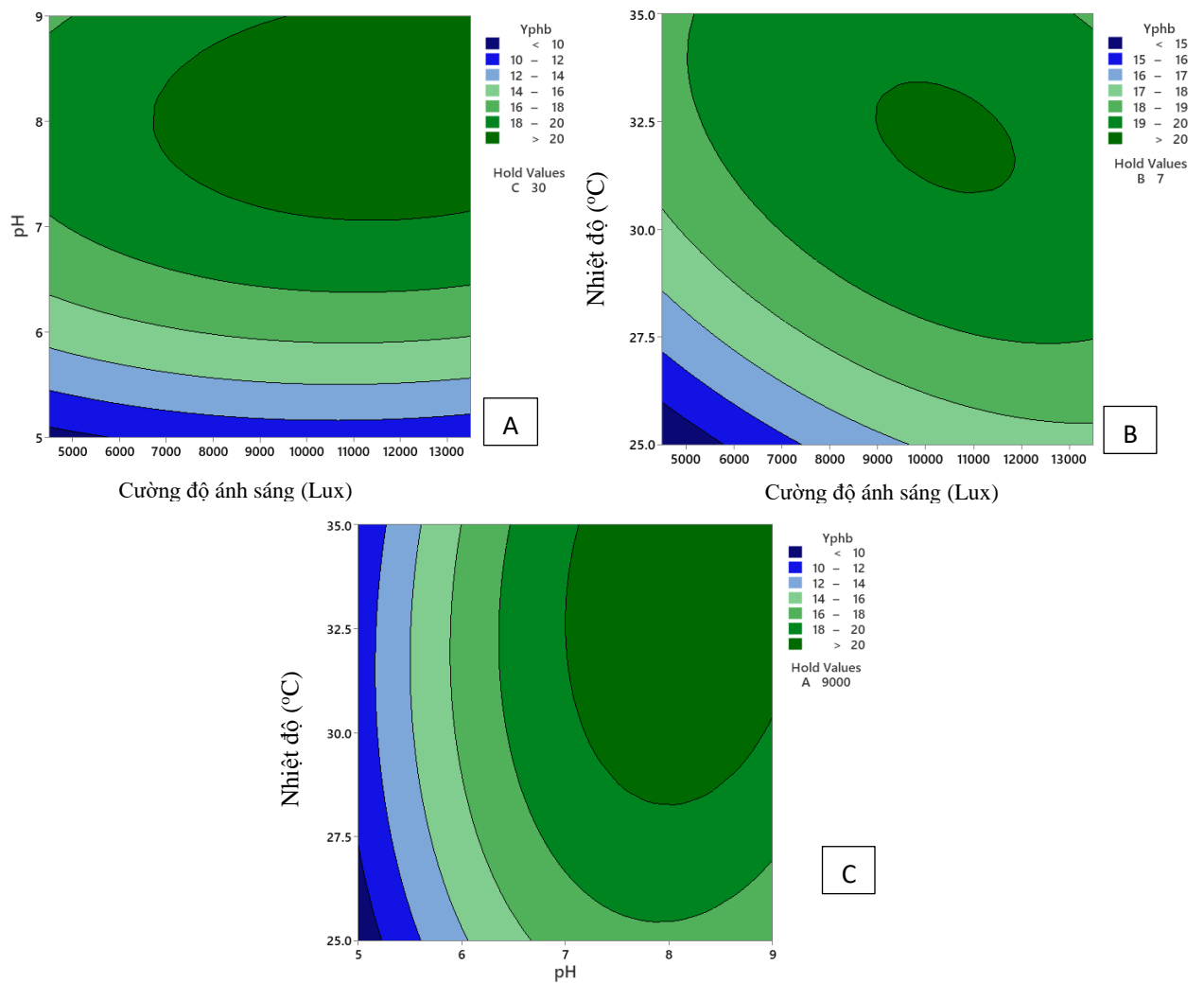
Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	19,620	0,315	62,32	0,000*
A	0,935	0,193	4,85	0,005*
B	4,498	0,193	23,33	0,000*
C	1,468	0,193	7,61	0,001*
A×A	-0,892	0,284	-3,15	0,026*
B×B	-4,277	0,284	-15,07	0,000*
C×C	-1,397	0,284	-4,92	0,004*
A×B	0,345	0,273	1,27	0,261
A×C	-0,885	0,273	-3,25	0,023*
B×C	0,675	0,273	2,48	0,056

*Giá trị thể hiện có ảnh hưởng lớn ở mức có ý nghĩa thống kê.

Phương trình của hàm hồi quy của hàm lượng PHB trong sinh khối *S. salina* M8 biểu diễn theo ba biến cường độ ánh sáng, pH ban đầu và nhiệt độ nuôi được viết theo biến mã hóa và các hệ số tương quan của các biến theo **Bảng 3.9** như sau (3.2):

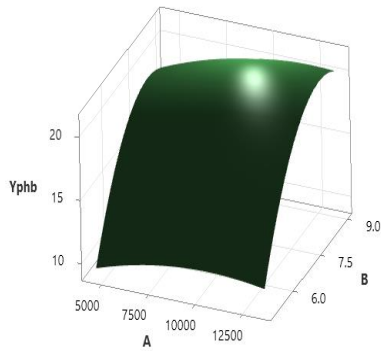
$$Y_{\text{PHB}} = 19,620 + 0,935A + 4,498B + 1,468C - 0,8921A \times A - 4,277B \times B - 1,397C \times C - 0,885A \times C \quad (3.2)$$

Phương trình cho phép xác định giá trị tối ưu của cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ để đạt hàm lượng PHB cao nhất, đồng thời khẳng định vai trò chi phối của pH, tầm quan trọng của các hiệu ứng phi tuyến và tương tác ánh sáng - nhiệt độ trong quá trình tích lũy PHB của *S. salina* M8.

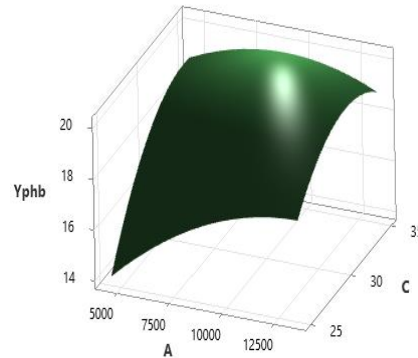


Hình 3.6. Đồ thị 2D về tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8

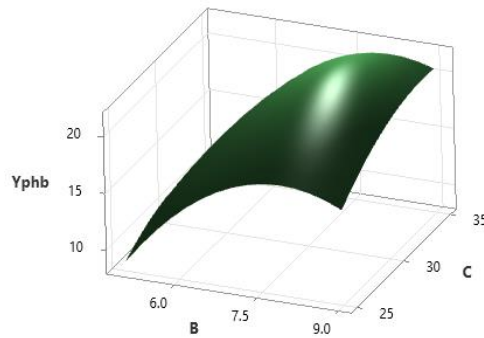
(A): Cường độ ánh sáng và pH (B): Nhiệt độ và cường độ ánh sáng (C): pH và nhiệt độ



A



B

Hold Values
A 9000

Hình 3.7. Đồ thị bề mặt 3D về tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8

A): Cường độ ánh sáng và pH B): Nhiệt độ và cường độ ánh sáng C): pH và nhiệt độ

Các biểu đồ đường viền hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8 được hiển thị trong **Hình 3.6** là đồ thị 2-D mô tả mối quan hệ giữa hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8 và cường độ ánh sáng, pH môi trường và nhiệt độ nuôi. Kết quả cho thấy quá trình tích lũy PHB chịu ảnh hưởng đồng thời và có tính phụ thuộc rõ rệt vào sự kết hợp của các yếu tố này. Cụ thể, đồ thị **Hình 3.6-A** cho thấy hàm lượng PHB vượt quá 20% đạt được trong một vùng điều kiện khá rộng, tương ứng với cường độ ánh sáng từ 7.000–13.500 lux, pH môi trường từ 7,5–9,0 và nhiệt độ xấp xỉ 30°C. Điều này phản ánh quá trình sinh tổng hợp PHB mạnh mẽ của *S. salina* M8 dưới điều kiện ánh sáng tương đối cao và môi trường kiềm nhẹ. Tương tự, khi pH ban đầu được cố định ở mức 7,0 (**Hình 3.6-B**), hàm lượng PHB trên 20% vẫn được ghi nhận trong khoảng cường độ ánh sáng 9.000–12.000 lux và nhiệt độ nuôi cấy 31–32°C, cho thấy sự phối hợp tối ưu giữa ánh sáng và nhiệt độ trong điều kiện pH trung tính. Ngược lại, khi cường độ ánh sáng được giữ cố định ở mức 9.000 lux (**Hình 3.6-C**), sự tích lũy PHB trên 20% được quan sát trong dải pH tương đối rộng (7,0–9,0) và khoảng nhiệt độ từ

28–35°C, qua đó nhấn mạnh vai trò đặc biệt quan trọng của nhiệt độ đối với quá trình sinh tổng hợp polymer nội bào. Kết quả này cho thấy *S. salina* M8 có khả năng duy trì tích lũy PHB hiệu quả trong một khoảng điều kiện nhiệt tương đối linh hoạt. Dựa trên mô hình hồi quy, giá trị tối ưu trong không gian biến khảo sát được dự đoán tại cường độ ánh sáng 9.800 lux, pH ban đầu 8,0 và nhiệt độ 32°C, tại đó hàm lượng PHB đạt cực đại 21,4% (**Hình 3.5**). Tổng hợp các kết quả cho thấy sự kết hợp giữa ánh sáng tương đối cao, pH kiềm nhẹ và nhiệt độ ở mức tối ưu nhưng không gây stress là các điều kiện then chốt để tối đa hóa khả năng sinh tổng hợp PHB của *S. salina* M8.

Hình 3.5 trình bày kết quả tối ưu hóa đa phản hồi được tạo ra từ mô hình Box–Behnken cho *S. salina* M8, đồng thời tối đa hóa sinh khối ($Y_{\text{sinh khối}}$) và hàm lượng PHB (Y_{PHB}). Ba yếu tố gồm cường độ ánh sáng (A), độ pH ban đầu (B) và nhiệt độ (C) được hiển thị dọc theo phía trên, với mỗi cột thể hiện sự thay đổi của mức độ mong muốn và phản hồi dự đoán trong phạm vi thí nghiệm của chúng. Biểu đồ tối ưu hóa này cho thấy rằng, độ pH là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến cả sản lượng sinh khối và PHB, trong khi nhiệt độ cũng có tác động bậc hai mạnh mẽ, góp phần đáng kể vào việc tối đa hóa cả hai phản hồi. Hơn nữa, cường độ ánh sáng đóng vai trò tích cực nhưng ít chi phối hơn, với giá trị tối ưu gần 10.000 lux. Trong không gian tham số được nghiên cứu, các điều kiện tối ưu cho năng suất sinh khối và sản lượng PHB về cơ bản trùng khớp. Cả hai mô hình hồi quy bậc hai đều dự đoán cùng một điều kiện tối ưu: cường độ ánh sáng ≈ 9.800 Lux, pH $\approx 8,0$ và nhiệt độ $\approx 32^\circ\text{C}$, tại đó sinh khối tối đa ($\approx 2,73$ g/L) và hàm lượng PHB tối đa ($\approx 21,4\%$) đạt được đồng thời (**Bảng 3.10**). Sự hội tụ này được hỗ trợ thêm bởi phân tích mức độ mong muốn đa phản hồi (**Hình 3.5**), cho thấy một điểm tối ưu toàn cục duy nhất tối đa hóa cả hai phản hồi, và bởi giá trị R^2 cao của cả hai mô hình ($> 99\%$), cho thấy sự phù hợp dự đoán mạnh mẽ. Do đó, hình ảnh minh họa trực quan hiệu quả của mô hình thống kê và xác nhận tính ảnh hưởng của các điều kiện tối ưu được suy ra để tăng cường sản xuất polymer sinh học trong *S. salina* M8.

Từ quan điểm sinh lý học, sự tăng trưởng sinh khối và sự tích lũy PHB thường tách rời nhau ở vi khuẩn lam: sinh khối thường đạt mức tối đa trong điều kiện tăng trưởng thuận lợi, trong khi PHB thường được tăng cường dưới áp lực dinh dưỡng hoặc môi trường. Tuy nhiên, một số cơ chế giải thích lý do *S. salina* M8 không thể hiện sự thay đổi trong các điều kiện thử nghiệm:

- Vai trò chủ đạo của pH đối với cả hai phản ứng: pH là yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến cả sinh khối và PHB (giá trị F cao nhất trong ANOVA, **Bảng 3.6, 3.7, 3.8 và 3.9**). Độ pH hơi kiềm (~ 8) đồng thời tối ưu hóa khả năng cung cấp carbon vô cơ (sự chiếm ưu thế của HCO_3^-), hiệu quả quang hợp và hoạt động của các enzyme sinh tổng hợp PHB, tạo điều kiện tối ưu cho sự tăng trưởng và lưu trữ polymer.

- Dòng carbon đầy đủ dưới điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tối ưu: Ánh sáng vừa phải đến mạnh (~10.000 lux) và nhiệt độ trung bình (~32°C) tối đa hóa quá trình cố định carbon quang hợp. Trong những điều kiện này, nguồn cung cấp carbon vượt quá nhu cầu tức thời cho sự phân chia tế bào, cho phép lượng carbon dư thừa được chuyển hóa thành PHB mà không ức chế sự tăng trưởng.

- Không có sự căng thẳng dinh dưỡng mạnh trong giai đoạn tối ưu hóa: Trong quá trình tối ưu hóa Box–Behnken, CO₂, nitrate, phosphate, sục khí và thời gian nuôi cấy được cố định ở mức không giới hạn. Điều này tránh được sự căng thẳng dinh dưỡng nghiêm trọng, nếu không sẽ thúc đẩy sự tích lũy PHB mà làm giảm sinh khối, từ đó thúc đẩy sự tối ưu đồng thời.

- Chiến lược phân bổ carbon hiệu quả của *S. salina* M8: Chủng này có khả năng tích lũy PHB như một bể chứa carbon thứ cấp trong khi vẫn duy trì tốc độ tăng trưởng cao, không giống như nhiều vi khuẩn lam khác, nơi quá trình tổng hợp PHB chỉ được kích thích bởi stress.

Sự trùng lặp của các điều kiện tối ưu rất có lợi cho việc mở rộng quy mô. Điều này cho thấy rằng một cửa sổ vận hành duy nhất có thể được sử dụng để đồng thời tối đa hóa năng suất sinh khối và sản lượng PHB, đơn giản hóa việc điều khiển lò phản ứng và giảm nhu cầu về các chiến lược hai giai đoạn hoặc kích thích stress. Điều này trực tiếp củng cố tính ứng dụng thực tiễn của các phương trình dự đoán cho các hệ thống canh tác thực tế.

Tóm lại, mặc dù sản lượng sinh khối và PHB thường bị chi phối bởi các yếu tố sinh lý khác nhau, dữ liệu thực nghiệm cho thấy *S. salina* M8 thể hiện các điểm tối ưu trùng khớp cho cả hai phản ứng trong không gian thiết kế đã được nghiên cứu, nhờ vào sự sẵn có carbon thuận lợi, kiểm soát độ pH vượt trội và điều hòa trao đổi chất cân bằng.

Bảng 3.10. Tổng hợp kết quả tối ưu đồng thời sinh khối khô và hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8

Thông số tối ưu	Giá trị
pH	8,0
Cường độ ánh sáng (lux)	9.800
Nhiệt độ (°C)	32
Sinh khối khô (g/L)	2,73
Hàm lượng PHB tích lũy (%)	21,4

3.3.3. Kết quả thí nghiệm kiểm chứng mô hình tối ưu và đánh giá độ tin cậy của mô hình hồi quy bậc hai sinh khối khô và hàm lượng PHB

Thí nghiệm kiểm định mô hình được tiến hành dưới 05 tổ hợp thí nghiệm độc lập về cường độ ánh sáng, pH và nhiệt độ nuôi cấy (**Bảng 3.11**) nhằm đánh giá độ tin cậy của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$) và hàm lượng PHB (Y_{PHB}) của *S. salina* M8. Kết quả cho thấy mức độ phù hợp rất cao giữa các giá trị dự đoán từ mô hình và số liệu đo thực nghiệm đối với cả hai biến đáp ứng. Đối với sinh khối khô, sai lệch tương đối giữa giá trị dự đoán và giá trị thực nghiệm dao động trong khoảng 2,98–3,86%, đều nằm trong giới hạn chấp nhận $\pm 5\%$. Sai lệch âm lớn nhất (-3,86%) ghi nhận tại điều kiện cường độ ánh sáng 13.000 lux, pH ban đầu 9 và nhiệt độ nuôi 35°C, trong đó sinh khối đo được (1,99 g/L) chỉ thấp hơn không đáng kể so với giá trị dự đoán (2,07 g/L). Ngược lại, sai lệch dương lớn nhất (2,98%) xuất hiện tại cường độ ánh sáng 10.000 lux, pH 8,5 và nhiệt độ nuôi 35°C, với sinh khối thực nghiệm (2,42 g/L) rất gần với giá trị dự đoán (2,35 g/L). Những kết quả này khẳng định mô hình bề mặt đáp ứng mô tả chính xác xu hướng tăng trưởng sinh khối của *S. salina* M8 trong phạm vi điều kiện khảo sát. Tương tự, mô hình dự đoán hàm lượng PHB cũng cho thấy độ chính xác cao, với sai số tương đối chỉ dao động từ 0,99–3,71%, thấp hơn đáng kể so với ngưỡng xác nhận 5%. Sai lệch dương lớn nhất (3,71%) được ghi nhận tại điều kiện ánh sáng cao (13.000 lux), pH kiềm (9) và nhiệt độ 35°C, trong đó hàm lượng PHB đo được (20,98%) chỉ cao hơn nhẹ so với giá trị dự đoán (20,23%). Sai lệch nhỏ nhất (-0,71%) thu được tại cường độ ánh sáng 10.000 lux, pH 8 và nhiệt độ nuôi 30°C, phản ánh độ phù hợp cao của mô hình trong điều kiện nuôi cấy trung bình. Nhìn chung, mức sai số thấp và ổn định trong toàn bộ các thí nghiệm kiểm chứng cho thấy các mô hình hồi quy bậc hai được xây dựng cho sinh khối (phương trình 3.1) và hàm lượng PHB (phương trình 3.2) có độ tin cậy cao, đủ khả năng dự đoán chính xác hiệu suất sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong không gian tham số đã nghiên cứu.

Bảng 3.11. Kết quả tính toán theo mô hình hồi quy và đo thực tế từ thí nghiệm kiểm chứng hàm lượng sinh khối và PHB bởi *S. salina* M8 (n = 2)

STT	Cường độ ánh sáng (lux)	pH	Nhiệt độ (°C)	Sinh khối khô ($Y_{\text{sinh khối}}$, g/L)			Hàm lượng PHB (Y_{PHB} , %)		
				Tính từ mô hình	Đo thực tế	Sai số (%)	Tính từ mô hình	Đo thực tế	Sai số (SD)
1	9.000	7	30	2,57	2,61±0,04	1,56	19,62	20,02±1,34	2,04
2	13.000	9	35	2,07	1,99±0,07	-3,86	20,23	20,98±0,86	3,71
3	10.000	8	30	2,74	2,71±0,11	-1,09	21,00	20,85±0,98	-0,71
4	10.000	8,5	30	2,73	2,81±0,09	2,93	20,81	21,07±1,22	1,25
5	10.000	8,5	35	2,35	2,42±0,05	2,98	21,19	20,98±0,78	-0,99

Sai số (%) = [(Kết quả đo thực tế - Kết quả tính từ mô hình)/Kết quả tính từ mô hình]×100

3.4. Kết quả về ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi đến sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt của *S. salina* M8

Các điều kiện tối ưu được xác định trong Mục 3.3 được xây dựng trên cơ sở môi trường nuôi cấy trong điều kiện quang dưỡng với thành phần dinh dưỡng ổn định và được kiểm soát chặt chẽ. Khi chuyển sang môi trường nước thải sinh hoạt, vốn có thành phần dinh dưỡng phức tạp và biến động theo thời gian, không phải tất cả các điều kiện tối ưu đều có thể áp dụng trực tiếp.

Do đó, trong nội dung nghiên cứu này, các điều kiện đã được ứng dụng có chọn lọc. Một số yếu tố có ảnh hưởng rõ rệt và ổn định (như pH) tiếp tục được duy trì theo kết quả tối ưu hóa. Ngược lại, các yếu tố chịu tác động mạnh của thành phần nước thải, đặc biệt là tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P, được điều chỉnh và mở rộng phạm vi khảo sát nhằm phản ánh điều kiện thực tế của nước thải sinh hoạt. Các yếu tố đã được xác định là không ảnh hưởng đáng kể theo thiết kế sàng lọc Plackett–Burman (Mục 3.2) không được lặp lại trong hệ nước thải, nhằm giảm số lượng thí nghiệm nhưng vẫn đảm bảo tính khoa học, hiệu quả xử lý và khả năng tích lũy PHB của chủng *S. salina* M8.

3.4.1 Kết quả phân tích đặc tính của mẫu nước thải sinh hoạt

Kết quả phân tích đặc tính nước thải sinh hoạt sau xử lý sơ bộ (**Bảng 3.12**) cho thấy mẫu nước thải có pH trung tính, phù hợp với điều kiện sinh trưởng của *S. salina* M8 – chủng vi khuẩn lam đã được nuôi cấy hiệu quả trong môi trường BG-11 chuẩn. Hàm lượng tổng nitrogen cao, chủ yếu ở dạng amoni (N-NH_4^+ đạt $32,12 \pm 0,42$ mg/L), trong khi nitrate (N-NO_3^-) thấp hơn nhiều ($3,2 \pm 0,1$ mg/L), cho thấy quá trình nitrate hóa diễn ra hạn chế, đây là đặc trưng phổ biến của nước thải sinh hoạt chưa qua xử lý. Tổng nitrogen ($36,12 \pm 0,52$ mg/L) và tổng phosphorus ($5,2 \pm 0,2$ mg/L) nằm trong phạm vi giá trị được ghi nhận phổ biến đối với nước thải sinh hoạt trên thế giới (T-N = 20–70 mg/L; T-P = 3–10 mg/L), và cũng tương đồng với nồng độ quan sát trong nước thải đô thị ở các khu vực nhiệt đới như Việt Nam và Indonesia [2, 123-125]. Phosphorus tồn tại chủ yếu dưới dạng phosphate (P-PO_4^{3-}) với nồng độ $4,24 \pm 0,15$ mg/L, cung cấp đủ phosphorus để hấp thu cho quá trình chuyển hóa của vi tảo, nước thải có tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P theo khối lượng xấp xỉ 47:7:1 (tương đương tỷ lệ mol C:N:P = 121:15:1), tỷ lệ này gần với cân bằng dinh dưỡng tối ưu cho quá trình tạo sinh khối và tích lũy polymer sinh học [2, 123-125]. Hàm lượng COD ($325,6 \pm 0,3$ mg/L) cho thấy mức độ hữu cơ phân hủy sinh học trung bình, tương tự giá trị của nước thải sinh hoạt trung bình (250–500 mg/L) [2, 123-125], đồng thời cung cấp nguồn carbon hữu cơ tiềm năng cho vi tảo phát triển theo cơ chế dị dưỡng. Trong các thí nghiệm này, hệ nuôi cấy được vận hành với thời gian lưu thủy lực khoảng 7–8 ngày nhằm đảm bảo đủ thời gian cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn lam và hấp thu các chất dinh dưỡng trong nước thải.

Như vậy, nước thải sinh hoạt sau tiền xử lý vẫn duy trì các điều kiện hóa – lý và dinh dưỡng phù hợp cho nuôi cấy bền vững *S. salina* M8 cũng như cho quá trình tích lũy PHB.

Bảng 3.12. Kết quả phân tích chất lượng nước thải sau khi xử lý sơ bộ sử dụng trong các nghiên cứu thực nghiệm (n = 3)

STT	Thông số	Đơn vị	Giá trị của các chất ô nhiễm	QCVN 14:2025/BTNMT	
				Cột A	Cột B
1	pH	-	7,3 ± 0,2	6-9	6-9
2	Nhiệt độ	°C	25,67 ± 0,21	-	-
3	TSS	mg/L	1,4 ± 0,2	≤ 35	≤ 100
4	COD	mg/L	325,6 ± 0,3	≤ 50	≤ 60
5	N-NH ₄ ⁺	mg/L	32,12 ± 0,42	≤ 4,0	≤ 8,0
6	N-NO ₃ ⁻	mg/L	3,2 ± 0,1	30 ^(*)	50 ^(*)
7	T-N	mg/L	36,12 ± 0,52	≤ 25	≤ 30
8	P-PO ₄ ³⁻	mg/L	4,24 ± 0,15	6 ^(*)	10 ^(*)
9	T-P	mg/L	5,2 ± 0,2	≤ 2,5	≤ 3,0
10	Tỷ lệ C:N:P	Tỷ lệ khối lượng	47:7:1	-	-
		Tỷ lệ số mol	121:15:1	-	-

COD: Nhu cầu oxygen hóa học

T-P: Tổng phosphorus

BOD₅: Nhu cầu oxygen sinh hoá

T-N: Tổng nitrogen

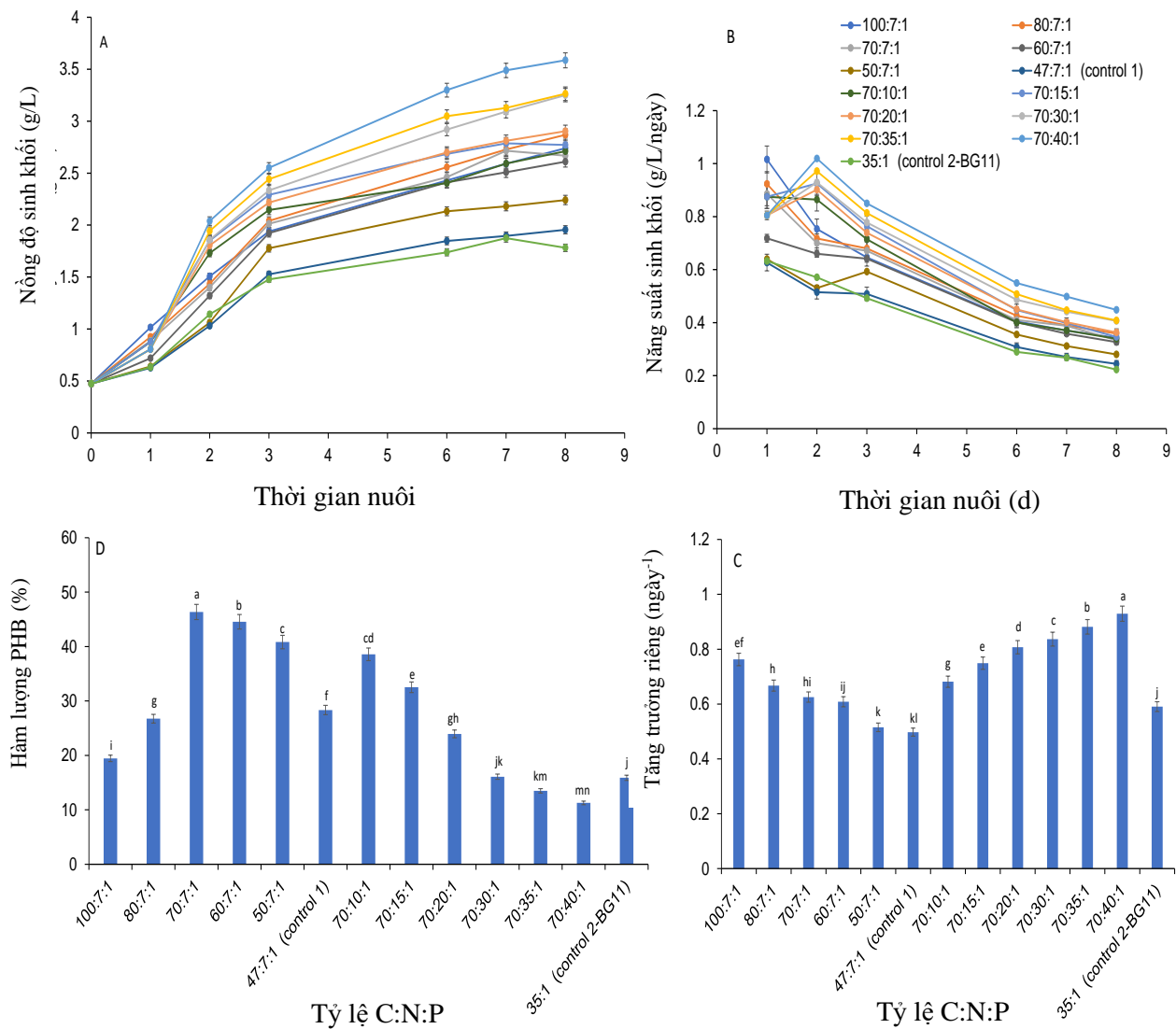
Ghi chú: (*): QCVN 14:2008/BTNMT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải sinh hoạt và QCVN 14:2025/BTNMT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về nước thải sinh hoạt và nước thải đô thị, khu dân cư tập trung.

3.4.2. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ C:N:P đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi *S. salina* M8

3.4.2.1. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ C:N:P đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB bởi *S. salina* M8

Kết quả khảo sát được thực hiện với nước thải đã tiệt trùng và môi trường chuẩn BG-11, với các tỷ lệ C:N:P trong nước thải tiệt trùng điều chỉnh carbon là (100:7:1); (80:7:1); (70:7:1), (60:7:1), (50:7:1), và mẫu đối chứng 1 (47:7:1, nước thải thô). Nước thải với tỷ lệ C:N:P điều chỉnh cả hai nguồn carbon và nitrogen là (70:10:1); (70:15:1); (70:20:1), (70:30:1), (70:40:1), và môi trường BG-11 chuẩn có tỷ lệ N:P = 35:1 (mẫu đối chứng 2).

Các điều kiện nuôi cấy được đồng bộ bao gồm: tỷ lệ giống ban đầu 50% (v/v) (tương ứng với sinh khối khô 0,5 g/L), pH = 7, cường độ ánh sáng 4.500 lux, nhiệt độ 27°C, sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm. Sau 8 ngày nuôi, sinh khối khô, tốc độ tăng trưởng riêng, năng suất sinh khối và hàm lượng PHB được đo lường và phân tích thể hiện trong **Hình 3.8**.



Hình 3.8. Sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải đã tiệt trùng với các tỷ lệ C:N:P khác nhau

Kết quả thí nghiệm trên **Hình 3.8** cho thấy, nồng độ sinh khối *S. salina* M8 tăng nhanh trong pha lũy thừa (ngày 0–4) và ổn định sau đó, đạt giá trị cực đại từ 1,87 đến 3,59 g/L tùy theo thành phần dinh dưỡng. Hai thí nghiệm đối chứng gồm nước thải sinh hoạt chưa điều chỉnh với tỷ lệ C:N:P = (47:7:1), phản ánh đặc điểm dinh dưỡng trong nước thải thực tế được sử dụng trong thí nghiệm và môi trường nhân tạo BG-11 có tỷ lệ N:P tương ứng là (35:1), chỉ đạt sinh khối khô 1,87 và 1,96 g/L. Việc bổ sung nguồn carbon bên ngoài (acid acetic) để điều chỉnh tỷ lệ C:N:P lên mức 50:7:1 đến 100:7:1, giúp tăng sinh khối khô của *S. salina* M8 lên 2,24–2,87 g/L. Đồng thời bổ sung cả acid

acetic và nitrate để đạt tỷ lệ C:N:P trong khoảng 70:10:1 đến 70:40:1 tiếp tục cải thiện sinh khối tăng từ 2,71 đến 3,59 g/L. Giá trị sinh khối cao nhất $3,59 \pm 0,09$ g/L thu được tại tỷ lệ C:N:P = (70:40:1), tiếp theo là tỷ lệ (70:35:1), sinh khối đạt ($3,26 \pm 0,11$ g/L) và tỷ lệ (70:30:1) đạt sinh khối tương ứng là ($3,25 \pm 0,07$ g/L) (**Hình 3.8-A**).

Về năng suất sinh khối (**Hình 3.8-B**), giá trị cao nhất được ghi nhận trong giai đoạn lũy thừa sớm (ngày 1–3) ở tỷ lệ (70:35:1) và (70:40:1) tương ứng là 1,0 và 1,1 g/L/ngày, sau đó giảm khi dinh dưỡng bị tiêu thụ và thấp nhất ở 2 mẫu đối chứng tỷ lệ (47:7:1) và (35:1:1), năng suất sinh khối chỉ đạt 0,61 – 0,62 g/L/ngày. Dữ liệu này một lần nữa khẳng định rằng cân bằng dinh dưỡng, đặc biệt giữa C, N và P, đóng vai trò then chốt trong hiệu quả sinh trưởng của *S. salina* M8.

Tốc độ sinh trưởng cực đại (μ_{\max}) (**Hình 3.8-C**), dao động từ 0,50 đến 0,93 ngày⁻¹, trong đó các giá trị cao nhất tại C:N:P = 70:35:1 và 70:40:1 (0,88 và 0,93 ngày⁻¹; $p = 0,002-0,014 < 0,05$). Ngược lại, hàm lượng PHB tăng mạnh trong điều kiện thiếu nitrogen ở mức vừa phải. Hàm lượng PHB cao nhất 46,4% được ghi nhận tại tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, tiếp theo là 44,6% (60:7:1) và 40,8% (50:7:1). Các mẫu đối chứng nước thải tiết trùng (C:N:P = 47:7:1) và môi trường BG-11 (N/P = 35:1) chỉ đạt 28,3% và 15,9% PHB ($p = 0,002-0,034$; **Hình 3.8-D**). Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước cho thấy giới hạn nitrogen hoặc phosphorus thúc đẩy chuyển hướng dòng carbon sang tổng hợp PHB ở vi khuẩn lam [88]. Điều này cũng được quan sát ở nhiều loài cyanobacteria khác như *Synechococcus* sp. MA19, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Aulosira fertilissima* và *Spirulina platensis*. Nhìn chung, kết quả cho thấy giới hạn dinh dưỡng ở mức vừa phải, đặc biệt tại C:N:P = 70:7:1, giúp tối ưu đồng thời sinh trưởng và tích lũy PHB, đạt năng suất PHB cực đại 0,14 g/L/ngày, khẳng định tính linh hoạt trao đổi chất và tiềm năng sản xuất nhựa sinh học của *S. salina* M8 dưới các điều kiện dinh dưỡng được kiểm soát. Hàm lượng nitrogen ở tỷ lệ (47:7:1) trong mẫu đối chứng lớn không đem lại hiệu quả tăng trưởng cao hơn mà còn gây mất cân bằng dinh dưỡng. Những kết quả này là cơ sở quan trọng để điều chỉnh dinh dưỡng trong quy trình nuôi cấy vi khuẩn lam nhằm tối ưu hóa sinh khối và hiệu quả xử lý nước thải.

3.4.2.2. Đánh giá hiệu quả xử lý chất ô nhiễm trong nước thải của *S. salina* M8 tại các tỷ lệ C:N:P

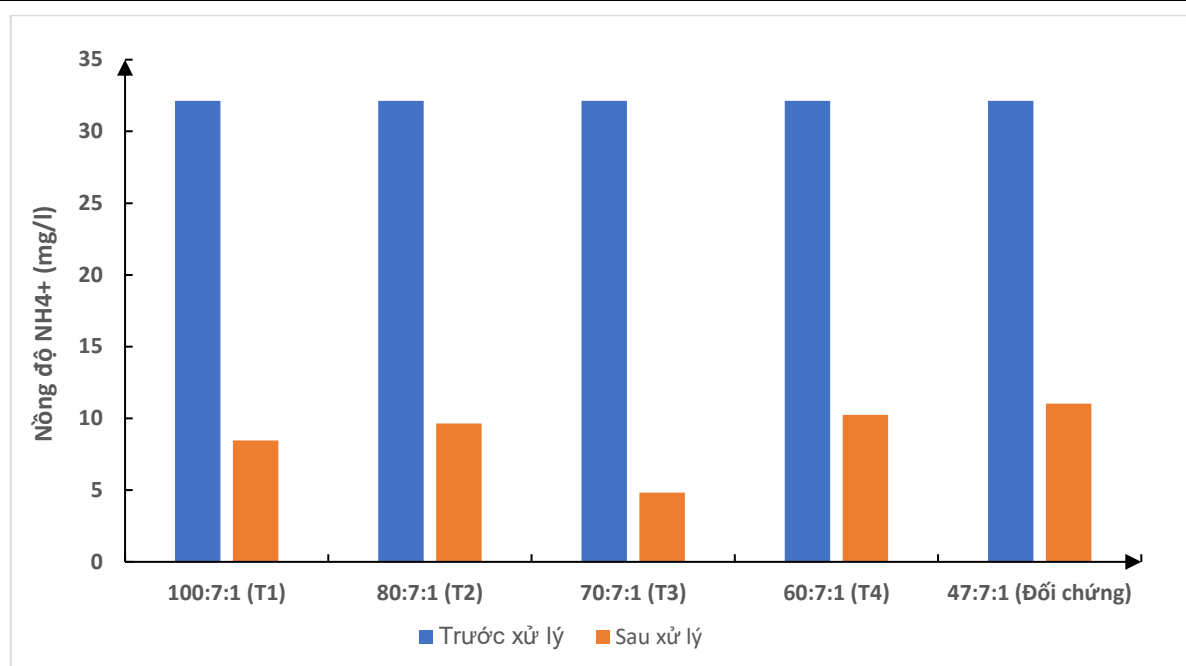
Nghiên cứu đã tiến hành phân tích nồng độ các chất ô nhiễm trong nước thải đã tiết trùng bao gồm: N-NH₄⁺, T-N, T-P, P-PO₄³⁻, COD (sau điều chỉnh) xử lý bằng *S. salina* M8, tại các tỷ lệ C:N:P khác nhau: (100:7:1, COD = 4.600 mg/L); (80:7:1, COD = 3.700 mg/L); (70:7:1, COD = 3.370 mg/L), (60:7:1, COD = 2.600 mg/L) và mẫu đối chứng (47:7:1, COD = 325,6 g/L). Hiệu quả xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bao gồm: N-NH₄⁺, T-N, T-P, P-PO₄³⁻, COD trong nước thải sau 8 ngày được thể hiện trong **Bảng 3.13** dưới đây:

Bảng 3.13. Nồng độ các chất ô nhiễm trong nước thải sau khi xử lý bởi *S. salina* M8 tại các tỷ lệ C:N:P khác nhau (n = 3)

Tỷ lệ C:N:P	NH ₄ ⁺ (mg/L)	T - N (mg/L)	P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	T - P (mg/L)	COD (mg/L)
100:7:1 (T1)	8,45± 0,15	8,84± 0,13	1,45± 0,20	2,1± 0,42	113,6 ± 0,85
80:7:1 (T2)	9,64± 0,21	10,84± 0,43	1,19± 0,20	1,66± 0,47	101 ± 0,16
70:7:1 (T3)	4,82± 0,11	5,42± 0,14	0,85± 0,10	1,14± 0,56	65,15 ± 0,18
60:7:1 (T4)	10,24±0,24	9,64± 0,16	1,30± 0,16	1,88± 0,31	93 ± 0,2
47:7:1 (Đối chứng)	11,03±0,31	10,56± 0,62	1,06± 0,08	1,56± 0,12	97 ± 0,23

- Đối với thông số N-NH₄⁺:

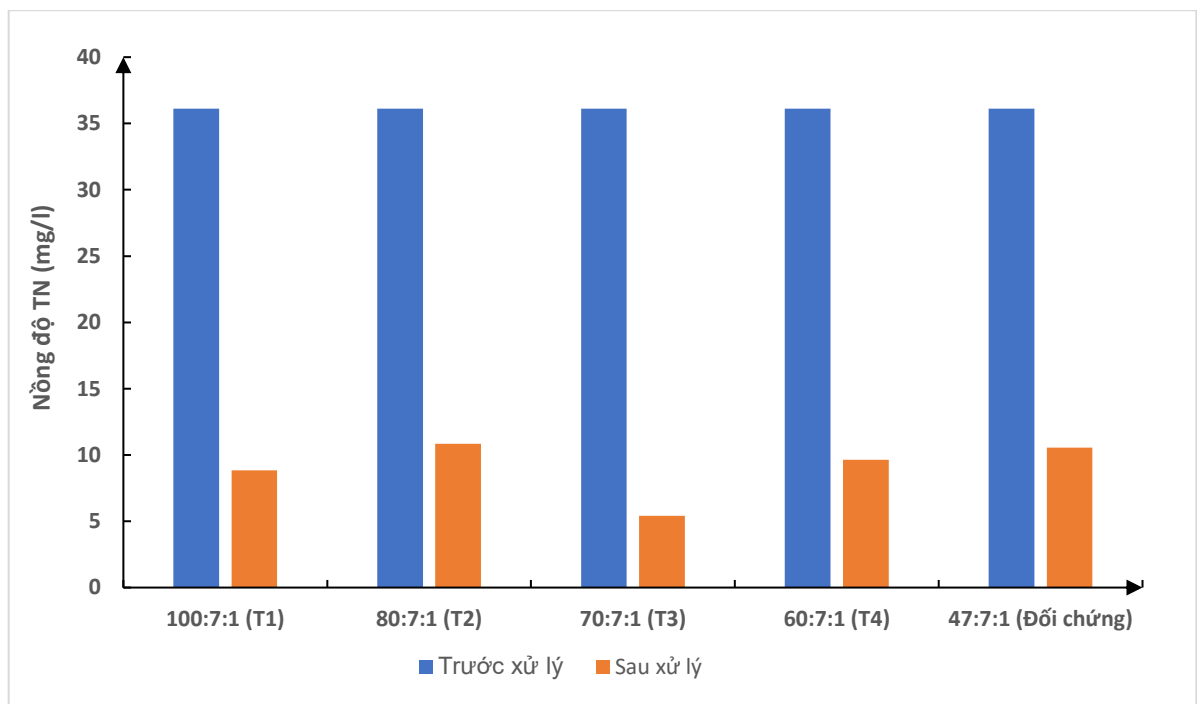
Số liệu trên **Hình 3.9** cho thấy hiệu quả loại bỏ N-NH₄⁺ bởi *S. salina* M8 phụ thuộc rõ rệt vào tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P. Ở tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, được xem là cân bằng tối ưu giữa carbon và nitrogen, sinh khối và quá trình đồng hóa nitrogen đều được duy trì hiệu quả và do đó nồng độ N-NH₄⁺ giảm mạnh từ 32,12 ± 0,42 mg/L xuống 4,82 ± 0,11 mg/L sau 8 ngày nuôi cấy, tương đương với hiệu suất đạt 84,99%. Khi tỷ lệ carbon tăng lên (100:7:1 và 80:7:1), nguồn carbon dồi dào cung cấp năng lượng nhưng có thể làm dịch chuyển phân bố dòng carbon nội bào về dự trữ (ưu tiên tích lũy PHB) hoặc gây biến đổi sinh lý (pH, stress chuyển hóa), từ đó giảm tỷ lệ đồng hóa nitrogen - kết quả là N-NH₄⁺ sau xử lý vẫn ở mức 8,45–9,64 mg/L (hiệu suất ~70–74%). Ngược lại, khi carbon ở mức thấp (mẫu đối chứng 47:7:1 và 60:7:1), thiếu carbon hạn chế tốc độ tăng trưởng và nhu cầu nitrogen để tổng hợp sinh khối, dẫn tới đồng hóa N-NH₄⁺ kém hơn và nồng độ sau xử lý cao hơn (10,24–11,03 mg/L; hiệu suất ~65–68%). Tóm lại, dữ liệu cho thấy cân bằng hợp lý giữa C và N là yếu tố then chốt để vừa duy trì sinh khối, vừa tối đa hóa đồng hóa N-NH₄⁺, cả dư carbon lẫn thiếu carbon đều làm giảm hiệu suất khử N-NH₄⁺ nhưng thông qua những cơ chế khác nhau như dịch chuyển dòng carbon sang dự trữ hoặc hạn chế sinh tổng hợp tương ứng.



Hình 3.9. Nồng độ $N-NH_4^+$ trong nước thải trước và sau xử lý bởi *S. salina* M8 - Đối với thông số tổng nitrogen (T-N):

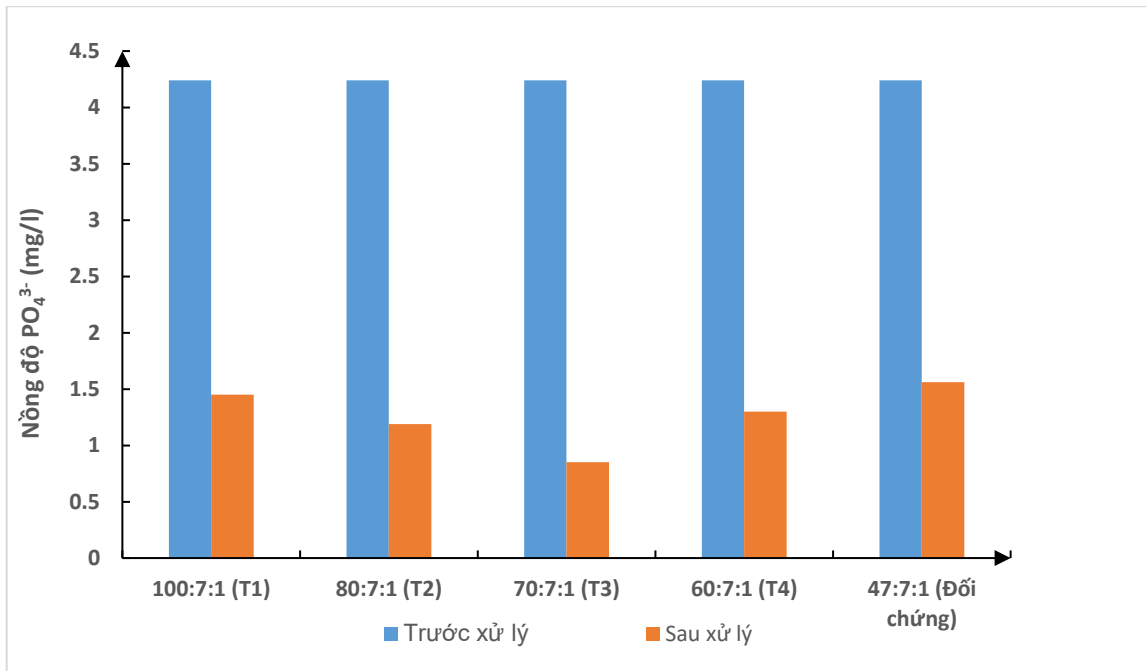
Các kết quả **Hình 3.10**, cho thấy tỷ lệ dinh dưỡng đầu vào có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả loại bỏ tổng nitrogen (T-N) của *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt. Trong điều kiện tối ưu với tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, *S. salina* M8 đạt hiệu suất xử lý T-N cao nhất (84,99%), chứng tỏ môi trường dinh dưỡng cân bằng đã thúc đẩy hiệu quả chuyển hóa và hấp thu nitrogen. Ở tỷ lệ C:N:P = 100:7:1 và 80:7:1, nguồn carbon cao, hàm lượng nitrogen thấp hơn làm giảm hiệu suất loại bỏ tổng nitrogen (T-N), nguyên nhân là do dư thừa carbon thúc đẩy phân hướng carbon vào dự trữ (PHB) thay vì vào sinh khối chứa nitrogen do đó làm giảm nhu cầu đồng hóa nitrogen; đồng thời dư carbon có thể gây thay đổi pH hoặc stress chuyển hóa, ảnh hưởng đến cơ chế hấp thu nitrogen của tế bào. Vì nước thải đã tiệt trùng (không có dị dưỡng cạnh tranh), các cơ chế nội bào của vi khuẩn lam là nhân tố chính giải thích hiện tượng này. Ở tỷ lệ (60:7:1) và (47:7:1), hiệu suất thấp nhất đạt 70,8-73,3%), tỷ lệ này phản ánh thiếu carbon tương đối so với nhu cầu tổng hợp sinh khối nhanh làm giảm tỷ lệ đồng hóa nitrogen.

Như vậy, đối với nước thải đã tiệt trùng, tỷ lệ C:N:P \approx 70:7:1 là điều kiện tối ưu hóa khả năng loại bỏ tổng nitrogen (T-N) vì cân bằng giữa nguồn carbon và nhu cầu đồng hóa nitrogen cho sinh khối.



Hình 3.10. Nồng độ T-N trong nước thải trước và sau xử lý
- Đối với thông số $P-PO_4^{3-}$

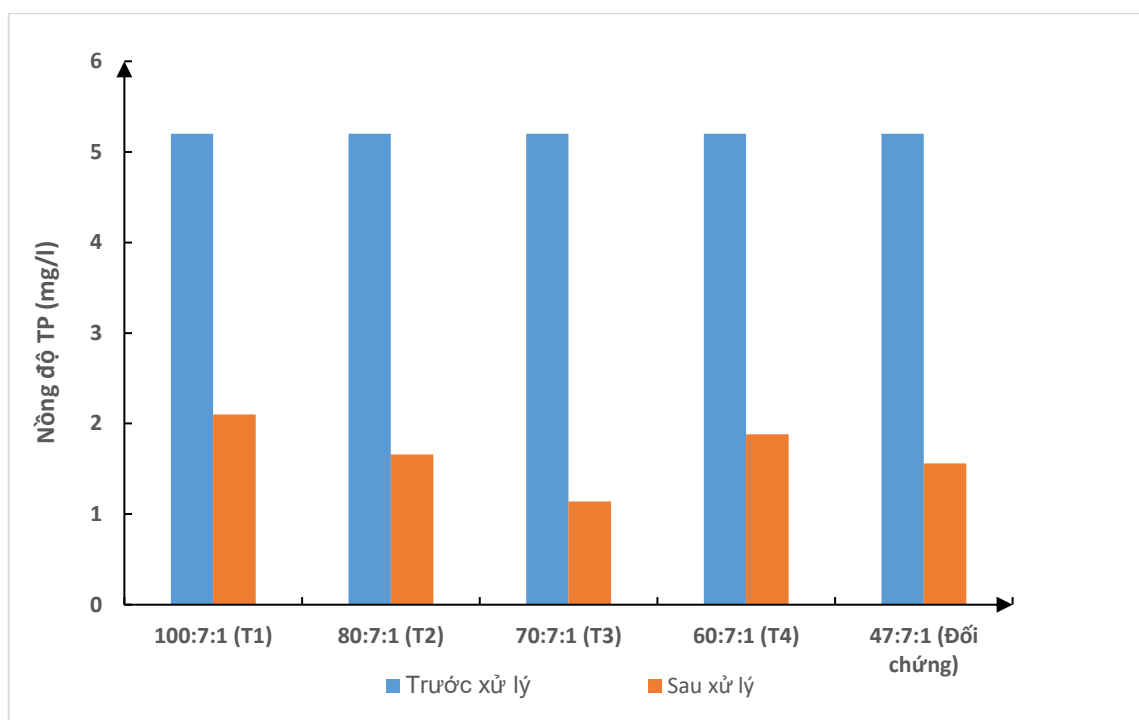
Kết quả thể hiện trong **Hình 3.11** cho thấy hiệu quả loại bỏ phosphorus ($P-PO_4^{3-}$) trong nước thải sinh hoạt bởi *S. salina* M8 phụ thuộc chặt chẽ vào tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P đầu vào. Ở nghiệm thức tối ưu với tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, nồng độ $P-PO_4^{3-}$ giảm từ $4,24 \pm 0,15$ mg/L xuống còn $0,85 \pm 0,10$ mg/L sau 8 ngày nuôi, đạt hiệu suất xử lý cao nhất khoảng 83%. Điều này cho thấy điều kiện dinh dưỡng cân bằng đã tạo thuận lợi cho vi khuẩn lam hấp thu phosphorus hiệu quả để phục vụ cho quá trình tăng trưởng và tích lũy sinh khối từ đó thúc đẩy hấp thu và cố định các chất dinh dưỡng vào sinh khối vi khuẩn lam. Ở các tỷ lệ giàu carbon (100:7:1 và 80:7:1), mặc dù carbon dồi dào cung cấp năng lượng cho quang hợp, nhưng dư thừa carbon có xu hướng làm chuyển dòng chuyển hóa sang tích lũy các hợp chất dự trữ như PHB, làm giảm nhu cầu sử dụng dinh dưỡng cho tăng trưởng sinh khối. Do đó, hiệu quả xử lý giảm, thể hiện qua nồng độ sau xử lý cao hơn (1,45–1,19 mg/L). Ngược lại, tại các tỷ lệ carbon thấp (60:7:1 và 47:7:1), nguồn carbon trở thành yếu tố giới hạn sinh trưởng, làm giảm khả năng đồng hóa và tích lũy dinh dưỡng của *S. salina* M8. Do đó, hiệu quả xử lý không cao, với nồng độ sau xử lý tăng trở lại ($1,30 \pm 0,16$ và $1,56 \pm 0,12$ mg/L). Do hệ nước thải đã được tiệt trùng, các biến động này phản ánh trực tiếp đáp ứng sinh lý và trao đổi chất nội tại của *S. salina* M8, không chịu ảnh hưởng của vi sinh vật dị dưỡng.



Hình 3.11. Nồng độ $P-PO_4^{3-}$ trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi *S. salina* M8

- Đối với thông số tổng phosphorus (T-P)

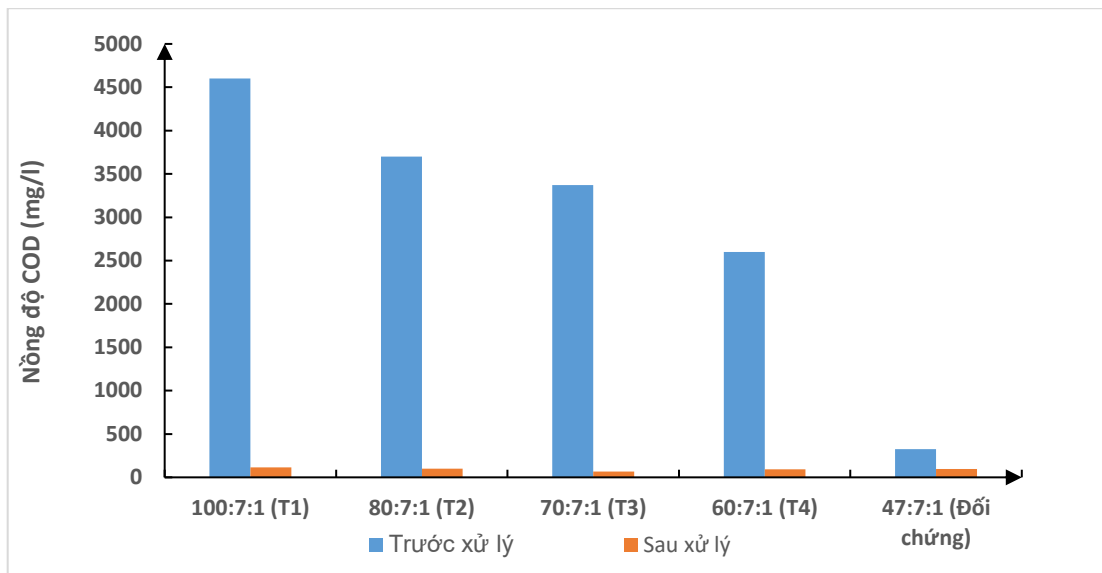
Kết quả tại **Hình 3.12** cho thấy hiệu quả loại bỏ tổng phosphorus (T-P) của *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt đã tiết trùng cũng phụ thuộc vào tỷ lệ C:N:P. Nồng độ T-P sau xử lý dao động từ 1,14 đến 2,1 mg/L, phản ánh sự khác biệt về khả năng đồng hóa phosphorus dưới các điều kiện carbon khác nhau. Tỷ lệ 70:7:1 cho hiệu quả xử lý cao nhất đạt 78%, nồng độ sau xử lý $1,14 \pm 0,56$ mg/L, cho thấy sự cân bằng tối ưu giữa carbon và nhu cầu phosphorus cho sinh trưởng và sinh tổng hợp tế bào. Ở các tỷ lệ giàu carbon (100:7:1 và 80:7:1), hiệu quả loại bỏ T-P giảm do dư thừa carbon làm giảm nhu cầu phosphorus cho tăng trưởng. Ngược lại, tại các tỷ lệ carbon thấp (60:7:1 và 47:7:1), sinh trưởng bị hạn chế, dẫn đến giảm hấp thu phosphorus và T-P sau xử lý tăng trở lại. Kết quả khẳng định rằng duy trì tỷ lệ C:N:P cân bằng (70:7:1), là điều kiện tối ưu đồng thời hiệu quả xử lý phosphorus và sinh trưởng của vi khuẩn lam trong hệ thống nước thải.



Hình 3.12. Nồng độ T-P trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi *S. salina* M8 - Đối với thông số COD

Bảng 3.14. Hàm lượng COD đầu vào (sau điều chỉnh) tại các tỷ lệ và hiệu suất xử lý (n = 3)

Tỷ lệ C:N:P	COD đầu vào (sau điều chỉnh; mg/L)	COD sau xử lý (mg/L)	Hiệu suất (%)
100:7:1 (T1)	4.600	113,6 ± 0,85	97,5
80:7:1 (T2)	3.700	101 ± 0,16	97,2
70:7:1 (T3)	3.370	65,15 ± 0,18	98
60:7:1 (T4)	2.600	93 ± 0,2	96,4
47:7:1 (Đối chứng)	326	97 ± 0,23	70



Hình 3.13. Nồng độ COD trong nước thải trước và sau khi xử lý bởi *S. salina* M8

Ở các tỷ lệ giàu carbon (100:7:1 và 80:7:1), COD sau xử lý cao hơn đáng kể ($113,6 \pm 0,85$ và $101 \pm 0,16$ mg/L). Dư thừa carbon trong các điều kiện này có thể vượt quá năng lực đồng hóa của tế bào, làm giảm hiệu quả chuyển hóa hoàn toàn carbon hữu cơ. Đồng thời, carbon dư thừa có xu hướng được chuyển hướng vào các dạng dự trữ nội bào (như PHB), thay vì bị loại bỏ hoàn toàn khỏi hệ thống, dẫn đến COD còn lại cao hơn. Ngược lại, tại các tỷ lệ carbon thấp (60:7:1 và 47:7:1), mặc dù lượng carbon ban đầu thấp hơn, nồng độ COD còn lại $93 \pm 0,2$ và $97 \pm 0,23$ mg/L, cao hơn giới hạn cho phép theo QCVN 14:2025/BTNMT (cột B). Điều này là do carbon trở thành yếu tố giới hạn sinh trưởng, làm giảm hoạt động trao đổi chất tổng thể và năng lực đồng hóa carbon của *S. salina* M8. Khi sinh trưởng bị hạn chế, tốc độ sử dụng và chuyển hóa carbon hữu cơ cũng suy giảm, dẫn đến hiệu quả xử lý COD thấp hơn so với điều kiện tối ưu. Do nước thải đã được tiệt trùng, sự suy giảm COD trong hệ thống chủ yếu phản ánh khả năng hấp thu và chuyển hóa carbon trực tiếp của *S. salina* M8, không chịu ảnh hưởng của vi sinh vật dị dưỡng. Kết quả này khẳng định rằng tỷ lệ C:N:P cân bằng, đặc biệt ở mức 70:7:1, là yếu tố quyết định để tối ưu hóa hiệu quả xử lý COD, đồng thời duy trì sinh trưởng ổn định và hiệu quả trao đổi chất của vi khuẩn lam trong hệ thống nước thải sinh hoạt.

Tổng hợp kết quả xử lý các chỉ tiêu ô nhiễm chính như carbon hữu cơ (COD), nitrogen ($N-NH_4^+$, T-N) và phosphorus ($P-PO_4^{3-}$, T-P) được thể hiện trong **Bảng 3.15**. Trong đó, nghiệm thức có tỷ lệ C:N:P = 70:7:1 cho thấy hiệu suất xử lý tổng thể cao nhất và chất lượng nước thải sau xử lý đạt QCVN 14:2025/BTNMT, cột B (Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về nước thải sinh hoạt và nước thải đô thị, khu dân cư tập trung). Do đó, tỷ lệ C:N:P = 70:7:1 được xác định là điều kiện tối ưu và lựa chọn để thực hiện cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo nhằm đánh giá hiệu quả xử lý và tích lũy sinh khối của *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt.

Bảng 3.15. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi *S. salina* M8 tại tỷ lệ C:N:P = 70:7:1 (n = 3)

Tỷ lệ C:N:P = 70:7:1	N-NH₄⁺	T-N	PO₄³⁻	T-P	COD
Trước xử lý (mg/L)	32,12 ± 0,42	36,12 ± 0,52	4,24 ± 0,15	5,2 ± 0,2	3.370 ± 5,7
Sau xử lý (mg/L)	4,82 ± 0,11	5,42 ± 0,14	0,85 ± 0,10	1,14 ± 0,56	65,15 ± 0,18
QCVN 14:2025/BTNMT (Cột B)	≤ 8,0	≤ 30	-	≤ 3	≤ 60
Hiệu suất (%)	84,99	84,99	83	78	98

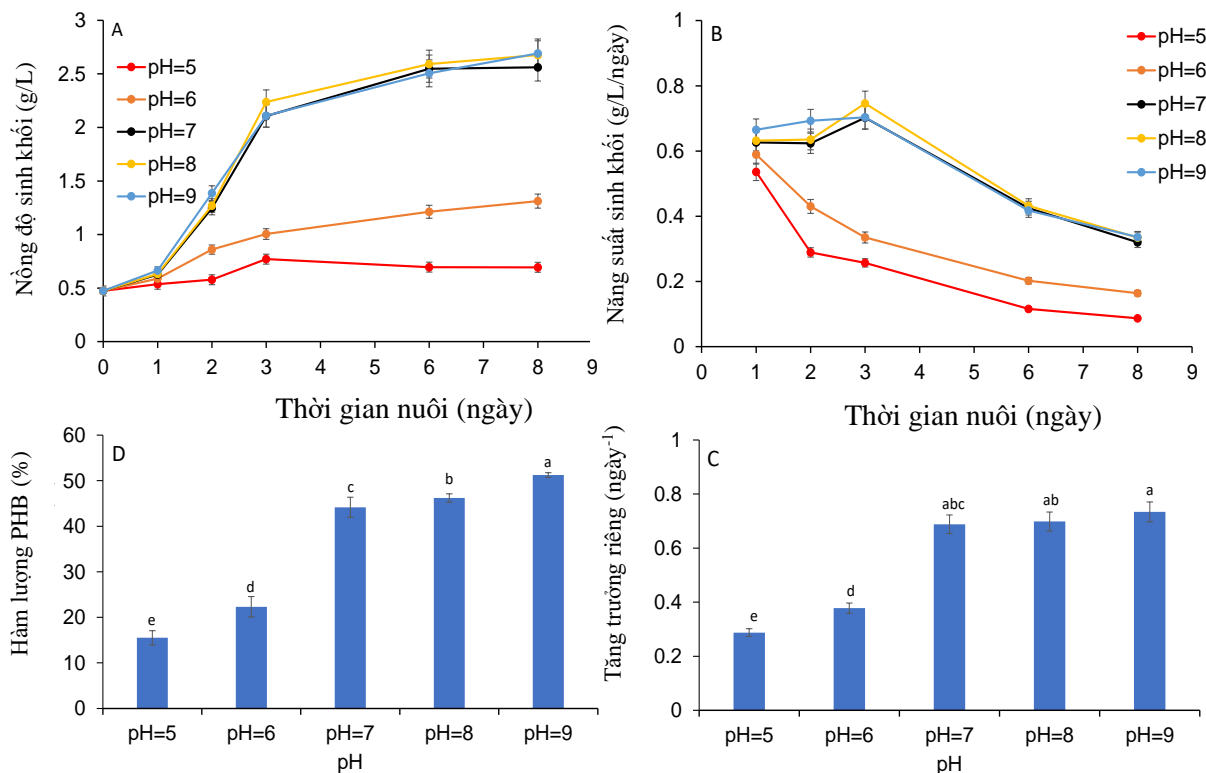
Kết quả cho thấy, sau 8 ngày nuôi cấy trong điều kiện tỷ lệ dinh dưỡng C:N:P = 70:7:1, hàm lượng các chất ô nhiễm chính trong nước thải như N-NH₄⁺, T-N, T-P, P-PO₄³⁻ và COD đều giảm đáng kể, cho thấy hiệu quả hấp thu và xử lý các chất ô nhiễm của *S. salina* M8. Cụ thể, nồng độ N-NH₄⁺ và T-N đều đạt hiệu suất xử lý 84,99%, chứng minh khả năng loại bỏ hiệu quả cả dạng nitrogen vô cơ lẫn hữu cơ. Hàm lượng P-PO₄³⁻ và T-P cũng được loại bỏ với hiệu suất lần lượt 83% và 78%, đáp ứng yêu cầu xả thải theo QCVN 14:2025/BTNMT (cột B). Ngoài ra, hàm lượng COD giảm từ 3370 ± 5,7 mg/L xuống còn 65,15 ± 0,18 mg/L, tương đương hiệu suất xử lý đạt 98%, cho thấy *S. salina* M8 không chỉ xử lý hiệu quả các chất dinh dưỡng mà còn góp phần loại bỏ chất hữu cơ trong nước thải. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nattawut Krasaesueb và cộng sự, (2019), trong đó chủng *Synechocystis* sp. được nuôi trong nước thải giàu N-NH₄⁺ và P-PO₄³⁻ đã cho hiệu suất loại bỏ chất dinh dưỡng lần lượt là 96,99% đối với phosphate; 80,10% đối với nitrate; 67,90% đối với nitrite và 98,07% đối với ammonium [146]. Đồng thời, nghiên cứu cũng tương đồng với nghiên cứu của Li và cộng sự, (2024), khi nuôi cấy kết hợp vi tảo chủng *Chlorella vulgaris* và vi khuẩn hiếu khí trong nước thải hỗn hợp ở tỷ lệ C:N = 15:1, đạt hiệu suất loại bỏ COD, NH₄⁺-N và TP cao nhất, lần lượt chiếm 60,89 ± 1,80%, 43,38 ± 1,00% và 68,55 ± 0,59% [170]. Như vậy, việc điều chỉnh tỷ lệ dinh dưỡng cân đối giữa C:N:P = (70:7:1) trong nước thải đầu vào kết hợp với nồng độ giống ban đầu 0,5 g/L, cường độ ánh sáng 4.500 lux, pH = 7 và nhiệt độ 27°C đã tạo môi trường tối ưu cho *S. salina* M8 sinh trưởng tốt và xử lý hiệu quả các chất ô nhiễm và đồng thời tích lũy sinh khối phục vụ mục tiêu sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB.

3.4.3. Kết quả về ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi *S. salina* M8

3.4.3.1. Kết quả về ảnh hưởng của pH đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB bởi *S. salina* M8

pH là một yếu tố chỉ thị quan trọng, phản ánh tình trạng dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy, đặc biệt liên quan đến nguồn cung cấp bicarbonat và khí CO₂ hòa tan là các thành phần cần thiết cho quá trình quang hợp của vi khuẩn lam. Trong môi trường nuôi *S. salina* M8 thì pH đóng vai trò then chốt, vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng hấp thu dinh dưỡng (như nitrate, phosphate) cũng như điều chỉnh tốc độ trao đổi khí và sinh trưởng của tế bào vi khuẩn lam. Các điều kiện thực nghiệm: tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, nhiệt độ 27°C, cường độ ánh sáng 4500 lux, sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) với lưu lượng 0,1 vvm, nước thải đã tiệt trùng.

Số liệu trong (**Hình 3.14-A**) cho thấy, sinh khối khô tăng nhanh trong 3–4 ngày đầu và sau đó đạt trạng thái ổn định ở tất cả các nghiệm thức, với giá trị sinh khối cao nhất (2,6 – 2,7 g/L) tại pH = 7 – 9, tiếp theo là 1,3 g/L tại pH = 6 và thấp nhất 0,6 g/L ở pH 5. Tương tự, năng suất sinh khối đạt cực đại vào ngày 2–3 của quá trình nuôi, đạt mức 0,65–0,75 g/L/ngày ở pH = 7 – 9, so với mức thấp hơn nhiều là 0,335 g/L/ngày tại pH = 6 và 0,26 g/L/ngày tại pH = 5 (**Hình 3.14-B**). Tốc độ sinh trưởng cực đại (μ_{max} , **Hình 3.14-C**) cũng phản ánh xu hướng tương tự, tăng từ khoảng 0,3 ngày⁻¹ tại pH = 5 lên 0,7–0,8 ngày⁻¹ ở pH = 7–9 ($p = 0,002–0,03 < 0,05$). Hàm lượng PHB bị chi phối mạnh bởi pH, với giá trị cao nhất tại pH = 8 và 9 (tương ứng với PHB = 46–51%), mức trung bình tại pH = 7 (PHB = 44%), và giảm mạnh tại pH = 6 (PHB = 22%) và pH = 5 (PHB = 16%) ($p = 0,001–0,023 < 0,05$ (**Hình 3.14-D**)). Kết quả cho thấy *S. salina* M8 sinh trưởng và tích lũy PHB hiệu quả nhất trong điều kiện trung tính đến kiềm nhẹ (pH = 7–9), trong khi môi trường acid gây ức chế đáng kể cả sinh trưởng lẫn tổng hợp PHB. Điều này cho thấy môi trường kiềm không chỉ thúc đẩy hình thành sinh khối mà còn tăng cường dự trữ carbon dưới dạng PHB. Các phát hiện trên phản ánh khả năng thích ứng tốt với pH và linh hoạt về trao đổi chất của *S. salina* M8, khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng này trong sản xuất nhựa sinh học từ nước thải dưới điều kiện kiềm nhẹ. Đặc biệt, khả năng duy trì đồng thời sinh trưởng và tích lũy vật liệu nhựa cho thấy *S. salina* M8 ít gặp sự biến động về trao đổi chất như nhiều chủng vi khuẩn lam khác.



Hình 3.14. Sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải ở các giá trị pH khác nhau

So sánh với các loài vi khuẩn lam khác cho thấy *S. salina* M8 vừa thể hiện những đặc điểm tương đồng, vừa có những khác biệt rõ rệt. Tương tự vi khuẩn lam nói chung, *S. salina* M8 cũng giảm sinh trưởng trong môi trường acid, trong khi nhiều loài vi khuẩn lam được nuôi tối ưu ở pH = 7–9 do hạn chế trong hấp thu carbon vô cơ và hoạt tính enzyme. Dưới các điều kiện gây stress (như thiếu dinh dưỡng hoặc pH bất lợi), nhiều loài vi khuẩn lam có xu hướng chuyển hướng dòng carbon sang tổng hợp polymer dự trữ (ví dụ như PHB), nhưng điều này thường đi kèm với sự suy giảm mạnh sinh khối [24]. Đối với chủng *Synechocystis* sp. PCC 6803 tích lũy PHB dưới điều kiện thiếu nitrogen nhưng thường chỉ đạt hàm lượng PHB thấp (~5–13% khối lượng khô) khi stress nhẹ [24], trừ khi được biến nạp di truyền hoặc bổ sung acetate (khi đó có thể đạt trên 60% PHB). Trong một thử nghiệm pilot trên nước thải, *Synechocystis* sp. PCC6714 MT_a24 đạt hàm lượng PHB tối đa 23,7% dưới điều kiện hạn chế dinh dưỡng, đồng thời sinh khối đạt 3,5 g/L [59]. Trong nghiên cứu này, cho thấy *S. salina* M8 có thể tích lũy PHB lên đến ~50% đồng thời vẫn duy trì sinh khối > 2 g/L trong khoảng pH 7–9. Điều này cho thấy *S. salina* M8 sở hữu khả năng linh hoạt trao đổi chất, cho phép vừa tăng trưởng sinh khối vừa tích lũy carbon dưới dạng PHB trong các điều kiện pH thuận lợi, đây được coi là một đặc tính ít gặp ở vi khuẩn lam, trừ khi bị stress nghiêm trọng hoặc được biến nạp di truyền.

Những khác biệt này cho thấy *S. salina* M8 là một chủng thích hợp cho các hệ thống sản xuất đồng thời sinh khối và tiền chất nhựa sinh học trong điều kiện stress vừa

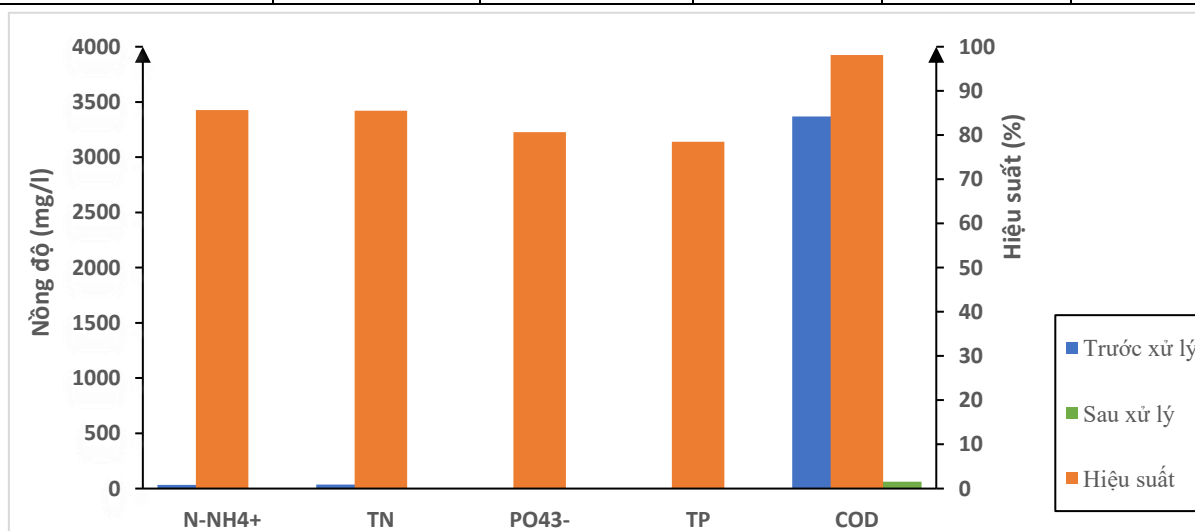
phải, trong khi nhiều vi khuẩn lam khác thường cần chấp nhận đánh đổi sinh trưởng hoặc phải tăng cường di truyền mới đạt được hiệu suất PHB cao.

3.4.3.2. Đánh giá hiệu quả xử lý chất ô nhiễm trong nước thải của *S. salina* M8 tại pH = 7

Kết quả phân tích nồng độ và hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm của *S. salina* M8 tại pH = 7 trong nước thải sinh hoạt được thể hiện trong **Bảng 3.16** và **Hình 3.15**.

Bảng 3.16. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi *S. salina* M8 tại pH = 7 (n = 3)

pH = 7.0	NH ₄ ⁺ (mg/L)	T - N (mg/L)	P-PO ₄ ³⁻ (mg/L)	T - P (mg/L)	COD (mg/L)
Trước xử lý	32,12 ± 0,42	36,12 ± 0,52	4,24 ± 0,15	5,2 ± 0,2	3370 ± 5.7
Sau xử lý	4,61 ± 0,22	5,23 ± 0,25	0,82 ± 0,05	1,12 ± 0,15	63,33 ± 0,5
QCVN 14:2025/BTNMT (Cột B)	≤ 8,0	≤ 30	-	≤ 3	≤ 60
Hiệu suất (%)	85,65	85,52	80,66	78,46	98,1



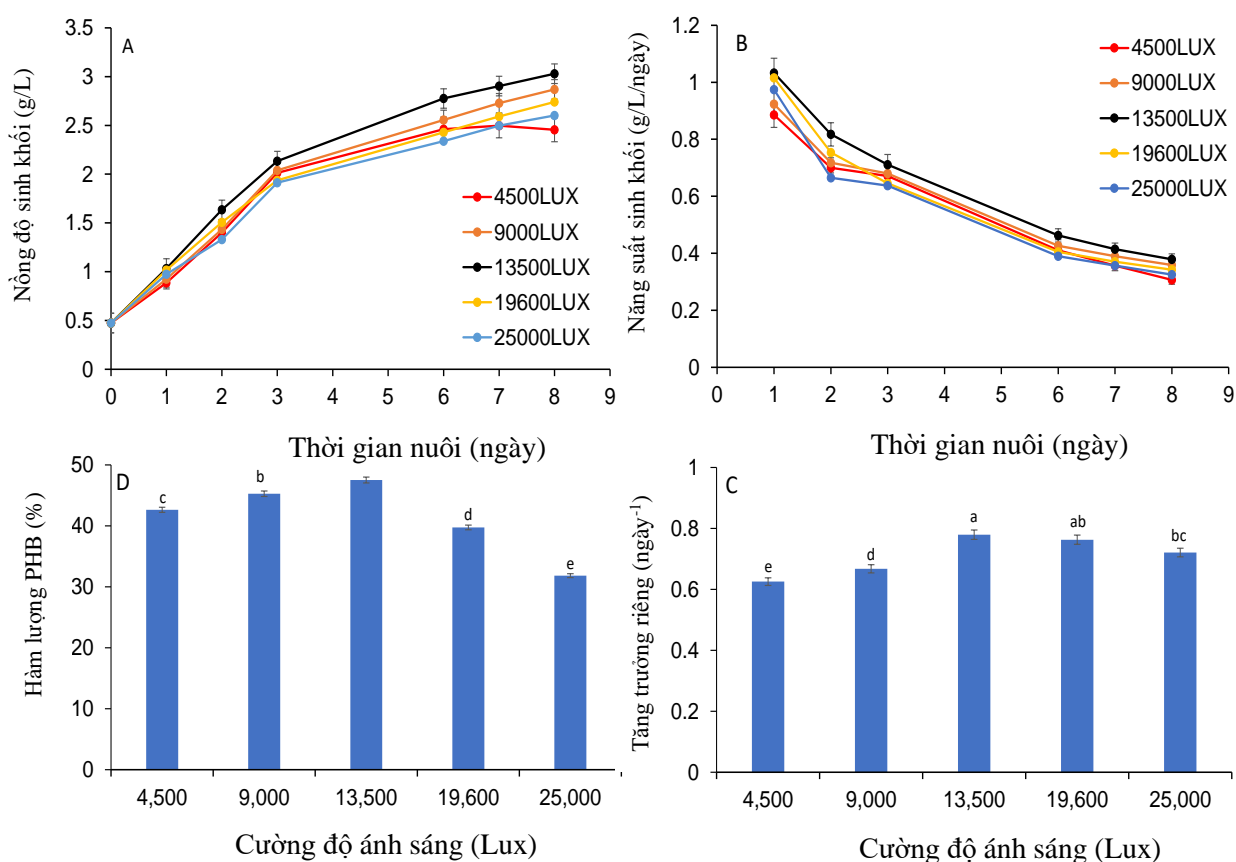
Hình 3.15. Nồng độ và hiệu suất xử lý chất ô nhiễm trong nước thải bởi *S. salina* M8

Kết quả thể hiện trên **Hình 3.15** cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy tại giá trị pH = 7, nồng độ các chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt giảm rõ rệt. Hiệu suất xử lý cao nhất ghi nhận đối với N-NH₄⁺, đạt 85,65% (từ 32,12 ± 0,42 mg/L xuống 4,61 ± 0,22 mg/L), chứng tỏ khả năng loại bỏ N-NH₄⁺, hiệu quả của *S. salina* M8. Tổng nitrogen (T-N) đạt 85,52% (từ 36,12 ± 0,52 mg/L còn 5,23 ± 0,25 mg/L). Điều này cho thấy *S. salina* M8 không chỉ hấp thu N-NH₄⁺ mà còn có khả năng xử lý hiệu quả các dạng nitrogen khác trong nước thải. Tương tự, hàm lượng phosphate hòa tan (P-PO₄³⁻) và tổng phosphorus (T-P) sau xử lý cũng giảm đáng kể với hiệu suất lần lượt là 80,66% và 78,46%, chứng tỏ khả năng loại bỏ đồng thời phosphorus cả ở dạng vô cơ và hữu

ơ. Ngoài ra, hàm lượng COD - đại diện cho chất hữu cơ trong nước thải cũng được giảm mạnh từ 3370 ± 5.7 mg/L xuống $63,33 \pm 0,5$ mg/L, tương đương với hiệu suất đạt 98,1%. Các số liệu trong nghiên cứu này là đồng nhất với các kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Đoàn Thị Oanh và cộng sự, (2020), trong đó chủng *Chlorella vulgaris* CNK có tốc độ sinh trưởng tối ưu tại pH = 7 với hiệu suất xử lý N-NH₄⁺ đạt 54% [171]. So sánh này càng củng cố thêm hiệu quả sinh trưởng và xử lý vượt trội của chủng *S. salina* M8 tại điều kiện pH trung tính trong môi trường nước thải.

3.4.4. Kết quả về ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến tăng trưởng sinh khối, tích lũy PHB và hiệu quả xử lý nước thải bởi *S. salina* M8

Cường độ ánh sáng ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và khả năng xử lý nước thải của *S. salina* M8. Lựa chọn được cường độ ánh sáng tối ưu sẽ giúp *S. salina* M8 tăng trưởng tốt thông qua quá trình quang hợp và loại bỏ được hàm lượng nitrogen, phosphate đồng thời giúp tăng oxygen hoà tan trong nước thải. Tuy nhiên nếu cường độ sáng quá lớn thì có thể gây ức chế quá trình quang hợp và làm giảm hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm. Kết quả sinh trưởng của *S. salina* M8 ở các cường độ ánh sáng khác nhau với điều kiện nuôi cấy: tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, pH ban đầu = 7, nhiệt độ 27°C, tốc độ sục khí hỗn hợp không khí + CO₂ (2% CO₂, v/v) là 0,1 vvm, nước thải đã tiệt trùng sau 8 ngày được thể hiện trong **Hình 3.16**.



Hình 3.16. Sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải ở cường độ ánh sáng khác nhau

Kết quả thể hiện trên **Hình 3.16**, cho thấy ảnh hưởng của các mức cường độ ánh sáng khác nhau đến sinh trưởng và khả năng tích lũy PHB của *S. salina* M8. Như thể hiện ở **Hình 3.16-A**, sinh khối khô tăng ổn định trong suốt thời gian nuôi ở tất cả các mức chiếu sáng, đạt 2,6–3,1 g/L sau 8 ngày nuôi cấy. Sinh khối cao nhất đạt được tại 13.500 lux (3,1 g/L), tiếp theo là 19.600 và 9.000 lux (3,0 g/L), trong khi mức ánh sáng 4.500 và 25.000 lux cho sinh khối thấp hơn (2,8–2,9 g/L).

Năng suất sinh khối đạt cực đại vào ngày thứ 2, với giá trị khoảng 1,0–1,1 g/L/ngày tại 13.500 lux, và giảm nhẹ ở cả mức ánh sáng thấp hơn và cao hơn (**Hình 3.16-B**). Tốc độ sinh trưởng đặc hiệu cực đại (μ_{\max}) cũng tăng đáng kể từ 0,6 ngày⁻¹ ở 4.500 lux lên 0,8 ngày⁻¹ tại 13.500 lux ($p = 0,001 < 0,05$), sau đó giảm nhẹ còn 0,7 ngày⁻¹ tại 19.600 – 25.000 lux ($p = 0,19 < 0,05$) (**Hình 3.16-C**). Hàm lượng PHB phụ thuộc rõ rệt vào cường độ ánh sáng, cao nhất tại 13.500 lux (PHB = 48%), tiếp theo là 9.000 và 4.500 lux (PHB = 44–46%, $p = 0,017 < 0,05$). Trong khi đó, ánh sáng cao (19.600–25.000 lux) làm giảm tích lũy PHB, chỉ còn 40% và 35% ($p = 0,003 < 0,05$) (**Hình 3.16-D**).

Các kết quả này cho thấy cường độ ánh sáng trung bình – cao (13.500 lux) là tối ưu cho cả sinh trưởng và tổng hợp PHB của *S. salina* M8, trong khi cường độ ánh sáng quá cao có thể gây ức chế quang hóa và làm giảm hiệu suất tích lũy PHB. Xu hướng này phù hợp với các kết quả trước đây ở nhiều loài vi khuẩn lam và vi tảo, trong đó cường độ ánh sáng quá thấp hoặc quá cao đều hạn chế sinh trưởng và khả năng tích lũy carbon nội bào. Ví dụ, Rueda và García (2021) sử dụng mô hình động học cho quá trình tạo PHB ở vi khuẩn lam và chỉ ra rằng cường độ chiếu sáng tối ưu (khoảng 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) giúp tối đa hóa cả năng suất sinh khối và tích lũy PHB. Mô hình của họ mô tả chính xác sự cân bằng giữa thiếu sáng và ức chế quang hóa, tương đồng với quan sát trong nghiên cứu này khi cường độ ánh sáng vượt quá 13.500 lux làm giảm hàm lượng PHB, có thể do stress và tổn thương quang oxy hóa [107].

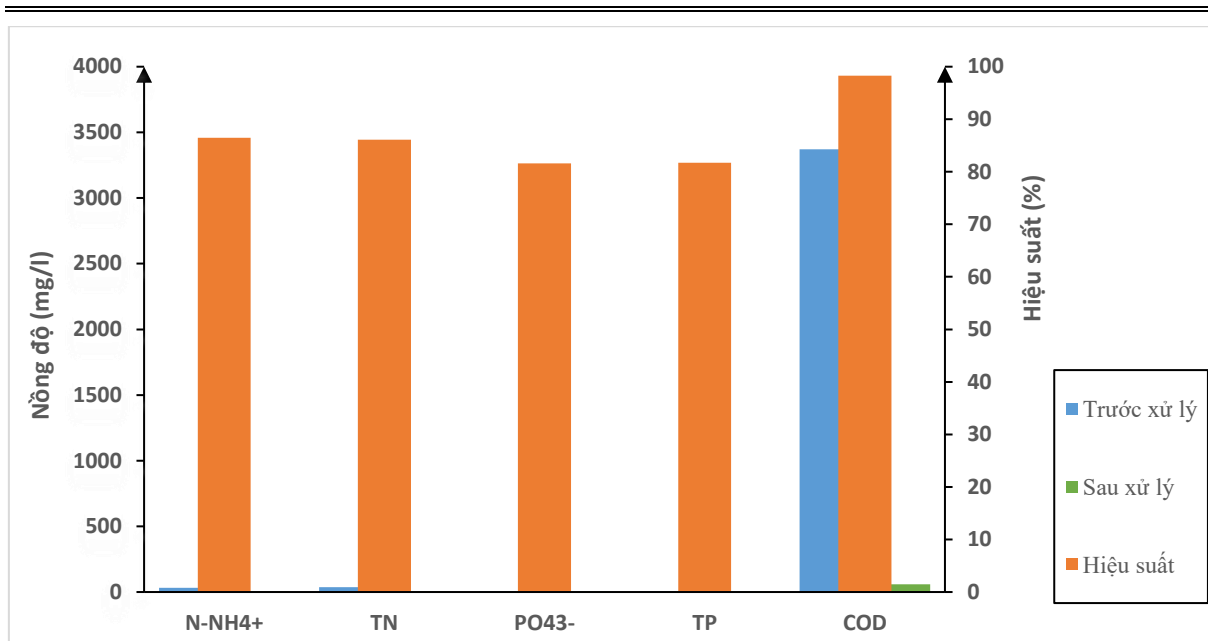
Tương tự, Perez Couñago và cộng sự, (2025) mô phỏng sự tăng trưởng của vi khuẩn lam dưới nhiều mức chiếu sáng khác nhau và cho thấy các hệ vi sinh vật chiếm ưu thế bởi *Synechocystis* và *Synechococcus* đạt năng suất PHB tối ưu ở khoảng 400–800 PPFD (≈ 12.000 – 16.000 lux). Mô hình cũng dự báo sự suy giảm năng suất khi vượt quá ~ 1000 PPFD, phù hợp với dữ liệu của nghiên cứu này khi lượng PHB giảm ở 25.000 lux. Hơn nữa, Perez Couñago và cộng sự, (2025) nhận thấy năng suất PHB trong hệ *Synechocystis* có thể tăng $\sim 18,6\%$ khi tối ưu hóa ánh sáng - rất tương đồng với mức tăng quan sát được ở *S. salina* M8 giữa hai điều kiện chiếu sáng chưa tối ưu

và tối ưu. Các kết quả này cũng phù hợp với Gracioso và cộng sự, (2021), người ghi nhận rằng ánh sáng cao có thể kích thích tăng PHB ở *Synechocystis* phân lập từ rừng ngập mặn, dù vẫn tồn tại giới hạn ức chế ánh sáng [60]. Ngược lại, Rueda và cộng sự, (2022) cho thấy mặc dù tăng ánh sáng làm tăng năng suất PHB theo thể tích ở *Synechocystis* sp., nhưng không làm thay đổi đáng kể hàm lượng PHB (% trọng lượng khô) [110]. Như vậy, kết quả nghiên cứu này cho thấy tầm quan trọng của việc xác định “vùng ánh sáng tối ưu theo từng chủng”: đối với *S. salina* M8, khoảng tối ưu nằm trong vùng ánh sáng trung bình – cao; vượt quá mức này, khả năng tích lũy PHB giảm, có thể do stress quang hoặc thay đổi hướng phân bố carbon nội bào. Các so sánh này cho thấy ánh sáng là yếu tố quyết định trong tổng hợp PHB, nhưng hiệu quả của nó phụ thuộc mạnh vào kiểu gen chủng, trạng thái dinh dưỡng và điều kiện nuôi.

Dựa trên kết quả thực nghiệm, cường độ ánh sáng 13.500 lux được xác định là điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng của *S. salina* M8 trong nước thải đã tiệt trùng với tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, sau 8 ngày nuôi cấy, kết hợp với pH = 7 và nhiệt độ ổn định ở 27°C, tốc độ sục khí hỗn hợp không khí + CO₂ (2% CO₂, v/v) là 0,1 vvm. Trong điều kiện này, mật độ *S. salina* M8 đạt giá trị cao nhất, đồng thời hiệu quả xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt cũng được cải thiện đáng kể. Kết quả phân tích nồng độ và hiệu suất xử lý các chỉ tiêu ô nhiễm được trình bày trong **Bảng 3.17** và **Hình 3.17**.

Bảng 3.17. Hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi *S. salina* M8 tại cường độ ánh sáng 13.500 lux (n = 3)

Cường độ ánh sáng 13.500 Lux	NH₄⁺ (mg/L)	T - N (mg/L)	P-PO₄³⁻ (mg/L)	T - P (mg/L)	COD (mg/L)
Trước xử lý	32,12 ± 0,42	36,12 ± 0,52	4,24 ± 0,15	5,2 ± 0,2	3.370 ± 5.7
Sau xử lý	4,35 ± 0,09	5,02 ± 0,14	0,78 ± 0,21	0,95 ± 0,41	58,05 ± 0,28
QCVN 14:2025/BTNMT (Cột B)	≤ 8,0	≤ 30	-	≤ 3	≤ 60
Hiệu suất (%)	86,46	86,1	81,6	81,7	98,3

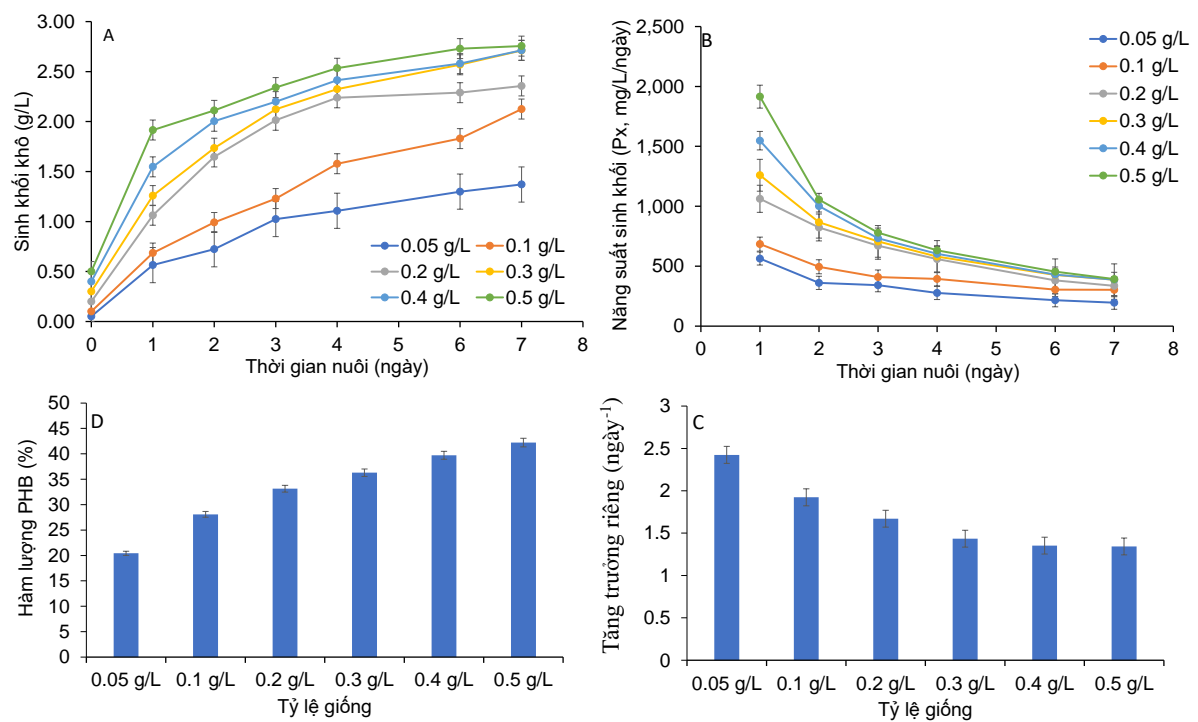


Hình 3.17. Nồng độ và hiệu suất xử lý các chất ô nhiễm trong nước thải bởi *S. salina* M8 ở cường độ ánh sáng 13.500 lux

Từ kết quả trên **Hình 3.16** cho thấy, *S. salina* M8 xử lý hiệu quả hầu hết các chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt. Nồng độ N-NH₄⁺ giảm từ (32,12 ± 0,42) mg/L xuống (4,35 ± 0,09) mg/L, tương ứng với hiệu suất xử lý 86,46%, cho thấy khả năng loại bỏ ammonium vượt trội. Tổng nitrogen (T-N) cũng được loại bỏ hiệu quả, giảm 86,1% từ (36,12 ± 0,52) mg/L xuống (5,02 ± 0,14) mg/L, chứng minh khả năng hấp thụ và đồng hóa nitrogen vào các hợp chất sinh học của tế bào. Đối với các hợp chất phosphorus, hiệu suất xử lý P-PO₄³⁻ đạt 81,6% (từ 4,24 ± 0,15 mg/L xuống 0,78 ± 0,21 mg/L); tổng phosphorus (T-P) giảm từ (5,2 ± 0,2) mg/L còn (0,95 ± 0,41) mg/L (tương đương hiệu suất đạt 81,7%). Điều này cho thấy *S. salina* M8 có khả năng hấp thụ phosphorus mạnh trong điều kiện ánh sáng tối ưu. Hàm lượng COD giảm từ (3.370 ± 5,7) mg/L còn (58,05 ± 0,28) mg/L, đạt hiệu suất 98,3 %. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nattawut Krasaesueb và cộng sự, (2019), chủng *Synechocystis* sp. được nuôi trong nước thải giàu N-NH₄⁺ và P-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 ammonium [146].

3.4.5. Kết quả về ảnh hưởng của tỷ lệ giống *S. salina* M8 ban đầu đến sinh trưởng của *S. salina* M8 trong nước thải

Tỷ lệ cấp giống ban đầu có vai trò quan trọng và ảnh hưởng đến sinh trưởng của *S. salina* M8 trong môi trường dinh dưỡng. Trong nghiên cứu này các tỷ lệ cấp giống ban đầu được khảo sát là: 5, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v), tương đương sinh khối khô ban đầu là 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; và 0,5 g/L. Sinh trưởng của *S. salina* M8 được theo dõi sau 7 ngày thông qua đo mật độ quang và sinh khối khô sau mỗi ngày nuôi cấy (**Hình 3.18**).



Hình 3.18. Sinh trưởng và hàm lượng PHB tích lũy bởi *S. salina* M8 ở tỷ lệ giống đầu vào khác nhau

Hình 3.18 minh họa một cách toàn diện ảnh hưởng của tỷ lệ giống đầu vào đến sinh trưởng, động học sử dụng dinh dưỡng và khả năng tích lũy PHB của *S. salina* M8. Các kết quả thu được cho thấy sự tương tác chặt chẽ giữa mật độ tế bào ban đầu, hiệu suất sinh trưởng và quá trình tích lũy sản phẩm dự trữ trong tế bào.

Ở **Hình 3.18-A**, sinh khối khô tăng liên tục theo thời gian nuôi ở tất cả các nghiệm thức, tuy nhiên mức độ tăng trưởng khác biệt rõ rệt giữa các tỷ lệ giống. Các nghiệm thức có tỷ lệ giống cao (0,4–0,5 g/L) đạt sinh khối cao nhất, xấp xỉ 2,7–2,8 g/L sau 7 ngày nuôi. Điều này cho thấy mật độ tế bào ban đầu lớn giúp rút ngắn pha thích nghi, tăng khả năng khai thác ánh sáng và dinh dưỡng, từ đó thúc đẩy tích lũy sinh khối nhanh hơn. Ngược lại, ở các tỷ lệ giống thấp (0,05–0,1 g/L), sinh khối tăng chậm hơn và đạt giá trị cuối thấp hơn, phản ánh sự kéo dài pha thích nghi và giới hạn về số lượng tế bào tham gia vào quá trình tăng trưởng.

Hình 3.18-B thể hiện sự suy giảm nhanh năng suất sinh khối (P_x) trong môi trường nuôi, đặc biệt trong 1–2 ngày đầu. Mức giảm P_x rõ rệt hơn ở các nghiệm thức có tỷ lệ giống cao, cho thấy khả năng hấp thu dinh dưỡng mạnh mẽ của *S. salina* M8 khi mật độ tế bào lớn. Sau giai đoạn đầu, tốc độ giảm P_x chậm lại, phù hợp với xu hướng giảm tốc độ sinh trưởng ở giai đoạn sau. Kết quả này nhấn mạnh tiềm năng ứng dụng của chủng *S. salina* M8 trong xử lý nước thải giàu dinh dưỡng, đặc biệt là loại bỏ phosphorus.

Sự thay đổi của tốc độ sinh trưởng riêng cực đại (μ_{max}) được thể hiện trong **Hình 3.18-C** cho thấy xu hướng giảm dần khi tăng tỷ lệ giống. Giá trị μ_{max} cao nhất (khoảng

2,4 ngày⁻¹) đạt được ở tỷ lệ giống thấp (0,05 g/L), trong khi giảm xuống còn khoảng 1,3–1,4 ngày⁻¹ ở các tỷ lệ giống cao (0,4–0,5 g/L). Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự gia tăng cạnh tranh ánh sáng, CO₂ và dinh dưỡng trong điều kiện mật độ tế bào cao, làm hạn chế tốc độ tăng trưởng của từng tế bào riêng lẻ.

Đáng chú ý, **Hình 3.18-D** cho thấy hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối tăng rõ rệt khi tăng tỷ lệ giống, từ khoảng 20% ở 0,05 g/L lên trên 40% ở 0,5 g/L sinh khối khô. Sự gia tăng này liên quan đến điều kiện dinh dưỡng hạn chế, đặc biệt là phosphorus, và stress sinh lý ở mật độ tế bào cao, vốn được xem là các yếu tố kích thích vi tảo tích lũy PHB như một dạng dự trữ carbon và năng lượng.

Tổng hợp các kết quả cho thấy tỷ lệ giống đầu vào là một thông số vận hành quan trọng trong nuôi cấy *S. salina* M8. Tỷ lệ giống thấp phù hợp cho mục tiêu đạt tốc độ tăng trưởng cao ban đầu, trong khi tỷ lệ giống cao có lợi cho việc tối đa hóa sinh khối, hiệu quả loại bỏ dinh dưỡng và hàm lượng PHB, qua đó mở ra triển vọng ứng dụng trong sản xuất vật liệu sinh học kết hợp xử lý nước thải.

Tỷ lệ 0,2-0,5 g/L tảo giống cho kết quả sinh trưởng và ổn định tốt nhất. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, khẳng định rằng mật độ giống nuôi ban đầu ảnh hưởng lớn đến hiệu suất quang hợp và tốc độ tăng trưởng của sinh khối [172]. Do đó, tỷ lệ cấp giống 0,2-0,5 g/L sinh khối khô được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

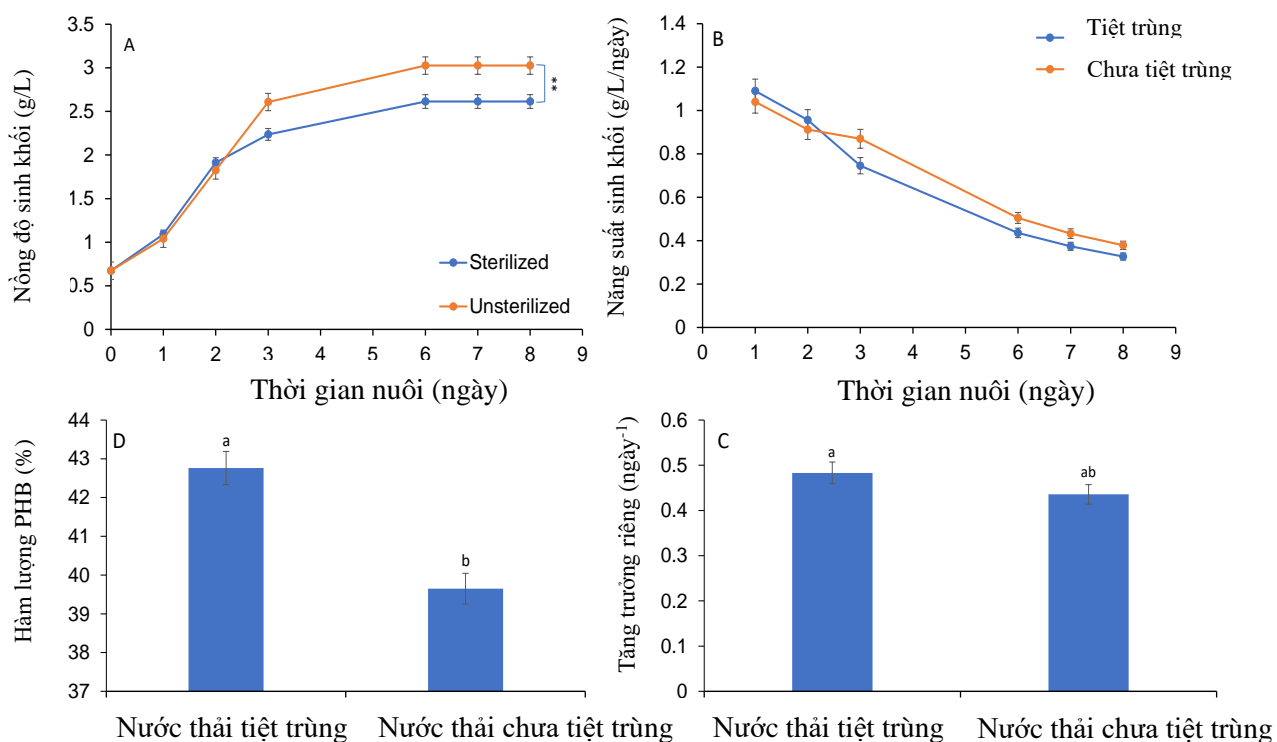
3.4.6. Kết quả về khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải tiết trùng và không tiết trùng

Thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá sự khác biệt trong khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 khi nuôi trong nước thải sinh hoạt đã tiết trùng và không tiết trùng. Đây là một yếu tố quan trọng để xác định khả năng ứng dụng thực tiễn của vi khuẩn lam trong môi trường giàu vi sinh vật và không qua xử lý sơ bộ. Số liệu thể hiện trên **Bảng 3.18** và **Hình 3.19** cho thấy nước thải không tiết trùng và nước thải tiết trùng trong điều kiện nuôi cấy: tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, pH ban đầu = 7, nhiệt độ 27°C, cường độ ánh sáng 13.500 lux, sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) ở tốc độ 0,1 vvm), có ảnh hưởng rõ rệt sự phát triển sinh khối của *S. salina* M8. Sinh khối khô tăng đều trong 4 ngày đầu nuôi cấy và sau đó đạt trạng thái ổn định. Nồng độ sinh khối tối đa đạt 3,0 g/L trong nước thải chưa tiết trùng (nước thải thô) và 2,8 g/L trong nước thải đã tiết trùng, cho thấy sinh trưởng được cải thiện nhẹ trong điều kiện chưa tiết trùng. Năng suất sinh khối đạt cực đại vào ngày thứ 2, với khoảng 1,1 g/L/ngày trong nước thải chưa tiết trùng và 1,0 g/L/ngày trong nước thải đã tiết trùng, sau đó giảm dần đến ngày thứ 8 (**Hình 3.19-B**). Tốc độ sinh trưởng riêng cực đại (μ_{max}) giữa hai nghiệm thức gần như tương đương (0,55 ngày⁻¹ trong nước thải đã tiết trùng và 0,52 ngày⁻¹ trong nước thải chưa tiết trùng, $p = 0,073 > 0,05$) (**Hình 3.19-C**). Kết quả

này cho thấy *S. salina* M8 có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường nước thải không tiệt trùng, chứng tỏ loài này có khả năng cạnh tranh sinh học cao, thích nghi tốt và kháng lại vi sinh vật tạp nhiễm, từ đó giảm yêu cầu khắt khe về khử trùng môi trường trước khi nuôi cấy, điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc ứng dụng *S. salina* M8 vào xử lý nước thải mà không cần tiệt trùng giúp tiết kiệm chi phí vận hành và năng lượng của hệ thống xử lý.

Bảng 3.18. Kết quả về khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải tiệt trùng và không tiệt trùng

Môi trường nuôi	Nồng độ sinh khối (g/L)	Tốc độ tăng trưởng riêng cực đại (ngày ⁻¹)	Năng suất sinh khối cực đại (g/L/ngày)	Hàm lượng PHB (%)
Nước thải tiệt trùng	2,8±0,1	0,55	1,0	43
Nước thải không tiệt trùng	3,0±0,3	0,52	1,1	40



Hình 3.19. Sinh trưởng và hàm lượng PHB của *S. salina* M8 trong nước thải tiệt trùng và không tiệt trùng

Mặc dù *S. salina* M8 thể hiện mô hình sinh trưởng sinh khối tương đồng giữa nước thải tiệt trùng và không tiệt trùng (Hình 3.19 A–C), hàm lượng PHB lại khác biệt rõ rệt (43% trong nước thải tiệt trùng và 40% trong nước thải không tiệt trùng, $p = 0,011$

< 0,05, **Hình 3.19-D**). Điều này cho thấy quá trình phân bố carbon nhạy cảm hơn với tương tác vi sinh và cạnh tranh cơ chất so với quá trình tổng hợp sinh khối. Nồng độ sinh khối, năng suất và tốc độ sinh trưởng cực đại tương đương giữa hai hệ cho thấy các vi sinh vật bản địa trong nước thải không tiệt trùng không gây ức chế đáng kể đối với tăng trưởng quang dưỡng, điều này là do *S. salina* M8 có khả năng cạnh tranh mạnh trong điều kiện chiếu sáng cao và sục khí liên tục. Trong các điều kiện này, vi khuẩn lam thường chiếm ưu thế nhờ khả năng hấp thu carbon vô cơ hiệu quả và chịu được tải lượng hữu cơ trung bình, cho phép tích lũy sinh khối trong quần xã vi sinh hỗn hợp.

Ngược lại, hàm lượng PHB giảm đáng kể trong nước thải không tiệt trùng (**Hình 3.19-D**). Tổng hợp PHB là một quá trình chuyển hóa thứ cấp, chỉ được kích hoạt mạnh khi tế bào đối mặt với tình trạng dư thừa carbon trong điều kiện thiếu hụt dinh dưỡng, đặc biệt là nitrogen. Trong nước thải không tiệt trùng, sự cố mật của vi sinh vật dị dưỡng dẫn đến việc tiêu thụ nhanh các nguồn carbon hữu cơ hòa tan và làm thay đổi động học khoáng hóa dinh dưỡng, từ đó làm giảm mức độ mất cân bằng carbon - nitrogen mà *S. salina* M8 trải nghiệm. Điều này hạn chế sự kích hoạt mạnh của con đường sinh tổng hợp PHB. Bên cạnh đó, sự cạnh tranh đối với acetate và các hợp chất hữu cơ dễ phân hủy, cũng như các dao động cục bộ về CO₂ do hô hấp vi sinh, có thể ảnh hưởng đến trạng thái oxy hóa - khử nội bào - yếu tố quan trọng điều hòa quá trình tích lũy PHB.

Mặc dù vậy, kết quả cho thấy *S. salina* M8 vẫn duy trì khả năng sinh trưởng ổn định trong cả hai điều kiện nước thải, chứng tỏ khả năng thích nghi cao với môi trường có cấu trúc vi sinh phức tạp. Trong hệ tiệt trùng, việc loại bỏ cạnh tranh sinh học giúp trạng thái thiếu hụt nitrogen - phosphorus biểu hiện rõ hơn, tạo điều kiện để dòng carbon nội bào được ưu tiên phân bổ cho quá trình tổng hợp polymer, dẫn đến hàm lượng PHB cao hơn. Ngược lại, trong hệ không tiệt trùng, mặc dù hàm lượng PHB thấp hơn, mức tích lũy thu được vẫn khẳng định tính khả thi của mô hình tích hợp xử lý nước thải sinh hoạt và sản xuất PHB trong điều kiện vận hành thực tế. Do đó, sự khác biệt về hàm lượng PHB giữa hai điều kiện không làm hạn chế tiềm năng ứng dụng của hệ thống, mà phản ánh đúng các tương tác sinh - hóa học đặc trưng trong môi trường thực tế. Đồng thời, kết quả này gợi mở các hướng tối ưu hóa tiếp theo như điều chỉnh tỷ lệ C:N:P, kiểm soát cường độ ánh sáng hoặc áp dụng các biện pháp tiền xử lý đơn giản nhằm nâng cao hiệu suất tích lũy PHB mà không cần duy trì điều kiện tiệt trùng hoàn toàn.

Những kết quả thu được trong nghiên cứu này phù hợp với các báo cáo trước đó về ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy và quần xã vi sinh đến khả năng tích lũy PHB của vi khuẩn lam. Rueda và cộng sự (2022) khi khảo sát khả năng tích lũy PHB của *Synechocystis* sp. trong nước thải đã chỉ ra rằng các yếu tố như cấu trúc quần xã vi sinh vật và sự không đồng nhất dinh dưỡng có ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất PHB; năng

suất PHB cao nhất của các nghiên cứu đó đạt 15,7 mg/L/ngày ở 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ chỉ đạt được trong hệ thống bán vô trùng, nơi sự cạnh tranh vi sinh vật được giảm thiểu [110].

Troschl và cộng sự (2018) nuôi cấy *Synechocystis sp.* CCALA192 trong hệ thống quang sinh 200 L không vô trùng chỉ đạt nồng độ sinh khối trung bình 1,0 g/L và hàm lượng PHB khoảng 12,5% khối lượng khô [123, 124, 168]. Tương tự, Gracioso và cộng sự (2021) ghi nhận rằng khi nuôi *Synechocystis sp.* trong môi trường không khử khuẩn có nguồn gốc rừng ngập mặn, quần thể vi khuẩn bản địa ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất tích lũy PHB, với hàm lượng PHB cao nhất (31% khối lượng khô; 241 mg/L) chỉ đạt được trong điều kiện ánh sáng cao và cân bằng dinh dưỡng tối ưu [60]. Kết quả này cũng phù hợp với nhận định của Altamira-Algarra và cộng sự (2025), những người đã tổng quan về sản xuất PHB trong hệ vi sinh lam – tảo và cho rằng các hệ thống không vô trùng thường cho hiệu suất PHB thấp hơn do sự tồn tại đồng thời của tảo lục không sản xuất PHB và vi khuẩn cạnh tranh dinh dưỡng và ánh sáng. Trong các quần xã vi khuẩn lam từ nước thải, hàm lượng PHB thường không vượt quá 5–14% khối lượng khô, trong khi các hệ thống tối ưu hoặc bán vô trùng có kiểm soát dinh dưỡng có thể đạt 27% khối lượng khô dưới điều kiện thiếu nitrogen và phosphorus kết hợp bổ sung acetate [60]. Ngoài ra, Sun và cộng sự (2025) cho kết quả rằng, các quần xã vi khuẩn lam hỗn hợp chỉ duy trì mức 5–15% PHB trong điều kiện đủ dinh dưỡng, và chỉ tăng lên 27% khi bị giới hạn dinh dưỡng và kiểm soát cường độ ánh sáng [60].

Tổng hợp các bằng chứng này cho thấy trong hệ không vô trùng, carbon thường được chuyển hướng sang hô hấp hoặc tổng hợp chất polymer ngoại bào (EPS) thay vì tổng hợp PHB, dẫn đến giảm hiệu suất tích lũy polymer. Ngược lại, hàm lượng PHB cao hơn gần ba lần được ghi nhận ở *S. salina* M8 (40–43% khối lượng khô) trong nghiên cứu này, đặc biệt là trong nước thải đã tiệt trùng, cho thấy duy trì độ tinh sạch hệ nuôi và điều chỉnh tối ưu ánh sáng – dinh dưỡng giúp cải thiện đáng kể hiệu quả chuyển hóa carbon so với các hệ mở. Khả năng tích lũy PHB vượt trội của *S. salina* M8 so với các quần xã hỗn hợp được Sun và cộng sự (2025) nghiên cứu cũng nhấn mạnh tính bền vững về mặt trao đổi chất của chủng này trong điều kiện nước thải [60]. Trong khi các quần xã hỗn hợp thường ưu tiên sự phát triển của vi khuẩn dị dưỡng ở tải lượng hữu cơ cao, làm suy giảm hiệu suất PHB của vi khuẩn lam, *S. salina* M8 vẫn duy trì năng suất quang hợp và tích lũy polymer hiệu quả ngay cả khi nuôi trong nước thải không vô trùng. Những so sánh này cho thấy rằng mặc dù hệ nuôi vi sinh mở có lợi thế về chi phí, việc lựa chọn chủng thích hợp và áp dụng các biện pháp kiểm soát một phần hệ nuôi (như tiệt trùng hoặc chủng hóa định hướng) là điều kiện then chốt để đạt hiệu suất PHB tối ưu và đảm bảo tính ổn định trong sản xuất.

Nhận xét chung: Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn lam *S. salina* M8 có khả năng sinh trưởng mạnh và xử lý hiệu quả nước thải sinh hoạt mà không cần tiệt trùng trong điều kiện nuôi cấy tối ưu được xác định bao gồm: tỷ lệ C:N:P = 70:7:1, pH = 7, nhiệt độ nuôi 27°C, cường độ chiếu sáng 13.500 lux, tỷ lệ giống 0,5 g/L sinh khối khô, sục khí hỗn hợp không khí CO₂ (2% CO₂, v/v) ở tốc độ 0,1 vvm. Sau 8 ngày nuôi cấy, sinh khối khô thu được trong nước thải không tiệt trùng đạt tối đa 3,0 g/L, tích lũy PHB đạt trên 40% và hiệu suất xử lý các thông số ô nhiễm như sau: N-NH₄⁺ 86,46%, tổng nitrogen 86,1%, P- PO₄³⁻ 81,6%, tổng phosphorus 81,7% và COD trên 98%. Nước thải sau khi xử lý đáp ứng tiêu chuẩn xả thải theo QCVN 14:2025/BTNMT (cột B) trước khi xả vào nguồn tiếp nhận. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng của *S. salina* M8 trong xử lý nước thải sinh hoạt không tiệt trùng, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng thu hồi sinh khối từ vi khuẩn lam để sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB trong hệ thống xử lý nước thải ở quy mô công nghiệp.

3.5. Thử nghiệm sản xuất sinh khối và PHB từ *S. salina* M8 nuôi trong nước thải sinh hoạt thô với hệ thống quang sinh 30 L

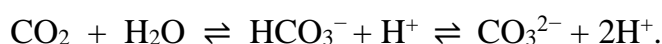
Trên cơ sở các kết quả xác định điều kiện nuôi cấy tối ưu của chủng *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt ở quy mô phòng thí nghiệm, nghiên cứu tiếp tục được triển khai trong điều kiện gần thực tế nhằm đánh giá khả năng ứng dụng ở quy mô lớn hơn. Theo đó, thí nghiệm sản xuất sinh khối và tích lũy PHB từ *S. salina* M8 được thực hiện trong hệ thống phản ứng quang sinh dạng ống dung tích 30 L, bố trí ngoài trời, sử dụng nước thải sinh hoạt thô. Cơ sở Luận án lựa chọn hệ thí nghiệm pilot 30L nhằm đánh giá khả năng mở rộng từ quy mô phòng thí nghiệm lên điều kiện gần thực tế hơn, đồng thời vẫn đảm bảo kiểm soát được các yếu tố vận hành. Nguồn nước thải sử dụng cho hệ thống quang sinh 30 L đã được điều chỉnh tải lượng hữu cơ theo tỷ lệ tối ưu C:N:P = 70:7:1 theo kết quả đã được xác định trong quy mô phòng thí nghiệm ở mục 3.4 và phân tích các thông số ô nhiễm chính được trình bày tại **Bảng 3.20**. Hệ phản ứng được vận hành với thời gian lưu khoảng 20 ngày nhằm đảm bảo đủ thời gian cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn lam, hấp thu dinh dưỡng và tích lũy PHB trong điều kiện gần với thực tế vận hành. Kết quả cho thấy nồng độ COD sau điều chỉnh đạt 3.370 mg/L, BOD₅ đạt 2.200 mg/L, cùng với hàm lượng dinh dưỡng tương ứng T-N ≈ 36,12 mg/L và T-P ≈ 5,2 mg/L.

Hệ thống quang sinh dạng ống quy mô 30 L được sử dụng như một mô hình thử nghiệm nhằm đánh giá khả năng thích nghi, sinh trưởng và tích lũy vật liệu sinh học PHB của chủng *S. salina* M8 trong điều kiện nuôi cấy bằng nước thải sinh hoạt. Số liệu thể hiện trên **Hình 3.20** trình bày sự biến thiên theo thời gian về sự sinh trưởng, năng suất sinh khối, tốc độ tăng trưởng riêng, nhiệt độ, pH của môi trường

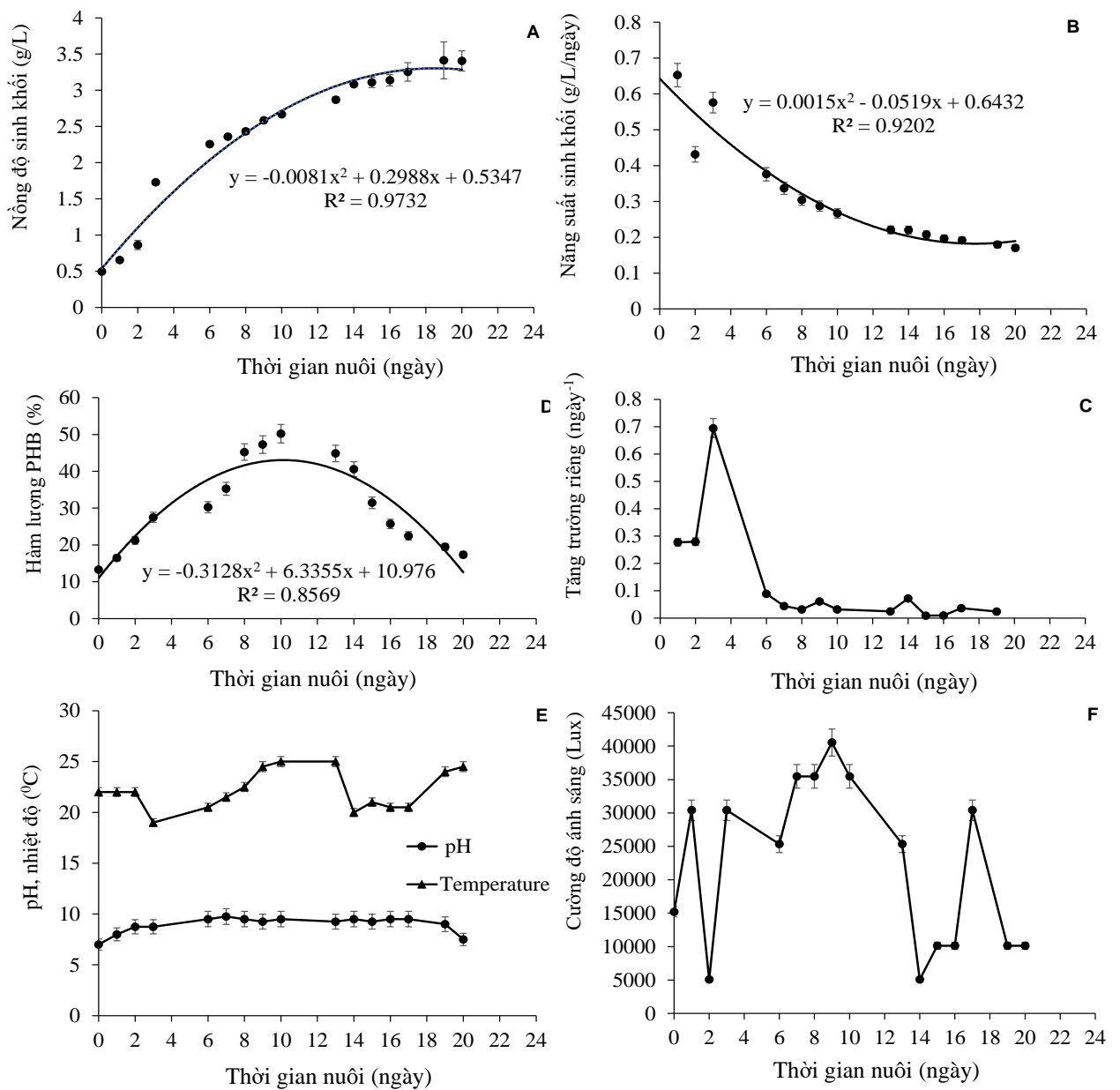
nuôi, và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối *S. salina* M8 khi nuôi trong nước thải sinh hoạt. Kết quả cho thấy, sinh khối khô tăng theo dạng hình chữ S (sigmoid), đạt khoảng 3,4 g/L vào ngày thứ 17 trước khi ổn định, phản ánh quá trình chuyển pha từ sinh trưởng lũy thừa sang pha ổn định. Mô hình hồi quy bậc hai đối với sinh khối khô ($R^2 = 0,9732$) cho thấy mức độ phù hợp cao, thể hiện tốc độ tích lũy sinh khối nhanh trong pha lũy thừa ban đầu, sau đó tăng chậm dần và tiến tới trạng thái ổn định sau ngày thứ 14 do cạn kiệt dinh dưỡng và hiện tượng cạnh tranh nhau về nguồn ánh sáng trong hệ nuôi (**Hình 3.20-A**). Ngược lại, năng suất sinh khối giảm dần theo mô hình đa thức bậc hai ($R^2 = 0,9202$), đạt đỉnh khoảng 0,65 g/L/ngày (ngày thứ 2) ở giai đoạn đầu rồi giảm liên tục xuống còn khoảng 0,19 g/L/ngày sau ngày 17 khi tốc độ sinh trưởng suy giảm (**Hình 3.20-B**). Mối tương quan giảm dần theo thời gian này phù hợp với xu hướng suy giảm nitrogen và carbon sẵn có, vốn là đặc trưng của các hệ thống nước thải nuôi ngoài trời. Tốc độ sinh trưởng cực đại (μ_{max}) đạt đỉnh 0,7 ngày⁻¹ vào ngày thứ 2 và giảm nhanh ngay sau đó, cho thấy giai đoạn sinh trưởng mạnh chủ yếu diễn ra trong 2–3 ngày đầu của quá trình nuôi (**Hình 3.20-C**).

Hàm lượng PHB thể hiện dạng đường cong hình chuông: tăng từ dưới 10% khối lượng khô (DCW) trong pha lũy thừa ban đầu lên mức cực đại 50% (DCW) vào ngày thứ 10, sau đó giảm dần xuống còn 17% (DCW) vào ngày thứ 20 (**Hình 3.20-D**). Hàm lượng PHB cũng phù hợp với mô hình bậc hai ($R^2 = 0,8569$), tăng mạnh trong giai đoạn giữa quá trình nuôi (ngày 6–12) trước khi giảm sau ngày 14. Mô hình này phản ánh sự chuyển đổi trao đổi chất, trong đó tế bào ưu tiên chuyển carbon vào PHB khi điều kiện dinh dưỡng ngày càng trở nên hạn chế, đạt cực đại khi tốc độ sinh trưởng chậm lại nhưng carbon vẫn còn đủ để tích lũy. Sự suy giảm sau đó tương ứng với sự cạn kiệt carbon hoặc việc huy động PHB để duy trì hoạt động tế bào dưới điều kiện stress kéo dài. Các hệ số xác định cao cho thấy rằng các mô hình đa thức này mô tả hiệu quả sự tương tác động giữa quá trình tích lũy sinh khối, sự suy giảm năng suất và sự cảm ứng PHB - đặc trưng của nuôi cấy vi khuẩn lam trong nước thải có điều kiện dinh dưỡng biến động ngoài trời.

Hình 3.20-E và Hình 3.20-F cho thấy pH và nhiệt độ của môi trường nuôi dao động trong khoảng tương ứng 7–9,75 và 19–25°C, trong khi cường độ ánh sáng biến thiên từ 5.000–40.000 lux, với các giai đoạn bức xạ cao trùng với thời kỳ tăng trưởng và tích lũy PHB mạnh (ngày 4–10). Sự gia tăng giá trị pH này phản ánh đồng thời các cơ chế cân bằng carbonat – bicarbonat và hoạt động quang hợp đặc trưng của vi khuẩn lam. Trong môi trường nuôi có sự tích tụ CO₂, cân bằng hệ đệm carbonat được mô tả theo phương trình:



Ở pH trung tính, HCO_3^- là dạng carbon vô cơ và là cơ chất chính của cơ chế tập trung CO_2 (CO_2 concentrating mechanisms – CCM). Trong quá trình quang hợp, tế bào *S. salina* M8 hấp thu HCO_3^- và CO_2 để cung cấp CO_2 cho carboxysome, nơi enzym RuBisCO xúc tác phản ứng cố định carbon. Khi HCO_3^- được tiêu thụ liên tục, phản ứng thuận $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ bị dịch chuyển, dẫn đến sự tiêu thụ H^+ và hình thành OH^- , làm pH môi trường tăng dần. Đồng thời, việc giảm CO_2 tự do trong pha lỏng do quang hợp và sự hình thành CO_3^{2-} tiếp tục dịch chuyển cân bằng hệ đệm về phía kiềm. Quang hợp còn giải phóng O_2 , làm giảm áp suất riêng phần CO_2 và càng thúc đẩy quá trình kiềm hóa. Cơ chế này đã được ghi nhận phổ biến trong các hệ nuôi cấy tảo và vi khuẩn lam, nơi pH có thể đạt 10 –11 khi cường độ quang hợp cao [173]. Kết quả quan sát trong nghiên cứu này cho thấy *S. salina* M8 tuân theo quy luật chung đó, đồng thời khẳng định khả năng hoạt động mạnh mẽ của hệ CCM và hiệu quả cố định carbon của chúng trong điều kiện quang dưỡng [173].



Hình 3.20. Sự sinh trưởng và hàm lượng tích lũy PHB của *S. salina* M8 nuôi trong nước thải ở hệ thống quang sinh dạng ống đứng 30 L (n=3)

Đáng chú ý, kết quả so sánh định lượng giữa các chủng vi khuẩn lam cho thấy *S. salina* M8 thể hiện ưu thế rõ rệt khi đồng thời đạt sinh khối cao và khả năng tích lũy PHB lớn trong điều kiện nước thải sinh hoạt thực tế (**Bảng 3.19**). Cụ thể, chủng này đạt nồng độ sinh khối lớn nhất 3,4 g/L, hàm lượng PHB 50,2% và năng suất sinh khối đạt 0,14 g/L/ngày. So với các chủng *Synechocystis* đã được công bố, đây là sự kết hợp tối ưu giữa sinh trưởng và tích lũy polymer – hai quá trình vốn thường có xu hướng cạnh tranh trong chuyên hóa nội bào.

Trong khi đó, nhiều chủng khác chỉ đạt một trong hai mục tiêu. Ví dụ, chủng *Synechocystis* PCC 6714 MT_a24 đạt sinh khối tương đương (3,5 g/L), nhưng hàm lượng PHB (23,7%) và yêu cầu điều kiện vận hành khắc khe (pH ~10,5) để duy trì hoạt

động ổn định [59]. Chủng *Synechocystis* phân lập từ rừng ngập mặn tích lũy 31% PHB nhưng sinh khối thấp ($\sim 0,78$ g/L) dưới cường độ ánh sáng cao ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cho thấy sự liên kết yếu hơn giữa tăng trưởng và hình thành polymer [174, 175]. Tương tự, CCALA192 chỉ đạt 1,0 g/L sinh khối và 12,5% PHB trong hệ PBR 200 L vận hành bán liên tục dưới điều kiện thiếu nitrogen trong hệ thống quang sinh không tiệt trùng [123, 124, 168], trong khi các chủng phân lập từ nước thải khác chỉ đạt 7,5% PHB theo VSS [110]. Chủng *Synechocystis* PCC 6803 hoang dại, vốn được nghiên cứu rộng rãi, thường chỉ tích lũy khoảng 15% PHB dưới điều kiện thiếu nitrogen, thấp hơn nhiều so với chủng *S. salina* M8; các chủng biến nạp có mức PHB cao hơn (81%) lại yêu cầu điều kiện không phải nước thải và sử dụng biến đổi di truyền [24].

Đặc biệt, khác với phần lớn các nghiên cứu trước đây được thực hiện trong môi trường tổng hợp, điều kiện tiệt trùng hoặc nước thải đã qua xử lý, kết quả của luận án được thu nhận từ hệ nuôi cấy sử dụng trực tiếp nước thải sinh hoạt thực tế tại Việt Nam với đặc trưng tải lượng hữu cơ và dinh dưỡng biến động. Điều này làm nổi bật tính ứng dụng, khả năng thích nghi và tiềm năng chuyển giao của *S. salina* M8 trong các hệ thống xử lý nước thải thực tế, đồng thời khẳng định ưu thế của chủng nghiên cứu trong điều kiện gắn với vận hành ngoài thực địa.

Đáng chú ý, hàm lượng PHB đạt 50,2% DCW trong hệ quang sinh 30 L cao gấp khoảng 2,5 lần so với môi trường chuẩn. Sự gia tăng này có thể được giải thích bởi sự phối hợp của ba cơ chế chính. Thứ nhất, trong nước thải thực tồn tại trạng thái mất cân bằng dinh dưỡng (dư carbon nhưng hạn chế nitrogen hoặc phosphorus cục bộ), làm giảm ưu tiên sinh trưởng và thúc đẩy dòng carbon chuyển hướng sang con đường tổng hợp PHB thông qua tiền chất acetyl-CoA. Thứ hai, sự hiện diện của cộng đồng vi sinh vật bản địa góp phần phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các dạng carbon dễ đồng hóa (như acetate), đồng thời tạo cạnh tranh dinh dưỡng, đặc biệt là nitrogen, qua đó kích thích cơ chế tích lũy PHB như một dạng dự trữ nội bào. Thứ ba, các yếu tố stress môi trường trong hệ ngoài trời (dao động ánh sáng, nhiệt độ và oxy hòa tan) đóng vai trò điều hòa chuyển hóa, thúc đẩy tế bào chuyển sang trạng thái tích lũy polymer để thích nghi với điều kiện biến động.

Như vậy, sự cộng hưởng của mất cân bằng dinh dưỡng, tương tác vi sinh và điều kiện stress môi trường đã làm thay đổi phân bố dòng carbon nội bào, theo hướng ưu tiên tích lũy PHB thay vì sinh trưởng, từ đó giải thích cho hàm lượng PHB cao vượt trội so với môi trường chuẩn. Kết quả này khẳng định tiềm năng của chủng *S. salina* M8 trong các hệ thống xử lý nước thải kết hợp thu hồi vật liệu sinh học theo hướng ứng dụng thực tiễn.

Bảng 3.19. So sánh định lượng sinh khối và hàm lượng PHB do *S. salina* M8 và các chủng vi khuẩn lam khác tạo ra trong các loại nước thải khác nhau

Chủng loài	Điều kiện nuôi cấy	Sinh khối cực đại (g/L, CDW)	Hàm lượng PHB lớn nhất (% , CDW)	Điều kiện PHB tối đa	Tài liệu tham khảo
<i>Synechocystis salina</i> M8	- Nước thải sinh hoạt; - Hệ quang sinh dạng ống 30L	3,4	50,2 ± 0,52	Nước thải sinh hoạt (tỷ lệ C/N/P ≈ 70:7:1), 2% CO ₂ ; giai đoạn ổn định muộn trong bể phản ứng quang sinh học 30 lít; loại bỏ chất dinh dưỡng và tích lũy PHB đồng thời.	Nghiên cứu này
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6714 MT_a24	- Nước thải đô thị; - Ao chứa nước dạng màng mỏng 100 lít (ngoài trời)	3,5	23,7 ± 2,2	Nước thải đô thị là nguồn dinh dưỡng duy nhất; giai đoạn ổn định muộn bị hạn chế dinh dưỡng trong màng nuôi sinh khối mỏng ngoài trời; độ pH cao (~10,5) để kiểm soát động vật ăn cỏ.	[59]
<i>Synechocystis</i> sp. (phân lập từ khu vực ven biển bị ô nhiễm)	Môi trường tổng hợp; - Bình/bàn thí nghiệm	0,78	31	Điều kiện ánh sáng mạnh (HL); nồng độ PHB 241 mg/L tương ứng với 31% PHB của CDW.	[174, 175]
<i>Synechocystis</i> sp. CCALA192	- BG-11 đã được sửa đổi; - Bể phản ứng sinh học dạng ống 200 lít (không vô trùng, bán liên tục)	1,0	12,5	CO ₂ là nguồn carbon duy nhất; thiếu nitrogen, trong lò phản ứng quang sinh học dạng ống 200 lít; PHB được hình thành ở giai đoạn cuối của mỗi chu kỳ sản xuất.	[123, 124, 168]
<i>Synechocystis</i> sp. (phân lập từ nước thải)	- Nước thải thứ cấp thực tế; - Quy mô phòng thí nghiệm	NR	7,5% VSS (tối đa)	PHB đạt 14% CDW dưới sự tối ưu hóa kết hợp độ mặn, P và ánh sáng; tập trung vào ảnh	[110]

				hường của độ mặn và hàm lượng P	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (hoang dã)	- Môi trường BG-11 - Thiếu nitrogen/hiện tượng vàng lá	NR	15 (chủng điển hình)	Trong điều kiện thiếu nitrogen (thiếu chất diệp lục), <i>Synechocystis</i> kiểu hoang dã chỉ tích lũy PHB đến khoảng 15% trọng lượng khô tế bào; nồng độ PHB thường dưới 30 mg/L.	[24]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 PPT1 (ΔpirC + phaAB)	- BG-11 tổng hợp không chứa N, P + axetat; - Flask	NR	81 (bổ sung nguồn Carbon là acetate)	Chủng vi khuẩn biến đổi gen; trong điều kiện thiếu N, P cộng với 10 mM acetate, PHB nội bào đạt 81% trọng lượng khô tế bào (63% khi không có acetate), mức cao nhất được ghi nhận ở vi khuẩn lam.	[24]

Số liệu tại **Bảng 3.20** thể hiện kết quả về hiệu suất loại bỏ COD, BOD₅, N-NH₄⁺, T-N, P-PO₄³⁻ và T-P của *S. salina* M8 khi được nuôi trong hệ thống quang sinh 30 L ngoài trời sử dụng nước thải sinh hoạt không tiết trùng. Nước thải đầu vào có pH gần trung tính ($7,0 \pm 0,2$) và nhiệt độ ($22,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$), sau xử lý pH tăng nhẹ lên lần lượt $7,5 \pm 0,1$ và $24,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$, các điều kiện đều nằm trong phạm vi tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn lam. Tổng chất rắn lơ lửng (TSS) tăng nhẹ từ 1,4 mg/L lên 2,73 mg/L, có thể do tích tụ sinh khối tảo trong nước effluent sau thu hoạch. Hệ thống đạt hiệu suất loại bỏ dinh dưỡng rất cao, cụ thể: N-NO₃⁻ đạt $99,8 \pm 3,7$ %; Amonium (N-NH₄⁺): $92,6 \pm 2,5$ %; Tổng nitrogen (T-N): $90,3 \pm 1,8$ % (với hàm lượng giảm từ $36,1 \pm 0,52$ mg/L xuống $3,52 \pm 0,03$ mg/L). Tương tự, nồng độ phosphate (P-PO₄³⁻) và tổng phosphorus (T-P) được loại bỏ lần lượt $96,5 \pm 5,1$ % và $95,9 \pm 2,9$ %. Khả năng loại bỏ chất hữu cơ cao, cụ thể: COD (sau điều chỉnh) giảm từ $3.370 \pm 5,7$ mg/L xuống $11,87 \pm 0,14$ mg/L ($99,6 \pm 0,8$ %); BOD₅ giảm từ $2.200 \pm 5,0$ mg/L xuống $8,0 \pm 0,5$ mg/L ($99,6 \pm 1,6$ %). Điều này càng khẳng định, chủng *S. salina* M8 đạt hiệu quả loại bỏ chất ô nhiễm toàn diện, vượt xa quy chuẩn xả thải Quốc gia QCVN 14:2025/BTNMT.

**Bảng 3.20. Hiệu suất loại bỏ các chất ô nhiễm bởi *S. salina* M8
trong nước thải sinh hoạt hệ 30 L (n=3)**

Thông số	Giá trị các thông số (mg/L)		Hiệu suất xử lý (%)	QCVN 14:2025/BTNMT		Đánh giá
	Trước xử lý	Sau xử lý		Cột A	Cột B	
pH	7,0 ± 0,2	7,5 ± 0,1	ND	6-9	6-9	-
Nhiệt độ	22,0 ± 0,21	24,5 ± 0,1	ND	-	-	-
TSS	1,4 ± 0,2	2,73 ± 0,2	ND	-	-	-
N-NO ₃ ⁻	3,2 ± 0,1	0,005 ± 0,00	99,8 ± 3,7	-	-	-
N-NH ₄ ⁺	32,12 ± 0,42	2,38 ± 0,01	92,6 ± 2,5	≤ 4,0	≤ 8,0	Đạt
T-N	36,12 ± 0,52	3,52 ± 0,03	90,3 ± 1,8	≤ 25	≤ 30	Đạt
P-PO ₄ ³⁻	4,24 ± 0,15	0,15 ± 0,03	96,5 ± 5,1	-	-	-
T-P	5,2 ± 0,2	0,21 ± 0,01	95,9 ± 2,9	≤ 2,5	≤ 3,0	Đạt
COD	3370 ± 5,7	11,87 ± 0,14	99,6 ± 0,8	≤ 50	≤ 60	Đạt
BOD ₅	2200 ± 5,0	8,00 ± 0,51	99,6 ± 1,6	≤ 25	≤ 30	Đạt
C:N:P (sau điều chỉnh)	Tỷ lệ khối lượng 70:7:1		ND	-	-	-
	Tỷ lệ mol 180:16:1			-	-	-

ND: Không xác định

Hiệu suất loại bỏ dinh dưỡng và chất hữu cơ vượt trội được ghi nhận đối với *S. salina* M8 hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước đây về khả năng phycoremediation của vi khuẩn lam trong nước thải sinh hoạt và công nghiệp. Ví dụ, Rueda và cộng sự (2022) báo cáo rằng *Synechocystis sp.* nuôi trong nước thải sau xử lý đạt hiệu suất loại bỏ trên 85% amoni và 90% photphate, cùng với giảm 95% COD trong điều kiện quang dưỡng [110]. Tương tự, *Synechocystis sp.* cũng cho thấy khả năng loại bỏ amoni và photphate rất cao, lần lượt 99,4% và 97,5%, từ nước thải sinh hoạt và công nghiệp của Abedi và cộng sự (2019). Hiệu suất loại bỏ dinh dưỡng gần như hoàn toàn (> 90%) trong nghiên cứu này vượt trội hơn nhiều kết quả quy mô phòng thí nghiệm, chứng tỏ *S. salina* M8 có khả năng thích nghi rất tốt trong điều kiện nước thải ngoài trời, không tiệt trùng. Hơn nữa, mức giảm COD và BOD (99,6%) thu được trong nghiên cứu này cũng vượt mức được báo cáo ở các hệ thống xử lý bằng vi khuẩn lam khác. Chẳng hạn, Troschl và cộng sự, (2018) chỉ đạt mức giảm 85–90% COD và BOD trong hệ thống quang sinh quy mô pilot

sử dụng *Synechocystis* [123, 124, 168]. Hiệu suất vượt trội của *S. salina* M8 có thể được giải thích bởi khả năng quang hợp mạnh, cơ chế hấp thu dinh dưỡng hiệu quả, và tính tương thích cao với vi sinh vật bản địa trong nước thải sinh hoạt.

Theo **Bảng 3.20** tỷ lệ mol C:N:P của nước thải sinh hoạt dùng để nuôi *S. salina* M8 xấp xỉ 180:16:1, trong khi tỷ lệ Redfield cổ điển cho sinh trưởng vi tảo cân bằng trong hệ sinh thái nước mặn và nước ngọt là 106:16:1. Điều này cho thấy tỷ lệ nitrogen (N) và phosphorus (P) trong nước thải gần tương đồng với tỷ lệ Redfield, nghĩa là nước thải cung cấp mức dinh dưỡng đa lượng đầy đủ cho quá trình tổng hợp tế bào và sinh tổng hợp chlorophyll, nhưng hạn chế tích lũy PHB nội bào, do dòng carbon ưu tiên chuyển vào sinh khối hơn là vào các polymer dự trữ. Tuy nhiên, thành phần carbon (C) trong nước thải này cao hơn 70 % so với tỷ lệ Redfield ($C/N > 150$), cho thấy môi trường giàu carbon và hơi thiếu nitrogen. Điều kiện thừa carbon này có hai ý nghĩa lớn đối với chuyển hóa của vi khuẩn lam: (i) Tăng cường hấp thu carbon và tích lũy PHB. Khi tỷ lệ C:N vượt tỷ lệ Redfield [2, 123-125], các loài vi khuẩn lam như *Synechocystis* hoặc *Synechococcus* có xu hướng chuyển carbon dư thừa vào các hợp chất dự trữ như glycogen và PHB, thay vì vào tổng hợp protein. Các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ C/N cao (> 120) thúc đẩy mạnh mẽ sự tích lũy PHB ở giống *Synechocystis*, do sự hạn chế nitrogen làm chậm phân chia tế bào trong khi quang hợp vẫn tiếp tục cố định carbon [110]. Xu hướng này phù hợp với hàm lượng PHB cao (40–45 % DCW) của *S. salina* M8 được ghi nhận trong nghiên cứu này. (ii) Giảm nhẹ tốc độ sinh trưởng nhưng tăng hiệu suất loại bỏ dinh dưỡng, mặc dù tỷ lệ C/N cao có thể hạn chế tổng hợp protein và làm chậm pha sinh trưởng lũy thừa, nó lại tăng cường hiệu quả loại bỏ N và P khỏi nước thải, do tế bào tích cực hấp thu các chất dinh dưỡng để cân bằng lại tỷ lệ dinh dưỡng nội bào. Hiệu suất loại 90% đối với tổng N và P trong **Bảng 3.20** càng khẳng định thêm về cơ chế này.

Để làm rõ hơn cơ chế này, cân bằng tương đối giữa carbon và nitrogen trong hệ 30 L được xem xét thông qua sự biến thiên của COD và tổng nitrogen theo thời gian nuôi cấy. Ở giai đoạn đầu, khi nồng độ nitrogen còn cao (trên ~70–80% so với ban đầu), phần lớn nguồn carbon được sử dụng cho sinh trưởng tế bào, thể hiện qua sự gia tăng nhanh sinh khối. Khi quá trình nuôi cấy tiếp diễn, nitrogen giảm mạnh (hiệu suất loại bỏ đạt $> 90\%$), trong khi COD vẫn còn tồn tại ở mức nhất định, dẫn đến trạng thái mất cân bằng theo hướng dư carbon – thiếu nitrogen. Trong điều kiện này, phần carbon không còn được sử dụng hiệu quả cho tổng hợp sinh khối sẽ được chuyển hướng vào tích lũy nội bào dưới dạng PHB. Xu hướng này phù hợp với kết quả thực nghiệm khi hàm lượng PHB tăng rõ rệt ở giai đoạn cuối chu kỳ nuôi, đồng thời sinh trưởng có xu hướng chậm lại. Như vậy, sự gia tăng tỷ lệ C/N hiệu dụng trong hệ nuôi cấy chính là

yếu tố điều khiển quan trọng chi phối phân bố đồng carbon giữa hai quá trình cạnh tranh là sinh trưởng sinh khối và tích lũy polymer sinh học.

Việc bổ sung acid acetic và nitrate trong nghiên cứu này được sử dụng như một chiến lược có kiểm soát ở giai đoạn nghiên cứu, nhằm điều chỉnh cân bằng C:N:P và làm rõ tiềm năng chuyển hóa của *S. salina* M8 dưới các điều kiện tối ưu. Mặc dù cách tiếp cận này cho thấy việc làm giàu carbon hợp lý và hạn chế nitrogen ở mức trung bình có thể tối đa hóa sinh khối và khả năng tích lũy PHB, nhưng các biện pháp điều chỉnh dinh dưỡng phụ thuộc vào hóa chất như vậy không phù hợp cho vận hành dài hạn hoặc quy mô công nghiệp, nơi chi phí, tính bền vững và sự đơn giản trong vận hành là yếu tố then chốt. Ở quy mô lớn, việc bổ sung hóa chất thường xuyên sẽ làm tăng gánh nặng kinh tế và môi trường, đi ngược lại mục tiêu cốt lõi của mô hình sản xuất PHB tích hợp với xử lý nước thải. Từ góc độ ứng dụng thực tiễn, kết quả nghiên cứu cho thấy *S. salina* M8 có khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB hiệu quả trực tiếp trong nước thải sinh hoạt không tiệt trùng, mở ra tiềm năng triển khai tại các hệ thống xử lý nước thải quy mô vừa và nhỏ, đặc biệt trong điều kiện khí hậu nhiệt đới như Việt Nam. Mô hình này cho phép tích hợp đồng thời hai mục tiêu: xử lý ô nhiễm và thu hồi tài nguyên sinh học, góp phần nâng cao hiệu quả kinh tế – môi trường của hệ thống xử lý nước thải.

Do đó, các nghiên cứu và phát triển trong tương lai cần ưu tiên mô hình vận hành “không hoặc tối thiểu hóa chất bổ sung”, tận dụng thành phần dinh dưỡng vốn có của nước thải và khai thác các biến động tự nhiên của tỷ lệ C:N:P, thay vì điều chỉnh nhân tạo. Nhiều chiến lược tiềm năng có thể hiện thực hóa hướng tiếp cận này: (i). Pha trộn chọn lọc các dòng nước thải khác nhau (ví dụ: nước thải sau lắng sơ cấp, dịch lên men yếm khí, nước thải chế biến thực phẩm) để đạt tỷ lệ C/N cao một cách tự nhiên; (ii). Điều chỉnh nhẹ thời gian lưu thủy lực (HRT) để tạo điều kiện hạn chế nitrogen nội sinh mà không cần bổ sung hóa chất; (iii). Đồng nuôi cấy với vi khuẩn giải phóng carbon giúp tăng nguồn carbon hữu cơ ngay tại chỗ; (iv). Tích hợp khí thải giàu CO₂ từ công nghiệp làm nguồn carbon chính. Kết hợp các giải pháp này có thể duy trì mức độ stress dinh dưỡng kích thích sinh tổng hợp PHB mà không cần bổ sung hóa chất liên tục, từ đó xây dựng mô hình sản xuất chi phí thấp, tuần hoàn, dễ mở rộng và phù hợp hoàn toàn với định hướng nhà máy sinh học xử lý nước thải bền vững.

Về khả năng mở rộng quy mô, kết quả từ hệ quang sinh 30 L cho thấy tính khả thi bước đầu của việc chuyển đổi từ quy mô phòng thí nghiệm sang quy mô pilot trong điều kiện gần thực tế. Tuy nhiên, việc mở rộng nuôi cấy *S. salina* M8 từ hệ quang sinh 30L có kiểm soát lên quy mô pilot mang lại cả thách thức vận hành lẫn cơ hội giảm chi phí. Ở thể tích lớn hơn, việc duy trì sự đồng đều về phân bố ánh sáng, truyền khí

và khuấy trộn trở nên phức tạp hơn, dễ hình thành các gradient không gian về pH, CO₂ và nồng độ dinh dưỡng, từ đó làm giảm sinh trưởng sinh khối và tích lũy PHB. Khi vận hành ngoài trời, hệ thống còn chịu tác động của các yếu tố môi trường biến động như cường độ chiếu sáng, nhiệt độ, điều kiện thời tiết theo chu kỳ ngày - đêm và cạnh tranh vi sinh, những yếu tố đã xuất hiện trong thí nghiệm 30 L và có thể trở nên rõ rệt hơn khi mở rộng quy mô. Đảm bảo sự ổn định của hệ nuôi trong nước thải không triệt trùng là thách thức lớn, vì nhiễm tạp và phân hủy chất hữu cơ có thể làm giảm hàm lượng PHB so với điều kiện vô trùng. Các hiện tượng như bám sinh học (biofouling) trên bề mặt ống phản ứng, tích tụ oxygen hòa tan cao do quang hợp, cũng như lực cắt thủy động trong hệ tuần hoàn có thể ảnh hưởng đến tính ổn định của hệ nuôi và hiệu suất sinh trưởng của tế bào. Tuy nhiên, việc mở rộng quy mô cũng mang lại nhiều lợi thế về mặt kinh tế và kỹ thuật. Việc sử dụng trực tiếp nước thải sinh hoạt làm nguồn dinh dưỡng và môi trường nuôi cấy giúp giảm đáng kể nhu cầu sử dụng các nguồn dinh dưỡng tổng hợp, từ đó giảm chi phí vận hành. Hiệu suất loại bỏ chất dinh dưỡng rất cao (> 90% T-N và T-P; > 99% COD và BOD₅) trong hệ 30 L cho thấy rằng hệ pilot có thể đồng thời giảm chi phí xử lý nước thải và tạo sinh khối giàu PHB. Việc tích hợp các giải pháp như chiếu sáng tiết kiệm năng lượng, khuấy trộn thụ động, và sử dụng khí thải giàu CO₂ có thể tiếp tục nâng cao hiệu quả kinh tế của hệ thống, phù hợp với định hướng phát triển công nghệ sinh học xanh và kinh tế tuần hoàn. Do đó, các kết quả thu được từ hệ thống 30 L không chỉ chứng minh tính khả thi về mặt kỹ thuật mà còn cho thấy tiềm năng ứng dụng thực tiễn và khả năng mở rộng của mô hình trong các hệ thống xử lý nước thải tại Việt Nam.

Tóm lại, tỷ lệ C:N:P bằng 180:16:1 trong nước thải sinh hoạt tạo ra một môi trường giàu carbon và hơi thiếu nitrogen, lệch nhẹ so với tỷ lệ Redfield. Sự mất cân bằng này không làm cản trở sự sinh trưởng của *S. salina* M8 mà ngược lại còn tăng hiệu quả loại bỏ dinh dưỡng và tích lũy PHB, cho thấy rằng điều kiện thiếu nitrogen ở mức độ vừa phải trong khi nguồn carbon dồi dào là thuận lợi cho các chủng vi khuẩn lam sinh tổng hợp nhựa sinh học. Kết quả cũng khẳng định rằng *S. salina* M8 không chỉ thích nghi tốt với nước thải thực tế mà còn đạt mức loại bỏ chất ô nhiễm tương đương hoặc vượt trội so với các hệ tối ưu hóa sử dụng *Synechocystis* hoặc *Scenedesmus* trong các nghiên cứu trước đây. Dữ liệu thu được cũng chứng minh *S. salina* M8 có tiềm năng rất lớn cho mô hình tích hợp xử lý nước thải và sản xuất các sản phẩm sinh học (như PHB). Hiệu suất loại bỏ dinh dưỡng 90 – 99,8% và giảm tải hữu cơ > 99% của chủng này vượt trội hơn nhiều hệ vi khuẩn lam được nghiên cứu trước đó. Tổng thể, các so sánh cho thấy *S. salina* M8 là một chủng tự nhiên tương đối ưu thế, có khả năng đạt đồng thời sinh khối cao và năng suất PHB lớn trong hệ thống nước thải thực, nhấn mạnh tiềm năng nổi bật của *S. salina* M8 cho xử lý nước thải tích hợp và sản xuất nhựa sinh học. Kết

quả nghiên cứu không chỉ khẳng định hiệu quả xử lý nước thải sinh hoạt của *S. salina* M8 mà còn làm nổi bật khả năng chuyển hóa dòng carbon thành vật liệu sinh học có giá trị, qua đó mở ra hướng tiếp cận tích hợp giữa xử lý môi trường và sản xuất tài nguyên sinh học trong điều kiện thực tế tại Việt Nam.

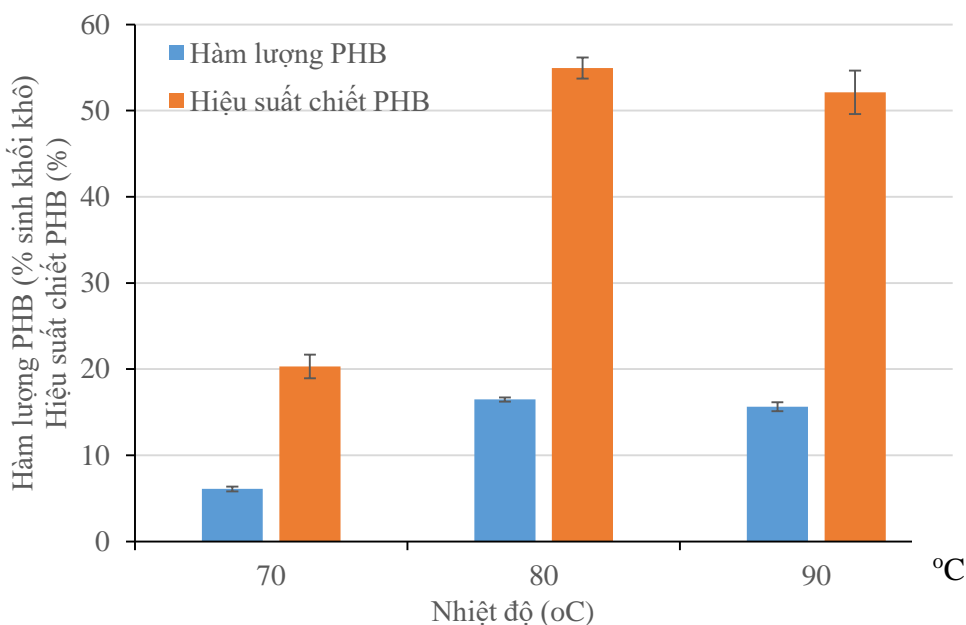
3.6. Kết quả về nghiên cứu chiết tách và đặc trưng vật liệu nhựa sinh học PHB từ sinh khối *S. salina* M8

Trên cơ sở kết quả nghiên cứu ứng dụng về sản xuất sinh khối và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong hệ phản ứng 30 L vận hành ngoài trời tại **Mục 3.5**, nghiên cứu tiếp theo tập trung đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chiết tách PHB từ sinh khối nhằm hoàn thiện quy trình thu hồi polymer sinh học.

3.6.1. Kết quả về ảnh hưởng của các yếu tố chiết tách đến hiệu suất thu hồi PHB

3.6.1.1. Kết quả về ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tách

Kết quả thu được từ thí nghiệm chiết tách PHB được thực hiện ở ba khoảng nhiệt độ: 70, 80 và 90°C, trong khi các điều kiện khác giữ cố định (thời gian chiết 60 phút; thể tích chloroform 5 mL) được thể hiện trong **Hình 3.21**.



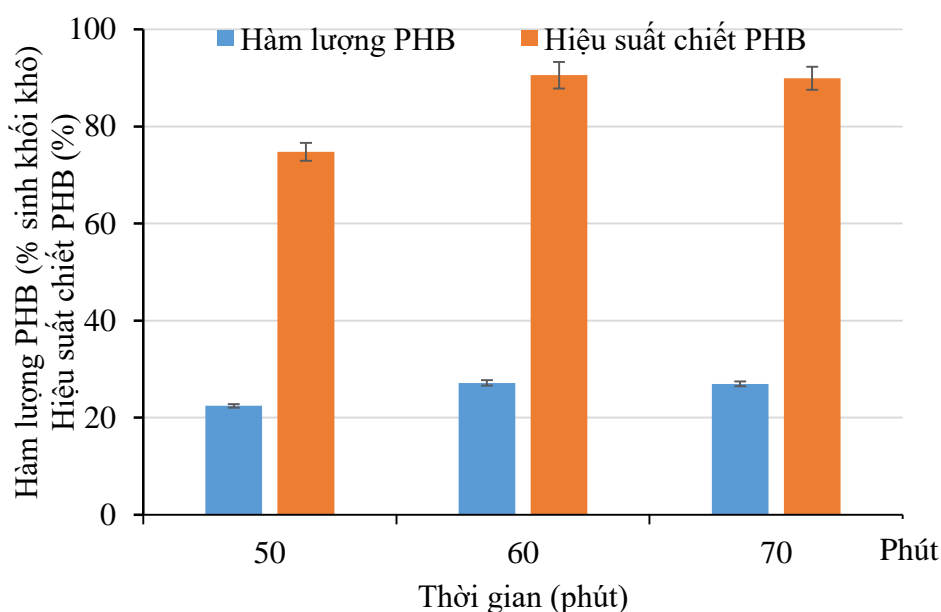
Hình 3.21. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối *S. salina* M8 (n =3)

Hình 3.21 trình bày kết quả về ảnh hưởng của nhiệt độ chiết (70–90°C) đến hàm lượng PHB trong sinh khối khô và hiệu suất chiết PHB. Khi tăng nhiệt độ từ 70 lên 80°C, hàm lượng PHB thu hồi tăng đáng kể, từ khoảng 6% lên ~16–17%, đồng thời hiệu suất chiết tăng mạnh từ ~20% lên gần 55%. Sự cải thiện này có thể được giải thích do nhiệt độ cao hơn giúp tăng khả năng hòa tan PHB trong dung môi chloroform và thúc đẩy quá trình phá vỡ cấu trúc tế bào, qua đó giải phóng polymer hiệu quả hơn.

Tuy nhiên, khi tiếp tục nâng nhiệt độ lên 90°C, hàm lượng PHB và hiệu suất chiết có xu hướng giảm nhẹ hoặc không tăng thêm trong phạm vi sai số. Điều này cho thấy ở nhiệt độ quá cao, PHB có thể bắt đầu bị suy giảm chất lượng hoặc xảy ra tổn thất trong quá trình chiết. Do đó, ở nhiệt độ 80°C được xác định là nhiệt độ tối ưu, đảm bảo hiệu quả thu hồi PHB cao đồng thời hạn chế tiêu hao năng lượng và rủi ro phân hủy polymer.

3.6.1.2. Kết quả về ảnh hưởng của thời gian chiết tách

Thực hiện thí nghiệm tinh chiết PHB ở các mốc thời gian khác nhau: $t_{\text{chiết}} = 50, 60$ và 70 phút. Các điều kiện khác được giữ cố định: Nhiệt độ chiết ($T = 80^\circ\text{C}$) và thể tích dung dịch chloroform ($V_{\text{Chloroform}} = 5 \text{ mL}$).



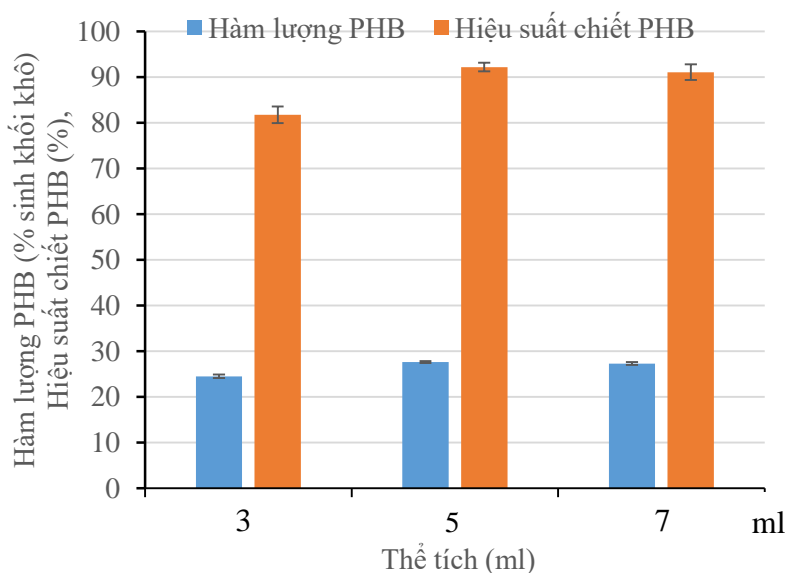
Hình 3.22. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối *S. salina* M8 ($n = 3$)

Kết quả thể hiện trên **Hình 3.22** cho thấy, khi tăng thời gian chiết từ 50 lên 60 phút, hàm lượng PHB thu được tăng rõ rệt (từ khoảng 22–23% lên ~27% sinh khối khô), đồng thời hiệu suất chiết tăng mạnh từ ~75% lên xấp xỉ 90%. Điều này cho thấy thời gian 60 phút là đủ để dung môi và tác nhân chiết phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng PHB hiệu quả hơn. Tuy nhiên, khi tiếp tục kéo dài thời gian chiết đến 70 phút, hàm lượng PHB gần như không tăng thêm và hiệu suất chiết chỉ duy trì ở mức tương đương hoặc giảm nhẹ trong sai số thí nghiệm. Xu hướng này cho thấy quá trình chiết đã đạt trạng thái bão hòa, việc kéo dài thời gian không mang lại lợi ích đáng kể mà còn có thể làm tăng tiêu hao năng lượng và nguy cơ phân hủy polymer. Do đó, với thời gian 60 phút được xem là thời gian chiết tối ưu, cân bằng giữa hiệu quả thu hồi PHB và hiệu suất quy trình.

3.6.1.3. Kết quả về ảnh hưởng của thể tích dung môi chiết chloroform

Trong nghiên cứu này, chloroform được lựa chọn làm dung môi chiết tách PHB do đây là dung môi cơ bản và được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về PHA/PHB ở quy mô phòng thí nghiệm. Việc sử dụng chloroform cho phép hòa tan chọn lọc PHB, đồng thời đảm bảo tính nhất quán về phương pháp, tạo cơ sở thuận lợi cho việc so sánh, đối chiếu kết quả về hiệu suất thu hồi và hàm lượng PHB với các công trình đã công bố trong nước và Quốc tế. Trên cơ sở đó, ảnh hưởng của dung môi chiết đến hiệu suất thu hồi và đặc tính PHB được đánh giá nhằm làm rõ tính phù hợp của dung môi này trong điều kiện nghiên cứu.

Thực hiện thí nghiệm tinh chiết ở các thể tích chloroform khác nhau: $V_{\text{Chloroform}} = 3, 5$ và 7 mL, tương ứng với tỷ lệ dung môi/sinh khối lần lượt là 6 mL/g, 10 mL/g và 14 mL/g. Các điều kiện khác được giữ cố định: Nhiệt độ chiết ($T = 80^{\circ}\text{C}$) và thời gian chiết ($t_{\text{chiết}} = 60$ phút).



Hình 3.23. Ảnh hưởng của thể tích chloroform đến hiệu suất chiết PHB từ sinh khối *S. salina* M8 ($n = 3$)

Số liệu trên **Hình 3.23** cho thấy, hàm lượng PHB chiết được tính theo sinh khối khô dao động từ $24,53\%$ đến $27,65\%$. Tương ứng với hàm lượng PHB chiết, thì hiệu suất thu hồi PHB đạt $82,92\%$ và 91% khi dùng $3, 5$ và 7 mL dung môi chloroform. Mức tối ưu đạt $27,65\%$ sinh khối khô (hiệu suất thu hồi 92%) khi dùng 5 mL dung môi (≈ 10 mL/g sinh khối). Tăng từ 3 lên 5 mL giúp tăng hiệu suất do tăng gradient khuếch tán; tuy nhiên, khi nâng lên 7 mL, hiệu suất không cải thiện đáng kể, phản ánh trạng thái bão hòa khối chuyển hoặc giới hạn khuếch tán. Việc dùng nhiều dung môi hơn chỉ làm tăng chi phí và rủi ro an toàn mà không nâng cao sản lượng.

3.6.1.4. Cơ chế hòa tan PHB trong chloroform và phương pháp thu hồi - xử lý dung môi

Nghiên cứu đã sử dụng dung môi chloroform trong chiết suất PHB từ sinh khối của *S. salina* M8. PHB là polyester kỵ nước, có khả năng hòa tan tốt trong các dung môi halogen hóa, đặc biệt là chloroform, nhờ sự tương tác hiệu quả giữa phân tử dung môi và mạch polymer, cho phép phá vỡ các liên kết nội phân tử và hòa tan PHB sau khi cấu trúc tế bào bị suy yếu hoặc phá vỡ [146]. Nhờ đặc tính hòa tan chọn lọc này, chloroform thường cho hiệu suất thu hồi PHB cao và độ tinh sạch tốt hơn so với nhiều dung môi hữu cơ không halogen. Quá trình chiết được tiến hành ở nhiệt độ cao (80°C) và thời gian đủ dài (60 phút), giúp tăng khả năng thâm thấu của dung môi vào sinh khối, làm tăng hệ số khuếch tán và thúc đẩy quá trình hòa tan PHB từ tế bào ra pha dung môi [146]. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi PHB tăng khi thể tích chloroform tăng đến mức tối ưu 5 mL, nhưng không cải thiện đáng kể khi tiếp tục tăng lên 7 mL. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi giới hạn khuếch tán và bão hòa khối chuyển, khi lượng PHB hòa tan đạt trạng thái cân bằng với thể tích dung môi [146]. Mặc dù chloroform cho hiệu quả chiết PHB cao, đây là dung môi halogen hóa có độc tính, tiềm ẩn rủi ro đối với sức khỏe con người và môi trường. Do đó, trong nghiên cứu này chloroform chỉ được sử dụng với lượng nhỏ, phù hợp cho quy mô phòng thí nghiệm, và toàn bộ dung môi sau chiết được thu hồi bằng phương pháp cô quay chân không ở điều kiện áp suất giảm và nhiệt độ thấp nhằm hạn chế phát thải ra môi trường. Đối với định hướng ứng dụng ở quy mô lớn và thương mại, việc thay thế chloroform bằng các dung môi thân thiện môi trường hơn như ethyl acetate, acetone, propylene carbonate, limonene hoặc CO₂ siêu tới hạn là cần thiết nhằm đảm bảo tính an toàn và bền vững của quy trình chiết tách PHB [146].

3.6.1.5. Sinh khối còn lại sau thu hồi PHB

Với hàm lượng PHB thu hồi tối đa 27,6% (\approx 276,5 mg PHB/g sinh khối khô), tương đương với hiệu suất chiết PHB đạt 92%, phần sinh khối còn lại khoảng 72–73% khối lượng sinh khối sau chiết không phải là PHB. Thành phần còn lại chủ yếu gồm protein, carbohydrate, lipid phi-PHB, khoáng chất và thành phần thành tế bào (polysaccharide ngoại bào, sắc tố quang hợp như chlorophyll, phycobiliprotein) [146].

Đây là đặc điểm phổ biến của vi khuẩn lam: tỷ lệ PHB thường chiếm 10–40% khối lượng khô tùy vào điều kiện nuôi dưỡng, phần còn lại vẫn giàu dinh dưỡng [146]. Ở quy mô phòng thí nghiệm, phần bã sau chiết có thể được tận dụng hoặc xử lý như một phụ phẩm có giá trị như:

- Làm nguyên liệu sản xuất phân bón hữu cơ hoặc chế phẩm vi sinh sau khi loại bỏ dung môi, nhờ hàm lượng nitrogen – phosphorus cao trong tế bào vi khuẩn lam [146].
- Tiếp tục nghiên cứu chiết tách thêm các hợp chất sinh học (phycocyanin, carotenoid) phục vụ cho dược phẩm hoặc thực phẩm chức năng [146].

- Sử dụng như nguồn carbon/nitrogen cho các hệ xử lý sinh học hoặc làm giá thể tạo năng lượng sinh học (biogas) [146].

Ngoài ra, để tái sử dụng an toàn cần đảm bảo quá trình loại bỏ hoàn toàn chloroform trước khi tái sử dụng bã để tránh phát thải hóa chất độc hại [146]. Khi mở rộng quy mô, có thể tích hợp bước rửa – bay hơi dung môi và kiểm soát chất lượng nhằm biến phần sinh khối còn lại từ “chất thải sau chiết” thành nguồn tài nguyên thứ cấp, phù hợp định hướng kinh tế tuần hoàn [146].

Tóm lại, với kết quả khảo sát các thông số chiết cho thấy nhiệt độ chiết 80°C, thời gian chiết 60 phút và thể tích chloroform 5 mL là điều kiện tối ưu để thu hồi PHB từ sinh khối *S. salina* M8. Hàm lượng thu hồi tối đa của PHB từ sinh khối *S. salina* M8 đạt 27,65% tương đương 276,5 mg PHB/g sinh khối sử dụng (với hiệu suất chiết đạt 92%). Hàm lượng PHB của *S. salina* M8 là tương đối cao trong số những chủng *Synechocystis* được nghiên cứu và công bố trên các tạp chí chuyên ngành [94].

Bảng 3.21. Tổng hợp so sánh hàm lượng PHB sản xuất bởi một số chủng thuộc loài *Synechocystis*

STT	Tên chủng	Chế độ nuôi	Hàm lượng PHB (%)	Tài liệu tham khảo
1	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Tạp dưỡng, acetate, thiếu N	25,6	[94]
2	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Quang dưỡng, thiếu N	26	[176]
3	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Dị dưỡng, acetate	35	[176]
4	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Dị dưỡng, acetate, fructose, thiếu P	38	[123, 177]
5	<i>S. salina</i> M8	Tạp dưỡng, acetate, thiếu P	27 – 31	Nghiên cứu này

Kết quả tổng hợp trong **Bảng 3.21** cho thấy, *S. salina* M8 tích lũy tới 27 – 31% PHB trong tế bào, thấp hơn so với chủng *Synechocystis* PCC 6803 nuôi dị dưỡng trong acetate và fructose cho kết quả tích lũy 38% [123, 177] và 35% tích lũy bởi *Synechocystis* PCC 6803 cũng nuôi dị dưỡng trong acetate [176], nhưng tương đương với 25,6% và 26% đã được công bố tương ứng cho *Synechococcus* sp. PCC 7942 nuôi tạp dưỡng trong acetate [94] và *Synechocystis* PCC 6803 nuôi quang dưỡng thiếu nitrogen [176]. Điều đó chứng minh chủng *S. salina* M8 được sàng lọc là có chất lượng tốt so với các chủng đã được công bố trên các tạp chí Quốc tế uy tín về sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB từ sinh khối của vi khuẩn lam.

3.6.2. Đặc tính của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết suất từ sinh khối *S. salina* M8

3.6.2.1 Đặc tính cấu trúc phân tử của vật liệu nhựa sinh học PHB thông qua phổ FT-IR

Để đánh giá mức độ tương đồng về cấu trúc hóa học, phổ FT-IR của mẫu PHB thu được được so sánh với phổ đặc trưng của PHB thương mại đã được công bố trong các tài liệu trước đây. Kết quả đo phổ FT-IR của PHB chiết và tinh sạch từ sinh khối *S. salina* M8 được thể hiện trên **Hình 3.24** cho thấy sự tương đồng cao giữa hai phổ, thể hiện qua sự xuất hiện và trùng khớp của các dải hấp thụ đặc trưng của polymer.

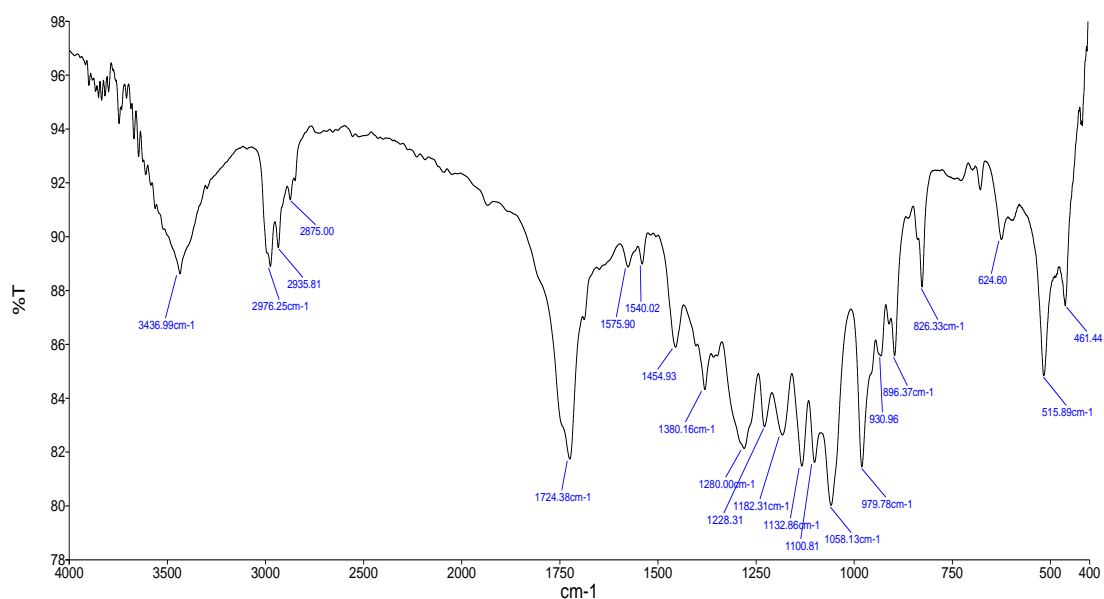
Cụ thể, đỉnh hấp thụ mạnh tại khoảng $\sim 1724\text{--}1725\text{ cm}^{-1}$, tương ứng với dao động kéo dẫn của nhóm carbonyl (C=O) trong liên kết este, xuất hiện rõ rệt ở cả mẫu nghiên cứu và PHB thương mại. Đây là tín hiệu đặc trưng quan trọng nhất của cấu trúc polyester, khẳng định sự hình thành mạch polymer với bản chất hóa học điển hình của PHB [140-142].

Trong vùng $\sim 2975\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$, các dải hấp thụ tương ứng với dao động kéo dẫn của nhóm $-\text{CH}_3$ và $-\text{CH}_2$ cũng được ghi nhận tương đồng giữa hai mẫu. Điều này phản ánh sự hiện diện của mạch aliphatic đặc trưng trong cấu trúc PHB, đồng thời cho thấy mức độ bảo toàn cấu trúc hydrocarbon của polymer sau quá trình chiết tách.

Các dải hấp thụ tại $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ và $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$, liên quan đến dao động biến dạng của nhóm methyl và methylene, cũng trùng khớp tốt với phổ chuẩn. Đặc biệt, đỉnh tại $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ – thường được xem là “fingerprint” của nhóm $-\text{CH}_3$ trong PHB – xuất hiện rõ ràng, củng cố thêm bằng chứng về cấu trúc polymer [140-142].

Trong vùng $\sim 1280\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, phổ của mẫu nghiên cứu thể hiện nhiều dải hấp thụ đặc trưng của liên kết C–O–C và C–O trong nhóm este, tương tự với PHB thương mại. Sự phân bố các đỉnh trong vùng này phản ánh cấu trúc bán kết tinh của polymer, bao gồm cả pha tinh thể và vô định hình – đặc điểm điển hình của PHB sinh học.

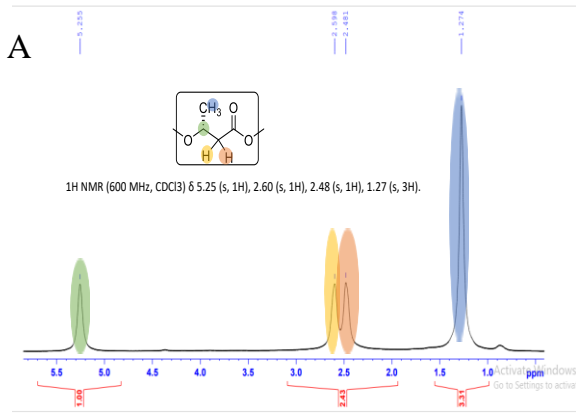
Tuy nhiên, một số sai khác nhỏ có thể quan sát được, đặc biệt là sự xuất hiện của dải hấp thụ rộng tại khoảng $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ trong mẫu nghiên cứu, trong khi phổ PHB thương mại thường ít thể hiện rõ dải này. Điều này có thể liên quan đến sự hiện diện của nhóm hydroxyl cuối mạch hoặc lượng ẩm/tạp chất còn sót lại sau quá trình tinh sạch. Ngoài ra, sự thay đổi nhẹ về vị trí và cường độ các đỉnh trong vùng fingerprint ($1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) có thể phản ánh sự khác biệt về mức độ kết tinh, khối lượng phân tử hoặc điều kiện sinh tổng hợp giữa PHB sinh học và PHB thương mại. Đáng chú ý, các đỉnh đặc trưng tại ~ 1380 , 1724 , 2976 , 2935 và $\sim 3436\text{ cm}^{-1}$ trong nghiên cứu này cũng tương đồng với các báo cáo trước đây trên các chủng vi khuẩn lam như *Spirulina subsalsa* [113] và *Nostoc muscorum* NCCU- 442 [2] cho thấy tính nhất quán về cấu trúc hóa học của PHB được sinh tổng hợp từ các nguồn vi sinh vật khác nhau.



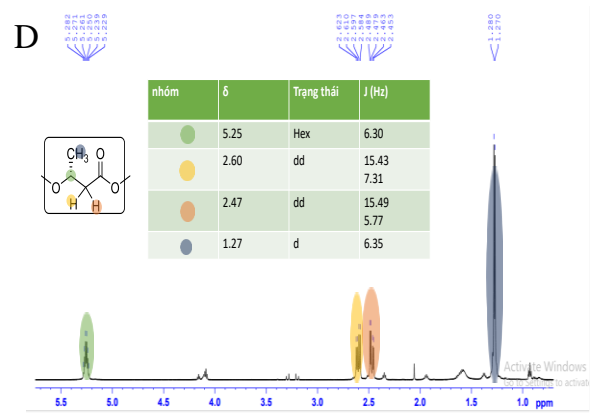
Hình 3.24. Phổ FT-IR của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

3.6.2.2. Đặc tính cấu trúc của vật liệu nhựa sinh học PHB thông qua phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$.

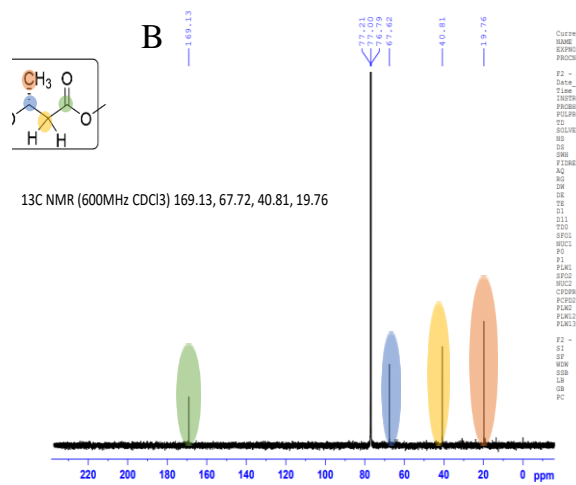
Kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, và 2 chiều của PHB chiết từ vi khuẩn lam *S. salina* M8 và PHB thương mại thể hiện trên **Hình 3.25** cho thấy, cấu trúc của PHB từ *S. salina* M8 và PHB thương mại là tương đương nhau với đơn phân polymer gồm 4C, 4H được bố trí. Bội số tại 5,25 ppm biểu thị proton methine (-CH) có carbon bất đối (**Hình 3.25-A**). Các proton trong nhóm methylene (-CH₂) được gán cho bộ bốn kép có giá trị cộng hưởng 2,43–2,50 ppm và 2,48–2,60 ppm. Cuối cùng là proton methyl (-CH₃) cho tín hiệu kép ở mức 1,27 ppm. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ của PHB chiết và tinh sạch từ nghiên cứu của Ansari và Fatma (2016) [2]. Đồng thời, phù hợp với kết quả phân tích $^1\text{H-NMR}$ của PHB thương mại (**Hình 3.25-D-F**).



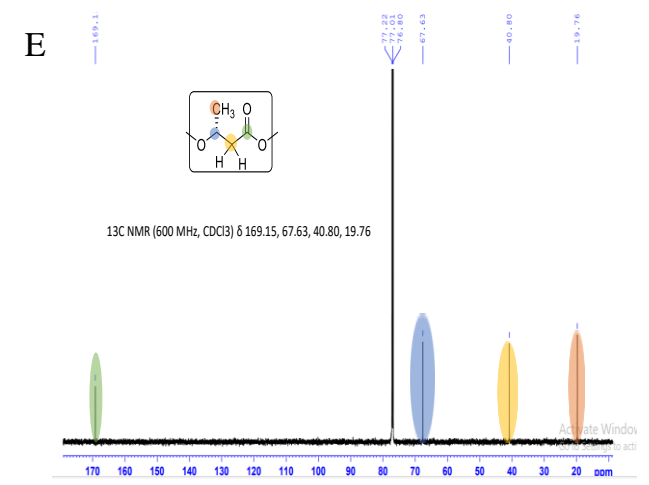
A - Phổ ¹H-NMR của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8



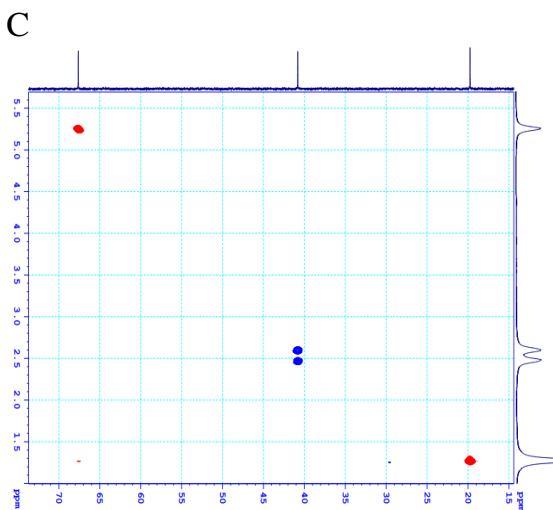
(D)- Phổ ¹H-NMR của PHB thương mại



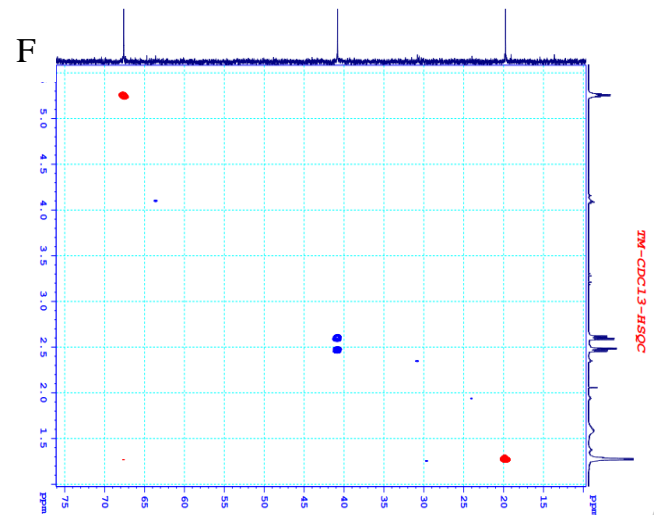
(B) - Phổ ¹³C-NMR của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8



(E)- Phổ ¹³C-NMR của PHB thương mại



(C)- Phổ 2 chiều của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

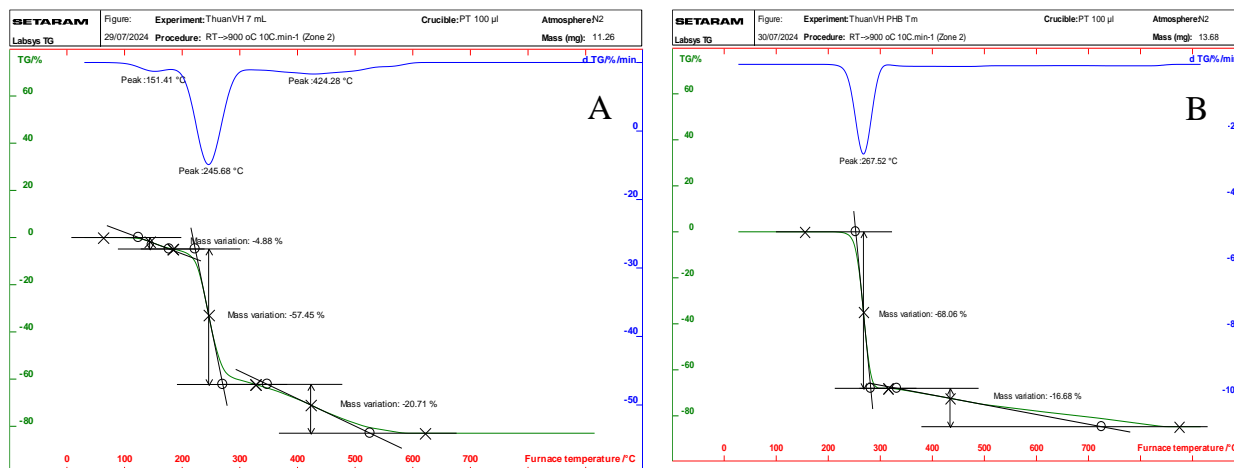


(F)- Phổ 2 chiều của PHB thương mại

Hình 3.25. Phổ ¹H-NMR và phổ ¹³C-NMR của vật liệu nhựa sinh học PHB

3.6.2.3. Đặc tính phổ nhiệt học qua phân tích TGA và DSC của vật liệu nhựa sinh học PHB

Sự phân hủy nhiệt của PHB được biết là xảy ra thông qua phản ứng phân mảnh chuỗi ngẫu nhiên của các nhóm este PHB để tạo thành chuỗi ngắn hơn với các nhóm đầu cacboxygenic và olefinic.



(A) - Phổ TGA/DTG của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

(B) - Phổ TGA/DTG của PHB thương mại

Hình 3.26. Phổ TGA/DTG của vật liệu nhựa sinh học PHB

Nhiệt độ phân hủy 2% khối lượng PHB ban đầu được xác định là $T_{\text{onset}} = 146,35^{\circ}\text{C}$ và nhiệt độ tại đó 10% PHB phân hủy được xác định là $T_{10} = 221,76^{\circ}\text{C}$. Nhiệt độ tại đó tốc độ phân hủy PHB đạt đỉnh (max) là $T_{\text{max}} = 245,68^{\circ}\text{C}$ (**Hình 3.26-A**).

Nhiệt độ phân hủy 2% khối lượng PHB ban đầu được xác định là $T_{\text{onset}} = 242,05^{\circ}\text{C}$ và nhiệt độ tại đó 10% PHB phân hủy được xác định là $T_{10} = 254,47^{\circ}\text{C}$. Nhiệt độ tại đó tốc độ phân hủy PHB đạt đỉnh (max) là $T_{\text{max}} = 267,52^{\circ}\text{C}$ (**Hình 3.26-B**).

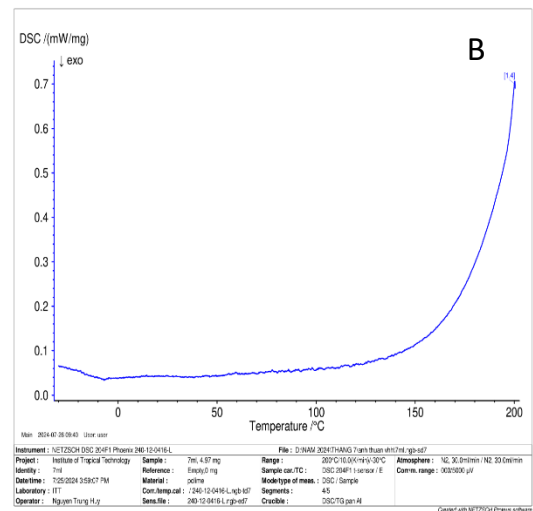
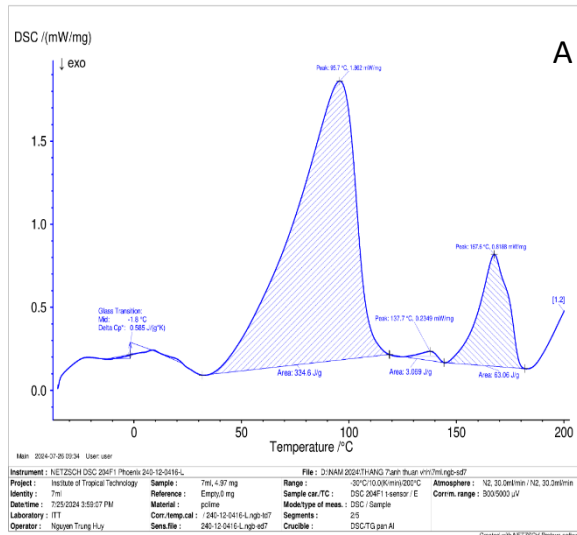
Kết quả phân tích TGA/DTG cho thấy các số liệu về T_{onset} , T_{10} , và T_{max} của PHB chiết xuất từ sinh khối *S. salina* M8 thấp hơn so với PHB thương mại, phản ánh bản chất vật liệu có nguồn gốc sinh học polymer và mức độ tinh sạch của vật liệu.

PHB chiết xuất từ vi khuẩn lam thường có phân bố khối lượng phân tử rộng, bao gồm đồng thời các mạch polymer ngắn, trung bình và dài. Trong quá trình gia nhiệt, các mạch ngắn có xu hướng phân hủy trước, tiếp theo là các mạch có độ dài lớn hơn, dẫn đến cơ chế phân hủy nhiệt xảy ra theo kiểu từng giai đoạn kế tiếp (cuốn chiếu), làm hạ thấp nhiệt độ phân hủy ban đầu quan sát được. Bên cạnh đó, PHB sinh học trong nghiên cứu này được chiết tách từ sinh khối vi khuẩn lam ở quy mô phòng thí nghiệm, nên có thể còn tồn tại một lượng nhỏ tạp chất sinh học như protein, lipid, sắc tố hoặc dung môi dư. Các thành phần này có thể đóng vai trò xúc tác cho quá trình phân mảnh chuỗi polymer, góp phần làm giảm ngưỡng ổn định nhiệt so với PHB thương mại. Ngược lại, PHB thương mại thường có độ tinh khiết cao, khối lượng phân

tử lớn và mức độ kết tinh cao, được sản xuất bằng quy trình công nghiệp kiểm soát chặt chẽ, do đó thể hiện độ bền nhiệt vượt trội [123].

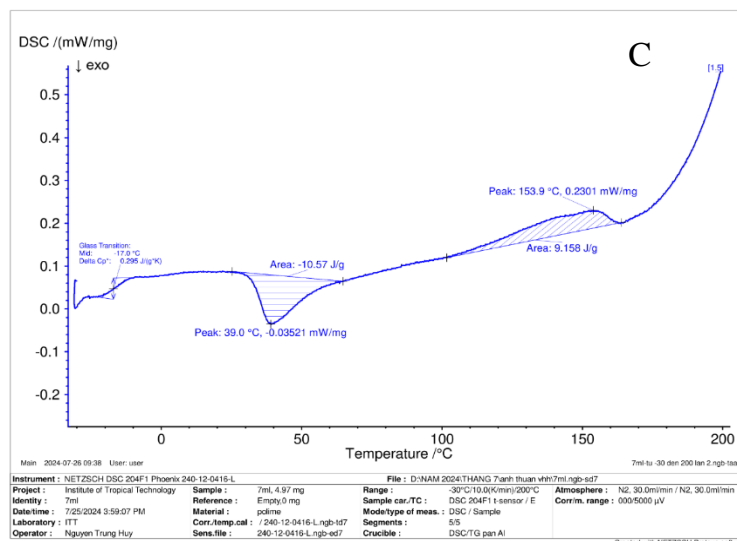
Ngoài ra, sự khác biệt về nguồn gốc sinh học cũng ảnh hưởng đến đặc tính nhiệt của vật liệu. Trong tế bào vi khuẩn lam, PHB được tích lũy dưới dạng các hạt nội bào có liên kết với protein bề mặt (granule-associated proteins). Quá trình chiết tách có thể chưa loại bỏ hoàn toàn lớp protein này, dẫn đến sự khác biệt về đặc tính nhiệt so với PHB thương mại dạng polymer tinh sạch [2].

Mặc dù các thông số T_{onset} , T_{10} và T_{max} của PHB từ *S. salina* M8 thấp hơn so với mẫu thương mại, đường cong TGA/DTG của hai mẫu đều thể hiện một giai đoạn phân hủy chính đặc trưng, với hình dạng và cơ chế phân hủy tương đồng, điển hình cho polymer PHB. Điều này khẳng định rằng vật liệu thu được từ sinh khối *S. salina* M8 là PHB về mặt cấu trúc polymer. Sự khác biệt về độ bền nhiệt không phù hợp của vật liệu sinh học thu được, mà phản ánh đặc trưng thường gặp của PHB sinh học chưa qua tinh sạch công nghiệp, đồng thời cho thấy tiềm năng cải thiện đặc tính nhiệt thông qua tối ưu hóa quy trình chiết tách và tinh sạch trong các nghiên cứu tiếp theo.



(A) - Phổ DSC của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8 từ (-30°C) đến 200°C

(B) - Phổ DSC của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8 từ 200°C đến (-30°C)



(C) - Phổ DSC của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8 từ (-30°C) đến 200°C lần 2

Hình 3.27. Phổ DSC của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

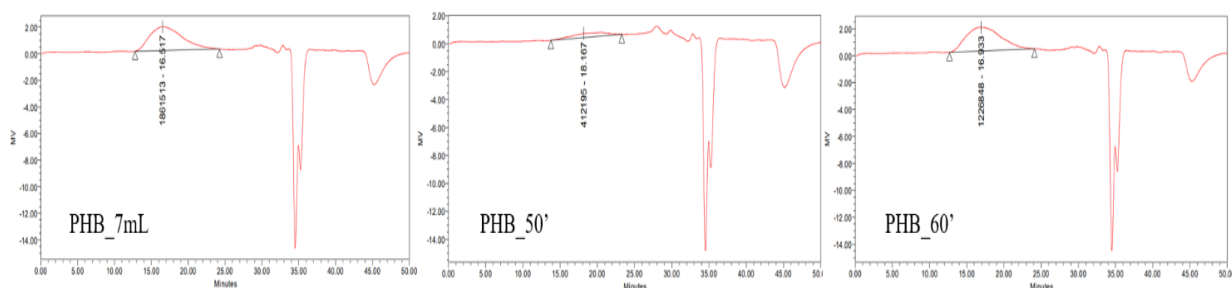
Phân tích nhiệt vi sai DSC được sử dụng nhằm đánh giá các đặc trưng nhiệt quan trọng của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết xuất từ sinh khối *S. salina* M8, bao gồm nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh (T_g), nhiệt độ nóng chảy (T_m) và mức độ kết tinh của polymer. Trong lần quét nhiệt thứ nhất (-30°C đến 200°C) (Hình 3.27-A), đường cong DSC thể hiện các hiệu ứng nhiệt phức tạp, phản ánh ảnh hưởng của lịch sử nhiệt và trạng thái cấu trúc ban đầu của mẫu. Do đó, lần quét này chủ yếu được sử dụng để loại bỏ lịch sử nhiệt trước đó và đưa polymer về trạng thái nhiệt chuẩn trước khi xác định các thông số đặc trưng. Trong giai đoạn làm nguội tiếp theo (Hình 3.27-B), không quan sát được đỉnh kết tinh rõ ràng (T_c), cho thấy quá trình kết tinh của PHB không

xảy ra đáng kể hoặc bị hạn chế. Hiện tượng này thường được ghi nhận đối với PHB sinh học chiết xuất trực tiếp từ sinh khối vi sinh vật, khi polymer có độ tinh khiết chưa cao hoặc tồn tại đồng thời các vùng vô định hình chiếm ưu thế, làm suy giảm khả năng tái kết tinh trong quá trình làm nguội. Trong lần quét gia nhiệt thứ hai từ -30°C đến 200°C (**Hình 3.27-C**), các thông số nhiệt đặc trưng của PHB được xác định rõ ràng hơn. Nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh T_g được xác định tại khoảng -17°C , phù hợp với khoảng T_g đã được báo cáo cho PHB sinh học (-20 đến -5°C), phản ánh sự chuyển pha của các vùng vô định hình trong polymer [123]. Đỉnh nóng chảy xuất hiện tại nhiệt độ $153,9^{\circ}\text{C}$, tương ứng với nhiệt độ nóng chảy T_m của PHB. Giá trị này thấp hơn so với PHB tinh khiết thương mại (khoảng $170-180^{\circ}\text{C}$), cho thấy mức độ kết tinh của polymer chiết xuất chưa cao và cấu trúc tinh thể chưa hoàn thiện. Sự sai khác này có thể bắt nguồn từ điều kiện sinh tổng hợp trong tế bào vi khuẩn lam cũng như ảnh hưởng của các thành phần không phải PHB còn tồn dư sau quá trình chiết tách. Entanpy nóng chảy thu được trong lần quét thứ hai đạt khoảng $9,158\text{ J/g}$. Dựa trên giá trị entanpy nóng chảy lý thuyết của PHB tinh thể hoàn toàn ($\Delta H^{\circ} \approx 146\text{ J/g}$) [58], độ kết tinh của PHB chiết xuất được tính toán đạt khoảng $6,25\%$. Giá trị này cho thấy polymer chủ yếu tồn tại ở trạng thái bán tinh thể với tỷ lệ vùng vô định hình cao. Mức độ kết tinh thấp đã được ghi nhận là đặc trưng phổ biến của PHB sinh học thu hồi từ vi sinh vật nuôi trong điều kiện dinh dưỡng biến động, đặc biệt khi sử dụng nguồn carbon phức tạp như nước thải. Đồng thời, PHB có độ kết tinh thấp thường thể hiện tính mềm dẻo cao hơn, ít giòn và thuận lợi hơn cho một số ứng dụng vật liệu sinh học so với PHB có độ kết tinh cao. Tổng hợp các kết quả phân tích DSC cho thấy PHB chiết xuất từ sinh khối *S. salina* M8 mang đầy đủ các đặc trưng nhiệt điển hình của PHB sinh học, khẳng định bản chất polymer thu được, đồng thời phản ánh ảnh hưởng của nguồn gốc sinh học và quy trình chiết tách đến cấu trúc vật liệu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về PHB sản xuất từ vi khuẩn lam và vi sinh vật quang dưỡng, qua đó chứng minh tiềm năng ứng dụng của mô hình tích hợp xử lý nước thải – thu hồi PHB trong định hướng công nghệ sinh học bền vững [123].

3.6.2.4. Khối lượng phân tử trung bình của PHB tinh sạch từ *S. salina* M8

Kết quả phân tích khối lượng phân tử trung bình số (M_n), khối lượng phân tử trung bình khối (M_w) và chỉ số phân bố khối lượng (M_w/M_n) xác định bằng thiết bị sắc ký thẩm thấu gel (GPC) của PHB tinh chế từ sinh khối *S. salina* M8 được thể hiện trong **Hình 3.28**. Số liệu cho thấy khối lượng phân tử trung bình số (M_n) của PHB là $129,495 - 197,393\text{ kg/mol}$. Khối lượng phân tử trung bình khối (M_w) của PHB là $492,901 - 856,874\text{ kg/mol}$. Đây là dải giá trị cao, chứng tỏ polymer thu được chứa nhiều mạch dài – đặc trưng cần thiết cho các ứng dụng yêu cầu tính cơ học tốt. Kết

quả này khá tương đồng với khối lượng phân tử (503 kg/mol) của PHB chiết từ *Synechocystis* sp. PCC 6803 [123], xác nhận khả năng sinh tổng hợp polymer cao phân tử của *S. salina* M8.



Sample	RT (min)	Mn	Mw	Mw/Mn	Area %
PHB_7mL	16.52	197393	856874	4.341	100
PHB_50'	18.17	129495	492901	3.806	
PHB_60'	16.93	193269	797780	4.129	

Hình 3.28. Khối lượng phân tử của PHB chiết và tinh sạch từ sinh khối *S. salina* M8

Tuy nhiên, chỉ số Mw/Mn của PHB tinh chế từ *S. salina* M8 nằm trong khoảng 3,806 – 4,341, điều đó chứng minh rằng PHB bao gồm các đơn phân tử có độ phân tán rất rộng. Kết quả Mw/Mn này cao hơn nhiều so với Mw/Mn = 1,74 đo được cho PHB chiết từ *Synechocystis* sp. PCC 6803 [123]. Độ phân tán lớn cho thấy quần thể phân tử PHB có dải khối lượng rộng, xuất phát từ nhiều nguyên nhân: (i) Động học đồng thời tổng hợp – phân giải trong điều kiện stress dinh dưỡng và môi trường nước thải khiến tốc độ kéo dài mạch không đồng đều; (ii) đứt mạch trong quá trình tinh chế, đặc biệt khi xử lý NaOCl hoặc chiết ở nhiệt độ cao; (iii) Giới hạn của phương pháp GPC, do hệ hiệu chuẩn thông thường chưa tối ưu cho polyester sinh học, gây sai lệch về ước tính kết quả của Mw/Mn.

Độ phân tán rộng mang lại hai mặt tác động: một mặt giúp tăng độ bền nóng chảy và khả năng gia công nhiệt; mặt khác gây biến thiên tính chất cơ học, giảm tính đồng nhất giữa các mẻ sản xuất. Để cải thiện độ đồng đều có thể thu hoạch sinh khối ở đỉnh pha tích lũy PHB, hạn chế kéo dài pha sinh trưởng ổn định của vi khuẩn lam; Vận hành nuôi bán liên tục để hạn chế pha stress kéo dài. Giảm thời gian/nồng độ NaOCl, chiết ở nhiệt độ thấp hơn trong môi trường khí trơ, bổ sung chất chống oxy hóa, và sử dụng GPC–MALLS/universal calibration. Các tối ưu hoá này dự kiến sẽ hạ tỷ lệ Mw/Mn, đồng thời nâng độ ổn định cơ – nhiệt của PHB thu được.

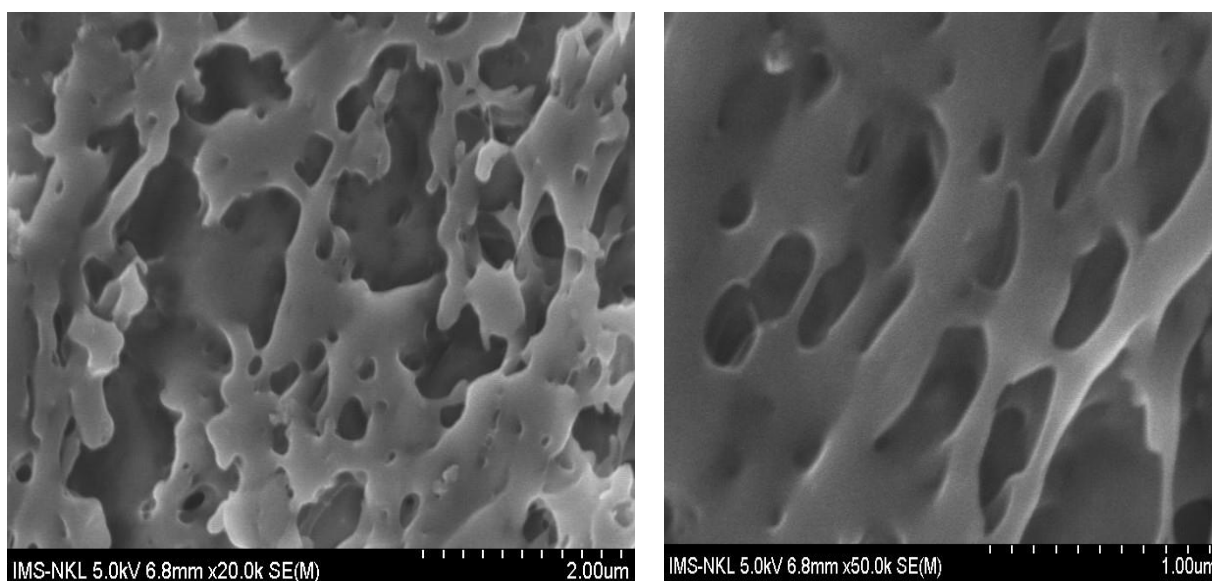
Với Mw cao và tính phân tán cho phép điều chỉnh cơ – nhiệt, PHB từ *S. salina* M8 có tiềm năng trong sản xuất các sản phẩm như: Bao bì phân hủy sinh học (túi, màng

đóng gói) nhờ độ bền kéo và khả năng gia công nhiệt; Sản phẩm y – sinh (chỉ khâu tự tiêu, màng dẫn thuốc, scaffold mô), khi được kiểm soát Mw/Mn và loại bỏ tạp chất; Ngành nông nghiệp (màng phủ đất, vật liệu bao vi hạt phân bón) yêu cầu khả năng phân hủy sinh học và độ bền môi trường; Phụ gia pha trộn trong composit hoặc blend với PLA/PHBV nhằm cải thiện tính dẻo.

3.6.2.5. Hình thái bề mặt của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết tách từ *S. salina* M8

Sau khi xác nhận cấu trúc hóa học đặc trưng của PHB bằng phổ FT-IR và đánh giá tính ổn định nhiệt thông qua phân tích TGA/DTG, hình thái bề mặt của vật liệu PHB chiết tách từ sinh khối *S. salina* M8 được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Phân tích SEM nhằm cung cấp thông tin trực quan về đặc điểm hình thái, mức độ đồng nhất và cấu trúc bề mặt của polymer sau quá trình chiết tách, qua đó bổ sung cơ sở đánh giá mối liên hệ giữa cấu trúc và tính chất vật liệu của PHB sinh học.

Ảnh SEM cho thấy vật liệu PHB có cấu trúc xốp ba chiều với hệ lỗ rỗng phân bố không đồng đều và hình dạng không định hình rõ ràng (**Hình 3.29**). Các lỗ rỗng có kích thước đa dạng, chủ yếu ở thang micromet, và có xu hướng liên thông với nhau, tạo thành mạng lưới xốp mở. Bề mặt vật liệu thể hiện tính gồ ghề và nhám, với các vách ngăn mỏng giữa các lỗ rỗng, phản ánh độ rỗng tương đối cao của mẫu PHB. Không quan sát thấy sự xuất hiện của các tinh thể lớn hoặc các hạt polymer tách rời, cho thấy PHB tồn tại chủ yếu ở dạng khối polymer liên tục với mức độ kết tinh thấp hoặc các miền tinh thể phân bố mịn. Đặc điểm hình thái này nhiều khả năng liên quan đến quá trình chiết tách và làm khô, trong đó sự bay hơi của dung môi tạo ra các khoảng rỗng bên trong vật liệu. Cấu trúc xốp và bề mặt nhám của PHB được xem là đặc điểm thuận lợi cho các ứng dụng sinh học và môi trường, do làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc, hỗ trợ các quá trình phân hủy sinh học hoặc tương tác vật liệu – môi trường.



Hình 3.29. Hình thái SEM của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

3.7. Đánh giá tổng hợp mô hình tuần hoàn kết hợp xử lý nước thải – thu hồi sinh khối – sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu đã trình bày, mô hình tích hợp sử dụng vi khuẩn lam *S. salina* M8 trong xử lý nước thải sinh hoạt kết hợp thu hồi sinh khối và sản xuất nhựa sinh học PHB cho thấy tính khả thi cao về mặt kỹ thuật và môi trường. Mô hình đã được thử nghiệm thành công trong hệ quang sinh dạng ống dung tích 30 L ngoài trời, thể hiện hiệu quả đồng thời trong xử lý ô nhiễm và tạo sản phẩm sinh học có giá trị, phù hợp với định hướng phát triển kinh tế tuần hoàn và công nghệ xanh.

Về khả năng sinh trưởng và thu hồi sinh khối và tích lũy sinh khối: Chủng *S. salina* M8 thể hiện tốc độ sinh trưởng nhanh và tích lũy PHB cao khi được nuôi trong môi trường chuẩn, trong các điều kiện tối ưu về pH, cường độ ánh sáng và nhiệt độ, với năng suất sinh khối khô đạt 2,73 g/L, hàm lượng PHB tích lũy đạt 21,4% khối lượng khô. Việc tối ưu hoá các yếu tố như tỷ lệ C:N:P, cường độ ánh sáng, pH và sục khí đã góp phần cải thiện đáng kể khả năng tích lũy sinh khối và hàm lượng PHB.

Về hiệu quả xử lý nước thải: Khi nuôi cấy trong nước thải sinh hoạt, *S. salina* M8 thích nghi tốt, duy trì sinh trưởng ổn định và tích lũy PHB hiệu quả, đặc biệt dưới các điều kiện tối ưu về C:N:P, ánh sáng, pH. Hiệu suất xử lý các chỉ tiêu ô nhiễm như COD, T-N và T-P đạt mức cao trên 90%, chủ yếu thông qua cơ chế hấp thu trực tiếp vào sinh khối, qua đó hạn chế phát sinh bùn thải thứ cấp, tạo ra giá trị gia tăng kinh tế vốn là nhược điểm chính của các công nghệ xử lý nước thải truyền thống hiện nay. Đồng thời cho năng suất sinh khối tiềm năng phục vụ chiết tách nhựa sinh học.

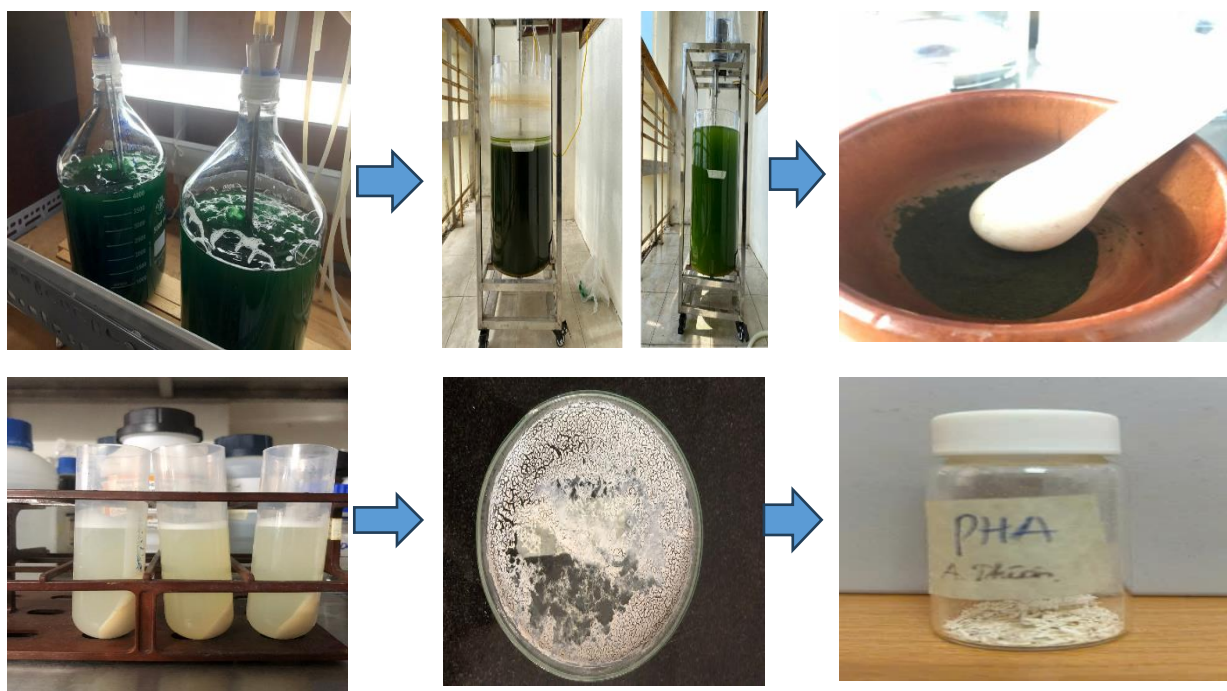
Ứng dụng thử nghiệm trong hệ thống phản ứng quang sinh dạng ống dung tích 30 L vận hành ngoài trời cho thấy mô hình hoạt động ổn định, duy trì hiệu quả quang hợp và năng suất sinh khối bền vững. Kết quả đạt được cho thấy sinh khối khô thu được đạt 3,4 g/L, trong khi hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối đạt giá trị lớn nhất 50,2%, qua đó khẳng định tiềm năng mở rộng quy mô và khả năng ứng dụng thực tiễn của mô hình.

Về điều kiện vận hành và bố trí mô hình trong hệ thống xử lý nước thải thực tế, kết quả thực nghiệm cho thấy trạng thái tiết trùng của nước thải đầu vào có ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi PHB của chủng *S. salina* M8, trong khi không làm suy giảm đáng kể hiệu quả xử lý các chỉ tiêu ô nhiễm chính như COD, T-N và T-P. Cụ thể, việc sử dụng nước thải sinh hoạt thô, với tải lượng carbon và dinh dưỡng cao, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển sinh khối, qua đó làm gia tăng tổng lượng PHB tích lũy trong tế bào vi khuẩn lam. Trên cơ sở các kết quả này, mô hình xử lý nước thải tích hợp vi khuẩn lam được đề xuất bố trí thay thế cho bể sinh học truyền thống và đặt trước công đoạn khử trùng trong sơ đồ công nghệ xử lý nước thải sinh hoạt. Cách bố

trí này vừa đảm bảo hiệu quả xử lý ô nhiễm, vừa tối ưu hóa mục tiêu thu hồi sinh khối và sản xuất PHB, đồng thời phù hợp với định hướng tích hợp xử lý nước thải và sản xuất vật liệu sinh học theo mô hình kinh tế tuần hoàn.

Chất lượng của vật liệu PHB sau tinh sạch được xác định thông qua phổ FTIR, NMR và phân tích nhiệt học (DSC, TGA), phù hợp với tiêu chuẩn vật liệu nhựa sinh học thương mại. Điều này mở ra tiềm năng ứng dụng thực tế cho sản phẩm PHB từ sinh khối vi khuẩn lam.

Về hiệu quả tổng hợp mô hình tuần hoàn: Mô hình tích hợp chứng minh khả năng khai thác chuỗi giá trị khép kín, bao gồm: tái sử dụng nước sau xử lý; tận dụng N, P và C trong nước thải làm nguồn dinh dưỡng; thu hồi sinh khối để sản xuất PHB phân hủy sinh học; và giảm phát thải CO₂ thông qua quá trình quang hợp. Nhờ đó, mô hình đóng vai trò như giải pháp kép, vừa xử lý ô nhiễm nước thải sinh hoạt hiệu quả, vừa tạo ra tài nguyên tái tạo từ chất thải, phù hợp với định hướng công nghệ xanh, kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững, đặc biệt có tiềm năng nhân rộng cho các hệ thống xử lý nước thải đô thị, khu công nghiệp và nông nghiệp giàu dinh dưỡng.



Hình 3.30. Mô hình nghiên cứu quy trình xử lý nước thải và tinh chiết vật liệu nhựa sinh học PHB từ sinh khối của *S. salina* M8

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu chính mà luận án đạt được bao gồm:

Thứ nhất, thông qua quá trình sàng lọc và chọn lọc, nghiên cứu đã đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy PHB của các chủng vi khuẩn lam khác nhau. Kết quả cho thấy *S. salina* M8 là chủng nổi trội với tốc độ tăng trưởng nhanh, khả năng thích nghi tốt và hàm lượng PHB tích lũy cao trong sinh khối so với các chủng còn lại. Chủng này thể hiện tính ổn định sinh học và có tiềm năng ứng dụng cao trong các hệ thống nuôi cấy sử dụng nước thải, do đó được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu chính cho các bước tiếp theo.

Thứ hai, nghiên cứu đã tối ưu hóa được các điều kiện hóa – lý ảnh hưởng đến sinh trưởng và tích lũy PHB của *S. salina* M8, bao gồm pH, nhiệt độ, cường độ ánh sáng, sục khí, nồng độ CO₂ và nguồn carbon. Sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett–Burman, cường độ ánh sáng (4.500-13.500 lux), pH (5-9) và nhiệt độ (25-35°C) được xác định là các thông số ảnh hưởng mạnh nhất đến sự sinh trưởng sinh khối, trong khi sự tích lũy PHB chỉ chịu ảnh hưởng đáng kể bởi pH. Thiết kế tối ưu hóa Box–Behnken tiếp theo đã xác định các điều kiện tối ưu nhằm tối đa hóa hiệu suất của chủng *S. salina* M8, bao gồm cường độ ánh sáng ≈ 9.800 lux, pH $\approx 8,0$ và nhiệt độ $\approx 32^\circ\text{C}$. Dưới các điều kiện tối ưu này, nồng độ sinh khối khô đạt 2,73 g/L, hàm lượng PHB đạt 21,4% khối lượng khô, phản ánh khả năng tích lũy hiệu quả polymer sinh học nội bào cùng với sự tăng trưởng mạnh mẽ của tế bào.

Thứ ba, nghiên cứu đã chứng minh khả năng sản xuất sinh khối của *S. salina* M8 ở quy mô phòng thí nghiệm, sử dụng nước thải sinh hoạt làm môi trường nuôi cấy. Ảnh hưởng của các thông số hóa – lý chính, bao gồm tỷ lệ C/N/P, pH, cường độ ánh sáng và điều kiện tiệt trùng nước thải, đã được tối ưu hóa một cách hệ thống dưới các chế độ nuôi quang tự dưỡng và quang – tạp dưỡng. Sinh trưởng tối ưu đạt được tại tỷ lệ C/N/P = 70:7:1, pH = 7 và cường độ ánh sáng 13.500 lux, cho nồng độ sinh khối đạt trên 3,0 g/L và hàm lượng PHB đạt trên 40% khối lượng khô tế bào (DCW).

Thứ tư, luận án đã bước đầu triển khai thử nghiệm thành công chủng *S. salina* M8 trong hệ thống quang sinh quy mô 30 L dưới điều kiện nuôi ngoài trời. Hệ thống được vận hành ở các điều kiện tối ưu (tỷ lệ C/N/P = 70:7:1, pH = 7, sục khí 0,1 vvm), cho thấy hệ thống hoạt động ổn định, vi khuẩn lam sinh trưởng tốt, sinh khối khô đạt 3,4 g/L và hàm lượng PHB cực đại đạt 50,2% khối lượng khô tế bào (DCW). Đồng thời, hệ thống đạt hiệu suất loại bỏ cao các chất ô nhiễm, bao gồm 99,6% COD, 99,6% BOD₅, 90,3% tổng nitrogen và 95,9% tổng phosphorus, qua đó khẳng định tính khả thi của mô

hình tích hợp xử lý nước thải sinh hoạt và sản xuất sinh khối giàu PHB, định hướng mở rộng quy mô và ứng dụng thực tiễn.

Thứ năm, nghiên cứu đã xây dựng quy trình thu hoạch sinh khối, chiết tách và tinh sạch PHB, đồng thời phân tích chi tiết các đặc tính cấu trúc, hóa – lý và nhiệt học của vật liệu thu được. Phân tích cấu trúc của PHB tinh sạch bằng các kỹ thuật FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ đã xác nhận sự tương đương về mặt chức năng với PHB có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn lam khác, trong khi phân tích sắc ký thẩm gel (GPC) cho thấy vật liệu có khối lượng phân tử cao ($M_w = 856,9 \text{ kg/mol}$) và chỉ số đa phân tán rộng ($M_w/M_n = 4,34$). PHB tinh sạch thể hiện đặc trưng cấu trúc điển hình, độ tinh khiết cao và tính chất nhiệt phù hợp với các ứng dụng vật liệu sinh học, khẳng định tiềm năng thay thế một phần nhựa truyền thống có nguồn gốc hóa thạch.

2. KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu cải tiến quy trình chiết tách PHB và định hướng phát triển bền vững: Khuyến nghị nghiên cứu các dung môi thay thế chloroform để chiết tách và tinh sạch PHB theo hướng thân thiện với môi trường và thay thế bằng các dung môi khác an toàn hơn, có độ độc hại ít hơn như hỗn hợp acetone và n-hexan, butyl acetat, hiệu suất cao và chất lượng tương đương sản phẩm PHB thương mại. Bên cạnh đó, cần tích hợp xử lý nước thải – sản xuất PHB – tái sử dụng tài nguyên vào mô hình kinh tế tuần hoàn, đồng thời mở rộng khai thác các hợp chất sinh học giá trị khác (lipid, sắc tố, chất chống oxy hóa) từ sinh khối *S. salina*.

2. Kiến nghị mở rộng nghiên cứu nuôi cấy *S. salina* M8 trên các loại nước thải khác nhau (như nước thải thực phẩm, chăn nuôi, chế biến thủy sản...) nhằm đánh giá khả năng thích nghi, hiệu quả xử lý và tích lũy PHB trong các điều kiện thực tế đa dạng, đồng thời giảm chi phí bổ sung nguồn carbon tinh khiết.

3. Kiến nghị triển khai nuôi cấy *S. salina* M8 trong các hệ quang sinh mở vận hành theo chế độ dòng liên tục, nhằm đánh giá tính ổn định dài hạn của hệ thống, khả năng duy trì sinh khối và tích lũy PHB, làm cơ sở cho định hướng mở rộng quy mô và ứng dụng thực tiễn.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

Các công bố khoa học NCS là tác giả chính:

1. **Nguyen Thi Phuong Dung**^{2,3,†}, Do Thi Cam Van^{1,†}, Bui Thi Thu Uyen⁴, Tran Dang Thuan^{4,*}, Le Truong Giang⁴, (2026). *Integrated valorization of domestic wastewater for phycoremediation and polyhydroxybutyrate (PHB) production by Synechocystis salina M8*. *Bioresource Technology Reports* 33 (2026) 102521, doi: 10.1016/j.biteb.2025.102521.
2. **Nguyen Thi Phuong Dung**^{1,2}, Ta Thi Minh Anh¹, Bui Thi Thu Uyen³, Luu Thi Thu Ha², Dao Duy Khanh³, Tran Dang Thuan^{3,*}, Tran Huu Quang³, Phan Quang Thang^{4,*}, (2026). *High-efficiency PHB production in Synechocystis salina M8 through sequential screening and optimization of bioprocess parameters*. *Biochemical Engineering Journal* 228 (2026) 110073, doi 10.1016/j.bej.2026.110073.
3. **Nguyễn Thị Phương Dung**, Nguyễn Thị Thu Phương, Bùi Thị Thu Uyên, Đỗ Thế Khánh, Lưu Ngọc Sinh, Trần Đăng Thuần, *Đặc tính sinh trưởng và khả năng tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) của Synechocystis M8 dưới điều kiện quang-tạp dưỡng*. *Tạp chí khoa học và công nghệ Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội số tháng 6-2025* (P-ISSN: 1859-3585; E-ISSN: 2615-9619) doi: 10.57001/huic5804.2025.195.
4. **Nguyễn Thị Phương Dung**, Trần Đăng Thuần, Nguyễn Thị Thu Cúc, Nguyễn Thị Thu Thảo, *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố hoá sinh đến sinh trưởng và hiệu suất xử lý nước thải sinh hoạt của vi khuẩn lam S. salina M8*. *Tạp chí môi trường kỳ 1-2025* (ISSN: 2615-9597, số Tiếng Việt).
5. **Nguyen Thi Phuong Dung**, Tran Dang Thuan, Nguyen Thi Thu Thao, *Evaluating the effects of several environmental factors on the growth and domestic wastewater treatment efficiency of the photoautotrophic cyanobacterium S. salina M8*. *Magazine Environment, English Edition I-2025* (ISSN: 2615-9600).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sharma Laxuman, Mallick Nirupama (2005), *Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in Nostoc muscorum: regulation by pH, light–dark cycles, N and P status and carbon sources*, Bioresource technology, 96(11), 1304-1310.
2. Ansari Sabbir, Fatma Tasneem (2016), *Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization*, PloS one, 11(6), e0158168.
3. Balaji Sundaramoorthy, Gopi Kadiyala, Muthuvelan Bhaskaran (2013), *A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics*, Algal Research, 2(3), 278-285.
4. Yu Yi, You Le, Liu Dianyi, Hollinshead Whitney, Tang Yinjie J, Zhang Fuzhong (2013), *Development of Synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory*, Marine drugs, 11(8), 2894-2916.
5. Thi Phuong Dung Nguyen, Thi Minh Anh Ta, Thi Thu Uyen Bui, Thi Thu Ha Luu, Khanh Dao Duy, Thuan Tran Dang, Quang Tran Huu, Thang Phan Quang (2026), *High-efficiency PHB production in Synechocystis salina M8 through sequential screening and optimization of bioprocess parameters*, Biochemical Engineering Journal, 228, 110073.
6. Dung Nguyen Thi Phuong, Van Do Thi Cam, Uyen Bui Thi Thu, Thuan Tran Dang, Giang Le Truong (2026), *Integrated valorization of domestic wastewater for phycoremediation and polyhydroxybutyrate (PHB) production by Synechocystis salina M8*, Bioresource Technology Reports, 33, 102521.
7. Nguyễn Thị Phương Dung, Nguyễn Thị Thu Phương, Bùi Thị Thu Uyên, Đỗ Thế Khánh, Lưu Ngọc Sinh, Trần Đăng Thuận (2025), *Đặc tính sinh trưởng và khả năng tổng hợp poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) của Synechocystis salina M8 dưới điều kiện quang - tạp dưỡng*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, 61(5B), 394-400.
8. Gupta Vishal, Ratha Sachitra Kumar, Sood Anjuli, Chaudhary Vidhi, Prasanna Radha (2013), *New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges*, Algal Research, 2(2), 79-97.
9. Lau N. S., Matsui M., Abdullah A. A. (2015), *Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products*, BioMed research international, 2015, 754934.
10. Meireles dos Santos Aline, Vieira Karem Rodrigues, Basso Sartori Rafaela, Meireles dos Santos Alberto, Queiroz Maria Isabel, Queiroz Zepka Leila, Jacob-Lopes Eduardo (2017), *Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: study of effect of exogenous sources of organic carbon, absolute amount of nutrients, and stirring speed on biomass and lipid productivity*, Frontiers in bioengineering and biotechnology, 5, 12.

-
-
11. Rippka Rosmarie, Deruelles Josette, Waterbury John B., Herdman Michael, Stanier Roger Y. (1979), *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*, Microbiology, 111(1), 1-61.
 12. Singh S. P., Montgomery B. L. (2011), *Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology*, Trends in microbiology, 19(6), 278-85.
 13. Komárek Jiří (2016), *Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014*, Hydrobiologia, 764(1), 259-270.
 14. Seckbach Joseph, Chapman David J., Garbary David, Oren Aharon, Reisser Werner, *Algae and Cyanobacteria Under Environmental Extremes*, in *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, J. Seckbach, Editor. Springer Netherlands: Dordrecht, 781-786, 2007.
 15. Komárek Jiří (2014), *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach*, Preslia, 86, 295.
 16. Meixner Katharina, Daffert Christina, Dalnodar Da, Mrázová Kateřina, Hrubanová Kamila, Krzyzanek V, Nebesarova J, Samek Ota, Šedrlová Zuzana, Slaninová Eva (2022), *Glycogen, poly (3-hydroxybutyrate) and pigment accumulation in three Synechocystis strains when exposed to a stepwise increasing salt stress*, Journal of Applied Phycology, 34(3), 1227-1241.
 17. Sánchez-Riego Ana María, López-Maury Luis, Florencio Francisco Javier (2014), *Genomic responses to arsenic in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*, PLoS One, 9(5), e96826.
 18. Assunção Joana, Amaro Helena M, Lopes Graciliana, Tavares Tânia, Malcata F Xavier, Guedes A Catarina (2021), *Synechocystis salina: Potential bioactivity and combined extraction of added-value metabolites*, Journal of Applied Phycology, 33(6), 3731-3746.
 19. Trentin Giulia, Bertucco Alberto, Sforza Eleonora (2019), *Mixotrophy in Synechocystis sp. for the treatment of wastewater with high nutrient content: Effect of CO₂ and light*, Bioprocess and Biosystems Engineering, 42, 1661-1669.
 20. Assunção Joana, Amaro Helena M, Tavares Tânia, Malcata F Xavier, Guedes A Catarina (2023), *Effects of temperature, pH, and NaCl concentration on biomass and bioactive compound production by Synechocystis salina*, Life, 13(1), 187.
 21. Wagner Jonathan, Bransgrove Rachel, Beacham Tracey A, Allen Michael J, Meixner Katharina, Drosch Bernhard, Ting Valeska P, Chuck Christopher J (2016), *Co-production of bio-oil and propylene through the hydrothermal liquefaction of polyhydroxybutyrate producing cyanobacteria*, Bioresource technology, 207, 166-174.
 22. Singh Manoj K., Rai Pradeep K., Rai Anuradha, Singh Surendra, Singh Jay Shankar (2019), *Poly-β-hydroxybutyrate production by the cyanobacterium Scytonema geitleri bharadwaja under varying environmental conditions*, Biomolecules, 9(5), 198.
-
-

-
-
23. Miyake M., Takase K., Narato M., Khatipov E., Schnackenberg J., Shirai M., Kurane R., Asada Y. (2000), *Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria*, Applied biochemistry and biotechnology, 84-86, 991-1002.
 24. Troschl C., Meixner K., Drosch B. (2017), *Cyanobacterial PHA production-review of recent advances and a summary of three years' working experience running a pilot plant*, Bioengineering (Basel, Switzerland), 4(2), 26.
 25. Wang Zeshuang, Akbar Siddiq, Sun Yunfei, Gu Lei, Zhang Lu, Lyu Kai, Huang Yuan, Yang Zhou (2021), *Cyanobacterial dominance and succession: Factors, mechanisms, predictions, and managements*, Journal of Environmental Management, 297, 113281.
 26. Gibbs Max M, Roygard Jon, Patterson Maree, Brown Logan, Brown David (2024), *Factors influencing cyanobacteria blooms: review of the historical monitoring data to assess management options for Lake Horowhenua*, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 58(1), 1-27.
 27. Zhang D., Dechatiwongse P., del Rio-Chanona E. A., Maitland G. C., Hellgardt K., Vassiliadis V. S. (2015), *Modelling of light and temperature influences on cyanobacterial growth and biohydrogen production*, Algal Research, 9, 263-274.
 28. Muhetaer Guligena, Asaeda Takashi, Jayasanka Senavirathna M. D. H., Baniya Mahendra B., Abeynayaka Helayaye D. L., Rashid M. Harun, Yan HongYu (2020), *Effects of Light Intensity and Exposure Period on the Growth and Stress Responses of Two Cyanobacteria Species: Pseudanabaena galeata and Microcystis aeruginosa*, Water, 12(2), 407.
 29. Burford Michele A., Anusuya Willis, Man Xiao, J. Prentice Matthew, and Hamilton David P. (2023), *Understanding the relationship between nutrient availability and freshwater cyanobacterial growth and abundance*, Inland Waters, 13(2), 143-152.
 30. Bonilla Sylvia, Aguilera Anabella, Aubriot Luis, Huszar Vera, Almanza Viviana, Haakonsson Signe, Izaguirre Irina, O'Farrell Inés, Salazar Anthony, Becker Vanessa, Cremella Bruno, Ferragut Carla, Hernandez Esneddy, Palacio Hilda, Rodrigues Luzia Cleide, Sampaio da Silva Lúcia Helena, Santana Lucineide Maria, Santos Juliana, Somma Andrea, Ortega Laura, Antoniades Dermot (2023), *Nutrients and not temperature are the key drivers for cyanobacterial biomass in the Americas*, Harmful Algae, 121, 102367.
 31. Garcia Amanda K., Kędzior Mateusz, Taton Arnaud, Li Meng, Young Jodi N., Kaçar Betül (2023), *Effects of RuBisCO and CO₂ concentration on cyanobacterial growth and carbon isotope fractionation*, Geobiology, 21(3), 390-403.
 32. Lucius S., Hagemann M. (2024), *The primary carbon metabolism in cyanobacteria and its regulation*, Front Plant Sci, 15, 1417680.
 33. Rai Sushanth Vishwanath, Rajashekhar Madaiah (2014), *Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of marine phytoplankton*.
 34. Adekolurejo Oloyede A., Floyd Matthew, Dunn Alison M., Kay Paul, Dean Andrew P., Hassall Christopher (2022), *Combined effects of increased water temperature and*
-
-

cyanobacterial compounds exert heterogeneous effects on survival and ecological processes in key freshwater species, *Oecologia*, 200(3), 515-528.

35. Nalley Jakob O., O'Donnell Daniel R., Litchman Elena (2018), *Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria*, *Algal Research*, 35, 500-507.
36. Nosratimovafagh Ahmad, Fereidouni Abolghasem Esmaeili, Krujatz Felix (2022), *Modeling and Optimizing the Effect of Light Color, Sodium Chloride and Glucose Concentration on Biomass Production and the Quality of Arthrospira platensis Using Response Surface Methodology (RSM)*, *Life*, 12(3), 371.
37. Nosratimovafagh Ahmad, Esmaeili Fereidouni Abolghasem, Krujatz Felix (2023), *Effect of light spectrum, salinity, and glucose levels on Spirulina morphology*, *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(6), 1687-1701.
38. Gupta A., Mohan D., Saxena R. K., Singh S. (2018), *Phototrophic cultivation of NaCl-tolerant mutant of Spirulina platensis for enhanced C-phycoyanin production under optimized culture conditions and its dynamic modeling*, *Journal of phycology*, 54(1), 44-55.
39. Yu Y., You L., Liu D., Hollinshead W., Tang Y. J., Zhang F. (2013), *Development of Synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory*, *Mar Drugs*, 11(8), 2894-916.
40. Sheng Jie, Kim Hyun Woo, Badalamenti Jonathan P., Zhou Chao, Sridharakrishnan Swathi, Krajmalnik-Brown Rosa, Rittmann Bruce E., Vannela Raveender (2011), *Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of Synechocystis sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor*, *Bioresource Technology*, 102(24), 11218-11225.
41. Pandey Priyul, Pandey Deepa, Gupta Anjali, Gupta Rinkesh, Tiwari Sapna, Singh Shailendra Pratap (2025), *Cyanobacterial green chemistry: a blue-green approach for a sustainable environment, energy, and chemical production*, *RSC Sustainability*, 3(2), 661-675.
42. Nawaz Taufiq, Fahad Shah, Gu Liping, Saud Shah, Zhou Ruanbao (2024), *Cyanobacteria: role in sustainable biomanufacturing and nitrogen fixation*, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 18(6), 2132-2155.
43. Singh Varsha K., Jha Sapana, Rana Palak, Soni Renu, Lalnunpuii Rowland, Singh Prashant K., Sinha Rajeshwar P., Singh Garvita (2024), *Cyanobacteria as a Biocatalyst for Sustainable Production of Biofuels and Chemicals*, *Energies*, 17(2), 408.
44. Schwarz Anna, Walther Jakob, Geib Doris, Witthohn Marco, Strieth Dorina, Ulber Roland, Muffler Kai (2020), *Influence of heterotrophic and mixotrophic cultivation on growth behaviour of terrestrial cyanobacteria*, *Algal Research*, 52, 102125.
45. Sánchez-Bayo A., Morales V., Rodríguez R., Vicente G., Bautista L. F. (2020), *Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition*, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12).

-
-
46. Knoot C. J., Ungerer J., Wangikar P. P., Pakrasi H. B. (2018), *Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production*, The Journal of biological chemistry, 293(14), 5044-5052.
 47. Majhi Bharat Kumar (2024), *Cyanobacteria: Photosynthetic cell factories for biofuel production*, Journal of Bioresources and Bioproducts.
 48. Miao Rui, Xie Hao, Liu Xufeng, Lindberg Pia, Lindblad Peter (2020), *Current processes and future challenges of photoautotrophic production of acetyl-CoA-derived solar fuels and chemicals in cyanobacteria*, Current Opinion in Chemical Biology, 59, 69-76.
 49. Altamira-Algarra Beatriz, Lage Artai, Meléndez Ana Lucía, Arnau Marc, Gonzalez-Flo Eva, García Joan (2024), *Bioplastic production by harnessing cyanobacteria-rich microbiomes for long-term synthesis*, Science of the Total Environment, 954, 176136.
 50. Agarwal Preeti, Soni Renu, Kaur Pritam, Madan Akanksha, Mishra Reema, Pandey Jayati, Singh Shreya, Singh Garvita (2022), *Cyanobacteria as a promising alternative for sustainable environment: Synthesis of biofuel and biodegradable plastics*, Frontiers in Microbiology, 13, 939347.
 51. Pratap Bhanu, Kumar Saroj, Nand Sampurna, Azad Iqbal, Bharagava Ram Naresh, Romanholo Ferreira Luiz Fernando, Dutta Venkatesh (2023), *Wastewater generation and treatment by various eco-friendly technologies: Possible health hazards and further reuse for environmental safety*, Chemosphere, 313, 137547.
 52. Bộ Tài nguyên và Môi trường, *Báo cáo hiện trạng môi trường quốc gia giai đoạn 2016–2020*. 2020.
 53. Anh C. . *Hà Nội ô nhiễm môi trường từ nước thải sinh hoạt*. 2024; Available from: <https://tienphong.vn/ha-noi-o-nhiem-moi-truong-tu-nuoc-thai-sinh-hoat-post1696673.tpo>.
 54. Senatore Vincenzo, Rueda Estel, Bellver Marta, Díez-Montero Rubén, Ferrer Iveta, Zarra Tiziano, Naddeo Vincenzo, García Joan (2023), *Production of phycobiliproteins, bioplastics and lipids by the cyanobacteria Synechocystis sp. treating secondary effluent in a biorefinery approach*, Science of the Total Environment, 857, 159343.
 55. Fleischhacker-Daffert Christina, Zerobin Antonia, Hummel Ferdinand, Slaninova Eva, Kroupová Zuzana, Obruca Stanislav, Mrazova Katerina, Hrubanova Kamila, Krzyzanek Vladislav, Nebesarova Jana (2024), *A Comparison of the Effects of Continuous Illumination and Day/Night Regimes on PHB Accumulation in Synechocystis Cells*, Life, 14(7), 907.
 56. Marchetto Francesca, Roverso Marco, Righetti Davide, Bogianni Sara, Filippini Francesco, Bergantino Elisabetta, Sforza Eleonora (2021), *Bioremediation of per-and poly-fluoroalkyl substances (PFAS) by Synechocystis sp. PCC 6803: A chassis for a synthetic biology approach*, Life, 11(12), 1300.
 57. Ahmad Iffat Zareen (2022), *The usage of Cyanobacteria in wastewater treatment: prospects and limitations*, Letters in applied microbiology, 75(4), 718-730.
-
-

-
-
58. Gonçalves Ana L, Rodrigues Carla M, Pires José CM, Simões Manuel (2016), *The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria*, *Algal research*, 14, 127-136.
 59. Grivalský Tomáš, Lakatos Gergely Ernő, Štěrbová Karolína, Manoel João Artur Câmara, Beloša Romana, Divoká Petra, Kopp Julian, Kriechbaum Ricarda, Spadiut Oliver, Zwirzitz Alexander (2024), *Poly-β-hydroxybutyrate production by Synechocystis MT_a24 in a raceway pond using urban wastewater*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 44.
 60. Gracioso Louise Hase, Bellan Alessandra, Karolski Bruno, Cardoso Letícia Oliveira Bispo, Perpetuo Elen Aquino, do Nascimento Claudio Augusto Oller, Giudici Reinaldo, Pizzocchero Valentino, Basaglia Marina, Morosinotto Tomas (2021), *Light excess stimulates Poly-beta-hydroxybutyrate yield in a mangrove-isolated strain of Synechocystis sp*, *Bioresource Technology*, 320, 124379.
 61. Kamravamanesh Donya, Pflügl Stefan, Nischkauer Winfried, Limbeck Andreas, Lackner Maximilian, Herwig Christoph (2017), *Photosynthetic poly-β-hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6714*, *AMB express*, 7, 1-12.
 62. Le Duong Hai, Nguyen Huu Luong, Huynh Minh Thuan, Le Hoang Anh (2020), *Bioplastic and its potential in Vietnam*, *Petrovietnam Journal*, 4(0).
 63. Choi J., Lee S. Y. (1999), *Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 13-21.
 64. Saratale Rijuta Ganesh, Saratale Ganesh Dattatraya, Cho Si Kyung, Kim Dong Su, Ghodake Gajanan S., Kadam Avinash, Kumar Gopalakrishanan, Bharagava Ram Naresh, Banu Rajesh, Shin Han Seung (2019), *Pretreatment of kenaf (Hibiscus cannabinus L.) biomass feedstock for polyhydroxybutyrate (PHB) production and characterization*, *Bioresource Technology*, 282, 75-80.
 65. Rueda Estel, Gonzalez-Flo Eva, Roca Lucas, Carretero Javier, García Joan (2022), *Accumulation of polyhydroxybutyrate in Synechocystis sp. isolated from wastewaters: effect of salinity, light, and P content in the biomass*, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107952.
 66. Markl Erich, Grünbichler Hannes, Lackner Maximilian (2019), *Cyanobacteria for PHB Bioplastics*, *Algae*, 37.
 67. Singh Akhilesh Kumar, Mallick Nirupama (2017), *Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production*, *FEMS Microbiology Letters*, 364(20), fnx189.
 68. NTTU N. C. n. S. h., *Polymer sinh học PHB (poly-β-hydroxybutyrate) tổng hợp từ vi sinh vật*. Trục tuyến.
 69. Simonazzi Mara, Pezzolesi Laura, Galletti Paola, Gualandi Chiara, Pistocchi Rossella, De Marco Nicole, Paganelli Zoe, Samorì Chiara (2021), *Production of*
-
-

-
-
- polyhydroxybutyrate by the cyanobacterium cf. Anabaena sp*, International Journal of Biological Macromolecules, 191, 92-99.
70. Arias Dulce María, Fradinho Joana C., Uggetti Enrica, García Joan, Oehmen Adrian, Reis Maria A. M. (2018), *Polymer accumulation in mixed cyanobacterial cultures selected under the feast and famine strategy*, Algal Research, 33, 99-108.
 71. Samantaray S., Nayak J. K., Mallick N. (2011), *Wastewater utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production by the cyanobacterium Aulosira fertilissima in a recirculatory aquaculture system*, Appl Environ Microbiol, 77(24), 8735-43.
 72. Acién F. G., Fernández J. M., Magán J. J., Molina E. (2012), *Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it*, Biotechnology Advances, 30(6), 1344-1353.
 73. Renuka Nirmal, Guldhe Abhishek, Prasanna Radha, Singh Poonam, Bux Faizal (2018), *Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges*, Biotechnology Advances, 36(4), 1255-1273.
 74. Singh A. K., Mallick N. (2017), *Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production*, FEMS microbiology letters, 364(20), fnx189.
 75. Arias D. M., Uggetti E., Garcia-Galan M. J., Garcia J. (2018), *Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: Effect of nutrients limitation and photoperiods*, N Biotechnol, 42, 1-11.
 76. Troschl C., Meixner K., Drosig B. (2017), *Cyanobacterial PHA production-review of recent advances and a summary of three years' working experience running a pilot plant*, Bioengineering (Basel), 4(2).
 77. da Silva Cleber Klasener, Costa Jorge Alberto Vieira, de Moraes Michele Greque (2018), *Polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by Spirulina sp. LEB 18 using biopolymer extraction waste*, Applied biochemistry and biotechnology, 185(3), 822-833.
 78. Afreen Rukhsar, Tyagi Shivani, Singh Gajendra Pratap, Singh Mamtesh (2021), *Challenges and perspectives of polyhydroxyalkanoate production from microalgae/cyanobacteria and bacteria as microbial factories: an assessment of hybrid biological system*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 624885.
 79. Panda B., Mallick N. (2007), *Enhanced poly-β-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, Synechocystis sp. PCC 6803*, Letters in applied microbiology, 44(2), 194-198.
 80. Samantaray Shilalipi, Mallick Nirupama (2014), *Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by the diazotrophic cyanobacterium Aulosira fertilissima CCC 444*, Journal of Applied Phycology, 26, 237-245.
 81. Price Shawn, Kuzhiumparambil Unnikrishnan, Pernice Mathieu, Ralph Peter J (2020), *Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: critical review and perspectives*, Journal of Environmental Chemical Engineering.
-
-

-
-
82. Coelho Vanessa Costa, da Silva Cleber Klasener, Terra Ana Luiza, Costa Jorge Alberto Vieira, de Moraes Michele Greque (2015), *Polyhydroxybutyrate production by Spirulina sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations*, African Journal of Microbiology Research, 9(24), 1586-1594.
 83. Carpine Roberta, Olivieri Giuseppe, Hellingwerf Klaas J, Pollio Antonino, Marzocchella Antonio (2020), *Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: can cyanobacteria meet this challenge?*, Processes, 8(3), 323.
 84. Haase Sandra Mareike, Huchzermeyer Bernhard, Rath Thomas (2012), *PHB accumulation in Nostoc muscorum under different carbon stress situations*, Journal of Applied Phycology, 24, 157-162.
 85. Carpine Roberta, Raganati Francesca, Olivieri Giuseppe, Hellingwerf Klaas J, Pollio Antonino, Salatino Piero, Marzocchella Antonio (2018), *Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by Synechocystis PCC6803 from CO₂: Model development*, Algal research, 29, 49-60.
 86. Carpine Roberta, Olivieri Giuseppe, Hellingwerf Klaas J, Pollio Antonino, Pinto Gabriele, Marzocchella Antonio (2019), *Photoautotrophic production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria: nitrate effects and screening of strains*, Environ Eng Manag J, 18(6), 1337-1346.
 87. Price Shawn, Kuzhiumparambil Unnikrishnan, Pernice Mathieu, Ralph Peter J (2020), *Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: critical review and perspectives*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 8(4), 104007.
 88. Samantaray Shilalipi, Mallick Nirupama (2012), *Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from Aulosira fertilissima*, Journal of Applied Phycology, 24, 803-814.
 89. Bhati Ranjana, Mallick Nirupama (2012), *Production and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, Nostoc muscorum Agardh*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 87(4), 505-512.
 90. Price Shawn, *Developing Next Generation Algae Bioplastic Technology*. 2022: University of Technology Sydney (Australia).
 91. Samantaray Shilalipi, Nayak Jitendra Kumar, Mallick Nirupama (2011), *Wastewater utilization for poly- β -hydroxybutyrate production by the cyanobacterium Aulosira fertilissima in a recirculatory aquaculture system*, Applied and environmental microbiology, 77(24), 8735-8743.
 92. Hauf Waldemar, Watzer Björn, Roos Nora, Klotz Alexander, Forchhammer Karl (2015), *Photoautotrophic polyhydroxybutyrate granule formation is regulated by cyanobacterial phasin PhaP in Synechocystis sp. strain PCC 6803*, Applied and Environmental Microbiology, 81(13), 4411-4422.
-
-

-
-
93. Sudesh Kumar, Taguchi Kazunori, Doi Yoshiharu (2002), *Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in Synechocystis sp. PCC6803*, International journal of biological macromolecules, 30(2), 97-104.
 94. Khetkorn Wanthanee, Incharoensakdi Aran, Lindblad Peter, Jantaro Saowarath (2016), *Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in Synechocystis sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes*, Bioresource Technology, 214, 761-768.
 95. Mallick Nirupama, Gupta Suneel, Panda Bhabatarini, Sen Ramkrishna (2007), *Process optimization for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production by Nostoc muscorum*, Biochemical Engineering Journal, 37(2), 125-130.
 96. Santini Gaia, Biondi Natascia, Rodolfi Liliana, Tredici Mario R (2021), *Plant biostimulants from cyanobacteria: An emerging strategy to improve yields and sustainability in agriculture*, Plants, 10(4), 643.
 97. Garciglia-Mercado Carolina, Contreras Claudia A, Choix Francisco J, de-Bashan Luz E, Gómez-Anduro Gracia A, Palacios Oskar A (2024), *Metabolic and physiological adaptations of microalgal growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense growing under biogas atmosphere: a microarray-based transcriptome analysis*, Archives of Microbiology, 206(4), 173.
 98. Fradinho JC, Domingos JMB, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM (2013), *Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae*, Bioresource Technology, 132, 146-153.
 99. De Philippis Roberto, Ena Alba, Guastini Monica, Sili Claudio, Vincenzini Massimo (1992), *Factors affecting poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria*, FEMS Microbiology Reviews, 9(2-4), 187-194.
 100. Kaewbai-Ngam Auratai, Incharoensakdi Aran, Monshupanee Tanakarn (2016), *Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by Calothrix scytonemicola TISTR 8095*, Bioresource technology, 212, 342-347.
 101. Cepoi Liliana, Donțu Natalia, Șalaru Victor, Șalaru Vasile (2016), *Removal of organic pollutants from wastewater by cyanobacteria*, Cyanobacteria for bioremediation of wastewaters, 27-43.
 102. Teo Chee Loong, Atta Madiha, Bukhari Attaullah, Taisir Mohamad, Yusuf Afendi M, Idris Ani (2014), *Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths*, Bioresource technology, 162, 38-44.
 103. Mika Adrianna, *Polyhydroxybutyrate Production in a Photobioreactor Using Spirulina platensis*. 2016: The University of Western Ontario (Canada).
 104. Kucho Ken-ichi, Okamoto Kazuhisa, Tsuchiya Yuka, Nomura Satoshi, Nango Mamoru, Kanehisa Minoru, Ishiura Masahiro (2005), *Global analysis of circadian expression in*
-
-

-
-
- the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803*, Journal of bacteriology, 187(6), 2190-2199.
105. Blessing Samantha, Pisciotto John M (2023), *Carbon sequestration: principle and recent advances*, Clean Technologies Toward a Sustainable Future, 43.
 106. Rueda Hernández Estel (2022), *Optimization of the bioplastics production from cyanobacteria*.
 107. Rueda Estel, García Joan (2021), *Optimization of the phototrophic Cyanobacteria polyhydroxybutyrate (PHB) production by kinetic model simulation*, Science of The Total Environment, 800, 149561.
 108. Sheikh Tahir, Hamid Basharat, Baba Zahoor, Iqbal Sadaf, Yattoo Ali, Fatima Sabah, Nabi Asha, Kanth Rehana, Dar Khursheed, Hussain Nazir (2022), *Extracellular polymeric substances in psychrophilic cyanobacteria: A potential bioflocculant and carbon sink to mitigate cold stress*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 42, 102375.
 109. Nishioka Motomu, Nakai Katsuya, Miyake Masato, Asada Yasuo, Taya Masahito (2001), *Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, Synechococcus sp. MA19, under phosphate-limited conditions*, Biotechnology letters, 23, 1095-1099.
 110. Rueda Estel, Álvarez-González Ana, Vila Joaquim, Díez-Montero Rubén, Grifoll Magdalena, García Joan (2022), *Inorganic carbon stimulates the metabolic routes related to the polyhydroxybutyrate production in a Synechocystis sp. strain (cyanobacteria) isolated from wastewater*, Science of the Total Environment, 829, 154691.
 111. Strunecký Otakar, Kopejtká Karel, Goecke Franz, Tomasch Jürgen, Lukavský Jaromír, Neori Amir, Kahl Silke, Pieper Dietmar H, Pilarski Plamen, Kaftan David (2019), *High diversity of thermophilic cyanobacteria in Rupite hot spring identified by microscopy, cultivation, single-cell PCR and amplicon sequencing*, Extremophiles, 23, 35-48.
 112. Meixner Katharina, Daffert Christina, Bauer Lisa, Drog Bernhard, Fritz Ines (2022), *PHB producing cyanobacteria found in the neighborhood—their isolation, purification and performance testing*, Bioengineering, 9(4), 178.
 113. Shrivastav Anupama, Mishra Sanjiv K., Mishra Sandhya (2010), *Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by Spirulina subsalsa from Gujarat coast of India*, International Journal of Biological Macromolecules, 46(2), 255-260.
 114. Keshari Nitin, Gugger Muriel, Zhu Tao, Lu Xuefeng (2019), *Compatible solutes profiling and carbohydrate feedstock from diversified cyanobacteria*, Algal Research, 43, 101637.
 115. de Faria Rodrigues David Luís, *Improving the production of the heterologous compatible solute betaine in Synechocystis-based chassis*. 2023, Universidade do Porto (Portugal).
 116. Hendy Mahmoud H., Shehabeldine Amr M., Hashem Amr H., El-Sayed Ahmed F., El-Sheikh Hussein H. (2025), *Optimization and characterization of polyhydroxybutyrate produced by Halomonas meridiana using orange peel waste*, BMC Microbiology, 25(1), 304.
-
-

-
-
117. Ibrahim Rafwana, Aranjani Jesil Mathew, Prasanna Navya, Biswas Avirup, Gayam Prasanna Kumar Reddy (2025), *Production, isolation, optimization, and characterization of microbial PHA from Bacillus australimaris*, Scientific Reports, 15(1), 8395.
 118. Kumar Mukesh, Kumar Sachan Rohan Samir, Simran Kauts, Arun Karnwal, and Mahmoud Alaa El Din (2025), *Unlocking sustainable solutions: wood waste as a novel substrate for polyhydroxybutyrate (PHB) production to combat plastic pollution*, Environmental Technology, 46(11), 1909-1921.
 119. Hendy M. H., Shehabeldine A. M., Hashem A. H., El-Sayed A. F., El-Sheikh H. H. (2025), *Optimization and characterization of polyhydroxybutyrate produced by Halomonas meridiana using orange peel waste*, BMC Microbiol, 25(1), 304.
 120. Fjodorova Natalja, Novič Marjana (2015), *Searching for optimal setting conditions in technological processes using parametric estimation models and neural network mapping approach: A tutorial*, Analytica chimica acta, 891, 90-100.
 121. Geethu M., Chandrashekar H. R., Divyashree M. S. (2021), *Statistical optimisation of polyhydroxyalkanoate production in Bacillus endophyticus using sucrose as sole source of carbon*, Archives of microbiology, 203(10), 5993-6005.
 122. Rueda Estel, Gonzalez-Flo Eva, Mondal Soumila, Forchhammer Karl, Arias Dulce María, Ludwig Katharina, Drog Bernhard, Fritz Ines, Gonzalez-Esquer C. Raul, Pacheco Sara, García Joan (2024), *Challenges, progress, and future perspectives for cyanobacterial polyhydroxyalkanoate production*, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 23(2), 321-350.
 123. Koch M., Bruckmoser J., Scholl J., Hauf W., Rieger B., Forchhammer K. (2020), *Maximizing PHB content in Synechocystis sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC*, Microb Cell Fact, 19(1), 231.
 124. Elghazy E., Syed Mohamed S. M. D., Wianglor K., Tetali S., Raut M., Roy I., Pandhal J. (2024), *Large-scale cultivation of Synechocystis sp. PCC6803 for the production of Poly(3-hydroxybutyrate) and its potential applications in the manufacturing of bulk and medical prototypes*, N Biotechnol, 83, 133-141.
 125. Penkhrue W., Jendrossek D., Khanongnuch C., Pathom-Aree W., Aizawa T., Behrens R. L., Lumyong S. (2020), *Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in Bacillus drentensis BP17 using pineapple peel*, PLoS One, 15(3), e0230443.
 126. Yabueng Nuttipon, Napathorn Suchada Chanprateep (2018), *Toward non-toxic and simple recovery process of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane*, Process Biochemistry, 69, 197-207.
 127. Wongmoon C., Napathorn S. C. (2022), *Optimization for the efficient recovery of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane*, Frontiers in bioengineering and biotechnology, 10, 1086636.
-
-

-
-
128. Psaki Olga, Zoghbi Lina, Galani Drosoula Despoina, Giannoulis Anastasios, Athanasoulia Ioanna-Georgia I., Stylianou Eleni, Briassoulis Demetres, Koutinas Apostolis, Ladakis Dimitrios (2025), *Process development and environmental impact assessment of sustainable poly(3-hydroxybutyrate) separation and purification via Paraburkholderia sacchari cell lysis using crude enzymes*, Biochemical Engineering Journal, 213, 109526.
 129. Aramvash A., Gholami-Banadkuki N., Moazzeni-Zavareh F., Hajizadeh-Turchi S. (2015), *An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents*, Journal of microbiology and biotechnology, 25(11), 1936-43.
 130. Kobayashi Daigo, Fujita Kyoko, Nakamura Nobuhumi, Ohno Hiroyuki (2015), *A simple recovery process for biodegradable plastics accumulated in cyanobacteria treated with ionic liquids*, Applied Microbiology and Biotechnology, 99(4), 1647-1653.
 131. Murugan Paramasivam, Han Lizhu, Gan Chee-Yuen, Maurer Frans H. J., Sudesh Kumar (2016), *A new biological recovery approach for PHA using mealworm, Tenebrio molitor*, Journal of Biotechnology, 239, 98-105.
 132. Martínez Virginia, Herencias Cristina, Jurkevitch Edouard, Prieto M. Auxiliadora (2016), *Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates*, Scientific Reports, 6(1), 24381.
 133. Kapritchkoff Fernanda M., Viotti Alexandre P., Alli Rita C. P., Zuccolo Marisa, Pradella José G. C., Maiorano Alfredo E., Miranda Everson A., Bonomi Antonio (2006), *Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by Ralstonia eutropha*, Journal of Biotechnology, 122(4), 453-462.
 134. McAdam B., Brennan Fournet M., McDonald P., Mojicevic M. (2020), *Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics*, Polymers (Basel), 12(12).
 135. Oehmen Adrian, Keller-Lehmann Beatrice, Zeng Raymond J., Yuan Zhiguo, Keller Jürg (2005), *Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems*, Journal of Chromatography A, 1070(1), 131-136.
 136. Torri Cristian, Cordiani Helena, Samorì Chiara, Favaro Lorenzo, Fabbri Daniele (2014), *Fast procedure for the analysis of poly(hydroxyalkanoates) in bacterial cells by off-line pyrolysis/gas-chromatography with flame ionization detector*, Journal of Chromatography A, 1359, 230-236.
 137. Juengert J. R., Bresan S., Jendrossek D. (2018), *Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in Ralstonia eutropha Using Gas Chromatography and Nile Red Staining*, Bio Protoc, 8(5), e2748.

-
-
138. Li Hong-Fei, Wang Meng-Ru, Tian Lin-Yue, Li Zheng-Jun (2021), *Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Vibrio alginolyticus Strains Isolated from Salt Fields*, *Molecules*, 26(20), 6283.
 139. Tsuge Takeharu (2016), *Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis*, *Polymer Journal*, 48(11), 1051-1057.
 140. Mai Jingjing, Kockler Katrin, Parisi Emily, Chan Clement Matthew, Pratt Steven, Laycock Bronwyn (2024), *Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based block copolymers: A review*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130204.
 141. Turco R., Santagata G., Corrado I., Pezzella C., Di Serio M. (2020), *In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review*, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 619266.
 142. Panaitescu Denis Mihaela, Nicolae Cristian Andi, Gabor Augusta Raluca, Trusca Roxana (2020), *Thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) reinforced with cellulose fibers from wood waste*, *Industrial Crops and Products*, 145, 112071.
 143. Troschl C., Meixner K., Drosig B. (2017), *Cyanobacterial PHA Production-Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant*, *Bioengineering (Basel)*, 4(2).
 144. Markl Erich, Lackner Maximilian, Grünbichler Hannes, *Cyanobacteria for PHB Bioplastics Production: A Review*, in *Algae*, Y.K. Wong, Editor. IntechOpen: Rijeka, 2018.
 145. Gomes Gradíssimo Diana, Pereira Xavier Luciana, Valadares Santos Agenor (2020), *Cyanobacterial polyhydroxyalkanoates: A sustainable alternative in circular economy*, *Molecules*, 25(18), 4331.
 146. Krasaesueb Nattawut, Incharoensakdi Aran, Khetkorn Wanthanee (2019), *Utilization of shrimp wastewater for poly- β -hydroxybutyrate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain Δ SphU cultivated in photobioreactor*, *Biotechnology Reports*, 23, e00345.
 147. Panda Bhabatarini, Jain Praveen, Sharma Laxuman, Mallick Nirupama (2006), *Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803*, *Bioresource Technology*, 97(11), 1296-1301.
 148. Koch Moritz, Bruckmoser Jonas, Scholl Jörg, Hauf Waldemar, Rieger Bernhard, Forchhammer Karl (2020), *Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: development of a new photosynthetic overproduction strain*.
 149. Afreen R., Tyagi S., Singh G. P., Singh M. (2021), *Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System*, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 624885.
-
-

-
-
150. Saratale Rijuta Ganesh, Cho Si-Kyung, Bharagava Ram Naresh, Patel Anil Kumar, Vivekanand Vivekanand, Bhatia Shashi Kant, Ferreira Luiz Fernando Romanholo, Shin Han Seung, Awasthi Mukesh Kumar, Chakraborty Sankha, Kumar Ramesh, Saratale Ganesh Dattatraya (2024), *Third-generation biomass for bioplastics: a comprehensive review of microalgae-driven polyhydroxyalkanoate production*, Biofuel Research Journal, 11(4), 2256-2282.
 151. Boisseaux P., Hopkinson P., Santillo D., Smith C., Garmulewicz A., Powell Z., Galloway T. (2023), *Environmental safety of second and third generation bioplastics in the context of the circular economy*, Ecotoxicol Environ Saf, 256, 114835.
 152. Lage Artai, Berrendero Gómez Ester, García Laura, Martínez Cristina, Garcia Joan, Gonzalez-Flo Eva), *Assessment of Polyhydroxybutyrate Production by Cyanobacteria Strains Isolated from Environmental Water Sources Using Secondary Treated Wastewater*, Available at SSRN 5138351.
 153. Bhuyar Prakash, Hong Dang, Mandia Emelina, Ab. Rahim Mohd Hasbi, Maniam Gaanty Pragas, Govindan Natanamurugaraj (2020), *Salinity Reduction From Poly-Chem-Industrial Wastewater by Using Microalgae (Chlorella sp.) Collected From Coastal Region of Peninsular Malaysia*, The Yale journal of biology and medicine, 1, 1-14.
 154. Pham M. D., Bui X. T., Vo T. K., Dao T. S., Le L. T., Vo T. D., Huynh K. P., Nguyen T. B., Lin C., Visvanathan C. (2025), *Microalgae - bacteria based wastewater treatment systems: Granulation, influence factors and pollutants removal*, Bioresour Technol, 418, 131973.
 155. Nguyen Minh Tuan, Nguyen Thao Phuong, Pham Tung Huu, Duong Thuy Thi, Do Manh Van, Trinh Tuyen Van, Nguyen Quynh Thi Xuan, Trinh Viet M. (2022), *Removal of Nutrients and COD in Wastewater from Vietnamese Piggery Farm by the Culture of Chlorella vulgaris in a Pilot-Scaled Membrane Photobioreactor*, Water, 14(22), 3645.
 156. Prakash Bhuyar, Dang Diem Hong, Emelina Mandia, Mohd Hasbi Ab Rahim, Gaanty Pragas Maniam, Natanamurugaraj Govindan (2019), *Desalination of Polymer and Chemical industrial wastewater by using green photosynthetic microalgae, Chlorella sp.*, Maejo International Journal of Energy and Environmental Communication, 1(3), 9-19.
 157. Hong Dang Diem, Ha Nguyen Cam, Thom Le Thi, Van Quyen Dong, Cuc Nguyen Thi Kim, Huong Nguyen Thi Lan, Rao Ambati Ranga, Ravishankar Gokare A., *Algal-Mediated Bioremediation of Wastewater Streams with a Special Focus on the Successes Achieved in Vietnam*, in *Algae Mediated Bioremediation*. 633-661, 2024.
 158. Tran Dang Thuan, Nguyen Hai Yen, Do Thi Cam Van, Show Pau Loke, Le Truong Giang, Nguyen Van Tuyen (2020), *Factors affecting pollutants removal and biomass production capability of Chlorella variabilis TH03 in domestic wastewater*, Materials Science for Energy Technologies, 3, 545-558.
 159. Do Thi Cam Van, Nguyen Thi Nham Tuat, Tran Dang Thuan, Le Truong Giang, Nguyen Van Tuyen (2020), *Semi-continuous removal of nutrients and biomass production from*
-
-

domestic wastewater in raceway reactors using Chlorella variabilis TH03-bacteria consortia, Environmental Technology & Innovation, 20, 101172.

160. Tran Dang Thuan, Van Do Thi Cam, Nguyen Quang Trung, Le Truong Giang (2021), *Simultaneous removal of pollutants and high value biomaterials production by Chlorella variabilis TH03 from domestic wastewater*, Clean Technologies and Environmental Policy, 23(1), 3-17.
161. Thu Nguyễn Thị Tâm (2023), *Nghiên cứu đặc điểm của chủng vi khuẩn chịu mặn Salinicola sp.TSLT21 phân lập từ Trường Sa có khả năng sinh tổng hợp Polyhydroxyalkanoate (PHA)*, TNU Journal of Science and Technology, 228(09), 292-300.
162. Van Anh Trinh Thi, Kim Toan Ngo Thi, Huy Nguyen Quang (2012), *Degradation of Poly (3-Hydroxybutyrate) (PHB) by Bacillus gelatini isolated from Vietnam*, Academia Journal of Biology, 32(3), 72-77.
163. Loan T. T., Trang D. T. Q., Huy P. Q., Ninh P. X., Van Thuoc D. (2022), *A fermentation process for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using waste cooking oil or waste fish oil as inexpensive carbon substrate*, Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands), 33, e00700.
164. Hồ K. Q. M. , *Sản xuất nhựa sinh học PHB từ vi khuẩn Bacillus phân lập từ bùn hoạt tính sử dụng nước thải giàu carbon*. 2023, Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh.
165. Geethu M, Chandrashekar H Raghuram, Divyashree MS (2021), *Statistical optimisation of polyhydroxyalkanoate production in Bacillus endophyticus using sucrose as sole source of carbon*, Archives of Microbiology, 203, 5993-6005.
166. Dianursanti, Alifia Kanya C. H., Sari Putri R. (2019), *Solvent extraction of polyhydroxybutyrate with NaClO from Spirulina platensis for capsule ingredients*, 2193, 030005.
167. Costa Samantha Serra, Miranda Andréa Lobo, Andrade Bianca Bomfim, Assis Denilson de Jesus, Souza Carolina Oliveira, de Moraes Michele Greque, Costa Jorge Alberto Vieira, Druzian Janice Izabel (2018), *Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae*, International Journal of Biological Macromolecules, 116, 552-562.
168. Troschl Clemens, Meixner Katharina, Fritz Ines, Leitner Klaus, Romero Alejandra Palacios, Kovalcik Adriana, Sedlacek Petr, Drosch Bernhard (2018), *Pilot-scale production of poly-β-hydroxybutyrate with the cyanobacterium Synechocystis sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor*, Algal research, 34, 116-125.
169. Cordara A., Re A., Pagliano C., Van Alphen P., Pirone R., Saracco G., Branco Dos Santos F., Hellingwerf K., Vasile N. (2018), *Analysis of the light intensity dependence of the growth of Synechocystis and of the light distribution in a photobioreactor energized by 635 nm light*, PeerJ, 6, e5256.

-
-
170. Li Ran, Guo Dan, Li Tong, Zhao Jin, Pan Jie (2024), *Effect of C: N ratio on treatment of mixed industrial-domestic wastewater by microalgae-bacteria consortium*, Biomass Conversion and Biorefinery, 1-9.
 171. Thị Oanh Đoàn, Thị Thủy Dương, Thành Trung Nguyễn (2020), *09. Đánh giá ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh trưởng và xử lý các hợp chất nitơ trong nước thải sinh hoạt của vi tảo Chlorella vulgaris CNK*, Tạp chí khoa học Tài nguyên và Môi trường, (32), 80-87.
 172. Vonshak Avigad, Abeliovich Aharon, Boussiba Samy, Arad Shoshana, Richmond Amos (1982), *Production of Spirulina biomass: effects of environmental factors and population density*, Biomass, 2(3), 175-185.
 173. Do Cam Van T., Nguyen Nham Tuat T., Tran Thuan Dang, Pham Mai Huong T., Pham Thanh Yen T. (2021), *Capability of carbon fixation in bicarbonate-based and carbon dioxide-based systems by Scenedesmus acuminatus TH04*, Biochemical Engineering Journal, 166, 107858.
 174. Fradinho J. C., Reis M. A. M., Oehmen A. (2016), *Beyond feast and famine: Selecting a PHA accumulating photosynthetic mixed culture in a permanent feast regime*, Water Research, 105, 421-428.
 175. Gracioso L. H., Bellan A., Karolski B., Cardoso L. O. B., Perpetuo E. A., Nascimento Caod, Giudici R., Pizzocchero V., Basaglia M., Morosinotto T. (2021), *Light excess stimulates Poly-beta-hydroxybutyrate yield in a mangrove-isolated strain of Synechocystis sp*, Bioresour Technol, 320(Pt B), 124379.
 176. Takahashi Hideyuki, Miyake Masato, Tokiwa Yutaka, Asada Yasuo (1998), *Improved accumulation of poly-3- hydroxybutyrate by a recombinant cyanobacterium*, Biotechnology letters, 20(2), 183-186.
 177. Koch M., Berendzen K. W., Forchhammer A. K. (2020), *On the role and production of polyhydroxybutyrate (PHB) in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*, Life (Basel), 10(4).

PHỤ LỤC I
LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

PHỤ LỤC 1: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

1. Hoá chất

Bảng 1.1. Các hóa chất cần thiết thực hiện thí nghiệm

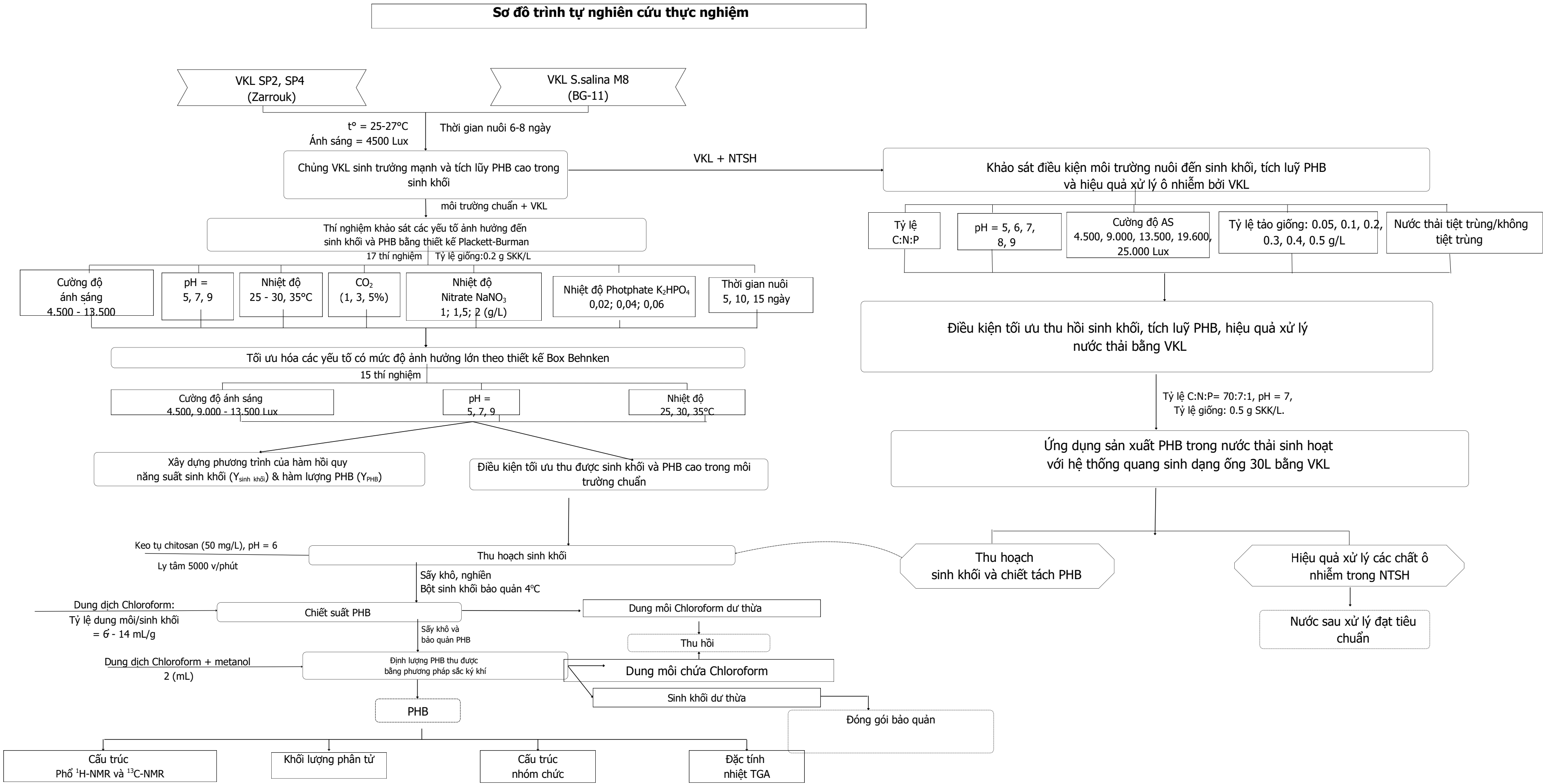
STT	Tên hóa chất	Công thức phân tử	Độ tinh khiết (%)	Xuất xứ
1	Sodium nitrate	NaNO_3	95	Trung Quốc
2	Dipotassium phosphate	K_2HPO_4	95	Trung Quốc
3	Magnesium sulfate heptahydrate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	95	Trung Quốc
4	Calcium chloride dihydrate	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95	Trung Quốc
5	Citric acid	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	95	Trung Quốc
6	Ferric ammonium citrate	$(\text{NH}_4)_5[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]$	95	Trung Quốc
7	Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95	Trung Quốc
8	Sodium carbonate	Na_2CO_3	95	Trung Quốc
9	Ammonium chloride	NH_4Cl	98	Sigma
10	Urea	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	95	Trung Quốc
11	Acetic acid	CH_3COOH	95	Sigma
12	Chloroform	CCl_3	95	Trung Quốc
13	Methanol	CH_3OH	95	Hàn Quốc
14	Sodium axit DL-3-hydroxygenbutyric PHB	$\text{CH}_3^{13}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2^{13}\text{CO}_2\text{Na}$	99 atom % ^{13}C	Sigma-Aldrich
15	Chitosan	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$	95	Trung Quốc
16	Hỗn hợp vi lượng: kim loại (mix A5): H_3BO_3 : 2,86g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1,81 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,222g/L; $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,39g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,079g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,049 g/L.			

2. Thiết bị thí nghiệm

Bảng 1.2. Các dụng cụ, thiết bị cần thiết thực hiện thí nghiệm

STT	Tên thiết bị	Model/Thông số kỹ thuật	Nhà sản xuất	Mục đích sử dụng
1	Cân phân tích	JF2204	Labex – Anh	Cân hóa chất
2	Máy ly tâm	Z206A	Hermle, Đức	Thu hoạch sinh khối
3	Máy siêu âm	Ultrasonic Cleaner	Anh	Hỗ trợ phá vỡ tế bào vi khuẩn lam, chiết PHB
4	Nồi hấp tiệt trùng	LS-75LJ	Nanbei, Trung Quốc	Khử khuẩn môi trường và dụng cụ thí nghiệm
5	Tủ sấy và tủ ẩm	OGS60	Heraeus, Đức	Sấy mẫu và dụng cụ thí nghiệm
6	Kính hiển vi	Kính hiển vi	OLYMPUS, Nhật Bản	Soi hình thái vi khuẩn lam
7	Máy đo quang UV-Vis	U-2900/2910	Shimadzu, Nhật Bản	Đo mật độ quang, sinh trưởng của tảo
8	Máy đo cường độ ánh sáng	TM-204	Tenmars Electronics CO., Ltd, Đài Loan	Đo cường độ ánh sáng
9	Đèn LED 9-36W	Dài 30 cm	Rạng Đông, Việt Nam	Chiếu sáng cho hệ nuôi vi khuẩn lam
10	Máy thổi khí	HP-400	Atman, Trung Quốc	Sục khí hệ nuôi vi khuẩn lam
11	Van điều chỉnh lưu lượng khí		Việt Nam	Điều chỉnh lưu lượng khí
12	Bình thủy tinh dùng để nuôi cấy	1 L; 2 L; 3,5 L; 5 L	SIMAX, Germany	Nuôi vi khuẩn lam
13	Đầu lọc khí	0,22 µm	Trung Quốc	Lọc khí cấp vào hệ nuôi vi khuẩn lam
14	Ống dây Silicon		Trung Quốc	Kết nối hệ nuôi vi khuẩn lam và máy sục khí

15	Ổng đong	25 mL, 50mL, 100 mL, 1000 mL	Đức	Đong thể tích môi trường nuôi
16	Bình định mức	25 mL, 50 mL, 1000 mL	Đức	Đong thể tích môi trường nuôi
17	Bình nón	50 mL, 250mL	Đức	Phân lớp và chiết PHB
18	Hệ thống thiết bị phản ứng	10 - 30 L	Việt Nam	Sản xuất sinh khối vi khuẩn lam trong nước thải
19	Motor khuấy	40W	Panasonic, Nhật	Khuấy trộn hệ nuôi vi khuẩn lam 30 L
20	Máy đo pH cầm tay		Hàn Quốc	Đo pH môi trường nuôi



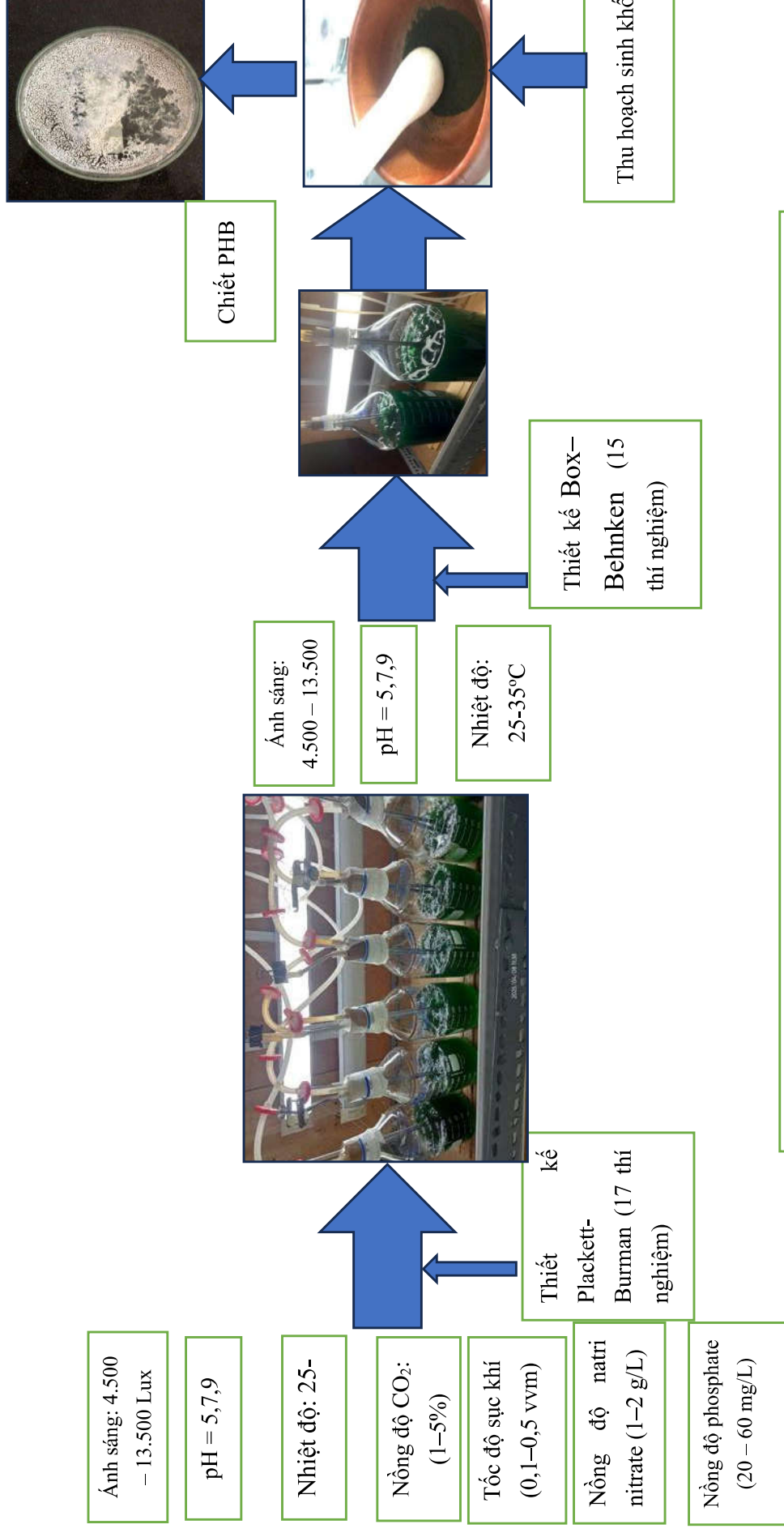
Hình 2.2. Sơ đồ trình tự nghiên cứu thu hồi sinh khối, sản xuất vật liệu nhựa sinh học PHB kết hợp xử lý nước thải sinh hoạt bằng S.salina M8

3. Khảo sát lựa chọn chủng vi khuẩn lam tăng trưởng nhanh và hàm lượng PHB tích lũy trong sinh khối



Hình 1.3. Quy trình nhân giống và khảo sát sinh trưởng và sản xuất PHB bởi vi khuẩn lam *S. salina* M8, *Spirulina* SP2, và *Spirulina* SP4 trong môi trường BG-11 và Zarrouk tương ứng. Nhân giống trong bình 250 mL (A), nhân giống trong bình 1000 mL (B), nuôi khảo sát trong bình thủy tinh 5000 mL (C), khảo sát tăng trưởng và PHB của *S. salina* M8, *Spirulina* SP2, và *Spirulina* SP4 trong bình 1000 mL (D).

4. Tối ưu hoá các điều kiện hoá lý ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tích lũy PHB của chủng vi khuẩn lam được lựa chọn



Hình 1.4. Sơ đồ thực nghiệm quy trình tối ưu hoá các điều kiện hoá lý ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tích lũy PHB

5. Khảo sát điều kiện môi trường nuôi đến sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu suất xử lý chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt bằng *S. salina* M8



A- Khảo sát sự sinh trưởng và hiệu suất xử lý nước thải bởi *S. salina* M8 trong bình 1,0 L

B- Nuôi giống trong bình Duran 5000 mL với NTSH

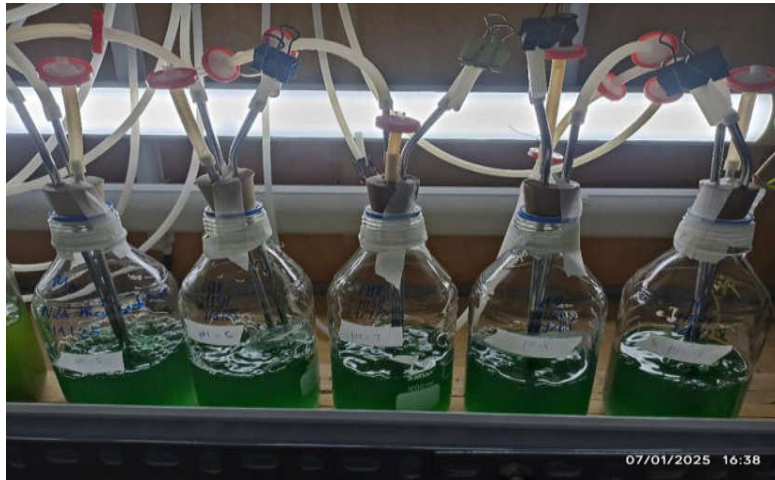
Hình 1.5. Khảo sát sự sinh trưởng, tích lũy PHB và hiệu suất xử lý chất ô nhiễm trong nước thải sinh hoạt bởi *S. salina* M8

5.1. Khảo sát tỷ lệ chất dinh dưỡng carbon/nitrogen/phosphorus (tỷ lệ C:N:P)



Hình 1.6. Khảo sát *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt tại các tỷ lệ C:N:P khác nhau

5.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu



Hình 1.7. Khảo sát *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt tại các giá trị pH khác nhau

5.3. Khảo sát ảnh hưởng của cường độ ánh sáng



Hình 1.8. Khảo sát *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt ở cường độ ánh sáng khác nhau

5.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ tảo giống ban đầu



Hình 1.9. Khảo sát *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt với tỷ lệ tảo giống khác nhau

6. Sản xuất sinh khối và tích lũy PHB của *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt trong hệ thống quang sinh dạng ống 30 L



A - Nuôi giống trong bình tam giác 250 mL

B- Nuôi giống trong bình Duran 5.000 mL



C- Hệ thống quang sinh dạng ống 30 L

Hình 1.10. Sản xuất sinh khối và PHB từ *S. salina* M8 trong nước thải sinh hoạt trong hệ quang sinh dạng ống 30 L

7. Phương pháp phân tích chất lượng nước thải

1. Hàm lượng tổng phosphorus (T-P) và phosphate trong mẫu nước thải được xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 6202:2008 – Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định tổng Phosphorus và Phosphate, phương pháp đo phổ dùng ammonium moliphat

Nguyên tắc của phương pháp:

- Phản ứng giữa ion octophosphat và một dung dịch axit chứa molipdat và ion antimon tạo ra phức chất antimon phosphomolipdat.

- Khử phức chất bằng axit ascorbic tạo thành phức chất molipden màu xanh đậm. Đo độ hấp thụ của phức chất để xác định nồng độ octophosphat.

- Xác định polyphosphat và một số hợp chất phospho hữu cơ bằng cách thủy phân chúng với axit sulfuric để chuyển sang dạng octophosphat phản ứng với moliopdat.

- Một số hợp chất phospho hữu cơ được chuyển thành octophosphat bằng vô cơ hóa với pesulfat. Nếu cần xử lý cẩn thận thì vô cơ hóa với axit nitric – axit sulfuric.

Hàm lượng phosphorus trong mẫu được xác định thông qua đường chuẩn được xây dựng từ các dung dịch chuẩn phosphate có nồng độ xác định. Kết quả được biểu thị theo đơn vị mg P/L.

2. Hàm lượng nitrate trong mẫu nước thải được xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 6180:1996 ISO 7890-3:1998 (E): Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định Nitrate, phương pháp trắc phổ dùng axit sunfosalixylic

Nguyên tắc của phương pháp:

Nguyên tắc của phương pháp dựa trên phản ứng nitrat hóa của nitrate với axit sunfosalixylic trong môi trường acid, tạo thành hợp chất nitro dẫn xuất có màu vàng. Sau khi trung hòa bằng dung dịch kiềm, cường độ màu của dung dịch thu được tỷ lệ thuận với nồng độ nitrate trong mẫu và được xác định bằng phương pháp đo quang phổ tại bước sóng đặc trưng. Dinatri dihidro etylendinitrilotetraaxetat (EDTANa) được thêm vào với kiềm để tránh kết tủa các muối canxi và magie. Natri nitrua được thêm vào để khắc phục sự nhiễu của nitrit. Mẫu nước được lọc để loại bỏ chất rắn lơ lửng trước khi phân tích. Hàm lượng nitrate được xác định thông qua đường chuẩn được xây dựng từ các dung dịch chuẩn nitrate có nồng độ xác định. Kết quả phân tích được biểu thị theo đơn vị mg NO_3^-/L hoặc quy đổi về mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ theo yêu cầu đánh giá chất lượng nước.

3. Hàm lượng ammonium trong mẫu nước thải được xác định theo Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 6179-1:1996 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định ammonium, phương pháp đo phổ.

Nguyên tắc của phương pháp:

Do quang phổ ở bước sóng khoảng 655 nm của hợp chất màu xanh được tạo bởi phản ứng của amoni với salixylat và ion hypoclorit có sự tham gia của natri nitrosopentaxyno sắt (III) taxyano sắt (III) (natri nitroprusiat). Các ion hypoclorit được tạo trong situ bằng cốc thủy phân kiềm của N, N/ dicloro- 1,3,5- triazin 2,4,6 (1H,3H,5H) trion, muối natri (natri diclorosoxyanurat). Phản ứng của cioramin với natri salixylat xảy ra ở độ pH 12.6 có sự tham gia của natri nitroprusiat. Bất kỳ chất cloramin nào có mặt trong mẫu thử cũng đều được xác định. Natri xitrat có trong thuốc thử để cân sự nhiễu do các cation, đặc biệt là canxi và magiê.

4. Xác định nhu cầu oxygen hoá học trong mẫu nước thải theo Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 6491:1999 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước – Xác định nhu cầu oxygen hoá học, phương pháp dicromat.

Nguyên tắc của phương pháp:

Đun hồi lưu mẫu thử với lượng kali dicromat đã biết trước khi có mặt thủy ngân (II) sunfat và xúc tác bạc trong axit sunfuric đặc trong khoảng thời gian nhất định, trong quá trình đó một phần dicromat bị khử do sự có mặt các chất có khả năng bị oxi hoá. Chuẩn độ lượng dicromat còn lại với sắt (II) amoni sunfat. Tính toán giá trị COD từ lượng dicromat bị khử, 1 mol dicromat ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) tương đương với 1,5 mol oxi (O_2).

5. Xác định tổng nitrogen sau khi phân hủy bằng UV: TCVN 9319:2012 - Tiêu chuẩn Việt Nam về chất lượng nước - Xác định tổng nitrogen sau khi phân hủy bằng UV - Phương pháp sử dụng phân tích dòng chảy (CFA và FIA) và phát hiện phổ.

Nguyên tắc của phương pháp:

Mẫu được xử lý trước với dung dịch đệm peroxodisunphat và bức xạ nhiệt UV. Nitrat được tạo thành và được xác định bằng phân tích bơm dòng (FIA) hoặc bằng phân tích dòng chảy liên tục (CFA). Đối với FIA, mẫu được đưa vào dung dịch đệm liên tục (dòng mang) bằng van bơm trong khi với CFA mẫu được trộn liên tục với dung dịch đệm. Nitrat trong mẫu được cadimi kim loại khử thành nitrit. Tiếp sau đó, dung dịch thuốc thử axit phosphoric cũng liên tục được bổ sung vào. Nitrit từ quá trình khử nitrat diazo hóa sulfanilamin trong dung dịch axit thành muối diazonium sau đó kết hợp với N-(1-naphtyl)etylendiamin tạo thành thuốc nhuộm đỏ có tính tan.

8. Phương pháp thu hoạch tảo



A- Keo tụ/ly tâm thu sinh khối dạng sệt



B- Sinh khối được sấy khô ở 40°C



D - Thu sinh khối khô sau khi sấy



C - Nghiền sinh khối khô thành bột

Hình 1.11. Quy trình thu hoạch sinh khối S. salina M8

9. Chế biến sinh khối thu hồi PHB



A- Loại bỏ sắc tố chlorophyll



B- Ly tâm thu hồi sinh khối



C – Chiết sinh khối với chloroform

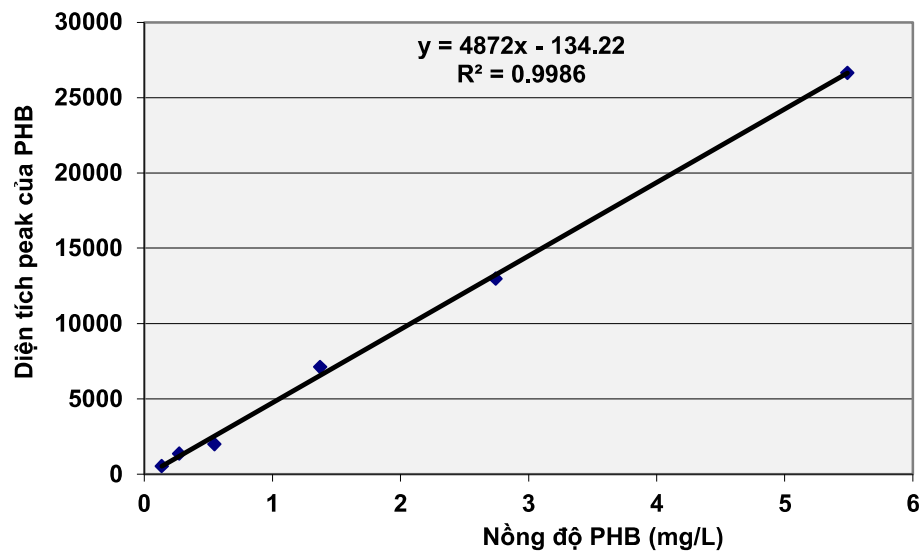


D - PHB kết tủa trong methanol lạnh và sấy khô

Hình 1.11. Quy trình chiết và tinh sạch PHB từ sinh khối *S. salina* M8

10. Phương pháp định lượng PHB

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 %) thông qua xây dựng đường chuẩn giữa diện tích đo pick và nồng độ PHB (mg/L).



Hình 1.12. Phương trình đường chuẩn PHB xây dựng trên máy GC-FID

PHỤ LỤC 2: KẾT QUẢ VỀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI KHUẨN LAM *SYNECHOCYSTIS SALINA*

2.1. Định danh vi khuẩn lam

2.1.1. Đặc điểm hình thái

Việc khảo sát hình thái được thực hiện bằng kính hiển vi có gắn camera kỹ thuật số. Hình ảnh được chụp từ các mẫu nuôi cấy ở giai đoạn sinh trưởng lũy thừa đến giai đoạn ổn định của vòng đời vi tảo. Kích thước tế bào của các tế bào sinh dưỡng, tế bào dị hình (heterocyst) và bào tử nghỉ (akinetete) được đo trên mẫu sống theo phương pháp mô tả bởi Phạm và cs. (2017) [1].

2.1.2. Tách chiết DNA, khuếch đại PCR và giải trình tự

DNA của vi khuẩn lam được tách chiết từ các mẫu nuôi cấy một tuần tuổi theo quy trình đã được mô tả trong nghiên cứu trước [1]. Dung dịch DNA thô sau tách chiết được bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ và sử dụng trực tiếp làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm khuếch đại các gen 16S rRNA và *rbcL* bằng các cặp mồi đặc hiệu.

Mồi sử dụng:

CYA106F: 5'–CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA–3'

CYAN1281R: 5'–GCAATTACTAGCGATTCTCC–3'

Mồi xuôi *rbcLF*: 5'–GACTTCACCAAAGAYGACGAAAACAT–3'

Mồi ngược *rbcLR*: 5'–GAACTCGA ACTTRATYTCCTTT–3'

Một phần vùng gen 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) với cặp mồi CYA106F và CYAN1281R. Thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt được thực hiện theo phương pháp mô tả trong tài liệu [1]. Gen *rbcL* được khuếch đại bằng cặp mồi *rbcLF* và *rbcLR*. Hỗn hợp phản ứng PCR gồm 15,0 μL dung dịch Master Mix PCR 2X (GoTaq®, Promega, Mỹ), 0,9 μL (0,3 μM) mỗi mồi xuôi và mồi ngược, 1,5 μL DNA tách chiết và nước PCR (12 μL) để đạt tổng thể tích 30 μL . Chu trình nhiệt PCR gồm bước biến tính ban đầu ở $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 giây, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 giây, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 phút, và bước kéo dài cuối ở $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% (bổ sung 1 μL thuốc nhuộm RedSafe trong 25 mL agarose) trong 25 phút ở điện áp 100 V. Kích thước các băng DNA được quan sát dưới tia cực tím (UV) và so sánh với thang chuẩn DNA 1 kb (Clever

Scientific Ltd., Vương quốc Anh). Cuối cùng, các sản phẩm khuếch đại được gửi đến FIRSTBASE (Malaysia) để giải trình tự Sanger [1, 2].

2.1.3. Phân tích phát sinh loài

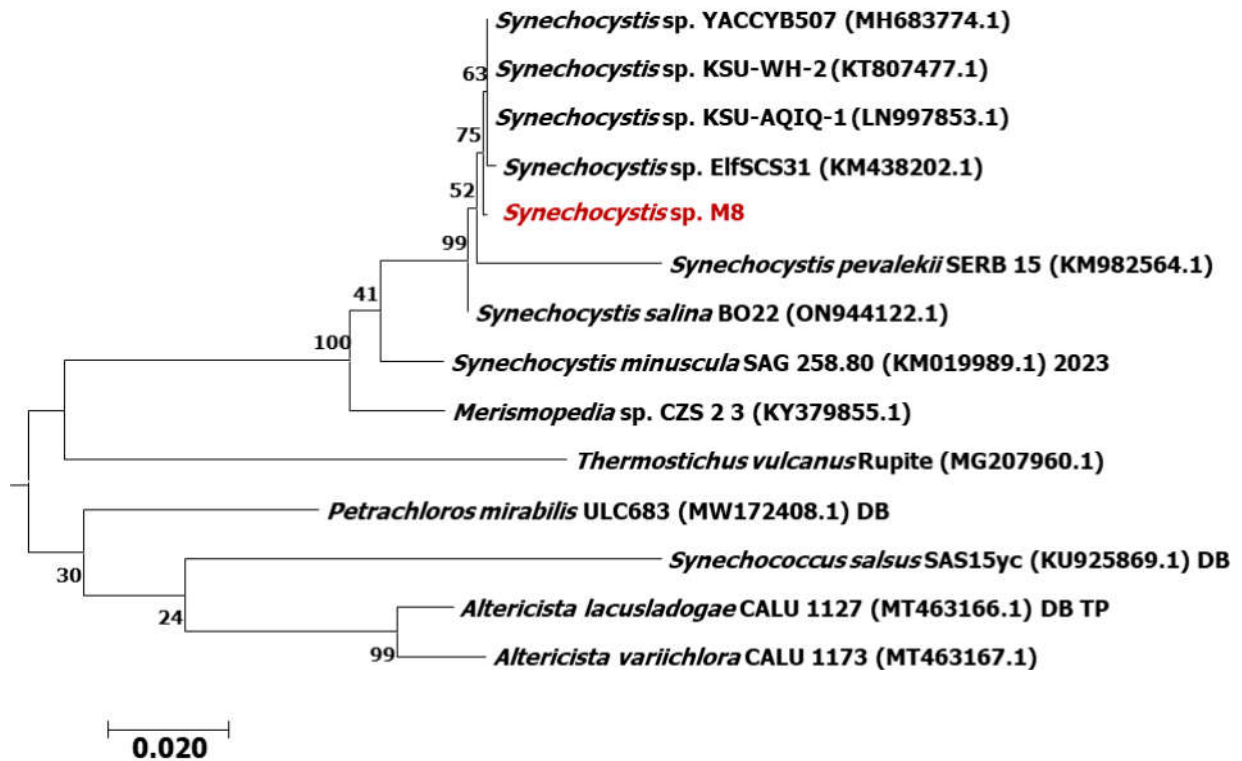
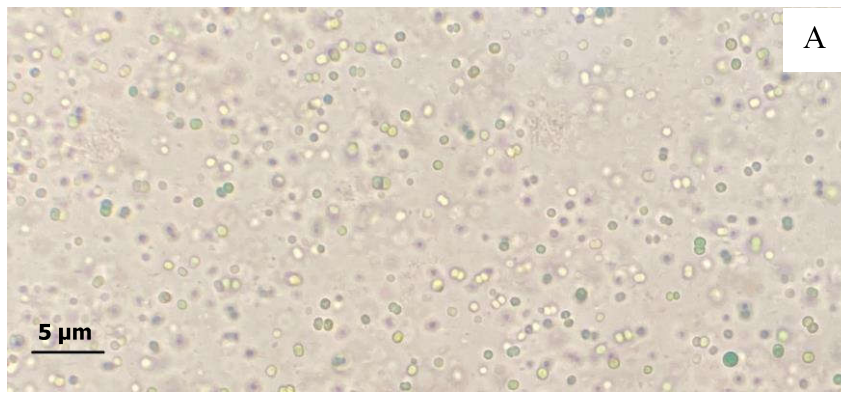
Trình tự consensus của các gen 16S rRNA và rbcL được lắp ráp từ các trình tự giải trình tự xuôi và ngược bằng phần mềm CLC Genomics Workbench v8.0.1 (CLCBio, Đan Mạch). Các trình tự thu được trong nghiên cứu này được so sánh BLAST với cơ sở dữ liệu nucleotide của GenBank; các trình tự có mức tương đồng cao nhất được tải về và sử dụng, cùng với trình tự của các loài chuẩn, cho các phân tích phát sinh loài tiếp theo.

2.2 Kết quả và thảo luận

2.2.1. Đặc điểm hình thái, phát sinh loài phân tử và so sánh trình tự của *Synechocystis salina* M8

Các khuẩn lạc được phân lập bằng phương pháp cấy vạch được quan sát dưới kính hiển vi nhằm xác định các đặc điểm đặc trưng. Chúng M8 thường tồn tại ở dạng đơn bào hoặc dạng tập đoàn. Các tế bào đơn bào có hình cầu hoặc hình bầu dục, với kích thước dao động từ 1 đến 3 μm (Hình 1A). Ở dạng tập đoàn, các tế bào có hình dạng và kích thước đa dạng, sắp xếp thành các cụm hoặc chuỗi không đều.

Bên cạnh đó, dựa trên trình tự gen 16S rRNA, phân tích phát sinh loài của chủng M8 đã được xây dựng và trình bày trong Hình 1B. Kết quả cho thấy chủng M8 được xác định thuộc chi *Synechocystis*, với mức độ tương đồng cao nhất đạt 99,7% khi so sánh với *Synechocystis salina* BO22. Do đó, chủng M8 được định danh là *Synechocystis salina* M8 và được đăng ký trên cơ sở dữ liệu với số hiệu truy cập (accession number) là **PV368867** (Hình 1C)



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>Synechocystis</i> sp. M8														
2 <i>Synechocystis minuscula</i> SAG 258.80 (KM019989.1) 2023	97.2													
3 <i>Synechocystis pevalekii</i> SERB 15 (KM982564.1) 2013	96.7	94.1												
4 <i>Synechocystis salina</i> BO22 (ON944122.1), 2022	99.7	97.5	96.7											
5 <i>Synechocystis</i> sp. KSU-AQIQ-1 (LN997853.1)	99.9	97.2	96.7	99.7										
6 <i>Synechocystis</i> sp. YACCYB507 (MH683774.1)	99.9	97.2	96.7	99.7	100									
7 <i>Synechocystis</i> sp. KSU-WH-2 (KT807477.1)	99.9	97.2	96.7	99.7	100	100								
8 <i>Synechocystis</i> sp. ElfSCS31 (KM438202.1)	99.7	97.0	96.6	99.6	99.9	99.9	99.9							
9 <i>Altericista lacusladogae</i> CALU1127 (MT463166.1)	87.7	88.7	84.9	88	87.7	87.7	87.7	87.5						
10 <i>Merismopedia</i> sp. CZS 2 3 (KY379855.1)	96.5	96.9	93.5	96.5	96.5	96.5	96.5	96.6	87.4					
11 <i>Altericista variichlora</i> CALU 1173 (MT463167.1)	86.8	88.4	84.5	87.1	86.8	86.8	86.8	86.6	97.6	87				
12 <i>Synechococcus salsus</i> SAS15yc (KU925869.1)	84.8	84.9	82	85.1	84.8	84.8	84.8	84.9	87.0	84.2	86.8			
13 <i>Petrachloros mirabilis</i> ULC683 (MW172408.1)	89	89.3	85.3	89.1	89.1	89.1	89.1	89.0	90.8	88.8	90.6	87		
14 <i>Thermostichus vulcanus</i> Rupite (MG207960.1)	85.5	85.4	82.7	85.7	85.5	85.5	85.5	85.3	86.9	84.9	86.9	83.9	86.1	

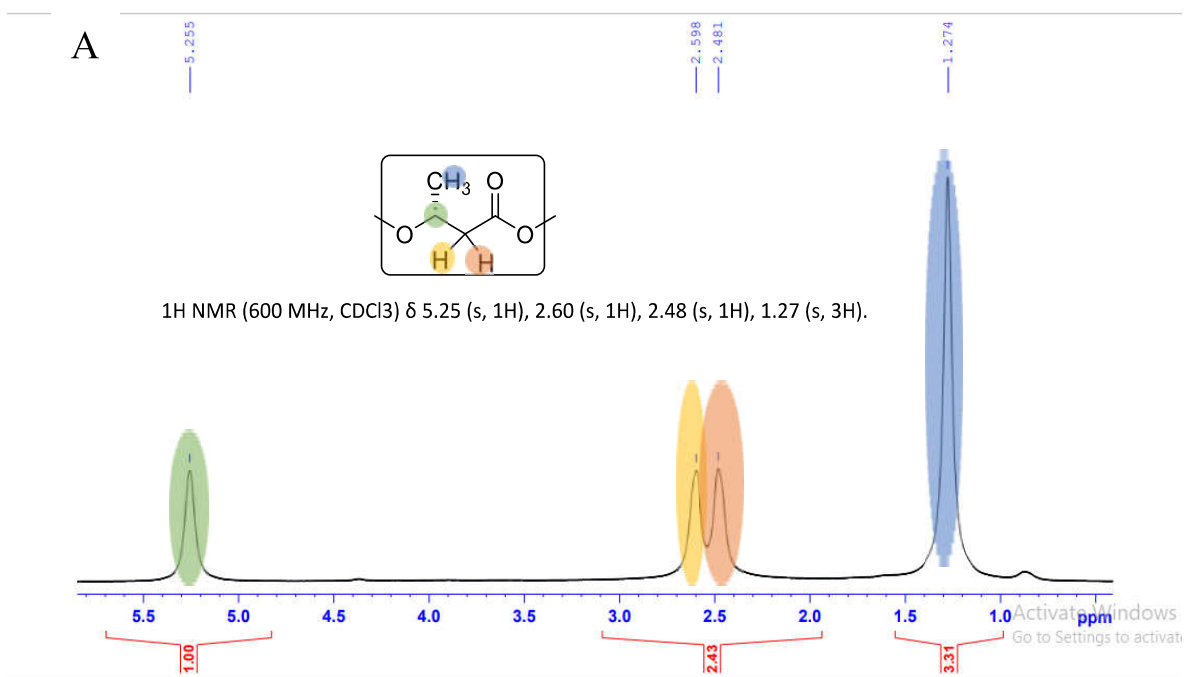
Hình 1. Đặc điểm hình thái (A), phát sinh loài phân tử (B) và so sánh trình tự của *Synechocystis salina* M8 (C)

Tài liệu tham khảo

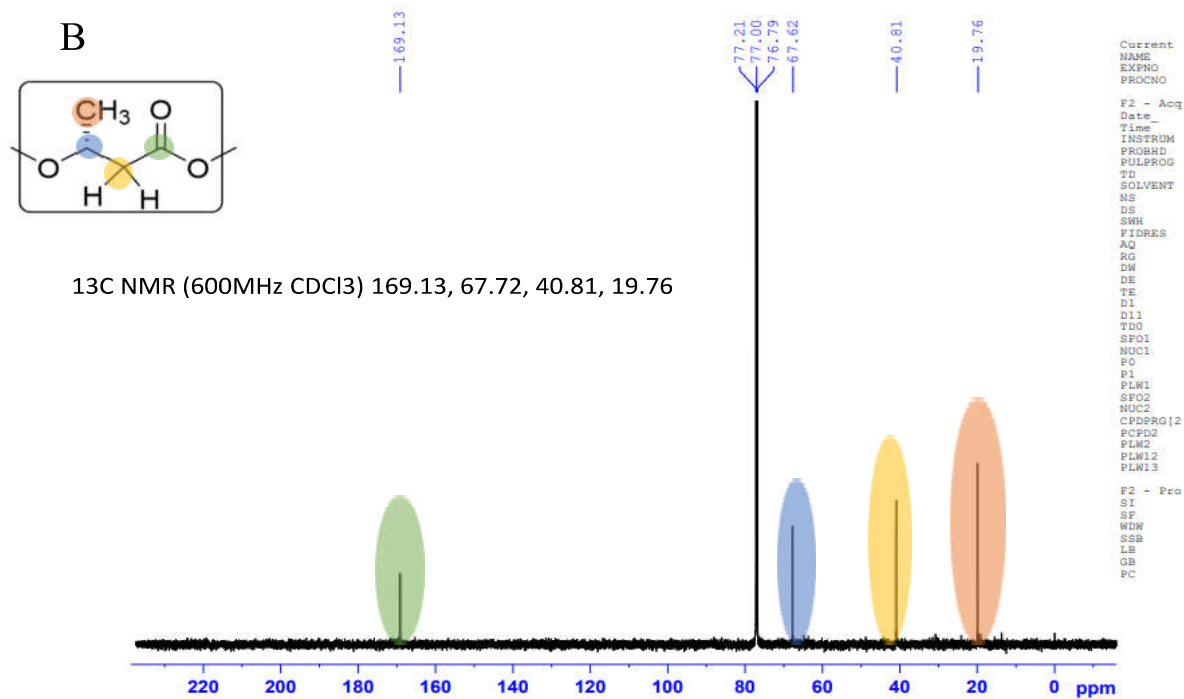
1. Pham H. T. L., Nguyen L. T. T., Duong T. A., Bui D. T. T., Doan Q. T., Nguyen H. T. T., Mundt S. (2017), *Diversity and bioactivities of nostocacean cyanobacteria isolated from paddy soil in Vietnam*, Syst Appl Microbiol, 40(8), 470-481.
2. Ngo T. T., Nguyen B. T., Duong T. A., Nguyen T. T., Nguyen T. L., Kieu K. T., Do M. T., Nguyen S. V., Thang N. D., Pham H. T. L. (2022), *Polyphasic evaluation and cytotoxic investigation of isolated cyanobacteria with an emphasis on potent activities of a Scytonema strain*, Front Microbiol, 13, 1025755.

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

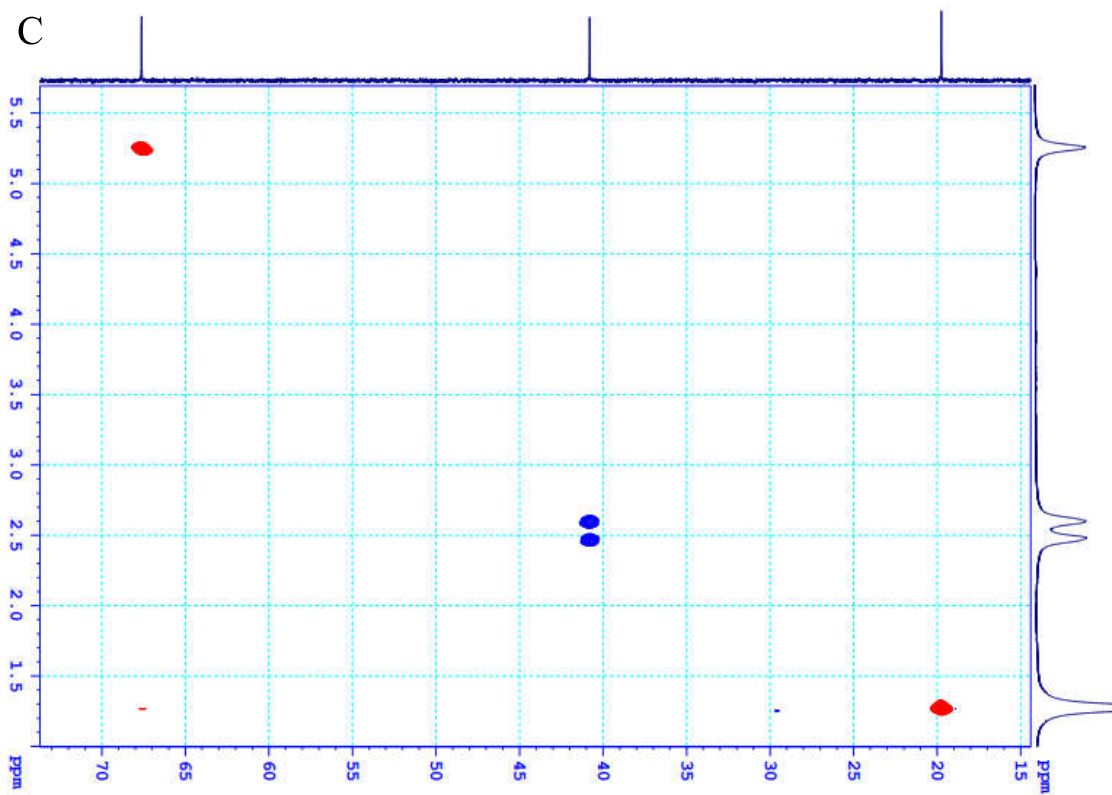
3.1. Kết quả phân tích phổ 2 chiều của vật liệu nhựa sinh học PHB chiết suất từ *S. Salina* M8



(A) - Phổ ¹H-NMR của PHB chiết từ sinh khối *S.salina* M8



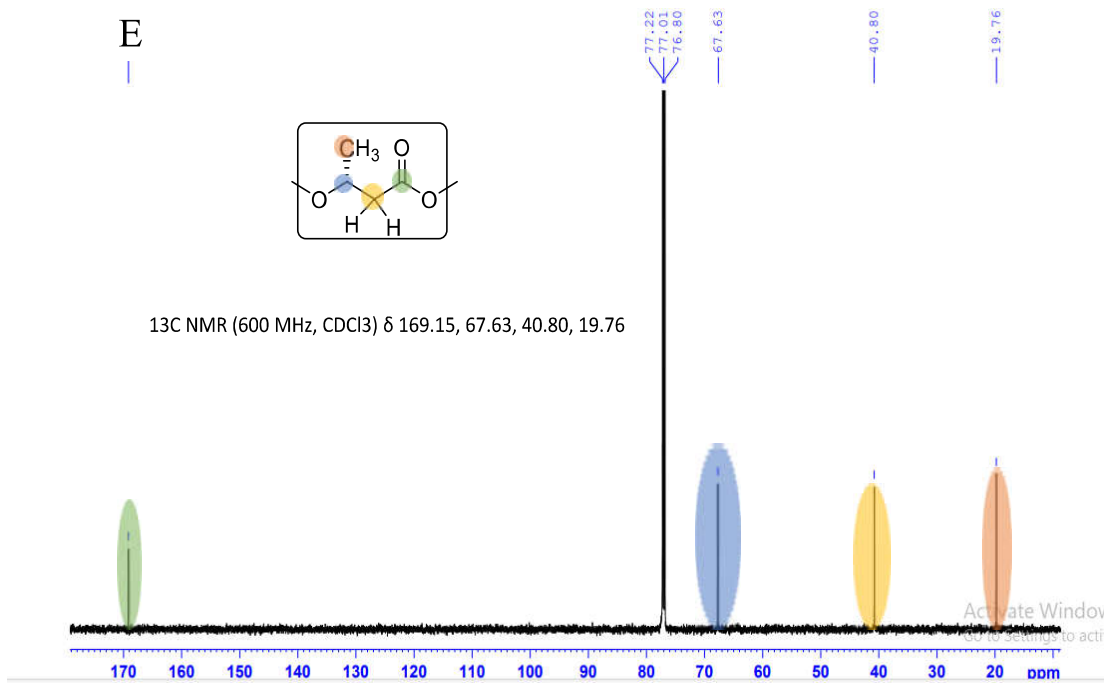
(B) - Phổ ¹³C-NMR của PHB chiết từ sinh khối *S.salina* M8



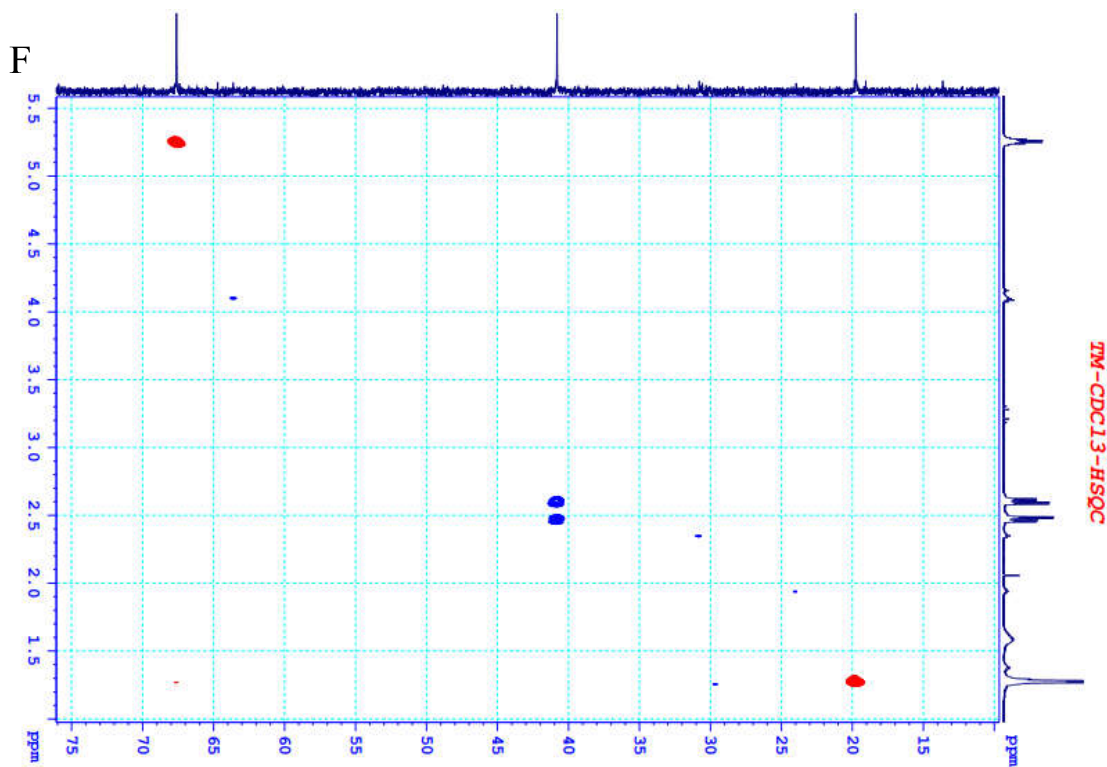
(C)- Phổ 2 chiều của PHB chiết từ sinh khối *S.salina*



(D)- Phổ $^1\text{H-NMR}$ của PHB thương mại



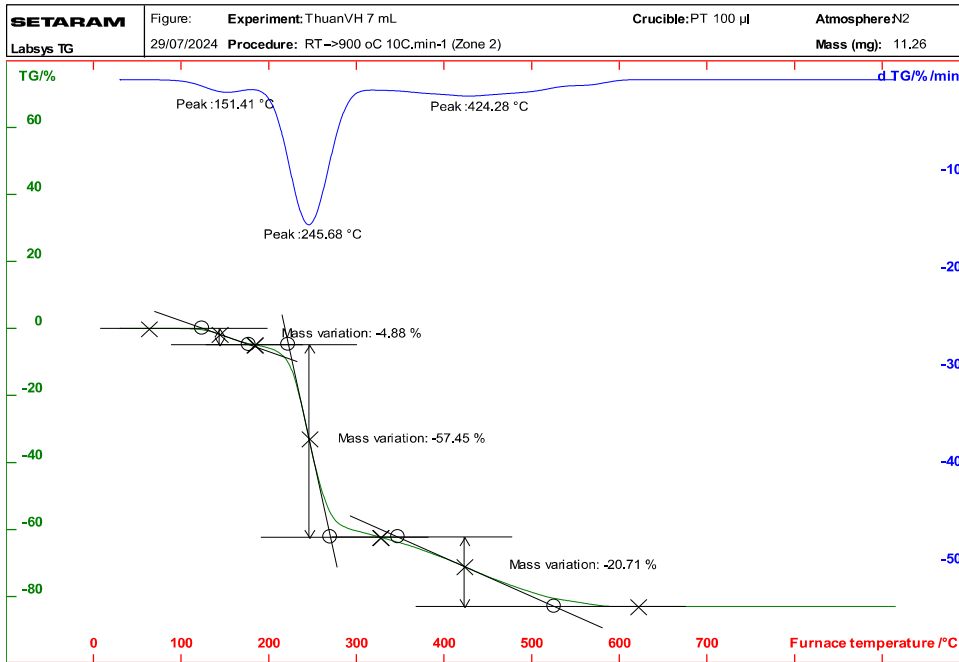
(E)- Phổ ¹³C-NMR của PHB thương mại



(F)- Phổ 2 chiều của PHB thương mại

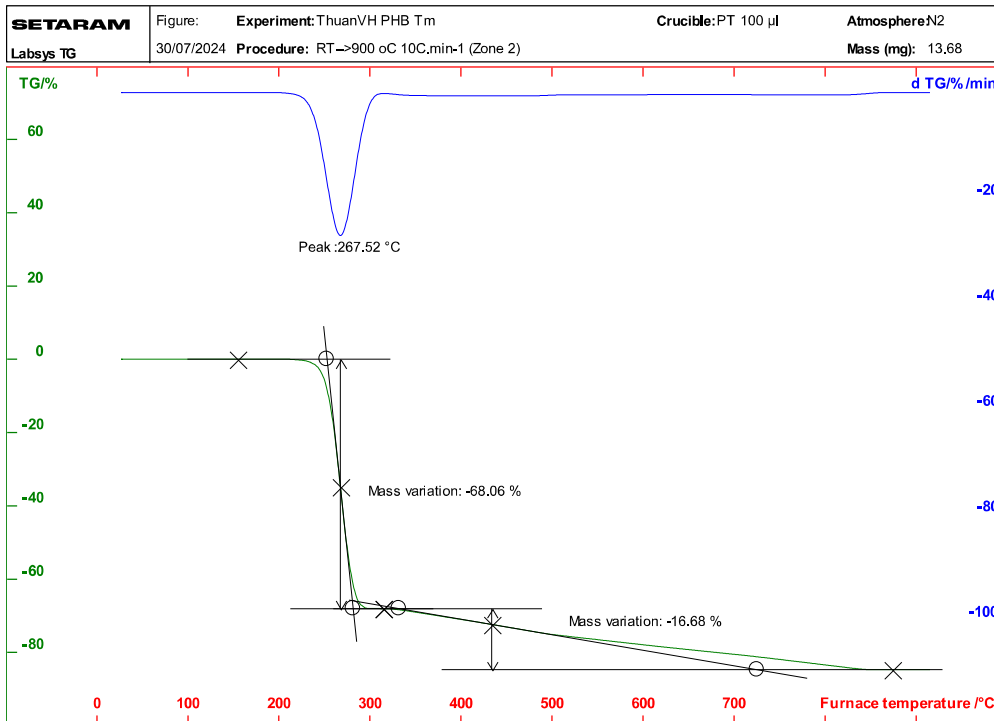
Hình 3.1. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và phổ ¹³C-NMR của vật liệu nhựa sinh học PHB

3.2. Kết quả phân tích phổ nhiệt học qua phân tích TGA và DSC của vật liệu nhựa sinh học PHB



A

(A) - Phổ TGA/DTG của PHB chiết từ sinh khối *S. salina* M8

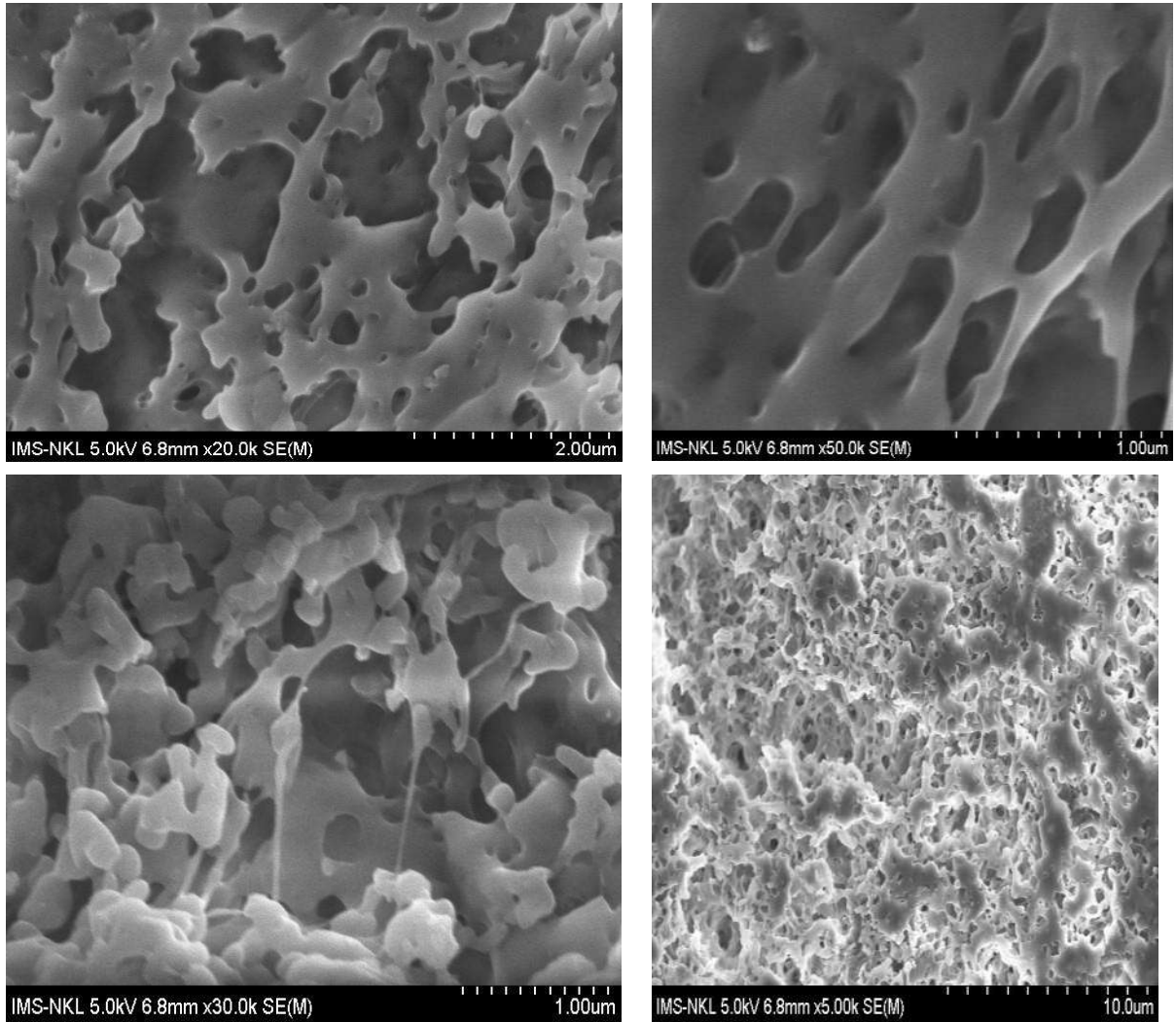


B

(B) - Phổ TGA/DTG của PHB thương mại

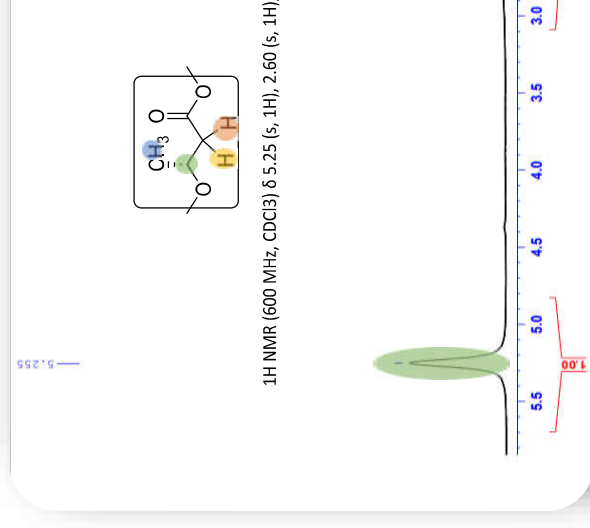
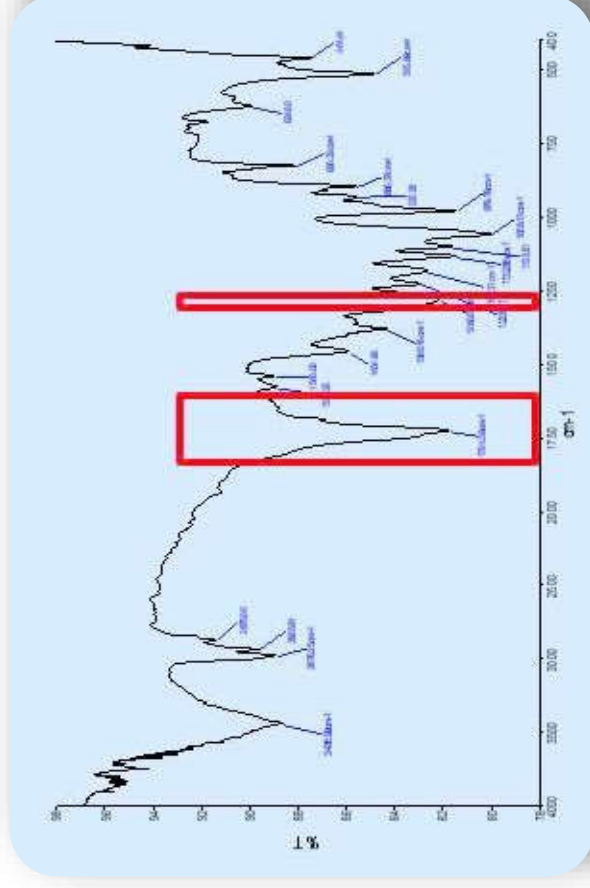
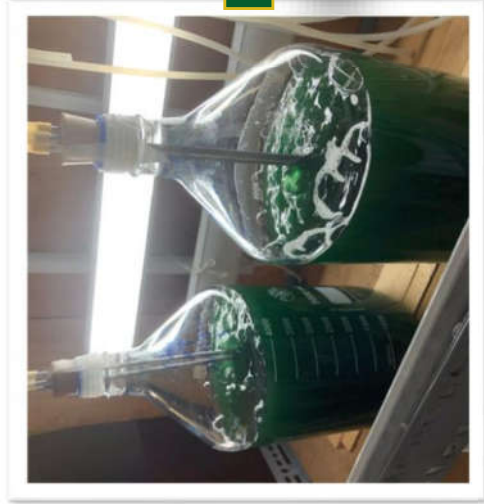
Hình 3.2. Phổ TGA/DTG của vật liệu nhựa sinh học PHB

3.3. Kết quả về phân tích SEM



Hình 3.3. Hình thái bề mặt của PHB chiết từ sinh khối S.salina M8

3.4. MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU VI KHUẨN LẠM *S.SALINA* M8 TRONG XÚC NƯỚC THẢI SINH HOẠT VÀ SẢN XUẤT NHỰA PHB



Nguyên liệu đầu vào

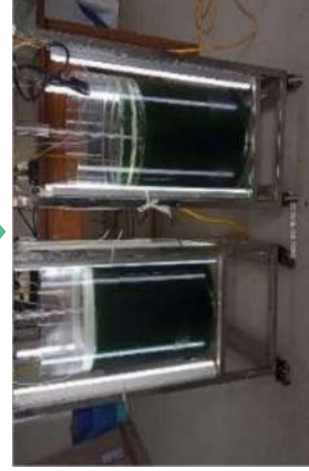


Ánh sáng mặt trời



Nước thải sinh hoạt
(C, N, P, vi chất dinh
dưỡng)

Sinh trưởng
quang tạp dưỡng

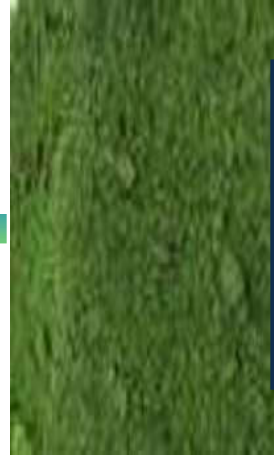


S. salina M8

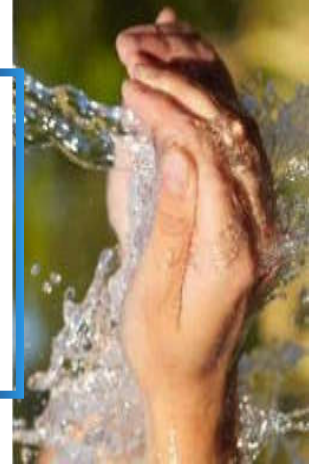
Tinh chế sản phẩm



Sinh khối



Nước sạch



1. Vật
2. Sản
3. Ứng
4. và m
5. Hàn
6. Ứng



1. Prot
2. Vita
3. Diệp
4. Lipi
5. Carl
6. Hợp



1. Nôn
2. Quy
3. sản
4. Hoạ



Ứng dụng S. salina M8 trong thu hồi sinh khối, sản xuất PHB và xử lý nước thải theo mô hình kinh tế tuần hoàn