

XÁC ĐỊNH MẬT ĐỘ TẾ BÀO TẢO VÀ HÀM LƯỢNG CAROTENOID TỔNG CỦA CÁC LOÀI VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG THUỘC CHI *SCHIZOCHYTRIUM* VÀ *THRAUSCHYTRIUM* Ở BỜ BIỂN TỈNH TRÀ VINH

Phạm Thị Bình Nguyễn^{1*}

DETERMINING THE ALGAE CELL DENSITY AND TOTAL CAROTENOID CONTENT OF HETEROTROPHIC MARINE MICROALGAE - SCHIZOCHYTRIUM AND THRAUSTOCHYTRIUM ON THE COAST OF TRA VINH PROVINCE, VIETNAM

Pham Thi Binh Nguyen^{1*}

Tóm tắt – Nghiên cứu xác định khả năng nuôi sinh khối và hàm lượng carotenoid tổng của các loài vi tảo biển thuộc chi *Schizochytrium* và chi *Thrauschytrium* ở bờ biển tỉnh Trà Vinh. Trong đó, 05 mẫu tảo đem nuôi sinh khối và xác định hàm lượng carotenoid được kí hiệu gồm chủng DH41.79, CN27, DH10, CN15 và CN47. Nghiên cứu cho thấy mật độ tế bào của chủng CN47 là cao nhất qua các cấp nhân giống cũng như ở các mức nồng độ pha loãng khác nhau (10%, 20%, 30%), chỉ ra mối tương quan thuận giữa mật độ tế bào với trọng lượng khô tế bào của các chủng tảo ($R^2 \approx 1 > 0$). Đồng thời, kết quả này còn xác định được chủng CN47 có hàm lượng carotenoid cao nhất (7,613 $\mu\text{g/kg}$) so với 04 chủng còn lại và cao hơn so với các nghiên cứu đã được thực hiện. Kết quả nghiên cứu góp phần tạo nền tảng cho các công trình khoa học về các loài vi tảo biển dị dưỡng thuộc nhóm *Thraustochytrids* có khả năng ứng dụng cao trong việc sản xuất sinh khối, chiết tách các hợp chất có giá trị dinh dưỡng cao cho nuôi trồng thủy sản, hướng đến sự phát triển bền vững thông qua sự thay thế nguồn dầu cá từ khai thác tự nhiên tại tỉnh Trà Vinh.

Từ khóa: carotenoid, chi *Schizochytrium*, chi *Thrauschytrium*, tỉnh Trà Vinh, vi tảo biển.

Abstract – This study aimed to determine the biomass culture capacity and total carotenoid content of heterotrophic marine microalgae genera, including the genus *Schizochytrium* and *Thraustochytrium* on the coast of Tra Vinh Province. Five strains of these genera, DH41.79, CN27, DH10, CN15, and CN47, were cultured for biomass and carotenoid content. The study showed that the cell density of CN47 was highest with different periods under three different dilution levels (10%, 20%, and 30%), with a positive relationship between cell density and dry weight of algae strains ($R^2 \approx 1 > 0$). Besides, the results indicated that all densities of strain CN47 showed carotenoid content of this strain (7,613 $\mu\text{g/kg}$) was significantly higher than that of the 04 remainings and previous studies. The research results contribute to the foundation for scientific works on the heterotrophic marine microalgae *Thraustochytrids*, which have a high potential for applications in biomass production, extraction of high-value nutritional compounds for aquaculture, towards sustainable development through replacing fish oil sourced from natural exploitation in Tra Vinh Province.

Keywords: carotenoid, genus *Schizochytrium*, genus *Thraustochytrium*, marine microalgae, Tra Vinh Province.

¹Trường Đại học Trà Vinh, Việt Nam
Ngày nhận bài: 14/02/2023; Ngày nhận bài chỉnh sửa: 21/3/2022; Ngày chấp nhận đăng: 30/3/2022
*Tác giả liên hệ: phamnguyen@tvu.edu.vn
¹Tra Vinh University, Vietnam
Received date: 14th February 2023; Revised date: 21st March 2023; Accepted date: 30th March 2023
*Corresponding author: phamnguyen@tvu.edu.vn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, vi tảo là đối tượng đang được chú ý về khả năng chứa đựng những hợp chất sinh học quý mang lại giá trị sức khỏe, kinh tế và khả năng gia tăng sinh khối của chúng. Carotenoid là một trong những hợp chất được quan tâm và có vai trò quan trọng ở nhiều lĩnh vực, đặc biệt trong dược phẩm và thực phẩm. Carotenoid được ứng dụng rộng rãi làm chất phụ gia tạo màu cho thực phẩm và thức ăn cho động vật, chất bổ sung giúp gia tăng giá trị dinh dưỡng cho tôm, cá [1]. Bên cạnh đó, các carotenoid với vai trò là chất chống oxy hóa đã mang lại lợi ích cho sức khỏe con người bằng cách ngăn ngừa các bệnh ung thư, xơ cứng động mạch, đục thủy tinh thể và một số bệnh khác. Do đó, carotenoid đã được nghiên cứu và ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực dược, mỹ phẩm [2]. Theo báo cáo gần đây, giá trị của carotenoid trên thị trường thế giới đang gia tăng, thị trường carotenoid thức ăn chăn nuôi được dự báo sẽ đạt CAGR là 3,6% trong giai đoạn 2022 – 2027. Về dài hạn, sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản và tăng tiêu thụ thủy sản được dự đoán sẽ thúc đẩy sự phát triển của thị trường carotenoid [3]. Người tiêu dùng ngày càng ưa chuộng các sản phẩm có nguồn gốc thiên nhiên đã tạo cơ hội cho sự phát triển của vi tảo bởi vì chúng là một trong những nguồn có khả năng sản xuất carotenoid. Các nghiên cứu về vi tảo quang dưỡng và thực vật được ứng dụng để sản xuất carotenoid phổ biến hiện nay. Theo nghiên cứu của Faruq Ahmed et al. [4], trong số hàng trăm mẫu phân lập ở Úc, với 12 loài vi tảo đã được sàng lọc về cấu hình carotenoid, năng suất carotenoid và khả năng chống oxy hóa trong ống nghiệm, kết quả chỉ ra rằng *T. suecica*, *D. salina*, *P. salina* và *I. galbana* có thể được phát triển thêm để sản xuất carotenoid thương mại. Tuy nhiên, việc nuôi tảo quang dưỡng gặp nhiều khó khăn và tốn chi phí vì điều kiện nuôi đòi hỏi phức tạp hơn về chế độ ánh sáng, hàm lượng dinh dưỡng, yếu tố nhiệt độ và điều kiện sục khí so với các vi tảo dị dưỡng. Thêm vào đó, nó tăng trưởng chậm hơn so với vi tảo dị dưỡng [5]. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng một số vi tảo thuộc nhóm *Thraustochytrids* (các chủng thuộc chi *Schizochytrium* và *Thraustochytrium*) có thể được nuôi cấy để tạo ra sinh khối cao, chứa một

lượng đáng kể lipid giàu axit béo không bão hòa đa (PUFA). Thêm vào đó, *Thraustochytrids* được biết đến như một nguồn tiềm năng để sản xuất các sắc tố carotenoid: xanthophyll, astaxanthin, zeaxanthin, canthaxanthin, echinenone và β -carotene [6]. Tuy nhiên, việc tìm kiếm thêm các chủng mới ở các khu vực khác nhau, mở rộng thêm địa điểm nghiên cứu và chứng minh khả năng tồn tại, gia tăng sinh khối, tuyển chọn các chủng có giá trị sinh học, đặc biệt hợp chất carotenoid của các giống loài tảo thuộc nhóm *Thraustochytrids* để tạo thêm nguồn sinh khối địa phương là điều cần thiết.

Vì vậy, bài báo này cung cấp dữ liệu khoa học về khả năng nuôi sinh khối và hàm lượng carotenoid của các loài thuộc chi *Thraustochytrium* và *Schizochytrium*. Nghiên cứu giúp tìm nguồn cung cấp các dưỡng chất dinh dưỡng có lợi có thể thay thế dầu cá, chất tạo màu, thức ăn tự nhiên cho vật nuôi hiện nay và làm nền tảng cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong tương lai tại tỉnh Trà Vinh.

II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Vi tảo dị dưỡng là đối tượng được nghiên cứu ở nhiều phương diện như đặc điểm sinh học, phân loại, nhận diện, phân lập và cả về mặt ứng dụng vi tảo trong nông nghiệp – thủy sản nhưng còn khá mới mẻ đối với nhóm vi tảo có khả năng sản xuất carotenoid. Năm 2007, Đặng Diễm Hồng và cộng sự [7] đã góp phần nghiên cứu quy trình tách chiết dầu sinh học giàu axit béo omega-3 và omega-6 (EPA, DHA, DPA) từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng, với mục tiêu chính là xây dựng được quy trình công nghệ nhân nhanh tảo và tách chiết, thu nhận dầu sinh học giàu EPA, DHA, DPA từ sinh khối vi tảo biển dị dưỡng và ứng dụng trong lĩnh vực sản xuất thực phẩm chức năng. Các công trình nghiên cứu của Đặng Diễm Hồng và cộng sự liên quan đến quy trình chiết tách các hoạt tính sinh học quý giá như DHA, squalene, PUFAs, β – carotene và lycopene đã được thực hiện và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản và chăn nuôi gia cầm. Năm 2010, Hoàng Thị Lan Anh và cộng sự [8] đã phân lập thành công các chủng vi tảo biển dị dưỡng mới thuộc chi *Thraustochytrids* giàu DHA và carotenoid từ đầm ngập mặn Thị Nại – Bình Định. Kết quả đã

cung cấp thêm dữ liệu khoa học về các dòng vi tảo dị dưỡng *Thraustochytrids* có khả năng sản xuất ra DHA, carotenoid cũng như đặc điểm sinh học của một số giống loài thuộc vi tảo biển *Thraustochytrids* và *Labyrinthulids* ở Việt Nam. Những năm tiếp theo, các nghiên cứu do Trần Thị Xuân Mai và cộng sự [9] đã cho kết quả phân lập, nhận diện được dòng vi tảo *Aurantiochytrium* sp. BCM05 có khả năng sản xuất carotenoid với hàm lượng tổng số là 7.600 $\mu\text{g/kg}$, nghiên cứu mang tính chất cung cấp dữ liệu khoa học về nhóm tảo này ở địa phương là tỉnh Cà Mau. Cùng đối tượng nghiên cứu và địa điểm triển khai, Lê Bích Tuyên và Huỳnh Kim Yến [10] cũng đã phân lập được 5 dòng vi tảo có khả năng sản xuất carotenoid, tuy nhiên chưa định danh được thành phần loài và đánh giá khả năng sản xuất carotenoid của các dòng vi tảo được phân lập. Một nghiên cứu của Nguyễn Thị Hoài Hà và cộng sự [11] về đặc điểm phân loại mười chủng vi tảo dị dưỡng *Thraustochytrids* phân lập từ rừng ngập mặn Xuân Thủy, Nam Định đã góp phần cung cấp một cách tiếp cận mới trong phân loại, mô tả đặc điểm sinh học, phân tử của *Thraustochytrids* bản địa rừng ngập mặn Xuân Thủy, Nam Định.

Các năm gần đây, nghiên cứu của X. Zhao [12] về phân tích quá trình tổng hợp sinh học của các axit béo trong *Thraustochytrids* cho thấy chỉ tảo thuộc nhóm *Thraustochytrids* có khả năng sản xuất ra các hợp chất sinh học quý, các axit béo quan trọng, dinh dưỡng như các axit béo không bão hòa đa chuỗi dài (VLCPUFAs), axit docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3), axit béo bão hòa chuỗi (SFAs), acid palmitic (16:0) và chuỗi SFAs axit pentadecanoic (15:0). Năm 2021, Kaliyamoorthy Kalidasan [13] đã phân lập 127 chủng *thraustochytrid* từ các sinh cảnh rừng ngập mặn ở phía Nam quần đảo Andaman, Ấn Độ để xác định tính đa dạng, axit béo không bão hòa đa (PUFAs) và tiềm năng công nghệ sinh học của chúng. Các chủng ưu thế được xác định thuộc hai chi chính (*Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*) dựa trên các đặc điểm hình thái và phân tử. Kết quả nghiên cứu cho rằng tất cả các chủng đều không độc, có khả năng làm tan huyết thạch âm tính. Do đó, các chủng thuộc họ *Thraustochytrids* được cho là nguồn cung cấp DHA tiềm năng để ứng dụng trong việc chăm sóc sức khỏe của con

người và cá.

Các kết quả trên chưa nhấn mạnh khả năng nuôi gia tăng sinh khối của các dòng vi tảo phân lập được. Thêm vào đó, việc phân lập và nhận diện các dòng vi tảo biển dị dưỡng có khả năng sản xuất carotenoid được thực hiện ở các tỉnh ven biển khác nhau sẽ làm phong phú thêm thành phần giống loài của nhóm vi tảo biển. Đặc biệt, Trà Vinh là một tỉnh nằm giữa hai sông lớn, sông Tiền và sông Hậu, có vị trí tiếp giáp biển Đông chiều dài 65 km bờ biển, đây là đặc điểm địa hình tạo nên vùng sinh thái khác biệt và là một tỉnh có tiềm năng rất lớn về nông nghiệp, thế mạnh về nuôi trồng thủy sản. Một trong những nguồn thức ăn ưa chuộng trong nghề nuôi trồng thủy sản hiện nay là thức ăn có thể bổ sung hàm lượng carotenoid tự nhiên như vi tảo dị dưỡng *Thraustochytrids* thật sự cần thiết để nghiên cứu.

III. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Thời gian, địa điểm và đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong 06 tháng (3/2022 – 9/2022) tại các phòng thí nghiệm thuộc Khoa Nông nghiệp – Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

Đối tượng nghiên cứu: Các chủng tảo được phân lập từ lá bần, lá đước tại các bờ biển ở tỉnh Trà Vinh.

B. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập vi tảo

Các mẫu lá bần, lá đước đã xử lý khử trùng được cắt ra với kích thước khoảng 0,5 cm $\times$ 0,5 cm và cấy trực tiếp vào các đĩa petri có chứa môi trường glucose yeast axtraxt peptone seawater (GYPS), thành phần gồm: 3,0 g glucose, 1,25 g yeast extract, 1,25 g peptone, thêm 50% NBTN cho đủ 1 lít, chỉnh pH = 6, môi trường được làm đặc với 15 g agar/L, môi trường sau khi khử trùng ở 121°C trong 10 phút được làm nguội đến khoảng 60°C, sau đó bổ sung 300 mg/L streptomycin (Strep) và 300 mg/L penicillin G (Peni) [14]. Những đĩa này được ủ trong tối ở nhiệt độ 28 $\pm$ 1°C trong 3 – 5 ngày. Khi xuất hiện những vùng trắng hoặc vàng nhạt xung quanh các rìa mép lá, cấy chuyển các lần tiếp theo trên đĩa

môi trường GYPS + Strep + Peni mới cho đến khi xuất hiện các khuẩn lạc rời và thuần.

Phương pháp phân tích trình tự 18S rDNA

DNA được tách chiết từ sinh khối theo phương pháp của Fawley et al. [14]. Phương pháp khuếch đại phản ứng PCR từ DNA tổng số với các cặp mồi Laby F: 5'-CCT ATC AGC TGT CGA TGG TA-3' và Laby R: 5'-GGT TAA GAC TAC GAT GGT ATC TAA-3'. Sản phẩm PCR dự kiến có kích thước là 700 bp. Thành phần phản ứng PCR với tổng thể tích 20 μ L, bao gồm 2,0 μ L đệm 10X cho taq – DNA polymerase; 1,5 μ L dNTP mỗi loại (2,5 mM); 1,0 μ L Laby F và Laby R mỗi loại 10 mM; 1,0 μ L DNA khuôn (50 – 100 mg/ μ L); 0,3 μ L Taq polymerase (5U/ μ L) và 13,2 μ L nước. Chu trình biến tính ở 94°C trong 5 phút. Chạy nhắc lại chu kỳ tại: 94°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút. Tổng hợp 72°C/5 phút [15]. Phân tích trình tự gen 18S rDNA tại Trung tâm Xét nghiệm Kỹ thuật cao Việt Á Miền Nam tại tỉnh Bình Dương. Sản phẩm được kiểm tra và điện di trên gel agarose 1%. So sánh độ tương đồng các trình tự nucleotide của một phần đoạn gen 18S rDNA với các loài thuộc chi *Schizochytrium*, *Aurantionchytrium*, *Thraustochytrium* đã được định tên và đăng ký mã số trên Genbank.

Nuôi sinh khối các dòng vi tảo phân lập

Nhân giống cấp I: Chuyển cẩn thận một khuẩn lạc đang nuôi cấy trên môi trường GYPS đặc vào ống nghiệm 50 ml chứa 10 ml môi trường lỏng GYPS + Strep + Peni (300 mg/L). Nuôi cấy dung dịch trên máy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ $28 \pm 1^\circ\text{C}$ với điều kiện tối, trong 3 ngày.

Nhân giống cấp II: Sau nhân giống cấp I, chuyển 1 ml dịch vi tảo sang bình tam giác 500 ml chứa 199 ml môi trường GYPS + Strep. + Peni (300 mg/L) lỏng. Tiếp tục nuôi ở chế độ lắc 200 vòng/phút ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ với điều kiện tối trong 4 ngày.

Xác định trọng lượng khô tế bào và tốc độ tăng trưởng tế bào vi tảo

Nghiên cứu xác định trọng lượng khô tế bào dựa theo phương pháp của Taha et al. [16].

Sau bốn ngày nuôi cấy, các dòng vi tảo đã phân lập và nhận diện sơ bộ với thể tích 200 ml, tiến hành lấy 100 ml dung dịch tảo đã được pha loãng bằng môi trường GYPS ở các nồng độ khác nhau: 10%, 20% và 30%. Sau đó, tương ứng với mỗi

nồng độ pha loãng li tâm thu sinh khối tế bào ở 4.000 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C trong 10 phút. Đổ bỏ phần dịch lỏng lấy phần dịch tủa. Chuyển sinh khối tảo thu được sang đĩa petri có đặt một tấm giấy lọc bên trong đĩa (cân trọng lượng đĩa và giấy lọc ban đầu) sấy ở 65°C cho đến khi khối lượng không đổi. Khối lượng khô của tảo được tính theo công thức:

$$\text{Khối lượng tảo (g/l)} = \frac{M2 - M1}{100} \times 100$$

Trong đó:

M1: Trọng lượng đĩa petri và giấy lọc ban đầu

M2: Trọng lượng đĩa petri và giấy lọc sau khi sấy

Phương pháp xác định mật độ tảo

Sự tăng trưởng của tế bào trong dung dịch nuôi cấy được xác định bằng cách đo mật độ quang phổ các nồng độ pha loãng 10%, 20%, 30% bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm trong một dãy OD 0,2 – 1,8. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Từ những thông số thu được, xây dựng đường chuẩn qua phương trình hồi quy tuyến tính giữa chỉ số OD và TLKTB của các vi tảo phân lập có dạng $y = ax + b$. Trong đó, y là chỉ số OD và x là TLKTB tương ứng của vi tảo (g/l).

Xác định hàm lượng carotenoid

Hàm lượng carotenoid được xác định theo phương pháp của Hoàng Thị Lan Anh và cộng sự [8]. Nghiền sinh khối tảo với cát thủy tinh và thêm vào 10 ml acetone 90% lạnh. Lọc lấy dịch trong bằng giấy lọc chuyên biệt Whatman GF/C. Định mức lên 10 ml bằng acetone 90%. Đo quang phổ ở bước sóng 480 nm.

Hàm lượng carotenoid trong dung dịch được tính theo công thức [17]:

$$\text{Hàm lượng sắc tố } (\mu\text{g/L}) = C/V$$

Trong đó: V là lượng thể tích dịch tảo sau khi đem lọc (L) C (carotenoid tổng số) = $4,0 \times E_{480}$ (μg)

Với E_{480} là giá trị OD đo được ở bước sóng 480 nm.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý trên Excel và các phần mềm xử lý số liệu hiện hành (SPSS, Stargraphic...).

Phương pháp phân tích: Phương pháp ANOVA, xây dựng đường chuẩn tương quan, xây dựng bảng, biểu đồ để minh họa kết quả.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. Định danh các chủng phân lập

Nghiên cứu sử dụng phương pháp so sánh hình thái và so sánh độ tương đồng các trình tự gen 18S rDNA với loài có mối quan hệ họ hàng gần đã được đăng kí trong ngân hàng dữ liệu gen NCBI, kết quả thu được như Bảng 1, Hình 1 và Bảng 2, Hình 2.

Kết quả ở Bảng 1 và Hình 1 cho thấy 02 chủng DH41, DH79 có quan hệ gần với loài *Schizochytrium mangrovei* (có mã định danh DQ367049) là 92,24%. Chủng CN27 có quan hệ gần với loài *Schizochytrium* sp. BR2 (có mã định danh DQ525180) là 99%. Chủng DH10 nằm trong một cụm riêng biệt và có quan hệ gần với *Aurantiochytrium* sp. B072 (có mã định danh JF266572) là 99,05%. Như vậy, nghiên cứu nhận diện được 02 chủng thuộc chi *Schizochytrium* gồm: chủng CN27 và chủng DH41, DH79 cùng loài, có quan hệ gần với loài *Schizochytrium mangrovei*, kí hiệu chủng là DH41,79 và 01 chủng DH10 thuộc chi *Aurantiochytrium*. Kết quả này giúp phát hiện các chi tảo biển dị dưỡng thuộc nhóm Thraustochytrids có lợi đối với con người và sinh vật.

Sau khi phân tích và giải trình tự đoạn gen 18S rRNA và so sánh hình thái của 02 chủng CN15 và CN47, Bảng 2 và Hình 2 cho thấy chủng CN15 có quan hệ gần với loài *Thraustochytrium aureum* (có mã định danh AB022110) là 92,79%. và chủng CN47 có quan hệ gần với loài *Thraustochytrium* sp. TN22 (có mã định danh HQ116831) là 96,24%. Trong đó, loài *Thraustochytrium* sp. TN22 có khả năng sản xuất carotenoid với hàm lượng carotenoid là 5.200 µg/kg trọng lượng sinh khối khô [8] và là đối tượng tiềm năng trong ứng dụng sản xuất DHA và DPA (axit docosapentaenoic), hàm lượng lipid và squalene cao [7]. Kết quả nghiên cứu đã xác định được chủng CN47 có quan hệ gần gũi với loài *Thraustochytrium* sp. TN22 là khởi đầu cho các ứng dụng về loài tảo này, đặc biệt trong chăn nuôi và thủy sản về việc tạo màu đỏ cam cho lòng đỏ trứng gà và màu sắc của tôm.

B. Kết quả nuôi sinh khối cấp 1 và cấp 2 vi tảo dị dưỡng Thraustochytrids

Mật độ tế bào tảo của các chủng vi tảo khi nuôi sinh khối cấp 1 và 2

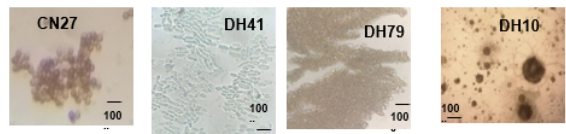
Sau ba ngày nuôi sinh khối vi tảo cấp 1 (Hình 3 và Hình 4) và bốn ngày nuôi cấy chuyển cấp 2 (Hình 5), các chủng vi tảo được xác định bằng cách đo mật độ quang phổ ở bước sóng 600 nm và phân tích thống kê cho thấy mật độ tế bào giữa các chủng vi tảo ở cấp 1 và cấp 2 chênh lệch không nhiều (Bảng 3).

Kết quả mật độ tế bào của các chủng vi tảo cho thấy sự tăng trưởng của tế bào tảo phát triển tốt sau bảy ngày nuôi cấy. Trong đó, chủng CN47 mật độ cao nhất so với các chủng còn lại. Chủng DH41,79 đạt mật độ thấp nhất ở các lần nhân giống cấp 1 và cấp 2. Đặng Diễm Hồng và cộng sự [7] khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp các chủng thuộc chi *Schizochytrium*. Kết quả cho thấy đường cong sinh trưởng của 04 chủng tiềm năng thuộc chi *Schizochytrium* sinh trưởng đi vào pha cân bằng sau năm ngày nuôi. Đây là điều kiện thích hợp được lựa chọn để so sánh sinh khối tảo tạo ra. Vì vậy, việc bố trí nuôi cấp 2 ở bốn ngày nuôi để đo mật độ sinh khối tảo là phù hợp.

Mật độ cao nhất là chủng CN47 sau hai lần nhân giống cấp 1 và cấp 2 với hàm lượng 20,65 x 10⁷TB/ml (cấp 1) và 31,79 x 10⁷TB/ml (cấp 2); các chủng còn lại CN15, CN27, DH10, DH41,79 có mật độ tế bào không chênh lệch nhiều và không khác biệt có ý nghĩa thống kê (mức ý nghĩa 5%). Trong đó, chủng CN47 được nhận diện có quan hệ gần với loài *Thraustochytrium* sp. TN22 có tiềm năng sản xuất carotenoid là chất có vai trò phụ gia tạo màu tự nhiên cho thực phẩm, chất bổ sung giúp gia tăng giá trị dinh dưỡng cho gia súc, gia cầm, tôm, cá [18]. Nghiên cứu của Kaliyamoorthy Kalidasan [13] đã phân lập 127 chủng Thraustochytrid từ các sinh cảnh rừng ngập mặn ở phía Nam quần đảo Andaman, Ấn Độ để xác định tính đa dạng, axit béo không bão hòa đa (PUFAs) và tiềm năng công nghệ sinh học của chúng. Các chủng ưu thế được xác định thuộc hai chi chính (*Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*) dựa trên các đặc điểm hình thái và phân tử, kết quả cho thấy tất cả các chủng đều không độc, có khả năng làm tan huyết thạch âm tính. Do đó, các chủng thuộc họ Thraustochytrids được cho

Bảng 1: Kết quả định danh chi *Schizochytrium* và chi *Aurantionchytrium* ở tỉnh Trà Vinh

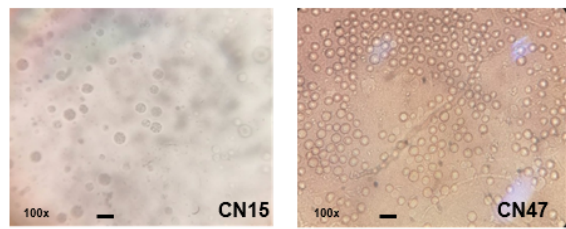
TT	Kí hiệu chủng	Có quan hệ gần với chủng	Tỉ lệ (%) tương đồng với đoạn gen 18sRNA	Mã định danh
1	CN27	<i>Schizochytrium</i> sp. BR2	99	DQ525180
	DH41	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	92, 24	DQ367049
2	DH79	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	92, 24	DQ367049
3	DH10	<i>Aurantionchytrium</i> sp. B072	99, 05	JF266572



Hình 1: Hình dạng tế bào các chủng thuộc chi *Schizochytrium* và *Aurantiochytrium* (thanh kích thước 1 μ m)

Bảng 2: Kết quả định danh các chi *Thraustochytrium* ở bờ biển tỉnh Trà Vinh

TT	Kí hiệu chủng	Có quan hệ gần với chủng	Tỉ lệ (%) tương đồng với đoạn gen 18sRNA	Mã định danh
1	CN15	<i>Thraustochytrium aureum</i>	92,79	AB022110
2	CN47	<i>Thraustochytrium</i> sp. TN22	96,24	HQ116831



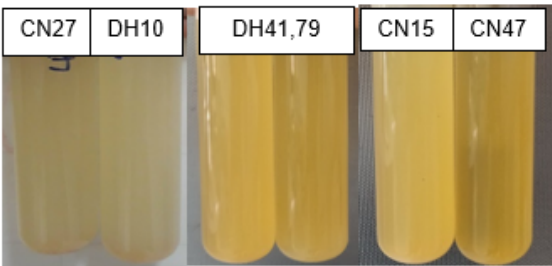
Hình 2: Hình dạng tế bào (thanh kích thước 1 μ m) các chủng chi *Thraustochytrium*

Bảng 3: Kết quả thống kê so sánh mật độ tế bào các chủng tảo nuôi cấp 1 và cấp 2

TT	Tên chủng	Mật độ tế bào trung bình ($\times 10^7$ TB/ml) cấp 1	Mật độ tế bào trung bình ($\times 10^7$ TB/ml) cấp 2
1	CN15	14,03 ^b	17,65 ^b
2	CN47	20,65 ^a	31,79 ^a
3	CN27	15,53 ^b	21,88 ^b
4	DH10	14,42 ^b	18,92 ^b
5	DH41,79	14,47 ^b	18,33 ^b

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau khác biệt không ý nghĩa (mức độ 5%)

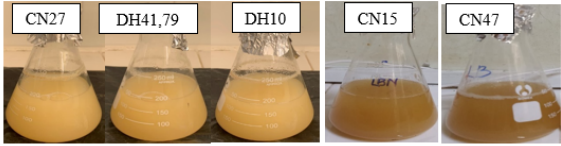
là nguồn cung cấp DHA tiềm năng để ứng dụng trong việc chăm sóc sức khỏe của con người và cá. Mật độ tế bào và sản xuất PUFA của một số chủng *Thraustochytrid* có thể thay đổi bằng cách thao tác các thông số vật lí và hóa học của quá trình nuôi [19]. Điều này cũng giải thích rằng trong quá trình nuôi cấy, một số yếu tố môi trường tác động làm ảnh hưởng đến mật độ tế bào, sự gia tăng sinh khối và mật độ nuôi cấy giữa các lần thí nghiệm có độ dao động trung bình khá cao giữa các chủng vì tảo được phân lập.



Hình 3: Các chủng vi tảo nhân giống cấp 1 sau ba ngày nuôi



Hình 4: Nuôi cấp 1 trong máy lắc



Hình 5: Các chủng vi tảo nhân giống cấp 2 sau bốn ngày nuôi

Kết quả hàm lượng carotenoid của các vi tảo đã được phân lập

Các chủng vi tảo đã phân lập và nhận diện sơ bộ với thể tích 200 ml sau bốn ngày nuôi cấy (cấp 2) sẽ được lấy 100 ml dung dịch tảo và pha loãng bằng môi trường GYPS ở các nồng độ: 10%, 20% và 30%, sau đó đo mật độ quang phổ các nồng độ pha loãng ở bước sóng 600 nm. Kết quả thu được như Bảng 4.

Bảng 4: Mật độ tế bào các chủng tảo ở các nồng độ pha loãng khác nhau

Tên chủng	Mật độ tế bào ở các nồng độ pha loãng (x10 ⁷ TB/ml)		
	10%	20%	30%
CN15	1,86 ^b	3,49 ^b	7,82 ^b
CN47	3,41 ^a	6,83 ^a	9,78 ^a
CN27	1,91 ^b	4,8 ^b	7,51 ^b
DH10	2,18 ^b	4,14 ^b	6,33 ^b
DH41,79	1,83 ^b	4,08 ^b	6,57 ^b

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có mẫu tự theo sau giống nhau khác biệt không ý nghĩa (mức độ 5%)

Phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5% cho thấy mật độ tế bào của các chủng CN15, CN27, DH10, DH41,79 ở cùng nồng độ pha loãng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chủng CN47 có mật độ tế bào cao nhất ở các nồng độ pha loãng lần lượt với mức 3,41 x 10⁷ TB/ml (10%), 6,83 x 10⁷ TB/ml (20%), 9,78 x 10⁷ TB/ml (30%).

Mặt khác, kết quả so sánh mật độ tế bào cùng một chủng ở ba mức nồng độ pha loãng khác nhau đều cho thấy mật độ tế bào tăng dần và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Riêng chủng CN15, mật độ tế bào ở nồng độ 10% và 20% khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Mật độ tế bào của các chủng vi tảo đo ở các nồng độ khác nhau 10%, 20% và 30% được sử dụng để li trích sinh khối khô và xây dựng đường chuẩn giữa trọng lượng khô tế bào với mật độ quang tế bào. Tuy nhiên,

để thuận tiện cho việc tính toán và vẽ biểu đồ đường chuẩn, mật độ tế bào được chuyển về đơn vị là 10⁶ TB/ml cho phù hợp và giảm khoảng cách giữa mật độ quang và trọng lượng khô tế bào trong biểu đồ.

Kết quả trọng lượng khô tế bào ở các nồng độ khác nhau giữa các chủng vi tảo

Sau khi thực hiện các bước theo phương pháp nghiên cứu, chúng tôi phân tích khối lượng khô tế bào của các chủng vi tảo. Kết quả thu được như Bảng 5.

Bảng 5: Trọng lượng khô tế bào các chủng tảo ở các nồng độ pha loãng khác nhau

Tên chủng	Trọng lượng khô tế bào (g/100ml)		
	10%	20%	30%
Cầu Ngang			
CN15	0,08±0,006	0,12±0,03	0,29±0,02
CN47	0,13±0,06	0,23±0,05	0,33±0,11
CN27	0,07±0,03	0,15±0,05	0,22±0,02
Duyên Hải			
DH10	0,09±0,015	0,1±0,02	0,15±0,02
DH41,79	0,08±0,01	0,15±0,05	0,23±0,02

Ghi chú: Kết quả thể hiện là giá trị trung bình ± sai số chuẩn

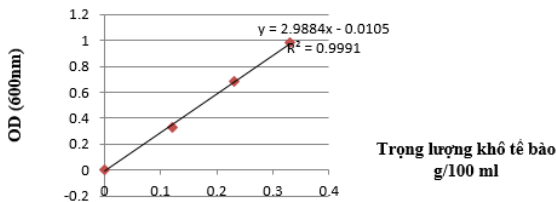
Kết quả cho thấy trọng lượng khô tế bào tảo được trích từ các sinh khối tươi tương ứng của các chủng có sự tăng dần ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Ở nồng độ 30%, trọng lượng khô cao nhất đạt được là chủng CN47 với 0,33g/100 ml và thấp nhất là chủng DH10 với 0,15g/100 ml. Trọng lượng khô tế bào có thể được xác định trực tiếp bằng cách lấy một lượng tối thiểu của dịch huyền phù tế bào để li tâm. Sau khi đổ thể nổi, tế bào được rửa bằng nước cất để loại bỏ tất cả các chất hòa tan. Dịch huyền phù được li tâm một lần nữa, các tế bào sau khi kết đặc lại được sấy khô trong tủ sấy và cân để xác định trọng lượng. Đây là phương thức trực tiếp nhất để xác định số lượng sinh khối tế bào. Tuy nhiên, cách xác định như thế tốn nhiều thời gian và dễ bỏ qua những thay đổi nhỏ của sinh khối tế bào, dịch huyền phù dày đặc và tế bào phải được rửa sạch hoàn toàn khỏi những chất ngoại sinh bám vào [20]. Lin Lu et al. [21] cho rằng có mối tương quan tuyến tính đáng kể giữa mật độ tế bào, mật độ quang và trọng lượng khô tế bào. Mặt khác, nghiên cứu David Ulises Santos Ballardo et al. [22] cho rằng phương pháp

đo quang phổ nhanh chóng, đơn giản và cụ thể để đo khối lượng sinh vật của bốn loài vi tảo (*Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornpose*, *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis affinis galbana*) có hiệu suất cao trong nuôi trồng thủy sản đã được phát triển và bước sóng cụ thể cho độ hấp thụ tối đa của từng loài được thiết lập khác nhau.

Vì vậy, việc xác định trọng lượng khô tế bào bằng phương pháp xây dựng đường chuẩn giữa trọng lượng khô tế bào và mật độ quang là phương pháp giúp xác định nhanh sinh khối khô của vi tảo thông qua việc đo mật độ quang dịch tảo thuộc nhóm *Thraustochytrids* ở bước sóng 600 nm là có ý nghĩa rất lớn, giúp tính chính xác cao hơn và đỡ mất nhiều thời gian trong việc thu li tâm sinh khối, sấy khô và cân trọng lượng dịch tảo sau sấy.

Xây dựng đường chuẩn giữa trọng lượng khô và mật độ quang (OD) tế bào các chủng vi tảo

Sau khi đo mật độ quang tế bào và xác định trọng lượng khô tế bào, kết quả được xử lí và vẽ đường chuẩn cho chủng CN47 như Hình 6.



Hình 6: Đường chuẩn OD (600 nm) trọng lượng khô chủng CN47

Kết quả thể hiện ở Hình 6 cho thấy các điểm tương quan giữa mật độ quang và trọng lượng khô tế bào của chủng CN47 hầu như đều nằm trên đường thẳng, với hệ số tương quan là $R^2 = 0,9991$ gần bằng 1 thể hiện mối tương quan thuận. Dựa vào đường chuẩn có thể xác định được ở nồng độ pha loãng 30% cho kết quả trọng lượng khô tế bào cao nhất.

Việc xử lí số liệu của 05 chủng vi tảo thu được kết quả như Bảng 6.

Bảng 6 cho thấy cả 05 chủng tảo đều có R^2 gần bằng 1 > 0. Điều này thể hiện mối tương quan thuận giữa mật độ tế bào và trọng lượng

Bảng 6: Phương trình hồi quy tuyến tính giữa chỉ số OD (600 nm) và trọng lượng khô của tế bào

Stt	Tên chủng	Phương trình hồi quy tuyến tính	Hệ số tương quan
1	CN15	$y = 2,6878x + 0,0075$	$R^2 = 0,9984$
2	CN47	$y = 2,9884x - 0,0105$	$R^2 = 0,9991$
3	CN27	$y = 2,709x$	$R^2 = 0,9971$
4	DH10	$y = 3,3219x$	$R^2 = 0,9931$
5	DH41,79	$y = 2,7836x$	$R^2 = 0,9908$

khô của sinh khối tảo. Điều này chỉ ra rằng ở nồng độ pha loãng cao, mật độ tế bào tảo cao sẽ thu được sinh khối tảo nhiều hơn dẫn đến trọng lượng khô tế bào cao.

C. Kết quả hàm lượng carotenoid của các chủng vi tảo đã phân lập

Sau bốn ngày nhân sinh khối cấp 2 các chủng vi tảo đã phân lập và nhận diện sơ bộ với thể tích 200 ml, tiếp tục thực hiện các bước mô tả trong phương pháp nghiên cứu để xác định hàm lượng carotenoid tổng số của các vi tảo đã phân lập (Bảng 7).

Kết quả xử lí số liệu bằng tính toán và phần mềm thống kê cho thấy khả năng sản sinh carotenoid tổng số của các chủng khá chênh lệch. Ba chủng CN27, DH10, DH41,79 có hàm lượng carotenoid tổng số khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chủng CN15 và chủng CN47 có hàm lượng carotenoid tổng số cao hơn lần lượt là 7.026 $\mu\text{g/kg}$ và 7.613 $\mu\text{g/kg}$. Trong đó, hàm lượng cao nhất là chủng CN47 với 7.613 $\mu\text{g/kg}$. So với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Xuân Mai [9], dòng BCM05 được phân lập ở rừng ngập mặn Cà Mau với 7.600 $\mu\text{g/kg}$ và dòng D5 khi chiết xuất bằng dung môi ethanol 90% trong nghiên cứu của Lê Bích Tuyền và cộng sự [10] với hàm lượng carotenoid 7.569 $\mu\text{g/kg}$, chủng vi tảo CN47 có hàm lượng tương đương. Mặt khác, so với dòng *Thraustochytrium* sp. TN22 đã được Hoàng Thị Lan Anh và cộng sự [8] phân lập từ đầm ngập mặn Thị Nại, tỉnh Bình Định chứa hàm lượng carotenoid là 5.200 $\mu\text{g/kg}$, chủng vi tảo này có tiềm năng sản xuất cao hơn gấp 31,7%.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu bước đầu xác định được khả năng nuôi sinh khối của các chủng vi tảo biển của chi

Bảng 7: Hàm lượng carotenoid tổng số của các chủng vi tảo đã phân lập

Stt	Tên chủng	Mật độ tế bào ở bước sóng 480 nm (x10 ⁷ TB/ml)	Hàm lượng Carotenoid tổng số (µg/kg)
1	CN15	1,76 ± 0,11	7.026 ^a
2	CN47	1,90 ± 0,16	7.613^a
3	CN27	0,74 ± 0,26	2.946 ^b
4	DH10	0,65 ± 0,34	2.586 ^b
5	DH41,79	1,00 ± 0,09	4.013 ^b

Schizochytrium và chi *Thraustochytrium* thuộc họ Thraustochytrid. Quá trình nhân giống cấp 1 và cấp 2 cho thấy mật độ tế bào của các chủng vi tảo đều có sự tăng trưởng và phát triển tốt sau bảy ngày nuôi cấy. Trong đó, chủng CN47 có mật độ cao nhất so với các chủng còn lại. Chủng DH41,79 đạt mật độ thấp nhất ở các lần nhân giống cấp 1 và cấp 2. Kết quả xác định hàm lượng carotenoid cho thấy khả năng sản sinh carotenoid tổng số của các chủng khá chênh lệch. Chủng CN47 có hàm lượng carotenoid tổng số cao nhất so với bốn chủng còn lại là 7.613 µg/kg. Như vậy, các chủng tảo đã phân lập được ở các bờ biển tỉnh Trà Vinh đều có khả năng nuôi sinh khối và chiết xuất các hợp chất có giá trị cho gia súc và con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Jorgensen K, Skibsted LK. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *International Journal of Food Research and Technology* [Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung]. 1993;196(5): 9–423.

[2] Olson JA. Carotenoids and human health. *Latin American Nutrition Archives* [Archivos latinoamericanos de nutrición]. 1999;49(3 Suppl 1): 7–11.

[3] Momordor Intelligence. *Thị trường carotenoid trong thức ăn chăn nuôi – tăng trưởng, xu hướng, tác động và dự báo của Covid-19 (2023-2028)*. <https://www.mordorintelligence.com/vi/industryreports/global-feed-carotenoids-market-industry> [Ngày truy cập 04/4/2023]. [Momordor Intelligence. *Carotenoids market size and share analysis – Forecast and growth trends (2023 - 2028)*. <https://www.mordorintelligence.com/vi/industryreports/global-feed-carotenoids-market-industry> [Accessed 04th April 2023]].

[4] Ahmed F, Fanning K, Netzel M, Turner W, Li Y, Schenk PM. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*. 2014;165: 300–306.

[5] Aki T, Hachida K, Yoshinaga M, Katai Y, Yamasaki T, Kawamoto S, et al. Thraustochytrid as a potential sources of carotenoid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003;80(8): 789–794.

[6] Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing Thraustochytrium species; screening of strains and optimization of omega-3 production. *Microbiol Biotechnol*. 2006;72: 1161–1169.

[7] Đặng Diễm Hồng, Hoàng Minh Hiền, Hoàng Sỹ Nam, Nguyễn Đình Hưng, Hoàng Lan Anh, Ngô Hoàn Thu và cộng sự. Đa dạng sinh học của các loài tảo biển dị dưỡng *Labyrinthula* sp và *Schizochytrium* sp. của Việt Nam. Trong: *Báo cáo khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ hai*. Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Việt Nam. https://sti.vista.gov.vn/file_DuLieu/dataTLKHCHN//Vd341-2008/2007/Vd341-2008S12007332.pdf [Ngày truy cập: 12/4/2022]. [Dang Diem Hong, Hoang Minh Hien, Hoang Sy Nam, Nguyen Dinh Hung, Hoang Lan Anh, Ngo Hoan Thu, et al. The biodiversity of marine heterotrophic algae species *Labyrinthula* sp and *Schizochytrium* sp in Vietnam. In: *Scientific report on Ecology and Biological Resources. The second national conference on ecology and biological resources*. Vietnam: Institute of Ecology and Biological Resources; 2007. https://sti.vista.gov.vn/file_DuLieu/dataTLKHCHN//Vd341-2008/2007/Vd341-2008S12007332.pdf [Accessed 12th April 2022]].

[8] Hoàng Thị Lan Anh, Đinh Thị Ngọc Mai, Ngô Thị Hoài Thu, Đặng Diễm Hồng. Phân lập chủng vi tảo biển dị dưỡng thuộc chi Thraustochytrium giàu DHA và carotenoid từ đầm ngập mặn Thị Nại – Bình Định. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2010;8(3A): 459–465. [Hoang Thi Lan Anh, Dinh Thi Ngoc Mai, Ngo Thi Hoai Thu, Dang Diem Hong. Isolation of marine heterotrophic algae strains belonging to the DHA and carotenoid-rich Thraustochytrium genus from Thi Nai lagoon, Binh Dinh. *Journal of Biotechnology*. 2010;8(3A): 459–465].

[9] Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Văn Bé. Phân lập và nhận diện vi tảo biển dị dưỡng Thraustochytrid sản xuất carotenoid. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2015;37(1): 57–64. [Tran Thi Xuan Mai, Nguyen Thi Pha, Nguyen Thi Lien, Nguyen Van Be. Isolation and identification of thraustochytrid heterotrophic microalga for production of carotenoids. *Can Tho University Journal of Science*. 2015;37(1): 57–64].

[10] Lê Bích Tuyền, Huỳnh Kim Yến. Phân lập một số dòng vi tảo biển dị dưỡng nhóm Thraustochytrids sản xuất carotenoid ở tỉnh Cà Mau. *Tạp chí Khoa học Đại học Cửu Long*. 2018;10: 90–96. [Le Bích Tuyen,

- Huynh Kim Yen. Isolation of some trophic marine microalgae lines capable of producing carotenoids in Ca Mau waters. *Cuu Long University Journal of Sciences*. 2018;10: 90–96].
- [11] Nguyễn Thị Hoài Hà, Phạm Thị Bích Đào, Nguyễn Đình Tuấn. Đặc điểm phân loại mười chủng vi tảo biển dị dưỡng Thraustochytrids ở rừng ngập mặn xuân thủy, Nam Định. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2016;14(2): 377–384. [Nguyễn Thị Hoài Hà, Phạm Thị Bích Đào, Nguyễn Đình Tuấn. Taxonomic characterization of ten Thraustochytrids strains isolated from mangrove Xuan Thuy, Nam Dinh. *Journal of Biotechnology*. 2016;14(2): 377–384].
- [12] Zhao X. Analysis of the biosynthetic process of fatty acids in Thraustochytrids. *Biochimie*. 2018;144: 108–114.
- [13] Kaliyamoorthy K, Nambali VV, Dhassiah MP, Gopal D, Laurent D. Thraustochytrids of Mangrove Habitats from Andaman Islands: Species Diversity, PUFA Profiles and Biotechnological Potential. *Mar Drugs*. 2021;19(10): 571–582.
- [14] Arafles KHV, Alcántara JCO, Batoon JAL, Galura FS, Cordero PRF, Leano EM, et al. Cultural optimization of Thraustochytrids for biomass and fatty and production. *Mycosphere*. 2011;2(5): 521–531.
- [15] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [16] Taha AIBHM, Kimoto T, Kanada T, Okuyama H. Growth optimization of thraustochytrid strain 12B for the commercial production of docosahexaenoic acid. *Food Sci. Biotechnol*. 2013;22: 53–58.
- [17] Strickland JDH, Parsons TR. *A practical handbook of seawater analysis*. 2nd ed. Canada: Fisheries Research Board of Canada. 1972: 1–311.
- [18] Jorgensen K, Skibsted LH. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *International Journal of Food Research and Technology [Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung]*. 1993;196(5): 423–429.
- [19] Lewis TE, Nichols PD, McMeekin TA. The biotechnological potential of Thraustochytrids. *Mar Biotechnol*. 1999;1: 580–587.
- [20] Li E, Mira de Orduña R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;50(3):283–8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x.
- [21] Lu L, Yang G, Zhu B, Pan K. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 2017;46(11): 2265–2272.
- [22] Santos-Ballardo DU, Rossi S, Hernández V, Gómez RV, del Carmen Rendón-Unceta M, Caro-Corrales J, et al. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*. 2015;448: 87–92.

