

# Nghiên cứu thử nghiệm nuôi tảo *Chaetoceros calcitrans* trong hệ thống quang sinh vận hành bằng khí

Nguyễn Đức Bách<sup>1,2\*</sup>, Phạm Tài Minh<sup>3</sup>, Vũ Lê Diệu Hương<sup>2</sup>, Phí Thị Cẩm Miện<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Vi tảo và Dược mỹ phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Sở Khoa học và Công nghệ Nam Định

Ngày nhận bài 19/7/2021; ngày chuyển phản biện 22/7/2021; ngày nhận phản biện 18/8/2021; ngày chấp nhận đăng 23/8/2021

## Tóm tắt:

*Chaetoceros calcitrans* là loài tảo silic nước mặn, kích thước nhỏ, có hàm lượng dinh dưỡng cao, được sử dụng phổ biến làm nguồn thức ăn cho ấu trùng các loài thủy sản. Ở Việt Nam, tảo *C. calcitrans* được nhân giống từ các bình nhỏ, sau đó nâng dần thể tích nuôi tới các bể hồ lớn. Mặc dù tảo *C. calcitrans* được nuôi ở nhiều cơ sở sản xuất giống thủy sản nhưng quá trình nuôi vẫn gặp nhiều khó khăn, như tảo phát triển không ổn định, mật độ thấp hoặc dễ bị tàn lụi, nguyên nhân do tạp nhiễm, chất lượng giống ban đầu không đồng đều, khuấy trộn khí chưa hiệu quả và nhiệt độ không ổn định. Nghiên cứu này thử nghiệm hệ thống quang sinh vận hành bằng khí đẩy (Air-lift photobioreactor - ALPBR) để nhân giống *C. calcitrans*. Hệ thống ALPBR được lắp đặt bằng các ống thủy tinh có đường kính 32 mm và tổng chiều dài 18 m, thể tích 14,5 l. Điều kiện vận hành của hệ thống ở mật độ tiếp giống  $0,5-0,75 \times 10^6$  tế bào/ml, tốc độ dòng 40 cm/giây và cường độ ánh sáng 12,5 klux ở nhiệt độ 26-28°C. Mật độ tảo *C. calcitrans* đạt cao nhất ở mức  $7,65 \times 10^6$  tế bào/ml. Kết quả thử nghiệm ban đầu cho thấy có thể áp dụng hệ thống ALPBR để nhân giống và sinh khối tảo *C. calcitrans* làm thức ăn cho nuôi trồng thủy sản.

**Từ khóa:** *Chaetoceros calcitrans*, cường độ ánh sáng, hệ thống quang sinh vận hành bằng khí, ôxy hoà tan, tốc độ dòng chảy.

**Chỉ số phân loại:** 4.6

## Đặt vấn đề

Tảo *C. calcitrans* thuộc nhóm tảo silic, tế bào có kích thước nhỏ, sinh trưởng nhanh, hàm lượng dinh dưỡng cao, đặc biệt chứa axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) [1, 2]. Chính vì vậy, tảo *C. calcitrans* được nuôi phổ biến để làm thức ăn cho ấu trùng thủy sản, đặc biệt là nhóm giáp xác và nhuyễn thể [3, 4]. Về mặt hình thái, tế bào tảo *C. calcitrans* có kích thước nhỏ (2-8  $\mu$ m), dạng hình hộp lồng, tế bào hình vuông hoặc chữ nhật ở 4 góc có 2 cặp gai (seta) tương đối dài [5]. Các nghiên cứu về *C. calcitrans* và *C. muelleri* ở Việt Nam tập trung vào phân lập và xác định ảnh hưởng của môi trường, các điều kiện nuôi đến sự sinh trưởng của tảo [3-7]. Thực tế, tảo giống *C. calcitrans* thường được nuôi trong các môi trường lỏng như F/2, Walne hoặc Conway sử dụng các bình nhựa hay thủy tinh nhỏ, sau đó được nhân tiếp trong các bình lớn hơn (từ 5 đến 10 l) trong phòng thí nghiệm hoặc phòng mát 20-28°C, sử dụng ánh sáng trắng, cường độ từ 2 đến 5 klux và sục khí với mật độ đạt được dao động từ  $10^6$  đến  $5 \times 10^6$  tế bào/ml [3-7]. Hiện nay ở Việt Nam, các cơ sở nhân giống thủy sản quy mô vừa và nhỏ thường nhân tảo giống trong phòng, sau đó tiếp tục nuôi trong các túi nylon, bình, xô nhựa lớn (thể tích từ 30 đến 100 l), cuối cùng sẽ nhân sinh khối trong các bể lớn thể tích 2-10 m<sup>3</sup> hoặc lớn hơn, đặt ngoài trời dưới mái che chắn sáng bằng lưới nylon đen hoặc nuôi trong nhà để làm thức ăn tươi cho ấu trùng.

\*Tác giả liên hệ: Email: ndbach@vnua.edu.vn

Mặc dù quá trình nuôi tảo *Chaetoceros* sp. trong nước hiện nay đã đạt được nhiều kết quả [3-8]. Tuy nhiên, khi khảo sát thực tế tại các trại, cơ sở sản xuất giống thủy sản ở Nam Định, Ninh Bình, Hà Nam, Hải Phòng vẫn thường gặp một số vấn đề khó khăn như chưa chủ động được nguồn giống ban đầu, mức độ tạp nhiễm tăng dần theo thời gian, quy trình nuôi chưa ổn định, các điều kiện nuôi như nhiệt độ, ánh sáng và khuấy trộn (sục khí) chưa được chuẩn hoá nên tảo sinh trưởng chậm, mật độ nuôi sinh khối còn thấp hơn nhiều so với khi nuôi trong phòng. Hiện tượng tảo bị tàn lụi đột ngột hoặc mật độ thấp vẫn thường xảy ra nên chưa đáp ứng được nhu cầu thức ăn cho ấu trùng, dẫn đến thiệt hại kinh tế và công sức cho người làm giống. Do đó, cần thực hiện các nghiên cứu và thử nghiệm để tìm ra giải pháp kỹ thuật và mô hình nuôi mới, nhằm ổn định quy trình nuôi, nâng cao mật độ, độ đồng đều và chất lượng sinh khối tảo.

Đến nay, nhiều hình thức nuôi tảo sử dụng túi polyetylen, bình polycarbonate, bể raceway hoặc các hệ thống quang sinh (Photobioreactor - PBR) dạng cột (bubble column) hoặc dạng ống (tubular PBR) được sục khí hoặc đẩy bằng bọt khí để khuấy trộn hay tạo dòng chảy để làm thức ăn cho thủy sản [9, 10]. Trong đó, hệ thống PBR đã được nghiên cứu và thử nghiệm ở các quy mô khác nhau tại nhiều quốc gia trên thế giới [11-15]. Mặc dù chi phí lắp đặt tương đối cao

## A cultivation trial of *Chaetoceros calcitrans* in an air-lift photobioreactor

Duc Bach Nguyen<sup>1,2\*</sup>, Tai Minh Pham<sup>3</sup>,  
Le Dieu Huong Vu<sup>2</sup>, Thi Cam Mien Phi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology,

Vietnam National University of Agriculture

<sup>2</sup>Institute for Microalgae and Pharmacocosmetics,

Vietnam National University of Agriculture

<sup>3</sup>Nam Dinh Department of Science and Technology

Received 19 July 2021; accepted 23 August 2021

### Abstract:

*Chaetoceros calcitrans* is a marine planktonic diatom with small-sized and high-nutrient commonly used as a feed for larvae of aquatic species. In Vietnam, *C. calcitrans* is often cultivated from small vessels and subsequently gradually increased the culture volume to large open tanks. Although *C. calcitrans* is widely cultured in aquaculture hatcheries, the cultivation process is still facing many difficulties such as unstable growth, low density or collapse due to the high risk of contamination, low quality of seeding, insufficient mixing or aeration and the control of ambient conditions. This study investigated the airlift photobioreactor systems (ALPBR) for seedling cultivation of *C. calcitrans*. The ALPBR was constructed by using transparent glass tubes with a diameter of 32 mm, a total length of 18 m, and volume 14.5 l. The system was optimally operated at an inoculation of  $0.5-0.75 \times 10^6$  cell.ml<sup>-1</sup>, the flow rate at 40 cm.s<sup>-1</sup> and the solar light intensity at 12.5 klux at a temperature of 26-28°C. The highest cell density was at  $7.65 \times 10^6$  cells. ml<sup>-1</sup>. The obtained results may develop a model scale-up for algae seeding and biomass production as feed for aquaculture.

**Keywords:** air-lift photobioreactor, *Chaetoceros calcitrans*, dissolved oxygen, flow rates, light intensity.

**Classification number:** 4.6

và vận hành phức tạp nhưng các hệ thống PBR có nhiều ưu điểm như rút ngắn thời gian sinh trưởng của tảo do tận dụng ánh sáng tối đa, mật độ tảo cao hơn các hệ thống nuôi khác và giảm nguy cơ tạp nhiễm [16-18]. Các hệ thống PBR vận hành bằng bơm ly tâm thường gây áp lực, stress cho tảo trong đường ống, có thể làm gãy roi, hư hại tế bào và ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo [19-21]. Tuy nhiên, hệ thống ALPBR sử dụng khí nén sẽ tạo bọt để đẩy dòng chảy giúp hệ thống vận hành một cách nhẹ nhàng, giảm áp lực và tác động cơ học lên tảo, do đó phù hợp với các loài tảo có lông roi như *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*

[19-21]. Hệ thống ALPBR về cơ bản được thiết kế tương tự như các hệ thống PBR dạng ống kín và tuần hoàn, tuy nhiên thay vì sử dụng bơm đẩy/hút để huyền phù vi tảo di chuyển trong các ống thủy tinh thì sử dụng khí qua bộ phận tạo bọt để làm giảm áp suất cục bộ tại vị trí đưa khí vào trong lòng ống. Việc tạo áp suất giảm cục bộ sẽ tạo lực kéo làm cho dòng huyền phù vi tảo di chuyển, đồng thời không gây áp lực cơ học lên đường ống cũng như vi tảo, do đó phù hợp đối với các loài tảo có lông roi hoặc mẫn cảm với các tác động cơ học. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng hệ thống ALPBR để nhân giống và sinh khối vi tảo [19-21].

Việc mở rộng diện tích nuôi trồng thủy sản dẫn đến nhu cầu nguồn thức ăn cho con giống thủy sản sẽ ngày càng tăng, chính vì vậy việc nghiên cứu phát triển các mô hình nuôi tảo khép kín, trong đó có đó hệ thống ALPBR để nhân giống và sản xuất sinh khối vi tảo ở quy mô lớn là nhu cầu của thực tiễn. Đến nay, việc nghiên cứu và ứng dụng hệ thống ALPBR ở Việt Nam còn hạn chế, do đó với mục tiêu phát triển hệ thống nuôi tảo theo mô hình ALPBR, nghiên cứu này đã thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự sinh trưởng của tảo *C. calcitrans* trong hệ thống ALPBR ở quy mô thí nghiệm, bao gồm tốc độ dòng chảy, cường độ ánh sáng, nồng độ oxy hoà tan (DO). Nghiên cứu tạo cơ sở ban đầu để áp dụng lắp đặt các hệ thống nhân giống tảo khép kín liên tục hoặc bán liên tục ở quy lớn nhằm khắc phục nhược điểm của các hệ thống nuôi hở theo mô hình hiện nay, hướng tới chủ động sản xuất tảo giống và sinh khối cho các cơ sở sản xuất giống thủy sản.

### Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

#### Vật liệu

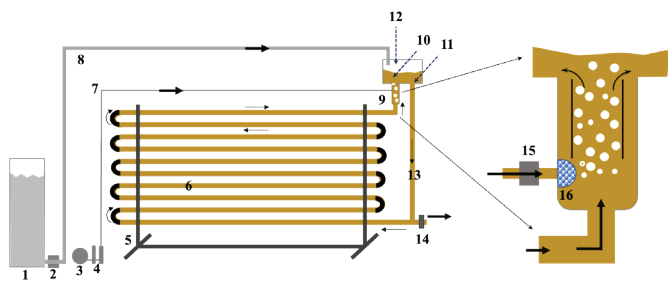
**Chủng giống:** Tảo *C. calcitrans* (Paulsen) Tanako 1968 từ Đại học Tsukuba Nhật Bản với mã chủng CCMP1315 được lưu giữ trong môi trường thạch bán lỏng (4% agar) trong môi trường Erdscheiber cải tiến [22, 23].

**Môi trường bảo quản chủng giống:** Môi trường Erdscheiber cải tiến với các thành phần (mg/l): NaNO<sub>3</sub> (196,35), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (17,69), CaCO<sub>3</sub> (0,00025), FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (2,35), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,432), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,264), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,048), NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,003), Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (12), vitamin B<sub>12</sub> (0,00113), pH 7,5 [22]. Môi trường được bổ sung 50 ml dịch chiết đất/l. Dịch chiết đất được chuẩn bị bằng cách lấy 200 g đất khô nghiền thành bột và khuấy đều với 1 l nước cất, sau đó được lọc và hấp vô trùng. Môi trường bán lỏng được bổ sung 4 g agar/l và vô trùng ở 121°C trong 30 phút. Môi trường được bảo quản trong tối ở nhiệt độ 4°C cho tới khi sử dụng (vitamin B<sub>12</sub> bổ sung ngay trước khi dùng). Tảo được giữ ở nhiệt độ 15-17°C, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang 18 W Rạng Đông (Model: FL T8-18W Deluxe) ở cường độ 700 lux theo chu kỳ sáng tối 16/8.

**Môi trường nuôi lỏng:** Môi trường Conway cải tiến được sử dụng cho hệ thống ALPBR gồm các thành phần (g/l):  $\text{KNO}_3$  (100),  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (20),  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (45),  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,3),  $\text{ZnCl}_2$  (4,2),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,36),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (4,0),  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (4,0),  $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,8),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (33,4), Thiamin HCl (0,2), Cyanocobalamin/ $\text{B}_{12}$  (0,01), pH 7,5 [23]. Muối biển nhân tạo ORiTA (ORiTA Salt, Aquaculture™) bổ sung với hàm lượng 25 g/l, muối silicate  $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  được bổ sung vào với hàm lượng 30 mg/l. Để loại bỏ các yếu tố tạp nhiễm, môi trường Conway sau khi pha được bổ sung chlorine  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  ở nồng độ 20 ppm trong 120 phút sau đó trung hoà bằng  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  20 ppm. Môi trường sau đó được cho chảy qua lớp bông lọc và chứa vào bình để sử dụng.

**Đèn LED và chế độ chiếu sáng:** Trong nghiên cứu này, đèn LED T8 Deluxe 22 W 1,2 m, bóng thủy tinh, nguồn rời (Model: BD TT01 NR M11/22Wx1, độ sáng 2500 lm, nhiệt độ màu 5000 K) của Công ty Cổ phần bóng đèn phích nước Rạng Đông được sử dụng để chiếu sáng cho tảo trong phòng thí nghiệm. Thời gian chiếu sáng 16:8 và cường độ chiếu sáng được sử dụng từ 2 klux ở giai đoạn mới tiếp giống và được điều chỉnh tăng lên 5 klux sau 3 ngày tính từ thời điểm tiếp giống. Đối với hệ thống ALPBR, sử dụng ánh sáng tự nhiên, cường độ ánh sáng được điều tiết bằng lưới chắn sáng.

**Thiết kế và vận hành hệ thống ALPBR:** Hệ thống được thiết kế và lắp đặt dựa trên cơ sở tham khảo nhiều công bố nước ngoài [24, 25]. Khung của hệ thống được thiết kế bằng kim loại có chiều dài 195 cm, rộng 110 cm để đỡ các ống thủy tinh. Mô hình thí nghiệm gồm 10 ống thủy tinh dài 1200 mm, đường kính trong 32 mm, độ dày 0,5 mm được nối với nhau bằng nút nhựa PVC với 2 đầu cuối được đặt trong bể chứa bằng nhựa lắp đặt cao hơn so với ống ở trên cùng 200 mm. Chiều dài toàn bộ đường ống 18 m và tổng thể tích của hệ thống đạt 14,5 l. Hệ thống được vận hành bằng khí nén (Pegasus TM-OF600-25L) điều chỉnh bằng van điều áp. Sơ đồ cấu tạo và nguyên lý hoạt động của hệ thống được trình bày ở hình 1.



**Hình 1. Sơ đồ lắp đặt và vận hành hệ thống ALPBR.**

Ghi chú: (1) Bình chứa môi trường nuôi tảo; (2) Bơm ly tâm đẩy môi trường; (3) Máy nén khí; (4) Cột lọc khí; (5) Giá đỡ hệ thống quang sinh; (6) Ống thủy tinh đường kính 32 mm; (7) Ống dẫn khí; (8) Ống dẫn môi trường nuôi tảo; (9) Bộ phận trộn khí và lát cắt ngang được phóng to; (10) Vị trí đầu ra của dòng chảy; (11) Vị trí đầu vào của dòng chảy; (12) Bể xả khí; (13) Ống dẫn xuống; (14) Vị trí mở lấy tảo ra khỏi hệ thống sử dụng trong trường hợp nuôi bán liên tục; (15) Van khí 1 chiều; (16) Bộ phận tạo bọt khí. Chiều mũi tên thể hiện chiều dòng chảy hoặc đường đi của dòng khí.

### Phương pháp nghiên cứu

Khí đẩy sau khi đi qua màng lọc được dẫn vào bộ phận tạo bọt khí để đẩy dòng chất lỏng hướng lên trên đi vào bể chứa. Bể chứa có tác dụng xả khí ôxy và kết nối giữa phần đầu vào và đầu ra của hệ thống tạo vòng khép kín. Toàn bộ hệ thống được đặt trong nhà lưới có mái che và lưới đen để chắn sáng, nhiệt độ được điều tiết bằng phun hơi nước. Cường độ ánh sáng được điều chỉnh bằng cách sử dụng lưới che chắn sáng trong phạm vi từ 2,5 đến 20 klux. Trong điều kiện nuôi ở nhà lưới, cường độ ánh sáng trung bình ở giai đoạn 2 ngày đầu tiên từ khi bắt tiếp giống ở mật độ 0,5 triệu tế bào/ml được điều chỉnh trung bình khoảng 3-4 klux [5, 6]. Từ ngày thứ 3 sau khi tiếp giống, khi mật độ tế bào tăng lên, cường độ ánh sáng được điều chỉnh bằng lưới che ở mức tối đa 20 klux.

**Xác định mật độ của tảo:** Mật độ tế bào được xác định bằng buồng đếm Improved Neubauer. Mật độ được tính theo công thức:  $C = (5N_i + 1/2N_o) \times 5 \times 201 \times 10^4$  (tế bào/ml). Trong đó, C là mật độ tế bào/ml;  $N_i$  là tổng số tế bào trong 5 ô lớn của buồng đếm (không tính những tế bào dính vào phần biên ngoài);  $N_o$  là số lượng tế bào ở 4 cạnh của 5 ô lớn [26].

**Đồ thị tương quan giữa mật độ tế bào và mật độ quang học  $A_{680}$ :** Để đánh giá tốc độ sinh trưởng của tảo, đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ quang học ở bước sóng 680 nm ( $A_{680}$ ) và mật độ tế bào được xây dựng [27]. Cụ thể, huyền phù tảo ở các mức độ pha loãng khác nhau được đồng thời đếm tế bào và đo độ hấp thụ quang học  $A_{680}$  trong khoảng từ 0,2 đến 0,8 để xây dựng đồ thị tương quan bằng phần mềm Excel.

**Xác định tốc độ sinh trưởng riêng ( $\mu$ ):** Được xác định ở pha sinh trưởng logarit theo công thức sau:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

trong đó:  $N_2$  và  $N_1$  là mật độ tế bào ở thời điểm  $t_2$  và  $t_1$ ; t là thời gian (ngày). Thời gian nhân đôi hay thời gian thế hệ (doubling time)  $T_d = \ln(2)/\mu$  (ngày).

**Xác định mối tương quan giữa lưu lượng khí và tốc độ dòng chảy trong hệ thống:** Để xác định tốc độ dòng chảy phù hợp trong quá trình nuôi tảo, đồ thị tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí được xây dựng. Tốc độ dòng chảy được xác định thông qua cách đo độ dẫn điện dùng nước khử ion để chạy trong hệ thống và dung dịch NaCl bão hoà (360 g/l hay 6,15 M) được dùng làm chất đánh dấu [28]. Độ dẫn điện được đo liên tục bằng máy đo độ dẫn điện (Hanna Instruments HI93301-02, điện cực EC HI7630, Rumani). Khi hệ thống chạy ổn định ở một lưu lượng khí nhất định, điện cực của máy đo độ dẫn điện được đặt ở phần đầu ra bộ tách khí lỏng để đo độ dẫn điện, sau khi giá trị đo với nước khử ion trong hệ thống ổn định, 10 ml

dung dịch NaCl bão hoà được bơm vào đầu vào của hệ thống và giá trị độ dẫn điện được đo liên tục. Khoảng thời gian ( $Dt=T_0-T_1$ ) được tính từ thời điểm NaCl bão hoà ( $T_0$ ) được bổ sung ở vị trí đầu vào của hệ thống cho tới khi xác định được độ dẫn điện cực đại tại đỉnh ( $T_1$ ). Khoảng thời gian dòng chất lỏng đi qua hết chiều dài đường ống được gọi là thời gian chạy 1 vòng hay chu kỳ. Quá trình đo được lặp lại ít nhất 3 lần để thu được giá trị ổn định ở mỗi lưu lượng khí đẩy vào hệ thống.

**Xác định nồng độ oxy hoà tan trong ống:** Nồng độ oxy hoà tan (DO, mg/l) được đo bằng máy đo DO (Hana instruments HI98193, điện cực DO HI764073). Nồng độ DO tạo ra do quang hợp được xác định trong điều kiện chiếu sáng bằng ánh sáng tự nhiên trong nhà lưới với các cường độ từ 2,5 đến 20 klux (tương đương 135 đến 1080  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) [29]. Nhiệt độ tại thời điểm thí nghiệm dao động điều chỉnh trong phạm vi 26-28°C sử dụng lưới đen và phun hơi nước làm mát.

**Xác định mối tương quan giữa cường độ ánh sáng và nồng độ DO:** 4 mức cường độ ánh sáng khác nhau từ 2,5 đến 20 klux được sử dụng trong quá trình nuôi tảo. Cường độ ánh sáng được đo bằng máy Milwaukee, Rumani-Eu, MW700. Nhiệt độ nuôi hệ thống đặt nhà lưới được kiểm soát trong phạm vi 26 đến 28°C. Mẫu tảo được lấy ra đo độ hấp thụ quang ở  $A_{680}$  nm sau mỗi ngày nuôi [27].

**Xác định mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO:** Nồng độ DO tích lũy trong quá trình quang hợp (oxygen evolution) tương ứng ở mỗi tốc độ dòng chảy tại một giá trị cường độ ánh sáng nhất định được xác định bằng cách đo trực tiếp tại đầu ra của hệ thống.

**Xác định mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và tốc độ sinh trưởng của tảo:** Tốc độ sinh trưởng của tảo ở các tốc độ dòng chảy khác nhau được xác định dựa vào giá trị  $A_{680}$ . Đồ thị tương quan giữa tốc độ sinh trưởng riêng ( $\mu$ ) và tốc độ dòng chảy (v) được xây dựng tại cường độ ánh sáng tối ưu, tại đó nồng độ oxy sinh ra trong quang hợp là lớn nhất.

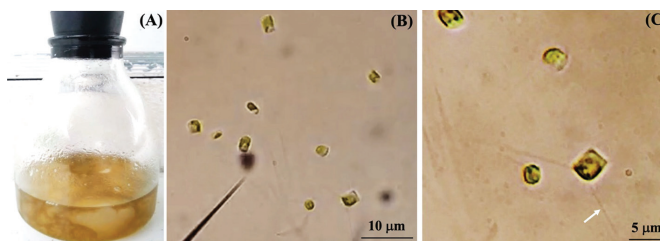
**Phân tích số liệu:** Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Chương trình Microsoft Excel (2016)

được sử dụng để vẽ các đồ thị. Các giá trị đo ở các thí nghiệm được kiểm tra phân phối chuẩn dựa vào đánh giá hàm mật độ có tính đối xứng qua giá trị trung bình và trung vị. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được xác định bằng phân tích phương sai (ANOVA) với mức ý nghĩa  $p=0,05$ . Hậu kiểm (Tukey's test) được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa cặp các giá trị trung bình trong các công thức thí nghiệm.

## Kết quả và bàn luận

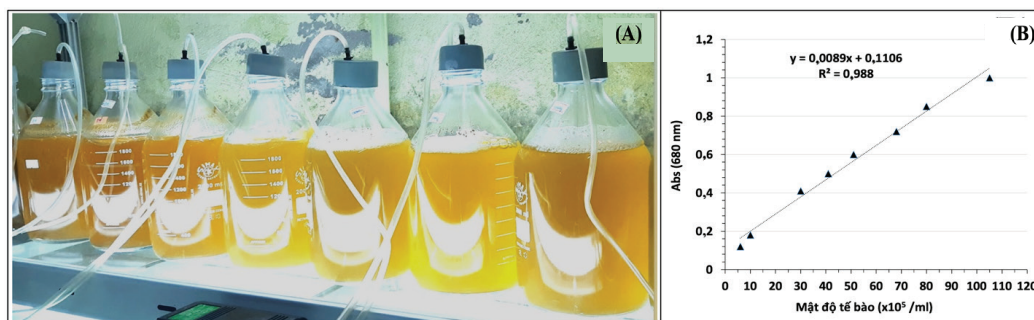
### Nhân giống tảo

Tảo *C. calcitrans* được giữ trong môi trường thạch bán lỏng ở nhiệt độ 15°C được nhân từng bước trong môi trường Erdschreiber, tế bào tồn tại chủ yếu ở dạng hợp chữ nhật có kích thước 3×5 mm và có 4 roi (gai) đặc trưng tại 4 góc của tế bào (hình 2A). Hình 2B và 2C thể hiện hình thái tế bào tảo chụp ở độ khuếch đại 100X và 400X. Mũi tên trắng chỉ roi ở góc tế bào.



Hình 2. Giống tảo *C. calcitrans* sử dụng trong nghiên cứu.

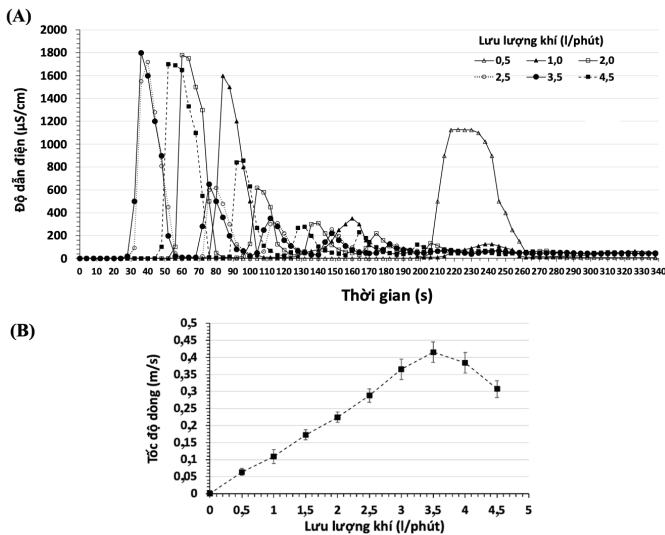
Quá trình nhân tảo *C. calcitrans* được thực hiện bằng cách san giống và bổ sung môi trường Erdschreiber lỏng cải tiến theo tỷ lệ 1:3 (thể tích giống/môi trường). Trong điều kiện phòng thí nghiệm, khi mới san giống, tảo được chiếu sáng ở cường độ 3-5 klux. Sau 3 ngày, tảo được chiếu sáng ở cường độ 5 klux bằng đèn huỳnh quang cả phía trên và dưới các bình nuôi (hình 3A). Mật độ tảo đạt cực đại sau 8 ngày nuôi ở mức  $4,2 \times 10^6$  tế bào/ml. Mối tương quan giữa mật độ tế bào và độ hấp thụ quang học tại bước sóng 680 nm được thể hiện ở hình 3B.



Hình 3. Nhân giống tảo *C. calcitrans* trong phòng thí nghiệm.

**Xác định tốc độ dòng chảy**

Tốc độ dòng chảy trong lòng ống phụ thuộc vào tốc độ hay lưu lượng dòng khí được đẩy vào trong hệ thống ALPBR. Trong nghiên cứu này, các mức độ lưu lượng khí được thử nghiệm, cho thấy, ở lưu lượng khí đẩy vào thấp hơn 0,3 l/phút không đủ khả năng tạo lực nâng đủ để đẩy dung dịch bên trong ống vào bình xả khí, do đó gần như không có dòng chảy bên trong lòng ống. Bằng cách đo độ dẫn điện khi sử dụng dung dịch NaCl bão hoà, ở mức lưu lượng khí từ 0,5 l/phút, thời gian cho 1 chu kỳ dòng chảy (giá trị cao nhất của độ dẫn điện) tại đầu ra của hệ thống là 230 giây (3,83 phút) với tốc độ dòng chảy đạt khoảng 6,3 cm/giây (hình 4A). Khi tăng dần lưu lượng khí đẩy vào trong hệ thống, tốc độ dòng chảy tăng nhanh. Kết quả phân tích cho thấy, khi tăng lưu lượng khí đẩy vào hệ thống ở các mức từ 1,0, 2,0, 2,5 và 3,5 l/phút, các đỉnh có độ dẫn điện tương ứng theo thời gian quy đổi tương đương 84, 60, 40, 36 giây (hình 4A). Khi tiếp tục tăng lưu lượng khí đến 4,0 l/phút, tốc độ dòng chảy trong ống giảm và thời gian cho 1 chu kỳ chạy toàn bộ hệ thống khoảng 47 giây. Nguyên nhân là do lượng bọt khí và kích thước bọt khí tạo ra quá nhiều, dẫn đến hiệu quả nâng dòng chảy vào bể thoát khí kém hiệu quả. Ở lưu lượng khí 3,5 lít/phút, tốc độ dòng chảy trong hệ thống đạt mức cao nhất khoảng 0,45 m/s (hình 4B). Thực tế lưu lượng khí đưa vào hệ thống ALPBR cũng đã được nhiều nhóm nghiên cứu thử nghiệm [30, 31], điển hình khi nghiên cứu nuôi tảo *Scenedesmus obliquus* (CCAP 276/3A), A. Massart và cs (2014) [32] đã khảo sát các mức lưu lượng khí đưa vào hệ thống từ 0,5 đến 7,0 l/phút ảnh hưởng đến năng suất sinh khối, mật độ tế bào, tốc độ sinh trưởng riêng. Bằng cách sử dụng dung dịch NaCl làm chất đánh dấu đã xác định được mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí đẩy vào trong hệ thống.

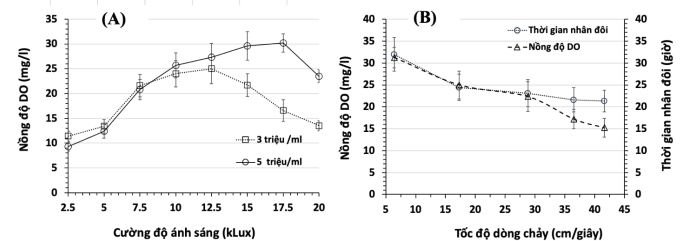


**Hình 4. Mối tương quan giữa tốc độ dòng chảy và lưu lượng khí đẩy.** (A) Động học dòng chảy thông qua đo độ dẫn điện theo thời gian; (B) Tương quan lưu lượng khí và tốc độ dòng chảy trong hệ thống ALPBR.

**Xác định các đặc điểm sinh trưởng của tảo trong hệ thống ALPBR**

Trong quá trình quang hợp, oxy sẽ được giải phóng và hoà tan vào trong huyền phù tảo. Do đó, nồng độ DO sẽ tỷ lệ với cường độ quang hợp và trạng thái sinh lý của tảo. Trong nghiên cứu này, các mức cường độ ánh sáng từ 2,5 đến 20 klux được thử nghiệm để đánh giá khả năng quang hợp của tảo trong hệ thống ALPBR. Kết quả cho thấy, ở mật độ  $3,0 \times 10^6$  tế bào/ml giá trị DO cao nhất đo được ở cường độ ánh sáng 12,5 klux (25,4 mg/l) và thấp nhất ở 2,5 klux (12,2 mg/l). Khi tăng cường độ ánh sáng vượt mức 15 klux, giá trị DO đo được giảm (hình 5A). Ở mật độ  $5,0 \times 10^6$  tế bào/ml, cường độ ánh sáng cho giá trị DO cao nhất ở mức 17,5 klux đạt 30,2 mg/l (hình 5A). Các nghiên cứu cho thấy, nồng độ DO liên quan trực tiếp tới mật độ tảo vì ảnh hưởng bởi mức độ che khuất ánh sáng tạo ra khi mật độ tảo tăng lên, đồng thời tốc độ dòng chảy trong ống cũng là một yếu tố quyết định [15, 33].

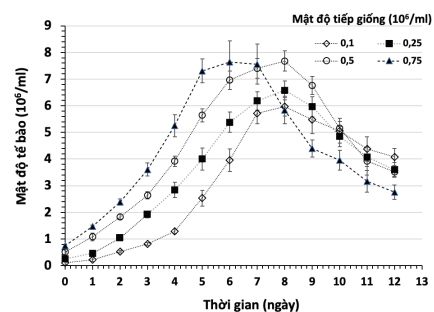
Trong điều kiện thí nghiệm, tảo sinh trưởng tốt nhất ở tốc độ dòng chảy 36,5 đến 41,6 cm/giây và cường độ ánh sáng (phụ thuộc vào mật độ tảo), tuy nhiên ở ngưỡng 12,5 đến 15,0 klux là phù hợp vì đường kính của ống thủy tinh sử dụng trong nghiên cứu có đường kính 32 mm cho phép ánh sáng đi qua tất cả các chiều ngay cả khi tảo ở mật độ cao  $7 \times 10^6$  tế bào/ml. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, hệ thống được lắp đặt bằng cách gắn các ống thủy tinh sử dụng các nút nối bằng nhựa PVC, do đó quá trình quang hợp vẫn bị ngắt quãng một phần bởi các vị trí nối ống, vì vậy thời gian tiếp xúc với ánh sáng bị mất đi một phần (khoảng 17,85%, tổng chiều dài 14,5 m đường ống có 2,5 m bị che khuất bằng ống PVC). Trong trường hợp toàn bộ đường ống được làm bằng thủy tinh (kể cả các đầu nối) thì cường độ ánh sáng tối ưu sẽ thay đổi. Tuy nhiên, đối với hệ thống sử dụng trong nghiên cứu này, cường độ ánh sáng tối ưu dao động trong phạm vi từ 12,5 đến 15,0 klux. Khi cường độ ánh sáng cao hơn (15 đến 20 klux), tốc độ sinh trưởng của tảo giảm mạnh do hiệu ứng ức chế quang hợp bởi cường độ ánh sáng quá cao (hình 5A). Một số nghiên cứu cho thấy, tảo có khả năng phục hồi sau khi giảm cường độ ánh sáng về mức tối ưu, tuy nhiên khả năng phục hồi sau khi bị ức chế phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc với cường độ ánh sáng cao [14, 16].



**Hình 5. Mối liên hệ giữa các yếu tố liên quan đến sự sinh trưởng của tảo.** (A) Tương quan giữa cường độ ánh sáng và nồng độ DO đo ở 2 mức mật độ 3 và 5 triệu tế bào/ml; (B) Tương quan giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO với tốc độ dòng chảy được xác định ở mật độ  $5,0 \times 10^6$  tế bào/ml, cường độ chiếu sáng 12,5 klux; tương quan giữa tốc độ dòng chảy và thời gian (thể hệ) nhân đôi của tế bào được xác định ở mật độ tiếp giống  $0,5 \times 10^6$  tế bào/ml, cường độ chiếu sáng 12,5 klux.

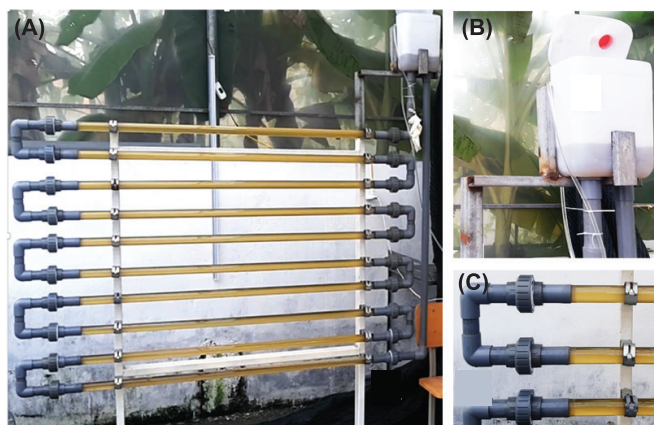
Nghiên cứu ảnh hưởng giữa tốc độ dòng chảy và nồng độ DO cho thấy, tốc độ dòng chảy tỷ lệ nghịch với nồng độ DO. Ở tốc độ dòng chảy thấp 6,4 cm/giây giá trị DO đo được ở mức 31,25 mg/l (tại mật độ tảo  $5 \times 10^6$  tế bào/ml và cường độ ánh sáng 12,5 klux), tuy nhiên khi tăng tốc độ dòng chảy lên khoảng 40 cm/giây, nồng độ DO giảm còn 15,23 mg/l (hình 5B). Mặc dù thời gian và ngưỡng chịu đựng nồng độ DO của tảo *C. calcitrans* trong hệ thống PBR vẫn chưa được đề cập một cách cụ thể, nhưng một số nghiên cứu cho thấy, khi lượng oxy vượt quá 35 mg/l sẽ gây độc cho hầu hết các loài tảo [34, 35] và nồng độ DO cao hơn 300% mức bão hoà trong không khí (mức bão hoà DO trong không khí khoảng 8 mg/l) sẽ ức chế quang hợp và sinh trưởng của tảo [27]. Ngoài ra, tỷ lệ  $CO_2$  và oxy cũng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme Rubisco (Ribulose-1, 5-diphosphate carboxylase oxygenase) liên quan đến khả năng cố định  $CO_2$  ở cả vi tảo và thực vật [36, 37]. Chính vì vậy, đối với hệ thống PBR việc loại bỏ bớt oxy khi nồng độ vượt quá cao là cần thiết vì oxy sẽ gây độc cho tảo. Ở tốc độ dòng chảy 6,4 cm/giây giá trị DO đo được ở mức 31,25 mg/l sẽ gây ức chế sự sinh trưởng của tế bào trong điều kiện ánh sáng mạnh. Tuy nhiên khi tốc độ dòng chảy đạt 40 cm/giây, nồng độ DO đo được nằm trong khoảng 15-17 mg/l, ở mức không gây ảnh hưởng đến quang hợp và gây độc tế bào (hình 5B). Kết quả này cũng tương ứng với nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ dòng chảy đến tốc độ sinh trưởng riêng (m) và thời gian nhân đôi (thế hệ) của tảo khi nuôi trong hệ thống này. Thời gian nhân đôi của tảo giảm đáng kể từ 32 giờ ở tốc độ 6,4 cm/giây xuống còn 21,3 giờ ở tốc độ 40 cm/giây (hình 5B). Từ kết quả nghiên cứu thu được, có thể suy luận rằng đối với hệ thống PBR có chiều dài đường ống lớn thì ngoài việc điều chỉnh tốc độ dòng chảy trong ống, việc loại bỏ oxy đi kèm với bổ sung  $CO_2$  sẽ làm thay đổi tỷ lệ  $CO_2$  và oxy trong ống. Nhờ đó, có thể duy trì điều kiện sinh trưởng tối ưu cho tảo trong hệ thống ALPBR khi nâng lên quy mô lớn. Ngoài ra, cần hiệu chỉnh các tham số cường độ ánh sáng nhằm tránh hoặc hạn chế hiện tượng ức chế quang hợp (photo-inhibition) và hiện tượng oxy hoá (photo-oxidation) bởi ánh sáng mạnh [33, 15].

Trên cơ sở kết quả thử nghiệm, đường cong sinh trưởng của tảo *C. calcitrans* được xây dựng với các mật độ tiếp giống từ 0,1 đến  $0,75 \times 10^6$  tế bào/ml trong điều kiện tốc độ dòng khoảng 40 cm/giây, cường độ chiếu sáng từ 12 đến 15 klux. Kết quả cho thấy, ở mật độ tiếp giống  $0,75 \times 10^6$  tế bào/ml, tảo sinh trưởng nhanh và hầu như không trải qua pha tiềm phát (pha lag) và đạt mật độ tảo tối đa ở mức  $7,65 \pm 0,75 \times 10^6$  tế bào/ml sau 7 ngày (hình 6).



**Hình 6. Đường cong sinh trưởng của tảo ở các mật độ tiếp giống khác nhau.** Các thí nghiệm được thực hiện ở trong hệ thống ALPBR đặt trong nhà lưới che mái nylon và cắt sáng bằng lưới đen. Tốc độ dòng chảy dao động trong khoảng 40 cm/giây và cường độ chiếu sáng điều tiết ở mức 12-15 klux, nhiệt độ dao động 26-29°C.

Ở các mức tiếp giống ban đầu  $0,5 \times 10^6$  và  $0,75 \times 10^6$  tế bào/ml, thời gian tảo đạt mật độ tối đa tương ứng là  $7,65 \pm 0,42 \times 10^6$  tế bào/ml sau 6 ngày và  $7,68 \pm 0,38 \times 10^6$  tế bào/ml sau 8 ngày. Không có sự sai khác có ý nghĩa về mật độ tảo cực đại ở 2 mức tiếp giống này ( $\alpha=0,05$ ), tuy nhiên xét về thời gian, mật độ tiếp giống cao hơn rút ngắn được thời gian nuôi trong hệ thống ALPBR đáng kể. Ở mức tiếp giống 0,1 và  $0,25 \times 10^6$  tế bào/ml, mật độ tối đa đạt được tương ứng  $5,96 \pm 0,53$  và  $6,58 \pm 0,38 \times 10^6$  tế bào/ml sau 8 ngày nhưng mật độ tảo cực đại thấp (hình 6). Kết quả phân tích tốc độ sinh trưởng riêng ( $\mu$ /ngày) tại thời điểm từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 trong pha sinh trưởng logarit đạt 0,254, 0,317 và 0,325, tương ứng ở các mật độ tiếp giống  $0,75 \times 10^6$ ,  $0,5 \times 10^6$  và  $0,25 \times 10^6$  tế bào/ml. Trên cơ sở phân tích quan hệ giữa mức độ tiếp giống ban đầu, tốc độ sinh trưởng riêng, thời gian đạt mật độ tối đa và mật độ tảo tối đa, mật độ tảo ban đầu  $0,5 \times 10^6$  tế bào/ml là phù hợp trong mô hình hệ thống ALPBR (hình 7). So với điều kiện nuôi trong bình thủy tinh 2 l trong phòng thí nghiệm chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang ( $4,2 \times 10^6$  tế bào/ml), mật độ tối đa của tảo nuôi trong hệ thống ALPBR cao hơn 1,7 lần.



**Hình 7. Tảo *C. calcitrans* được nuôi trong hệ thống ALPBR.** (A) Hệ thống ALPBR; (B) Bình xả khí; (C) Hình ảnh chụp khí tảo đang sinh trưởng ở mật độ  $3 \times 10^6$  tế bào/ml.

## Kết luận

Tảo *C. calcitrans* sinh trưởng tốt trong mô hình hệ thống ALPBR lắp đặt bằng các ống thủy tinh, vận hành bằng khí nén và chiếu sáng bằng ánh sáng tự nhiên. Trong phạm vi nghiên cứu này, ở mật độ tiếp giống  $0,5 \times 10^6$  tế bào/ml, cường độ ánh sáng 12-15 klux, mật độ tối đa đạt  $7,68 \pm 0,38 \times 10^6$  tế bào/ml sau 8 ngày. Kết quả nghiên cứu ban đầu này có thể tham khảo, làm cơ sở để thử nghiệm mở rộng và phát triển các hệ thống nhân giống tảo khép kín liên tục hoặc bán liên tục ở quy lớn hơn cho loài vi tảo, đặc biệt các loài có lông roi như *C. calcitrans* ở các cơ sở sản xuất giống thủy sản.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ Đề tài tiềm năng của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn giai đoạn 2020-2021. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R. Sathasivam, et al. (2017), "Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26(4)**, pp.709-722.

[2] P. Han, et al. (2019), "A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture", *Appl. Sci.*, **(9)**, DOI: 10.3390/app9112377.

[3] Nguyễn Thanh Mai và cs (2010), "Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy *in vitro* tảo silic nước mặn (*Chaetoceros calcitrans* Paulsen, 1905) và ứng dụng sinh khối tảo làm thức ăn cho tôm he chân trắng (*Penaeus vannamei*)", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, **12(13)**, tr.28-36.

[4] Tất Anh Thư và cs (2008), "Sự phát triển của tảo diatom (*Chaetoceros calcitrans*) dưới sự tương tác của đất và nước trong ao Artemia", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **10**, tr.126-134.

[5] Trần Dự Chi và cs (2003), "Bước đầu tìm hiểu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng và nhiệt độ lên sinh trưởng và quang hợp của 3 chủng vi tảo thuộc chi *Chaetoceros* phân lập được ở Việt Nam", *Tạp chí Khoa học, Đại học quốc gia Hà Nội*, **8**, tr.6-16.

[6] Nguyễn Thị Kim Dung và cs (2016), "Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng N, P, Si đến sinh trưởng của tảo *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 trong điều kiện phòng thí nghiệm", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Số chuyên đề: 55 năm Viện Nghiên cứu Hải sản*, tr.194-198.

[7] Nguyễn Thị Thu Liên và cs (2017), "Ảnh hưởng của hàm lượng chất dinh dưỡng đến sinh khối và hàm lượng lipid của chủng tảo silic nước mặn *Chaetoceros Chta*", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **15(1)**, tr.113-120.

[8] Trần Vinh Phương và cs (2017), "Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng, mật độ ban đầu đến sinh trưởng của hai loài tảo biển *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* và thử nghiệm nuôi sinh khối trong điều kiện ánh sáng tự nhiên", *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, **126(3D)**, tr.119-129.

[9] H.F. Kaspar, et al. (2016), "Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries", *Aquaculture*, **420-421**, pp.1-9.

[10] K. Lee, et al. (2013), "Chapter 3: Basic culturing and analytical measurement techniques", *Handbook of Microalgae Culture Applied Phycology and Biotechnology*, Wiley, 736pp.

[11] Đặng Diễm Hồng (2019), "Vi tảo giàu dinh dưỡng và công nghệ nuôi trồng chúng trên thế giới và ở Việt Nam", *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 750tr.

[12] Đặng Đình Kim và cs (2018), *Công nghệ sản xuất và ứng dụng vi tảo*, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 380tr.

[13] M. Placzek, et al. (2017), "Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation", *E3S Web of Conferences*, **19**, DOI: 10.1051/e3sconf/20171902032.

[14] Q. Huang, et al. (2017), "Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms", *Engineering*, **3(3)**, pp.318-329.

[15] F.G. Acién-Fernández, et al. (2013), "Photobioreactors for the production of microalgae", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **(12)**, pp.131-151.

[16] B. Wang, et al. (2012), "Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses", *Biotechnology Advances*, **30(4)**, pp.904-912.

[17] I. Dogaris, et al. (2016), "A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae", *Bioresour. Technol.*, **198**, pp.316-324.

[18] J. Pruvost, et al. (2016), "Chapter five - industrial photobioreactors and scale-up concepts", *Advances in Chemical Engineering*, **48**, pp.257-310.

[19] M.H.A. Michels, et al. (2016), "Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump", *J. Appl. Phycol.*, **28**, pp.53-62.

[20] J. Li, et al. (2014), "Design and characterization of a scalable airlift flat panel photobioreactor for microalgae cultivation", *J. Appl. Phycol.*, **27**, pp.75-86.

[21] W. Ritcharoen, et al. (2014), "Cultivation options for indoor and outdoor growth of *Chaetoceros gracilis* with airlift photobioreactors", *Maejo International Journal of Science and Technology*, **8(01)**, pp.100-113.

[22] R.A. Andersen, et al. (2005), "Appendix a - Recipes for freshwater and seawater media", *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, 592pp.

[23] J. Tompkins, et al. (1995), *Culture Collection of Algae and Protozoa Catalogue of Strains*, Ambleside, 208pp.

[24] F.G. Acién-Fernández, et al. (2001), "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance", *Chemical Engineering Science*, **56(8)**, pp.2721-2732.

[25] K.H. Mahmood, et al. (2015), "Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes", *Chemical Engineering Science*, **137**, pp.243-253.

[26] M. Zhang, et al. (2019), "Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber", *J. Clin. Lab. Anal.*, **34(1)**, DOI: 10.1002/jcla.23024.

[27] D.U. Santos-Ballardo, et al. (2015), "A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture", *Aquaculture*, **448**, pp.87-92.

[28] B.D. Fernandes, et al. (2014), "Characterization of split cylinder airlift photobioreactors for efficient microalgae cultivation", *Chemical Engineering Science*, **117**, pp.445-454.

[29] T.A. Kazbar, et al. (2019), "Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors", *Algal Research*, **39**, DOI: 10.1016/j.algal.2019.101432.

[30] N. Ding, et al. (2021), "Evaluation of an enclosed air-lift photobioreactor (ALPBR) for biomass and lipid biosynthesis of microalgal cells grown under fluid-induced shear stress", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **35(1)**, pp.139-149.

[31] X. Gao, et al. (2018), "Multiphysics simulation of algal growth in an airlift photobioreactor: Effects of fluid mixing and shear stress", *Bioresour. Technol.*, **251**, pp.75-83.

[32] A. Massart, et al. (2014), "Experimental characterization and numerical simulation of the hydrodynamics in an airlift photobioreactor for microalgae cultures", *Algal Research*, **6B**, pp.210-217.

[33] A. Richmond (2013), "Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae", *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Wiley Blackwell, Oxford, pp.171-204.

[34] A.P. Carvalho, et al. (2006), "Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances", *Biotechnol. Prog.*, **22(6)**, pp.1490-1506.

[35] J.C.G. Cañedo, et al. (2016), *Considerations for Photobioreactor Design and Operation for Mass Cultivation of Microalgae, Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*, IntechOpen, DOI: 10.5772/63069.

[36] S. Raso, et al. (2012), "Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity", *Journal of Applied Phycology*, **24(4)**, pp.863-871.

[37] F.C. Rubio, et al. (1999), "Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture", *Biotechnol. Bioeng.*, **62(1)**, pp.71-86.