

PHÂN LẬP CÁC CHỦNG VI TẢO DẦU TỪ CÁC NGUỒN NƯỚC NGỌT, NƯỚC LỢ VÀ NƯỚC MẶN

TRẦN YÊN THẢO*, ĐINH THỊ NHẤT LINH**, VÕ CHÍ SĨ***,
TRẦN NGUYỄN MỸ CHÂU****, NGUYỄN NGỌC KHẢI**, PHẠM ĐÌNH PHƯƠNG THẢO*

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã phân lập được 27 chủng vi tảo dầu từ các nguồn nước ngọt, nước lợ và nước mặn tự nhiên. Các chủng này đa dạng về hình thái, đặc điểm nuôi cấy, về trình tự gen 18S rRNA và sinh trưởng chịu ảnh hưởng của nồng độ CO₂, hàm lượng muối và N. Các chủng vừa có hàm lượng dầu cao vừa có sinh khối cao là QG-N1; QG-N14; QG-N16; QG-M2; QG-L1.

Từ khóa: vi tảo, đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy, trình tự gen 18S rRNA, hàm lượng dầu.

ABSTRACT

Isolation of lipid producing microalgae from fresh, brackish and marine water sources

We isolated 27 lipid producing strains of microalgae from various fresh, brackish and marine water sources. These strains are very diverse in morphological and cultural characteristics, 18S rRNA sequences and their growth depended on CO₂, NaCl and N content. The strains having high lipid content together with high biomass were QG-N1, QG-N14, QG-N16, QG-M2, QG-L1.

Keywords: microalgae, morphological and cultural characteristics, 18S rRNA sequences, oil content.

1. Đặt vấn đề

Vi tảo là đối tượng ngày càng được chú ý nghiên cứu phát triển công nghệ và thương mại do vi tảo là nhóm sinh vật lớn và rất đa dạng về di truyền. Sự đa dạng di truyền quy định đa dạng các đặc trưng sinh lý và hóa sinh của các chủng loài và do đó chúng sản xuất một cách tự nhiên rất nhiều sản phẩm khác nhau thuộc các nhóm protein, chất béo, hydrate carbon, các nhóm hoạt chất sinh học. Ước tính có khoảng vài triệu loài vi tảo so với khoảng 250.000 loài thực vật bậc cao, có khoảng 40.000 loài tảo đã được nhận diện và các loài mới vẫn tiếp tục được phát hiện ở tốc độ nhanh, vài loài/tuần [12]. Công nghệ sinh học vi tảo mới bắt đầu vào khoảng giữa thế kỉ XX nhưng chỉ sau khoảng 30 năm thì công nghệ công nghệ sinh học vi tảo trên thế giới

* ThS, Viện nghiên cứu cây có dầu; Email: yenthao9@gmail.com

** Kỹ sư, Viện nghiên cứu cây có dầu

*** Cử nhân, Viện nghiên cứu cây có dầu

**** ThS, Viện nghiên cứu cây có dầu

đã phát triển nhanh và rất đa dạng. Thế giới sản xuất hơn 5000 tấn sinh khối khô vi tảo/năm, đạt doanh thu sấp xỉ $1,25 \times 10^9$ đô la Mỹ (chưa tính doanh thu từ việc chế biến các sản phẩm có giá trị kinh tế từ sinh khối này). Sự phát triển này vẫn đang tiếp tục và ứng dụng của vi tảo đang mở rộng sang nhiều lĩnh vực khác hơn là chỉ sử dụng sinh khối như dầu, các acid béo bão hòa nhiều nối đôi, các vitamin, chất màu, chất chống oxy hóa ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm, năng lượng [12], [13]. Các chủng vi tảo có hàm lượng dầu cao nằm trong khoảng 20 đến 60%, đạt 24.000 - 120.000 lít dầu/ha/năm trong khi đó hàm lượng dầu của các cây có dầu thấp hơn nhiều, ví dụ cây cọ dầu là cây có năng suất dầu cao nhất, chỉ đạt được năng suất khoảng 6.000 lít/ha/năm. [13]

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập từ các nguồn nước tự nhiên bao gồm nước ngọt, nước lợ và nước mặn các chủng vi tảo sinh tổng hợp lipid, xác định đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh trưởng, các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và trình tự gen 18S rRNA.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp thu thập mẫu nước

Mẫu nước được thu thập ở nhiều địa điểm khác nhau thuộc 8 tỉnh thành là Quảng Ninh, Phú Yên, Bình Thuận, Đắk Nông, Thành phố Hồ Chí Minh (huyện Cần Giờ), An Giang, Trà Vinh và Bến Tre. Độ sâu lấy mẫu: 10 – 100 cm. Xác định độ mặn của mẫu nước bằng dụng cụ đo độ mặn ngay tại vị trí lấy mẫu.

2.2. Phương pháp phân lập các chủng vi tảo

Mẫu nước sau khi đưa về phòng thí nghiệm được tiến hành phân lập ngay, sử dụng môi trường BG11 đối với các mẫu nước ngọt, môi trường F/2B đối với các mẫu nước lợ và môi trường F/2 đối với nước mặn. Nguyên tắc chung là tách các khuẩn lạc riêng rẽ phát triển từ một tế bào.

2.3. Phương pháp xác định định tính lipid trong tế bào vi tảo

Chúng tôi sử dụng thuốc nhuộm Nile Red để nhuộm lipid trong tế bào vi tảo và phát hiện lipid bằng kính hiển vi huỳnh quang [2].

2.4. Phương pháp xác định đặc điểm hình thái

Các chủng vi tảo được cấy trong lòng môi trường hoặc cấy ria trên đĩa môi trường đặc BG11, F/2B và F/2, quan sát màu sắc, đặc điểm của khuẩn lạc. Nuôi cấy các chủng trong môi trường lỏng, quan sát tế bào bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 40X.

2.5. Phương pháp xác định sinh khối khô

Nuôi cấy các chủng vi tảo, thu sinh khối ở thời điểm cao nhất, lọc qua giấy lọc sau đó sấy khô cho đến khi trọng lượng không đổi. Cân và tính toán lượng sinh khối trong dịch nuôi cấy ban đầu.

2.6. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của CO₂ đến sinh trưởng của các chủng vi tảo

Các chủng vi tảo được nuôi cấy ở trong các đĩa giếng (96 giếng) chứa môi trường BG11, F/2B và F/2. Các đĩa giếng này được đặt vào trong túi plastic và được bơm CO₂ vào ở 2 nồng độ khác nhau (0,083 g và 0,167 g trong cùng một đơn vị thể tích túi nuôi cấy). Đối chứng là nuôi cấy trong điều kiện khí quyển bình thường. Đo OD ở bước sóng 750nm sau thời gian nuôi cấy 10 ngày đối với các chủng nước ngọt, 20 ngày đối với các chủng nước lợ và nước mặn.

2.7. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của muối đến sinh trưởng của các chủng vi tảo

Các chủng vi tảo được nuôi cấy ở trong đĩa giếng (96 giếng) chứa môi trường có các nồng độ muối (NaCl) khác nhau là 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 và 50 ‰. Đo OD ở bước sóng 750nm sau thời gian nuôi cấy 10 ngày đối với các chủng nước ngọt, 20 ngày đối với các chủng nước lợ và nước mặn.

2.8. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của nồng độ N đến sinh trưởng của các chủng vi tảo

Các chủng vi tảo được nuôi cấy ở trong đĩa giếng (96 giếng) chứa môi trường có các nồng độ N (NaNO₃) là 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 g/l; môi trường nuôi cấy là BG11, F/2B và F/2. Đo OD ở bước sóng 750nm sau thời gian nuôi cấy 10 ngày đối với các chủng nước ngọt, 20 ngày đối với các chủng nước lợ và nước mặn.

2.9. Phương pháp định lượng lipid của các chủng vi tảo

Nuôi cấy các chủng vi tảo sau đó thu sinh khối. Tách chiết lipid từ sinh khối bằng dung môi methanol và chloroform. Tính toán hàm lượng dầu có trong sinh khối vi tảo.

2.10. Phương pháp xác định thành phần acid béo

Thành phần acid béo của các chủng vi tảo được phân tích bởi Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TPHCM theo phương pháp GC-ISO/CD 5509:94.

2.11. Phương pháp xác định trình tự gen 18S rRNA

Sử dụng kit Qiagen DNA (DNeasy Plant Mini Kit) để tách chiết ADN. Đối với phản ứng PCR, sử dụng 3 cặp mồi là EukA-F, EukA-R; Euk-F, Euk-R và EukB-F và EukB-R, có kích thước theo thứ tự là 930bp, 720bp và 690bp, có trình tự (5'-3') là EukA-F: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT; EukA-R: AGACCAGCGGAAGACGAAC Euk-F: CTCGTAGTTGGATTTCCGG; Euk-R: GTGAGGATTGACAGATTGAGA;

EukB-F: AACTAAAGTCTTTGGGT; EukB-F: AACTAAAGTCTTTGGGT;

EukB-R: GTAGGTGAACCTGCAGAAGGATC.

Chu trình nhiệt: 95^oC - 5 phút, thực hiện 1 chu kỳ; 94^oC - 30s, 55^oC - 30s, 72^oC - 30s thực hiện 40 chu kỳ và 72^oC - 6 phút, thực hiện 1 chu kỳ. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, hiệu điện thế 80V trong 30 phút. Những sản phẩm PCR có vạch

được đóng gói và gửi sang Công ty Macrogene (Hàn Quốc) để giải trình tự theo phương pháp Sanger.

2.12. Phương pháp phân tích số liệu: phân tích số liệu dựa vào phần mềm Excel.

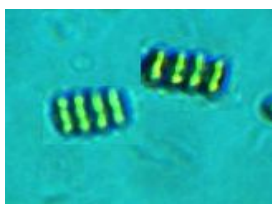
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Các chủng vi tảo dầu phân lập được trong các nguồn nước khác nhau

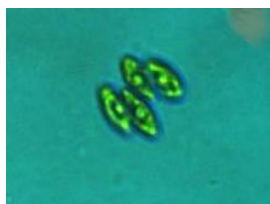
Đã thu thập được 38 mẫu nước tại 8 tỉnh thành: Quảng Ninh, Phú Yên, Bình Thuận, Đắk Nông, Thành phố Hồ Chí Minh (huyện Cần Giờ), An Giang, Trà Vinh và Bến Tre. Các mẫu nước này có độ mặn khác nhau, thay đổi từ 2ppt đến 35ppt và xếp vào 3 nhóm: nước ngọt (0 – 2ppt), nước lợ (2 – 30ppt) và nước mặn (≥ 30 ppt). Từ các mẫu nước chúng tôi phân lập được 45 chủng vi tảo thuần chủng trong đó có 27 chủng có khả năng tổng hợp lipid. Các chủng vi tảo dầu được đặt tên theo độ mặn và kí hiệu là QG-N cho các chủng nước ngọt (QG-N1 đến QG-N18); QG-L cho các chủng nước lợ (QG-L1 đến QG-L5) và QG-M cho các chủng nước mặn (QG-M1 đến QG-M4).

3.2. Một số đặc điểm hình thái và đặc điểm nuôi cấy của các chủng vi tảo dầu

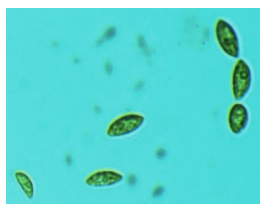
Đặc điểm hình thái của 27 chủng vi tảo khác biệt nhau. Tế bào của đa số chủng trong bộ giống có hình cầu hay hình elip. Tế bào hình cầu thì có đường kính tế bào từ 2 – 8 μm , đa số tế bào của các chủng có kích thước 2 – 3 μm . Đối với các chủng có tế bào hình elip thì kích thước tế bào của các chủng khác nhau nhiều hơn, chiều rộng từ 2 μm đến 7,5 μm và chiều dài tế bào từ 6 μm đến 19 μm . Ngoài ra, các chủng có tế bào hình elip còn khác nhau ở các đặc điểm khác như tế bào nhọn hay tròn ở hai đầu, tế bào cong hay thẳng. Tính đa dạng về hình thái tế bào còn biểu hiện ở sự kết hợp hay không kết hợp và kiểu kết hợp giữa các tế bào. Một số chủng có tế bào đứng riêng lẻ nhưng các chủng khác kết hợp với nhau thành cặp hoặc thành từng 4 tế bào hoặc nối với nhau thành chuỗi. Tế bào cũng gắn với nhau theo chiều dài của tế bào nhưng cũng dính với nhau chỉ ở một phần của tế bào hoặc xếp so le với nhau. Tế bào của một số chủng có roi để di chuyển. Khuẩn lạc của các chủng trong bộ giống thường có màu xanh nhưng mức độ màu có khác nhau giữa các chủng. Các chủng còn khác nhau ở kích thước khuẩn lạc, kích thước thay đổi từ rất nhỏ (0,05 mm) đến to (1,5 mm). Tuy nhiên, đa số các chủng có kích thước khuẩn lạc từ 0,1 đến 0,5 mm.



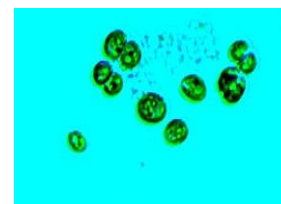
QG-N3. tế bào hình elip, xếp song song với nhau, kích thước 10-15x3-5 μm



QG-N4. tế bào hình elip, nhọn ở hai đầu, xếp theo kiểu so le, kích thước 15x6 μm



QG-N5. tế bào hình elip, nhọn ở hai đầu, đứng riêng rẽ hoặc nối với nhau thành chuỗi, kích thước 15x6 μm



QG-N13. tế bào hình cầu không đều, kích thước 4 – 8 μm

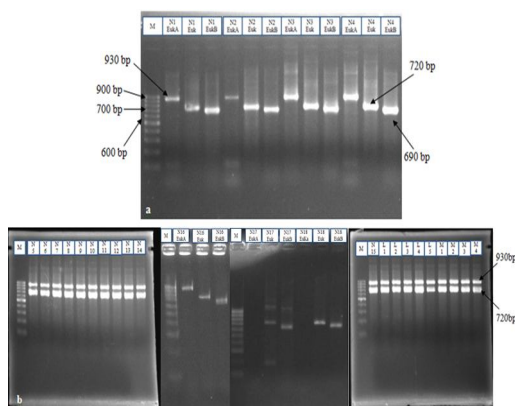
Hình 1. Hình ảnh và đặc điểm tế bào của một số chủng vi tảo tiêu biểu

Về tăng trưởng, khi nuôi cấy trong môi trường lỏng, hầu hết các chủng đều có kiểu sinh trưởng giống nhau là xuất hiện cạnh màu xanh lá dưới đáy chai, ngoại trừ các chủng QG-N3 và QG-N4 sinh khối giống đám mây lơ lửng ở gần đáy chai. Trong môi trường rắn agarose 1% (nuôi cấy trong đĩa petrie), đa số các chủng đều phát triển được cả trong lòng môi trường và trên bề mặt, ngoại trừ 3 chủng QG-L1, QG-L5 và QG-M2 chỉ phát triển được trong lòng môi trường. Điều này có thể do chúng thích nghi với điều kiện sống trong nước, luôn đòi hỏi có độ ẩm cao nên không thể phát triển trên bề mặt thạch.

3.3. Trình tự gen 18S-rRNA và định danh các chủng vi tảo

Hình 2 trình bày kết quả điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR của 27 chủng vi tảo. Ở Hình 2a, sản phẩm PCR thực hiện với 3 cặp mồi ở các mẫu QG N1, QG-N2, QG-N3 và QN-4 đều có kích thước đúng với tính toán lí thuyết là 930bp ở cặp mồi EukA, 720bp ở cặp mồi Euk và 690bp ở cặp mồi EukB. Điều này chứng tỏ các mồi là đặc hiệu cho phản ứng PCR để khuếch đại trình tự gen 18S rRNA của các chủng vi tảo này. Kết quả tương tự với các mẫu còn lại (Hình 2b).

Trình tự gen thu nhận đã được so sánh với các trình tự có trong ngân hàng gen (Genbank) và sử dụng công cụ BLAST trên NCBI (National Center for Biotechnology Information-USA). Kết quả (Bảng 2) cho thấy các chủng trong bộ gen thu thập được trong các nguồn nước tự nhiên rất khác nhau. 27 chủng vi tảo này là 23 loài thuộc 10 chi: *Mychonastes*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Pectinodesmus*, *Acutodesmus*, *Chlorella*, *Mychonastes*, *Picochlorum*, *Nannochloris*, *Stichococcus*, *Auxenochlorella*.



Kết quả điện di của 4 mẫu QG-N1, QG-N2, QG-N3 và QG-N4 sau khi thực hiện phản ứng PCR với 3 cặp mồi EukA, Euk và EukB.

(a) Kết quả điện di của 23 mẫu gồm: QG-N5 đến QG-N18, QG-L1 đến QG-L5, QG-M1 đến QG-M4 sau khi thực hiện phản ứng PCR với 2 cặp mồi EukA, Euk.

Giếng M: thang chuẩn DNA 1kb

Hình 2. Kết quả điện di trên gel argarose sản phẩm PCR của 27 chủng vi tảo với 3 cặp mồi EukA, Euk và EukB

Bảng 1. Kết quả định danh vi tảo dựa vào trình tự gen 18S rRNA

Tên mẫu	Kết quả định tên	Tương đồng	Mã số chủng tham khảo
QG-N1	<i>Mychonastes sp.</i>	99%	JN617908
QG-N2	<i>Scenedesmus costatus</i>	99%	AB773883
QG-N3	<i>Desmodesmus abundans</i>	99%	KF673371
QG-N4	<i>Scenedesmus sp. Pk1</i>	98%	KF569755
QG-N5	<i>Scenedesmus regularis</i>	99%	FR865732
QG-N6	<i>Pectinodesmus sp</i>	99%	AB917103
QG-N7	<i>Acutodesmus obliquus</i>	100%	AB917118
QG-N8	<i>Desmodesmus armatus</i>	100%	KF673362
QG-N9	<i>Pectinodesmus pectinatus</i>	99%	FR865730
QG-N10	<i>Desmodesmus sp.</i>	99%	AB917136
QG-N11	<i>Scenedesmus armatus</i>	100%	KC699545
QG-N12	<i>Desmodesmus opoliensis</i>	97%	AB917107
QG-N13	<i>Chlorella emersonii</i>	99%	FR865687
QG-N14	<i>Mychonastes afer</i>	99%	JF930340
QG-N15	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	100%	KF673378
QG-N16	<i>Mychonastes sp.</i>	99%	KR936171.1
QG-N17	<i>Desmodesmus sp.</i>	99%	AB917136.1
QG-N18	<i>Chlorella sp.</i>	100%	JX097061.1
QG-L1	<i>Chlorella sorokiniana</i>	99%	KJ616757
QG-L2	<i>Picochlorum oculatum</i>	99%	AY422075
QG-L3	<i>Chlorella sp.</i>	100%	KM213394
QG-L4	<i>Nannochloris sp.</i>	100%	JQ315641
QG-L5	<i>Mychonastes afer</i>	99%	GQ477049
QG-M1	<i>Picochlorum maculatum</i>	96%	KM055115
QG-M2	<i>Stichococcus sp</i>	97%	KM020184
QG-M3	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	97%	KM020039
QG-M4	<i>Nanochlorum eucaryotum</i>	99%	X06425

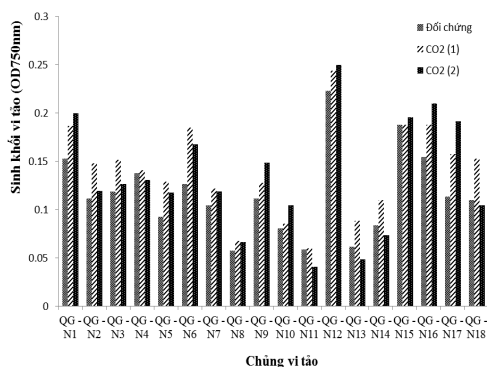
Kết quả này nói lên sự đa dạng của các chủng thu thập được từ tự nhiên và phù hợp với các kết quả của nghiên cứu này về sự khác nhau về hình thái, đặc điểm sinh trưởng, phản ứng với các yếu tố sinh trưởng, sinh khối và hàm lượng dầu. Dựa vào % tương đồng của trình tự gen của các chủng trong bộ giống vi tảo của chúng tôi với các chủng đã được công bố, chúng tôi cho rằng có khả năng xuất hiện các chủng loài mới. Dự đoán này sẽ được làm rõ khi thiết lập và phân tích cây phân loài (dựa vào kết quả trình tự gen) sau này.

3.4. Ảnh hưởng của CO₂, muối và N đến sinh trưởng của các chủng vi tảo

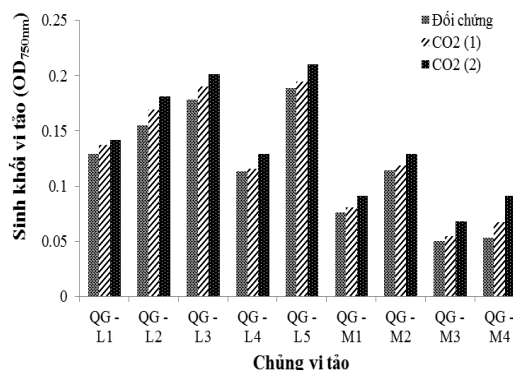
3.4.1. Ảnh hưởng của CO₂

Trong thí nghiệm này chúng tôi so sánh đáp ứng của 27 chủng vi tảo khi chúng được nuôi cấy trong điều kiện khí CO₂ ở 2 nồng độ CO₂ khác nhau trong cùng một đơn vị thể tích và so sánh với đối chứng (điều kiện khí quyển bình thường). Kết quả biểu hiện ở Biểu đồ 1 và Biểu đồ 2

Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của CO₂ đến sinh trưởng của các chủng vi tảo nước ngọt



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của CO₂ đến sinh trưởng của các chủng vi tảo nước lợ và nước mặn



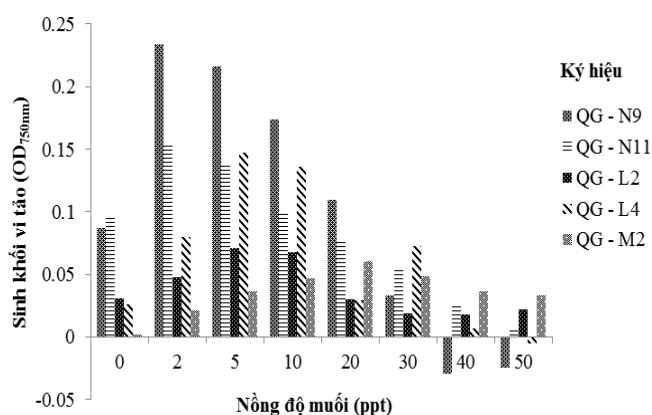
Các chủng vi tảo phản ứng khác nhau đối với CO₂, trong đó các chủng nước ngọt ít phụ thuộc vào CO₂ hơn so với các chủng nước mặn và nước lợ. Sinh trưởng của 2/3 số chủng vi tảo nước ngọt tăng lên khi nuôi cấy trong điều kiện cung cấp CO₂ so với nuôi trong điều kiện khí quyển bình thường nhưng giảm khi tăng nồng độ CO₂ từ 0,083g lên đến 0,167g. Các chủng vi tảo nước ngọt khác (7 chủng) có chiều hướng tăng sinh trưởng khi tăng cung cấp CO₂. Tất cả các chủng vi tảo nước lợ và nước mặn có xu hướng sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện nuôi cấy có cung cấp CO₂. Nghiên cứu của các tác giả khác cũng cho thấy kết quả tương tự là nồng độ CO₂ ảnh hưởng đến tích lũy sinh khối ở vi tảo và phụ thuộc vào các chủng. Nghiên cứu với 10 chủng vi tảo chịu mặn thuộc các chi khác nhau cho thấy nồng độ tối ưu cho sinh trưởng của các chủng thì khác nhau [9]. Nghiên cứu khác ở một số chủng vi tảo nước ngọt cũng cho kết quả tương tự. Sinh khối của *Chlamydomonas reinharatu*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* *Scenedesmus spinosus*, *Scenedesmus acuminatus* và *Coelastrum*

sp. tăng khi tăng nồng độ CO_2 trong môi trường nuôi cấy và sinh khối đạt cao nhất ở các liều lượng CO_2 khác nhau tùy thuộc vào các chủng .[8], [15]

3.4.2. Ảnh hưởng của muối lên sinh trưởng của các chủng vi tảo

Muối ảnh hưởng đến sinh trưởng của các chủng nghiên cứu. Đối với các chủng nước ngọt, các chủng sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối từ 2 đến 5ppt, khi tăng nồng độ muối sinh khối giảm mặc dù tất cả các chủng vẫn sinh trưởng được ở nồng độ muối cao 30ppt. Ngoại trừ chủng QG-N11, các chủng còn lại không thể sinh trưởng ở nồng độ muối 40 - 50ppt. Đối với các chủng nước lợ và nước mặn, các chủng sinh trưởng được ở nồng độ muối từ 0 đến 30ppt. Các chủng QG-L2, QG-L4, QG-M2, QG-M3 và QG-M4 sinh trưởng được ở nồng độ muối rất cao là 40- 50ppt.

Biểu đồ 3. Đáp ứng với muối của một số chủng vi tảo



Biểu đồ 3 trình bày sinh trưởng của một số chủng vi tảo đại diện khi thay đổi nồng độ muối trong môi trường. Phản ứng với sự thay đổi nồng độ muối của các chủng vi tảo thì phụ thuộc vào các chủng. Sinh trưởng của 2 chủng nước ngọt QG-N9 và QG-N11 tăng khi tăng nồng độ muối từ 0 lên 2 ppt và giảm dần khi nồng độ muối tăng đến 30 ppt. Khi tăng nồng độ muối lên 40 và 50 ppt chủng QG-N9 không tăng trưởng được trong khi đó chủng QG-N11 tăng trưởng được ở 2 nồng độ muối cao này. Tương tự chủng nước lợ QG-L2, QG-L4 có sinh khối tăng dần khi nồng độ muối tăng dần lên đến 10 ppt, giảm dần cho đến 40 ppt. Chủng QG-M2 thì tăng sinh khối cho đến nồng độ muối là 20 ppt. Chủng nước lợ và chủng nước mặn QG-L2 và QG-M2 sinh trưởng được ở nồng độ 50 ppt trong khi đó chủng QG-L4 không sinh trưởng được ở nồng độ muối cao này.

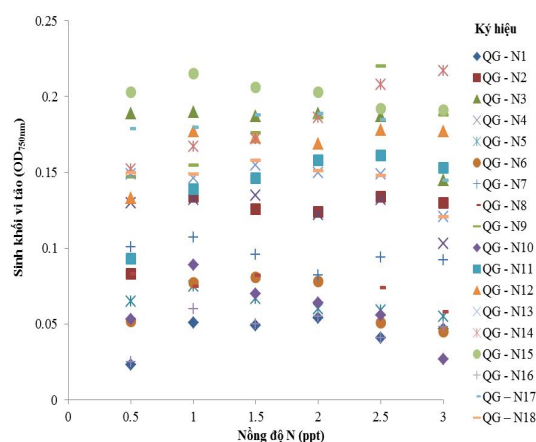
Nghiên cứu này cho thấy, muối ảnh hưởng đến sinh trưởng của các chủng vi tảo, cả nước ngọt, nước mặn và nước lợ và mức độ ảnh hưởng thì khác nhau giữa các chủng. Các nghiên cứu của các tác giả khác cũng có kết quả tương tự. Khi nuôi cấy *Nannochloropsis salina* trong điều kiện từ lợ cho đến rất mặn, sinh khối thay đổi phụ thuộc vào nồng độ muối và cao nhất ở nồng độ 22 - 34 psu [1]. Tương tự, sinh trưởng

của 9 chủng vi tảo thuộc chi *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Monoraphidium*, *Oocystis* và *Stichococcus* phụ thuộc vào nồng độ muối khác nhau. [7]

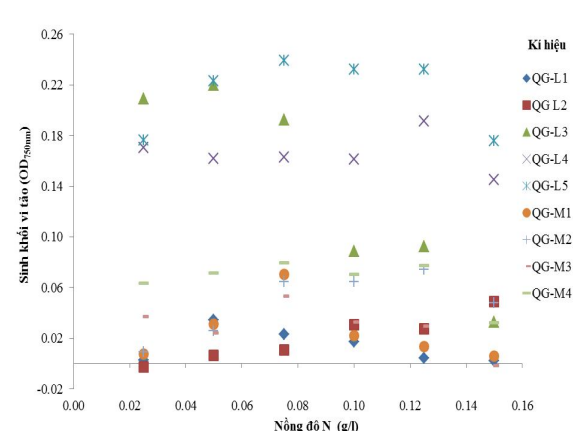
3.4.3. Ảnh hưởng của hàm lượng N đến sinh trưởng của các chủng vi tảo

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của N đến sinh trưởng của các chủng vi tảo thể hiện trong Biểu đồ 4 và 5.

Biểu đồ 4. Ảnh hưởng nồng độ nitơ đến sinh trưởng của các chủng vi tảo nước ngọt



Biểu đồ 5. Ảnh hưởng nồng độ nitơ đến sinh trưởng của các chủng vi tảo nước lợ và nước mặn



Sinh trưởng của các chủng phụ thuộc nồng độ N trong môi trường. Các chủng sinh trưởng được ở nồng độ N từ 0,5 đến 3,50 g N/l đối với các chủng nước ngọt; từ 0,025 đến 0,150 đối với các chủng nước lợ và nước mặn. Đa số các chủng nước ngọt sinh trưởng tốt ở nồng độ 1,0 - 1,5 g/l, ở nồng độ 0,75 - 0,125 g/l đối với các chủng nước lợ và nước mặn. Các nghiên cứu ảnh hưởng của N đến sinh trưởng của vi tảo cho đến nay cho thấy N là dinh dưỡng thiết yếu cho vi tảo. Nghiên cứu của Subhasha Nigam và cộng sự (2011) cho thấy *Chlorella pyrenoidosa* không thể sinh trưởng khi không có N và sinh trưởng của nó trực tiếp ảnh hưởng bởi nồng độ nitrate trong môi trường. Khi tăng nồng độ nitrate trong môi trường, sinh khối tăng [11]. Nghiên cứu của Neumara L.S. Hakalin và cộng sự (2014) đối với *Scenedesmus* sp. cũng cho thấy tương quan thuận giữa sinh khối và nồng độ N trong môi trường nuôi cấy. [10]

3.5. Sinh khối và hàm lượng dầu của các chủng vi tảo

Sinh khối và hàm lượng dầu của các chủng vi tảo được trình bày trong Bảng 2. Kết quả cho thấy các chủng vi tảo khác nhau tích lũy sinh khối khác nhau, thay đổi từ 0,29 đến 2,18 g/l. Nhiều nghiên cứu về sinh khối cho tới nay và kết quả cho thấy sinh khối thu được phụ thuộc nhiều vào các chủng vi tảo. Nghiên cứu của David Lim và cộng sự cho thấy sinh khối khô của 12 chủng vi tảo phân lập được từ nước biển và nước lợ ở Úc thay đổi rất lớn từ 0,37 đến 1,68 g/l [4]. Nghiên cứu khác, khảo sát 16

chủng vi tảo sinh tổng hợp lipid cao có tốc độ sinh trưởng rất khác nhau [14]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự.

Hàm lượng lipid thay đổi từ 8,71% đến 34,56% theo trọng lượng khô của tế bào. Có 16 trong số 27 chủng đạt hàm lượng lipid cao hơn 20%, trong đó có 4 chủng đạt cao hơn 30% (QG-N1; QG-N16; QG-L4; QG-L1). Nghiên cứu này cho thấy hàm lượng lipid của vi tảo rất khác biệt ở các chủng khác nhau. Các chủng QG-N1; QG-N14; QG-N16; QG-M2; QG-L1 vừa có sinh khối cao vừa có hàm lượng dầu cao. Nghiên cứu của các tác giả khác cũng cho thấy các chủng vi tảo khác nhau thì lipid tích lũy khác nhau: *Chlorella* sp. 28 – 32%, *Chlorella vulgaris* 14 – 56%, *Scenedesmus dimorphus* 16 – 40%, *Nanochloris* sp. 25 – 35%, *Acutodesmus obliquus* 47%. [3], [5], [6]

Bảng 2. Sinh khối và hàm lượng lipid của các chủng vi tảo

Tên chủng	Sinh khối (g/l)	Hàm lượng lipid (% sinh khối khô)	Tên chủng	Sinh khối (g/l)	Hàm lượng lipid (% sinh khối khô)
QG-N1	1,62	32,38	QG – N15	1,05	22,61
QG – N2	0,67	10,19	QG – N16	1,78	30,54
QG – N3	1,21	21,15	QG – N17	1,20	26,15
QG – N4	1,08	13,94	QG – N18	1,19	20,73
QG – N5	0,8	14,03	QG – L1	1,45	34,56
QG – N6	1,23	8,71	QG – L2	1,58	20,14
QG – N7	1,06	15,62	QG – L3	1,66	13,93
QG – N8	0,71	20,45	QG – L4	0,94	33,47
QG – N9	1,42	12,56	QG – L5	1,6	28,58
QG – N10	1,12	22,79	QG – M1	0,49	15,70
QG – N11	0,54	17,60	QG – M2	1,41	25,13
QG – N12	2,18	20,38	QG – M3	0,41	17,04
QG – N13	1,18	23,78	QG – M4	0,83	12,23
QG – N14	1,62	27,25			

4. Kết luận và đề nghị

Đã phân lập được 27 chủng vi tảo dầu từ các nguồn nước ngọt, nước lợ và nước mặn tự nhiên. Bộ giống vi tảo này 27 chủng vi tảo thuộc 23 loài, 10 chi: *Mychonastes*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Pectinodesmus*, *Acutodesmus*, *Chlorella*, *Mychonastes*, *Picochlorum*, *Nannochloris*, *Stichococcus*, *Auxenochlorella*.

Các chủng vi tảo dầu trong bộ giống đa dạng về hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, về trình tự gen 18S rRNA và sinh trưởng chịu ảnh hưởng của nồng độ CO₂, hàm lượng muối và N.

Sinh khối và hàm lượng dầu thay đổi phụ thuộc vào các chủng. Trong 27 chủng có 4 chủng có hàm lượng dầu cao hơn 30% (QG-N1; QG-N16; QG-L4; QG-L1). Các chủng vừa có hàm lượng dầu cao vừa có sinh khối cao là QG-N1; QG-N14; QG-N16; QG-M2; QG-L1.

Đề nghị xác định thành phần acid béo của dầu của các chủng vi tảo để có định hướng ứng dụng cho bộ giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bartley, M.L., Boeing, W.J., Coresrant, A.A., Holguin, F.O., Schaub T. (2013), "Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms", *Biomass and Bioenergy*, 54, pp.83-88.
2. Chen W., Zhang C.W., Song L.R., Sommerfeld M., Hu Q. (2009), "A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae", *Journal of Microbiological Methods*, 77, pp.41-47.
3. Chisti Y. (2007), "Biodiesel from microalgae", *Biotechnology Advances* 25, pp.294-306.
4. David K. Y. Lim et al. (2012), "Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters", *PLoS One*, 7(7), pp.40751.
5. Encamacion C.A.R., Benitez G.S., Santos G.M., Medina S.C. (2010), "Maximization of *Scenedesmus dimorphus* lipid yield for the production of biodiesel", *Chemical Engineering*, pp. 9 -15.
6. Feringo, D., Galle, G., Sforja, E., Morosinotto, T., Barcaccia, G., Berrini, C.C. (2014), "Biochemical characterization and genetic identification of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate", *J. Appl Phycol*, 27, pp 149-161.
7. Latala, A. (1991), "Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae" (1991), *Oceanologica*, (31), pp.119-138.
8. Minillo, A., Godoy H.C. and Fonseca G.G. (2013), "Growth performance of microalgae exposed to CO₂", *Journal of Clean Energy Technologies*, 1(2), pp.111-112.
9. Negoro, M., Shoji, N., Miyamoto K. and Miura, Y. (1991), "Growth of Microalgae in high CO₂ gas and effects of NO_x and SO_x", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28, pp.877-886.

10. Neumara, L.S. Hakalin, Ananda P. Paz, Donato A.G Aranda, Lidia Maria P. M. (2014), “Enhancement of cell growth and lipid content of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. by optimization of nitrogen, phosphorus and vitamin concentration for biodiesel production”, *Natural Science*, 6, pp.1047-1050.
11. Nigam, S., Rai, M. P. and Sharma, R. (2011), “Effect of Nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella Pyrenoidosa*”, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), pp.124-129.
12. Otto, P., Wolfgang, G. (2004), “Valuable products from biotechnology of microalgae”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, pp.635-648.
13. Priyadarshani, I. and Rath, B. (2012), “Commercial and industrial applications of microalgae – A review”, *J. Algal Biomass Utiln.*, 3 (4), pp. 89–100.
14. Van Thang Duong, Skye R. Thomas-Hall and Peer M. Schenk (2015), “Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and sea water locations in South East Queensland-Australia”, *Front Plant Sci*, 6, pp.355.
15. Yang, Y. and Gao, K. (2003), “Effects of CO₂ concentration on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta)”, *Applied Phycology*, 15, pp.379-389.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 05-01-2016; ngày phản biện đánh giá: 10-01-2016;
ngày chấp nhận đăng: 17-3-2016)