

Khảo sát khả năng tăng trưởng và tích lũy lipid của các chủng vi tảo phân lập tại Việt Nam

- Nguyễn Thị Mỹ Lan
- Đoàn Thị Mộng Thắm
- Huỳnh Hiệp Hùng
- Lê Thị Thanh Loan
- Phạm Thành Hồ
- Lê Thị Mỹ Phước

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

- Nguyễn Tiến Thắng

Viện Sinh học nhiệt đới Tp HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 3 năm 2013, nhận đăng ngày 16 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Biodiesel từ vi tảo được xem là một nguồn năng lượng thay thế nhiên liệu hóa thạch và việc sử dụng nguồn năng lượng này có khả năng làm giảm lượng CO₂ trong không khí so với việc sử dụng nhiên liệu hydrocarbon hóa thạch. Ngày nay, nghiên cứu về năng lượng tái tạo chủ yếu tập trung vào diesel sinh học từ vi tảo do tảo có tốc độ tăng trưởng nhanh và năng suất cao. Nhằm phát triển hướng nghiên cứu mới này ở Việt Nam, chúng tôi đã phân lập một số loài địa phương và sử dụng phương pháp sàng lọc

nhANH để định tính và định lượng lipid trong vi tảo dựa trên phương pháp đo OD huỳnh quang Nile Red. Hơn thế nữa, nhằm cung cấp một tài liệu tham khảo để sản xuất dầu diesel sinh học tương lai từ việc sử dụng các loài vi tảo thích nghi tốt trong điều kiện sống tự nhiên của nước ta, chúng tôi đã xác định hàm lượng lipid của những loài này dao động từ 8,89 % đến 29,12 % sinh khối khô trong điều kiện nuôi cấy ở ngoài tự nhiên bằng 2 phương pháp Soxhlet và Bligh & Dyer.

Từ khóa: Biodiesel, vi tảo, Nile Red, năng lượng tái tạo, lipid

GIỚI THIỆU

Sự phát minh ra năng lượng truyền thống đã dẫn đến mối nguy hiểm về sự biến đổi khí hậu, sự thiếu hụt năng lượng không thể tránh khỏi, và làm tổn hại đến an ninh quốc gia. Cùng với những hậu quả đang diễn ra, nhu cầu năng lượng ngày càng gia tăng. Để bảo vệ môi trường và duy

trì một nguồn năng lượng bền vững, yêu cầu cấp thiết được đặt ra là tìm những nguồn nhiên liệu mới để thay thế nguồn nhiên liệu hóa thạch đang ngày càng cạn kiệt. Biodiesel từ vi tảo (tảo dầu) - nhiên liệu sinh học thế hệ 3 - nổi lên như một nguyên liệu có triển vọng nhất để sản xuất nhiên

liệu sinh học, là một sự thay thế hoàn hảo cho các nhiên liệu hóa thạch không tái tạo do có một số ưu điểm nổi trội như: chứa hàm lượng dầu cao lên đến khoảng 50 % sinh khối khô, hiệu suất lipid từ tảo thì cao hơn nhiều (10 – 100 lần) so với những cây trồng năng lượng cạnh tranh, không ảnh hưởng đến an ninh lương thực, hấp thu CO₂, hiệu suất quang hợp cao, tốc độ tăng trưởng nhanh, có thể phát triển ở khắp mọi nơi (nước ngọt, nước mặn, nước lợ, nước thải...), phần sinh khối sau khi chiết lấy lipid còn là nguồn lợi kinh tế rất lớn [1]. Từ những thuận lợi trên, vi tảo đã cho thấy đây là nguồn nguyên liệu thích hợp để sản xuất ra nguồn “năng lượng xanh”, thay thế cho năng lượng từ nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về biodiesel từ tảo, tuy nhiên việc ứng dụng và sản xuất biodiesel từ tảo dầu ở Việt Nam vẫn còn là hướng đi mới và vẫn đang ở bước đầu nghiên cứu.

Từ 35 mẫu nước từ ao hồ tại một số quận 3, quận 6, quận 8, quận 11, quận Thủ Đức, huyện Hóc Môn, Bình Chánh Tp. Hồ Chí Minh, chúng tôi đã phân lập được 17 chủng vi tảo. Bằng phương pháp định tính nhanh với phẩm nhuộm Nile Red và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, 8 chủng vi tảo nước ngọt tuyển chọn được có chứa lipid thuộc các chủng: *Kirchneriella obesa* (West) Schmidle, *Asterococcus limneticus* G. M. Smith, *Coelastrum cambricum* Archer, *Pediastrum duplex* Meyen, *Cosmarium* cf. *sumatranum* Krieger, *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat, *Scenedesmus acuminatus* (Lag.) Chodat và *Scenedesmus dimorphus* [9].

Từ 57 mẫu nước ở một số ruộng muối, ao nuôi tôm, nước biển ở các tỉnh Bến Tre, Đồng Nai, Bà Rịa – Vũng Tàu, Khánh Hòa, Bình Định, chúng tôi đã phân lập được 18 chủng vi tảo. Bằng phương pháp định tính nhanh với phẩm nhuộm

Nile Red và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, 13 chủng vi tảo nước mặn tuyển chọn được có chứa Lipid thuộc các chủng: *Amphora* sp., *Chaetoceros* sp., *Nitzschia* sp., *Chlamydomonas* sp., *Cyanodictyon* cf. *endophyticum* Pascher, *Dunaliella* sp., *Chloridella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Fernandinella* sp., *Tetraselmis* sp., *Chlorella* sp1, *Chlorella* sp1, *Navicular* sp.

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả: khảo sát khả năng tăng trưởng và tích lũy lipid nội bào của các chủng vi tảo phân lập được ở một số vùng của Việt Nam, làm cơ sở để sản xuất biodiesel [7].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

8 chủng vi tảo nước ngọt được tuyển chọn có ký hiệu: N3, N4, N5, N12, N14, N16, N17, N18. 13 chủng vi tảo nước mặn M1, M2, M3, M5, M7, M8, M9, M10, M13, M16, M17, M18, M19 [7].

Phương pháp nghiên cứu

Các chủng vi tảo được nuôi cấy và sàng lọc trong điều kiện ánh sáng tự nhiên (cường độ ánh sáng dao động trong khoảng từ 5,000 lux đến 30,000 lux), nhiệt độ tự nhiên ở ngoài trời (dao động từ 26 °C đến 38 °C tùy theo ngày), chiếu sáng theo chu kỳ tự nhiên. Khí CO₂ được cung cấp đơn giản bằng cách sục khí liên tục 24/24 với nồng độ CO₂ tự nhiên trong không khí chiếm 0,03 %.

Sàng lọc các chủng vi tảo chứa lipid bằng tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red OD 485/535 và khảo sát khả năng tăng trưởng của chúng thông qua giá trị OD750 nm

Ưu điểm của phương pháp đo OD huỳnh quang: lượng mẫu cần dùng ít, định tính và định lượng lipid ngay trong môi trường nuôi cấy mà

không cần ly tâm thu sinh khối, quy trình thực hiện đơn giản, tiết kiệm thời gian, công sức. Thuốc nhuộm Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) là một thuốc nhuộm thường được sử dụng để định tính và định lượng những giọt lipid nội bào. Nile Red là một chất kỵ nước có khả năng liên kết đặc biệt với lipid trung tính (triacylglyceride – TAG) trong tế bào. Khi đưa vào máy đo OD huỳnh quang, máy sẽ phát ra 1 bước sóng kích thích (485/20 nm) có năng lượng cao tác động đến liên kết này và khi bị kích thích, chúng sẽ phát bước sóng có mức năng lượng thấp hơn (phát huỳnh quang có bước sóng hấp thụ 535/25 nm hay 590/35), máy đọc giá trị này. Ánh sáng huỳnh quang thu nhận được sẽ gia tăng theo hàm lượng lipid có trong mẫu [3,5,7]. Các thông số về nồng độ. Nile Red sử dụng, nồng độ mẫu và thời gian phản ứng của Nile Red với mẫu đều được khảo sát để đảm bảo rằng thời điểm đo là lúc mẫu đạt được sự hấp thụ và phát ánh sáng huỳnh quang thu nhận được tối ưu nhất. Thông số tối ưu: Sử dụng 4 μ l Nile Red (50 μ g/ml) với 200 μ l mẫu vi tảo. Huyền phù kỹ, ủ mẫu từ 10 - 15 phút và đo. Mỗi nghiệm thức lặp lại 8 lần (4 lần thử không và 4 lần thử thật). Mỗi mẫu vi tảo đều được kiểm tra ít nhất là 8 lần để thấy sự dao động các tín hiệu OD huỳnh quang thông qua lượng lipid trung tính tạo thành và tích trữ trong các mẫu tảo.

Định lượng lipid từ các chủng vi tảo phân lập được bằng phương pháp Soxhlet và phương pháp Bligh & Dyer

Định lượng bằng phương pháp Soxhlet. Cân chính xác khoảng 5 g sinh khối vi tảo đã sấy khô. Sử dụng 450 ml hệ dung môi Chloroform : Methanol (2:1). Tiến hành Soxhlet trong 5 - 6 giờ. Dịch chiết thu được tiến hành cô quay chân không đến khi còn một lượng rất ít dung môi thì

chuyển sang becher đã sấy khô và cân khối lượng trước. Cho dung môi còn lại bay hơi tự nhiên sau đó sấy khô lipid ở 60 °C đến khối lượng không đổi. Cân khối lượng lại becher chứa lipid [4, 8]. Định lượng bằng phương pháp Bligh và Dyer. Cân chính xác 5 g sinh khối tảo đã sấy khô, nghiền nhỏ. Cho tảo vào một erlen sạch. Thêm vào 4 ml nước cất. Bổ sung thêm 10 ml methanol và 5 ml chloroform (tỷ lệ methanol: chloroform: nước cất là 10:5:4). Lúc này, dung môi trộn lẫn với nhau tạo thành một lớp duy nhất. Lắc erlen trên máy lắc trong 6 giờ để lipid hòa tan vào trong dung môi. Sau 6 giờ, bổ sung thêm 5 ml chloroform và 5 ml nước cất vào erlen (tỷ lệ dung môi methanol: chloroform: nước cất là 10: 10: 9). Tiến hành ly tâm ở 4000 vòng/ phút trong 15 phút. Ở tỷ lệ mới, trong ống ly tâm có hai lớp dung môi hình thành: lớp methanol- nước ở trên và lớp chloroform ở dưới. Thu chloroform có chứa lipid rồi chuyển sang becher sạch (đã được sấy khô và cân khối lượng). Để bay hơi chloroform, sấy ở 60 °C đến khối lượng không đổi. Cân lại becher. Tính lượng lipid tách chiết [3].

Phương pháp xử lý số liệu. Số liệu thu được từ kết quả của các thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2007 và phần mềm xử lý thống kê GraphPad Prism 5.0

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

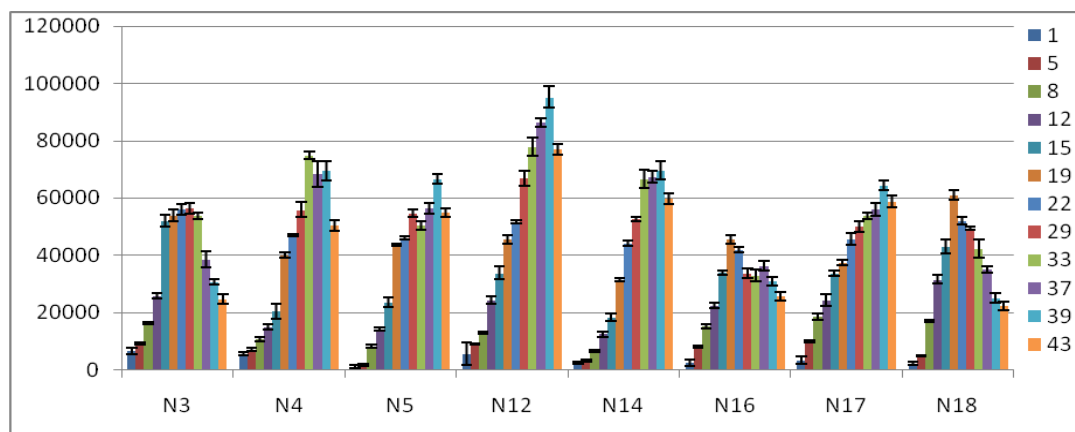
Sàng lọc nhanh các chủng vi tảo có chứa lipid trong điều kiện nuôi cấy ở ngoài tự nhiên và khảo sát khả năng tích lũy lipid nội bào của các chủng vi tảo nước ngọt bằng tín hiệu huỳnh quang Nile Red OD_{485/535} theo thời gian nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành lấy mẫu và đo kết quả vào các ngày 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 29,

33, 37, 39, 43. Mỗi nghiệm thức được tiến hành lặp lại 4 lần. Theo J. Polle và cộng sự (2010): môi trường nuôi cấy *Chlamydomonas reinhardtii* (chủng đối chứng) trong điều kiện không cảm ứng (không tạo stress) có giá trị OD huỳnh quang Nile Red tương đối khoảng 5000.

OD_{485/535nm}

Nuôi cấy *Chlamydomonas reinhardtii* trong điều kiện tích lũy lipid (18 – 20 % lipid) có giá trị OD huỳnh quang Nile Red tương đối khoảng 40000. Chính vì thế, những chủng vi tảo cho tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red cao (≥ 40000) là đạt tiêu chí tuyển chọn [5, 9].



Hình 1. Sàng lọc các chủng vi tảo nước ngọt theo tín hiệu OD_{485/535}

Dựa vào Hình 1, chúng tôi thấy 8 chủng vi tảo nước ngọt đều đạt yêu cầu (tín hiệu OD huỳnh quang ≥ 40000) theo thứ tự tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red (OD_{485/535} /200 μ l dịch tảo) giảm dần như sau: N12, N4, N14, N17, N5, N18, N3, N16. Chủng N12 cho tín hiệu tích lũy lipid cao nhất so với các chủng khác (trong khoảng OD_{485/535} từ 75000 đến 95000) và đạt giá trị cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 33 đến ngày 43 nhưng có sự tăng giảm đột ngột trong khoảng thời gian này. Điều này cho thấy rằng khả năng tích trữ lipid trong chủng N12 vẫn chưa ổn định. Bốn chủng N4, N14 và N5, N17 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535} từ 55000 đến 70000). Tuy nhiên, khoảng thời gian tích lũy lipid lại khác nhau giữa các chủng. Hai chủng N4

và N14 cho thấy đạt khả năng tích lũy lipid cao nhất (trong khoảng OD_{485/535} từ 65000 đến 70000) và tương đối ổn định trong khoảng thời gian từ ngày 33 đến ngày 39.

Hai chủng N5 và N17 có tín hiệu tích lũy lipid trong khoảng thời gian từ ngày 29 đến ngày 43 và cũng có sự biến động rõ trong khoảng thời gian này (trong khoảng OD_{485/535} từ 55000 đến 65000).

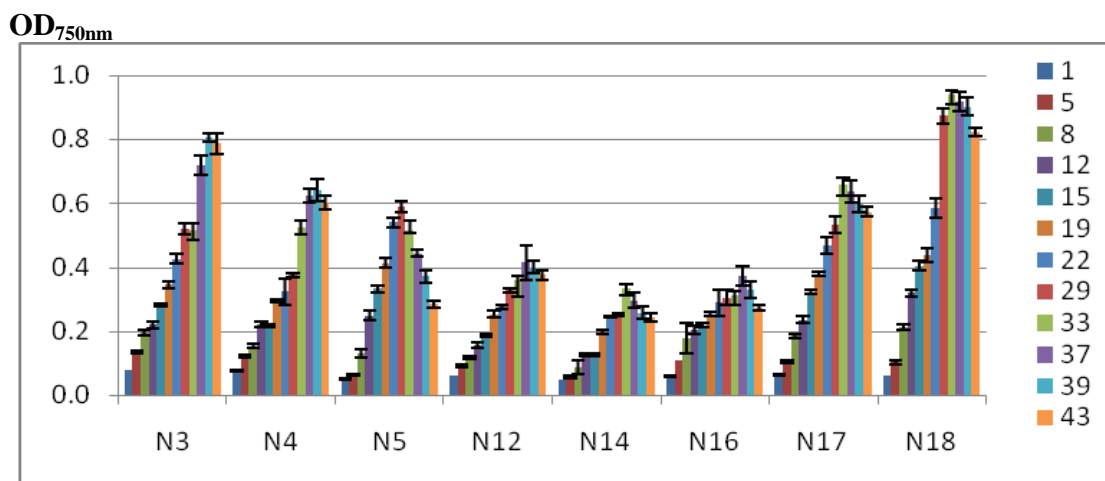
Chủng N3 cho tín hiệu tích lũy lipid thấp hơn các chủng khác (trong khoảng OD_{485/535} từ 50000 đến 55000) nhưng là chủng có khoảng thời gian tích lũy lipid ổn định nhất, kéo dài từ ngày 19 đến ngày 33 nên đây cũng là một chủng có tiềm năng.

Chủng N16 cho tín hiệu tích lũy lipid thấp nhất trong 8 chủng vi tảo nước ngọt khảo sát

(trong khoảng OD_{485/535} từ 30000 đến 45000). Tuy nhiên, do chủng này có kích thước lớn hơn các chủng vi tảo khác, tốc độ tăng trưởng yếu hơn các chủng khác. Chính vì thế, cần khảo sát thêm các giá trị huỳnh quang Nile Red OD

_{485/535}/OD₇₅₀ nhằm đánh giá kết quả chính xác hơn.

Khảo sát khả năng tăng trưởng của các chủng vi tảo nước ngọt theo thời gian nuôi cấy thông qua giá trị độ hấp thụ OD₇₅₀



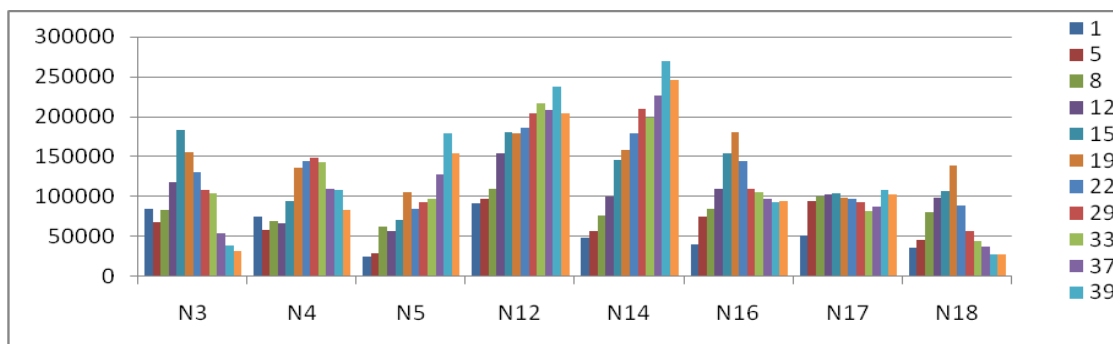
Hình 2. Khả năng tăng trưởng của các chủng vi tảo nước ngọt

Dựa vào Hình 2, chúng tôi nhận thấy 8 chủng vi tảo nước ngọt có khả năng tăng trưởng khác nhau (lượng giống ban đầu cấy là như nhau, OD_{750 nm} ≈ 0,04) trong khoảng thời gian khảo sát 43 ngày và 8 chủng khảo sát đều có dấu hiệu giảm khả năng tăng trưởng rõ từ ngày 39. Chủng N3, N4 giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 39, chủng N5 giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 29, chủng N12, N16 giảm khả năng tăng trưởng từ

ngày 37, chủng N14, N17, N18 giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 33.

Khả năng tăng trưởng của 8 chủng vi tảo nước ngọt giảm dần theo thứ tự như sau: N18, N3, N17, N4, N5, N12, N16, N14.

Khảo sát khả năng tích lũy lipid nội bào của các chủng vi tảo nước ngọt bằng tín hiệu huỳnh quang Nile Red OD_{485/535} /OD₇₅₀ theo thời gian nuôi cấy



Hình 3. Sàng lọc các chủng vi tảo nước ngọt theo tín hiệu OD_{485/535} /OD₇₅₀

Dựa vào Hình 3, chúng tôi thấy 8 chủng vi tảo nước ngọt có thứ tự tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red (OD_{485/535} /OD₇₅₀) giảm dần theo thứ tự như sau: N14, N12, N3, N16, N5, N4, N17, N18.

Hai chủng N12, N14 cho tín hiệu tích lũy lipid cao nhất so với các chủng khác (trong khoảng OD_{485/535} /OD₇₅₀ từ 200000 đến 250000) và đạt giá trị cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 29 đến ngày 43. Như vậy, đây là khoảng thời gian thích hợp nhất để thu nhận sinh khối tảo nhằm đạt được sự tích lũy lipid trong tế bào vi tảo là cao nhất và khoảng thời gian này cũng phù hợp với khả năng tăng trưởng tối ưu của chúng.

Bốn chủng N3, N4, N5 và N16 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535} /OD₇₅₀ từ 100000 đến 150000). Tuy nhiên, khoảng thời gian tích lũy lipid lại khác nhau giữa các chủng. Hai chủng N3 và N16 cho thấy đạt khả năng tích lũy lipid cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 15 đến ngày 22. Chủng N4 có tín hiệu tích lũy lipid rõ trong khoảng thời gian từ ngày 19 đến ngày 33. Còn chủng N5 thì lại có tín hiệu tích lũy lipid trong khoảng thời gian từ ngày 37 đến ngày 43.

Trong 8 chủng vi tảo nước ngọt tuyển chọn và khảo sát, tất cả các chủng đều là những chủng vi tảo nước ngọt có tiềm năng trong sản xuất Biodiesel, trong đó đặc biệt hai chủng N12 và

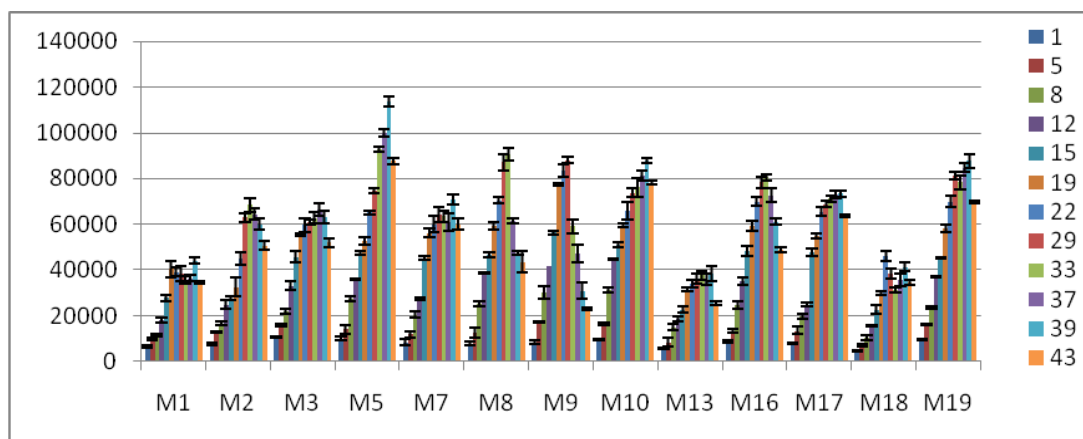
N14 có tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red/ OD mật độ sinh khối tảo là cao nhất. Tuy nhiên, chủng N12 và N17 được ưu tiên lựa chọn vì khả năng tích trữ lipid cao, tương đối ổn định (chủng N12, N17) và tốc độ tăng trưởng nhanh (chủng N17). Khảo sát khả năng tích lũy lipid nội bào của các chủng vi tảo nước mặn bằng tín hiệu huỳnh quang Nile Red OD_{485/535} theo thời gian nuôi cấy. Dựa vào Đồ thị 3.4, ta thấy các chủng vi tảo nước mặn đạt yêu cầu (OD_{485/535} ≥ 40000) gồm 10 chủng: M2, M3, M5, M7, M8, M9, M10, M16, M17, M19. Chủng M5 cho tín hiệu tích lũy lipid cao nhất so với các chủng khác (trong khoảng OD_{485/535} từ 90000 đến 110000) và đạt giá trị cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 33 đến ngày 43 nhưng có sự tăng giảm đột ngột trong khoảng thời gian này. Điều này cho thấy rằng khả năng tích trữ lipid trong chủng M5 vẫn chưa ổn định.

9 chủng M2, M3, M7, M8, M9, M10, M16, M17 và M19 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535} từ 60000 đến 80000). Tuy nhiên, khoảng thời gian tích lũy lipid lại khác nhau giữa các chủng. 2 chủng M2, M19 cho thấy đạt khả năng tích lũy lipid cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 29 đến ngày 39 nhưng chủng M19 có tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red cao hơn (M2~60000,

M19~ 80000). Tương tự, 2 chủng M7, M17 cho thấy đạt khả năng tích lũy lipid cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 22 đến ngày 43 nhưng chủng M17 có tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red cao hơn (M7~60000, M17~70000). Năm chủng còn lại có sự thay đổi khác nhau rõ về khoảng thời gian tích lũy lipid cao nhất ((M3~

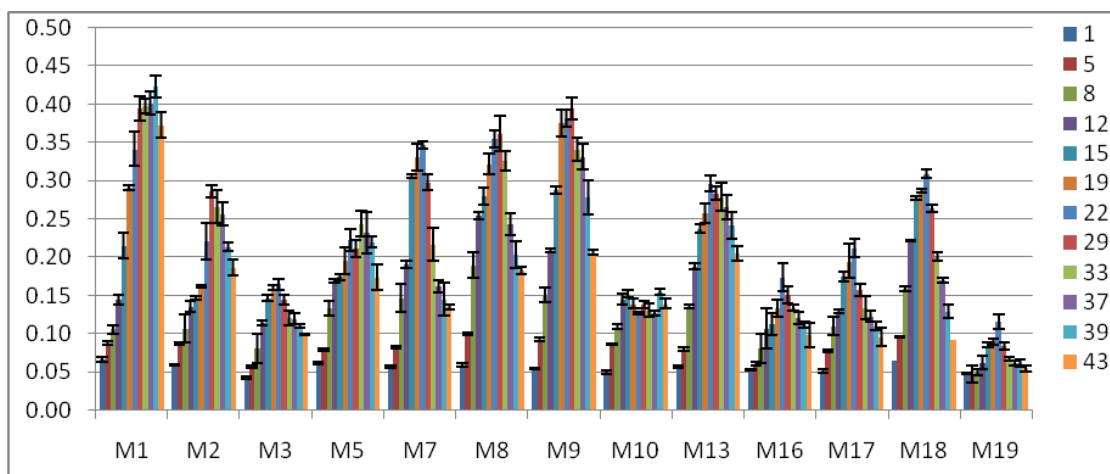
60000, 22-39); (M8~ 80000, 29-33); (M9~80000, 19-29); (M10~80000, 29-43); (M16~80000, 22-37). 3 chủng M1, M13 và M18 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535} từ 30000 đến 40000). Chính vì thế, 3 chủng này không đạt tiêu chí tuyển chọn.

OD_{485/535nm}



Hình 4. Sàng lọc các chủng vi tảo nước mặn theo tín hiệu OD_{485/535}

OD_{750nm}



Hình 5. Khả năng tăng trưởng của các chủng vi tảo nước mặn

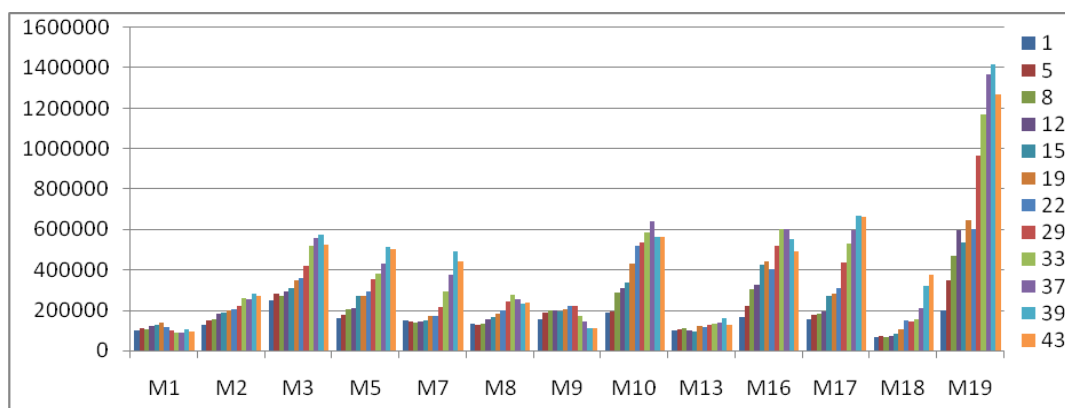
Khảo sát khả năng tăng trưởng của các chủng vi tảo nước mặn theo thời gian nuôi cấy thông qua giá trị độ hấp thụ OD₇₅₀

Dựa vào Hình 5, chúng tôi nhận thấy 13 chủng vi tảo nước mặn có khả năng tăng trưởng khác nhau (lượng giống ban đầu cấy là như nhau, OD_{750nm} ≈ 0,04) trong khoảng thời gian khảo sát 43 ngày và 13 chủng khảo sát đều có dấu hiệu giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 39. 3 chủng M2, M8, M9 giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 29. Bầy chủng M3, M7, M13, M16, M17, M18, M19 bắt đầu giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 22. Chủng M5 giảm khả năng tăng trưởng từ ngày 33.

Khả năng tăng trưởng của 13 chủng vi tảo nước ngọt giảm dần theo thứ tự như sau: M1, M9, M8, M7, M18, M13, M2, M5, M17, M3, M16, M10, M19. Do khó so sánh khả năng tích lũy lipid giữa các chủng này vì sau một khoảng thời gian nuôi cấy thì khả năng tăng trưởng của các chủng là khác nhau (mật độ OD khác nhau giữa các chủng) nên khả năng tích trữ lipid sẽ là khác nhau nhiều giữa các chủng. Nên cần khảo sát thêm các giá trị huỳnh quang Nile Red OD_{485/535}/OD₇₅₀ nhằm đánh giá kết quả chính xác hơn.

Khảo sát khả năng tích lũy lipid nội bào của các chủng vi tảo nước mặn bằng tín hiệu huỳnh quang Nile Red OD_{485/535} /OD₇₅₀ theo thời gian nuôi cấy.

OD_{485/535nm} / OD_{750nm}



Hình 6. Sàng lọc các chủng vi tảo nước mặn theo tín hiệu OD_{485/535} /OD₇₅₀

Dựa vào Hình 6, chúng tôi thấy 13 chủng vi tảo nước mặn có thứ tự tín hiệu OD huỳnh quang Nile Red (OD_{485/535} /OD₇₅₀) giảm dần theo thứ tự như sau: M19, M17, M10, M16, M3, M5, M7, M18, M2, M8, M9, M13, M1.

Chủng M19 cho tín hiệu tích lũy lipid cao nhất so với các chủng khác (trong khoảng

OD_{485/535} /OD₇₅₀ từ 1200000 đến 1400000) và đạt giá trị cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 37 đến ngày 43. Như vậy, đây là khoảng thời gian thích hợp nhất để thu nhận sinh khối tảo nhằm đạt được sự tích lũy lipid trong tế bào vi tảo là cao nhất. Tuy nhiên, khoảng thời gian này không phù hợp với khoảng thời gian tăng trưởng tối ưu

của chúng (từ ngày 15 đến ngày 29). Điều này có thể lý giải là do khả năng tích trữ giọt lipid trong tế bào tảo giai đoạn từ ngày 29 trở đi gia tăng nên khi mật độ OD₇₅₀ giảm đi nhưng OD_{485/535} vẫn tăng nên dẫn đến tỉ lệ OD_{485/535}/OD₇₅₀ sẽ gia tăng rất lớn. Chính vì thế, nếu cải thiện được khả năng tăng trưởng tốt của chủng này thì đây sẽ là ứng cử viên tiềm năng trong sản xuất biodiesel.

Bốn chủng M3, M10 M16 và M17 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535}/OD₇₅₀ ~ 600000) và khoảng thời gian tích lũy lipid gần giống nhau giữa các chủng (khoảng từ ngày 33 đến ngày 43). Ba chủng M5, M7 và M18 cho thấy đạt khả năng tích lũy lipid cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày 37 đến ngày 43. Ba chủng M2, M8, và M9 cho tín hiệu có khả năng tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535}/OD₇₅₀ ~ 200000) nhưng hai chủng M2 và M8 có tín hiệu tích lũy

Hiệu suất ly trích lipid từ các chủng vi tảo

lipid trong khoảng thời gian từ ngày 29 đến ngày 43, còn chủng M9 thì có khả năng tích trữ lipid ổn định từ ngày 5 đến ngày 29 và bắt đầu có dấu hiệu giảm rõ từ ngày 29 trở đi. Hai chủng M1, M13 thì lại có tín hiệu tích lũy lipid gần bằng nhau (trong khoảng OD_{485/535}/OD₇₅₀ ~ 140000) và khả năng tích trữ lipid trong tế bào tương đối ổn định, ít biến động.

Trong 13 chủng vi tảo nước mặn tuyển chọn và khảo sát, tất cả các chủng đều là những chủng vi tảo nước mặn có tiềm năng trong sản xuất biodiesel, đặc biệt các chủng vi tảo nước mặn đều đạt yêu cầu tuyển chọn ban đầu. Tuy nhiên, do các chủng nước mặn khó nuôi hơn so với các chủng nước ngọt, khả năng tăng trưởng yếu nên hai chủng M5 và M16 được ưu tiên lựa chọn vì chủng M5 có khả năng tích trữ lipid cao và chủng M16 có tốc độ tăng trưởng tương đối ổn định và giọt lipid hiện diện trong tế bào rất là rõ.

Bảng 1. Hiệu suất ly trích lipid từ các chủng vi tảo

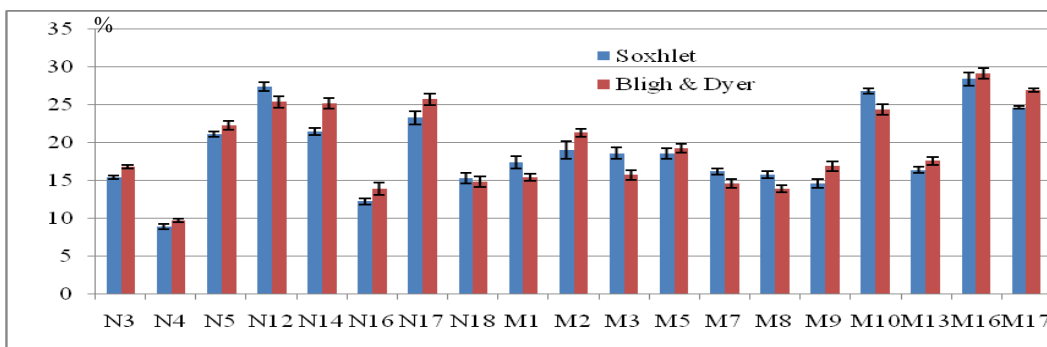
Ký hiệu chủng	Tên chủng	Hiệu suất ly trích lipid bằng phương pháp Soxhlet (%)	Hiệu suất ly trích lipid bằng phương pháp Bligh & Dyer (%)
N3	<i>Kirneriella obesa</i> (West) Schmidle	15,37 ± 0,25	16,75 ± 0,26
N4	<i>Asterococcus limneticus</i> G. M. Smith	8,89 ± 0,36	9,67 ± 0,27
N5	<i>Coelastrum cambricum</i> Archer	21,04 ± 0,33	22,23 ± 0,63
N12	<i>Pediastrum duplex</i> Meyen	27,35 ± 0,56	25,34 ± 0,74
N14	<i>Cosmarium cf. sumatranum</i> Krieger	21,37 ± 0,47	25,14 ± 0,67
N16	<i>Scenedesmus ellipsoideus</i>	12,21 ± 0,41	13,87 ± 0,83
N17	<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lag.) Chodat	23,21 ± 0,91	25,65 ± 0,76
N18	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	15,22 ± 0,70	14,81 ± 0,71
M1	<i>Amphora</i> sp.	17,35 ± 0,81	15,34 ± 0,50
M2	<i>Chaetoceros</i> sp.	18,98 ± 1,16	21,24 ± 0,53
M3	<i>Nitzschia</i> sp.	18,54 ± 0,76	15,65 ± 0,67
M5	<i>Chlamydomonas</i> sp.	18,54 ± 0,68	19,23 ± 0,59
M7	<i>Cyanodictyon cf. endophyticum</i> Pascher	16,13 ± 0,44	14,53 ± 0,61
M8	<i>Dunaliella</i> sp.	15,67 ± 0,45	13,84 ± 0,43
M9	<i>Chloridella</i> sp.	14,56 ± 0,60	16,84 ± 0,67

M10	<i>Nannochloropsis</i> sp.	26,76 ± 0,37	24,32 ± 0,74
M13	<i>Fernandinella</i> sp.	16,32 ± 0,42	17,54 ± 0,55
M16	<i>Tetraselmis</i> sp.	28,32 ± 0,86	29,12 ± 0,71
M17	<i>Chlorella</i> sp.	24,56 ± 0,18	26,86 ± 0,23

* 2 chủng M18, M19 chưa khảo sát

Bảng 1 và Hình 1, trong 19 chủng khảo sát chỉ có chủng N4 đạt hiệu suất ly trích lipid nhỏ hơn 10%, có 5 chủng đạt hiệu suất ly trích lipid từ 10 – 15%: N16, N18, M7, M8, M9, có 6 chủng đạt hiệu suất ly trích lipid từ 15% – 20%: N3,

M1, M2, M3, M5, M13, có 4 chủng đạt hiệu suất ly trích lipid từ 20 – 25%: N5, N14, N17, M10 và 3 chủng đạt hiệu suất ly trích lipid ≥ 25 %: N12, M16, M17.



Hình 7. Hiệu suất ly trích lipid từ các chủng vi tảo

Chủng N12, N18, M, M3, M7, M8, M10 đạt hiệu suất ly trích lipid lần lượt là 27,35 %, 15,22 %, 17,35 %, 18,54 %, 16,13 %, 15,67 %, 26,76 % lipid/ trọng lượng khô sinh khối tảo khi ly trích bằng phương pháp Soxhlet cao hơn 1,08, 1,03, 1,13, 1,18, 1,11, 1,13, 1,10 lần so với lượng lipid ly trích bằng phương pháp Bligh và Dyer đạt 25,34 %, 14,81 %, 15,34 %, 15,65%, 14,53 %, 13,84 %, 24,32 % tương ứng. Ngược lại, các chủng N3, N4, N5, N14, N16, N17, M2, M5, M9, M13, M16, M17 đạt hiệu suất ly trích lipid lần lượt là 16,75 %, 9,67 %, 22,23 %, 25,14 %, 13,87 % 25,65 %, 21,24 %, 19,23 %, 16,84 %, 17,54 %, 29,12 %, 26, 86 % bằng phương pháp Bligh và Dyer cao hơn 1,09, 1,08, 1,06, 1,17, 1,14, 1,11, 1,12, 1,04, 1,15, 1,07, 1,03, 1,09 lần so với lượng lipid ly trích bằng phương pháp soxhlet đạt 15,34 %, 8,89 %; 21,04 %, 21,37 %, 12,21%,

23,21 %, 18,98 %, 18,54 %, 14,56 %, 16,32 %, 28,32 %, 24,56 % tương ứng. Như vậy, việc sử dụng 2 phương pháp này là cho kết quả gần tương đương nhau.

Theo các bài báo đã công bố trên thế giới, một số loài vi tảo có chứa hàm lượng lipid cao: *Chlorella* sp :15-29%, *Dunaliella tertiolecta*: 36–42 %, *Nannochloropsis*: 31–68%, *Nitzschia*: 28–50 %, *Scenedesmus* 16 - 40 %, *Tetraselmis suecica*: 15 – 32 % [6, 7]. Nhìn chung, những kết quả nghiên cứu của nhóm chúng tôi cũng phù hợp với những kết quả nghiên cứu của thế giới và có khoảng trên 10 chủng vi tảo là những chủng rất có tiềm năng để phục vụ sản xuất Biodiesel và cho những ứng dụng nghiên cứu sâu hơn trong việc tăng cường khả năng sinh tổng hợp lipid và cải tiến giống.

KẾT LUẬN

Khảo sát khả năng tăng trưởng và tích lũy lipid nội bào 8 chủng vi tảo nước ngọt và 13 chủng vi tảo nước mặn đã tuyển chọn, chúng tôi thu được những kết quả sau: Các chủng nước ngọt: 2 chủng N12 - *Pediastrum duplex* Meyen và N14 - *Cosmarium cf. sumatranum* Krieger tích trữ lipid cao theo tín hiệu OD 485/535, 2 chủng N3 *Kirneriella obesa* (West) Schmidle – và N18 - *Scenedesmus dimorphus* có khả năng tăng trưởng cao nhất. Theo tín hiệu OD485/535/OD750, 2 chủng N12 - *Pediastrum duplex* Meyen và N17 - *Scenedesmus acuminatus* được ưu tiên lựa chọn. Các chủng nước mặn:

chủng M5 - *Chlamydomonas* sp. tích trữ lipid cao theo tín hiệu OD_{485/535}, chủng M1 – *Amphora* sp. có khả năng tăng trưởng cao nhất. Theo tín hiệu OD_{485/535}/OD₇₅₀, chủng M19- *Navicular* sp. được ưu tiên lựa chọn. Hiệu suất ly trích lipid của các chủng tảo khá cao, nhất là 2 chủng N12 - *Pediastrum duplex* Meyen (25,34 % - 27,35 %) và M16 – *Tetraselmis* sp. (28,32 % - 29,12 %). Có 1 chủng đạt hiệu suất ly trích lipid nhỏ hơn 10 %, 5 chủng đạt 10 – 15 %, 6 chủng đạt 15 % – 20 %: N3, M1, M2, M3, M5, M13, có 4 chủng đạt 20 – 25 % , 3 chủng đạt ≥ 25 %: N12, M16, M17.

Đây đều là những chủng có tiềm năng trong sản xuất biodiesel.

Study on growth and lipid biosynthesis of microalgae strains isolated in Vietnam

- Nguyen Thi My Lan
- Doan Thi Mong Tham
- Huynh Hiep Hung
- Le Thi Thanh Loan
- Pham Thanh Ho
- Le Thi My Phuoc

University of Science, VNU-HCM

- Nguyen Tien Thang
- Institute of Tropical Biology HCMC

ABSTRACT

Microalgal biodiesel is considered an alternative to fossil fuel and also potentially reduce the introduction of new CO₂ by displacing fossil hydrocarbon fuels. Nowadays, researching on renewable energy is mainly focus on biodiesel from

microalgae due to their fast growth rates and high-yield production. In order to improve this field in Vietnam, we isolated some local species and used rapid screening method for lipid production in microalgae based on Nile Red fluorescence. Furthermore,

providing a reference for the future biodiesel production using these microalgal species, we also determined lipid contents of these

species ranged from 8.89% to 29.12% in natural culturing conditions by soxhlet and Bligh & Dyer methods.

Keywords: Biodiesel, microalgae, Nile Red, renewable energy, lipid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Demirbas, M. F. Demirbas, Important of algae oil as a source of biodiesel, *Energy Conversion and Management*, 52, 163-170 (2011).
- [2]. D. Elsey, D. Jameson, B. Raleigh, M.J. Cooney, Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 639-642 (2007).
- [3]. E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911 – 917 (1959).
- [4]. E. Ryckebosch, K. Muylaert, I. Fourbert, Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae, *J Am Oil Chem Soc.*, 89, 189 – 198 (2011).
- [5]. E.W. P. Juergen, From Bio-Processing for new microalgae strains to strain engineering, Laboratory of Experimental & Applied Phycology, Department of Biology, Brooklyn College of CUNY, 2090 Bedford Ave., Brooklyn, NY 11210, USA (2009).
- [6]. L. Barsanti, P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Published by CRC press, Taylor & Francis Group (2006).
- [7]. N.T.M. Lan, L.T.M. Phước và cộng sự., Nghiên cứu và thiết lập quy trình nuôi vi tảo có hàm lượng lipid cao để sản xuất biodiesel, Đề tài cấp trọng điểm Đại học Quốc gia TP.HCM (nghiệm thu 03-2014).
- [8]. O. LeBlanc, Comparision of different solvents used in microalogaee biomass extraction, A report submit to Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University, USA, (2011).
- [9]. T. Duc, A. Mirza, S. Registe, L. Sakkal, A. Huang, S. Portilla, L. Chang, Fisher- Ramos C., J. E.W. Polle., High throughput isolation and screening of new microalgae for biofuel application, Department of Biology, Brooklyn College of CUNY, 2090 Bedford Ave., Brooklyn, NY 11210, USA (2010).
- [10]. High throughput isolation And screening of new microalgae for biofuel application, Department of Biology, Brooklyn College of CUNY, 2090 Bedford Ave., Brooklyn, NY 11210, USA (2010).
- [11]. W. Chen, C.W. Zhang, L.R Song, M. Sommerfeld., Q. Hu, A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae, *Journal of Microbiological Methods*, 77, 41-47 (2009).