

SÀNG LỌC CÁC CHỦNG VI TẢO CHỨA LIPID TRÊN MỘT SỐ ĐIỂM Ở MIỀN NAM VIỆT NAM

Nguyễn Thị Mỹ Lan^{1*}, Nguyễn Hoàng Ngọc Phương¹, Huỳnh Hiệp Hùng¹, Nguyễn Tiến Thăng², Lê Thị Thanh Loan¹, Đoàn Thị Mộng Thắm¹, Phạm Thành Hồ¹, Lê Thị Mỹ Phước¹

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG tp Hồ Chí Minh, *ntmlan@hcmus.edu.vn

²Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

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 ở địa phương và sử dụng phương pháp sàng lọc nhanh để định tính lipid trong vi tảo dựa trên phương pháp nhuộm các tế bào vi tảo với thuốc nhuộm huỳnh quang Nile Red. Chúng tôi đã tuyển chọn được 6 chủng vi tảo nước ngọt: *Pediastrum duplex* Meyen, *Asterococcus limneticus* G. M. Smith, *Coelastrum cambricum* Archer, *Cosmarium cf. sumatranum* Krieger, *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat và *Scenedesmus acuminatus* (Lag.) Chodat, có chứa lipid từ các mẫu nước từ các ao hồ và 10 chủng vi tảo nước mặn: *Amphora* sp., *Chaetoceros* sp., *Nitzschia* sp., *Chlamydomonas* sp., *Cyanodictyon cf. endophyticum* Pascher, *Dunaliella* sp., *Chloridella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Fernandinella* sp. và *Tetraselmis* sp. từ mẫu nước tại các ruộng muối, các ao nuôi tôm và nước biển.

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

MỞ ĐẦU

Hiện nay, nhu cầu sử dụng các nguồn năng lượng đang gia tăng nhanh chóng do sự bùng nổ dân số và công nghiệp hóa toàn cầu. Hơn 80% năng lượng sử dụng hiện nay trên thế giới là từ nhiên liệu hóa thạch (dầu mỏ, than đá, khí thiên nhiên). Đây là những nguồn năng lượng không tái sinh được và có giới hạn. Đứng trước thực tế nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt và việc sử dụng chúng giải phóng lượng lớn khí thải gây ra hiệu ứng nhà kính, nên trong vài thập niên gần đây, biodiesel đang trở thành đề tài nghiên cứu thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học trong và ngoài nước. Việc sử dụng biodiesel không những giảm sự phụ thuộc vào các nguồn dầu mỏ, than đá mà còn khép kín quy trình tuần hoàn carbon.

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 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. 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 còn là hướng đi mới và đang nghiên cứu.

Mục tiêu nghiên cứu của đề tài: phân lập và sàng lọc chủng vi tảo chứa lipid ở miền Nam Việt Nam, làm cơ sở để sản xuất Biodiesel.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Nguồn phân lập: 35 mẫu nước ao hồ tại các quận, huyện: quận 3, quận 6, quận 8, quận 11, quận Thủ Đức, huyện Hóc Môn, huyện Bình Chánh và 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.

Phân tích định tính lipid nội bào bằng phương pháp nhuộm các tế bào vi tảo với thuốc nhuộm huỳnh quang Nile red [5]

Để phát hiện các giọt lipid tích trữ trong tế bào tảo, chúng tôi sử dụng phẩm nhuộm huỳnh quang Nile Red để nhuộm mẫu và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Olympus BX 51 Fluorescence Microscopy). Dưới kính hiển vi huỳnh quang, các giọt lipid bắt thuốc nhuộm sẽ cho thấy màu vàng hoặc vàng cam. Quan sát ở ánh sáng thường và ánh sáng phổ huỳnh quang màu lục để so sánh. Các chủng tảo có chứa lipid được chọn lọc và giữ giống trong môi trường lỏng, rồi tiến hành định danh.

Định danh vi tảo

Việc phân loại và định danh các loài vi tảo theo phương pháp truyền thống chủ yếu dựa vào các đặc điểm kiểu hình bao gồm các đặc điểm hình thái, sinh lý, dinh dưỡng và đặc điểm sinh thái [2, 4, 7, 8, 9].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập

Qua quá trình phân lập và làm thuần, chúng tôi thu được các chủng sau:

Tảo nước ngọt: 17 chủng vi tảo nước ngọt đã được phân lập từ 35 mẫu nước ao hồ tại các quận, huyện: quận 3, quận 6, quận 8, quận 11, quận Thủ Đức, huyện Hóc Môn, Bình Chánh được ký hiệu từ N1 đến N17.

Tảo nước mặn: 18 chủng vi tảo đã được phân lập từ 57 mẫu nước ở một số ruộng muối, ao nuôi tôm, nước biển ở tỉnh Bến Tre, tỉnh Đồng Nai, tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, tỉnh Khánh Hòa, tỉnh Bình Định được ký hiệu từ M1 đến M18.

Định tính lipid nhanh bằng phẩm nhuộm Nile Red và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở sắc ánh sáng Blue

Kết quả là các chủng vi tảo cho tín hiệu dương tính có sự hiện diện các giọt lipid màu vàng; các chủng vi tảo cho tín hiệu âm tính thì không có. Các chủng vi tảo có chứa lipid được tuyển chọn khi dương tính với test lipid (hình 1).

Các chủng tuyển chọn bao gồm: 6 chủng vi tảo nước ngọt có ký hiệu: N4, N5, N12, N14, N16 và N17; 10 chủng vi tảo nước mặn có ký hiệu: M1, M2, M3, M5, M7, M8, M9, M10, M13 và M16.

Định danh vi tảo

Sau khi đã tuyển chọn được 6 chủng vi tảo nước ngọt và 10 chủng vi tảo nước mặn có chứa lipid nội bào, 6 chủng vi tảo nước ngọt và 10 chủng vi tảo nước mặn đã được phân lập và định danh.

Kết quả định danh 6 chủng vi tảo nước ngọt được tuyển chọn

Asterococcus limneticus G. M. Smith (N4): Tập đoàn hình cầu, 4-16 tế bào được bao quanh bởi một màng chất nhầy không màu đồng nhất trôi lơ lửng tự do trong môi trường. Lục lạp hình sao với 4-16 thùy xòe ra từ một lõi trung tâm. Các tế bào có đường kính 10-25 µ.

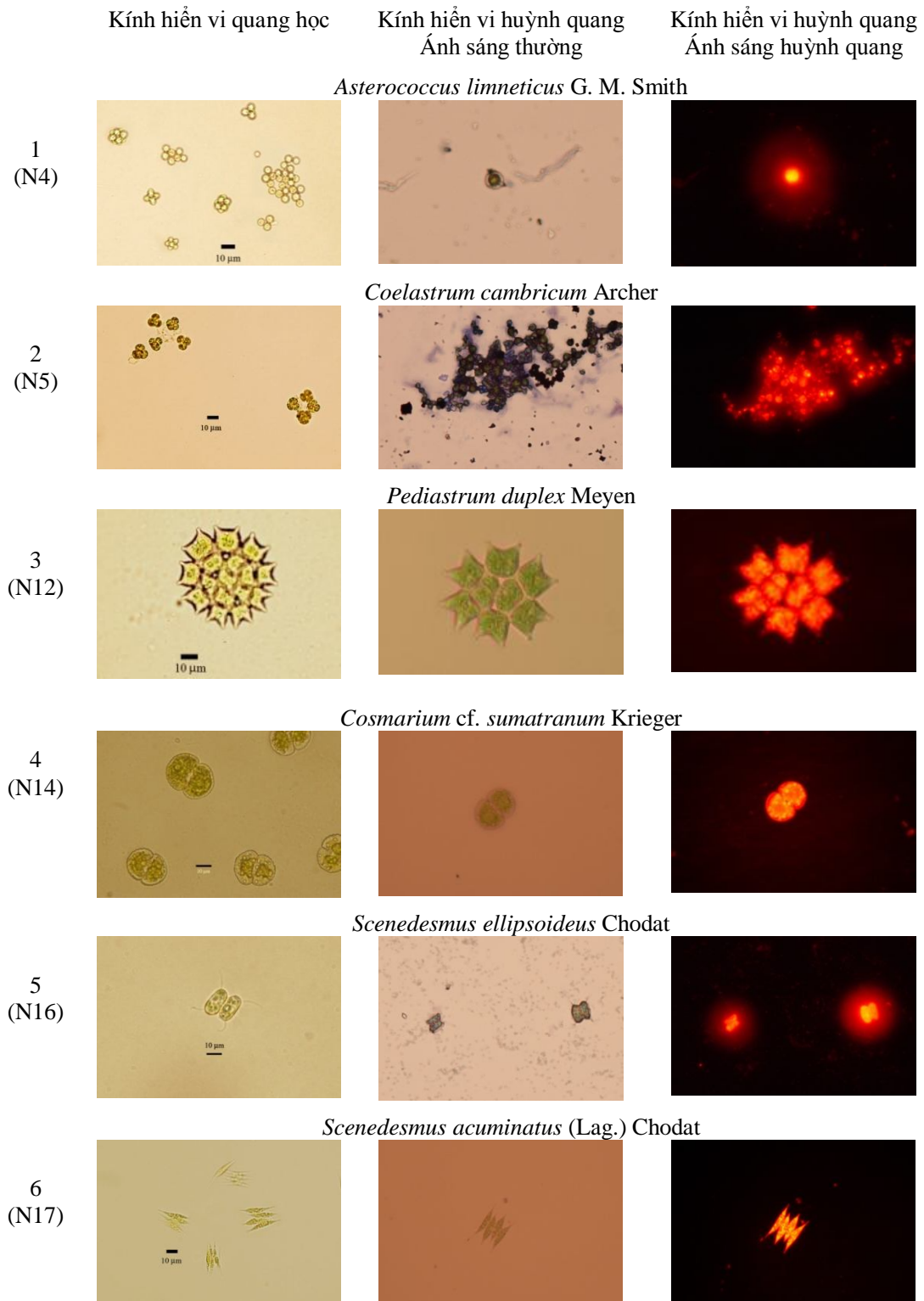
Coelastrum cambricum Archer (N5): Tập đoàn hình tròn, 8-16 tế bào. Tế bào có màng ngoài tách biệt, có mấu ở đỉnh và 5-6 mấu bên cạnh, rộng. Khoảng gian bào có góc cạnh. Tế bào tròn trịa. Các tế bào có đường kính 10-20 µ bao gồm lớp vỏ bọc.

Pediastrum duplex Meyen (N12): Tập đoàn có khe hở, 6-32 tế bào, có dạng chữ H. Các tế bào bên trong có hình vuông, có góc cạnh, mép tế bào có các chỗ lõm. Các tế bào nằm ngoài phân thùy thành 2 chôi dài.

Cosmarium cf. sumatranum Krieger (N14): Đơn bào, hình phiến có nhiều dạng khác nhau, thắt eo ở trung tâm tế bào, mỗi nửa tế bào có dạng hình quả thận.

Scenedesmus ellipsoideus Chodat (N16): Các tế bào xếp thẳng hàng hoặc so le, hình elip, sườn dính sát nhau. Tập đoàn gồm 2-4 tế bào. Tế bào bên ngoài có một sợi sinh chất ở mỗi đầu, đôi khi một tế bào bên trong cũng có gai.

Scenedesmus acuminatus (Lag.) Chodat (N17): Cộng đơn bào (tập đoàn) gồm 4 tế bào, các tế bào dính với nhau ở sườn. Tế bào hình elip hẹp, đầu tế bào hơi thắt nhọn. Tập đoàn đẹp, tế bào bên trong thẳng, tế bào bên ngoài hình vòng cung.



Hình 1. Kết quả kiểm tra lipid 6 chủng vi tảo nước ngọt được tuyển chọn (×600)

Kết quả định danh 10 chủng vi tảo nước mặn được tuyển chọn (hình 2)

Amphora sp. (M1): Tế bào đơn, không di động, dạng elip có tính đối xứng theo chiều dọc. Mép phần lưng lồi ra, phần bụng thẳng, hơi khuyết. Sống đơn lẻ hay từng cặp, hay tập trung ở đáy. Sinh sản vô tính bằng cách phân đôi. Chiều dài ~ 8-10 µm.

Chaetoceros sp. (M2): Các tế bào thường có dạng hình chữ nhật với vòng khung bao quanh bên ngoài. Lông cứng đối diện cảm ứng tế bào liền kề gần với chúng. Chiều dài ~ 5-8 µm.

Nitzschia sp. (M3): Tảo silic đơn bào, tế bào dài, thẳng và hẹp, hình thoi, trụ tròn hoặc trụ chữ nhật nhưng có thể có hình trứng. Thường ở dạng đơn lẻ hoặc tập trung thành cụm ở đáy, có thể tạo thành những tập đoàn hình sao hoặc sống trong các ống chất nhầy. Các tế bào chứa 2 plastid và 2 plastid này thì hướng về mỗi cực của tế bào. Tế bào đối xứng ngang, có khuyết ở giữa, có một lục lạp trong mỗi một nửa. Chiều dài ~10-20 µm, chiều rộng ~3-4 µm.

Chlamydomonas sp. (M5): Đơn bào, sống đơn lẻ, không tập trung, tế bào hình cầu hoặc hình trứng, đầu nhọn, đôi khi hơi tròn, cử động rất rõ. Lục lạp hình đĩa, có 2 lông roi hướng về trước, có không bào co bóp, đốm mắt màu đỏ, di động hướng sáng. Tế bào phân chia tạo 2-8 bào tử. Chiều dài ~8-12 µm, chiều rộng ~6-9 µm.

Cyanodictyon cf. *endophyticum* Pascher (M7): Các tế bào có thể ở dạng cầu, hoặc hơi kéo dài dạng que, nhỏ, dài ~5-8 µm, không có túi khí rõ ràng, có màu xanh lá cây nhạt, xám, hoặc ô liu, hoặc thấy dạng phẳng khi quan sát dưới kính hiển vi, hơi nhót, có cấu trúc mắt lưới không theo quy luật, hoặc khi sống tập đoàn các tế bào nối kéo dài ra trong không gian ba chiều, tạo thành từ những chuỗi nhầy nối với nhau hoặc những đoạn nhánh không theo quy luật, sau đó tạo thành một khối vô định hình với các lỗ.

Dunaliella sp. (M8): Đơn bào, di động nhanh; sống đơn lẻ, không tập trung thành bầy, kết cụm hay dạng chuỗi; tế bào trần (không có vách tế bào hay màng bao); dạng hình bầu dục, trứng đầu nhọn hay elip; đối xứng qua tâm; phần đầu hơi trong suốt, có 2 lông roi dài bằng nhau; lục lạp dạng bát, có thể có màu đỏ hay cam do lượng sắc tố carotenoid; có 1 hoặc hiếm

khí 2 điểm mắt màu đỏ; 2 không bào co bóp ở phía trước, bên dưới gốc roi. Chiều dài ~10-15 µm, chiều rộng ~6-10 µm.

Chloridella sp. (M9): Đơn bào, tế bào hình cầu, cử động rất rõ nhưng không nhìn thấy chiên mao, di động, sống đơn lẻ, không tập trung hay kết cụm, màu nâu vàng. Kích thước ~4-5 µm.

Nannochloropsis sp. (M10): Đơn bào, di động liên tục. Sống đơn lẻ, không tập trung thành bầy hay dạng chuỗi. Tế bào hình cầu, có đốm lục lạp hơi đậm ở giữa. Kích thước ~3-4 µm.

Fernandinella sp. (M13): Đơn bào, di động, sống đơn lẻ, không kết cụm. Tế bào hình trứng, elip, đôi khi hơi tròn. Thay đổi hình dạng do môi trường. Có 2 roi hướng về trước chèn giữa lưng bụng bên phải tế bào. Tế bào có rãnh kéo dài từ đầu đến cuối thân. Kích thước ~5-6 µm.

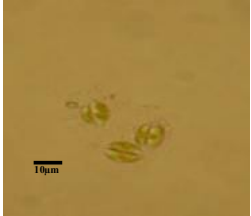
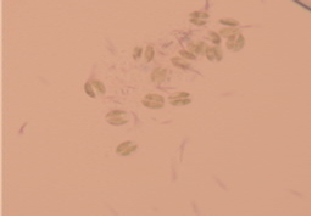

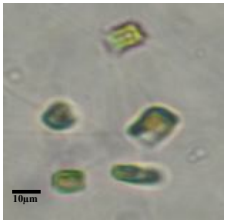

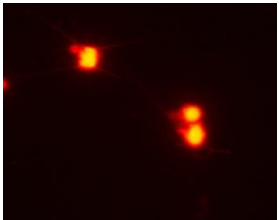
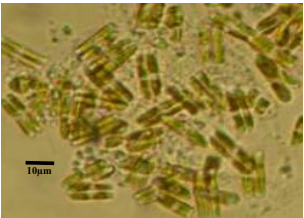

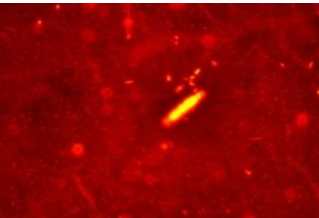
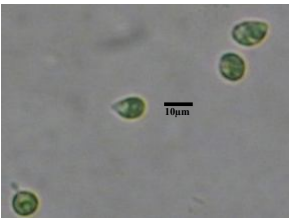
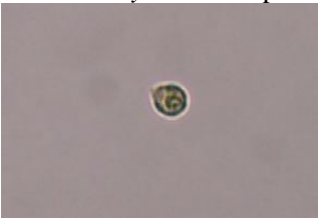

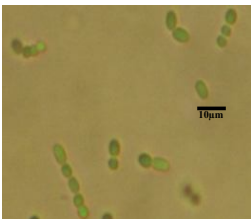
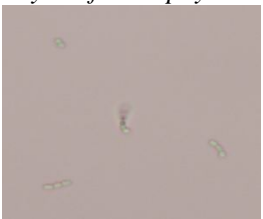
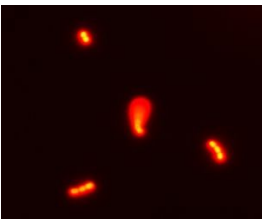
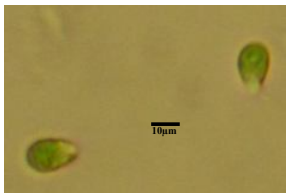
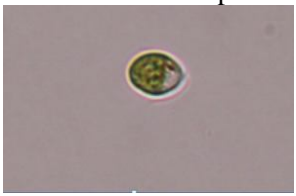
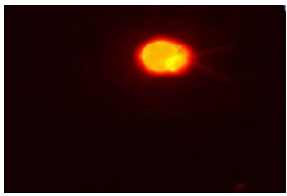
Tetraselmis sp. (M16): Đơn bào, di động, tế bào hình trứng hoặc elip, có vách tế bào rõ ràng; có 4 roi, lục lạp hình chén, vách tế bào rõ ràng. Có 1 điểm mắt lớn màu đỏ, 2 không bào co rút nằm ở góc các roi. Kích thước 15-25 µm.

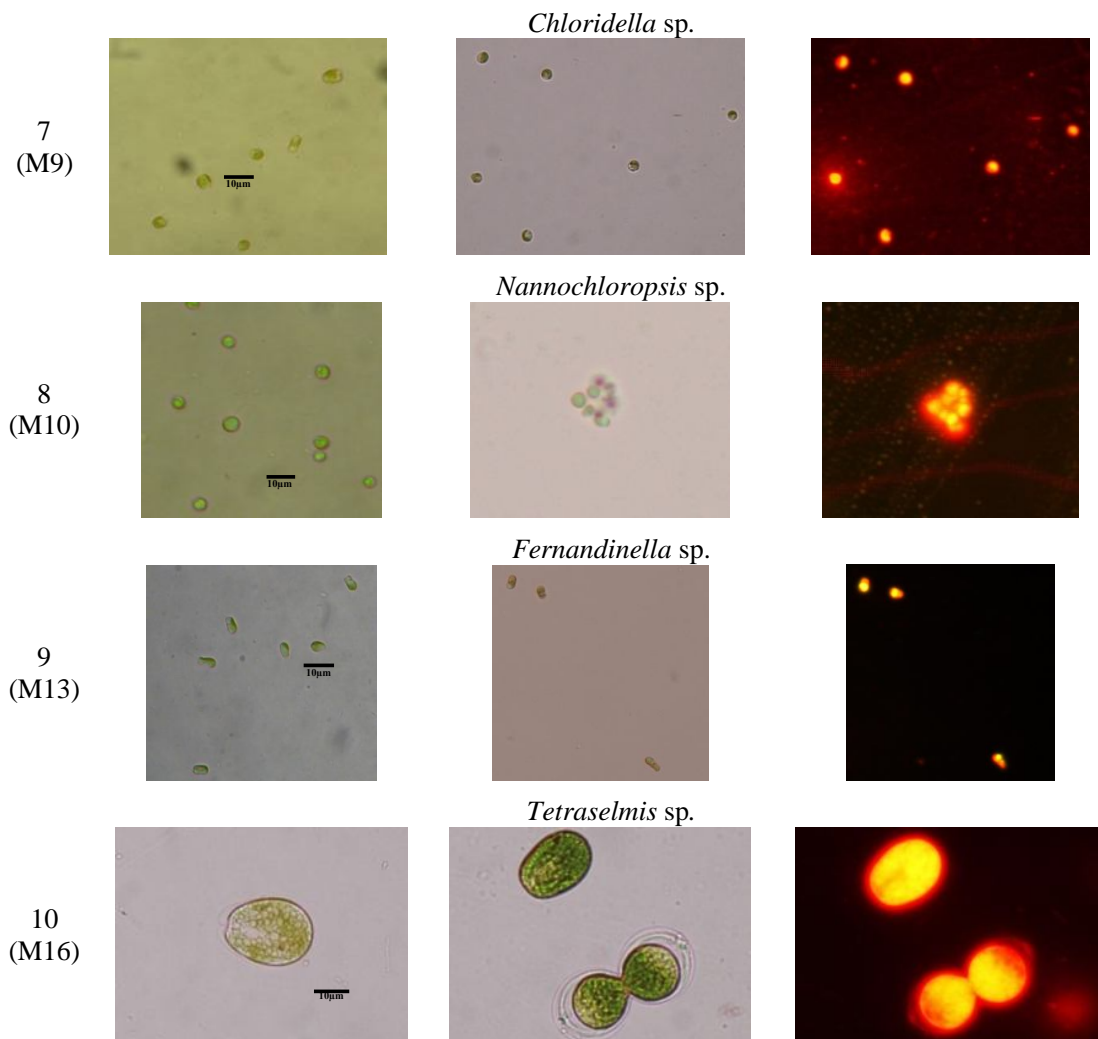
KẾT LUẬN

Từ 35 mẫu nước từ một số ao hồ tại 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, đã tuyển chọn được 6 chủng vi tảo nước ngọt có chứa Lipid thuộc các chủng: *Pediastrum duplex* Meyen, *Asterococcus limneticus* G. M. Smith, *Coelastrum cambricum* Archer, *Cosmarium* cf. *sumatranum* Krieger, *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat và *Scenedesmus acuminatus* (Lag.) Chodat.

Từ 57 mẫu nước ở một số ruộng muối, ao nuôi tôm, nước biển ở một số tỉnh miền Nam Việt Nam, 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, đã tuyển chọn được 10 chủng vi tảo nước mặn 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. và *Tetraselmis* sp..

Hình 2. Kết quả kiểm tra lipid 10 chủng vi tảo nước mặn được tuyển chọn (×600)

Chủng	Kính hiển vi quang học	Kính hiển vi huỳnh quang Ánh sáng trắng <i>Amphora</i> sp.	Kính hiển vi huỳnh quang Ánh sáng huỳnh quang
1 (M1)			
2 (M2)			
3 (M3)			
4 (M5)			
<i>Cyanodictyon cf. endophyticum</i> Pascher			
5 (M7)			
<i>Dunaliella</i> sp.			
6 (M8)			



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ayhan D., Demirbas M. F., 2011. Important of algae oil as a source of biodiesel. *Energy conversion and Management*, 52: 163-170.
2. Barsanti L., Gualtieri P., 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Published by CRC press, Taylor & Francis Group, 35-130.
3. Bischoff H. W., Bold H. C, 1963. *Phycological Studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species*. Univ. Texas Publ., 6318: 1-95.
4. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Hoài Hà, 2006. Vi tảo (Microalgae). *Vietsciences*: 1-32.
5. Elsey D., Jameson D., Raleigh B., Cooney M. J., 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 639-642.
6. Kaur S., Manas S., 2012. Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. *New Biotechnology*, 29(3): 332-344.
7. Prescott G. W., 1961. *Algae of the Western Great Lakes Area*. WM. C. Brown Co. Inc., Dubuque, Iowa, USA. Granbook Institute of science, 946p.
8. Đặng Thị Sy, 2005. *Tảo học*. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.

9. Dương Đức Tiến, Võ Hành, 1997. Tảo nước ngọt Việt Nam - Phân loại Bộ Tảo lục (Chlorococcales). Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
10. Yi-Ying Pan, Suz-Ting W., 2011. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology* 102: 10510-10517.

SCREENING FOR MICROALGAE STRAINS CONTAINING LIPID IN SOME PLACES IN SOUTHERN VIETNAM

Nguyen Thi My Lan¹, Nguyen Hoang Ngoc Phuong¹, Huynh Hiep Hung¹, Nguyen Tien Thang², Le Thi Thanh Loan¹, Doan Thi Mong Tham¹, Pham Thanh Ho¹, Le Thi My Phuoc¹

¹University of Science, VNU-HCM

²Institute of Tropical Biology, VAST

SUMMARY

Microalgal biodiesel is considered as 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 focused 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. In this study we determined 6 microalgae strains namely *Pediastrum duplex* Meyen, *Asterococcus limneticus* G. M. Smith, *Coelastrum cambricum* Archer, *Cosmarium* cf. *sumatranum* Krieger, *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat and *Scenedesmus acuminatus* (Lag.) Chodat containing lipid from freshwater samples from ponds and lakes and 10 strains viz *Amphora* sp., *Chaetoceros* sp., *Nitzschia* sp., *Chlamydomonas* sp., *Cyanodictyon* cf. *endophyticum* Pascher, *Dunaliella* sp., *Chloridella* sp., *Nannochloropsis* sp., *Fernandinella* sp. and *Tetraselmis* sp. from salt-water samples at salterns, shrimp ponds and seas.

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

Ngày nhận bài: 17-4-2013