

**BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

PHAN MINH TÂM

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ
CHỌN LỌC CÁC CHỦNG TẢO *CHLORELLA* SP.
ĐƯỢC THU THẬP Ở MỘT SỐ TỈNH NAM BỘ**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã ngành: 9.42.02.01

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2025

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**Người hướng dẫn: TS. HUỖNH VĂN BIẾT
PGS. TS. BÙI MẠNH HÀ**

**Luận án được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp trường họp
tại Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

MỞ ĐẦU

Chlorella là một trong những chi tảo lục phổ biến, trong đó *C. vulgaris* là một trong những loài tảo đầu tiên được phân lập bởi Beijerinck (1890), loài tảo này được dùng để nghiên cứu về quá trình quang hợp. Ngày nay, *Chlorella* có đến 44 loài đã được định danh, loài tảo này thường được tìm thấy ở cả thủy vực nước ngọt và nước mặn. Nhiều loài trong chi *Chlorella* có giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học cao. Tuy nhiên, các loài *Chlorella* khác nhau sẽ có thành phần dinh dưỡng và các chất có hoạt tính sinh học cũng khác nhau.

Đặc thù địa lý ở miền Nam Việt Nam có hệ sinh thái đa dạng, đặc biệt là sông ngòi, ao hồ và các vùng đất ngập nước, môi trường sống thích hợp của nhiều loài thủy sinh vật và các loài tảo thuộc chi *Chlorella* cũng không ngoại lệ. Qua quá trình tiến hóa, sinh vật bản địa đã thích nghi tốt với điều kiện môi trường sống. Việc phân lập chi tảo *Chlorella* tại khu vực miền Nam Việt Nam, giúp bảo tồn các dòng tảo bản địa và nguồn gen quý, nhằm khai thác và phát triển hiệu quả nguồn gen này. Đặc tính sinh hoá của sinh khối ở 4 chủng tảo *C. vulgaris* khác nhau, cho thấy hàm lượng lipid và thành phần acid béo đều có sự khác biệt rõ rệt. Sự khác nhau về hàm lượng lipid trong sinh khối và thành phần acid béo sẽ quyết định đến các định hướng ứng dụng cho dòng tảo đó. Hàm lượng lipid và acid béo no cao sẽ có ưu điểm trong sản xuất nguyên liệu sinh học, hàm lượng acid béo không no cao sẽ có tiềm năng để ứng dụng làm thực phẩm chức năng hoặc trong lĩnh vực y dược. Tuy nhiên, đặc điểm phân biệt và điều kiện nhận biết giữa các dòng tảo ở mức độ loài này còn nhiều bỏ ngỏ. Các nghiên cứu đa dạng di truyền cho thấy chỉ thị ISSR là công cụ hữu ích trong các nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể tảo lục (Wongsawad và ctv, 2015). Kết quả nghiên cứu đa dạng di truyền góp phần làm cơ sở dữ liệu ban đầu cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

Tiềm năng của chi tảo *Chlorella* không chỉ nằm ở sinh khối, mà chi tảo *Chlorella* còn có khả năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong nước. Ứng dụng chi tảo *Chlorella* vào xử lý nước thải được cho là phương pháp sản xuất sinh khối tảo ít tốn kém và thân thiện với môi trường. Bên cạnh đó, lipid từ chi tảo *Chlorella* còn được xem như nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng để sản xuất biodiesel (nhiên liệu sinh học). Do đó, luận án mong muốn đánh giá được mức độ đa dạng thành phần loài của chi tảo *Chlorella*, xác định được các

loài trong chi tảo *Chlorella* chiếm ưu thế và sự khác biệt về mặt di truyền của các loài trong chi *Chlorella* chiếm ưu thế. Từ đó, các chủng *Chlorella* được tiếp tục đánh giá và chọn lọc theo định hướng hẹp là xử lý nước thải, thử nghiệm thu hồi lipid từ sinh khối tảo, như nguồn nguyên liệu sản xuất biodiesel.

Do đó, đề tài “**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ CHỌN LỌC CÁC CHỦNG TẢO *Chlorella* sp. ĐƯỢC THU THẬP Ở MỘT SỐ TỈNH NAM BỘ**” đã được thực hiện.

Nội dung nghiên cứu:

Nội dung 1: Phân lập và định danh các chủng tảo *Chlorella* spp.

Nội dung 2: Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng tảo *Chlorella* spp. bằng chỉ thị sinh học phân tử PCR-ISSR.

Nội dung 3: Sàng lọc các chủng tảo *Chlorella* có tiềm năng ứng dụng vào xử lý nước thải

Nội dung 4: Thử nghiệm xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* sp. và tách chiết lipid từ sinh khối tảo

Mục tiêu nghiên cứu: 1) phân lập và định danh được các chủng tảo thuộc chi *Chlorella*. 2) đánh giá được mức độ đa dạng di truyền giữa các chủng tảo *Chlorella* đã phân lập được bằng chỉ thị ISSR. 3) xác định được các điều kiện phù hợp khi ứng dụng tảo *Chlorella* đã phân lập được, để giảm nitơ tổng số và chỉ số COD trong nước thải. 4) xác định được điều kiện tối ưu để trích ly lipid từ chủng tảo phân lập được.

Ý nghĩa khoa học

Nghiên cứu đã phân lập thành công các chủng tảo *Chlorella* và thực hiện định danh dựa trên phân tích hình thái kết hợp với trình tự DNA barcode. Đồng thời, luận án tiến hành phân tích đa dạng di truyền của các chủng được thu thập từ một số tỉnh thành ở miền Nam Việt Nam bằng chỉ thị ISSR. Kết quả này đóng góp dữ liệu khoa học quan trọng về đa dạng di truyền của tảo *Chlorella* tại khu vực nghiên cứu. Ngoài ra, nghiên cứu đã xác định được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng CG20, giúp phát huy hiệu quả trong xử lý nước thải. Đồng thời, các điều kiện trích ly lipid từ chủng này cũng được tối ưu hóa nhằm phục vụ ứng dụng trong xử lý nước thải và sản xuất nhiên liệu sinh học, góp phần mở rộng tiềm năng thực tiễn của tảo *Chlorella* trong lĩnh vực môi trường và năng lượng tái tạo.

Ý nghĩa thực tiễn

Luận án xác định được các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng tảo CG-20, giúp phát huy hiệu quả xử lý nước thải. Bên cạnh đó, luận án còn xác định được các điều kiện ly trích tối ưu cho chủng tảo CG-20 và góp phần mở rộng tiềm năng thực tiễn của tảo *Chlorella* trong lĩnh vực môi trường và năng lượng tái tạo.

Đối tượng nghiên cứu: 120 mẫu tảo thu thập từ 5 tỉnh thành khu vực miền Nam Việt Nam (Cần Giờ - Tp Hồ Chí Minh, Bình Dương, Đồng Tháp, Tiền Giang, Long An, Đồng Nai).

Những điểm mới của luận án

Luận án đã phân lập và định danh được 8 chủng tảo thuộc chi *Chlorella*, bao gồm 3 chủng thuộc loài *Chlorella vulgaris*, 2 chủng thuộc loài *Chlorella sorokiniana*, và 3 chủng chưa xác định được loài. Mức độ đa dạng di truyền giữa các chủng tảo *Chlorella vulgaris* đã được làm rõ bằng chỉ thị ISSR, cho thấy sự đa dạng di truyền của các mẫu tảo trong cùng loài chưa có sự tương quan với phân bố địa lý ở các tỉnh, thành trong nghiên cứu.

Xác định được môi trường nuôi thích hợp để phát triển sinh khối chủng *Chlorella vulgaris* CG20, bao gồm môi trường BBM hoặc HAMGAM, cùng với các điều kiện phù hợp để giảm nitơ tổng số và chỉ số COD trong nước thải.

Xác định được điều kiện tối ưu để trích ly lipid từ chủng tảo *Chlorella vulgaris* CG20 bằng phương pháp Taguchi, định hướng ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học. Kết quả phân tích LCA chỉ ra rằng quy trình ly trích lipid từ tảo không có tác động đáng kể đến môi trường.

Bố cục của luận án

Luận án chính thức gồm 100 trang (không bao gồm phụ lục), 3 chương, 33 bảng số liệu và 31 hình. Luận án đã tham khảo 3 tài liệu tiếng Việt và 121 tài liệu tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về tảo *Chlorella*

1.1.1 Tiêu chuẩn hình thái tảo *Chlorella*

1.1.2. Các marker phân tử được dùng để định danh tảo *Chlorella*

1.1.3. Thành phần dinh dưỡng của tảo *Chlorella*

1.2. Đa dạng di truyền ở tảo *Chlorella*

1.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến tăng trưởng của tảo *Chlorella*

1.3.1. Môi trường nuôi cấy

1.3.2. Các thành phần hữu cơ

1.4. Ứng dụng *Chlorella* vào trong xử lý nước thải và thử nghiệm ly trích lipid

1.4.1. Xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella*

1.4.2. Ly trích lipid từ tảo *Chlorella*

CHƯƠNG II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Thời gian

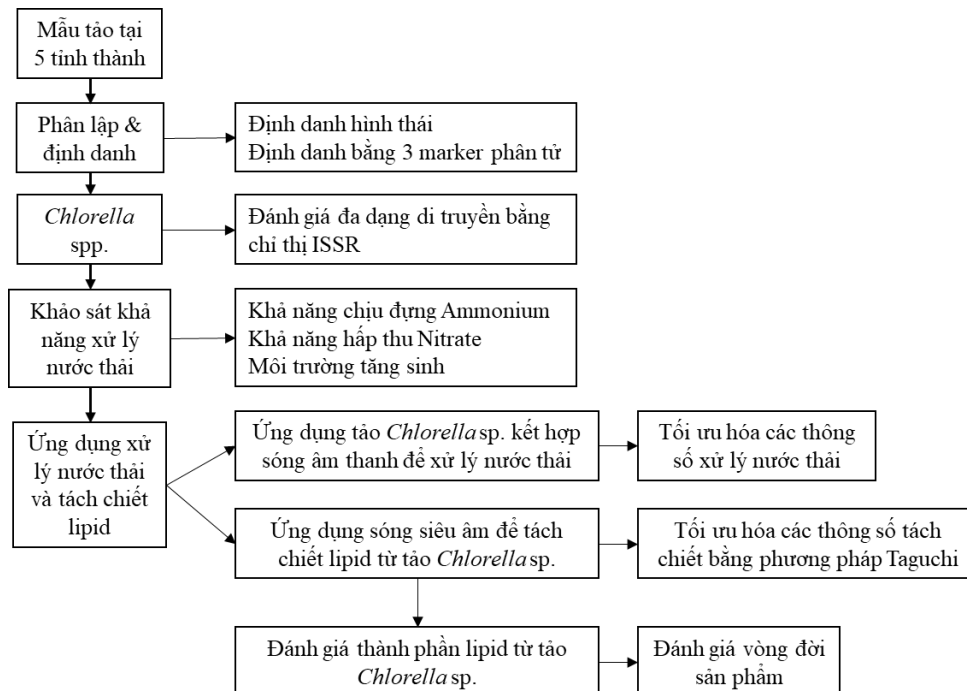
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.3. Vật liệu nghiên cứu

120 mẫu tảo thu tại các vị trí tọa độ khác nhau ở 5 tỉnh thành thuộc khu vực miền Nam Việt Nam (Cần Giờ - Tp. Hồ Chí Minh, Bình Dương, Đồng Tháp, Tiền Giang, Long An và Đồng Nai).

2.4. Phương pháp nghiên cứu



Nội dung 1: Phân lập và định danh các chủng tảo *Chlorella* spp.

Nội dung 2: Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng tảo *Chlorella* spp. bằng chỉ thị sinh học phân tử PCR-ISSR.

Nội dung 3: Sàng lọc các chủng tảo *Chlorella* có tiềm năng ứng dụng vào xử lý nước thải

Nội dung 4: Thử nghiệm xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* sp. và tách chiết lipid từ sinh khối tảo.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Nội dung 1: Phân lập và định danh các chủng tảo *Chlorella* spp.

2.4.1.1. Phương pháp thu mẫu tảo

2.4.1.2. Phương pháp xác định mật độ tế bào tảo

2.4.1.3. Phương pháp phân lập tảo

2.4.1.4. Phương pháp định danh phân tử

2.4.2. Nội dung 2: Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng tảo *Chlorella* spp. bằng chỉ thị sinh học phân tử PCR - ISSR

2.4.2.1. Quy trình PCR với chỉ thị ISSR

2.4.2.2. Xử lý số liệu

2.4.3. Nội dung 3: Sàng lọc các chủng tảo *Chlorella* có tiềm năng ứng dụng vào xử lý nước thải

2.4.3.1. Khảo sát ngưỡng chịu đựng ammonium của tảo *Chlorella*

2.4.3.2. Khảo sát khả năng loại bỏ nitrate của *Chlorella*

2.4.3.3. Khảo sát môi trường nuôi cấy tảo *Chlorella*

2.4.4. Nội dung 4: Thử nghiệm xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* sp. và ly trích lipid từ sinh khối tảo

2.4.4.1. Thử nghiệm xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* sp.

2.4.4.2. Nghiên cứu ly trích lipid từ sinh khối tảo

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nội dung 1: Phân lập và định danh các chủng tảo *Chlorella* spp.

3.1.1. Đánh giá hình thái các mẫu tảo thu được

Bảng 3.1. Kết quả các mẫu có hình thái tương đồng cao với *Chlorella*

STT	Kí hiệu mẫu	Vị trí mẫu	Tọa độ
1	CG-20	Cần Giờ	10.606304, 106.786438
2	BD-33	Bình Dương	11.231530, 106.408205
3	BD-38	Bình Dương	11.344112, 106.354302
4	ĐT-51	Đồng Tháp	10.465146, 105.634903
5	TG-67	Tiền Giang	10.356526, 106.460909
6	LA-81	Long An	10.638113, 106.711047
7	ĐN-112	Đồng Nai	11.098840, 107.048758
8	TG-65	Tiền Giang	10.355330, 106.466491
9	TG-71	Tiền Giang	10.352948, 106.359823
10	LA-83	Long An	10.638960, 106.706904
11	LA-90	Long An	10.514184, 106.557726

3.1.2. Định danh phân tử các mẫu tảo.

3.1.2.1. Phân tích chất lượng DNA tổng số ly trích từ các mẫu tảo

3.1.2.2. Khuếch đại vùng trình tự 18S RNA

3.1.2.3. So sánh và mức độ tương đồng của các vùng trình tự với cơ sở dữ liệu trên

3.1.2.4. Xây dựng cây phát sinh chủng loài

Dựa trên dữ liệu của 3 cây phát sinh chủng loài, cả 3 giả thuyết đều cho thấy các chủng CG-20, BD-38 và ĐT-51 đều nằm chung nhóm monophyletic với tảo *Chlorella vulgaris*. Dựa vào kết quả định danh hình thái được trình bày ở nội dung trên và sự ủng hộ

của 3 giả thuyết tiến hóa. Điều này cho thấy các chủng tảo CG-20, BD-38 và ĐT-51 là chủng *Chlorella vulgaris*.

Đối với mẫu BD-33 và LA-81 đồng thời có được sự ủng hộ của cả 3 giả thuyết. Các giả thuyết đều cho thấy 2 chủng tảo BD-33 và LA-81 có chung nguồn gốc với *Chlorella sorokiniana*. Kèm theo kết quả định danh hình thái và sự ủng hộ của cả 3 giả thuyết có thể kết luận rằng 2 chủng tảo này thuộc loài *Chlorella sorokiniana*.

Đối với mẫu TG-65 và ĐN-112, ba giả thuyết tiến hoá có phần khác biệt. Giả thuyết xây dựng trên vùng trình tự *ITS* cho thấy cả hai chủng đều nằm trong nhóm monophyletic của tảo *Chlorella sorokiniana*. Đối với giả thuyết xây dựng trên vùng 18S rRNA và *rbcL*, cả hai chủng này đều nằm trong nhóm monophyletic của *Chlorella* sp. Do đó, kết quả chỉ có thể khẳng định 2 chủng tảo này là *Chlorella* sp.

Đối với mẫu TG-67, giả thuyết xây dựng từ vùng trình tự 18S rRNA cho thấy chủng tảo này thuộc một nhóm monophyletic của *Chlorella* sp. tách biệt với các nhóm còn lại. Giả thuyết xây dựng từ vùng *rbcL* cho thấy có chung nhóm monophyletic với hai chủng *Chlorella pyrenoidosa* và *Auxenochlorella pyrenoidosa*. Trong khi giả thuyết xây dựng từ vùng *ITS*, chủng tảo này lại nằm trong nhóm monophyletic của chủng *Chlorella vulgaris*. Do đó, kết quả chỉ có thể kết luận chủng tảo này là *Chlorella* sp.

3.2. Nội dung 2: Đánh giá đa dạng di truyền của các chủng tảo *Chlorella* spp. bằng chỉ thị sinh học phân tử PCR-ISSR.

3.2.1. Khảo sát nhiệt độ của các primer sử dụng cho phản ứng PCR – ISSR

Kết quả phân lập ở chuyên đề 1 cho kết quả có 8 chủng *Chlorella*, các chủng này sẽ được dùng để khảo sát và đánh giá đa dạng di truyền.

Bảng 3.2. Nhiệt độ tối ưu của 14 primer được chọn

STT	Tên primer	Trình tự 5' – 3'	Nhiệt độ bắt cặp tối ưu
1	ISSR 1	(AC) ₈ AT	52°C
2	ISSR 2	(AC) ₈ TG	52°C
3	ISSR 4	(AC) ₈ TC	52°C
4	ISSR 5	(AC) ₈ CA	52°C
5	ISSS 6	(AC) ₈ CC	52°C
6	ISSS 8	(AC) ₈ GA	52°C
7	ISSR 9	(AC) ₈ GG	52°C
8	ISSR 10	(TG) ₈ GG	52°C
9	ISSR 11	(AG) ₈ GC	52°C
10	ISSR 12	(AG) ₈ GT	52°C
11	ISSR 13	(AG) ₈ CA	52°C
12	ISSR 14	(AG) ₈ CT	52°C
13	ISSR 15	(AG) ₈ CC	52°C
14	ISSR 17	(ACTG) ₄	52°C

3.2.2. Sản phẩm PCR với chỉ thị ISSR**Bảng 3.3.** Tổng hợp số băng DNA của sản phẩm PCR khuếch đại với 14 primer được khảo sát

Primer	Tổng số băng	Số băng đa hình	Tỉ lệ băng đa hình (%)	Kích thước băng (bp)
ISSR1	14	13	93,9	300 – 2000
ISSR2	12	10	83,3	200 – 3000
ISSR4	14	14	100	250 – 3000
ISSR5	11	11	100	300 – 4000
ISSS6	9	8	88,9	350 – 2500
ISSS8	16	16	100	300 – 3000
ISSR9	12	12	100	400 – 2500
ISSR10	14	14	100	400 – 2500
ISSR11	9	9	100	600 – 2500
ISSR12	11	11	100	250 – 1750
ISSR13	14	14	100	300 – 3000
ISSR14	12	12	100	250 – 3000
ISSR15	17	17	100	300 – 4000
ISSR17	13	13	100	400 – 3000
Tổng	179	175	-	-

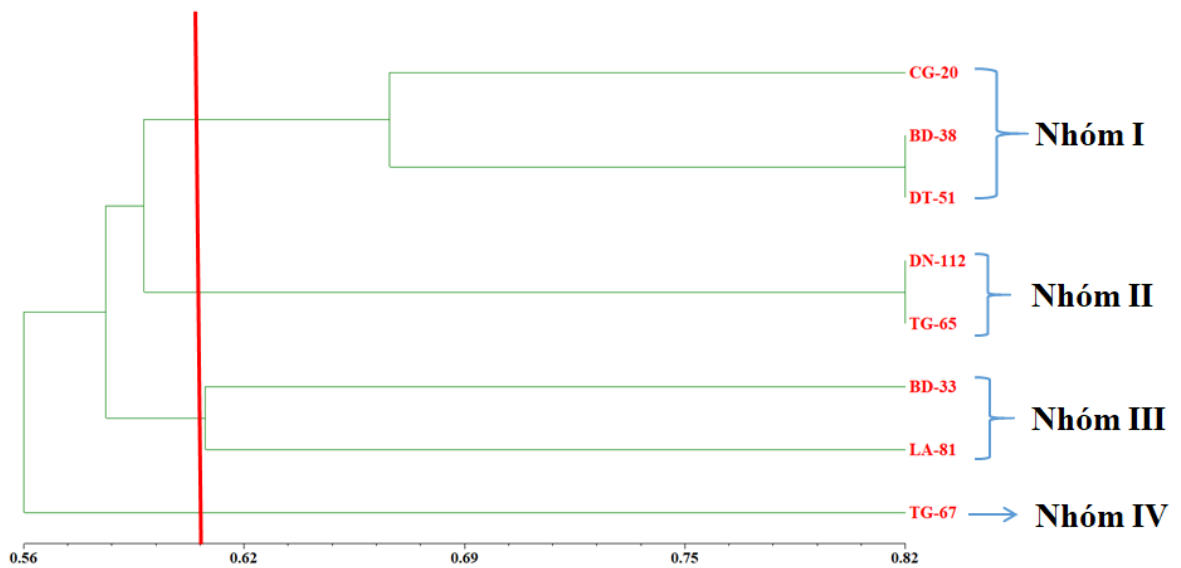
Trung bình	12,78	12,5	97,58	-
------------	-------	------	-------	---

3.2.3. Phân tích sự đa dạng di truyền của 8 mẫu tảo *Chlorella*

Bảng 3.4. Hệ số tương đồng di truyền của 8 mẫu tảo

Mẫu	CG-20	BD-33	BD-38	ĐT-51	TG-67	LA-81	ĐN-112	TG-65	Trung bình
CG-20	1,000								
BD-33	0,6196	1,000							
BD-38	0,6757	0,5452	1,000						
ĐT-51	0,6204	0,5561	0,8152	1,000					
TG-67	0,5282	0,6507	0,5172	0,5607	1,000				
LA-81	0,6102	0,6087	0,5412	0,5412	0,5598	1,000			
ĐN-112	0,6322	0,5343	0,5412	0,5412	0,5707	0,5987	1,000		
TG-65	0,6096	0,5343	0,5669	0,5443	0,5385	0,5661	0,7952	1,000	
Trung bình	0,6137	0,5715	0,5963	0,5468	0,5563	0,5824	0,7952	0	0,6089

Hệ số tương đồng di truyền lớn nhất và nhỏ nhất được in đậm



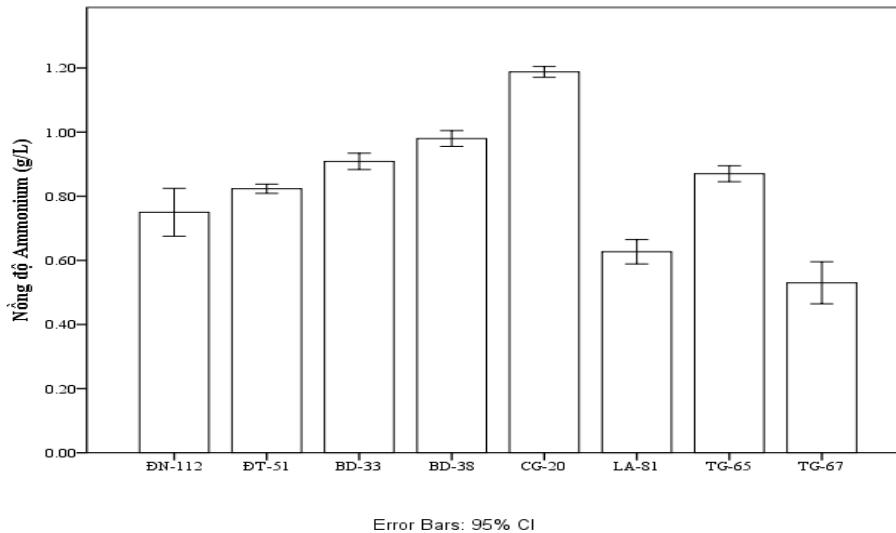
Hình 3.10. Cây phân nhóm di truyền của 8 mẫu tảo *Chlorella*

Cây di truyền được xây dựng bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 chia 8 mẫu tảo thành 4 nhóm (Hình 3.10) với hệ số tương đồng di truyền trung bình là 0,6089. Nhóm I là nhóm có nhiều mẫu nhất gồm ba mẫu CG-20, BD-38 và ĐT-51 đều là chủng *Chlorella vulgaris*

với hệ số tương đồng di truyền là 0,6204 - 0,8152. Nhóm II gồm hai mẫu ĐN-112 VÀ TG-65 cả 2 đều là *Chlorella* sp., với hệ số tương đồng di truyền là 0,7952. Nhóm III gồm hai mẫu là BD-33 và LA-81 *Chlorella sorokiniana*, với hệ số tương đồng di truyền là 0,6087. Nhóm IV chỉ có một mẫu là TG-67 (*Chlorella* sp.).

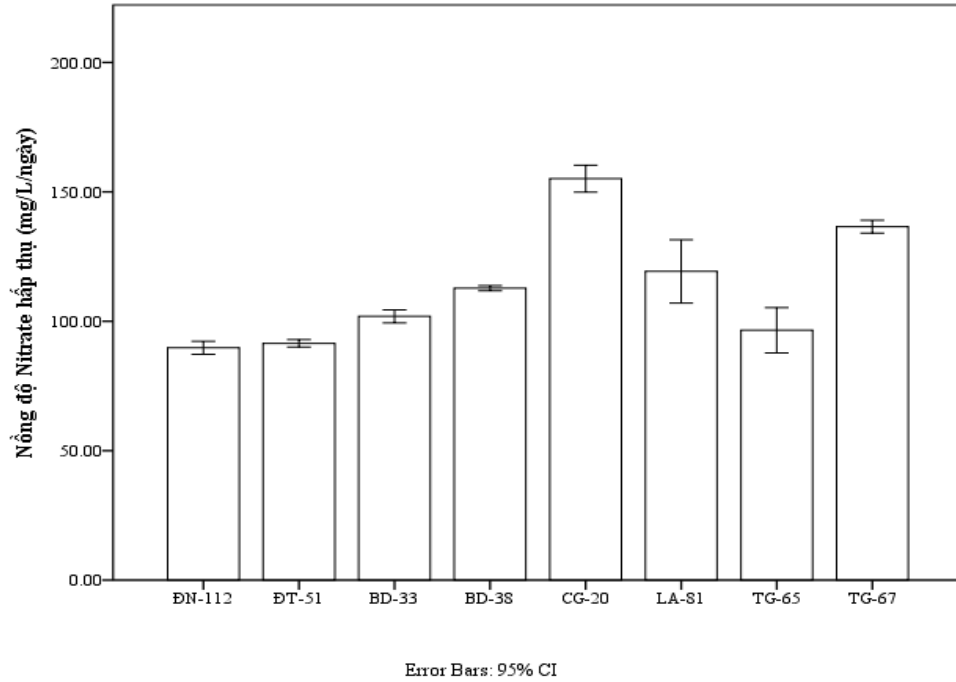
3.3. Nội dung 3: Khảo sát khả năng ứng dụng các chủng tảo *Chlorella* vào xử lý nước thải

3.3.3. Khảo sát ngưỡng chịu đựng NH_4^+ của *Chlorella* spp.



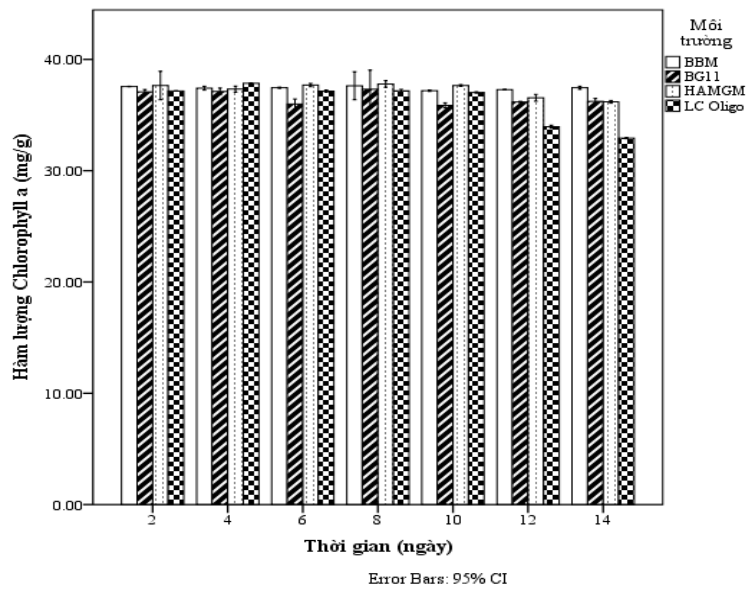
Hình 3.11. Nồng độ Ammonium có tỷ lệ ức chế sinh trưởng 50% đối với các chủng tảo khảo sát

3.3.2. Khảo sát khả năng loại bỏ NO_3^- của *Chlorella* spp.

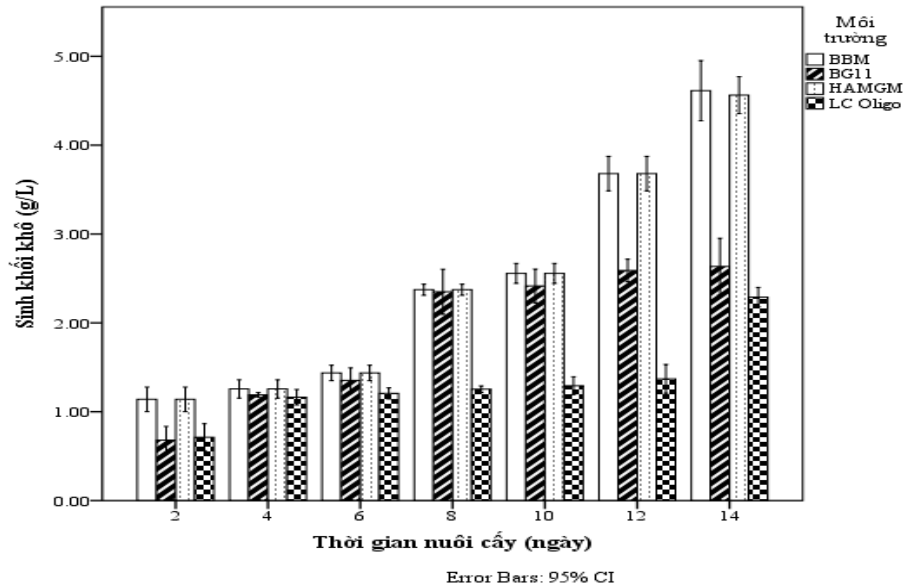


Hình 3.12. Khả năng hấp thụ nitrate của các chủng tảo khảo sát

3.3.3. Khảo sát môi trường nuôi cấy tảo *Chlorella* sp.



Hình 3.13. Hàm lượng chlorophyll a của các chủng tảo *Chlorella* được nuôi cấy ở các môi trường khác nhau



Hình 3.14. Hàm lượng sinh khối khô của các chủng tảo *Chlorella* được nuôi cấy ở các môi trường khác nhau

3.4. Nội dung 4: Thử nghiệm xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* sp. và ly trích lipid từ sinh khối tảo

3.4.1. Thử nghiệm ứng dụng tảo *Chlorella* và sóng âm nhạc vào trong xử lý nước thải

3.4.1.1. Kết quả phân tích mẫu nước thải đầu vào

Bảng 3.11. Thông số nước thải đầu vào chợ đầu mối Hóc Môn

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Giá trị đầu vào
1	pH	-	6,4 - 7,5
2	COD	mg/l	516 - 524
3	TOC	mg/l	150 - 190
4	TN	mg/l	66,9 - 75,7
5	NO ₃ ⁻	mg/l	14,1 - 21,2
6	NH ₄ ⁺	mg/l	47,5 - 60,2
7	BOD ₅	mg/l	357 - 363
8	PO ₄ ³⁻	mg/l	20,5 - 23,1

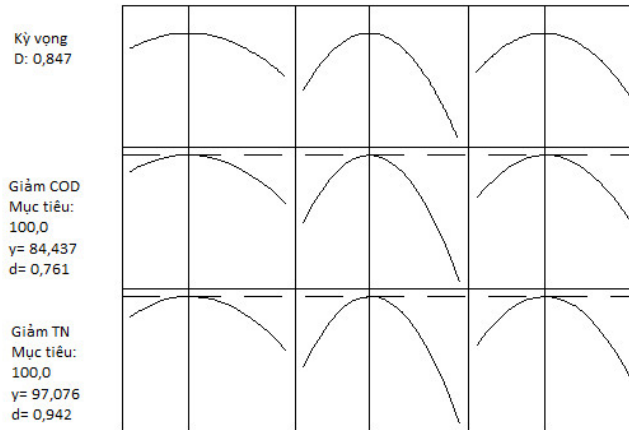
3.4.1.2. Kết quả thử nghiệm xử lý nước thải

Bảng 3.12. Các thông số động học phản ứng để loại bỏ TN trong nước thải chợ truyền thống

Yếu tố	Bậc phản ứng	Phương trình hồi quy	R ²	Hằng số tỷ lệ	t _{1/2} (ngày)
<i>Chlorel la CG-20</i> /âm nhạc	1	$y = 0,3182x + 0,3390$	0,9497	$0,3182 \left(\frac{1}{\text{ngày}}\right)$	2,178
	2	$y = 0,0335x - 0,0217$	0,9685	$0,0335 \left(\frac{L}{\text{mg.ngày}}\right)$	0,419
	3	$y = 0,0108x - 0,0210$	0,8248	$0,0108 \left(\frac{L^2}{\text{mg}^2.\text{ngày}}\right)$	0,027
<i>Chlorel la CG-20</i>	1	$y = 0,1094x + 0,2249$	0,9080	$0,1094 \left(\frac{1}{\text{ngày}}\right)$	6,336
	2	$y = 0,0331x + 0,0165$	0,9770	$0,0331 \left(\frac{L}{\text{mg.ngày}}\right)$	4,524
	3	$y = 1,939 \times 10^{-4}x + 1,674 \times 10^{-4}$	0,9996	$1,939 \times 10^{-4} \left(\frac{L^2}{\text{mg}^2.\text{ngày}}\right)$	0,152
Kiểm chứng	1	$y = 0,0018x + 0,0299$	0,1799	$0,0018 \left(\frac{1}{\text{ngày}}\right)$	385,1
	2	$y = 2,655 \times 10^{-5}x + 0,0144$	0,1771	$2,655 \times 10^{-5} \left(\frac{L}{\text{mg.ngày}}\right)$	19212,7
	3	$y = 7,329 \times 10^{-7}x + 0,0002$	0,1743	$7,329 \times 10^{-7} \left(\frac{L^2}{\text{mg}^2.\text{ngày}}\right)$	11,5
	3	$y = 1 \times 10^{-8}x + 3,94 \times 10^{-9}$	0,9106	$1 \times 10^{-9} \left(\frac{L^2}{\text{mg}^2.\text{ngày}}\right)$	5547,337

3.4.1.3. Các điều kiện tối ưu để xử lý nước thải bằng tảo *Chlorella* kết hợp sóng âm nhạc

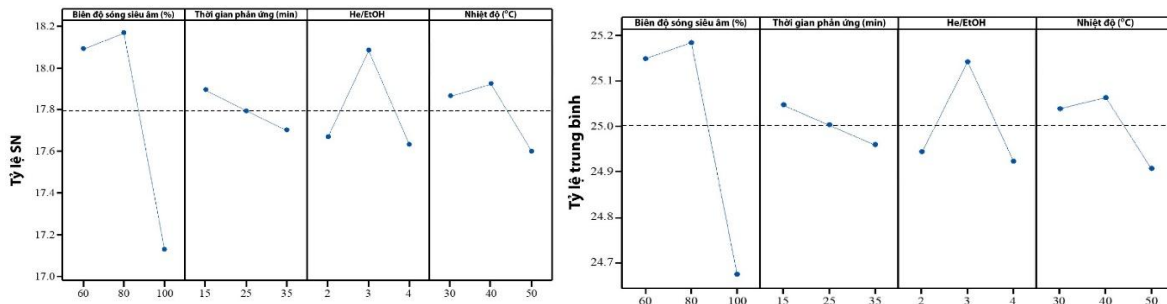
Tối ưu	Cao	Mật độ tảo	Cường độ âm nhạc	Thời gian xử lý
D: 0,847	Hiện tại	9,20	110,45	8,53
Dự đoán	Thấp	4,0	52,4	4,6
		0,80	9,55	1,47



Hình 3.18. Biểu đồ tối ưu hóa phản ứng của hiệu quả loại bỏ TN và COD tối đa

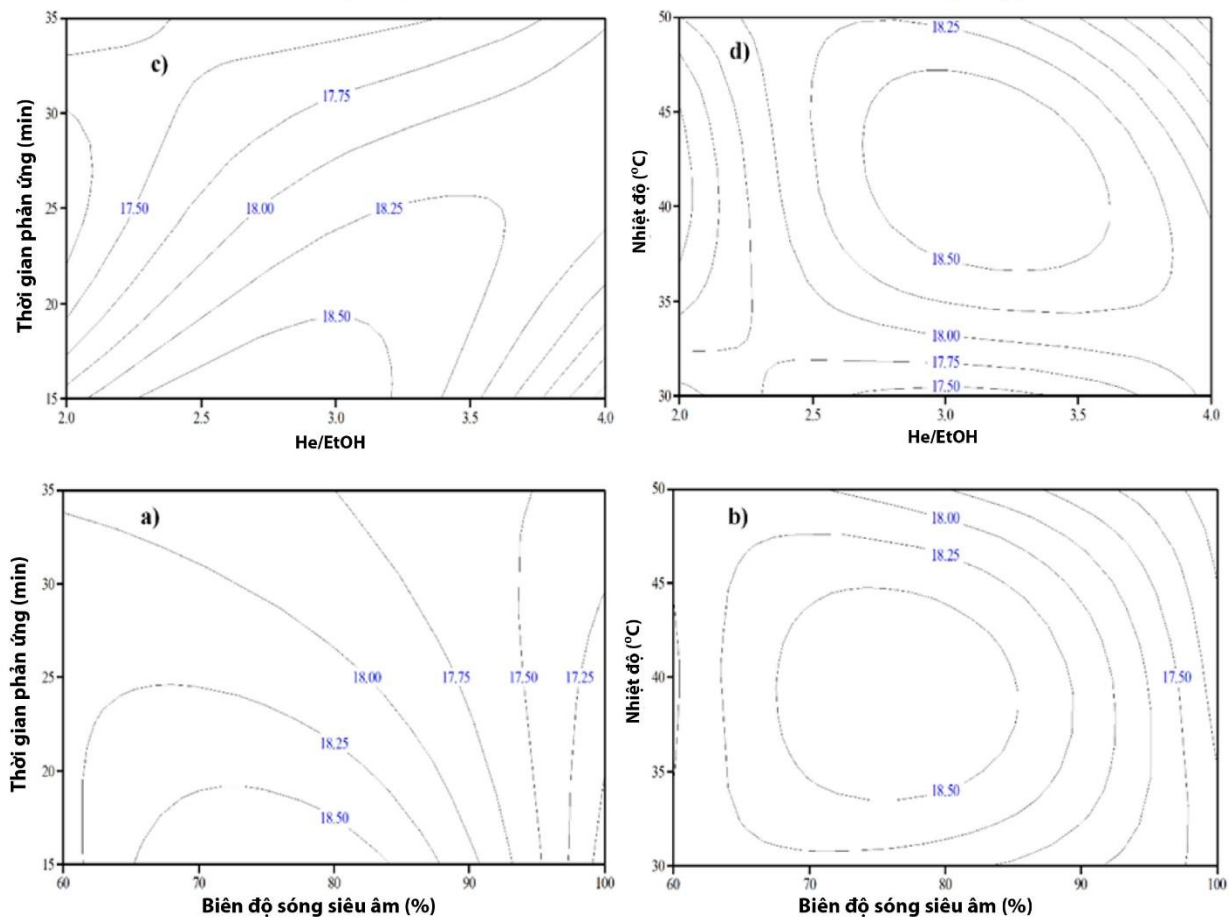
3.4.2. Nghiên cứu ly trích lipid từ sinh khối tảo *Chlorella* dưới sự hỗ trợ của sóng siêu âm và đánh giá vòng đời sản phẩm

3.4.2.1. Kết quả áp dụng phương pháp Taguchi tối ưu hóa các thông số ly trích lipid từ sinh khối tảo *Chlorella*



Hình 3.19. Ảnh hưởng chính của các yếu tố trong thiết kế thí nghiệm Taguchi

a) tỷ lệ S/N và b) ý nghĩa trung bình lipid từ *Chlorella* CG-20



Hình 3.2. Biểu đồ đường viền ảnh hưởng

a) biên độ siêu âm so với thời gian phản ứng; b) HE/EtOH so với thời gian phản ứng; c) HE/EtOH so với nhiệt độ; và d) biên độ siêu âm so với nhiệt độ

3.4.2.2. Thành phần dầu ly trích từ *Chlorella* CG-20

Bảng 3.5. Thành phần acid béo chính trong lipid từ *Chlorella* CG-20

Thành phần acid béo	Hàm lượng (%)
Myristic acid (C14:0)	1,5
Pentadecanoic acid (C15:0)	9,4
Palmitic acid (C16:0)	28,3
Palmitoleic acid (C16:1)	3,6
Heptadecanoic acid (C17:0)	13,9
Stearic acid (C18:0)	5,8
Oleic acid (C18:1)	8,1
Linoleic acid (C18:2)	17,4

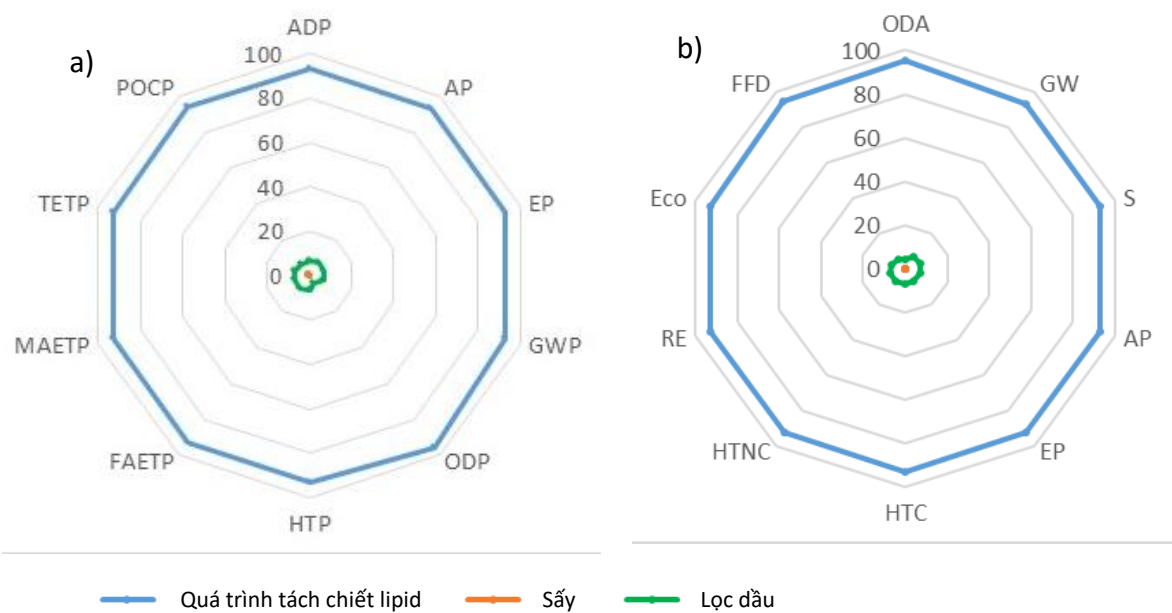
γ -Linolenic acid (C18:3)	6,3
Arachidic acid (C20:0)	2,6
Cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)	2,5
Tổng	99,4

3.5.2.3. Kết quả phân tích kiểm kê vòng đời sản phẩm (LCA) cho đặc tính sản xuất biodiesel bằng phương pháp siêu âm

Bảng 3.18. Tổng tác động môi trường do tảo *Chlorella* CG-20 và quy trình sản xuất dầu theo phương pháp CML và TRACI

Yếu tố tác động	Đơn vị	Tổng	Quá trình		
			Ly trích lipid	Sấy khô	Tinh chế dầu
CML 2001					
Cạn kiệt phi sinh học	kg Sb eq	0.193	0.180	0.0002	0.013
Acid hóa	kg SO ₂ eq	0.192	0.179	0.0003	0.013
Hiện tượng phú dưỡng	kg PO ₄ ²⁻ eq	0.048	0.044	6.649×10 ⁻⁵	0.003
Sự nóng lên toàn cầu	kg CO ₂ eq	24.854	23.107	0.0346	1.712
Suy giảm tầng ô zon	kg CFC-11 eq	4.538×10 ⁻⁷	4.361×10 ⁻⁷	3.508×10 ⁻¹⁰	1.734×10 ⁻⁸
Gây độc cho con người	kg 1,4-DB eq	14.697	13.687	0.020	0.991
Độc tính thủy sinh nước ngọt	kg 1,4-DB eq	11.602	10.787	0.016	0.800
Độc tính thủy sinh biển	kg 1,4-DB eq	33221.52	30864.768	46.734	2310.023
Độc tính sinh thái trên cạn	kg 1,4-DB eq	6	0.029	4.211×10 ⁻⁵	0.002
ozon hóa quang hóa	kg C ₂ H ₄ eq	0.008	0.007	9.380×10 ⁻⁶	0.0005
TRACI 2.1					
Acid hóa	kg SO ₂ eq	0.187	0.174	0.0003	0.013
Khả năng phú dưỡng (EP)	kg N eq	0.097	0.090	0.0001	0.007
Sự nóng lên toàn cầu	kg CO ₂ eq	24.880	23.132	0.0347	1.713
Suy giảm ô zon	kg CFC-11 eq	7.6×10 ⁻⁷	7.26×10 ⁻⁷	6.89×10 ⁻¹⁰	3.41×10 ⁻⁸
Chất gây ung thư	CTUh	1.16×10 ⁻⁶	1.08×10 ⁻⁶	1.59×10 ⁻⁹	7.88×10 ⁻⁸
Không gây ung thư	CTUh	8.39×10 ⁻⁶	7.8×10 ⁻⁶	1.18×10 ⁻⁸	5.82×10 ⁻⁷
Tác dụng hô hấp	kg PM2.5 eq	0.020	0.019	2.76×10 ⁻⁵	0.0013

Độc tính sinh thái	CTUe	157.022	146.279	0.213	10.530
Sương mù	kg O ₃ eq	1.800	1.673	0.0025	0.124
Cạn kiệt nhiên liệu hóa thạch	MJ surplus	16.965	16.013	0.0189	0.933



Hình 3.21. Biểu đồ radar về tác động môi trường của việc tách chiết lipid từ *Chlorella* CG-20 như được giải thích bởi a) CML và b) TRACI

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và chọn lọc thành công 8 chủng tảo *Chlorella* từ 120 mẫu thu thập tại các tỉnh Nam Bộ (Cần Giờ - TP. Hồ Chí Minh, Bình Dương, Đồng Nai, Long An, Tiền Giang, Đồng Tháp), đồng thời duy trì các chủng này để phục vụ các thí nghiệm tiếp theo. Qua phân tích hình thái kết hợp trình tự DNA barcode (18S rRNA, ITS, *rbcL*), 3 chủng (CG-20, BD-38, ĐT-51) được định danh là *Chlorella vulgaris*, 2 chủng (BD-33, LA-81) là *Chlorella sorokiniana* và 3 chủng (TG-65, TG-67, ĐN-112) chưa xác định cấp loài (*Chlorella* sp.).

Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR cho thấy 3 chủng *C. vulgaris* (CG-20, BD-38, ĐT-51) có sự biến thiên đáng kể (hệ số tương đồng 0,6204–0,8152), nhưng không tương quan rõ ràng với phân bố địa lý, gợi ý rằng yếu tố môi trường (đất ngập nước, ao hồ) có thể ảnh hưởng mạnh hơn đến genome tảo so với khoảng cách địa lý.

Về khả năng xử lý nước thải, chủng *C. vulgaris* CG-20 nổi bật với ngưỡng chịu đựng ammonium cao nhất (IC₅₀: 1,19 ± 0,01 g/L) và khả năng hấp thụ nitrate tối ưu (155,11 ± 2,1 mg/L/ngày), vượt trội so với các chủng khác (ĐN-112: 89,75 mg/L/ngày). Thử nghiệm thực tế trên nước thải chợ Hóc Môn (TN 66,9–75,7 mg/L, COD 516–524 mg/L) cho thấy CG-20 kết hợp sóng âm nhạc (52,5 dB, “Lý Ngựa Ô”) đạt hiệu suất loại bỏ TN 98,12% và COD 85,3% trong 4,6 ngày (mật độ 4%), với động học bậc 2 (t_{1/2}: 0,419 ngày).

Môi trường BBM và HAMGM được xác định là tối ưu để sản xuất sinh khối CG-20 (4,6 ± 0,08 g/L và 4,56 ± 0,08 g/L), cung cấp lượng tảo ban đầu dồi dào cho xử lý nước thải thực tế. Phương pháp Taguchi tối ưu hóa ly trích lipid đạt hiệu suất 18,8 ± 0,2% (80%, 15 phút, HE/EtOH 3:1, 40°C), với biên độ siêu âm là yếu tố ảnh hưởng lớn nhất (S/N 25,18). Thành phần FAME (61,5% SFA, 37,9% UFA, độ nhớt 4,6 cSt, iodine 81) cho thấy CG-20 là nguyên liệu tiềm năng cho biodiesel, dù cần quản lý UFA để đảm bảo độ ổn định oxy hóa. Phân tích LCA (CML 2001, TRACI 2.1) chỉ ra ly trích chiếm 92–96% tác động (GWP 24,854 kg CO₂ eq, độc tính biển 33,221,526 kg 1,4-DB eq), chủ yếu từ điện (64,2%) và n-hexan (33,6%), đặt cơ sở cho cải tiến bền vững.

4.2. Kiến nghị

Để nâng cao độ chính xác trong định danh và đánh giá đa dạng di truyền, cần mở rộng nguồn mẫu thu thập từ các khu vực khác tại Nam Bộ và áp dụng thêm marker phân tử (*tufA*, COI) nhằm phân định loài cho TG-65, TG-67 và ĐN-112. Phân tích hình thái nên kết hợp kính hiển vi điện tử quét (SEM) và truyền qua (TEM) để nghiên cứu siêu cấu trúc tế bào, hỗ trợ xác định đặc điểm đặc thù của các chủng bản địa.

Về xử lý nước thải, cần khảo sát ảnh hưởng của ánh sáng (cường độ, bước sóng) và các yếu tố khác (oxy hòa tan, tổng kiềm, biến động pH) đến sinh trưởng và hấp thụ nitrogen/phốt-pho của CG-20, nhằm tối ưu hóa hiệu suất trong điều kiện thực tế. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sóng âm nhạc (tần số, thời gian tác động) có thể làm rõ mối quan hệ giữa âm thanh và sinh tổng hợp lipid, tăng tiềm năng ứng dụng thực tiễn.

Đối với sản xuất biodiesel, cần điều chỉnh điều kiện nuôi cấy (thiếu nitrogen) để tăng tỷ lệ SFA, giảm UFA (37,9%), cải thiện độ ổn định oxy hóa của lipid CG-20. LCA cho thấy cần thay thế điện than bằng năng lượng tái tạo và tái chế n-hexan để giảm GWP (24,854 kg CO₂ eq) và độc tính sinh thái, hướng tới quy trình bền vững hơn. Các nghiên cứu tiếp theo nên mở rộng quy mô từ phòng thí nghiệm (300 mL) lên pilot để đánh giá hiệu quả kinh tế và môi trường toàn diện.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

Các bài báo đã công bố:

1. Tam Minh Phan, Biet Van Huynh, Susilo Nur Aji Cokro Darsono , Thanh-Luu Pham, Ha Manh Bui (2023). Ultrasound-Assisted Lipid Extraction from *Chlorella* sp.: Taguchi Design and Life Cycle Assessment. *Molecular Biotechnology* DOI: 10.1007/s12033-023-00836-6.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-023-00836-6>

Bài báo Q3, IF: 2.4

2. Thanh Luu Pham; Uyen Phuong Chan; Nghia Hiep Bui; Thuy Thi Ngoc Bach; Binh Van Chan; Xuan Thanh Bui; Tam Minh Phan; Ha Manh Bui (2021). Removal of total nitrogen from wastewater by a combination of *Chlorella* sp. and audible sound. *Water Sci Technol.* 84 (10-11): 3132–3142.

<https://doi.org/10.2166/wst.2021.345>.

Bài báo Q2, IF: 2.5

3. Phan Minh Tâm, Huỳnh Văn Biết (2025). Genetic diversity assessment of *Chlorella* sp. strains collected from Southern Vietnam. *Sustainable Chemistry One World*.