

TUYỂN CHỌN VI TẢO *Chlorella* sp. TỪ NƯỚC THẢI AO NUÔI TÔM VÀ XÁC ĐỊNH MẬT SỐ THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH NHÂN SINH KHỐI

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Phạm Trường Lâm, Nguyễn Thị Pha, Trần Hữu Hậu*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Trần Hữu Hậu <thhau@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2025; Hoàn thành phản biện: 23-01-2026; Ngày chấp nhận đăng: 26-01-2026)

Tóm tắt. Vi tảo được xem là nguồn tài nguyên sinh học giàu protein, lipid, khoáng vi lượng và vitamin, có tiềm năng được sử dụng như một nguồn thực phẩm bổ sung trong chăn nuôi. Tuy nhiên, việc xác định và tuyển chọn các dòng có tiềm năng tạo sinh khối cao vẫn còn gặp nhiều hạn chế. Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập vi tảo từ nước thải ao nuôi tôm và xác định được dòng TV1 có tốc độ sinh trưởng cao nhất trong số bảy dòng vi tảo. Phân tích đặc điểm hình thái cho thấy tế bào có dạng hình cầu, đường kính 3–5 μm . Kết quả phân tích trình tự gen 18S rRNA và so sánh với cơ sở dữ liệu NCBI, xác định dòng TV1 thuộc lớp tảo lục (Chlorophyceae), chi *Chlorella*. Quá trình nhân giống *Chlorella* sp. TV1 được tiến hành qua ba giai đoạn cấp. Giai đoạn nhân giống cấp 1 với mật số $0,313 \times 10^6$ tế bào/mL. Giai đoạn nhân giống cấp 2 và cấp 3 được thực hiện trong 9 ngày với mật số ban đầu lần lượt là $0,634 \times 10^6$ và $0,452 \times 10^6$ tế bào/mL. Nghiên cứu đã tuyển chọn dòng *Chlorella* sp. TV1 từ nước thải ao nuôi tôm và xây dựng quy trình nhân giống phù hợp, tạo nền tảng cho sản xuất sinh khối vi tảo quy mô lớn. Các nghiên cứu tiếp theo cần tối ưu điều kiện nuôi và đánh giá hiệu quả xử lý nước thải, hướng đến ứng dụng trong nông nghiệp tuần hoàn.

Từ khóa: *Chlorella*, nuôi sinh khối, nhân giống, vi tảo

Selection of *Chlorella* sp. from shrimp pond wastewater and determination of the optimal inoculum density for biomass production

Huynh Ngoc Thanh Tam, Pham Truong Lam, Nguyen Thi Pha, Tran Huu Hau*

Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Cantho, Vietnam

* Correspondence to Tran Huu Hau <thhau@ctu.edu.vn>

(Received: 18 September 2025; Revised: 23 January 2026; Accepted: 26 January 2026)

Abstract. Microalgae is a rich source of protein, lipids, minerals, and vitamins. They could be employed as an extra food source for animals. However, there are still a lot of problems with selecting and culturing strains that have a lot of biomass potential. The study selected the TV1 strain from shrimp pond effluent because it grew the fastest among the seven microalgae strains isolated on Conway medium. Morphologically, the cells are spherical, with a diameter of 3 to 5 μm . The 18S rRNA gene sequence analysis and its comparison with the NCBI database classified the TV1 strain as belonging to the Chlorophyceae class and the *Chlorella* genus. *Chlorella* sp. TV1 is cultured in three stages. The primary culture propagation was carried out at a cell density of 0.313×10^6 cells/mL. The

second and third subculture stages were carried out over 9 days, with initial cell densities of 0.634×10^6 and 0.452×10^6 cells/mL, respectively. The study selected the *Chlorella* sp. strain TV1 from shrimp pond wastewater, and finding a beneficial way to cultivate it will help produce a large amount of microalgae biomass. Further research is needed to improve animal husbandry environments and determine the effectiveness of wastewater treatment, with the goal of using it in circular agriculture.

Keywords: biomass cultivation, *Chlorella*, microalgae, propagation

1 Mở đầu

Tận dụng nguồn nước thải để nuôi sinh khối vi tảo không chỉ góp phần xử lý nước mà còn tạo ra nguồn nguyên liệu có giá trị dinh dưỡng phục vụ cho chăn nuôi. Trong số các loài vi tảo, *Chlorella* sp. được biết đến khả năng sinh trưởng nhanh, khả năng chống chịu tốt và có hàm lượng protein, lipid, carotenoid cao [1]. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã khẳng định tiềm năng của vi tảo *Chlorella* trong việc xử lý nước thải đồng thời tạo sinh khối giá trị. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu đã ghi nhận *Chlorella* sp. có khả năng loại bỏ nitrate và phosphate với hiệu suất trên 88% [2–4]. Trên thế giới, *Chlorella* được sử dụng trong xử lý nước thải sinh hoạt, nước thải dệt may nước thải chăn nuôi lợn và nước thải hầm biogas [5–7]. Hơn thế nữa, *Chlorella* chứa hàm lượng cao protein, carbohydrate, lipid, vitamin và khoáng chất. Hàm lượng protein của *Chlorella* có thể đạt 50–60% khối lượng khô, giàu các axit amin thiết yếu như lysine, methionine và threonine [8]. Carbohydrate chiếm 10–30% và lipid dao động 10–40%, trong đó có nhiều axit béo không no như omega-3 và omega-6 [9]. Ngoài ra, *Chlorella* chứa nhiều vitamin (A, C, E, nhóm B) và khoáng vi lượng (Fe, Zn, Mg, Se), cùng các sắc tố sinh học như chlorophyll, β -carotene, lutein, có hoạt tính chống oxy hóa mạnh [10–12].

Mặc dù *Chlorella* được ứng dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản, các nghiên cứu về tối ưu mật số khởi đầu cho từng cấp nhân giống vẫn còn hạn chế, đặc biệt đối với các chủng *Chlorella* bản địa phân lập từ ao nuôi tôm tại Việt Nam. Điều này gây khó khăn trong việc đánh giá tiềm

năng sinh trưởng và xây dựng quy trình nhân giống phù hợp với điều kiện địa phương.

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định *Chlorella* là tác nhân sinh học hiệu quả trong xử lý nước thải kết hợp sản xuất sinh khối giàu giá trị dinh dưỡng. Trong đó, mật số khởi đầu được xem là yếu tố then chốt quyết định năng suất sinh khối vi tảo. Mật số thấp có thể kéo dài pha thích nghi, trong khi mật số cao giúp rút ngắn thời gian tăng trưởng nhưng nếu vượt ngưỡng tối ưu sẽ làm gia tăng cạnh tranh dinh dưỡng, che sáng và biến đổi môi trường nuôi, từ đó làm giảm hiệu suất quang hợp và sản lượng sinh khối [1,13,14].

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng *Chlorella* có khả năng sinh trưởng mạnh từ nước thải ao nuôi tôm, đồng thời xác định mật số khởi đầu tối ưu cho quá trình nhân giống, làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng vi tảo trong xử lý nước thải và sản xuất sinh khối phục vụ nuôi trồng thủy sản.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Phân lập vi tảo

Thu mẫu và xử lý mẫu nước thải ao nuôi tôm

Thu mẫu: Thu 100 mL nước ở tầng nước mặt của ao lắng, mỗi ao thu 3 vị trí (đầu, giữa ao, cuối ao). Mẫu trong cùng một ao được đồng nhất vào chai chứa mẫu bằng nhựa polyethylene terephthalate, sau đó được bảo quản trong thùng lạnh ở nhiệt độ khoảng 5–10 °C và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm mẫu được xử lý và phân lập trong vòng 24 giờ.

Xử lý: Mẫu nước được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 có kích thước lỗ lọc 11 μm , nhằm loại bỏ những tạp nhiễm (chất hữu cơ, tảo lớn, vi sinh vật và động vật nguyên sinh).

Tăng sinh vi tảo tiền phân lập: Sau khi lọc mẫu, chuyển 50 mL mẫu vào chai 250 mL đậy kín. Nuôi cấy liên tục 2 tuần ở 22 °C dưới chu kỳ sáng/tối (16:8 giờ) để kích thích vi tảo phát triển [15]. Sau đó, lấy 100 μL mẫu từ lớp mặt cấy trải lên môi trường Conway's agar và tiếp tục ủ 2 tuần ở điều kiện tương tự.

Phân lập vi tảo

Sau hai tuần nuôi cấy, các đĩa Petri đã xuất hiện các khuẩn lạc đơn có màu xanh đặc trưng. Các khuẩn lạc này được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường mới nhiều lần cho đến khi thu nhận được dòng vi tảo thuần (đồng nhất về hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào). Quan sát và ghi nhận các đặc điểm khuẩn lạc như hình dạng, màu sắc cùng với hình thái tế bào của các dòng vi tảo đã phân lập [16,17].

2.2 Tuyển chọn và định danh vi tảo

Tuyển chọn vi tảo có khả năng tăng trưởng mạnh

Sau khi được làm thuần, các dòng vi tảo được nuôi trong ống nghiệm chứa 100 mL môi trường Conway's với mật số khởi đầu tương đương nhau, mỗi nghiệm thức được thực hiện với ba lần lặp lại. Mật số tế bào được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang học (OD_{682}) [18,19]. Quá trình sinh trưởng của các dòng vi tảo được theo dõi hằng ngày trong suốt 6 ngày nuôi cấy. Kết thúc thời gian này, dòng vi tảo có tốc độ sinh trưởng cao nhất được tuyển chọn để tiếp tục thí nghiệm.

Định danh vi tảo

Dòng vi tảo có khả năng sinh trưởng mạnh được lựa chọn để định danh dựa trên đặc điểm

hình thái kết hợp với phân tích sinh học phân tử, đồng thời được xác định mật số thích hợp phục vụ cho quá trình nhân giống.

a. Mô tả hình thái: Vi tảo được quan sát và mô tả các đặc điểm hình thái và kích thước dưới kính hiển vi quang học.

b. Sinh học phân tử: Quy trình tách chiết DNA được thực hiện theo phương pháp của Do và cộng sự [20] với một số điều chỉnh. Dịch huyền phù vi tảo sau khi nuôi cấy chuyển 2 mL vào ống eppendorf 1,5 mL, sau đó ly tâm ở 4500 vòng/phút trong 5 phút để thu phần sinh khối vi tảo. Tế bào vi tảo được ly giải bằng 600 μL dung dịch GX, đồng nhất trên máy nghiền mẫu. Tiếp theo, bổ sung 3 μL enzyme proteinase K vào dung dịch và ủ hỗn hợp ở 60°C trong 30 phút. Sau khi ủ, mẫu được ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C, sau đó chuyển 600 μL dịch nổi vào ống eppendorf mới. Kết tủa DNA bằng 700 μL isopropanol lạnh và tiếp tục ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C. Phần kết tủa chứa DNA được rửa hai lần bằng 500 μL ethanol 70%, sau đó sấy loại bỏ cồn bằng máy sấy chân không ở 60°C trong 10 phút. Cuối cùng, hòa tan DNA trong 100 μL dung dịch đệm TE 0,1X và trữ ở -4 °C để sử dụng cho các bước tiếp theo.

Tiến hành khuếch đại vùng gen 18S rRNA của vi tảo bằng cặp mồi: Forward (F) 5'-TACCTGGTTGATCCT GCCAG-3' và Reverse (R) 5'-CCTTCCGCAGGTT ACCTAC-3' [20]. Sản phẩm PCR được kiểm tra chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. Những mẫu có băng rõ nét và đặc hiệu được giải trình tự tại Công Ty Cổ phần Phù sa Genomics (phường Cái Răng, TP. Cần Thơ). Trình tự gen 18S thu được được đối chiếu với cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST nhằm xác định loài vi tảo.

2.3 Xây dựng đường chuẩn giữa mật số tế bào, khối lượng và giá trị OD

Mật số tế bào vi tảo trong dịch nuôi cấy được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD_{682}), trong khoảng OD từ 0,2 đến 1,8. Đồng thời, mật số tế bào được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu. Khối lượng sinh khối (g/L) được xác định thông qua phương pháp sấy khô ở 50 °C cho đến khi đạt khối lượng không đổi. Dữ liệu thu được được xử lý để xây dựng các phương trình hồi quy tuyến tính giữa giá trị OD (y) và mật số tế bào (X, log tế bào/mL) hoặc khối lượng sinh khối (X, g/L) theo dạng $y = a \times X + b$ [15,21]. Các phương trình này được sử dụng nhằm ước lượng nhanh mật số tế bào hoặc sinh khối dựa trên giá trị OD đo được trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.4 Xác định mật số khởi đầu cho quá trình nhân sinh khối

Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện bán vô trùng, trong đó môi trường nuôi cấy và dụng cụ thí nghiệm được khử trùng trước khi sử dụng, trong khi hệ thống sục khí và phòng nuôi được xử lý bằng tia UV trong 60 phút nhằm hạn chế nhiễm tạp. Vi tảo được nuôi cấy với hệ thống sục khí liên tục ở nhiệt độ 22 °C, độ mặn 20‰, pH 8,3, cường độ ánh sáng 5000 lux và chu kỳ chiếu sáng 16:8 giờ (sáng:tối). Các điều kiện nuôi cấy này được lựa chọn và điều chỉnh dựa trên các nghiên cứu trước đây về nuôi cấy vi tảo [22,23]. Quy trình nhân giống vi tảo được thực hiện qua ba giai đoạn với thể tích nuôi cấy và mật số vi tảo khác nhau trong môi trường Conway's nhằm xác định mật số phù hợp cho từng giai đoạn, mỗi nghiệm thức được thực hiện với ba lần lặp lại. Vi tảo gốc có mật số 10^7 tế bào/mL được cấy vào các bình nhân giống cấp 1 (thể tích 400 mL) với tỷ lệ ban đầu từ 1–3% (v/v). Giai đoạn nhân giống cấp 2 được tiến hành trong thể tích 1 L, sử dụng vi tảo

sau giai đoạn cấp 1 có mật số 10^6 tế bào/mL, với tỷ lệ cấy chuyển dao động từ 12–18%. Tiếp theo, ở giai đoạn nhân giống cấp 3, vi tảo được nuôi trong thể tích 4 L, sử dụng nguồn vi tảo sau cấp 2 (mật số 10^6 tế bào/mL) với tỷ lệ cấy chuyển tương tự, từ 12–18%. Mật số tế bào vi tảo được xác định gián tiếp thông qua giá trị mật độ quang (OD_{682}) trong suốt thời gian khảo sát. Giá trị này được quy đổi sang mật số tế bào (log tế bào/mL) dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính giữa OD (y) và mật số tế bào (X), theo phương trình đã được xác lập trước đó.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

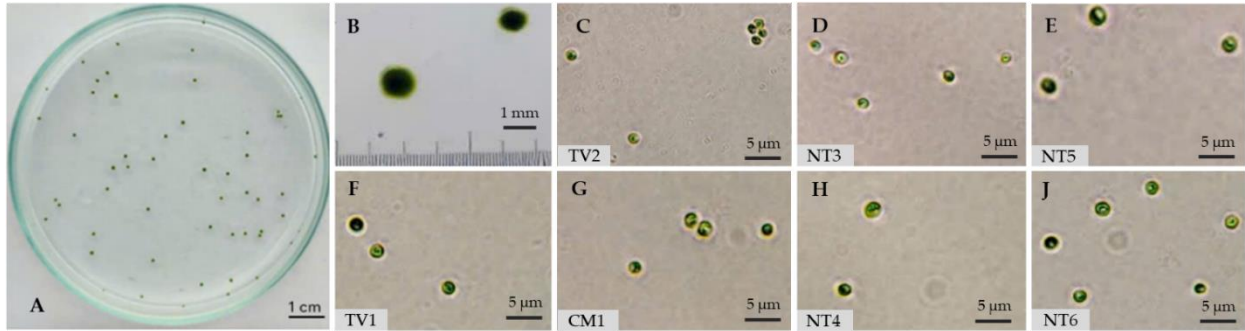
Số liệu thô được thu nhận, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Phần mềm Minitab 16 được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA). Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được đánh giá bằng phép kiểm Tukey với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tuyển chọn vi tảo

Bảy dòng vi tảo có khả năng phát triển trên môi trường thạch Conway's đã được phân lập. Đa số khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu xanh đặc trưng của vi tảo, có kích thước dao động từ 0,1 – 1 mm. Quan sát hình thái tế bào cả 7 dòng vi tảo đều có hình cầu với đường kính từ 3 – 11 μm (Hình 1).

Các dòng vi tảo đều sinh trưởng trong môi trường lỏng Conway's sau 6 ngày (Bảng 1). Mật số ban đầu ($OD_{682} = 0,06$) không khác biệt đáng kể giữa các dòng. Sau 6 ngày, OD_{682} của dòng TV1 đạt 0,11, cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại (0,091–0,097). Với sự tăng trưởng vượt trội, TV1 được lựa chọn để định danh và nghiên cứu quá trình nhân nuôi sinh khối.



Hình 1. Hình thái các dòng vi tảo đã phân lập, (A) hình thái khuẩn lạc dòng TV1 trên môi trường Conway's bằng phương pháp trải, (B) khuẩn lạc TV1 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, kích thước khoảng 1 mm sau 7 ngày nuôi cấy; (C–J) hình thái tế bào của các dòng vi tảo quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000×

Bảng 1. Giá trị OD₆₈₂ của các dòng vi tảo trong 6 ngày nuôi cấy

| Dòng vi tảo | Thời gian nuôi cấy (ngày) | | | | | |
|-------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| CM1 | 0,066±0,005 ^a | 0,075±0,007 ^{bcd} | 0,080±0,002 ^{bcd} | 0,082±0,001 ^{bc} | 0,089±0,005 ^{bc} | 0,092±0,006 ^{bc} |
| NT3 | 0,067±0,007 ^a | 0,081±0,003 ^a | 0,085±0,003 ^a | 0,087±0,007 ^{ab} | 0,093±0,007 ^{bc} | 0,097±0,005 ^b |
| NT4 | 0,068±0,004 ^a | 0,073±0,005 ^{cd} | 0,077±0,003 ^d | 0,077±0,007 ^c | 0,085±0,006 ^c | 0,092±0,008 ^{bc} |
| NT5 | 0,067±0,001 ^a | 0,074±0,003 ^{cd} | 0,079±0,005 ^{cd} | 0,081±0,008 ^{bc} | 0,086±0,007 ^c | 0,087±0,007 ^c |
| NT6 | 0,063±0,005 ^a | 0,077±0,001 ^{abc} | 0,083±0,003 ^{abc} | 0,086±0,005 ^{ab} | 0,096±0,003 ^b | 0,096±0,005 ^b |
| TV1 | 0,065±0,005 ^a | 0,080±0,006 ^{ab} | 0,084±0,004 ^{ab} | 0,091±0,004 ^a | 0,106±0,008 ^a | 0,110±0,007 ^a |
| TV2 | 0,062±0,005 ^a | 0,069±0,003 ^d | 0,083±0,003 ^{ab} | 0,086±0,004 ^{ab} | 0,092±0,003 ^{bc} | 0,096±0,004 ^b |
| CV (%) | 7,59 | 5,73 | 4,12 | 6,77 | 6,42 | 6,51 |

Ghi chú: CV là hệ số biến thiên. Trong cùng một cột, các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) của ba lần lặp lại; các giá trị mang cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

3.2 Định danh vi tảo

Dòng vi tảo TV1 trên môi trường Conway's agar có khuẩn lạc màu xanh lục kích thước từ, tế bào có hình tròn (3 – 5 μm) (Hình 1). Trình tự vùng gen 18S khi so sánh với trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI tương đồng với *Chlorella* sp. (Bảng 2). Kết hợp với những đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và trình tự vùng gen 18S đã xác định dòng vi tảo TV1 là *Chlorella* sp.

Chlorella là loại vi tảo lục đơn bào có nhiều đặc điểm nổi bật về cấu trúc tế bào và khả năng sinh trưởng. Tế bào của *Chlorella* thường có hình tròn hoặc bầu dục, với kích thước từ 2 – 10 μm [14]. Thành tế bào của *Chlorella* chủ yếu cấu tạo từ

cellulose và một lớp mucopolysaccharide, giúp bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân bên ngoài và duy trì hình dạng tế bào. *Chlorella* chứa hàm lượng protein cao, chiếm khoảng 43–58% khối lượng khô, rất phù hợp làm nguồn đạm thay thế từ động vật [24]. Bên cạnh đó, vi tảo còn chứa lipid, chủ yếu là các axit béo không bão hòa như omega-3 và omega-6, carbohydrate, chất xơ và khoáng chất thiết yếu như Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu [10–12].

Trong nuôi trồng thủy sản, *Chlorella* được ứng dụng làm thức ăn tự nhiên cho luân trùng hoặc tôm ở giai đoạn Zoea 1. Việc bổ sung *Chlorella* vào khẩu phần ăn của tôm và cá giúp cải

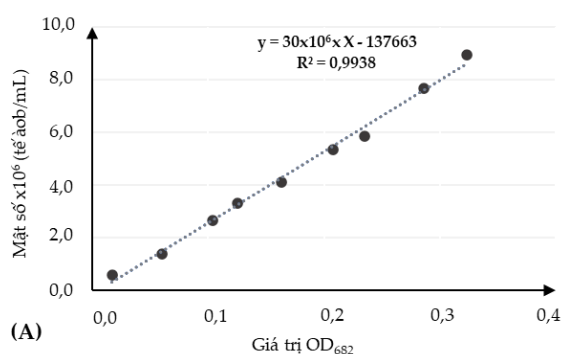
thiện tốc độ tăng trưởng, tăng tỷ lệ sống, và nâng cao sức đề kháng đối với các bệnh do vi khuẩn hoặc virus gây ra. Đồng thời, *Chlorella* còn giúp cải thiện chất lượng nước ao nuôi nhờ khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng dư thừa (nguồn N và P), hạn chế hiện tượng phú dưỡng và sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh [25].

Bảng 2. Độ tương đồng của trình tự vùng gen 18S của vi tảo TV1 với cơ sở dữ liệu NCBI

| Tên trình tự | Chiều dài | Độ phủ | Độ tương đồng | Mã trình tự |
|----------------------------------|-----------|--------|---------------|-------------|
| <i>Chlorella</i> sp. UMT LF1 | 1751 | 100% | 100% | ON851438.1 |
| <i>Chlorella</i> sp. KMMCC C-158 | 1724 | 100% | 100% | GQ122357.1 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 1672 | 100% | 100% | GQ122345.1 |

3.3 Đường chuẩn giữa mật số tế bào, khối lượng và giá trị OD

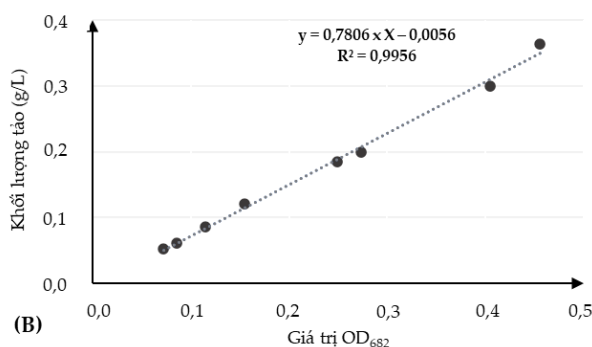
Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa mật số vi tảo và giá trị OD₆₈₂ được xây dựng bằng phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 30 \times 10^6 \times X - 137663$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9938$, cho



thấy tương quan rất chặt chẽ giữa giá trị OD và mật số vi tảo (Hình 2A).

Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa khối lượng vi tảo và giá trị OD₆₈₂ được xây dựng bằng phương trình hồi quy tuyến tính: $y = 0,7806 \times X - 0,0056$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9956$, cho thấy tương quan rất chặt chẽ giữa giá trị OD với khối lượng vi tảo (Hình 2B).

Trong nghiên cứu của Tsai [26], đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa mật số, khối lượng vi tảo và giá trị OD₆₈₂ của *Chlorella* sp. cũng được xác định với hệ số tương quan R^2 lần lượt đạt 0,997 và 0,991. Mặc dù được thực hiện trên các chủng *Chlorella* sp. và trong điều kiện nuôi cấy khác nhau, cả hai nghiên cứu đều ghi nhận mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa giá trị OD₆₈₂ ($R^2 > 0,99$). Điều này cho thấy OD₆₈₂ là chỉ số gián tiếp phù hợp và đáng tin cậy để ước lượng mật số và sinh khối của *Chlorella* sp. Tuy nhiên, sự khác biệt về hệ số hồi quy giữa hai nghiên cứu phản ánh tính đặc trưng của từng dòng vi tảo cũng như sự khác biệt về điều kiện nuôi cấy. Điều này cho thấy đường chuẩn cần được xây dựng riêng cho từng đối tượng và điều kiện nuôi cấy cụ thể.



Hình 2. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa giá trị OD và mật số vi tảo TV1 (A) hay khối lượng (B)

3.4 Mật số khởi đầu cho quá trình nhân giống

Giai đoạn nhân giống cấp 1

Vi tảo *Chlorella* sp. TV1 có khả năng phát triển trong suốt 6 ngày nuôi cấy ở giai đoạn nhân

giống cấp 1 với các tỷ lệ chủng ban đầu lần lượt là 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% và 3,0% (Bảng 3). Trong hai ngày đầu, giá trị OD ở tất cả các nghiệm thức tăng không đáng kể, phản ánh giai đoạn thích nghi (lag phase) của vi tảo trong môi trường lỏng

Conway's. Từ ngày thứ ba trở đi, mật số vi tảo bắt đầu tăng rõ rệt ở tất cả các nghiệm thức, trong đó nghiệm thức có tỷ lệ chủng 3,0% cho thấy tốc độ tăng trưởng vượt trội so với các nghiệm thức còn lại. Đến ngày thứ sáu, các nghiệm thức có tỷ lệ chủng từ 2,0% đến 3,0% đạt sinh trưởng mạnh, với mật số từ 9,542 đến 10,259x10⁶ tế bào/mL.

Ngược lại, các nghiệm thức có tỷ lệ chủng 1,0% và 1,5% chỉ đạt 8,542– 8,922x10⁶ tế bào/mL. Kết quả cho thấy mật số chủng ban đầu ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ sinh trưởng của vi tảo, trong đó tỷ lệ chủng từ 2,0% trở lên mang lại hiệu quả sinh trưởng cao sau 6 ngày nuôi cấy.

Bảng 3. Mật số vi tảo *Chlorella* sp. TV1 (x10⁶ tế bào/mL) ở giai đoạn nhân giống cấp 1

| Tỷ lệ giống (%) | Thời gian nuôi cấy (ngày) | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1,0 | 0,307±0,077 ^b | 0,367±0,067 ^c | 1,781±0,448 ^d | 3,153±0,333 ^b | 5,445±0,572 ^b | 8,542±1,209 ^c |
| 1,5 | 0,306±0,110 ^b | 0,509±0,061 ^b | 1,917±1,114 ^{cd} | 3,341±0,498 ^b | 5,829±1,008 ^{ab} | 8,922±0,783 ^{bc} |
| 2,0 | 0,313±0,109 ^b | 0,580±0,031 ^{ab} | 2,050±0,554 ^{bc} | 3,502±0,221 ^b | 6,552±0,713 ^{ab} | 9,995±0,967 ^{ab} |
| 2,5 | 0,382±0,097 ^a | 0,602±0,087 ^{ab} | 2,128±0,278 ^b | 3,549±0,303 ^b | 5,732±1,089 ^b | 9,542±0,065 ^{abc} |
| 3,0 | 0,382±0,099 ^a | 0,661±0,083 ^a | 2,429±0,570 ^a | 4,329±0,079 ^a | 7,009±0,508 ^a | 10,259±0,17 ^a |
| CV % | 8,52 | 10,92 | 6,87 | 12,02 | 15,12 | 10,22 |

Ghi chú: CV là hệ số biến thiên. Trong cùng một cột, các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) của ba lần lặp lại; các giá trị mang cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

Giai đoạn nhân giống cấp 2

Trong ngày đầu, mật số vi tảo dao động từ 0,519 đến 0,670x10⁶ tế bào/mL ở các nghiệm thức và tăng mạnh sau 2 ngày nuôi cấy, đạt 2,177x10⁶ tế bào/mL ở tỷ lệ chủng giống 14%, không khác biệt đáng kể so với các tỷ lệ chủng giống 16% và 18%. Sau 6 ngày, mật số cao nhất ghi nhận ở tỷ lệ chủng giống 18% với 9,365x10⁶ tế bào/mL, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ chủng giống 12% (Bảng 4). Kết quả này cho thấy chỉ mất 1 ngày để vào pha log ở quá trình nhân giống cấp 2, ngắn hơn so với 2 ngày ở giai đoạn nhân giống cấp 1, chứng tỏ vi tảo đã thích nghi tốt với điều kiện môi trường và dinh dưỡng. Việc bước vào pha log sớm có ý nghĩa quan trọng, quần thể vi tảo nhanh chóng đạt mật số cao, giúp chiếm ưu thế về không gian sinh thái và dinh dưỡng trong

môi trường nuôi cấy. Yếu tố này đặc biệt quan trọng trong hệ nuôi không vô trùng, nơi vi sinh vật tạp nhiễm luôn hiện diện và cạnh tranh trực tiếp với vi tảo. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng vi sinh vật thường tồn tại trong môi trường đa dạng về loài và luôn có hiện tượng cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống [27]. Quần thể có tốc độ sinh trưởng cao thường chiếm ưu thế cạnh tranh và có khả năng định hình cấu trúc quần xã vi sinh vật trong môi trường [28]. Do đó, việc rút ngắn thời gian thích nghi và đưa vi tảo nhanh chóng và pha log không chỉ giúp nâng cao mật số tế bào mà còn góp phần hạn chế sự xâm nhập và phát triển của vi sinh vật tạp nhiễm.

Trên cơ sở này, để đảm bảo sinh trưởng ổn định và đạt mật số cao trong giai đoạn nhân giống cấp 2, tỷ lệ giống ban đầu từ 14% trở lên.

Bảng 4. Mật số vi tảo *Chlorella* sp. TV1 ($\times 10^6$ tế bào/mL) ở giai đoạn nhân giống cấp 2

| Tỉ lệ giống (%) | Thời gian nuôi cấy (ngày) | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 12 | 0,519 \pm 0,091 ^b | 1,959 \pm 0,036 ^b | 3,502 \pm 0,337 ^{cd} | 4,579 \pm 0,423 ^c | 5,755 \pm 0,526 ^{bc} | 7,769 \pm 0,978 ^{bc} |
| 14 | 0,634 \pm 0,093 ^{ab} | 2,177 \pm 0,078 ^a | 3,769 \pm 0,044 ^{bc} | 4,642 \pm 0,241 ^{bc} | 6,402 \pm 0,766 ^{ab} | 8,092 \pm 0,590 ^{abc} |
| 16 | 0,546 \pm 0,080 ^a | 2,389 \pm 0,007 ^a | 4,072 \pm 0,031 ^{ab} | 5,442 \pm 0,260 ^{ab} | 7,039 \pm 0,752 ^a | 8,449 \pm 1,323 ^{ab} |
| 18 | 0,670 \pm 0,048 ^a | 2,345 \pm 0,0386 ^a | 4,222 \pm 0,103 ^a | 5,182 \pm 0,073 ^a | 7,335 \pm 0,354 ^a | 9,365 \pm 0,810 ^a |
| CV (%) | 16,58 | 7,03 | 7,09 | 8,29 | 11,41 | 13,47 |

Ghi chú: CV là hệ số biến thiên. Trong cùng một cột, các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) của ba lần lặp lại; các giá trị mang cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

Giai đoạn nhân giống cấp 3

Trong 2 ngày đầu tiên, giá trị OD ở tất cả các nghiệm thức đều tăng nhưng rất chậm, mật số cao nhất chỉ đạt $0,868 \times 10^6$ tế bào/mL, cho thấy vi tảo đang trong giai đoạn thích nghi (pha lag) với môi trường điều kiện nuôi quy mô nhân giống ở thể tích 4 L. Từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4, vi tảo bước vào pha log ở tất cả các nghiệm thức. Giai đoạn từ ngày 4 đến ngày 6 ghi nhận mật số tiếp tục tăng và dần có xu hướng ổn định, đặc biệt rõ ở các nghiệm thức có tỷ lệ chủng giống 18% (mật số $0,50 \times 10^6$ tế bào/mL), cho thấy vi tảo đã thích nghi và phát triển ổn định. Từ ngày 6 đến ngày 9, mật số vi tảo vẫn tiếp tục tăng nhẹ ở tất cả các nghiệm thức, vi tảo vẫn duy trì khả năng phát triển và ổn định trong suốt giai đoạn từ ngày 4 đến ngày 9. Tại thời điểm ngày 9, mật số vi tảo ở các nghiệm thức dao động từ 6,305 đến $6,735 \times 10^6$ tế bào/mL, nhưng không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức với tỷ lệ chủng ban đầu từ 12% đến 18% (Bảng 5).

Nồng độ vi tảo giống ban đầu thấp có thể dẫn đến việc kéo dài pha tiềm ẩn và làm giảm tốc độ sinh trưởng do số lượng tế bào tham gia vào quá trình phân chia và chuyển hóa chất dinh dưỡng còn hạn chế. Ngược lại, nồng độ giống cấy ban đầu cao thường giúp rút ngắn pha tiềm ẩn và thúc đẩy tốc độ tăng trưởng của quần thể trong giai đoạn đầu [29]. Trong thực tế, tỷ lệ giống ban

đầu thường được điều chỉnh ở mức cao nhằm đẩy nhanh quá trình nhân giống và rút ngắn chu kỳ sản xuất. Tuy nhiên, khi nồng độ giống cấy quá cao, sự cạnh tranh về ánh sáng và chất dinh dưỡng có thể gia tăng, từ đó làm hạn chế sự phát triển và năng suất sinh khối của tế bào [30]. Do đó, việc tối ưu hóa mật số giống cấy là yếu tố cần thiết nhằm đạt được năng suất sinh khối cao và sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên trong quá trình nuôi cấy vi tảo [31].

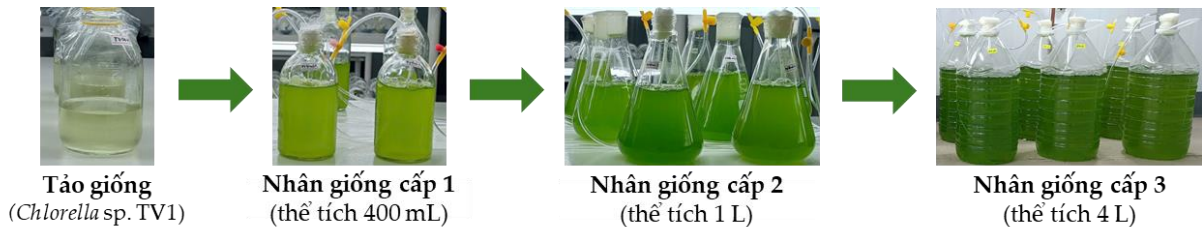
Kết quả nghiên cứu cho thấy mật số khởi đầu ở mức $0,452 \times 10^6$ tế bào/mL là phù hợp, trong khi việc tăng mật số ban đầu lên $0,50 \times 10^6$ tế bào/mL không khác biệt ý nghĩa về mật số sau 9 ngày. Do đó, việc áp dụng mật số khởi đầu trong khoảng $0,452 \times 10^6$ tế bào/mL không chỉ đảm bảo hiệu quả sinh trưởng mà còn góp phần giảm chi phí vận hành, hạn chế hao phí giống và ổn định chất lượng sinh khối *Chlorella* trong điều kiện sản xuất thực tế.

Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ tập trung vào việc xác định mật số khởi đầu phù hợp cho quá trình nhân giống trong điều kiện phòng thí nghiệm và chưa đánh giá quy trình nuôi sinh khối trực tiếp trong nước thải ao nuôi tôm ở quy mô ứng dụng, do đó cần có các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu hóa điều kiện nuôi thực tế và đánh giá hiệu quả xử lý nước cũng như năng suất sinh khối ở quy mô lớn.

Bảng 5. Mật số vi tảo *Chlorella* sp. TV1 ($\times 10^6$ tế bào/mL) ở giai đoạn nhân giống cấp 3

| Tỉ lệ giống (%) | Thời gian nuôi cấy (ngày) | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 12 | 0,437±0,104 ^c | 0,706±0,102 ^c | 2,812±0,018 ^b | 4,132±0,371 ^a | 4,295±0,027 ^b | 4,899±0,115 ^a | 5,135±0,108 ^c | 6,022±0,249 ^a | 6,305±0,289 ^a |
| 14 | 0,452±0,113 ^{bc} | 0,790±0,088 ^b | 2,979±0,036 ^a | 4,055±0,016 ^a | 4,655±0,033 ^a | 5,402±0,087 ^a | 5,609±0,071 ^a | 6,305±0,366 ^a | 6,735±0,212 ^a |
| 16 | 0,483±0,116 ^{ab} | 0,837±0,078 ^{ab} | 3,010±0,061 ^a | 4,032±0,064 ^a | 4,645±0,014 ^a | 5,585±0,203 ^a | 5,569±0,079 ^{ab} | 6,299±0,095 ^a | 6,729±0,300 ^a |
| 18 | 0,500±0,109 ^a | 0,868±0,097 ^a | 3,021±0,052 ^a | 3,918±0,052 ^a | 4,505±0,035 ^a | 5,262±0,142 ^a | 5,325±0,072 ^{bc} | 6,195±0,274 ^a | 6,689±0,413 ^a |
| CV (%) | 4,49 | 4,96 | 3,08 | 7,10 | 3,30 | 5,13 | 3,99 | 6,25 | 6,63 |

Ghi chú: CV là hệ số biến thiên. Trong cùng một cột, các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD) của ba lần lặp lại; các giá trị mang cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).



Hình 3. Quy trình nhân giống vi tảo *Chlorella* sp. TV1

Điều kiện nuôi cấy

Dịch nuôi *Chlorella* sp. TV1 được kiểm soát ở nhiệt độ 22 ± 2 °C, độ mặn 20 ± 2 ‰, pH $8,3 \pm 0,2$, cường độ ánh sáng 5000 lux, chu kỳ chiếu sáng 16:8 giờ (sáng:tối) và sục khí liên tục.

Quy trình nhân giống

Giai đoạn nhân giống cấp 1 được tiến hành trong bình 400 mL với mật số tế bào ban đầu $0,313 \times 10^6$ tế bào/mL và kéo dài 6 ngày nhằm giúp vi tảo đạt trạng thái sinh trưởng ổn định.

Giai đoạn nhân giống cấp 2 được thực hiện trong bình 1 L với mật số ban đầu $0,634 \times 10^6$ tế bào/mL trong 6 ngày, giúp vi tảo thích nghi tốt hơn với điều kiện nuôi cấy.

Giai đoạn nhân giống cấp 3 được tiến hành trong bình 4 L với mật số ban đầu $0,452 \times 10^6$ tế bào/mL và kéo dài 9 ngày; ở giai đoạn này, vi tảo đã thích nghi hoàn toàn và sinh trưởng ổn định.

Một số lưu ý quan trọng

Trong suốt quá trình nhân giống, các điều kiện nuôi cấy và biện pháp kiểm soát kỹ thuật được thực hiện nghiêm ngặt nhằm đảm bảo môi trường ổn định và hạn chế nguy cơ tạp nhiễm. Cụ thể, nguồn nước nuôi được khử clo hoàn toàn bằng cách sục khí mạnh liên tục trong 48 giờ; dung dịch dinh dưỡng (stock solution) được khử trùng trước khi pha môi trường và độ mặn được điều chỉnh và duy trì ổn định bằng NaCl; pH được kiểm soát hằng ngày trong khoảng $8,3 \pm 0,2$ bằng NaOH và NaH_2CO_3 . Nhiệt độ và chu kỳ chiếu sáng được giữ cố định trong suốt quá trình nuôi cấy. Trong quá trình cấy chuyển giống, toàn bộ dụng cụ được vệ sinh sạch và khử trùng bằng tia UV trong 60 phút nhằm hạn chế nhiễm vi sinh vật có thể ảnh hưởng đến quá trình nhân giống [32, 33].

Nguy cơ nhiễm vi sinh vật và biện pháp khắc phục

Quá trình nhân giống có thể gặp khó khăn do sự nhiễm vi sinh vật và sinh vật ăn vi tảo, bao gồm vi khuẩn, nấm, tảo tạp và rotifer [34–36]. Các tác nhân này có thể cạnh tranh dinh dưỡng, ánh sáng hoặc trực tiếp tiêu thụ tế bào tảo, trong đó rotifer có khả năng gây hiện tượng “sụp tảo” trong thời gian ngắn. Để hạn chế nguy cơ này, môi trường và dụng cụ nuôi cấy cần được khử trùng nghiêm ngặt, khu vực nuôi vi tảo giống phải được cách ly và áp dụng chặt chẽ các biện pháp an toàn sinh học; khi phát hiện tạp nhiễm, quá trình nhân giống cần được ngưng và xử lý triệt để trước khi tiến hành mẻ nuôi mới.

Nguy cơ thiếu ánh sáng và biện pháp khắc phục

Ánh sáng đóng vai trò quan trọng đối với sinh trưởng của vi tảo; thiếu ánh sáng có thể làm chậm sinh trưởng. Bên cạnh đó cường độ ánh sáng cao có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn tạp nhiễm [37]. Vì vậy, việc cung cấp ánh sáng đầy đủ kết hợp với hệ thống sục khí hiệu quả nhằm đảm bảo sự tuần hoàn của vi tảo trong bể nuôi, tránh hiện tượng thiếu sáng ở đáy và vùng trung tâm bể, là yếu tố cần thiết để duy trì sự phát triển ổn định của quần thể vi tảo.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được bảy dòng vi tảo từ nước thải ao nuôi tôm và tuyển chọn thành công dòng *Chlorella* sp. TV1 có khả năng sinh trưởng mạnh trong môi trường Conway's. Xác định được quy trình nhân giống ba giai đoạn: giai đoạn nhân giống cấp 1 nuôi trong 6 ngày với mật số khởi đầu $0,313 \times 10^6$ tế bào/mL; giai đoạn nhân giống cấp 2 nuôi trong 6 ngày với mật số $0,634 \times 10^6$ tế bào/mL và giai đoạn nhân giống cấp 3 nuôi trong 9 ngày với mật số $0,452 \times 10^6$ tế bào/mL.

Nghiên cứu này lần đầu tiên xác định mật số khởi đầu tối ưu cho từng giai đoạn nhân giống *Chlorella* sp. bản địa từ nước thải ao tôm tại Việt Nam, góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất giống vi tảo quy mô lớn theo hướng bền vững và kinh tế tuần hoàn.

Lời cảm ơn: Đề tài này được tài trợ bởi Đại học Cần Thơ, Mã số: T2025-121.

Mâu thuẫn lợi ích: Không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Borowitzka MA. The 'stress' concept in microalgal biology-homeostasis, acclimation and adaptation. *J Appl Phycol.* 2018;30(5):2815-2825.
2. Tran CB. Technical efficiency of *Chlorella* sp. algae biomass culture using wastewater from *Pangasianodon hypophthalmus* ponds. *CTU J Sci.* 2013;28:157-162.
3. Tran CB, Le TQE, Pham HN, Nguyen XL, Nguyen MC. Usage of wastewater from *Pangasianodon hypophthalmus* ponds to culture *Chlorella* sp. *CTU J Sci.* 2015;39:90-96.
4. Nguyen TKH, Dang TT, Nguyen CT, Nguyen TPO. Study on potential for nitrate and phosphate absorbance of microlagae isolated from domestic wastewater. *CTU J Sci.* 2021;57(4):73-81.
5. Wang Y, Zhang Y, Wang J. Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. *Chin J Biotechnol.* 2010;26(8):1074-1079.
6. Vo TKT, Nguyen DT, Vo TLA, Pham HH. Application of *Chlorella* sp. and *Daphnia* sp. for treating organic waste derived from swine wastewater after UASB system usage. *Acad J Biol.* 2012;34(3se):145-153.
7. Nguyen TTX, Dang KH, Vo TT. Possibility of anaerobic digester effluent treatment through microalgae *Chlorella vulgaris* cultivation in orientation of biofuel production. *Univ Danang J Sci Technol.* 2014;3(76):83-86.
8. Becker EW. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* 2007;25(2):207-210.

9. Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(2):269-274.
10. Sayeda MA, Ali GH, El-Baz FK. Potential production of omega fatty acids from microalgae. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2015;34(2):210-215.
11. Abdel-Moatamed BR, El-Fakhrany AEM, Elneairy NA, Shaban MM, Roby MH. The impact of *Chlorella vulgaris* fortification on the nutritional composition and quality characteristics of beef burgers. *Foods.* 2024;13(12):1945.
12. Georgiou D, Charisis A, Exarhopoulos S, Papapanagiotou G, Samara C, Chatzidoukas C, Kalogianni EP. Comparative evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* for food-related applications. *Waste Biomass Valor.* 2025;1-15.
13. Nguyen TTT, Mac NB, Tran NN. Influence of nutrient media and salinity on growth of microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Hue Univ J Sci Agric Rural Dev.* 2021;130(3A):13-23.
14. Richmond A, Hu Q. Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology. 2nd ed. Chichester (UK): Wiley-Blackwell; 2013.
15. Santhanam P, Kumar SD, Ananth S, Jeyanthi S, Sasirekha R, Premkumar C. Effect of culture conditions on growth and lipid content of marine microalga *Nannochloropsis* sp. strain (PSDK11). *Indian J Geo-Mar Sci.* 2017;46(11):2332-2338.
16. Andersen RA, Brett RW, Potter D, Sexton JP. Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18s rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist.* 1998;149(1):61-74.
17. Baroni ÉG, Yap KY, Webley PA, Scales PJ, Martin GJO. The effect of nitrogen depletion on the cell size, shape, density and gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella* sp. (marine) and *Haematococcus pluvialis*. *Algal Res.* 2019;39:101454.
18. Singh V, Laura JS. Spectral monitoring and quantification of *Chlorella sorokiniana* for biomass production. *Ann Biol.* 2020;36(1):43-47
19. Tasnim N, Karmakar D, Hasan R, Islam R, Hossain S, Shaikh AA, Karim R. Effect of light intensity and pH on cell density assessed by spectrophotometry for the unicellular algae *Chlorella vulgaris*. *Am J Plant Sci.* 2023;14(4):472-481.
20. Do TBXL, Nguyen TK, Vu XT, Dao BN, Nguyen HH. A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications. *Vietnam J Sci Technol Eng.* 2017;59(4):66-74.
21. Tran TXM, Nguyen VB, Nguyen TP, Nguyen TL. Isolation and identification of thraustochytrid heterotrophic microalga for production of carotenoids. *CTU J Sci.* 2015;37:57-64.
22. Tran SN, Huynh TNH, Pham TTN. Development of *Chlorella* sp. in heterotrophic cultivation. *CTU J Sci.* 2017;50:127-132.
23. Zhang Q, Zhan J, Hong Y. The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of *Chlorella* sp. HQ. *Desalin Water Treat.* 2016;57(22):104030-10408.
24. Wang CA, Onyeaka H, Miri T, Soltani F. *Chlorella vulgaris* as a food substitute: Applications and benefits in the food industry. *J Food Sci.* 2024;89(12):8231-8247.
25. De Schryver P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME J.* 2014;8(11):2360-2368.
26. Tsai MT. Study on the lipid production from microalgal cultures and producing biodiesel from the microalgal lipid [Master's thesis]. Hsinchu (Taiwan): National Chiao Tung University; 2009.
27. Ghoul M, Mitri S. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol.* 2016;24(10):833-845.
28. Valiei A, Dickson AM, Aminian-Dehkordi J, Mofrad MRK. Bacterial community dynamics as a result of growth-yield trade-off and multispecies metabolic interactions toward understanding the gut biofilm niche. *BMC Microbiol.* 2024;24:441.
29. Zhang L, Lu HF, Zhang YH, Ma SS, Li BM, Liu ZD. Effects of strain, nutrients concentration and inoculum size on microalgae culture for bioenergy from post hydrothermal liquefaction wastewater. *Int J Agric Biol Eng.* 2017;10(2):194-204.
30. Bohutskyi P, Kligerman DC, Byers N, Nasr LK, Cua C, Chow S. Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. *Algal Res.* 2016;19:278-290.
31. Abdul-Sani ER, Chin GJWL, Yong WTL, Misson M. Optimization of inoculum cell concentration for enhanced lipid production in laboratory-scale cultivation of the marine microalga *Chlorella* sp. for biofuel applications. *Front Energy Res.* 2024;12:1490421.

32. Cutler TD, Zimmerman JJ. Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents. *Anim Health Res Rev.* 2011;12(1):15-23.
33. Górný RL, Gołofit-Szymczak M, Pawlak A, Ławniczek-Wałczyk A, Cyprowski M, Stobnicka A, Płocińska M. Effectiveness of UV-C radiation in inactivation of microorganisms on materials with different surface structures. *Ann Agric Environ Med.* 2024;31(2):287-293.
34. Deruyck B, Nguyen TNK, Decaestecker E, Muylaert K. Modeling the impact of rotifer contamination on microalgal production in open pond, photobioreactor and thin layer cultivation systems. *Algal Res.* 2019;38:101398.
35. Di Caprio F. Methods to quantify biological contaminants in microalgae cultures. *Algal Res.* 2020;49:101943.
36. Laezza C, Salbitani G, Carfagna S. Fungal contamination in microalgal cultivation: Biological and biotechnological aspects of fungi-microalgae interaction. *J Fungi.* 2022;8(10):1099.
37. Assuncao FF de O, Nascimento É, Chaves L, da Silva AMH, Martinez R, Guirro RR de J. Inhibition of bacterial growth through LED (light-emitting diode) 465 and 630 nm: *In vitro.* *Lasers Med Sci.* 2022;37(5):2439-2447.