

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ, MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY, KÍCH THÍCH TĂNG TRƯỞNG ĐẾN SỰ TĂNG SINH CỦA TẢO *PLATYMONAS* SP.

RESEARCH OF *PLATYMONAS* SP. MORPHOLOGY CHARACTERS AND INFLUENCING OF CULTURAL MEDIUM, CONCENTRATION OF GROWTH REGULATOR ON *PLATYMONAS* SP.

Nguyễn Minh Nam¹, Đậu Thị Kim Dung, Khuu Hoàng Minh, Đỗ Thị Thanh Hương,
Lê Thị Phương Hồng
Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

SUMMARY

Finding suitable medium and condition to increase biomass of seaweed play a important role in its applications. The aim of this research was creating a suitable medium to cultivate *Platymonas*. On the other hand, we also studied on influencing of NAA and cytokinine, plant growth regulator agents, on *Platymonas* growth. *Platymonas* biomass was the highest at 15%. Biomass increased when we increased concentration of cultivated seaweed. It was not different that grown *Platymonas* in Wanle and ure medium. *Platymonas* grew well in molasses and biogas medium. Cytokinine stimulated cell division and extend cell life at 2.5mg/l. NAA intensified biomass and cell size.

Key word: platymonas, NAA, 2iP, biogas medium.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tảo là vi sinh vật có khả năng quang hợp giống cây xanh. Chúng phát triển rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt là nơi có đầy đủ ánh sáng mặt trời, pH môi trường trung tính hoặc kiềm nhẹ, có nhiều dinh dưỡng. Sinh khối tảo có hàm lượng protein cao và chứa đầy đủ các acid amine (cả thay thế và không thay thế), nên tảo ngày càng được sử dụng rộng rãi để sản xuất sinh khối giàu protein (Nguyễn Đức Lượng, 2003).

Trong nuôi trồng thủy sản, tảo đóng vai trò quan trọng “không có tảo không có nghề cá” (Vimbe, 1965). Tảo là mắt xích đầu tiên trong chuỗi thức ăn tự nhiên. Sinh khối tảo có tính chất quyết định tới năng suất thủy sản.

Sinh khối của tảo có giá trị ứng dụng thực tế rất cao như làm thức ăn cho gia súc thức ăn cho nuôi trồng thủy sản, làm thực phẩm cho người, làm phân bón, sử dụng như hóa chất,... Việc tăng sinh khối của tảo có ý nghĩa quan trọng. Đối với nuôi trồng thủy sản, khi tăng năng suất của tảo sẽ thay thế phần lớn thức ăn nhân tạo hiện nay. Đối với ứng dụng khác của tảo như làm thức ăn gia súc, làm thực phẩm, mỹ phẩm... thì việc tăng năng suất của tảo có tính chất quyết định tới thành công của các ứng dụng đó.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

- Tảo giống *Platymona*

¹ Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
Email: saophuongnam05@gmail.com, mnam-az@hcmuaf.edu.vn. ĐT: 0904972804.

- Môi trường nuôi cấy: môi trường Walne (Laing, 1991; trích bởi Lavens và Sorgeloos, 1996).

- Ure: được thêm vào trong nước biển (2%) sau khi đã hấp khử trùng (1 atm trong 30 phút) với nồng độ 10g/l.

- Môi trường rỉ đường: 1kg rỉ đường được thêm 3,5g H₂SO₄ và đun nóng ở 85°C, khuấy liên tục trong vòng 6 giờ. Sau đó pha loãng 1,25ml rỉ đường trong 1l nước biển (2%), đem hấp khử trùng ở 1atm trong 30 phút.

- Môi trường Biogas: dịch thải sau khi được xử lý qua hệ thống biogas được lọc qua bông gòn. Pha loãng dịch này với tỉ lệ 3 nước biển:2 dịch thải biogas. Sau đó đem hấp khử trùng ở 1atm trong 30 phút.

-Kích thích tố tăng trưởng thực vật: auxin, cytokinine.

Phương pháp

Thí nghiệm 1: thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ tảo nuôi cấy ban đầu lên sự gia tăng mật độ tảo.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Tảo giống *Platymonas* được cấy ở 3 nồng độ 5%, 10%, 15% vào 400ml nước biển (2%) trong chai 500ml trong môi trường Walne.

Thí nghiệm2: thí nghiệm so sánh sự tăng sinh của tảo *Platymonas* trong các môi trường Walne, biogas, ure và rỉ đường.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Tảo giống *Platymonas* được cấy ở nồng độ 10% vào 400ml môi trường Walne, biogas, ure, rỉ đường.

Thí nghiệm 3: đánh giá ảnh hưởng của NAA (naphtyl axetic acid) ở các nồng độ 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05mg/l và 2iP ở các nồng độ 0,1; 0,5; 2,5mg/l lên sự tăng sinh của tảo *Platymonas*.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu đa yếu tố. Tảo giống *Platymonas* được cấy ở nồng độ 10% vào 400ml môi trường Walne. Auxin (NAA) được thêm vào để đạt các nồng độ 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05mg/l. Cytokinine được thêm vào để đạt các nồng độ 0,1; 0,5; 2,5mg/l. Điều kiện nuôi cấy: độ mặn 20 - 25‰, pH 8 – 8,5, tốc độ sục khí 500ml/l, cường độ chiếu sáng 3000 – 3500lux.

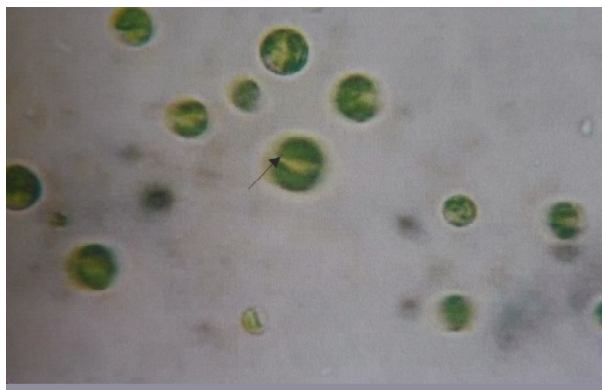
Mật độ tảo được xác định bằng đo OD ở bước sóng 560nm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái và sự phân chia của tảo *Platymonas* trong quá trình tăng sinh

Tế bào hình trứng, có hai chiên mao. Lục lạp hình chén.

Sự phân chia xảy ra trong tế bào mẹ tạo thành 2; 4; 8;... tế bào con (hình 1; 2; 3). Đầu tiên tế bào mẹ sẽ phân chia thành hai tế bào con sau đó tiếp tục phân chia để tạo thành 4; 8;... tế bào con. Trong giai đoạn phân chia này các tế bào con vẫn chưa thoát ra môi trường mà được bao bọc bởi màng của tế bào mẹ (hình 4).



Hình 1. Tế bào hình thành vách phân chia đầu tiên (100X)



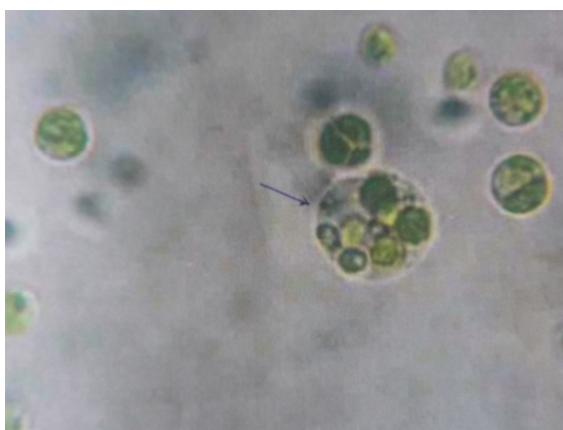
Hình 2. Tế bào phân chia thành 2 tế bào con (100X)



Hình 3. Bốn tế bào con trong nang bào tử



Hình 4. Tế bào con được phóng thích khỏi tế bào mẹ (100X)



Hình 5. Tế bào hình thành bào tử bất động (100X)

Sau đó màng tế bào vỡ ra phóng thích các tế bào con. Chúng có kích thước khoảng 1,25 μ m. Giai đoạn này được thấy nhiều nhất ở pha logarit, khi các tế bào đang phân chia nhanh để đạt mật độ cực đại. Các tế bào con sẽ tiếp tục hấp thu dinh dưỡng và ánh sáng để tăng trưởng. Các tế bào trưởng thành có kích thước khoảng 6,25 μ m, tiếp tục phân chia để tạo tế bào con.

Khi gặp điều kiện môi trường bất lợi, tế bào hình thành bào tử bất động (aplanospore) có lớp vách dày ngay từ lúc hình thành, có thể sống rất lâu. Khi gặp điều kiện thuận lợi tế bào tự tách lớp vách bên ngoài rồi phát triển thành cơ thể mới.

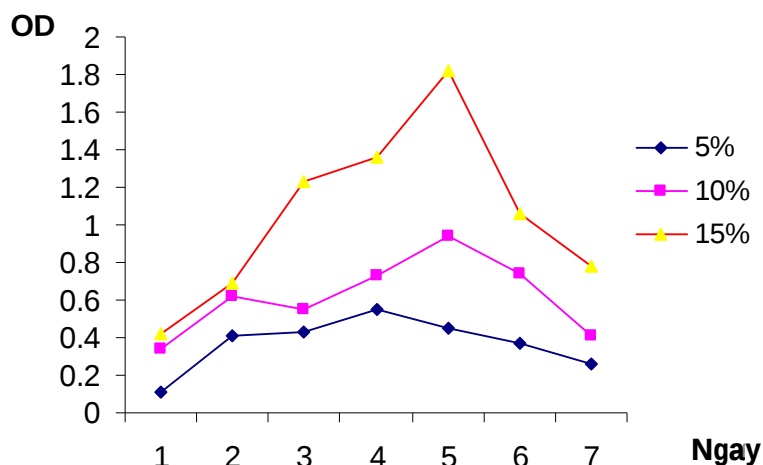
Ảnh hưởng của các nồng độ tảo nuôi cấy ban đầu lên sự gia tăng mật độ tảo

Kết quả ảnh hưởng của nồng độ tảo nuôi cấy ban đầu được trình bày ở bảng 1 và biểu đồ 1.

Bảng 1. Kết quả đo OD khi nuôi cấy tảo ở các nồng độ khác nhau

Ngày	5%				10%				15%			
	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	TB	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	TB	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	TB
1	0,11	0,11	0,11	0,11	0,34	0,34	0,35	0,34	0,42	0,42	0,43	0,42
2	0,38	0,42	0,42	0,41	0,59	0,65	0,62	0,62	0,73	0,68	0,67	0,69
3	0,42	0,41	0,45	0,43	0,54	0,56	0,55	0,55	1,22	1,24	1,22	1,23
4	0,53	0,55	0,56	0,55	0,68	0,73	0,77	0,73	1,36	1,37	1,36	1,36
5	0,45	0,46	0,45	0,45	0,95	0,91	0,95	0,94	1,78	1,78	1,89	1,82
6	0,37	0,37	0,38	0,37	0,73	0,72	0,76	0,74	1,01	1,10	1,07	1,06
7	0,28	0,26	0,23	0,26	0,43	0,40	0,42	0,41	0,79	0,77	0,79	0,78

Kết quả cho thấy khi nuôi cấy tảo ở các nồng độ khác nhau có sự khác biệt ($P < 0,05$).



Biểu đồ 1. Mật độ tảo trong 7 ngày nuôi cấy

Pha sinh trưởng của tảo *Platymonas* là bảy ngày. Ở ngày thứ nhất và ngày thứ hai sinh khối tảo tăng ở cả ba nghiệm thức. Ở ngày thứ ba nghiệm thức 15% tăng nhanh hơn hai nghiệm thức còn lại. Sang ngày thứ tư tảo vẫn tiếp tục tăng trưởng mạnh. Mật độ tảo đạt cực đại vào ngày thứ năm. Sang ngày thứ sáu và thứ bảy mật độ tảo giảm nhanh và nhanh nhất ở nghiệm thức 15%.

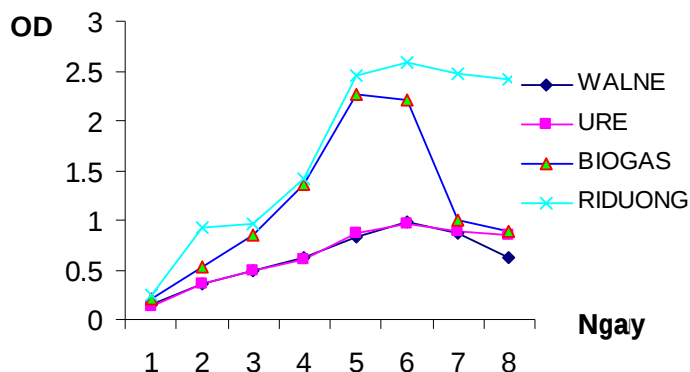
So sánh sự tăng sinh của tảo *Platymonas* trong các môi trường Walne, biogas, ure và rỉ đường

Sự tăng trưởng của tảo *Platymonas* trong môi trường Walne và môi trường ure không có sự khác biệt ($P > 0,05$) nhưng có sự khác biệt khi nuôi cấy tảo *Platymonas* trong môi trường Walne, ure, biogas và rỉ đường ($P < 0,05$) (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đo OD khi nuôi cấy tảo ở các môi trường khác nhau

Ngày	WALNE			URE			BIOGAS			RỈ ĐƯỜNG		
	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3
1	0,15	0,14	0,15	0,13	0,12	0,13	0,21	0,21	0,20	0,33	0,20	0,23
2	0,37	0,36	0,37	0,38	0,36	0,36	0,53	0,53	0,53	0,86	0,95	0,96
3	0,50	0,48	0,49	0,51	0,50	0,49	0,85	0,84	0,83	0,90	1,00	1,00
4	0,61	0,63	0,64	0,60	0,59	0,60	1,34	1,36	1,37	1,41	1,43	1,42
5	0,81	0,83	0,86	0,89	0,87	0,87	2,27	2,25	2,27	2,52	2,45	2,37
6	0,98	0,99	0,97	0,96	0,96	0,97	2,20	2,23	2,19	2,46	2,5	2,48
7	0,86	0,87	0,87	0,87	0,89	0,87	1,00	0,98	1,00	2,60	2,59	2,58

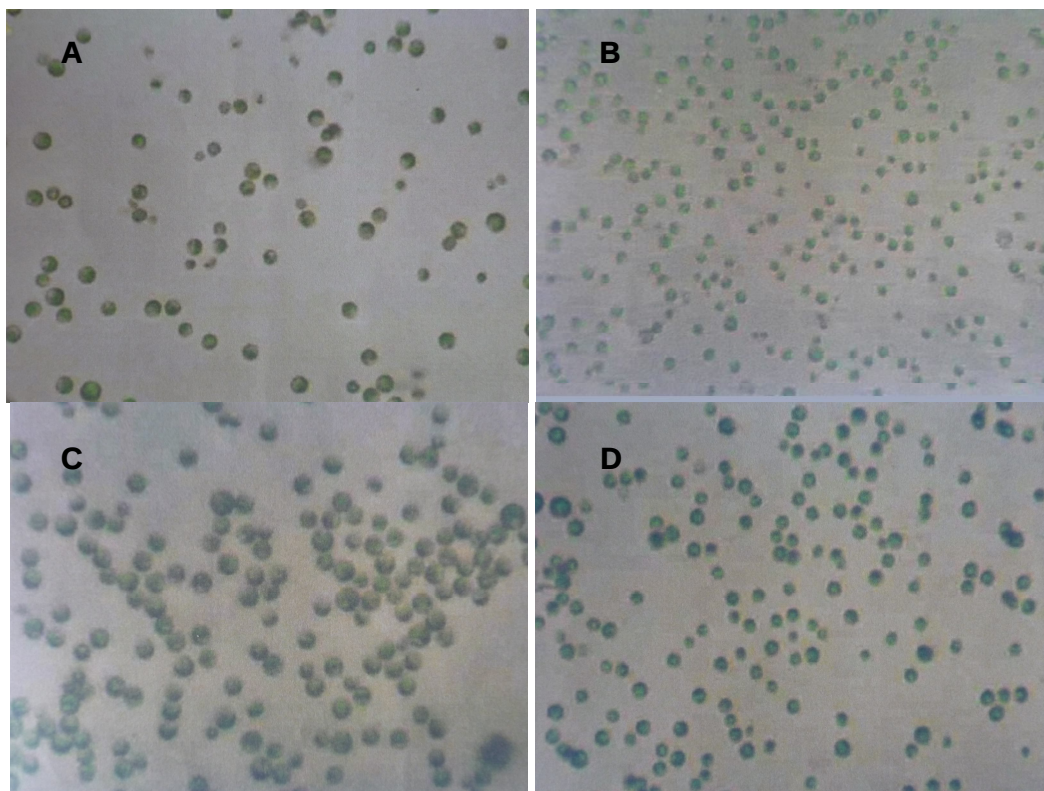
Trong môi trường rỉ đường và môi trường biogas tảo *Platymonas* tăng trưởng tốt hơn, tốt nhất là môi trường rỉ đường. Trong môi trường rỉ đường pha tăng trưởng của *Platymonas* diễn ra dài hơn. Kết quả này phù hợp với nhận định rằng sinh khối tảo đạt được khác nhau là do sự thay đổi hàm lượng các thành phần muối dinh dưỡng, đặc biệt là hàm lượng nitrate (Culver và Smith, 1989; trích bởi Đậu Thị Như Quỳnh, 2001).



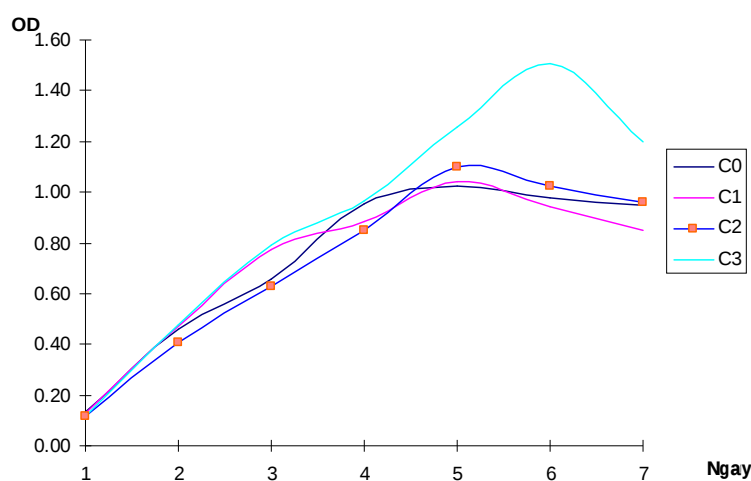
Biểu đồ 2. Mật độ tảo khi nuôi cấy trong các môi trường khác nhau

Ảnh hưởng của NAA (naphtyl axetic acid) và lên hình thái và sự tăng sinh của tảo *Platymonas*

Hình dạng tế bào tảo có sự khác biệt khi xử lý kích thích tố ở các nồng độ khác nhau. So với đối chứng không bổ sung kích thích tố tăng trưởng thực vật kích thước tế bào lớn hơn khi có bổ sung NAA và mật độ tế bào tăng cao hơn khi có bổ sung cytokinine (hình 6A, B, C). Khi bổ sung cả NAA và cytokinine mật độ và kích thước tế bào đều tăng (hình 6D). Điều này chứng tỏ kích thích tố tăng trưởng thực vật (NAA, cytokinine) có ảnh hưởng tới sự phân chia và hình thái tế bào tảo *Platymonas*.



Hình 6. Hình thái tế bào khi bổ sung kích thích tố tăng trưởng thực vật (A: đối chứng; B: bổ sung cytokinin 2,5mg/l; C: bổ sung NAA 0,05mg/l; D: bổ sung 0,05mg/l NAA và 2,5mg/l cytokinin. Độ phóng đại 40X).

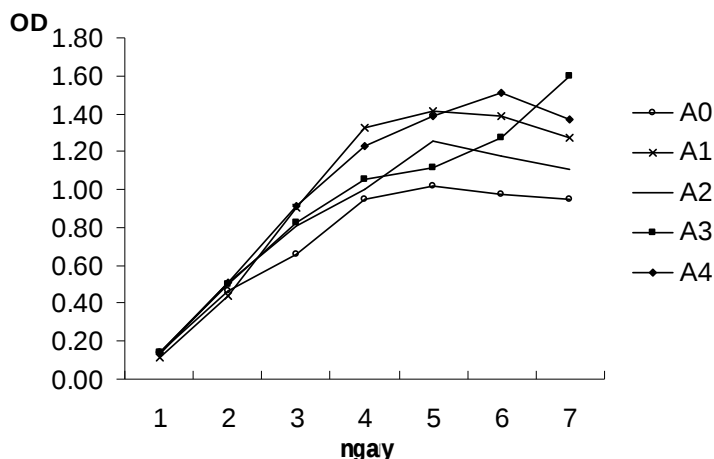


Biểu đồ 3. Mật độ tảo khi bổ sung cytokinin ở các nồng độ khác nhau (C0, C1, C2, C3: nồng độ cytokinin 0; 0,1; 0,5; 2,5mg/l)

Ở lô đối chứng chu kỳ tăng trưởng của tảo là 7 ngày, sinh khối đạt cực đại ở ngày thứ 5 sau đó chúng chuyển qua pha tàn lụi. Đối với lô có xử lý kích thích tố tăng trưởng thực vật kết quả đạt được rất khác nhau. Nhìn chung, pha tàn lụi diễn ra chậm hơn.

Việc xử lý kích thích tố tăng trưởng thực vật cytokinin ở các nồng độ 0; 0,1; 0,5mg/l không có sự khác biệt ($P>0,5$), nhưng có sự khác biệt khi xử lý ở nồng độ 2,5mg/l. Như vậy

cytokinine có ảnh hưởng sự tăng sinh của tảo ở nồng độ lớn hơn 2,5mg/l. Kết này phù hợp với đặc tính của cytokinine; làm tăng sự phân chia tế bào và kéo dài thời gian hoạt động của tế bào phân sinh, làm hạn chế sự hóa già của tế bào nên thời gian sinh khối đạt cực đại và thời gian chuyển sang pha tàn lụi diễn ra chậm hơn. Sự tăng sinh của *Platymonas* đạt cực đại vào ngày thứ 4 và thứ 5 sau đó chuyển sang pha tàn lụi. Riêng ở nghiệm thức bổ sung cytokinine 2,5mg/l sinh khối đạt cực đại vào ngày thứ 6 sau đó mới chuyển sang pha tàn lụi.



Biểu đồ 4. Mật độ tảo khi bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau (A0, A1, A2, A3, A4: NAA ở các nồng độ 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05mg/l)

Bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau vào môi trường tăng sinh tảo có sự khác biệt ($P < 0,05$). Khác biệt rõ nhất là ở nghiệm thức bổ sung NAA ở nồng độ 0,05mg/l. NAA không những làm tăng sinh khối mà còn có tác dụng kéo dài chu kỳ tăng trưởng của tế bào.

KẾT LUẬN

Trong khoảng nồng độ nuôi cấy ban đầu từ 5 – 15% sự tăng sinh của tảo *Platymonas* tăng theo sự gia tăng của nồng độ nuôi cấy ban đầu.

Môi trường Walne không phải là môi trường tối ưu nhất cho tảo *Platymonas* sinh trưởng. Sự sinh trưởng của tảo *Platymonas* trong môi trường Walne và ure không có sự khác biệt.

Tảo *Platymonas* sinh trưởng tốt trong môi trường ri đường và môi trường biogas.

Kích thích tăng trưởng thực vật có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và hình thái của tảo *Platymonas*. NAA làm gia tăng sinh khối và kích thước tế bào tảo. Cytokinin kích thích sự phân chia tế bào và kéo dài thời gian lão hóa của tế bào ở nồng độ lớn hơn 2,5mg/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phạm Hoàng Hộ, 1972. *Tảo học*. NXB giáo dục.

Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Thị Thùy Dương, 2003. *Công nghệ sinh học và môi trường (Tập 2: Xử lý chất thải hữu cơ)*. NXB Đại học Quốc gia TP. HCM.

Phạm Đình Kim, 1999. *Công nghệ vi tảo*. NXB nông nghiệp Hà Nội.

Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. 295p.