

## PHÂN LẬP VI TẢO *Dunaliella salina* NT6 TẠI KHÁNH HÒA VÀ NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG VÀ TỔNG HỢP $\beta$ -CAROTEN CỦA TẢO

Nguyễn Thị Hải Thanh<sup>1</sup> và Ngô Đăng Nghĩa

<sup>1</sup> Đại học Nha Trang

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

### Title:

Isolation microalgae *Dunaliella salina* NT6 in Khanh Hoa province and studying factors affecting the growth and  $\beta$ -carotene production

### Từ khóa:

*Dunaliella salina*, vi tảo biển,  $\beta$ -carotene, ruộng muối, môi trường J/I

### Keywords:

*Dunaliella salina*, marine microalgae,  $\beta$ -carotene, salt fields, J/I medium

### ABSTRACT

The halophytic green micro algae *Dunaliella salina* has an important economic value because it contains  $\beta$ -carotene, glycerol and other accessory pigments, which have pharmaceutical application. In this study, *Dunaliella salina* NT6 was isolated from 30 water samples collected in salt fields along the coast of Khanh Hoa province and assessed the role of cultural medium, temperature, light and salinity concentration to the growth and  $\beta$ -carotene production of this strain. As the result, after 7 days enrichment on J/I 8.8% *Dunaliella salina* NT6 strain were isolated by transplanting on agar plates, diluting samples and morphological observation on optical microscope. The J/I medium comforted the growth of the algae when compared with Walne and F/2 medium. Furthermore, *D.salina* NT6 grew the best in NaCl 2M, 14.000lux and 28°C. Under high salt concentration (2M NaCl) and strong light energy constantly 14.000lux,  $\beta$ -carotene concentration was accumulated up to 2.94 pg/cell in this strain. These findings contribute into studying on diversity of *Dunaliella* species in Khanh Hoa and further their applications in functional drugs and fish aquaculture.

### TÓM TẮT

Vi tảo biển *Dunaliella salina* có giá trị kinh tế lớn bởi nó có chứa các hợp chất có ứng dụng quan trọng trong dược phẩm như  $\beta$ -carotene, glycerol và các chất màu khác. Trong nghiên cứu này, chủng *Dunaliella salina* NT6 được phân lập từ 30 mẫu nước thu tại các ruộng muối dọc bờ biển Khánh Hòa và được đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, nhiệt độ, ánh sáng và độ mặn tới sự sinh trưởng và tích lũy  $\beta$ -carotene của chủng vi tảo này. Kết quả chỉ ra, sau 7 ngày được làm giàu trong môi trường J/I 8.8% chủng *Dunaliella salina* NT6 được phân lập bằng phương pháp cấy trên đĩa thạch, pha loãng mẫu và quan sát hình thái trên kính hiển vi quang học. Môi trường J/I hỗ trợ sinh trưởng của *D.salina* NT6 so với môi trường F/2 và Walne. Hơn nữa, *D.salina* NT6 sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ muối NaCl 2M, ánh sáng 14.000 lux và nhiệt độ 28°C. Trong điều kiện nồng độ muối cao (2M) và chiếu sáng mạnh (14.000lux) chủng NT6 có thể tích lũy hàm lượng  $\beta$ -carotene lớn hơn 2.94 pg/tế bào. Những kết quả này góp phần nghiên cứu tính đa dạng của các loài *Dunaliella* trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa và những ứng dụng xa hơn của vi tảo này làm thực phẩm chức năng và trong nuôi trồng thủy sản.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi tảo là một cấu thành quan trọng của sinh vật phù du (plankton), đóng vai trò trong việc duy trì và phát triển hệ sinh thái dưới nước. Vi tảo là thức ăn tươi sống đặc biệt quan trọng cho sự phát triển ấu trùng của hầu hết các loài tôm, cá, ốc và cho các động vật phù du; tính ưu việt của vi tảo là không gây ô nhiễm môi trường, cung cấp đầy đủ các vitamin, chất khoáng, vi lượng, đặc biệt là chúng chứa rất nhiều loại axit béo không no. Chúng có giá trị dinh dưỡng rất cao và phạm vi ứng dụng rộng rãi (Sena *et al*, 1995).

Carotenoid là nhóm sắc tố có khả năng chống oxy hóa hữu hiệu, giúp ngăn ngừa hoặc trì hoãn các bệnh mãn tính như ung thư, lão hóa, xơ cứng động mạch, đục thủy tinh thể. Việc sản xuất carotenoid từ nguồn có sẵn trong tự nhiên được cho là an toàn hơn vì ít tạo ra các dạng đồng phân cấu trúc có khả năng ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người so với từ con đường tổng hợp hóa học. Vi tảo biển, đặc biệt là loài *Dunaliella salina*, trong các điều kiện nhất định, có khả năng tổng hợp nguồn  $\beta$ -caroten rất hữu hiệu (Ben-Amotz, 1987).

Trên thế giới, mô hình làm giàu  $\beta$ -caroten trong sinh khối của *D.salina* đã được nghiên cứu trên qui mô phòng thí nghiệm và sản xuất thương mại (Hejazi *et al.*, 2004). Viên nén được làm từ tảo *D.salina* có hàm lượng đạm, lipid, carbohydrat tương đối cao, lại giàu  $\beta$ -caroten, do đó có tác dụng tăng cường sức khỏe, giúp đẹp da, sáng mắt, tăng cường hệ miễn dịch và chống lão hóa. Ngoài ra, tảo *D.salina* giàu carotenoid có thể được sử dụng trong nuôi trồng thủy hải sản, đặc biệt là các giai đoạn ương ấu trùng các loài thủy sản có giá trị kinh tế cao. Do đó, đã có một số công trình trong nước nghiên cứu về chủng vi tảo này nhằm ứng dụng trong y dược và nuôi trồng thủy sản (Đặng Diễm Hồng và *ctv*, 1998, Hoàng Thị Kim Thoa và *ctv*, 2006; Huỳnh Hiệp Hùng và *ctv*, 2013).

Để tích lũy  $\beta$ -caroten cần độ mặn cao, nhiệt độ cao và cường độ chiếu sáng lớn, các nghiên cứu chỉ ra ở độ mặn trên 27‰ NaCl *D.salina* có thể tích lũy được lượng carotenoid lên tới trên 14% khối lượng khô (Ben-Amotz, 1991). Khánh Hòa có đường bờ biển dài, cường độ chiếu sáng mạnh quanh năm, vào mùa khô nhiệt độ luôn duy trì ở mức ổn định 25-35°C, hơn nữa có hệ thống các ruộng muối có độ mặn cao, vì vậy là điều kiện rất tốt để vừa xen canh làm muối, vừa nuôi trồng vi tảo biển sinh carotenoid. Vì vậy, việc phân lập và nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tổng hợp  $\beta$ -caroten của vi

tảo biển *D.salina* góp phần nghiên cứu tính đa dạng của các loài *Dunaliella* trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa nhằm khai thác các loài bản địa và những ứng dụng xa hơn của vi tảo này làm thực phẩm chức năng và thức ăn nuôi trồng thủy sản.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Vi tảo *D.salina* được phân lập từ ruộng muối thuộc các xã Ninh Diêm, Ninh Hải, Ninh Thủy, Dốc Lết thuộc huyện Ninh Hòa; và Canh Ranh tỉnh Khánh Hòa.

### 2.2 Thu và xử lý mẫu

Sử dụng bình nhựa thu mẫu trong các ô của ruộng muối, các mẫu thu xong được đưa ngay về phòng thí nghiệm, lọc qua lưới lọc sinh vật phù du để loại bớt tạp chất, làm tiêu bản soi tươi để kiểm tra sơ bộ sự có mặt của tảo *Dunaliella salina*, bổ sung môi trường J/1 8.8% để nuôi làm giàu. Sau 10 ngày, khi thấy dung dịch có màu xanh của tảo thì đem mẫu quan sát dưới kính hiển vi và bắt đầu phân lập.

### 2.3 Phân lập bằng phương pháp pha loãng

Tảo *Dunaliella salina* được phân lập bằng phương pháp pha loãng mẫu theo mô tả của Nguyễn Thị Hương và *ctv*, 2001. Môi trường phân lập: J/1 8.8%.

### 2.4 Phân lập bằng phương pháp cấy trên môi trường thạch

Quá trình phân lập được tiến hành theo phương pháp của Shirai có cải tiến. Nhỏ 1 ml dịch mẫu vi tảo trên đĩa thạch chứa môi trường J/1 8.8%. Tảo được nuôi 2 -3 tuần ở nhiệt độ 20-22°C với cường độ ánh sáng 3000 - 4000 lux theo quang chu kỳ 24h sáng 0h tối. Sau 10-20 ngày xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh. Dựa vào hình thái để chọn khuẩn lạc mong muốn. Sau khi xác định chính xác, dùng que cấy tách các khuẩn lạc ra và đưa vào nuôi trong các lọ 5 ml. Quá trình phân lập có thể diễn ra nhiều lần đến khi phân lập được khuẩn lạc thuần.

Vi tảo *Dunaliella salina* được xác định tên loài bằng việc so sánh hình thái với khóa phân loại của Tomas (Tomas *et al*, 1997).

### 2.5 Phương pháp xác định khả năng sinh trưởng của vi tảo

Xác định mật độ tế bào bằng việc sử dụng buồng đếm hồng cầu Neubauer (Guillard, 1978 và Schoen, 1988), xử lý số liệu và vẽ đồ thị tăng trưởng của tảo.

## 2.6 Thăm dò ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp $\beta$ -caroten của tảo *Dunaliella*

Sự tích lũy  $\beta$ -caroten cần nhiệt độ cao, độ mặn cao và cường độ chiếu sáng mạnh (Ben-Amotz, 2009). Vì vậy, việc điều chỉnh cường độ ánh sáng và độ mặn có thể là chiến lược tốt nhất để đạt được mức tích lũy  $\beta$ -carotene tối ưu (Madadkar & Shariati, 2007; Madadkar et al, 2009). Ngoài ra, khả năng sinh trưởng của tảo phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và nhiệt độ (Ben-Amotz, 1991; Shariati & Hadi, 2011).

### 2.6.1 Chọn môi trường nuôi cấy thích hợp

Để xác định môi trường nuôi thích hợp chúng tôi sử dụng 3 loại môi trường thường được sử dụng để nuôi tảo *Dunaliella* là môi trường J/1, môi trường F/2 và môi trường Walne.

Mật độ ban đầu được chọn là  $5 \times 10^3$  tb/ml (Fazeli et al, 2006; Celekli and Donmez, 2005; Patricia and Gonzalez, 2005), ánh sáng 7500lux (Rad et al, 2011), chu kỳ chiếu sáng 24/24 giờ, nhiệt độ 28°C, thể tích nuôi 1l. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tiến hành theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của tế bào bằng phương pháp đếm số lượng tế bào từ đó xác định được môi trường nuôi thích hợp nhất.

### 2.6.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường

Bố trí thí nghiệm:

Nhiệt độ: 20-22°C, 28°C, nhiệt độ phòng (nhiệt độ biến thiên theo chu kỳ ngày và đêm)

Mật độ ban đầu:  $5 \times 10^6$  (Rad et al., 2011)

Cường độ chiếu sáng: 7500lux (Rad et al., 2011)

Độ mặn: J/1 12.5% (Shariati et al., 2011)

Thời gian chiếu sáng: 24/0h

Sục khí liên tục

Thể tích nuôi: 1000ml

### 2.6.3 Ảnh hưởng của độ mặn

Bố trí thí nghiệm:

Nhiệt độ: Từ nghiệm thức lựa chọn nhiệt độ

Mật độ ban đầu:  $5 \times 10^6$  (Rad et al, 2011)

Cường độ chiếu sáng: 10.000lux

Độ mặn: J/1 1M-5M (3.3%, 5.85%, 8.8%, 11.7%, 17.5%, 23.4%, 29.5%, 31%, 33%)

Thời gian chiếu sáng: 24/24h

Sục khí liên tục

Thể tích nuôi: 1000 ml

### 2.6.4 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng

Bố trí thí nghiệm:

Nhiệt độ: 28°C

Mật độ ban đầu:  $5 \times 10^6$

Cường độ chiếu sáng: 10.000lux - 14.000lux được thiết kế bằng việc sử dụng đèn đèn huỳnh quang và dùng máy đo cường độ sáng.

Độ mặn: Từ nghiệm thức lựa chọn độ mặn

Sục khí liên tục

Thể tích nuôi: 1000 ml

Ở mỗi nghiệm thức xác định các thông số môi trường thích hợp, sự thay đổi của tế bào vi tảo được xác định thông qua số lượng mật độ tế bào và hàm lượng  $\beta$ -carotene.

## 2.7 Xác định hàm lượng $\beta$ -caroten

Hàm lượng  $\beta$ -caroten của tảo *Dunaliella salina* được xác định theo phương pháp của Shaish (Shaish et al, 1992) như sau: Lấy 1 ml dịch tảo cần phân tích, mang li tâm ở 1000v/phút trong 5 phút, đổ dịch nổi, cạn được chiết với 3 ml etanol: hexan (tỷ lệ 2:1 v/v). Thêm 2 ml H<sub>2</sub>O và 4 ml n-hexan vào và lắc đều hỗn hợp. Li tâm ở 1000v/phút trong 5 phút. Hút dịch chiết ở pha n-hexan, so màu ở bước sóng 450 nm. Kết quả hàm lượng  $\beta$ -caroten được tính theo công thức:

Hàm lượng  $\beta$ -caroten ( $\mu\text{g/ml}$ ) = A450 x 25.2 trong đó A450 là giá trị OD đo được ở  $\lambda=450$  nm.

$$A450 \times 25.2$$

$$\text{Hàm lượng } \beta\text{-caroten (pg/tb)} = \frac{\text{Hàm lượng } \beta\text{-caroten (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Mật độ tế bào/ml}}$$

## 2.8 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê ANOVA one-way với sự hỗ trợ của phần mềm SPSS 16.0.

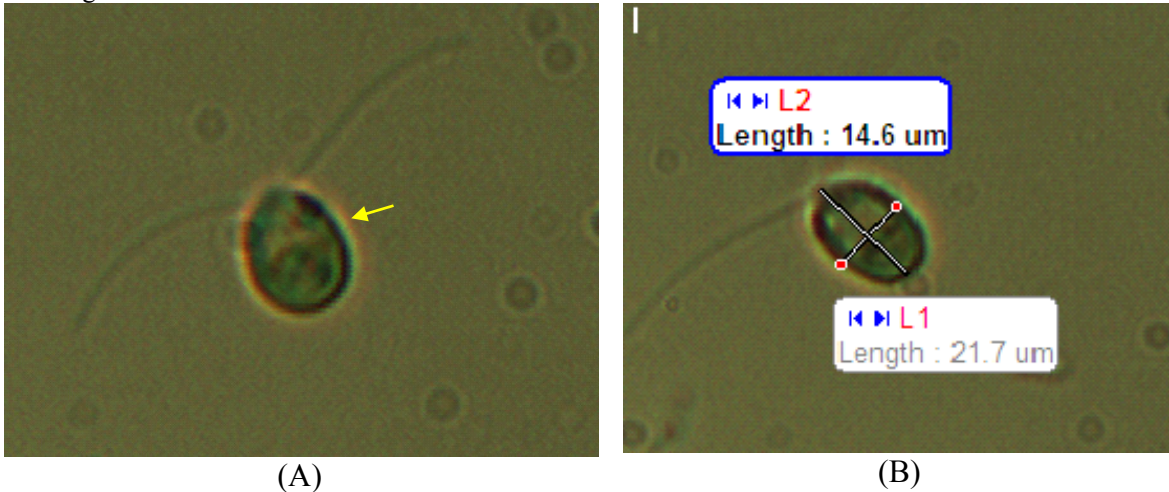
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập tảo *Dunaliella salina* trên ruộng muối tỉnh Khánh Hòa:

Việc phân lập dựa vào khả năng phát triển của vi tảo trên môi trường chọn lọc cho *D.salina* J/1 8.8% đã được thừa nhận (Borowitzka, 1988) và sử dụng các phương pháp soi kính hiển vi quang học mô tả đặc điểm cấu trúc tế bào và đo kích thước tế bào dựa theo khóa phân loại của Tomas (Tomas, 1997).

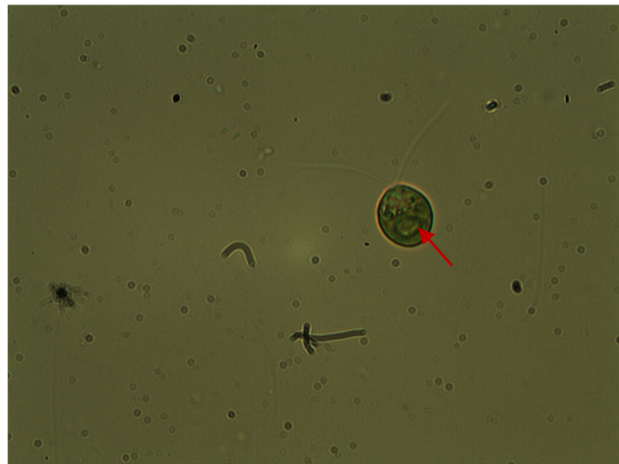
Quan sát hình thái của tế bào vi tảo từ mẫu NT6 trên kính hiển vi quang học (1000X) cho thấy: Tế bào nhỏ sống riêng lẻ, có 2 roi dài gấp đôi chiều dài cơ thể, chiều dài tế bào 18-24  $\mu\text{m}$ , chiều rộng 10-15  $\mu\text{m}$ . Có một điểm mắt màu đỏ sậm ở một phía gần gốc roi, thể lập xếp vòng hình chén ở phần dưới của tế bào chất, gồm những hạt nhỏ có màu đỏ nhạt, bắt màu sậm khi giảm cường độ ánh sáng.

Dữ liệu này phần lớn trùng khớp với các đặc điểm hình thái của *D.salina* Teodoresco 1905, được mô tả bởi Tomas với đặc điểm chung là vi tảo chuyển động nhanh, kích thước tế bào khoảng 16-24  $\mu\text{m}$ , có hai roi đều nhau, chiều dài của roi gấp 1,5 đến 2 lần chiều dài cơ thể. Do đó, chúng tôi bước đầu xác định đây là loài *D.salina* và đặt tên là *D.salina* NT6.



Hình 1: Cấu trúc *Dunalila salina* NT6 (A) và kích thước tế bào *D.salina* NT6 (B) trên kính hiển vi quang học (1000X); mũi tên màu vàng chỉ điểm mắt (eyespot)

Hình 2: Tảo *D.salina* NT6 trên kính hiển vi quang học (1000X); mũi tên màu đỏ chỉ thể lập hình chén



### 3.2 Sự thay đổi hình thái của tảo *D.salina* NT6

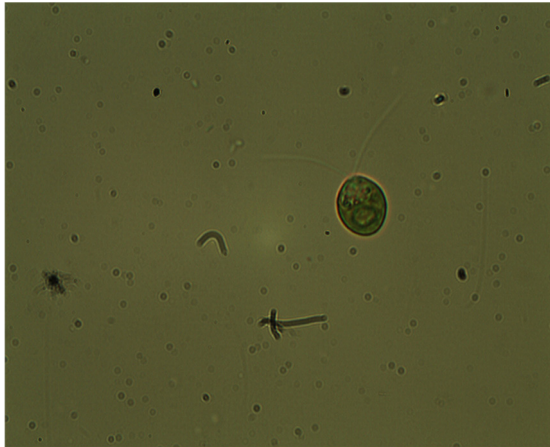
Vòng đời của tảo *Dunalila salina* NT6 trải qua 3 hình thái chủ yếu:

– **Thể sinh dưỡng** (Vegetative cells): tế bào có roi đều nhau, có hình ovan, kích thước chiều dài khoảng 22-24  $\mu\text{m}$ , chiều rộng khoảng 14-16  $\mu\text{m}$ . Các nghiệm thức thay đổi cường độ chiếu sáng và nồng độ muối cho thấy, ở nồng độ muối cao ( $\text{NaCl} > 15\%$ ) và cường độ chiếu sáng mạnh

( $> 22\text{Klux}$ ) thể sinh dưỡng có màu đỏ (hình 3B), tế bào ở dạng màu xanh trong điều kiện ánh sáng yếu ( $< 10.000\text{lux}$ ) và nồng độ muối thấp (3 - 15%) (Hình 3A). Đặc điểm này cũng phù hợp với nghiên cứu của Sarmad (Sarmad *et al.*, 2006). Tế bào trưởng thành có thể sinh sản vô tính bằng cách phân bào nguyên phân, tế bào phân chia theo kiểu phân đôi (Hình 4A), mỗi lần tạo ra 2 tế bào con. Kiểu sinh sản vô tính này khác với một số loài tảo lục thuộc cùng ngành Chlorophyta, ví dụ *Chlorella*

*vulgaris* phân chia đa nhân, từ một nhân của tế bào mẹ có thể phân thành 4, 8, 16 nhân nhỏ hơn, sau đó tạo thành 4, 8, 16 tế bào con (Dewan *et al.*, 2012).

Các tế bào sinh dưỡng con thường có kích thước nhỏ hơn gấp 2 lần kích thước của tế bào sinh dưỡng trưởng thành (Hình 4B).



(A)



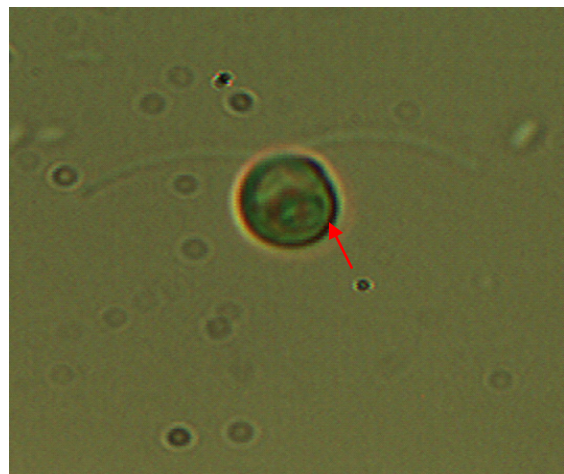
(B)

**Hình 3: Thể sinh dưỡng của tảo *Dunaliella salina* NT6 dưới kính hiển vi quang học (400X)**

(A) Thể sinh dưỡng màu xanh ở nồng độ NaCl 8.8%; (B) Thể sinh dưỡng màu đỏ ở nồng độ 15,5% NaCl



(A)



(B)

**Hình 4: Sự phân đôi của tế bào sinh dưỡng tảo *Dunaliella salina* NT6 dưới kính hiển vi quang học (1000X)**

(A). Quá trình phân đôi của tế bào mẹ *Dunaliella salina* NT6 (tế bào được chỉ bởi mũi tên màu trắng); (B) Tế bào con của *Dunaliella salina* NT6

– **Thể giao tử** (Gamete cells): *Dunaliella salina* có thể phân chia giảm phân tạo thành các giao tử. Giao tử của *Dunaliella salina* NT6 có đặc điểm cấu trúc cơ thể không khác biệt nhiều so với thể sinh dưỡng, ngoài trừ nó có hình thuôn dài, nhỏ hơn và bóp lại ở khoảng 1/3 cơ thể tính từ gốc roi (Hình 5A). Các thể này mang vật chất di truyền là n và có thể tiếp hợp để tạo thành hợp tử.

– **Thể hợp tử** (Zygote) hay thể bào tử (Cyst): Trong điều kiện sống khắc nghiệt, ví dụ môi trường

bị pha loãng quá mức (nồng độ muối NaCl giảm từ 10% đến 3%), hoặc bị khô hạn quá mức - tăng nồng độ muối NaCl (Loeblich, 1969; Oren & Dubinsky, 1994; Oren, 2005) xảy ra quá trình tiếp hợp của các giao tử để hình thành hợp tử. Ban đầu là sự tiếp xúc của roi (Hình 5B), sau đó các giao tử hình thành cầu nối sinh chất và tiếp hợp. Thể hợp tử có thể màu xanh (trong điều kiện pha loãng - Hình 6A) hoặc màu đỏ (trong điều kiện tăng nồng độ muối - Hình 6B). Thể hợp tử của *Dunaliella*

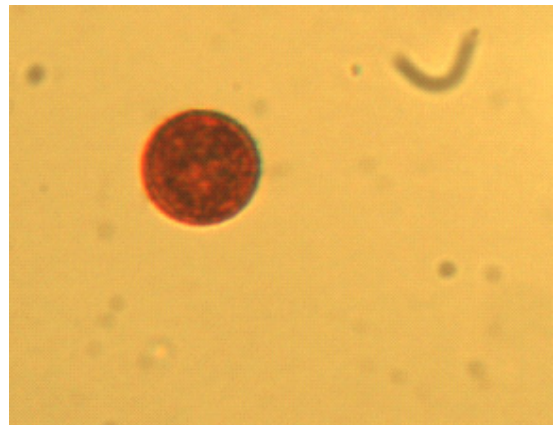
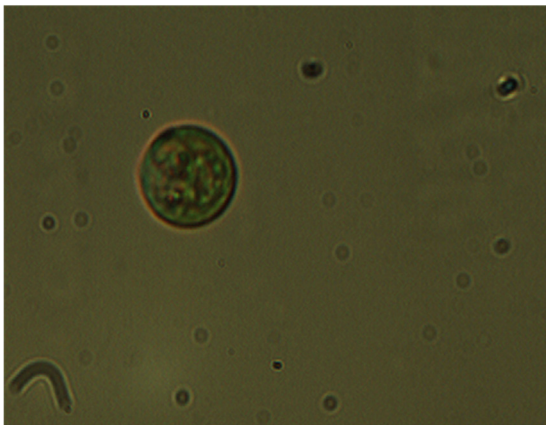
*salina* có lớp áo bên ngoài dày, có thể sống trong điều kiện pha loãng hoặc nồng độ muối cao một khoảng thời gian tương đối dài. Thể hợp tử đôi khi

còn được gọi là thể bào tử. Bào tử này khi gặp điều kiện thuận lợi, sẽ phân bào giảm nhiễm, có thể tạo thành 32 tế bào con.



**Hình 5: Sự tiếp hợp của giao tử *Dunaliella salina* NT6 để hình thành hợp tử dưới kính hiển vi quang học (1000X)**

(A) Giao tử *Dunaliella salina* NT6; (B) Sự tiếp hợp của giao tử *Dunaliella salina* NT6



(A)

(B)

**Hình 6: (A) Thể hợp tử có màu xanh của tảo *Dunaliella salina* NT6 ở độ muối NaCl 8,8%; (B) Thể hợp tử có màu đỏ của tảo *Dunaliella salina* NT6 ở độ muối NaCl 30%**

### 3.3 Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp $\beta$ -caroten của tảo *D.salina* NT6

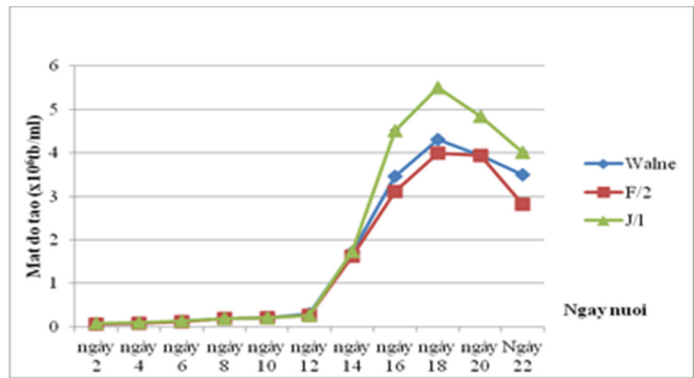
#### 3.3.1 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Khảo sát sự biến động mật độ tảo qua 12 ngày nuôi trên 3 loại môi trường J/1 3.3%, Walne 3.3% và F/2 3.3% (Hình 7) chúng tôi nhận thấy: Trong 10 ngày đầu tiên, sự tăng số lượng tế bào/ml ở các môi trường nuôi khác nhau không nhiều. Tuy nhiên, bắt đầu từ ngày thứ 12 trở đi thể hiện rõ sự khác biệt mật độ tế bào trong các môi trường nuôi. Ở các môi trường, mật độ tảo đều tăng nhanh từ ngày thứ 12 và đạt cực đại vào ngày thứ 18, nhưng

môi trường J/1 có tốc độ tăng nhanh nhất và đạt mật độ cực đại cao nhất so với 2 môi trường còn lại: từ  $2 \times 10^5 \pm 10^3$  tb/ml (ngày 10) lên đến cực đại là  $5.51 \times 10^6 \pm 2 \times 10^3$  tb/ml (ngày thứ 18) so với mật độ  $4.31 \times 10^6 \pm 10^3$  tb/ml và  $4 \times 10^6 \pm 10^3$  tb/ml ở môi trường Walne và F/2. Sau ngày 18, mật độ chủng NT6 giảm dần ở cả 3 môi trường, trong đó môi trường J/1 có tốc độ giảm chậm hơn 2 môi trường còn lại.

Như vậy, sự biến động số lượng tế bào trên 3 môi trường nuôi cho thấy môi trường J/1 là môi trường phù hợp hơn cả cho sự sinh trưởng của tế bào tảo *D.salina* NT6. Môi trường này được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

**Hình 7: Biến động của mật độ tảo *D.salina* NT6 theo môi trường nuôi**

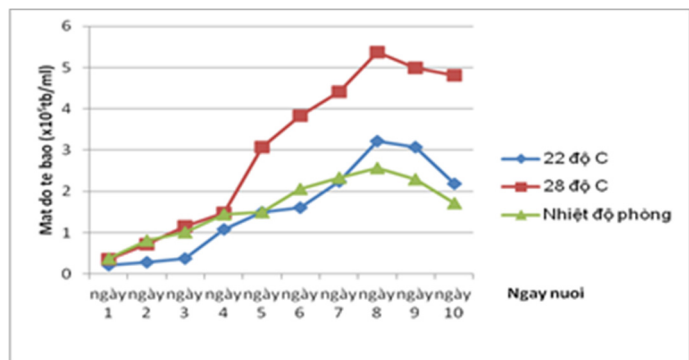


3.3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Hình 8 cho thấy thời gian nuôi cấy và các mức nhiệt độ nuôi cấy đều ảnh hưởng đến mật độ tảo NT6. Tám ngày đầu tiên của quá trình nuôi cấy, mật độ tế bào ở tất cả các nghiệm thức nhiệt độ đều tăng, trong đó mức nhiệt 22°C và nhiệt độ phòng tăng chậm qua các ngày, trong khi mức nhiệt 28°C

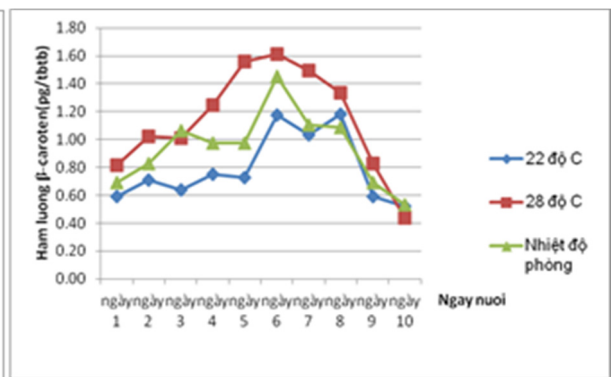
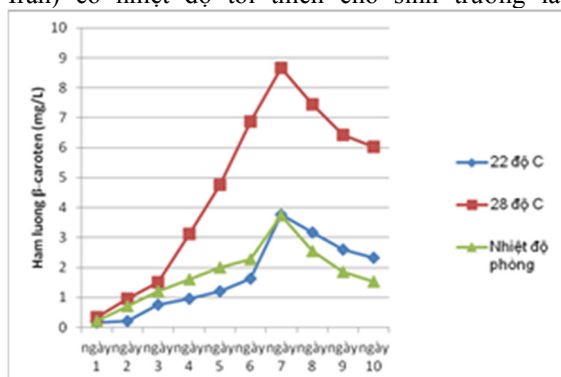
mật độ tảo tăng mạnh, đặc biệt là từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 8, mật độ tảo tăng 4.5 lần. Mật độ cực đại đều đạt được sau 8 ngày nuôi ở cả 3 mức nhiệt độ, trong đó cao nhất là nhiệt độ 28°C với  $5.38 \times 10^6 \pm 10^3$  tb/ml, tiếp đến là nhiệt độ 22°C với  $3.26 \times 10^6 \pm 4 \times 10^3$  tbp/ml và thấp nhất là mức nhiệt độ phòng với  $2.61 \times 10^6 \pm 10^3$  tb/ml. Sau ngày thứ 8, mật độ tảo giảm dần ở cả 3 nghiệm thức nhiệt độ.

**Hình 8: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi đến mật độ tế bào chủng *D.salina* NT6**



Như vậy, nhiệt độ 28°C là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của NT6. Kết quả này có sự khác biệt với kết quả nghiên cứu của Shariati (Shariati & Hadi, 2008) khi *Dunaliella* sp. (chủng Iran) có nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng là

khoảng 20-22°C. Điều này được giải thích là do Khánh Hòa thuộc vùng có mức nhiệt độ trung bình năm 27-28°C, nên các loài bản địa có xu hướng thích nghi với khoảng nhiệt độ này.



**Hình 9: (A). Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi đến hàm lượng β-caroten (mg/L)  
(B). Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi đến hàm lượng β-caroten (pg/tb)**

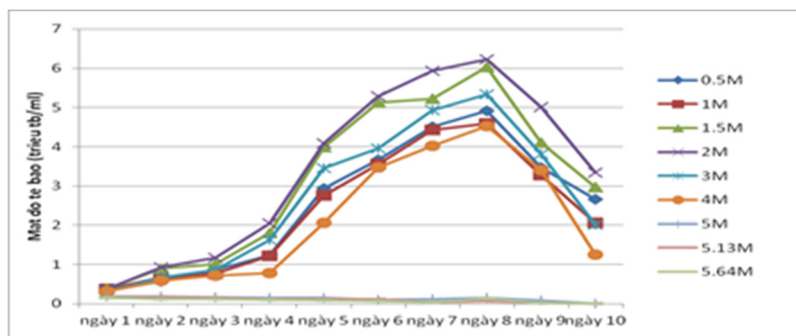
Hình 9 cho thấy sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tích lũy  $\beta$ -caroten của chủng NT6. Giai đoạn đầu của quá trình nuôi, khi tăng thời gian nuôi cây hàm lượng  $\beta$ -caroten (mg/L, pg/tb) đều tăng ở cả 3 mức nhiệt độ (sự sai khác giữa các mức nhiệt độ và giữa các ngày có ý nghĩa thống kê với  $p < 0.05$ ), trong đó nhiệt độ 28°C có mức tăng nhanh và mạnh nhất. Hàm lượng  $\beta$ -caroten (mg/L và pg/tb) đạt cực đại vào ngày thứ 8 của quá trình nuôi, cao nhất ở mức nhiệt 28°C ( $7.45 \pm 0.01$  mg/L và  $1.64 \pm 0.01$  pg/tb) và thấp nhất ở nhiệt độ 22°C ( $3.77 \pm 0.13$  mg/L và  $1.17 \pm 0.02$  pg/L). Điều đó cũng phù hợp với sự thay đổi của mật độ tế bào NT6 phụ thuộc vào nhiệt độ. Vì vậy, nhiệt độ 28°C cũng là nhiệt độ thích hợp nhất cho sự tổng hợp  $\beta$ -caroten của tảo NT6. Mặc dù, nhiệt độ cao là yếu tố kích thích sự tổng hợp  $\beta$ -caroten của tảo *Dunaliella* (Madadka *et al*, 2009; Madadka & Shariati, 2007; Sarmad *et al*, 2006), nhưng nhiệt độ phòng do bị biến đổi theo chu kỳ ngày và đêm nên

không có khả năng kích thích sự sinh tổng hợp  $\beta$ -caroten của chủng NT6.

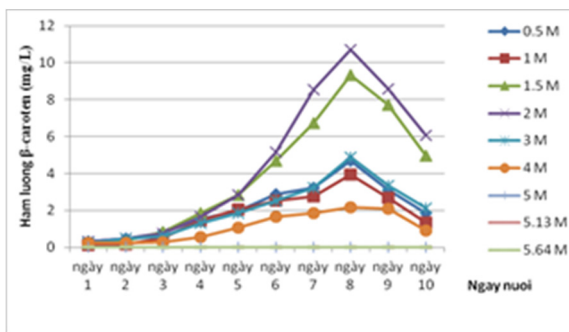
Như vậy, 28°C là nhiệt độ sinh trưởng tối ưu đồng thời là mức nhiệt độ xảy ra sự tích lũy cao hàm lượng  $\beta$ -caroten của chủng NT6.

### 3.3.3 Ảnh hưởng của độ mặn

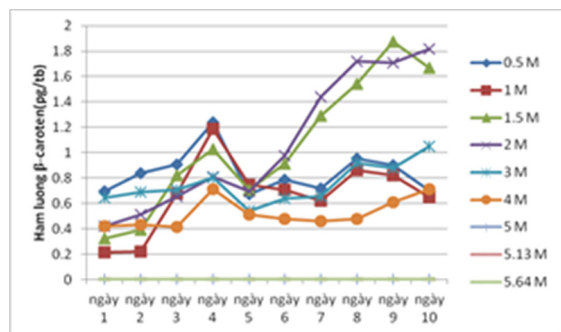
Độ mặn thích hợp nhất cho sinh trưởng của NT6 là 2M, mật độ tế bào là  $6.24 \times 10^6 \pm 10^4$  tế bào/ml. Nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Çelekli (Çelekli, 2006), nồng độ NaCl tốt nhất cho tăng trưởng là 2M và của Rad *et al* (Rad *et al.*, 2011) trên các chủng *Dunaliella* của Iran, giá trị độ mặn tối ưu cho sinh trưởng là 12.5% (tương đương 2,2 M NaCl). Tuy nhiên, kết quả này tương đối khác biệt so với chủng *Dunaliella* sp. (Huỳnh Hiệp Hùng và *ctv.*, 2013) có pha lag kéo dài đến khoảng ngày thứ 24 và ổn định vào ngày 45 với mật độ tế bào cao nhất đạt  $15.7 \times 10^6$  tế bào/ml. Điều này có thể do sự khác biệt chủng *Dunaliella* và mật độ ban đầu.



Hình 10: Ảnh hưởng của độ mặn đến sự sinh trưởng của tảo *D.salina* NT6



(A)



(B)

Hình 11: (A). Ảnh hưởng của độ mặn đến hàm lượng  $\beta$ -caroten của chủng NT6 (mg/L)  
(B). Ảnh hưởng của độ mặn đến hàm lượng  $\beta$ -caroten của chủng NT6 (pg/tb)

Với hàm lượng  $\beta$ -caroten theo đơn vị mg/L: Ở các độ mặn khác nhau, hàm lượng  $\beta$ -caroten (mg/L) tăng theo các ngày nuôi cấy. Hàm lượng  $\beta$ -caroten đạt cực đại sau 8 ngày nuôi, trong đó nồng độ muối 2M để nuôi chủng NT6 cảm ứng tổng hợp

$\beta$ -caroten cao nhất với  $10.73 \pm 0.02$  mg/L, tiếp theo là nồng độ 1.5M với  $9.33 \pm 0.02$  mg/L, cao hơn nhiều so với các nồng độ muối còn lại. Tại nồng độ NaCl 4M, tảo NT6 tổng hợp lượng  $\beta$ -caroten thấp nhất so với các giá trị độ mặn trước đó, chỉ đạt 2.19



$\pm 0.01$  mg/L. Từ nồng độ NaCl 5M trở đi, lượng  $\beta$ -caroten quá thấp, không có sự sai khác giữa các ngày nghiên cứu. Điều này cũng phù hợp với sự tăng mật độ tảo NT6 theo độ mặn, tại nồng độ 1.5-2M, mật độ tảo tăng nhanh và mạnh nhất, trong khi đó ở mật độ tảo giảm mạnh ở nồng độ 3M và 4M (Hình 11A). Như vậy, đơn vị mg/L chỉ phản ánh sự tăng hoặc giảm hàm lượng  $\beta$ -caroten phụ thuộc vào mật độ tế bào.

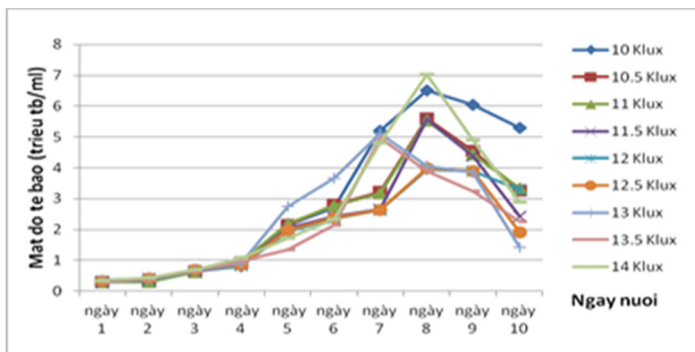
Với hàm lượng  $\beta$ -caroten theo đơn vị pg/tb: Biến động khác nhau theo các ngày nuôi cấy. Ở hầu hết nồng độ, hàm lượng  $\beta$ -caroten (pg/tb) bị giảm sau 4 ngày nuôi cấy. Sau đó, hàm lượng  $\beta$ -caroten tăng trở lại, đối với các giá trị NaCl 0.5M đến 2M, hàm lượng  $\beta$ -caroten đạt cực đại sau 8 ngày, cao nhất là nồng độ NaCl 2M tương ứng với lượng  $\beta$ -caroten là  $1.72 \pm 0.02$  pg/tb (Hình 11B). Tuy nhiên, sau đó hàm lượng  $\beta$ -caroten có xu hướng giảm xuống, giảm 11,6%. Trong khi đó, hàm lượng  $\beta$ -caroten ở nồng độ 3M và 4M có xu hướng tăng dần. Điều này có thể giải thích là do trong điều kiện sốc muối, tế bào cần phải có thời gian để khởi động cơ chế tăng tổng hợp glycerol và

tích lũy  $\beta$ -caroten. Do đó, cần thiết phải nghiên cứu thêm số ngày sinh trưởng của tảo để xem xét về mức độ tổng hợp  $\beta$ -caroten. Đáng lưu ý là, tại thời điểm 9 ngày của quá trình sinh trưởng, ở nồng độ NaCl 3M và 4M, hàm lượng  $\beta$ -caroten (mg/L) đã giảm thì hàm lượng  $\beta$ -caroten (pg/tb) lại có xu hướng tăng. Xu hướng này xảy ra do ở nồng độ muối từ 0.5M - 3M là nồng độ thích hợp cho sinh trưởng của tảo, mật độ tế bào tăng lên rất nhanh, ngày 9 rơi vào pha tàn lụi của tảo, số lượng tế bào/L môi trường có xu hướng giảm dần. Trong khi đó tại nồng độ muối cao, do điều kiện sống không thuận lợi, sự hình thành các thể cyst kéo dài thời gian sinh trưởng, tế bào có xu hướng tổng hợp  $\beta$ -caroten thích nghi với điều kiện ánh sáng mạnh và nồng độ muối cao (Madadkar & Shariati, 2007; Madadkar *et al.*, 2009).

### 3.3.4 Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng

Hình 12 chỉ ra ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sự thay đổi mật độ tảo NT6. Kết quả cho thấy, có sự phức tạp trong tác động của cường độ chiếu sáng từ 10Klux - 14Klux đến sự sinh trưởng của tảo NT6.

**Hình 12: Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến mật độ tế bào (tb/ml) chủng NT6**



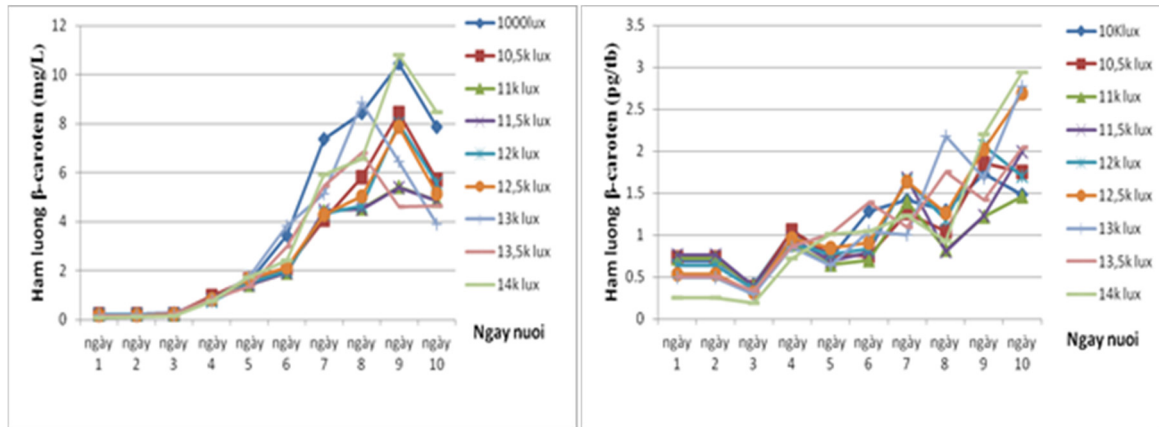
Khi tăng cường độ chiếu sáng từ 10Klux đến 11,5Klux thì ở mật độ tế bào ở các lô bị giảm ( $p < 0.05$ ), sau 8 ngày, mật độ cực đại ở cường độ 10Klux là  $6,53 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$  tb/ml, giảm dần còn là  $5,62 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$ ,  $5,53 \times 10^6 \pm 10^4$  và  $5,58 \times 10^6 \pm 3 \times 10^4$  tb/ml tương ứng với các giá trị 11Klux, 11,5Klux và 12Klux. Ngược lại, khi tăng cường độ chiếu sáng từ 12,5Klux đến 14Klux, mật độ tảo lại tăng theo thời gian nuôi cấy, trong đó cường độ 14Klux có mức tăng mạnh nhất, sau 8 ngày nuôi cấy, mật độ đạt  $7,2 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$  tb/ml. Giá trị cường độ 13Klux và 13,5Klux có mức tăng mật độ chậm hơn. Tuy nhiên, trong khi các mẫu khác mật độ tế bào đạt cực đại vào ngày thứ 8 của quá trình nuôi cấy, thì ở cường độ 13Klux mật độ đạt cực đại là  $5,12 \times 10^6 \pm 10^4$ tb/ml và giảm nhanh vào các ngày sau đó. Cường độ 10Klux không tuân theo qui luật chung, khi mật độ tế bào ở cường độ này đạt mức

tăng nhanh và mạnh hơn các cường độ từ 10,5Klux đến 13,5Klux, đạt mật độ cực đại  $6,53 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$  tb/ml, chỉ thấp hơn mức cường độ 14Klux.

Với giá trị cường độ sáng 10Klux sau 9 ngày nuôi cấy các tế bào bước vào pha chết, mật độ tế bào ở thời điểm 9 ngày nuôi chỉ còn  $5,3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$  tb/ml, giảm 18,9% so với thời điểm cực đại.

Như vậy, cường độ chiếu sáng từ 10Klux đến 14Klux có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tảo NT6 theo chiều hướng tương đối phức tạp. Qua các giá trị khảo sát thì cường độ 14Klux là giá trị cường độ ánh sáng thuận lợi nhất cho sinh trưởng của *Dunaliella salina* NT6.

Hình 13 cho thấy giá trị cường độ sáng 14 Klux thích hợp nhất cho việc tổng hợp  $\beta$ -caroten. NT6 tích lũy hàm lượng  $\beta$ -caroten là 2,94pg/tb và đang có xu hướng tăng lên ở các ngày sau đó.



(A)

(B)

**Hình 13: (A). Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hàm lượng β-caroten mg/L của *D.salina* NT6 (B). Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến hàm lượng β-caroten (pg/tb) của *D.salina* NT6**

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Dựa vào các đặc điểm hình thái, bước đầu xác định được loài vi tảo phân lập tại ruộng muối tỉnh Khánh Hòa là *Dunaliella salina*, được ký hiệu là NT6.

Vòng đời sinh trưởng của *Dunaliella salina* NT6 trải qua sự thay đổi của 3 hình thái chủ yếu: tế bào sinh dưỡng, giao tử, thể hợp tử.

Qua khảo sát trên 3 loại môi trường nuôi vi tảo là J/1, F/2 và Walne đã lựa chọn được môi trường nuôi thích hợp nhất cho sinh trưởng của chủng NT6 là J/1.

Điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng của tảo *D.salina* NT6 là: nhiệt độ 28°C, cường độ ánh sáng 14Klux, độ mặn 2M. Trong khi đó sau 22 ngày nuôi cấy, điều kiện cảm ứng tổng hợp mạnh β-caroten là cường độ ánh sáng >14 Klux, độ mặn 4M.

Trong điều kiện nuôi cấy NT6 gồm cường độ chiếu sáng 14.000lux, độ mặn 2M, hàm lượng β-caroten được tích lũy lên tới 2.94 pg/tb.

### 4.2 Đề xuất

Sử dụng các chỉ thị sinh học phân tử để định danh chính xác loài *Dunaliella salina* NT6.

Kết hợp các điều kiện nuôi để tối ưu hóa điều kiện sinh trưởng và tăng tích lũy β-caroten chủng *Dunaliella salina* NT6.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ben-Amotz A., 1987. Effects of irradiance and nutrient deficiency on the chemical

composition of *D. bardawi* (Volvocales, Chlorophyta). *Journal of Plant and Physiology*. 131: 479–487.

2. Ben-Amotz A., (1991), “The Biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β – carotene rich algae”, *Bioresource Technology* 38: 233 – 235.
3. Ben-Amotz A., (2009). Bioactive compounds: glycerol production, carotenoid production, fatty acids production. *The Alga Dunaliella*, Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology. Science Publishers, Enfield, USA, 189–208.
4. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J., 1988b. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *D. salina*. *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, Barking, 139–150
5. Celekli A., Donmez G., 2006. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β- carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 183–189
6. Dewan A., Kim J., Rebecca H.M.L., Siva A.V., Karim M., 2012. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays. *Biotechnology and Bioengineering*. 109: 2987–2996.
7. Đặng Diễm Hồng, Choon- Hwan Lee (1998) Tác động của điều kiện đối đậm lên hoạt động của chu trình anthophyll và sự tích lũy b-caroten của vi tảo *Dunaliella salina*. *Kỷ yếu của Viện Công nghệ Sinh*

- học. Trung tâm KHTN & CNQG, Nhà xuất bản KH và KT. Trang 327-335.
8. Đặng Diễm Hồng, Lê Thu Thủy, Choon - Hwan Lee.(1998) Tác động của cường độ ánh sáng cao lên hoạt động của chu trình xanthophyll và sự tích lũy  $\beta$ -carotene của vi tảo *Dunaliella salina*. Tuyển tập báo cáo khoa học. Hội nghị khoa học Công nghệ biển toàn quốc lần thứ IV. Hà Nội 12-12/11/1998. Tập II, Nhà xuất bản Thống kê. Trang 896-902.
  9. Fazeli M.R., Tofighi H., Samadi N., Jamalifar H., Fazeli A., 2006. Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia Isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & WT) under stress conditions. *Tehran University of Medical Sciences* 14: 146-150
  10. García-González M., Moreno J., Manzano C., Florencio F.J, Guerrero M.G., (2005) Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis  $\beta$  -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 115:81– 90.
  11. Guillard R.R.L. (1978) Counting Slides, *Phytoplankton Manual*. UNESCO. p. 182
  12. Loeblich LA., (1969). Aplanospores of *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Protozoology*. 22-23.
  13. Hejazi M.A., Holwerda E., 2004. Milking microalga *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology & Bioengineering*. 85: 475-481.
  14. Hoàng Thị Kim Thoa, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Trâm Anh, Nguyễn Thanh Mai, Nguyễn Thị Huyền (2006). Nghiên cứu qui trình công nghệ phân lập, làm sạch và bảo quản một số giống tảo có giá trị kinh tế cao phục vụ ngành nuôi trồng thủy sản. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ, Viện Ứng dụng Công nghệ, Hà Nội.
  15. Huỳnh Hiệp Hùng, Lê Thị Thanh Loan, Nguyễn Thị Mỹ Lan, Lê Thị Mỹ Phước, Phạm Thành Hồ (2013). Khảo sát khả năng tạo Beta-carotene của chủng vi tảo *Dunaliella* phân lập ở Việt Nam, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ, Tập 16: 43-50.
  16. Madadkar H.M, Shariati M., Smirnov N., 2009. The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiology and Plant.*, 135: 272 - 280.
  17. Madadkar H.M, Shariati M., 2007. Photosynthesis and respiration responses to short-term low temperature stress in two *Dunaliella salina* strains, *World Applied Science Journal*. 2: 276 - 282.
  18. Nguyễn Thị Hương, 2001. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố sinh thái lên sự phát triển của quần thể tảo *Chaetoceros calcitrans* Paulsen, 1905. Luận văn Thạc sĩ. Đại học Thủy sản, Khánh Hòa.
  19. Oren A., Dubinsky Z., (1994). On the red coloration of saltern crystallizer ponds. II. Additional evidence for the contribution of halobacterial pigments. *Journal of Salt Lake Research*, 3:9-13.
  20. Oren A., (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1: 1-14
  21. Patricia I.G., Gonzalez M.A., 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions, *Biology Resource* 38:151-162.
  22. Rad F.A., Nilufer A., Hejazi M.A., 2011. Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*. 10: 2328-2333.
  23. Sarmad J., Shariati M. , Tafreshi. A., Hosseini, 2006. Preliminary assessment of  $\beta$ -carotene accumulation in four strains of *Dunaliella salina* cultivated under the different salinities and low light intensity. *Pakistan Journal Biology* 9: 1492 - 1496.
  24. Sena S., Silve D., Trevor A., 1995. *Fish nutrition in Aquaculture*. Chapman & Hall.
  25. Schoen S. (1988) Cell Counting. Experimental Phycology - a Laboratory Manual.
  26. Shaish A., Ben-Amotz A., Avron M., 1992. Biosynthesis of  $\beta$ - carotein in *Dunaliella*. *Methods Enzymology*. 213: 439 - 444.
  27. Shariati M., Hadi M.R., 2011. Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella*. Angelo Carpi Publishers, ISSN 978-953-307-268-5.
  28. Tomas C.R.,1997. *Identifying Marine Phytolankton*. Academic Press.