ẢNH HƯỞNG KẾT HỢP GIỮA N–NO_3^- VÀ N–NH_4^+ LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA VI TẢO C*HAETOCEROS SUBTILIS* VAR. *ABNORMIS* PROSCHKINA-LAVRENKO ĐƯỢC PHÂN LẬP Ở CẦN GIỜ, TP HỒ CHÍ MINH

VÕ HỒNG TRUNG[*], LÊ THỊ TRUNG[**]

TÓM TẮT

Nitrogen (N) vô cơ là một chất dinh dưỡng thiết yếu cho các sinh vật quang hợp. Nitrogen được cung cấp chủ yếu như nitrate (NO_3^-), nhưng thường ammonium (NH_4^+) và urê cũng được sử dụng. Nitrogen – ammonium (N- NH_4^+) bổ sung riêng rẽ ở nồng độ cao (750 µmol/L) đã gây độc cho tế bào tảo, gây ra sự hình thành bào tử. Trong khi đó, bổ sung kết hợp N – NO_3^- và N – NH_4^+ ở các tỉ lệ khác nhau đã hạn chế tính độc của NH_4^+, môi trường bổ sung N – NO_3^-: N – NH_4^+ tỉ lệ 2:1 tảo đạt được tăng trưởng và sinh lí tốt nhất.

Từ khóa: Nitrogen, C*haetoceros*, môi trường ESAW.

ABSTRACT

Effect of combination of NO_3^- - N and NH_4^+ - N on the growth of microalga Chaetoceros subtilis* var. *abnormis Proschkina - Lavrenko isolated from Can Gio, Ho Chi Minh City

Inorganic nitrogen is an essential nutrient for photosynthetic organisms. Nitrogen is provided mainly as nitrate (NO_3^-), but usually ammonium (NH_4^+) and urea are also used. Ammonium - nitrogen ($NH4^+$ - N) supplemented separately with high concentrations (750 µmole/L) was toxic to algal cells and resulting in the formation of cysts. While, in the media supplemented with different NO_3^- - N to NH_4^+ - N ratios have limited toxicity of NH_4^+, NO_3^- - N:NH_4^+ - N ratio of 2:1, the growth and physiological process of population are the best.

Keywords: Nitrogen, C*haetoceros*, The ESAW medium.

1. Mở đầu

Nitrogen vô cơ là một chất dinh dưỡng thiết yếu cho các sinh vật quang hợp. Sử dụng hiệu quả N trong tự nhiên liên quan đến sự thích nghi của các sinh vật đối với sự cung cấp N, sự thay đổi của các điều kiện môi trường, cung cấp carbon và các chất dinh dưỡng khác (Fernandez and Galvan, 2007).

N là chất dinh dưỡng quan trọng góp phần vào sự sản xuất sinh khối của vi tảo. Nitrogen được cung cấp chủ yếu như nitrate (NO_3^-), nhưng thường ammonium (NH_4^+) và urê cũng được sử dụng. Một số hợp chất nitrogen hữu cơ (hypoxanthine, lysine, guanine…) cũng được sử dụng bởi tảo (Richmond, 2004).

Nitrogen là thành phần của acid amin, nucleotide, hormone, coenzyme,… Thiếu nitrogen, sườn carbon không được dùng cho sự tổng hợp các hợp chất

[*] NCS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

[**] TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

nitrogen (tỉ lệ C/N cao) (Bùi Trang Việt, 2000).

Trong nhiều nghiên cứu cho thấy, NH_4^+ ảnh hưởng lên sự biến dưỡng NO_3^- của tảo nước mặn. NH_4^+ được xem là nguồn N ưa thích đối với hầu hết các loài thực vật phù du nước mặn cũng như ức chế quá trình sử dụng NO_3^-. Tuy nhiên trong một số trường hợp, NH_4^+ ít hoặc không ảnh hưởng lên sự hấp thu NO_3^- và trong một số trường hợp khác, NH_4^+ còn tăng cường sự hấp thu NO_3^- (Varela and Harrison, 1999). Ngoài ra, sự cung cấp NO_3^- (hoặc K^+) nồng độ cao giúp làm giảm tính độc của NH_4^+ (Kotsiras *et al*., 2002).

2. Vật liệu, phương pháp

2.1. Vật liệu

Mẫu nước biển được thu ở vùng biển ven bờ Cần Giờ. Sự phân lập vi tảo C*haetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được thực hiện theo Andersen và Kawachi (2005), Guillard (2005) và lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Sinh lí Thực vật Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị môi trường

Các thí nghiệm được thực hiện trên môi trường ESAW (Harrison *et al*., 1980, Berges *et al*., 2001). Các dung dịch gốc và vitamin được giữ ở 4°C trong tối. Môi trường được điều chỉnh pH = 8,2 ± 0,2 và sử dụng trong vòng 24 giờ sau khi pha.

2.2.2. Điều kiện nuôi cấy

Mẫu được nuôi theo phương pháp nuôi cấy mẻ bán liên tục (Wood *et al*., 2005). Bình tam giác 250ml được sử dụng với 125ml môi trường. Điều kiện nuôi cấy lỏng lắc với cường độ 60 vòng/phút. Cường độ ánh sáng 60 ± 5µmol/m^2/s, chu kì sáng: tối 12:12, nhiệt độ 26 ± 2°C.

C*haetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được nuôi thích nghi trong môi trường ESAW loại bỏ hoàn toàn nitrogen từ 2 – 3 ngày trước khi tiến hành các thí nghiệm.

2.2.3. Quan sát hình thái tế bào

C*haetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được quan sát mỗi ngày dưới kính hiển vi quang học.

2.2.4. Mật độ tế bào và đường cong tăng trưởng

Mật độ tế bào được xác định thông qua việc đếm số lượng tế bào. Mẫu được lấy và cố định bằng lugol mỗi ngày với 3ml và bổ sung với lượng môi trường ESAW tương đương đã lấy. Số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu có độ sâu 0,1mm và diện tích ô vuông 1mm^2. Mật độ tế bào được tính toán theo công thức Guillard và Sieracki (2005). Đường cong tăng trưởng được xác định thông qua mật độ tế bào đếm hàng ngày.

2.2.5. Cường độ quang hợp và cường độ hô hấp

Cường độ quang hợp và hô hấp của vi tảo C*haetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được đo bằng máy Hansatech từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6. Mẫu được lấy từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 với 3ml mỗi ngày và sử dụng 1,5ml cho mỗi lần đo.

2.2.6. Ảnh hưởng kết hợp giữa N-NO_3^- và N-NH_4^+ lên sự tăng trưởng của Chaetoceros subtilis var. *abnormis*

Chaetoceros subtilis var. *abnormis* được nuôi trên môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N-NO_3^-, 750µmol/L N-NH_4^+ và ở các tỉ lệ khác nhau đảm bảo nồng độ N tổng số là 750µmol/L N (bảng 2.1).

Bảng 2.1. *Thí nghiệm ảnh hưởng kết hợp giữa N-NO_3^- và N-NH_4^+ lên sự tăng trưởng của* Chaetoceros subtilis var. *abnormis*

Nghiệm thức	Đặc điểm	Kí hiệu
ESAW+ 750µmol/L N-NO_3^-	Môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N-NO_3^-	750µmol/L N-NO_3^-
ESAW+ 750µmol/L N-NH_4^+	Môi trường ESAW bổ sung 750 µmol/L N-NH_4^+	750µmol/L N-NH_4^+
ESAW tỉ lệ 1:1	Môi trường ESAW bổ sung N-NO_3^-: N-NH_4^+ tỉ lệ 1:1	Tỉ lệ 1:1
ESAW tỉ lệ 2:1	Môi trường ESAW bổ sung N-NO_3^-: N-NH_4^+ tỉ lệ 2:1	Tỉ lệ 2:1
ESAW tỉ lệ 1:2	Môi trường ESAW bổ sung N-NO_3^-: N-NH_4^+ tỉ lệ 1:2	Tỉ lệ 1:2

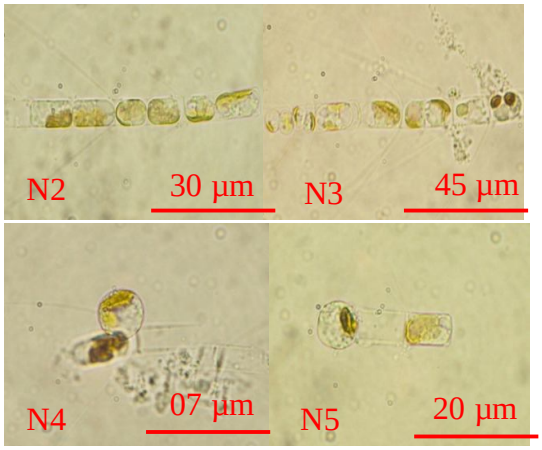
3. Kết quả, thảo luận

3.1. Kết quả

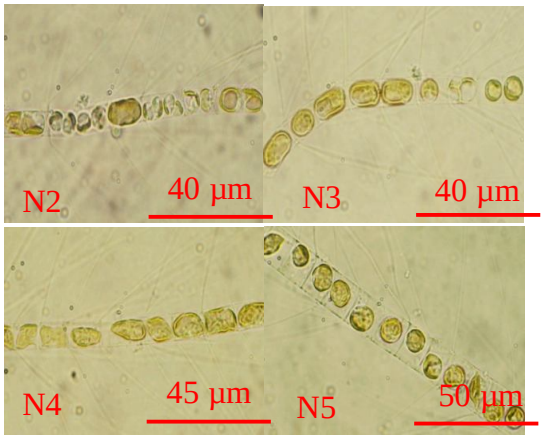
3.1.1. Hình thái tế bào

Môi trường bổ sung 750µmol/L N – NH_4^+, chuỗi tế bào dài khoảng 3 – 8 tb/chuỗi từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 3, sắc thể nhạt màu và chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào, có sự hình thành bào tử từ ngày thứ 4 (ảnh 3.1).

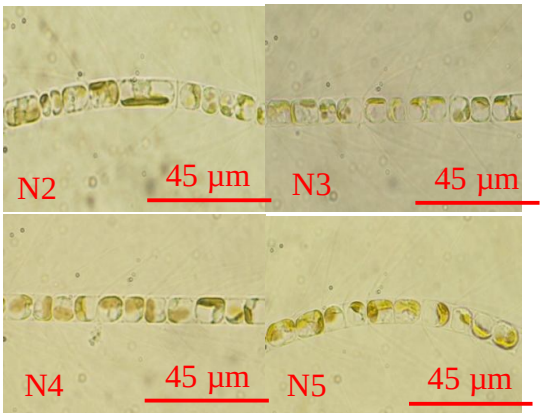
Ở các môi trường còn lại, chuỗi tế bào dài khoảng 3 – 8 tb/chuỗi từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 2, 6 – 12 tb/chuỗi từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5, chuỗi ngắn và rời rạc từ ngày thứ 6. Sắc thể đậm màu từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 và chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào trong suốt quá trình khảo sát (tỉ lệ 1:1 và 1:2); sắc thể đậm màu và chiếm toàn bộ thể tích tế bào từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 (750µmol/L N – NO_3^- và tỉ lệ 2:1) (ảnh 3.2, 3.3, 3.4 và 3.5).



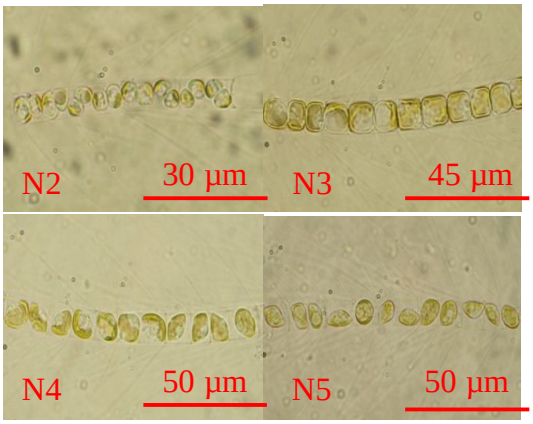
Ảnh 3.1. *Hình thái tế bào Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N – NH_4^+*



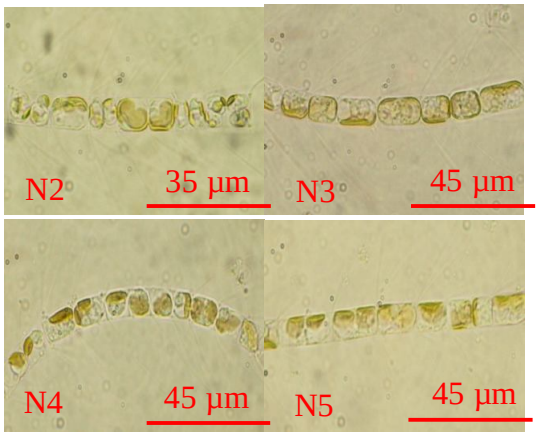
Ảnh 3.2. *Hình thái tế bào Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N – NO_3^-*



Ảnh 3.3. *Hình thái tế bào Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ theo tỉ lệ 1:1*



Ảnh 3.4. *Hình thái tế bào Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ theo tỉ lệ 2:1*



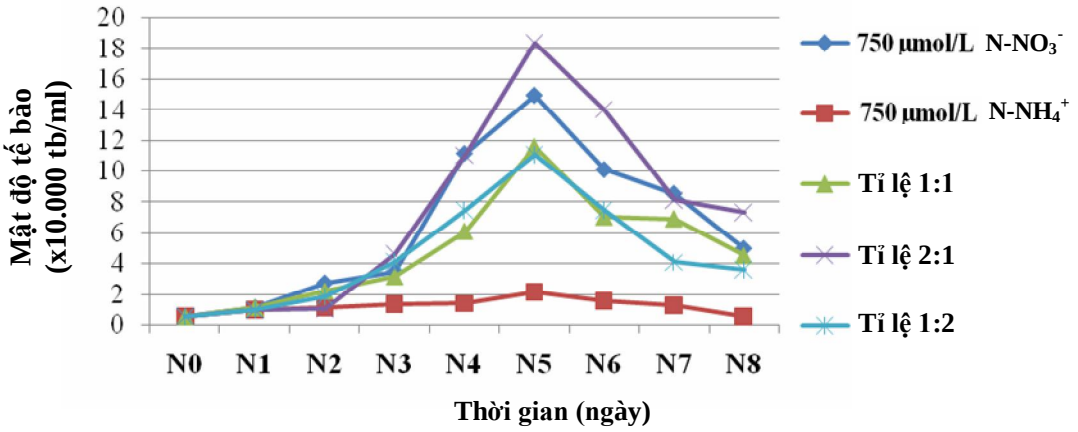
Ảnh 3.5. *Hình thái tế bào Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ theo tỉ lệ 1:2*

3.1.2. Đường cong tăng trưởng

Trên cả năm môi trường ESAW khảo sát cho thấy mật độ tế bào tăng dần từ ngày thứ 1, đạt mật độ tế bào cực đại ở ngày thứ 5 và sau đó giảm dần ở các ngày tiếp theo (hình 3.1).

Đường cong tăng trưởng trên các môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N – NO_3^- và bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ theo tỉ lệ khác nhau có dạng hình chữ S, trong khi đó, trên môi trường ESAW bổ sung 750µmol/L N – NH_4^+ có dạng gần như đường thẳng (hình 3.1).

Trên các môi trường ESAW có pha thích nghi là 2 ngày, pha tăng trưởng kéo dài 3 ngày và pha suy vong ở các ngày tiếp theo (hình 3.1).



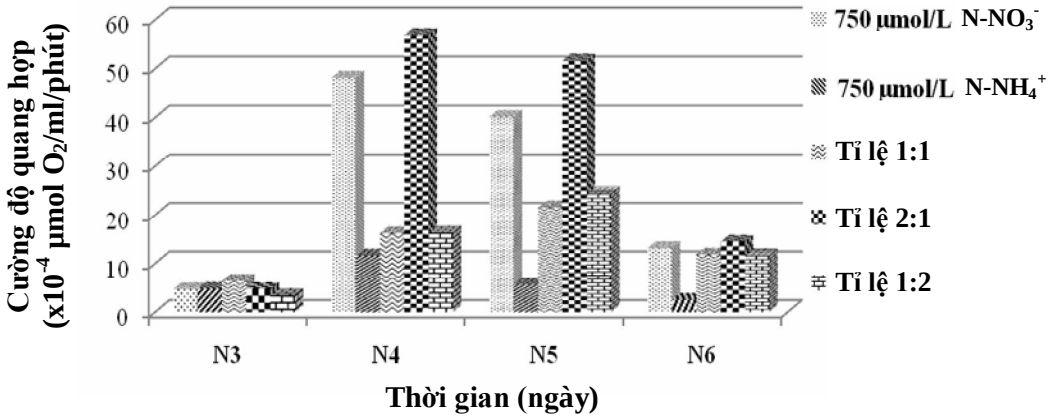
Hình 3.1. *Đường cong tăng trưởng của Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N-NO_3^- và N-NH_4^+ riêng rẽ và theo các tỉ lệ khác nhau*

3.1.3. Cường độ quang hợp (CĐQH)

Ở môi trường bổ sung 750µmol/L N – NO_3^-, CĐQH tăng từ ngày thứ 3 và đạt cực đại ở ngày thứ 4, sau đó giảm dần ở các ngày tiếp theo. Trên môi trường 750µmol/L N – NH_4^+, QH đạt mức thấp trong suốt quá trình khảo sát. Trong khi đó, trên các môi trường bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ ở các tỉ lệ khác nhau, CĐQH của tảo tăng từ ngày thứ 3 và đạt cực đại ở ngày thứ 4 và thứ 5, sau đó giảm ở ngày tiếp theo (hình 3.2).

CĐQH cực đại của tảo trên môi trường 750µmol/L N – NO_3^- (ở ngày thứ 4) và tỉ lệ 2:1 (ở ngày thứ 4 và thứ 5) không có sự khác biệt và cao hơn so với các môi trường còn lại (hình 3.2).

Khi bổ sung N – NO_3^- và N – NH_4^+ tỉ lệ 1:1 và 1:2, CĐQH đạt mức thấp và hầu như không có sự khác biệt (hình 3.2).

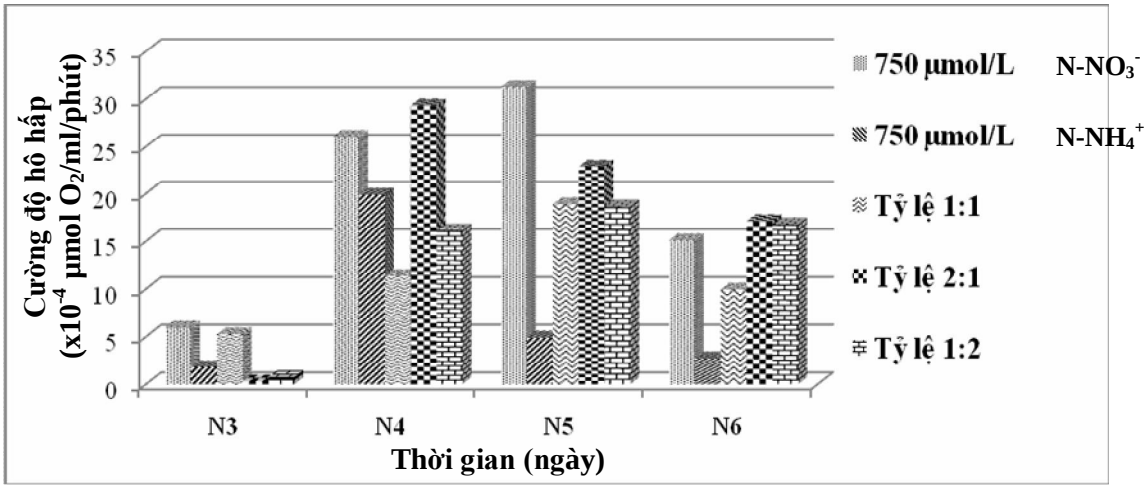


Hình 3.2. *Cường độ quang hợp của Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N-NO_3^- và NH_4^+ riêng rẽ và tỉ lệ khác nhau*

3.1.4. Cường độ hô hấp (CĐHH)

Trên các môi trường ESAW khảo sát, CĐHH của tảo tăng dần từ ngày thứ 3 và đạt cực đại ở ngày thứ 4 và thứ 5 (hình 3.3).

CĐHH cực đại của tảo trên các môi trường bổ sung 750 µmol/L N – NO_3^-, N – NO_3^- và N – NH_4^+ ở các tỉ lệ khác nhau cao hơn so với CĐHH cực đại của tảo trên môi trường bổ sung 750µmol/L N – NH_4^+ (hình 3.3).



Hình 3.3. *Cường độ hô hấp của Chaetoceros subtilis* var. *abnormis trên môi trường ESAW bổ sung N – NH_4^+ ở các nồng độ khác nhau*

3.2. Thảo luận

Dựa trên các kết quả cho thấy, ở môi trường bổ sung N- NH_4^+ nồng độ cao (750µmol/L) đã gây độc cho tế bào: sự tăng trưởng của tảo giảm, sắc thể nhạt màu, sự hình thành bào tử từ ngày thứ 4, cường độ quang hợp và hô hấp thấp (ảnh 3.1; hình 3.2, 3.3).

Trong khi đó, trên các môi trường bổ sung N- NO_3^- và N- NH_4^+ ở các tỉ lệ khác nhau, sự tăng trưởng của tảo tốt hơn với chuỗi tế bào dài hơn, sắc thể đậm màu từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 5 (ảnh 3.3, 3.4, 3.5), mật độ tế bào, cường độ quang hợp và hô hấp cao hơn (hình 3.2, 3.3). Điều này có thể là do ảnh hưởng của N- NO_3^- làm giảm tính độc của N- NH_4^+ trong môi trường. Theo Roosta *et al.* (2009), việc bổ sung NO_3^- (cũng như K^+) vào môi trường chứa NH_4^+ là một giải pháp để làm giảm tính độc của NH_4^+.

Đặc biệt, ở môi trường bổ sung N- NO_3^- và N- NH_4^+ tỉ lệ 2:1 có chuỗi tế bào dài, mật độ tế bào và cường độ quang hợp cao hơn các môi trường còn lại (ảnh 3.3; hình 3.1, 3.2). Điều này có thể do tác dụng kích thích của N- NH_4^+ ở nồng độ thấp làm tăng khả năng hấp thu và tích lũy của N- NO_3^- vào tế bào. Trong môi trường với sự hiện diện một lượng NH_4^+ nhỏ có thể kích thích sự hấp thu NO_3^- (Dortch, 1990; Varela and Harrison, 1999).

Ở các môi trường bổ sung N- NO_3^- và N- NH_4^+ tỉ lệ 1:1 và 1:2 có mật độ tế bào, cường độ quang hợp và hô hấp thấp

hơn so với môi trường bổ sung 750µmol/L N-NO_3^-, và bổ sung N- NO_3^- và N- NH_4^+ tỉ lệ 2:1 (hình 3.1). Điều này có thể là kết quả tương tác ức chế của NH_4^+ đối với NO_3^- khi có sự hiện diện đồng thời của chúng trong môi trường.

Đối với hầu hết tảo thì NH_4^+ được ưu tiên sử dụng trước khi cung cấp đồng thời N- NH_4^+ và N- NO_3^-. N-NO_3^- không được sử dụng cho đến khi tất cả N- NH_4^+ được sử dụng hết. Sử dụng ưu tiên N-NH_4^+ được cho là có liên quan đến sự điều hòa đồng hóa NO_3^-. Việc bổ sung NH_4^+ vào môi trường nuôi cấy tảo đang đồng hóa NO_3^- gây ra sự ức chế ngay lập tức và hoàn toàn sự đồng hóa NO_3^-, NH_4^+ không ức chế hoạt tính của enzyme nitrate reductase mà là một số sản phẩm của sự đồng hóa NH_4^+ ức chế ngược hoạt tính của nitrate reductase (Duncan and Stewart, 1974).

NH_4^+ ảnh hưởng lên sự biến dưỡng NO_3^- ở tảo nước mặn. NH_4^+ được cho là nguồn N ưa thích đối với hầu hết các loài thực vật phù du cũng như ức chế sử dụng NO_3^- (Dortch, 1990; Varela and Harrison, 1999). Một sản phẩm N hữu cơ đầu tiên (glutamine - GLN) của quá trình đồng hóa N vô cơ đóng vai trò trung tâm trong sự điều hòa ngắn hạn và dài hạn quá trình đồng hóa NO_3^- (Flynn *et al*., 1997).

Ở thực vật phù du, tốc độ hấp thu NO_3^- bị ức chế khi có sự hiện diện của NH_4^+ (Dortch, 1990). Tốc độ hấp thu NO_3^- giảm khi nồng độ của NH_4^+ tăng lên trong môi trường (Varela and Harrison, 1999). Điều này do sự ức chế hấp thu NO_3^- của NH_4^+ hoặc sự ưu tiên sử dụng NH_4^+. Mặc dầu có sự ưu tiên đối với hấp thu NH_4^+ nhưng sự tăng trưởng trên NO_3^- tốt hơn nhiều so với tăng trưởng trên NH_4^+ (Dortch, 1990).

4. Kết luận

Môi trường bổ sung N – NH_4^+ riêng rẽ ở nồng độ cao (750 µmol/L) đã gây độc cho tế bào tảo, gây ra sự hình thành bào tử, mật độ tế bào, cường độ quang hợp và hô hấp thấp.

Khi bổ sung kết hợp N – NO_3^- và N – NH_4^+ ở các tỉ lệ khác nhau đã hạn chế tính độc của N – NH_4^+. Môi trường bổ sung N – NO_3^-: N – NH_4^+ tỉ lệ 2:1, *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* cho chuỗi tế bào dài, thể sắc tố đậm màu, đường cong tăng trưởng hình chữ S, sinh khối tối đa của quần thể lớn, cường độ quang hợp và hô hấp cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Trang Việt (2000), *Sinh lí thực vật đại cương, Phần I: Dinh dưỡng*, Nxb Đại học Quốc gia TPHCM, tr. 111 – 144.
2. Andersen R. A., Kawachi M. (2005), "Traditional microalgae isolation techniques", In: Andersen R. A. (ed.), *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, pp. 85 – 100.
3. Dortch Q. (1990), "The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton", *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 61, pp. 183 – 201.
4. Duncan W. and Stewart P. (1974), *Algal physiology and biochemistry*, Botanical Monographs, Vol. 10, pp. 583 – 590.

5. Fernandez E. and Galvan A. (2007), "Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58 (9), pp. 2279–2287.
6. Flynn K. J., Fasham M. J. R. and Hipkin C. R. (1997), "Modelling the interactions between ammonium and nitrate uptake in marine phytoplankton", *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, Vol. 352, pp. 1625 – 1645.
7. Guillard R. R. L. and Sieracki M. S. (2005), "Counting cells in cultures with the light microscope", In: Andersen R. A. (ed.), *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, p. 239 -253Richmond A. (2004), *Handbook of Microalgal culture*, Blackwell Publishing company, pp. 83 – 105.
8. Harrison P. J. and Berges J. A. (2005), "Marine culture media", In: *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, pp. 21 – 35.
9. Kotsiras A., Olympios C. M., Drosopoulos J. and Passam H. C. (2002), "Effects of nitrogen form and concentration on the distribution of ions within cucumber fruits", *Scientia Horticulturae*, Vol. 95, pp. 175 – 183.
10. Roosta H. R., Sajjadinia A., Rahimi A. and Schjoerring J. (2009), "Responses of cucumber plant to NH_4^+ and NO_3^- nutrition: The relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration", *Scientia Horticulturae*, Vol. 121, pp. 397 – 403.
11. Varela D. E. and Harrison P. J. (1999), "Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliania huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific", *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 186, pp. 67 – 74.
12. Wood A. M., Everroad R. C. and Wingard L. M. (2005), "Measuring growth rates in microalgal cultures", In: Andersen R. A. (ed.), *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, pp. 256 – 287.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 11-9-2012; ngày phản biện đánh giá: 03-10-2012; ngày chấp nhận đăng: 18-02-2013)