

**ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY  
VÀ MẬT ĐỘ TẾ BÀO XUẤT PHÁT LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG  
CỦA VI TẢO *CHAETOCEROS SUBTILIS* VAR. *ABNORMIS*  
PROSCHKINA-LAVRENKO  
ĐƯỢC PHÂN LẬP Ở HUYỆN CẦN GIỜ, TP HỒ CHÍ MINH**

PHẠM THỊ HỒNG\*, LÊ ĐIỂM KIỀU\*\*,  
VÕ HỒNG TRUNG\*\*\*, LÊ THỊ TRUNG\*\*\*\*

**TÓM TẮT**

*Tảo silic là một mắt xích quan trọng trong chuỗi thức ăn và là nguồn chính của các chất hữu cơ trong môi trường biển, đặc biệt là ở các vùng ven bờ. Chaetoceros subtilis var. abnormis Proschkina-Lavrenko được phân lập từ vùng biển ven bờ thuộc huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh và nuôi cấy trên môi trường f/2 với các mật độ tế bào xuất phát khác nhau ở hai điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh và lỏng lắc. Kết quả cho thấy ở mật độ tế bào xuất phát 5.000 tb/ml với điều kiện nuôi cấy lỏng lắc thì sự sinh trưởng của quần thể tốt nhất: tế bào kết chuỗi dài, sắc thể lớn hơn và đậm màu hơn, có đường cong tăng trưởng điển hình.*

**Từ khóa:** tảo silic, *Chaetoceros*, sắc thể.

**ABSTRACT**

***Effect of the culture condition and initial cell density on the growth of microalgae  
Chaetoceros subtilis var. abnormis Proschkina-Lavrenko  
from Can Gio, Ho Chi Minh City isolated***

*Diatoms are an important link in the food chain and a major source for organic matter in marine environments, especially in coastal areas. Chaetoceros subtilis var. abnormis Proschkina-Lavrenko are from coastal areas of Can Gio, Ho Chi Minh City and cultured in the f/2 medium at different initial cell densities and under two standing and shake liquid culture conditions. The results show that the initial cell density 5,000 cells/ml in shake liquid culture condition, the growth of population is the best: the long-chained cells, the larger and darker chromatophores, and having the typical growth curve.*

**Keywords:** Diatoms, *Chaetoceros*, Chromatophores.

**1. Mở đầu**

Trong các nhóm thực vật phù du, tảo silic đóng vai trò rất quan trọng trong sự sản xuất sơ cấp, là một mắt xích quan

trọng trong chuỗi thức ăn và là nguồn chính của các chất hữu cơ trong môi trường biển, đặc biệt là ở các vùng biển ven bờ. Tảo silic phù du nước mặn, *Chaetoceros*, *Thalassiosira* và *Coscinodiscus* phân bố trên các khu vực rộng lớn và số lượng nhiều nhất (Sunlu *et al.*, 2010). *Chaetoceros* là một chi tảo silic phù du nước mặn lớn nhất với khoảng 400 loài (Tomas *et al.*, 1996).

\* CN, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

\*\* CN, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

\*\*\* HVCH, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

\*\*\*\* TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

Tảo silic (*Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*...) được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy hải sản, dùng làm thức ăn tươi cho *Artemia*, *Penaeus*, một số loài Crustacea, loài hai mảnh vỏ, thân mềm và cá (như ấu trùng tôm he Chân trắng, hàu, điệp, sò...) (Chotipuntu, 2005; Nguyễn Thanh Mai và cs., 2009).

Việc nuôi cấy tảo trong phòng thí nghiệm, làm cơ sở cho việc gia tăng sinh khối rất quan trọng. Trong đó, đáng chú ý là môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cũng như mật độ tế bào xuất phát sẽ ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của tảo. Đối tượng *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được khảo sát.

## 2. Vật liệu – phương pháp

### 2.1. Vật liệu

*Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko được phân lập theo Andersen và Kawachi (2005), Guillard (2005) từ nước biển thu được vùng ven bờ biển Cần Giờ. Mẫu được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Sinh lý Thực vật trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Chuẩn bị môi trường

Tảo được nuôi trên môi trường f/2 (Guillard và Ryther, 1962; Guillard, 1975). Nước biển sử dụng cho môi trường được thu tại vị trí lấy mẫu và được lọc tại phòng thí nghiệm ngay sau đó bằng bình hút chân không qua giấy lọc Whatman GF/C (Ø 47 mm, kích thước lỗ 1,2 µm) và màng lọc Advantec MFS, Japan (Ø 47 mm, kích thước lỗ 0,2 µm). Các dung dịch gốc khoáng đa lượng, vi

lượng và vitamin được giữ ở nhiệt độ 4 °C trong tối để sử dụng trong thời gian dài (Harrison and Berges, 2005)

#### 2.2.2. Điều kiện nuôi cấy

Tảo được nuôi theo phương pháp nuôi cấy mẻ bán liên tục (Wood *et al.*, 2005) trong bình tam giác 250 ml với 125 ml môi trường. Cường độ ánh sáng  $60 \pm 5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , chu kỳ sáng: tối 12: 12, nhiệt độ  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Các thí nghiệm được bố trí trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh và lỏng lắc với cường độ 60 vòng/phút.

#### 2.2.3. Quan sát hình thái tế bào

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

#### 2.2.4. Xác định mật độ tế bào và điều kiện nuôi cấy thích hợp

Mật độ tế bào trong hai điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh và lỏng lắc được xác định thông qua việc đếm số lượng tế bào hàng ngày. 3 ml mẫu được lấy mỗi ngày và được cố định bằng lugol. Bổ sung lại bằng môi trường f/2 tương đương lượng mẫu đã lấy. Số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu có độ sâu 0,1 mm, diện tích ô vuông 1 mm<sup>2</sup>. Mật độ tế bào được tính theo công thức Guillard và Sieracki (2005).

Các mật độ tế bào xuất phát được khảo sát là 2.500 tb/ml, 5.000 tb/ml, 10.000 tb/ml và 20.000 tb/ml.

#### 2.2.5. Xác định đường cong tăng trưởng

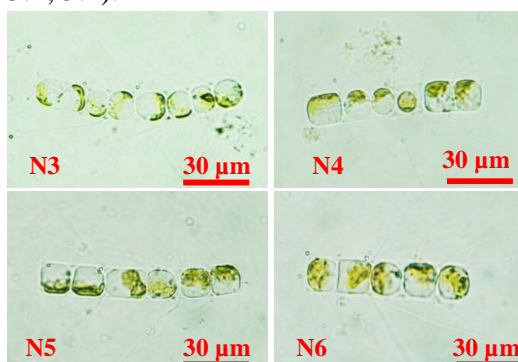
Đường cong tăng trưởng được xác định thông qua mật độ tế bào đếm hàng ngày.

## 3. Kết quả

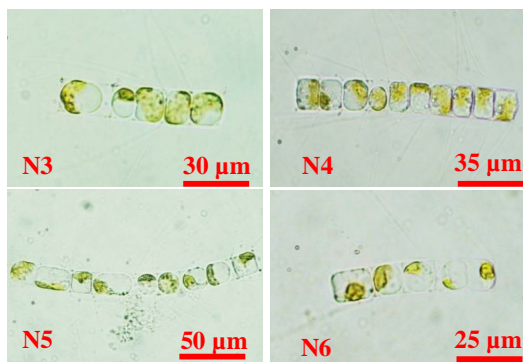
### 3.1. Hình thái tế bào

**3.1.1. Hình thái tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh**

Ở hai mật độ tế bào xuất phát 2.500 tb/ml và 5.000 tb/ml, chuỗi tế bào dài khoảng 5 – 10 tb/chuỗi từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6. Sắc thể của tế bào đậm màu và chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào (ảnh 3.1, 3.2).

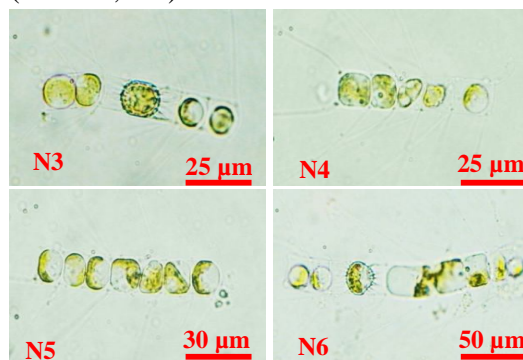


**Ảnh 3.1.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày (N) thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 2.500 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh

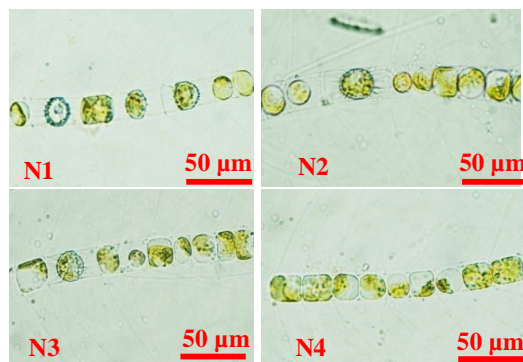


**Ảnh 3.2.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 5.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh

Ở hai mật độ tế bào xuất phát 10.000 tb/ml và 20.000 tb/ml, hình thái tế bào và sắc thể tương tự như ở hai mật độ trên. Tuy nhiên, có sự hình bào tử nghỉ từ ngày thứ 3 đối với mật độ tế bào xuất phát 10.000 tb/ml và từ ngày thứ 1 đối với mật độ tế bào xuất phát 20.000 tb/ml (ảnh 3.3, 3.4).



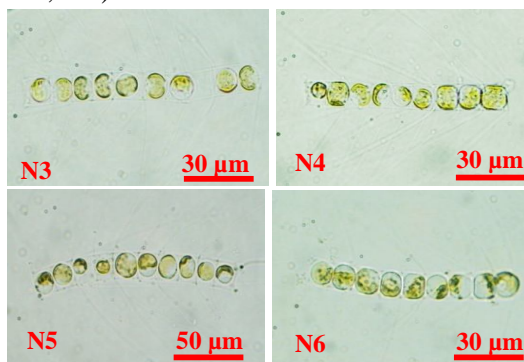
**Ảnh 3.3.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 10.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh



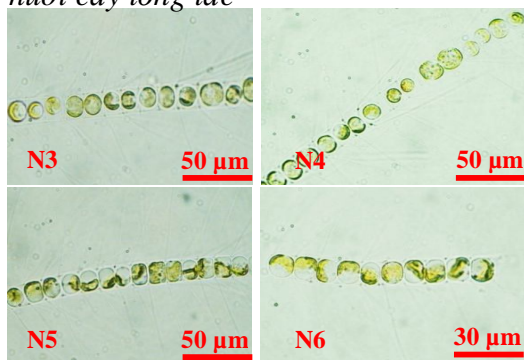
**Ảnh 3.4.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 4 ở mật độ độ xuất phát 20.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh

**3.1.2. Hình thái tế bào trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc**

Ở hai mật độ tế bào xuất phát 2.500 tb/ml và 5.000 tb/ml, chuỗi tế bào dài khoảng 6 – 12 tb/chuỗi từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6. Sắc thể đậm màu và chiếm toàn bộ thể tích tế bào từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 4, chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 6 (ảnh 3.5, 3.6).



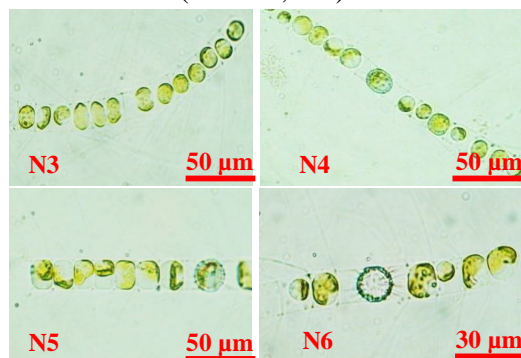
**Ảnh 3.5.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 2.500 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc



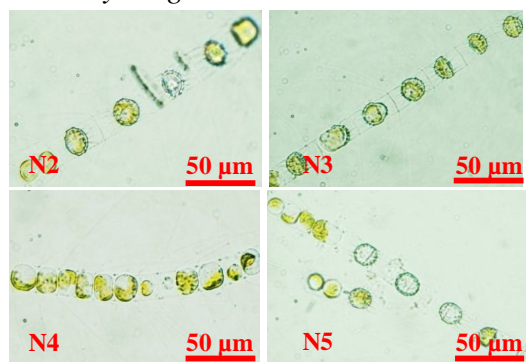
**Ảnh 3.6.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 5.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc

Ở mật độ tế bào xuất phát 10.000 tb/ml và 20.000 tb/ml, hình thái tế bào và sắc thể tương tự như ở hai mật độ xuất

phát trên. Tuy nhiên, có sự hình bào tử nghỉ từ ngày thứ 4 (1 – 2 bào tử/chuỗi) đối với mật độ tế bào xuất phát 10.000 tb/ml và từ ngày thứ 2 (2 – 6 bào tử/chuỗi) đối với mật độ tế bào xuất phát 20.000 tb/ml (ảnh 3.7, 3.8).



**Ảnh 3.7.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 ở mật độ độ xuất phát 10.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc



**Ảnh 3.8.** Sự thay đổi hình dạng tế bào *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 ở mật độ độ xuất phát 20.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc

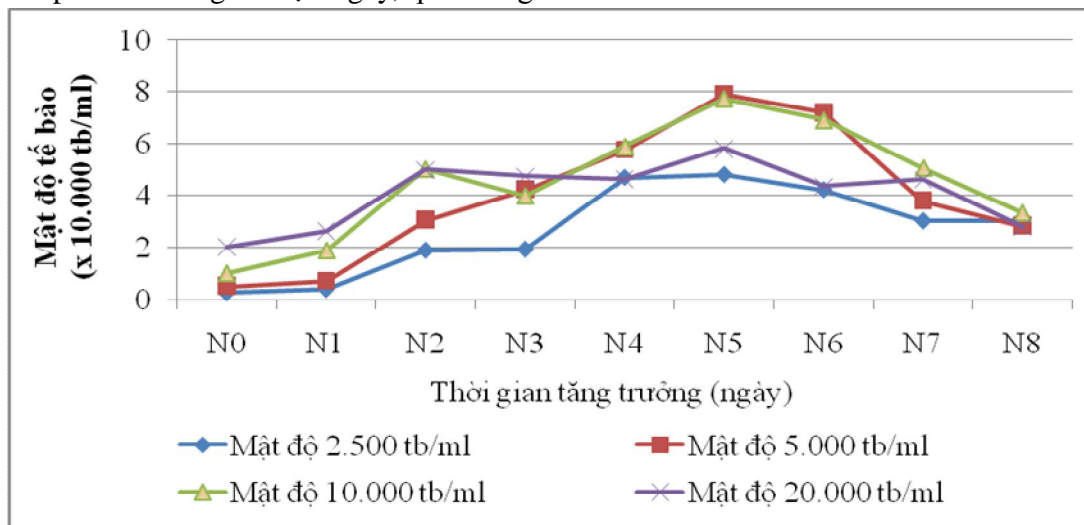
### 3.2. Đường cong tăng trưởng

#### 3.2.1. Đường cong tăng trưởng của *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh

Mật độ xuất phát 5.000 tb/ml có đường cong tăng trưởng hình chữ S điển hình, trong khi ở 3 mật độ tế bào xuất phát còn lại có pha tăng trưởng không ổn định (hình 3.1).

Cả bốn mật độ tế bào xuất phát đều có pha thích nghi một ngày, pha tăng

trường kéo dài 4 ngày và đạt mật độ tế bào cực đại ở ngày thứ 5, sau đó đi vào pha suy vong ở các ngày tiếp sau (hình 3.1)



**Hình 3.1.** Đường cong tăng trưởng của *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trên môi trường f/2 ở các mật độ tế bào xuất phát khác nhau với điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh

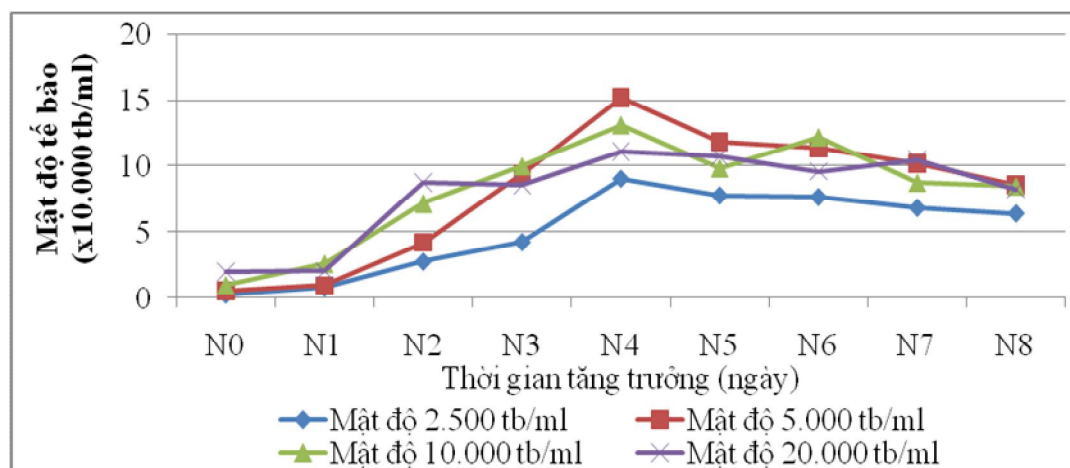
**3.2.2. Đường cong tăng trưởng của *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc**

Mật độ xuất phát 2.500 tb/ml và 5.000 tb/ml, tế bào cho đường cong tăng trưởng hình chữ S điển hình. Với 2 mật độ xuất phát 10.000 tb/ml và 20.000

tb/ml, đường cong tăng trưởng không điển hình với pha suy vong không ổn định (hình 3.2).

Cả bốn mật độ tế bào xuất phát đều có pha thích nghi 1 ngày, pha tăng trưởng kéo dài 3 ngày và đạt mật độ tế bào cực đại ở ngày thứ 4, sau đó đi vào pha suy vong ở các ngày tiếp sau (hình 3.2).





Hình 3.2. Đường cong tăng trưởng của *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trên môi trường f/2 ở các mật độ xuất phát khác nhau với điều kiện nuôi cấy lỏng lẻo

#### 4. Thảo luận

Trong điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh, ở các mật độ tế bào khác nhau có số lượng tế bào trong chuỗi thấp, trung bình từ 5 -10 tb/chuỗi; thể sắc tố chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6 (ảnh 3.1, 3.2, 3.3, 3.4), mật độ tế bào tối đa thấp hơn so với điều kiện nuôi cấy lỏng lắc (hình 3.1, 3.2). Điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh đã gây ra sự lắng đọng của các tế bào tảo, làm cho tảo không tiếp xúc đầy đủ với ánh sáng và chất dinh dưỡng, sự trao đổi khí trong môi trường nuôi cấy và không khí kém và gây ra sự phân tầng nhiệt trong cột nước (Lavens và Sorgeloods, 1996).

Trong khi đó, với điều kiện nuôi cấy lỏng lắc ở các mật độ tế bào khác nhau có số lượng tế bào trong chuỗi cao hơn, trung bình 6 – 12 tb/chuỗi; sắc thể đậm màu và chiếm toàn bộ thể tích tế bào từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 4, chiếm khoảng 1/2 thể tích tế bào từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 6 (ảnh 3.5, 3.6, 3.7, 3.8) và mật độ tế bào qua các ngày cao hơn so

với điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh (hình 3.1, 3.2). Điều kiện này đã gây ra sự xáo trộn cột nước, ngăn chặn sự lắng đọng của tảo, đảm bảo tất cả các tế bào trong quần thể tiếp xúc đều với ánh sáng, các tế bào trải qua chiều dài của chu kỳ sáng-tối một cách đầy đủ, phân phối đều chất dinh dưỡng và giảm các gradient tại bề mặt của các tế bào, giúp loại bỏ oxi quang hợp tạo ra, tránh sự phân tầng nhiệt trong cột nước, cải thiện sự trao đổi khí giữa môi trường nuôi cấy và không khí, cung cấp nguồn carbon ở dạng carbon dioxide cho quang hợp ở tảo. Ngoài ra, sự xáo trộn làm bổ xung carbon dioxide giúp chống lại sự thay đổi pH của môi trường đó là sự cân bằng  $CO_2/HCO_3^-$  (Lavens và Sorgeloods, 1996). Chính điều này đã giúp cho tế bào vi tảo *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko có được hình thái, sắc thể và sự tăng trưởng tốt hơn so với điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh.

Theo Richmond (2004), ở mật độ tế bào *Chlorella* cao nhất là 2,33 g/l tạo ra

gradient ánh sáng cao nhất trong các bình nuôi, tốc độ xáo trộn tăng làm cường độ quang hợp của tế bào tăng lên 50%. Trong thí nghiệm với mật độ tế bào xuất phát 5.000 tb/ml, điều kiện lỏng lắc đã thích hợp, giúp tận dụng hiệu quả bức xạ ánh sáng chiếu vào môi trường và nguồn dinh dưỡng trong môi trường, vì vậy hình thái tế bào và thể sắc tố của tế bào ở mật độ xuất phát này tốt hơn so với các mật độ tế bào xuất phát khác.

Với mật độ tế bào xuất phát 10.000 tb/ml và 20.000 tb/ml ở cả hai điều kiện nuôi cấy đều gây ra hiện tượng hình thành bào tử nghỉ với mật độ cao (ảnh 3.3, 3.4, 3.7, 3.8). Nguyên nhân, ở hai mật độ tế bào cao này làm tăng hiệu quả sử dụng chất dinh dưỡng trong quá trình tăng trưởng gây ra sự suy giảm nhanh chóng dinh dưỡng. Theo Kuwata *et al.* (1993), sự thiếu hụt nitrogen và phosphor trong môi trường dẫn đến sự hình thành bào tử nghỉ; ngoài ra, nồng độ silicic acid

cũng bị giảm mạnh trong cả pha tăng trưởng và hình thành bào tử nghỉ.

## 5. Kết luận

Sự tăng trưởng của *Chaetoceros subtilis* var. *abnormis* Proschkina-Lavrenko trên môi trường f/2 ở các mật độ tế bào xuất phát khác nhau với điều kiện nuôi cấy lỏng lắc cho kết quả tốt hơn so với điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh.

Điều kiện nuôi cấy lỏng lắc giúp tăng trưởng nhanh hơn (đạt mật độ tế bào cực đại ở ngày thứ 4 thay vì ngày thứ 5 ở điều kiện nuôi cấy lỏng tĩnh) và sinh khối tối đa của quần thể lớn hơn (150.000 tb/ml thay vì 80.000 tb/ml).

Mật độ tế bào xuất phát 5.000 tb/ml trong điều kiện nuôi cấy lỏng lắc cho kết quả tốt nhất.

Có hiện tượng hình thành bào tử nghỉ ở ngày thứ 2 và thứ 3 ở các mật độ tế bào xuất phát cao 10.000 tb/ml và 20.000 tb/ml trên cả hai điều kiện nuôi cấy.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thanh Mai, Trịnh Hoàng Khải, Đào Văn Trí, Nguyễn Văn Hùng, (2009), “Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy in vitro tảo silic nước mặn *Chaetoceros calcitrans* Paulsen, 1905 và ứng dụng sinh khối tảo làm thức ăn cho tôm he chân trắng (*Penaeus vannamei*)”, *Science & Technology Development*, vol. 12 (13), pp. 28 – 36.
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. Chisti Y. (2007), “Biodiesel from microalgae”, *Biotechnology Advances*, vol. 25, pp. 294 – 306.
4. Chotipuntu P. (2005), “Marine Diatom (*Chaetoceros calcitrans*) as a Monospecies Diet for Conditioning Oyster (*Crassostrea belcheri* Sowerby) Broodstock”, *Walailak J Sci & Tech*, vol. 2(2), pp. 201-207.
5. Guillard R. R. L. (2005), *Purification methods for microalgae*, In: Andersen R. A. (ed.), *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, pp. 117 – 133.

6. 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, pp. 239 -253.
7. Harrison P. J. and Berges J. A. (2005), *Marine culture media*, In: *Algal culturing techniques*, Elsevier Academic Press, pp. 21 – 35.
8. Kuwata A., Hama T. and Takahashi M. (1993), “Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion”, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 102 (30), pp. 245 – 255.
9. Lavens P. and Sorgeloos P. (1996), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, Fao Fisheries Technical Paper, vol. 361, pp. 10 – 30.
10. Richmond A. (2004), *Handbook of Microalgal Culture*, Blackwell Science Ltd., pp. 125 – 178.
11. Sunlu F. S., Kutlu B. and Buyukisik H. B. (2010), “Comparison of Growth Kinetics of *Chaetoceros gracilis* Isolated from Two Different Areas in the Aegean Sea (The Bay of Izmir and the Homa Lagoon)”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 9 (13), pp. 1796-1803.
12. Tomas C. R., Hasle G. R., Steidinger K. A., Syvertsen E. E., Jangen K. (1996), *Identifying marine diatoms and dinoflagellate*, Academic Press, Inc., pp. 28 – 240.
13. 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: 10-5-2011; ngày chấp nhận đăng: 02-6-2011)