



Bài báo nghiên cứu

TĂNG TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY LIPID CỦA VI TẢO *PICOCHLORUM* SP. DƯỚI ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN NITƠ VÀ PHOSPHOR, VÀ ĐIỀU KIỆN ỨC CHẾ KHÁC NHAU

Võ Hồng Trung*, Nguyễn Thị Hồng Phúc

Bộ môn Hóa sinh – Độc chất, Khoa Dược – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*Tác giả liên hệ: Võ Hồng Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com

Ngày nhận bài: 28-3-2019; ngày nhận bài sửa: 10-5-2019; ngày duyệt đăng: 21-5-2019

TÓM TẮT

Vi tảo *Picochlorum* sp. có hàm lượng lipid tổng cao tiềm năng cho những ứng dụng về năng lượng sinh học, thực phẩm và dược phẩm. *Picochlorum* sp. được nuôi cấy trong môi trường MD4 bổ sung nitơ (NO_3^-) và phosphor (H_2PO_4^-) có mật độ tế bào cao sau 6 ngày nuôi cấy. Sự tích lũy lipid của *Picochlorum* sp. ở môi trường MD4 bổ sung cả nitơ (NO_3^-) và phosphor (H_2PO_4^-) thấp hơn so với bổ sung nitơ và phosphor riêng rẽ. Môi trường MD4 bổ sung NPK 0,1-0,15 g/L kích thích tăng trưởng của *Picochlorum* sp. Trong điều kiện nuôi ỨC CHẾ, *Picochlorum* sp. giảm sự tăng trưởng, tuy nhiên làm tăng hàm lượng lipid ở điều kiện ỨC CHẾ độ muối 1,0 M NaCl kết hợp loại NPK.

Từ khóa: *Picochlorum*, lipid, tăng trưởng, phân bón NPK, nitơ, phosphor.

1. Giới thiệu

Chi *Picochlorum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) được biết đến là một loại vi tảo lục, kích thước nhỏ, đơn bào, có khả năng tạo ra lipid nội bào cao và có thể tăng trưởng mạnh trong các điều kiện môi trường nuôi cấy bất lợi (De la Vega, Diaz, Vila, & Leon, 2011), (Gonzalez-Esquer, Twary, Hovde, & Starckenburg, 2018), (Tran, Giordano, et al., 2014). *Picochlorum oklahomensis* giàu lipid, protein và nhiều acid béo không bão hòa, là một vi tảo tiềm năng cho các ứng dụng sinh học và nhiên liệu sinh học (Zhu, & Dunford, 2013).

Picochlorum sp. còn được biết đến với hàm lượng cao carotene, acid amin và lipid giàu acid béo thiết yếu, tiềm năng cho sự sản xuất thực phẩm chức năng và dược phẩm (De la Vega et al., 2011), (Tran et al., 2014). Mặt khác, vi tảo *Picochlorum* sp. giàu lipid chủ yếu là các acid béo C16 và C18 đang được quan tâm cho sự sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ thứ 2 có thể tái tạo, không độc hại và bảo vệ môi trường thay cho nguồn nhiên liệu hóa thạch đang dần bị cạn kiệt, giúp loại bỏ những hạn chế lớn liên quan đến nhiên liệu sinh học được sản xuất từ cây trồng trên đất liền (Schenk et al., 2008). Ngoài ra, vi tảo còn là

Cite this article as: Vo Hong Trung, & Nguyen Thi Hong Phuc (2019). Effects of different nitrogen and phosphorus nutrients and stress conditions on the growth and lipid accumulation of the microalga *Picochlorum* sp. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 16(9), 335-350.

nguồn thức ăn cho động vật phù du, ấu trùng cá, tôm thẻ chân trắng... giúp phát triển ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản, có khả năng xử lý nguồn nước và khí thải, giúp giảm thiểu các vấn đề ô nhiễm môi trường (Pulz, & Gross, 2004), (Cai, Park, & Li, 2013).

Trong tất cả các chất dinh dưỡng được đánh giá, nitơ là chất dinh dưỡng quan trọng ảnh hưởng đến chuyển hóa lipid trong tảo. Sự tích lũy lượng lớn chất béo, đặc biệt là TAG với sự thiếu hụt nitơ đã được quan sát thấy ở nhiều loài vi tảo khác nhau (Qiang et al., 2008): *Scenedesmus obliquus* (El-Sheekh, Abomohra, & Hanelt, 2013), *Nannochloropsis oculata* và *Chlorella vulgaris* (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borghi, 2009), *Picochlorum* sp. (El-Kassas, 2013). Theo Kilham và cộng sự (1997), bên cạnh sự thiếu hụt nitơ, sự thiếu hụt phosphor làm giảm hàm lượng diệp lục tố và hàm lượng protein nhưng làm tăng hàm lượng lipid trong các tế bào tảo (Kilham, Kreeger, Goulden, & Lynn, 1997). Điều kiện môi trường hạn chế phosphor đã được sử dụng để tăng sản xuất lipid tổng trong tảo lục đơn bào *Chlorella kessleri* (El-Sheekh, & Rady, 1995) và *Picochlorum* sp. (El-Kassas, 2013), (Dahmen et al., 2014).

Picochlorum sp. trong môi trường thiếu chất dinh dưỡng - thiếu nitơ, phosphor (-50%, -100% của $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và NaNO_3) dẫn đến sự gia tăng hàm lượng carbohydrate, lipid và methyl este của acid béo (FAME – Fatty Acid Methyl Esters) nhưng hàm lượng protein, diệp lục tố giảm rõ rệt trong cùng điều kiện. Dưới điều kiện môi trường nuôi tảo thiếu $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, thành phần acid béo không bão hòa chiếm chủ yếu, do đó *Picochlorum* sp. có thể được coi là phù hợp cho nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, dưới điều kiện thiếu NaNO_3 tạo thành các acid béo bão hòa, *Picochlorum* sp. có thể được coi là ứng viên phù hợp cho sản xuất diesel sinh học. Kết quả cho thấy giới hạn nitơ và phosphate có thể được áp dụng để tăng cường sản xuất lipid và carbohydrate (El-Kassas, 2013). *Picochlorum* sp., sự tăng trưởng cao nhất ở độ muối NaCl 0,5 M nhưng sự tích lũy lipid lại cao hơn ở độ muối NaCl 2 M (Tran et al., 2014).

Picochlorum sp. là vi tảo có hàm lượng lipid tổng cao giàu acid béo thiết yếu, omega-3 và omega-6 được xem như một nguyên liệu đầy hứa hẹn cho dinh dưỡng của con người, nuôi trồng thủy sản và sản xuất nhiên liệu sinh học. *Picochlorum* sp. có khả năng tăng trưởng mạnh và tích lũy lipid cao trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm khảo sát sự tăng trưởng và tích lũy lipid của *Picochlorum* sp. trong môi trường bổ sung nguồn nitơ và phosphor, và các điều kiện ức chế khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. *Picochlorum* sp. và điều kiện môi trường nuôi cấy

Picochlorum sp. được phân lập và định danh sinh học phân tử tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ tảo, Trường Đại học Quốc tế – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (Tran, 2014).

Tảo được nuôi cấy trong môi trường MD4 0,5M (Tran, Doan, Louime, Giordano, & Portilla, 2014), điều chỉnh pH= 7,5, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng $50 \mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, chu kì sáng: tối = 12h: 12h.

2.2. Các phương pháp phân tích

2.2.1. Quan sát hình thái tế bào

Hình thái tế bào *Picochlorum* sp. được quan sát bằng kính hiển vi quang học (400X) sau mỗi 2 hoặc 3 ngày nuôi cấy.

2.2.2. Phân tích tăng trưởng

Lấy 100 μL dịch nuôi tảo được cô định bằng dung dịch Lugol (5% iốt và 10% kali iodua). Mật độ tế bào được xác định bằng cách đếm số lượng tế bào trực tiếp 2 hoặc 3 ngày một lần, sử dụng kính hiển vi quang học (400X), bằng buồng đếm hồng cầu sâu 0,1 mm (Neubauer Haemocytometer) (Auinger, Pfandl, & Boenigk, 2008). Hút 10 μL dịch nuôi tảo bơm vào buồng đếm hồng cầu. Đếm tế bào vi tảo trong 25 ô ở khối vuông giữa có diện tích 1 mm^2 . Số lượng tế bào trong 1 mL được xác định theo công thức sau:

$$\text{Số lượng tế bào/mL} = \text{tổng số tế bào đếm được} \times 10^4 \times \text{Hệ số pha loãng}$$

2.2.3. Xác định tốc độ tăng trưởng đặc hiệu

Mật độ tế bào ở hai thời điểm khác nhau trong quá trình tăng trưởng của mẫu được dùng để tính tốc độ tăng trưởng đặc hiệu (μ : tế bào/mL/ngày) trong khoảng thời gian đó theo công thức (Harrison, 1993):

$$\mu = \frac{\ln(C_2/C_1)}{t_2 - t_1}$$

Trong đó: C_1 , C_2 : Mật độ tế bào tại thời điểm 1 và 2

t_1 , t_2 : Thời điểm 1 và 2

2.2.4. Xác định hàm lượng lipid tổng bằng phương pháp Sulfo-phospho-vanillin

Thuốc thử Phosphovanillin: hòa tan 0,06 g vanillin trong 2 mL ethanol nguyên chất, thêm 8 mL nước cất và lắc kĩ. Sau đó, thêm 50 mL acid phosphoric đậm đặc vào tạo thành hỗn hợp và bảo quản trong tối cho quá trình phân tích. Thuốc thử phospho-vanillin nên được chuẩn bị ngay khi phân tích mẫu để đảm bảo thuốc thử hoạt động tốt (Mishra et al., 2014), (Park, Jeong, Yoon, & Moon, 2016).

Lấy 1 mL dịch nuôi tảo li tâm ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần cặn tế bào được li trích với 2 mL acid sulfuric đậm đặc (98%), sau đó đun ở bếp cách thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong trong bể nước đá. Bổ sung 5mL thuốc thử phospho-vanillin, hỗn hợp ủ ở 37°C trong 15 phút và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm (Mishra et al., 2014), (Park et al., 2016).

Đường chuẩn lipid: dầu cải thương mại (sản phẩm của Công ty Cổ phần Dầu thực vật Tường An) trong cloroform (nồng độ 1 mg/mL), nồng độ lipid chuẩn (10-150 μg) được thực hiện trong các ống nghiệm sạch có nắp. Ủ các ống nghiệm ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút để làm bay hơi chloroform. Thêm 2 mL acid sulfuric đậm đặc, sau đó đun trên bếp cách

thủy 100°C trong 10 phút, làm lạnh trong bể nước đá. Bổ sung 5 mL thuốc thử Phosphovanillin, hỗn hợp được ủ ở 37°C và lắc mẫu liên tục. Đo mẫu ở bước sóng 530 nm. Xác định hàm lượng lipid tổng của *Picochlorum* sp. theo phương trình $y = 0,005x - 0,0531$, $R^2 = 0,9929$.

2.3. Phương pháp thiết kế thí nghiệm

2.3.1. *Picochlorum* sp. cho các thí nghiệm

Picochlorum sp. được nuôi trong môi trường MD4 0,5M đạt được pha tăng trưởng sau 10-14 ngày, được sử dụng để bố trí các thí nghiệm.

2.3.2. Thí nghiệm 1: *Picochlorum* sp. trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và Phosphor (H_2PO_4^-) khác nhau

Picochlorum sp. được nuôi trong bình tam giác 250 mL với 100 mL môi trường MD4 có mật độ tế bào ban đầu $\approx 10^6$ tế bào/mL với 9 nghiệm thức: bổ sung $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (nồng độ từ 0,002825 g/L đến 0,01695 g/L) và NaNO_3 (nồng độ từ 0,0375 g/L đến 0,225 g/L). Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định mật độ tế bào, tốc độ tăng trưởng và hàm lượng lipid tổng của *Picochlorum* sp. sau mỗi 2 ngày nuôi cấy.

2.3.3. Thí nghiệm 2: *Picochlorum* sp. trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ và phosphor (phân bón NPK) ở các nồng độ khác nhau

Picochlorum sp. được nuôi trong bình tam giác 250 mL với 100 mL môi trường MD4 có mật độ tế bào ban đầu $\approx 10^6$ tế bào/mL với 7 nghiệm thức: bổ sung NPK (Đầu Trâu 501, sản phẩm của Công ty Cổ phần Bình Điền) nồng độ thay đổi từ 0,05 g/L đến 1,0 g/L và nghiệm thức đối chứng không có bổ sung NPK. Các thí nghiệm nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xác định mật độ tế bào, tốc độ tăng trưởng và hàm lượng lipid tổng của *Picochlorum* sp. sau mỗi 3 ngày nuôi cấy.

2.3.4. Thí nghiệm 3: *Picochlorum* sp. trong môi trường MD4 dưới các điều kiện ức chế khác nhau

Vi tảo *Picochlorum* sp. được nuôi trong bình tam giác 250 mL với 100 mL môi trường MD4 gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn nuôi tăng trưởng: *Picochlorum* sp. nuôi trong môi trường MD4 0,5M bổ sung 0,1 g/L NPK có mật độ tế bào ban đầu $\approx 10^6$ tế bào/mL. Cường độ ánh sáng 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Giai đoạn nuôi ức chế: sau 18 ngày nuôi tăng trưởng tế bào *Picochlorum* sp. được chuyển sang các điều kiện ức chế khác nhau như cạn kiệt dinh dưỡng, loại NPK, ức chế độ muối và cường độ ánh sáng cao (300 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$).

Xác định mật độ tế bào và hàm lượng lipid tổng của *Picochlorum* sp. sau mỗi 3 ngày nuôi cấy.

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft office Excel 2013 và phân tích one way ANOVA bằng phần mềm SPSS 20.0 với sai số ý nghĩa $p < 0,05$. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình (Mean) \pm Sai số chuẩn (SE).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Picochlorum sp. trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau

3.1.1. Hình thái tế bào vi tảo Picochlorum sp.

Tế bào *Picochlorum* sp. có dạng hình cầu, màu xanh và kích thước tăng dần trong quá trình nuôi cấy. Hình dạng và kích thước tế bào vi tảo *Picochlorum* sp. không có sự khác biệt ở các điều kiện môi trường khác nhau (Hình 3.1).

Thí nghiệm	Ngày						
	0	4	8	12	16	20	
Đối chứng							
$NaNO_3$ 0,0375 g/L							
$NaNO_3$ 0,075 g/L							
$NaNO_3$ 0,15 g/L							
$NaNO_3$ 0,225 g/L							
NaH_2PO_4 0,002825 g/L							
NaH_2PO_4 0,00565 g/L							
NaH_2PO_4 0,0113 g/L							
NaH_2PO_4 0,01695 g/L							

Hình 3.1. Hình dạng tế bào *Picochlorum* sp. trong môi trường MD4 0,5 M bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau

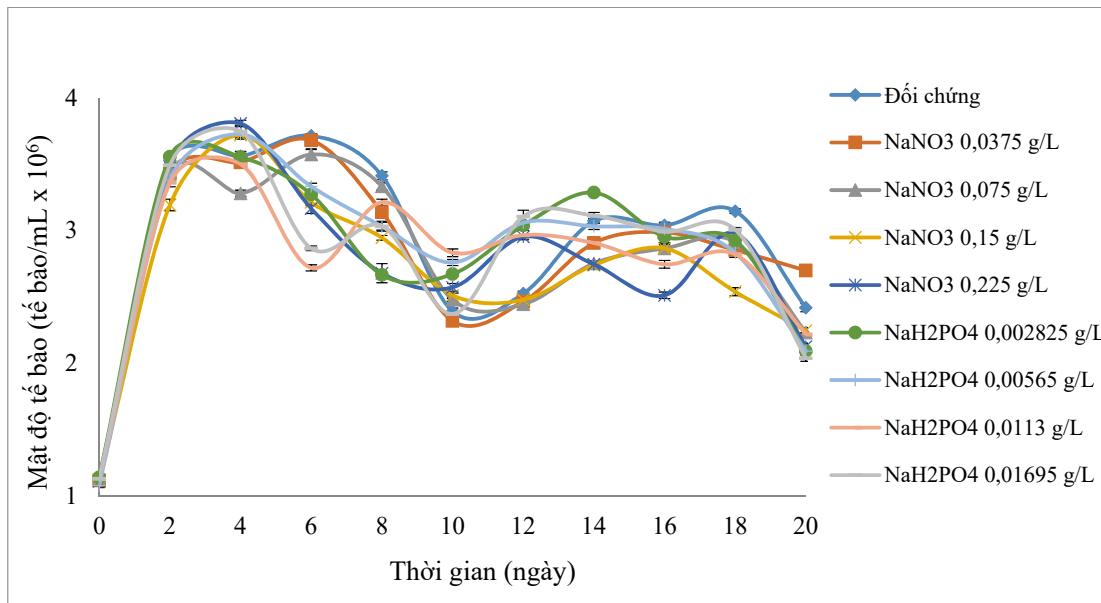
3.1.2. Sự tăng trưởng của *Picochlorum* sp.

Môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor (H_2PO_4^-) có ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của vi tảo *Picochlorum* sp. Mật độ tế bào *Picochlorum* sp. ở các nghiệm thức bổ sung nguồn nitơ và phosphor riêng rẽ không có sự khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng (bổ sung cả nitơ và phosphor) qua các ngày nuôi cấy ($p = 0,989$) (Hình 3.2)

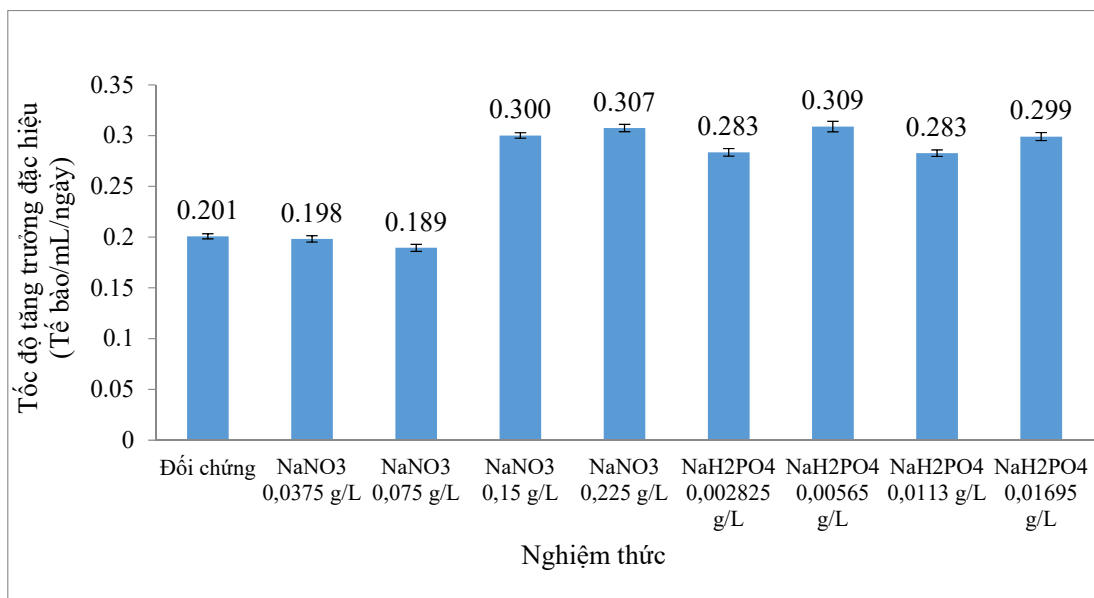
Mật độ tế bào *Picochlorum* sp. ở các nghiệm thức đối chứng, bổ sung NaNO_3 0,0375g/L và NaNO_3 0,075 g/L đạt cực đại ở ngày 6 ($p \leq 0,05$) và giảm dần theo thời gian. Trong đó, mật độ tế bào của nghiệm thức đối chứng và bổ sung NaNO_3 0,0375 g/L cao hơn nghiệm thức NaNO_3 0,075 g/L ($p \leq 0,05$) (Hình 3.2). Các nghiệm thức bổ sung nitơ (NO_3^-) và phosphor (H_2PO_4^-) còn lại có mật độ tế bào đạt cực đại ở ngày thứ 4 ($p \leq 0,05$) sau đó giảm dần qua các ngày nuôi cấy (Hình 3.2). Điều này có thể là do nguồn dinh dưỡng trong môi trường cạn kiệt đặc biệt là nitơ và phosphor. Nitơ và phosphor được coi là một trong những chất dinh dưỡng quan trọng cho sự tăng trưởng và tổng hợp các hợp chất hữu cơ trong thực vật cũng như vi tảo (Cai et al., 2013), (Kim, Mujtaba, & Lee, 2016). Nitơ là một thành phần trong tất cả các protein cấu trúc và chức năng như peptide, enzyme, diệp lục tố, phân tử chuyển năng lượng và vật liệu di truyền trong tế bào tảo (Hu, 2004).

Phosphor là yếu tố dinh dưỡng cần cho sự sinh trưởng chiếm tỉ lệ thấp hơn nitơ (Xin, Hong-ying, Ke, & Ying-xue, 2010). Phosphate là thành phần chính của các chất mang năng lượng trong tế bào như ATP, ADP và NADP, là một phần trong cấu trúc của DNA và RNA (những đại phân tử cần thiết cho tất cả các tế bào sống) và là thành phần quan trọng của phospholipid (Cai et al., 2013).

Hình 3.3 cho thấy môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor (H_2PO_4^-) khác nhau ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của vi tảo *Picochlorum* sp. Nghiệm thức đối chứng, bổ sung NaNO_3 0,0375 g/L và NaNO_3 0,075 g/L có tốc độ tăng trưởng thấp hơn các nghiệm thức khác ($p \leq 0,05$) và 3 nghiệm thức này có tốc độ tăng trưởng đặc hiệu không khác biệt ý nghĩa ($p = 0,083$). Trong khi đó, môi trường MD4 0,5 M bổ sung NaNO_3 nồng độ từ 0,15 – 0,225 g/L và bổ sung $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ có tốc độ tăng trưởng cao và không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các nghiệm thức này ($p \leq 0,05$). Sự tăng trưởng của *Picochlorum* sp. không cao có thể do tỉ lệ hàm lượng nitơ và phosphor bổ sung chưa phù hợp với môi trường nuôi cấy MD4.



Hình 3.2. Mật độ tế bào của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau



Hình 3.3. Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau

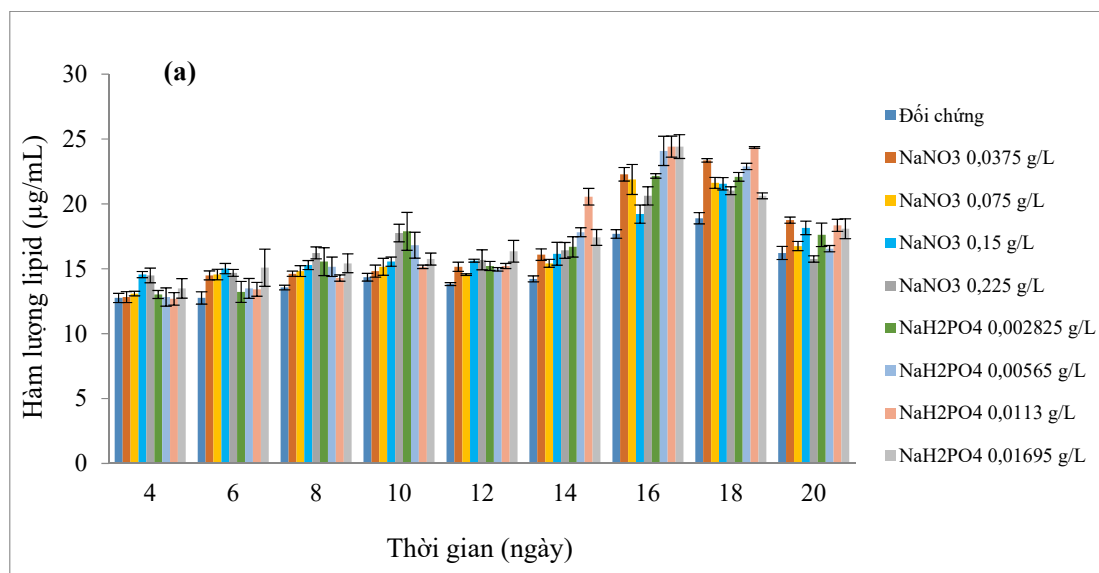
3.1.3. Sự tích lũy lipid của *Picochlorum sp.*

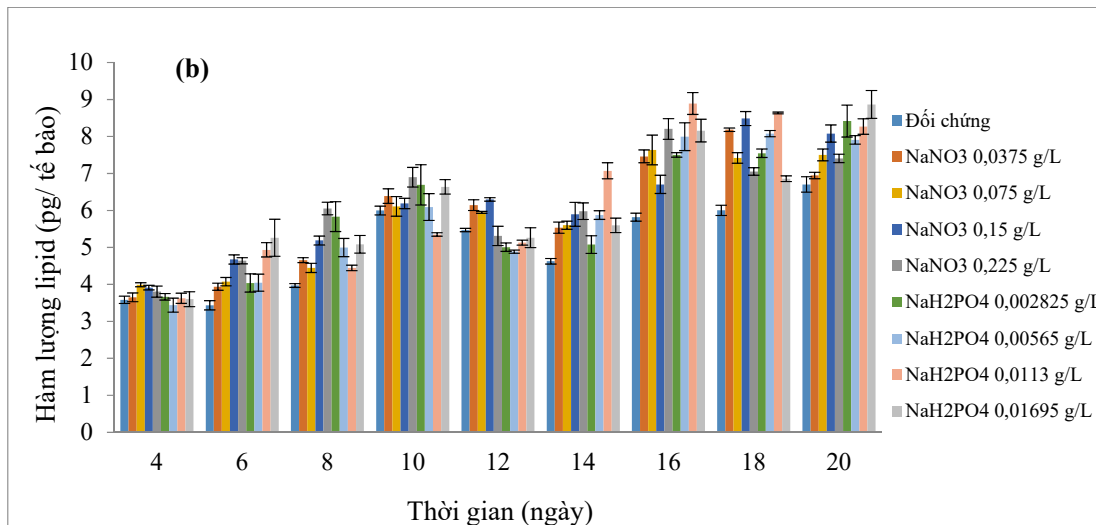
Hàm lượng lipid ($\mu\text{g/mL}$) của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau đạt giá trị ổn định không có sự khác biệt ý nghĩa từ ngày 4 đến ngày 14 ($p = 0,325$) và tăng cao từ ngày 16 đến ngày 18 ($p \leq 0,05$). Hàm

lượng lipid ($\mu\text{g/mL}$) của *Picochlorum* sp. ở các nghiệm thức bổ sung nitơ và phosphor riêng rẽ cao hơn so với nghiệm thức mẫu đối chứng ($p \leq 0,05$) (Hình 3.4a).

Sự tích lũy lipid trên tế bào (pg/tế bào) của *Picochlorum* sp. tăng từ ngày 16 và đạt giá trị cao hơn so với các ngày trước đó ($p \leq 0,05$). Hàm lượng lipid (pg/tế bào) của *Picochlorum* sp. ở các nghiệm thức bổ sung nitơ và phosphor riêng rẽ đạt giá trị cao hơn so với nghiệm thức đối chứng sau 16 ngày nuôi cấy ($p \leq 0,05$) (Hình 3.4b).

Kết quả này có thể là do môi trường MD4 bị giới hạn nguồn dinh dưỡng nitơ hoặc phosphor gây ra sự tăng tích lũy lipid và kích thước tế bào vi tảo *Picochlorum* sp sau 16 ngày nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự tăng trưởng và hàm lượng protein của vi tảo giảm nhưng hàm lượng carbohydrate và lipid tăng cao trong môi trường nuôi vi tảo thiếu hụt nitơ (Kilham et al., 1997) (Heraud, Wood, Tobin, Beardall, & McNaughton, 2005) (Converti et al., 2009), (El-Kassas, 2013). Tương tự, sự thiếu hụt phosphor cũng làm giảm hàm lượng diệp lục tố và protein, đồng thời làm tăng hàm lượng lipid và carbohydrate trong các tế bào vi tảo (El-Sheek & Rady, 1995), (Kilham et al., 1997). Theo Dahmen và cộng sự (2014) hàm lượng lipid của *Picochlorum* sp. đạt giá trị cao dưới điều kiện nuôi cấy thiếu hụt phosphate và bổ sung natri cacbonat (Dahmen et al., 2014). *Picochlorum* sp. trong môi trường thiếu chất dinh dưỡng nitơ và phosphor (-50%, -100% của $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và NaNO_3) dẫn đến sự gia tăng hàm lượng carbohydrate, lipid và acid béo (El-Kassas, 2013). Vì vậy, thiếu nitơ hoặc phosphor trong môi trường nuôi cấy làm giảm tốc độ tăng trưởng nhưng tích lũy lượng lớn các hợp chất thứ cấp như lipid.





Hình 3.4. Hàm lượng lipid của *Picochlorum sp.* trên thể tích (a) và tế bào (b) trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) khác nhau

3.2. *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ và phosphor (phân bón NPK) ở các nồng độ khác nhau

3.2.1. Sự tăng trưởng của *Picochlorum sp.*

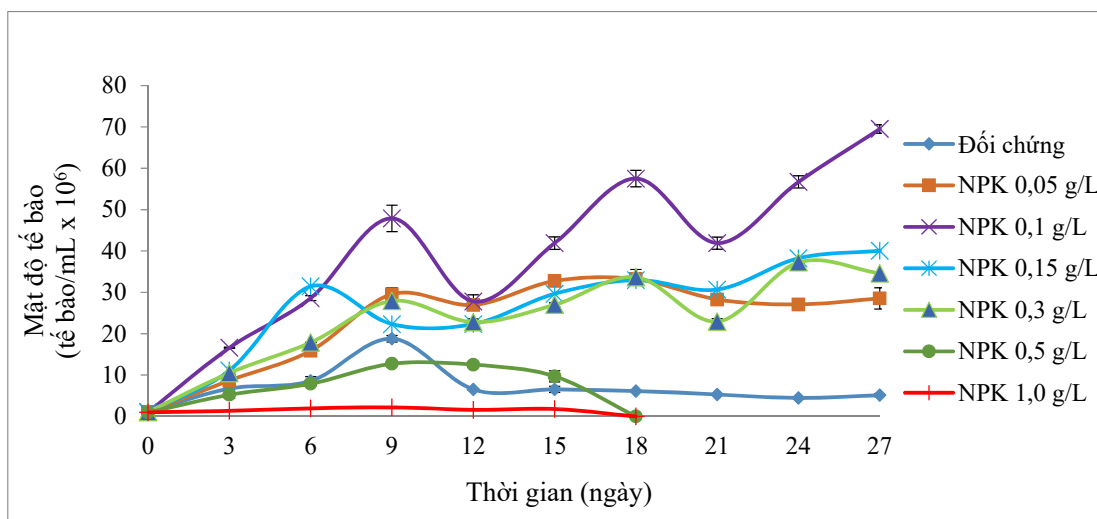
Kết quả thí nghiệm cho thấy phân bón NPK có ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của vi tảo *Picochlorum sp.* Trong điều kiện môi trường MD4 không bổ sung NPK sự tăng trưởng của tế bào *Picochlorum sp.* thấp hơn so với môi trường MD4 bổ sung NPK nồng độ từ 0,05g/L đến 0,3 g/L ($p \leq 0,05$). *Picochlorum* chết hoàn toàn sau 18 ngày nuôi cấy ở môi trường MD4 bổ sung nồng độ NPK cao (0,5 và 1,0 g/L). Môi trường MD4 bổ sung NPK 0,1 g/L có mật độ tế bào cao đạt được sau 9 ngày nuôi cấy và tăng dần từ ngày 9 đến ngày 27 ($p \leq 0,05$) (Hình 3.5). Mật độ tế bào *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung phân bón NPK từ 0,05 g/L đến 0,3 g/L cao hơn so với môi trường MD4 bổ sung nguồn nitrat và phosphat (Hình 3.2, 3.5).

Bổ sung phân bón NPK nồng độ khác nhau vào môi trường MD4 có ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của *Picochlorum sp.* Nghiệm thức NPK 0,1 g/L và NPK 0,15 g/L cho tốc độ tăng trưởng (0,553 và 0,532 tế bào/mL/ngày) cao hơn so với các nghiệm thức còn lại ($p \leq 0,05$) (Hình 3.6) và cao hơn so với môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ (NO_3^-) và phosphor ($H_2PO_4^-$) ($p \leq 0,05$) (Hình 3.3).

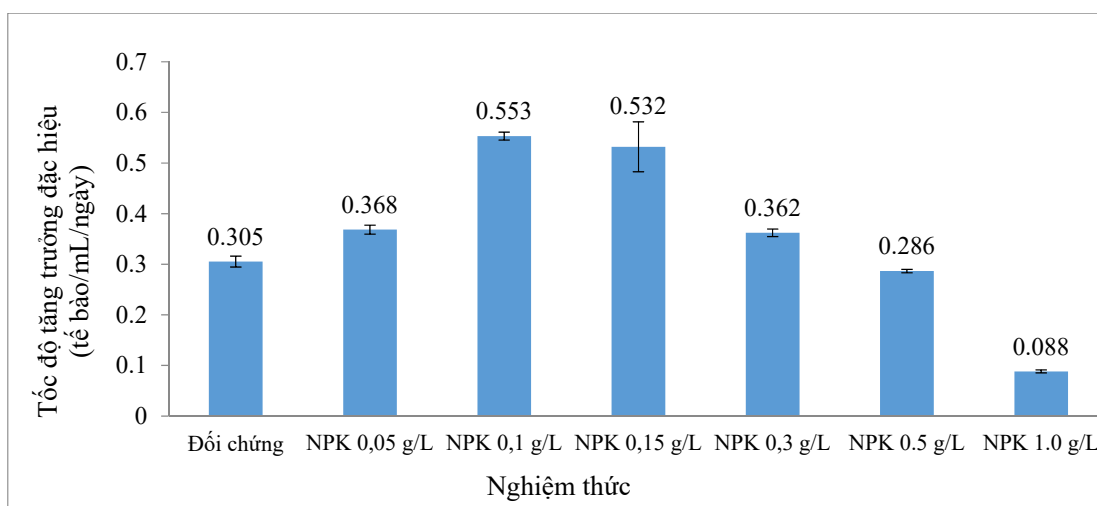
Điều này cho thấy, nồng độ phân bón NPK từ 0,1-0,15 g/L phù hợp cho sự tăng trưởng tối ưu của *Picochlorum sp.* Ở nồng độ NPK cao hơn 0,3 g/L gây độc và làm chết tế bào dẫn đến giảm sự tăng trưởng và hàm lượng các sắc tố quang hợp. Nitơ và phosphor là yếu tố phổ biến ảnh hưởng sự tăng trưởng và tích lũy lipid của các loài vi tảo (Kim et al., 2016). Tế bào vi tảo thường được nuôi cấy trong điều kiện giàu nitơ để kích thích tăng sinh khối (Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016). Vi tảo *Pseudokirchneriella subcapitata* nuôi trong môi trường có bổ sung phân bón NPK có chi phí thấp, năng suất và khả năng chịu sự biến động của pH của môi trường cao (Carvalho et al., 2012). Sự tăng

trường tốt của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung NPK 0,1-0,15 g/L có thể là do các thành phần khoáng, vi lượng và ba thành phần α -NAA, β -NOA, GA3 là các chất điều hòa tăng trưởng thực vật hiện diện trong phân bón NPK.

Các chất dinh dưỡng như nitơ và phosphor rất cần thiết cho sự phát triển bình thường và sản xuất các hợp chất hữu cơ bao gồm protein, lipid, diệp lục tố trong thực vật cũng như vi tảo. Sự tăng trưởng tương ứng với sự gia tăng hàm lượng diệp lục tố tổng – một thành phần thiết yếu của quá trình quang hợp trong các tế bào vi tảo lục. Nhu cầu về diệp lục tố tăng lên đối với sự tăng trưởng của tế bào được cung cấp đầy đủ bằng bổ sung nitơ, vì nó là một trong những yếu tố quan trọng liên quan đến sự hình thành vòng porphyrin (Wang, Lambert, Giang, Goericke, & Palenik, 2014).



Hình 3.5. Mật độ tế bào của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ và phosphor (phân bón NPK) ở các nồng độ khác nhau

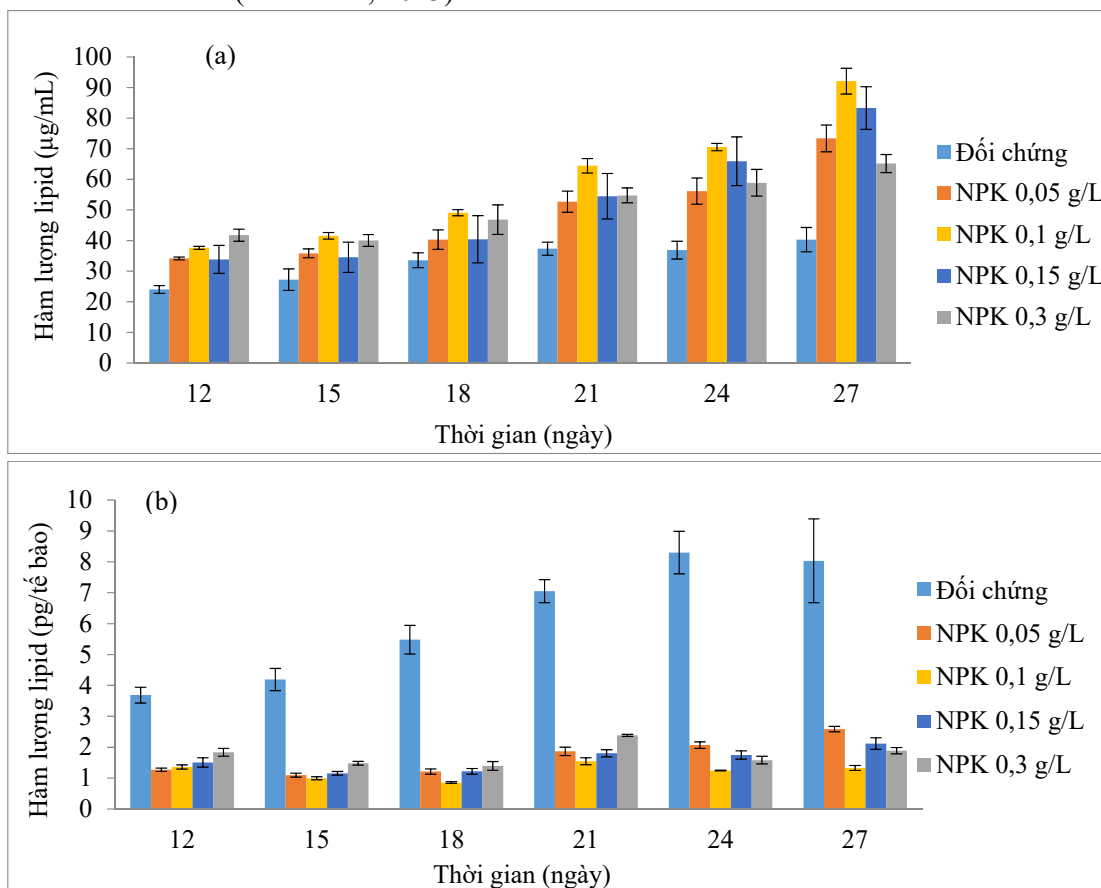


Hình 3.6. Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu của *Picochlorum sp.* trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ và phosphor (phân bón NPK) ở các nồng độ khác nhau

3.2.2. Tích lũy lipid của *Picochlorum* sp.

Hàm lượng lipid trên thể tích ($\mu\text{g/mL}$) của *Picochlorum* sp. tăng ở tất cả các nghiệm thức bổ sung NPK ($p \leq 0,05$) và nghiệm thức đối chứng ($p \leq 0,05$). Từ ngày 21 đến ngày 27, *Picochlorum* sp. có hàm lượng lipid trên thể tích ở nghiệm thức đối chứng thấp hơn so với các nghiệm thức bổ sung NPK ($p \leq 0,05$) (Hình 3.7a). Ngược lại, hàm lượng lipid trên tế bào (pg/tế bào) của *Picochlorum* sp. ở nghiệm thức đối chứng tăng và đạt giá trị cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung NPK trong quá trình nuôi cấy ($p \leq 0,05$) (Hình 3.7b).

Nghiên cứu trước đây cho rằng *Picochlorum* SE3 sản xuất carotenoid thứ cấp và tích lũy lipid dưới điều kiện nuôi cấy giới hạn nitơ (Wang et al., 2014). Cho thấy sự tích lũy carotene và lipid trong tế bào *Picochlorum* sp. có thể là do sự giới hạn nồng độ nitơ và phosphor trong môi trường MD4. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước của tác giả như El-Kassas (2013): *Picochlorum* sp. nuôi cấy trong điều kiện thiếu Nitơ và Phosphor làm giảm tốc độ tăng trưởng nhưng hàm lượng lipid tăng, đặc biệt là triacylglycerol (TCG) và các acid béo bão hòa. Sự thiếu dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy *Picochlorum* sp. gây ra sinh tổng hợp triacylglycerol (TCG) cũng như chuyển đổi lipid màng hiện tại của tế bào thành TCG (El-Kassas, 2013).



Hình 3.7. Hàm lượng lipid của *Picochlorum* sp. trên thể tích (a) và tế bào (b) trong môi trường MD4 bổ sung nguồn nitơ và phosphor (phân bón NPK) ở các nồng độ khác nhau

3.3. *Picochlorum* sp. trong môi trường MD4 dưới các điều kiện ức chế khác nhau

3.3.1. Sự tăng trưởng của *Picochlorum* sp.

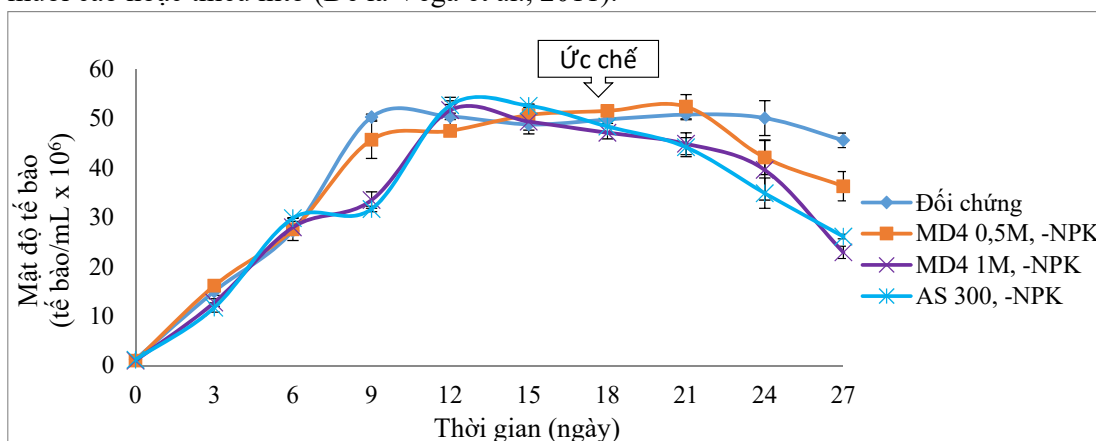
Picochlorum sp. được nuôi cấy trong môi trường MD4 0,5 M bổ sung phân bón NPK 0,1 g/L có mật độ tế bào và tốc độ tăng trưởng cao hơn so với môi trường MD4 bổ sung nitrat và phosphat các nồng độ khác nhau. Vì vậy, môi trường MD4 0,5 M bổ sung phân bón NPK 0,1 g/L được sử dụng cho thí nghiệm này.

Giai đoạn nuôi cấy tăng trưởng: *Picochlorum* sp. nuôi trong điều kiện môi trường MD4 0,5M bổ sung NPK 0,1 g/L có mật độ tế bào tăng qua các ngày nuôi cấy, đạt giá trị cao từ ngày từ ngày 9 đến ngày 12 và có sự khác biệt so với các ngày trước đó ($p \leq 0,05$), sau đó mật độ tế bào ổn định qua các ngày tiếp theo (Hình 3.8).

Giai đoạn nuôi cấy ức chế: Sau ức chế, mật độ tế bào *Picochlorum* sp. không đổi ở nghiệm thức đối chứng ($p = 0,325$) nhưng giảm ở các nghiệm thức MD4 0,5M, - NPK ($p \leq 0,05$), nghiệm thức MD4 1M, - NPK ($p \leq 0,05$) và nghiệm thức AS 300, -NPK ($p \leq 0,05$) (Hình 3.8). Trong điều kiện nuôi cấy bất lợi đã gây chết tế bào *Picochlorum* sp.

Mỗi vi tảo tăng trưởng tốt ở cường độ ánh sáng và nồng độ muối khác nhau. Sự tăng trưởng của vi tảo *Chlorella* sp. tăng khi cường độ ánh sáng tăng từ 2000 đến 8000 lux và giảm tăng trưởng khi cường độ ánh sáng tăng lên đến 10.000 lux. Điều này có thể là do sự quang ức chế (Cheirsilp & Torpee, 2012). Ở vi tảo *Dunaliella*, nồng độ muối trong môi trường nuôi cấy cao hơn 1,5 M gây ức chế sự tăng trưởng của tế bào (Takagi & Yoshida, 2006). Đối với *Picochlorum* sp., cường độ ánh sáng tốt cho sự tăng trưởng của vi tảo là dưới 100 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và tốc độ tăng trưởng tối ưu đạt được ở cường độ ánh sáng 50 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ (Ngan Tran, 2014,) và độ muối 0,5 M, càng tăng nồng độ muối mật độ tế bào càng giảm (Tran et al., 2014). Vì vậy, trong điều kiện cường độ ánh sáng cao 300 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ và độ muối 1 M NaCl làm giảm rõ sự tăng trưởng của vi tảo, tương ứng với sự giảm hàm lượng diệp lục tố trong quá trình nuôi cấy.

Picochlorum sp. tiếp xúc với cường độ ánh sáng cao gây ra sự sụt giảm mạnh hàm lượng violaxanthin trong khi hàm lượng zeaxanthin tăng rất cao. Ngoài ra, *Picochlorum* sp. có sự tổng hợp zeaxanthin với một hàm lượng nhỏ bởi các điều kiện ức chế khác như độ muối cao hoặc thiếu nitơ (De la Vega et al., 2011).

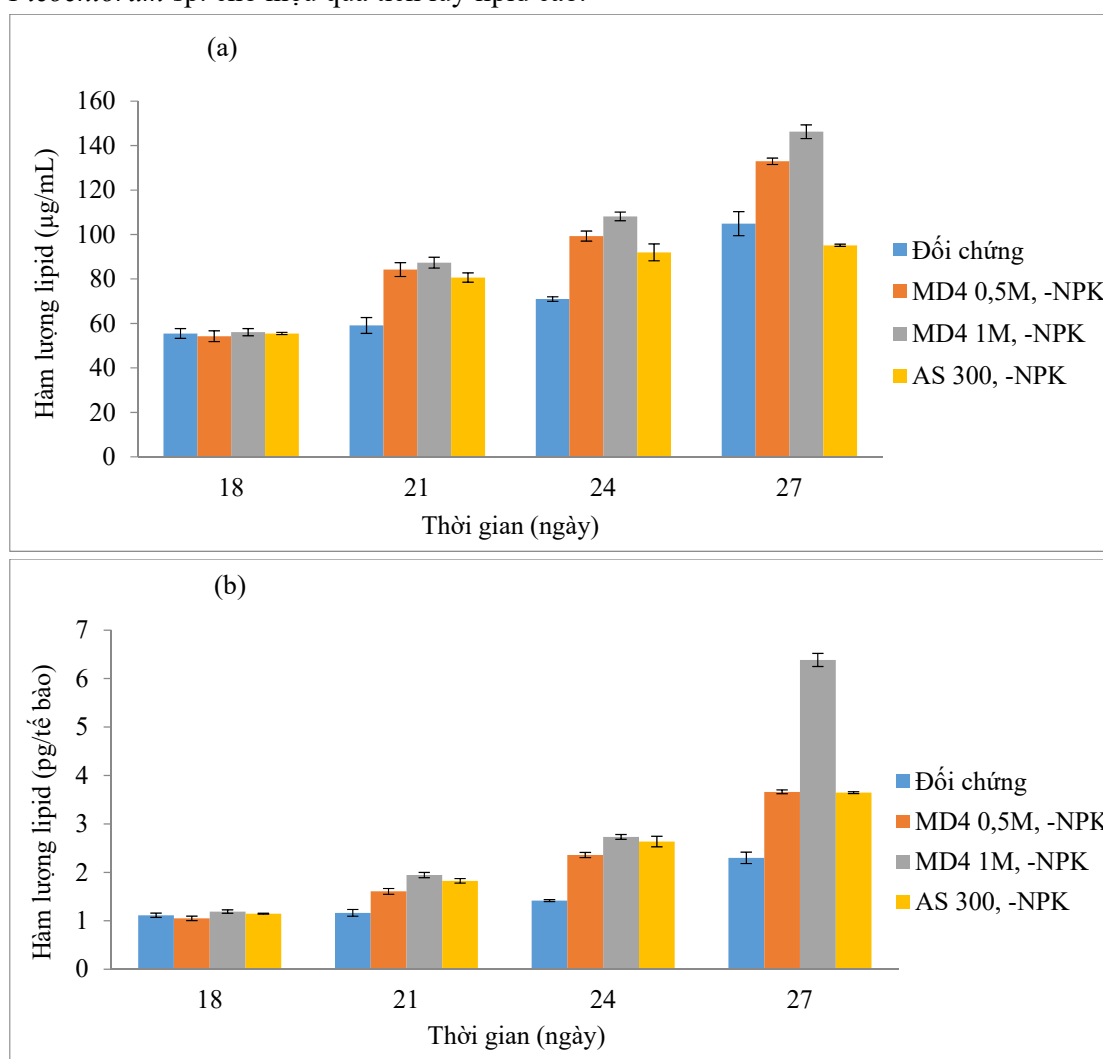


Hình 3.8. Mật độ tế bào *Picochlorum* sp. ở các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

3.3.2. Tích lũy lipid của *Picochlorum* sp.

Hàm lượng lipid trên thể tích và tế bào của *Picochlorum* sp. ở tất cả các nghiệm thức tăng dần sau ức chế ($p \leq 0,05$). Trong đó, nghiệm thức đối chứng có hàm lượng lipid trên thể tích và tế bào thấp hơn so với các nghiệm thức khác ($p \leq 0,05$). Ở ngày 27, nghiệm thức MD4 1M, -NPK có hàm lượng lipid trên thể tích và trên tế bào đạt giá trị cao hơn (146,220 $\mu\text{g/mL}$ và 6,385 pg/tế bào) so với các nghiệm thức khác ($p \leq 0,05$). (Hình 3.9).

Trong nuôi cấy vi tảo *Dunaliella* tăng độ muối từ 0,5 M lên 1,0 M dẫn đến hàm lượng lipid nội bào tăng (Takagi, & Yoshida, 2006). Vi tảo *Picochlorum* sp. tăng trưởng tốt hơn ở môi trường MD4 0,5 M, nhưng sản xuất lipid cao hơn ở môi trường có 2 M NaCl (Tran et al., 2014). Vì vậy, sự kết hợp loại NPK và tăng nồng độ muối của môi trường nuôi cấy *Picochlorum* sp. cho hiệu quả tích lũy lipid cao.



Hình 3.9. Hàm lượng lipid của *Picochlorum* sp. trên thể tích (a) và tế bào (b) trong các điều kiện nuôi cấy ức chế khác nhau

4. Kết luận

Picochlorum sp. nuôi trong môi trường MD4 bổ sung các nguồn nitơ và phosphor khác nhau có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của vi tảo *Picochlorum* sp. Môi trường MD4 bổ sung NPK 0,1-0,15 g/L kích thích tăng trưởng của *Picochlorum* sp. và hiệu quả cao hơn bổ sung NaNO_3 và $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Môi trường bổ sung các nguồn nitơ và phosphor khác nhau cũng ảnh hưởng lên sự tích lũy lipid ở *Picochlorum* sp. Ngoài ra, các điều kiện ức chế gây sự tổng hợp lipid cao, đặc biệt là ở điều kiện ức chế độ muối 1 M NaCl kết hợp loại NPK có hàm lượng lipid đạt giá trị cao hơn các điều kiện còn lại.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aunger, B. M., Pfandl, K., & Boenigk, J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2505-2510.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Carvalho, E. d., Ottonelli, F., Ansilago, M., Godoy, H., Nakagaki, J., & Ramires, I. (2012). Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochemistry and Biotechnology Report*, 1(2), 14-18.
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- Dahmen, I., Chtourou, H., Jebali, A., Daassi, D., Karray, F., Hassairi, I., Dhoub, A. (2014). Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1628-1638.
- De la Vega, M., Diaz, E., Vila, M., & Leon, R. (2011). Isolation of a new strain of *Picochlorum* sp and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, 27(6), 1535-1543.

- El-Kassas, H. Y. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* sp. grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(4), 233-239.
- El-Sheek, M., & Rady, A. (1995). Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Phyton*.
- El-Sheekh, M., Abomohra, A. E.-F., & Hanelt, D. (2013). Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 915-922.
- Gonzalez-Esquer, C. R., Twary, S. N., Hovde, B. T., & Starkenburg, S. R. (2018). Nuclear, Chloroplast, and Mitochondrial Genome Sequences of the Prospective Microalgal Biofuel Strain *Picochlorum soloecismus*. *Genome Announcements*, 6(4), e01498-01417.
- Harrison, P. J. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.*, 29, 587-595.
- Heraud, P., Wood, B. R., Tobin, M. J., Beardall, J., & McNaughton, D. (2005). Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 249(2), 219-225. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.021
- Hu, Q. (2004). *Environmental effects on cell composition*. Vol. 1): Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK.
- Kilham, s., kreeger, d., goulden, c., & lynn, s. (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*, 38(3), 591-596.
- Kim, G., Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*, 31(3), 257-266.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*, 7, 546.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource technology*, 155, 330-333.
- Ngan Tran, C. L., Duc Tran. (2014,). Cell Density and Light Intensity for *Picochlorum* sp., *Plant*. Vol. 2, No. 6., pp. 68-71. doi: 10.11648/j.plant.20140206.12
- Park, J., Jeong, H. J., Yoon, E. Y., & Moon, S. J. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*, 31(4), 391-401.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Qiang, H., Milton, S., Eric, J., Maria, G., Matthew, P., Michael, S., & Al, D. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621-639. doi:doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x

- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., . . . Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, 1(1), 20-43.
- Takagi, M., & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(3), 223-226.
- Tran, D., Doan, N., Louime, C., Giordano, M., & Portilla, S. (2014). Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 317-322.
- Tran, D., Giordano, M., Louime, C., Tran, N., Vo, T., Nguyen, D., & Hoang, T. (2014). An isolated *Picochlorum* species for aquaculture, food, and biofuel. *North American Journal of Aquaculture*, 76(4), 305-311.
- Wang, S., Lambert, W., Giang, S., Goericke, R., & Palenik, B. (2014). Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. *Journal of phycology*, 50(2), 303-309.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
- Zhu, Y., & Dunford, N. T. (2013). Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(6), 841-849.

**EFFECTS OF DIFFERENT NITROGEN AND PHOSPHORUS NUTRIENTS
AND STRESS CONDITIONS ON THE GROWTH AND LIPID ACCUMULATION
OF THE MICROALGA *PICOCHLORUM* SP.**

Vo Hong Trung*^{*}, *Nguyen Thi Hong Phuc

Department of Biochemistry and Toxicology – Nguyen Tat Thanh University, HCM City, Viet Nam

^{}Corresponding author: Vo Hong Trung – Email: vohongtrung2503@gmail.com*

Received: March 28, 2019; Revised: May 10, 2019; Accepted: May 21, 2019

ABSTRACT

Picochlorum sp. microalgae is able to accumulate large amount of lipid content in cells which are potential for biofuel production, function food and pharmaceutical applications. *Picochlorum* sp. reached the highest cell density after 6 days of culture under the nitrogen (NO_3^-) and phosphorus (H_2PO_4^-) supplemented MD4 medium. Lipid accumulation of *Picochlorum* sp. in MD4 medium supplemented with nitrogen (NO_3^-) and phosphorus (H_2PO_4^-) was lower than that of *Picochlorum* sp. in a separate medium of either nitrogen or phosphorus. The MD4 medium containing 0.1-0.15 g/L of NPK fertilizer stimulated growth of *Picochlorum* sp. Under stress conditions, the growth of *Picochlorum* sp. decreased; however, lipid content increased under the combination of 1.0 M salinity and NPK starved conditions.

Keywords: *Picochlorum*, lipid, the growth, NPK fertilizer, nitrogen, phosphorus.