

## NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP GIỮ GIỐNG TẢO *SPIRULINA MAXIMA*

TRẦN BẢO TRÂM, PHẠM HƯƠNG SON

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện ứng dụng Công nghệ

BÙI THỊ NGỌC TRINH

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

Từ khoảng những năm 1980 việc sử dụng các cấu phần vi sinh vật và tế bào thực vật làm chất xúc tác sinh học là lĩnh vực phát triển nhanh của công nghệ sinh học trên thế giới. Ban đầu các nghiên cứu tập trung vào việc cố định enzym, nhưng quá trình này có khó khăn khi tiến hành cố định phức hệ enzym. Điều này đã dẫn các nhà khoa học đến ý tưởng phát triển hệ thống cố định tế bào. Cho đến nay việc ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào đã được sử dụng để cố định vi tảo với các mục đích: Sản xuất điện năng, hydrogen, ammonia, polysaccharide và glycerol; Xử lý N, P trong nước thải với tốc độ cao; Xử lý/thu hồi kim loại nặng (Cu, Cd, Hg, Cr, Ni, Au...). Có hai phương pháp cố định vi tảo: thụ động và chủ động với nhiều loại vật liệu được sử dụng để cố định như bột polyurethane, bột polyvinyl, hạt thủy tinh, agar, alginate, agarose, carrageenan, chitosan, silicagel, cellulose...[5]. Việc lựa chọn kỹ thuật và vật liệu cố định phụ thuộc vào mục đích khai thác sản phẩm.

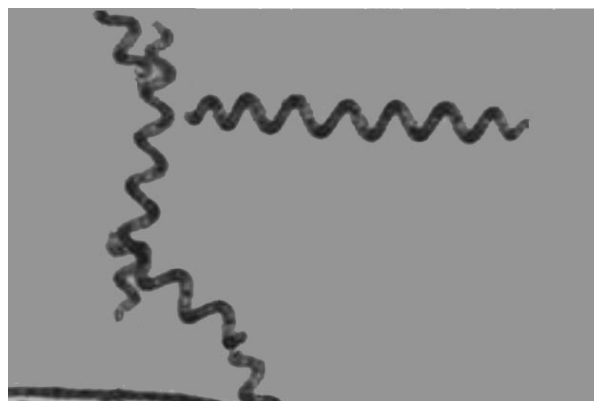
Phương pháp phổ biến được sử dụng để bảo quản giống tảo là cấy trong ống thạch, bảo quản ở nhiệt độ lạnh. Tuy nhiên phương pháp này có hạn chế là phải cấy truyền nhiều, dù tần số cấy truyền các dạng tảo đơn bào và dạng sợi không chuyển động thưa hơn so với các loài có roi [2]. Một phương pháp giữ giống khác cũng được sử dụng là trữ trong nitơ lỏng ở độ lạnh sâu [6], tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi phải có thiết bị chuyên dụng và chi phí duy trì cao. Yean Chang Chen [7, 8] đã ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào để bảo quản các loài vi tảo *Scenedesmus quadricauda*, *Isochrysis galbana* lâu dài. Hoàng Thị Kim Hoa [4] đã áp dụng thành công phương pháp cố định tế bào để bảo quản một số giống vi tảo (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*,

*Chlorella vulgaris*) nhằm mục đích ứng dụng cho các cơ sở nhân giống thủy hải sản.

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu bảo quản giống tảo *S. maxima* bằng phương pháp cố định tế bào trong dung dịch gel.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng: giống tảo *Spirulina maxima* được lấy từ tập đoàn giống tảo của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện ứng dụng Công nghệ.



Hình 1. Hình thái tảo *S. maxima*

Tảo *S. maxima* được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng Zarrouk (1996). Môi trường giữ giống trong ống thạch là MT thạch đặc Zarrouk cải tiến.

Tốc độ sinh trưởng của tảo *S. maxima* trong môi trường lỏng được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 560 nm.

Kỹ thuật bảo quản tảo dựa trên phương pháp cố định vi tảo của Yean-Chang Chen [7, 8]. Với tảo *Spirulina* nói chung, do tế bào có cấu tạo dạng sợi, vách mỏng rất dễ bị phá hủy nên khi cố định bằng cách tạo hạt (bead) gặp phải một số khó khăn, không như cố định các tảo đơn bào

khác, do vậy chúng tôi tiến hành bảo quản *S. maxima* trực tiếp trong dịch gel với các công thức nồng độ gel 2, 3, 4%.

Dải nhiệt độ thí nghiệm bảo quản giống là: 5, 10, 15 và 25 °C.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình bảo quản

Thí nghiệm được tiến hành nhằm mục đích xác định nhiệt độ thích hợp để bảo quản giống với 2 công thức: giữ trong ống thạch nghiêng (CTI) và bảo quản trong dịch gel 3% (CTII). Kết quả được trình bày trong bảng 1.

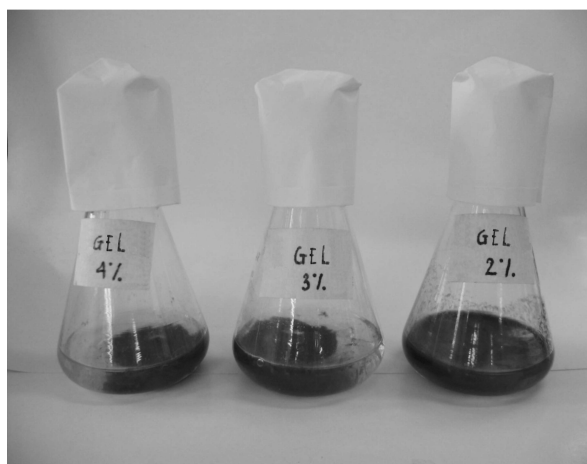
Từ kết quả thu được cho thấy nhiệt độ thấp (5°C) có tác dụng kìm hãm sinh trưởng của *S. maxima* (tảo sinh trưởng chậm hoặc hầu như không sinh trưởng). Sau 3 tháng bảo quản ở mức nhiệt độ này, ở cả 2 công thức giống tảo vẫn được giữ tốt. Tuy nhiên, với phương pháp

giữ giống trong thạch thì sau đó tảo có dấu hiệu giảm dần sinh trưởng và đến tháng thứ 6, ống giống ngả vàng hoàn toàn (tảo chết), còn ở công thức II (bảo quản trong gel) thì sau 6 tháng giống tảo vẫn duy trì tốt (xanh).

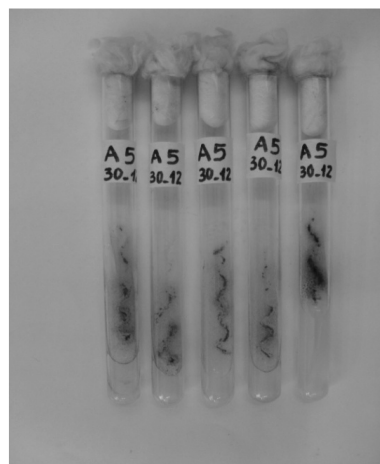
Ở mức nhiệt độ cao hơn (10,15,25 °C) với cách giữ giống trong ống thạch tảo vẫn tiếp tục phát triển (từ một vệt mỏng sinh khối tảo được cấy ban đầu sẽ phát triển thành vạch xanh sẫm dần), với mức nhiệt độ phòng (25 °C) chỉ sau 2 tháng ống giống đã ngả vàng (chết), còn ở các mức nhiệt độ thấp hơn (10,15 °C) cũng chỉ sau 3 tháng là cần phải cấy chuyển giống.

Khi *S. maxima* được bảo quản trong gel ở nhiệt độ phòng, sau 6 tháng tảo cũng bắt đầu chết (ngả vàng), còn ở dải nhiệt độ thấp hơn thì tảo vẫn xanh.

Từ kết quả này chúng tôi đã lựa chọn nhiệt độ để bảo quản giống *S. maxima* bằng cả hai phương pháp là 5°C nhằm kéo dài thời gian giữ giống và giảm tần suất cấy chuyển.



Hình 2. Tảo *S. maxima* được bảo quản trong dịch gel ở các nồng độ khác nhau



Hình 3. Giữ giống *S. maxima* trên ống thạch nghiêng

Bảng 1

Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng của *S. maxima* được bảo quản

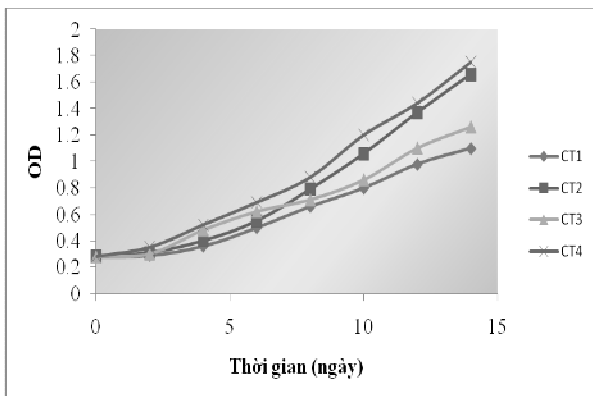
Thời gian \ Nhiệt độ	1 tháng		2 tháng		3 tháng		6 tháng	
	CTI	CTII	CTI	CTII	CTI	CTII	CTI	CTII
5°C	+	+	+	+	++	+	-	+
10°C	++	+	++	+	+	+	-	++
15°C	++	+	+++	++	-	++		+
25°C	+++	++	-	++		+++		-

Ghi chú: (+), biểu thị tốc độ tăng trưởng của tảo; (-), tảo chết.

## 2. Nghiên cứu khả năng phục hồi sinh trưởng của *S. maxima* sau 1, 3, 6 tháng bảo quản trong gel

Sau thời gian bảo quản đã tiến hành nuôi cấy tảo trở lại trong môi trường lỏng để tìm ra điều kiện thích hợp nhất cho bảo quản, với các công thức: CT1: bảo quản trong gel 4%, CT2: bảo quản trong gel 3%, CT3: bảo quản trong gel 2%, CT4: giữ trong ống thạch nghiêng.

### a. Khả năng phục hồi sinh trưởng của *S. maxima* sau 1 tháng bảo quản

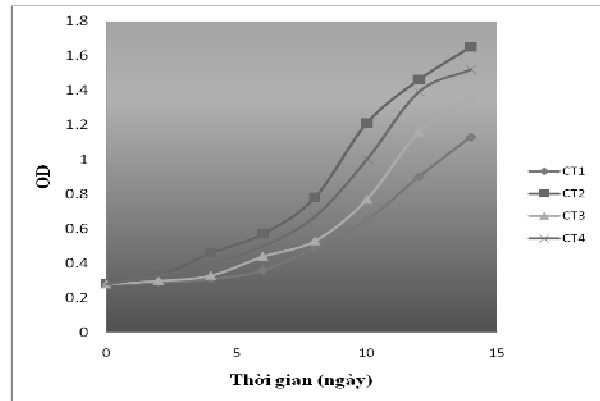


**Hình 4.** Sinh trưởng của *S. maxima* sau 1 tháng bảo quản

Kết quả nghiên cứu cho thấy *S. maxima* sau 1 tháng bảo quản trong gel ở các nồng độ khác nhau đều có thể phục hồi sinh trưởng. Sau khoảng 2 tuần nuôi cấy trong điều kiện thích hợp, tảo sẽ phát triển trở lại như bình thường. Trong đó, khả năng phục hồi sinh trưởng của tảo được giữ giống theo cách thông thường (CT4) là tốt nhất, sau đó lần lượt đến CT2 và CT3. Tại CT1, nồng độ gel 4% cho kết quả kém nhất.

Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy, quần thể tồn tại tại pha lag (pha tiềm phát) khi chuyển giống *S. maxima* ra nuôi cấy sau 4-5 ngày ở tất cả các công thức, điều này chứng tỏ *S. maxima* cần thời gian để thích nghi với môi trường nuôi cấy sau thời gian bảo quản mặc dù pha này tương đối ngắn. Như vậy, với tảo *S. maxima* sau thời gian bảo quản ngắn (1 tháng) có thể dễ dàng nhanh chóng phục hồi sinh trưởng và bước vào pha tăng trưởng (pha log). Sau 14 ngày ở tất cả các công thức bảo quản trong gel với các nồng độ gel khác nhau *S. maxima* vẫn trong giai đoạn sinh trưởng ở pha log.

### b. Khả năng phục hồi sinh trưởng của *S. maxima* sau 3 tháng bảo quản



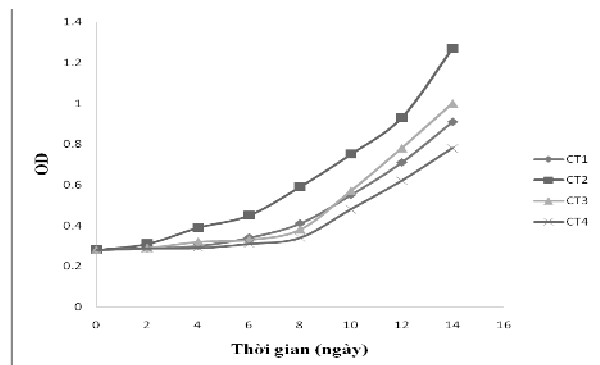
**Hình 5.** Sinh trưởng của *S. maxima* sau 3 tháng bảo quản

Từ kết quả trình bày ở hình 5 cho thấy *S. maxima* có thể phục hồi sinh trưởng sau thời gian bảo quản 3 tháng ở tất cả các công thức, ở CT2 (bảo quản trong gel 3%) tảo phục hồi sinh trưởng tốt nhất, tiếp đến là ở các nồng độ gel 2%, 4%. Trong đó, pha tiềm phát kéo dài 5-7 ngày (với cả 4 công thức), và tốc độ tăng trưởng trong pha log ở CT2 (gel 3%) là cao nhất, và sau 2 tuần các quần thể vẫn đang ở giai đoạn sinh trưởng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau 3 tháng giữ giống bằng cả 2 phương pháp bảo quản sinh trưởng của tảo vẫn đạt khả năng phục hồi tốt.

### c. Khả năng phục hồi sinh trưởng của *S. maxima* sau 6 tháng bảo quản

Sau 6 tháng bảo quản tảo *S. maxima* bằng phương pháp giữ giống trong ống thạch, tảo bắt đầu chết (sợi tảo ngả vàng), lúc này cần phải cấy chuyển tiếp giống tảo sang môi trường mới. Trong khi đó, giống được bảo quản trong gel vẫn duy trì tốt (xanh) - đây cũng chính là điểm hạn chế khi giữ giống trên môi trường ống thạch.



**Hình 6.** Sinh trưởng của *S. maxima* sau 6 tháng bảo quản

Qua kết quả thí nghiệm trên cho thấy sau 6 tháng bảo quản, khi được nuôi cấy trở lại trong điều kiện thích hợp tảo phục hồi sinh trưởng ở tất cả các công thức, tuy nhiên thời gian cần cho *S. maxima* thích nghi với môi trường nuôi cấy mới có chậm hơn (8-10 ngày). Ở CT4, tảo được giữ giống trong ống thạch *S. maxima* sinh trưởng khá chậm và sau 14 ngày hầu như không phát triển, còn ở các công thức bảo quản tảo trong gel thì sau pha lag (14 ngày), tảo tiếp tục bước vào pha tăng trưởng. Với CT2 (gel 3%) tốc độ tăng trưởng trong pha log ưu thế hơn hẳn so với 2 công thức bảo quản gel nồng độ 2% và 4%.

Các kết quả thu được cho phép nhận định rằng khi kéo dài thời gian bảo quản thì phương pháp giữ giống trong dịch gel tốt hơn so với cách giữ giống trong ống thạch, và nồng độ gel thích hợp để bảo quản *S. maxima* được lựa chọn là 3%.

### III. KẾT LUẬN

1. Tảo *S. maxima* có thể giữ giống được bằng cả hai phương pháp trong ống thạch và cố định trong dịch gel, tuy nhiên thời gian bảo quản giống trong dịch gel được lâu hơn so với giữ giống trong ống thạch.

2. Nồng độ chất tạo gel thích hợp nhất để bảo quản *S. maxima* là 3%, ở nồng độ này sau thời gian bảo quản tới 6 tháng tảo vẫn có thể phục hồi sinh trưởng tốt sau khi được nuôi cấy trở lại.

3. Việc giữ giống tảo *S. maxima* bằng kỹ thuật cố định tế bào là phương pháp đơn giản, giúp kéo dài thời gian giữ giống, giảm nguy cơ

nhễm tạp và bảo toàn được giống với chất lượng tốt.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Avigad Vonshak**, 1997: *Spirulina platensis* (Arthrospira). Taylor & Francis Publisher.
2. **Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền**, 1998: Giáo trình công nghệ sinh học vi tảo. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
3. **Đặng Xuyên Như và cs.**, 1995: Nghiên cứu công nghệ sản xuất các chế phẩm giàu dinh dưỡng và giàu hoạt tính sinh học từ nguồn vi tảo để phục vụ cho dinh dưỡng người và động vật. Báo cáo tổng kết đề tài KC-08-12, Chương trình Công nghệ Sinh học Quốc gia KC-08.
4. **Hoàng Thị Kim Hoa và cs.**, 2005: Nghiên cứu quy 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, Bộ Khoa học và Công nghệ.
5. **Mohamed Sayed Abdel Hameed, Ola Hammouda Ebrahim**, 2007: International Journal of Agriculture & Biology, 9(1): 183-192.
6. **Morris G. J.**, 1981: Cryopreservation. An introduction to cryopreservation in culture collections. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge.
7. **Yean-Chang C.**, 2001: Aquaculture, 195: 71-80.
8. **Yean-Chang C.**, 2003: Journal of Applying Phycology, 15: 439-444.

## STUDY ON PRESERVATION OF *SPIRULINA MAXIMA*

TRAN BAO TRAM, PHAM HUONG SON, BUI THI NGOC TRINH

### SUMMARY

In the 1980s of the past century, the use of immobilized enzymes or cell components for the production of a series of metabolites has become a branch of biotechnology of rapidly growing importance. Up to now, most frequent current uses of immobilize algal cells are applying for different purposes: the production of electricity, hydrogen, ammonia, polysaccharides and glycerol; culture collection handling; the removal of nitrogen and phosphorus; heavy metal removal/recovery. Immobilization techniques can be primarily divided

into two groups: ‘passive’ and ‘active’ immobilization with various matrices: polyurethane foam, polyvinyl foam, glass beads, agar, alginate, agarose, carrageenan, chitosan....

*Spirulina* has been widely used in food, pharmaceutical and cosmetic industries. The aim of our work was to find out preservation for *S. maxima*. In this report we carried out immobilizing of *S. maxima* in gel solution at 2, 3, 4% (w/v) concentrations. The growth responses of immobilized and normal agar culture of *S. maxima* were compared. The effect of temperature and time of the storage on growth of *S. maxima* was reviewed, too. The results showed that *S. maxima* can be maintained by both of immobilized and agar stock, but the recovered ability of immobilized *S. maxima* in gel was better than on agar stock after 6 months of preservation. We also found out that the preservation in concentration of 3% gel, at 5°C was the best condition for long-term storage of *S. maxima*.

The preservation of *S. maxima* by immobilization technique is quite easy method and it help contributing to the extension of term for storage, reducing contaminations and keeping the strain intact with high quality.

*Keywords: Immobilization, S. maxima, Stock culture.*

*Ngày nhận bài: 14-1-2010*