

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI TẾ BÀO Ở CÁC GIAI ĐOẠN KHÁC NHAU TRONG CHU TRÌNH SỐNG CỦA VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG *Schizochytrium mangrovei* PQ6

Đặng Diễm Hồng*, Phạm Văn Nhất, Hoàng Thị Lan Anh

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *ddhong60vn@yahoo.com

TÓM TẮT: *Schizochytrium mangrovei* PQ6 là chủng vi tảo biển dị dưỡng thu ở huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang năm 2006-2008 đã được phân lập. Đây là chủng tiềm năng được sử dụng làm thức ăn sống cho một số đối tượng thủy sản nuôi trồng; làm nguyên liệu để sản xuất thực phẩm chức năng, dầu sinh học giàu acid béo không bão hòa đa nối đôi omega-3 và omega-6 (PUFAs omega-3/6); sản xuất biodiesel; và tách chiết squalene làm dược phẩm. Tuy nhiên, nghiên cứu cơ bản về vòng đời của loài tảo này vẫn chưa được công bố cả trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Chu trình sống của loài tảo này rất phức tạp, gồm nhiều giai đoạn với các kiểu tế bào khác nhau. Bài báo này trình bày kết quả về một số đặc điểm hình thái tế bào quan sát được ở các giai đoạn khác nhau trong chu trình sống của chủng PQ6 như các dạng tế bào, kiểu và thời gian phân chia tế bào, làm cơ sở cho phân loại loài; xác định được các giai đoạn phát triển để cung cấp cơ sở khoa học cho việc xác định mức độ bội thể và kích thước hệ gen ở chủng tảo này. Trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6, sự phát triển tế bào theo 3 kiểu chính như sau: giải phóng động bào tử, phóng amip và phân chia tế bào theo kiểu sinh dưỡng. Thời gian cần thiết cho một chu kì phân chia tế bào theo các kiểu nêu trên kéo dài trong khoảng 8,5 đến 10,8 giờ tùy thuộc vào kích thước và trạng thái tế bào được chọn để quan sát ban đầu trong điều kiện thí nghiệm. Bằng chứng khoa học về sự thay đổi hình thái tế bào trong vòng đời của tảo này đã cung cấp thêm những dẫn liệu khoa học mới về đặc điểm sinh học của loài *S. mangrovei* PQ6 đã được công bố trước đây.

Từ khóa: *Schizochytrium mangrovei* PQ6, amip, chu trình sống, động bào tử, phân chia tế bào.

MỞ ĐẦU

Schizochytrium là chi vi tảo biển nhân chuẩn với đặc điểm có thallus (tân) đơn tâm, có thể gắn kết các thể nền thông qua mạng lưới ngoại chất xuất phát từ cơ quan tử gọi là sanganogenetosome [10]. Cách thức sinh sản của chi *Schizochytrium* được đặc trưng bởi sự phân đôi liên tiếp của một tế bào sinh dưỡng hình thành nên cụm tế bào; mỗi cụm tế bào sẽ phát triển thành túi động bào tử hoặc động bào tử. Động bào tử có một lông roi phía trước dài và một lông roi sau ngắn. Phương thức sinh sản bằng động bào tử có 2 roi với độ dài khác nhau được đặc trưng cho mỗi loài và được sử dụng để phân loại giữa các loài khác nhau thuộc chi *Schizochytrium* [12]. Các kết quả nghiên cứu về phân tích phát sinh chủng loại của các loài dựa trên trình tự nucleotide của gen 18S rRNA đã chỉ ra *Schizochytrium* có một mối quan hệ gần gũi với thraustochytrid. Hiện nay, thraustochytrid được xem là thành viên của ngành Heterokontophyta thuộc giới Stramenopila (Chromista).

Họ Thraustochytriaceae đã được xác nhận có bảy chi, đó là *Althornia*, *Diplophrys*, *Elina*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* và *Ulkenia* [4]. Zeller et al. (2001) [15] đã công bố thành phần lipid của các loài tảo thuộc chi *Schizochytrium* như sau: EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5 ω -3)-26,3; DHA (docosahexaenoic acid, C22:6 ω -3)-135; DPA (docosapentaenoic acid, C22:5 ω -3)-350; Cholesterol -7,8 mg/g dầu, tương ứng.

Hiện có 5 loài thuộc chi *Schizochytrium* đã được mô tả, bao gồm *S. mangrovei*, *S. aggregatum*, *S. octosporum*, *S. minutum* và *S. limacinum* [11, 6]. Trong suốt thời gian dài, sự phân loại của chi *Schizochytrium* nói riêng và lớp Labyrinthulea nói chung chỉ dựa vào duy nhất các đặc điểm hình thái và hình thức giải phóng động bào tử. Khóa phân loại chi tiết của các họ và chi thuộc lớp Labyrinthulea dựa trên các đặc điểm hình thái (hình dạng tế bào, mạng lưới ngoại chất, tế bào amip), sự hình thành động bào tử và tổng hợp sắc tố (chủ yếu là beta-caroten) đã được Yokoyama et al. (2007) [14]

đưa ra. Ngày nay, các công cụ sinh học phân tử hiện đại đã hỗ trợ đắc lực trong việc phân loại chính xác hơn các loài thuộc các chi khác nhau. Mặc dù còn là lĩnh vực khá mới, hệ gen của các sinh vật đơn bào ở biển giúp hiểu biết nhiều hơn về sinh vật nhân chuẩn [13].

Schizochytrium, chi vi tảo biển dị dưỡng được biết rất giàu lipid, đặc biệt là các acid béo như DHA, DPA (omega-3 và omega-6), cao hơn so với bất cứ một loài vi sinh vật và tảo biển khác hiện đã và đang được biết đến ở Việt Nam, đã được phân lập và nuôi trồng thành công tại phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ Sinh học [2, 7, 9].

Schizochytrium mangrovei PQ6 được phân lập ở huyện đảo Phú Quốc, Kiên Giang có chứa hàm lượng lipid và DHA cao. Chúng này có thể sử dụng các nguồn C và N thay thế như glycerol và ammonium acetate, NaNO₃, hoặc phân N-P-K. Hàm lượng lipid đạt được 38,67% khối lượng khô trong đó DHA và EPA tương ứng đạt 43,58% và 0,75% so với acid béo tổng số. Sinh khối chủng PQ6 giàu khoáng đa và vi lượng đặc biệt là Na, I và Fe [7]. Việc nuôi thu sinh khối *S. mangrovei* PQ6 ở quy mô bình lên men khác nhau cũng đã được nghiên cứu [3, 8]. Ở hệ thống bình lên men 30 và 150 lít, sinh khối chủng PQ6 có thể đạt đến 100-150 gr tươi/lít [7]. Và sinh khối chủng tảo này đã được sử dụng làm thực phẩm chức năng (viên Algal Omega-3), sản xuất diesel sinh học, dầu sinh học giàu omega-3 và omega-6 (EPA, DHA, DPA) và một số các chất có hoạt tính sinh học có giá trị khác như squalene [5, 7, 8, 9].

Có thể thấy rằng, vai trò ứng dụng của chi *Schizochytrium* nói chung và *S. mangrovei* PQ6 nói riêng rất lớn ở Việt Nam. Việc nghiên cứu giải mã hệ gen của vi tảo biển dị dưỡng thuộc chi *Schizochytrium* cũng đang được tiến hành ở Việt Nam.

Tuy nhiên, những nghiên cứu sâu hơn về di truyền học cũng như kích thước hệ gen của loài *S. mangrovei* PQ6 tiềm năng này vẫn chưa được công bố. Để có thể góp phần cho việc lắp ráp và chú giải hệ gen của chủng vi tảo biển dị dưỡng này, cần phải biết được số lượng và kiểu hình của nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, những thông số này của chủng PQ6 hiện nay vẫn đang được

nghiên cứu. Để có thể giúp cho việc xác định được dễ dàng và chính xác số lượng và kiểu hình nhiễm sắc thể cần phải hiểu rõ đặc điểm hình thái tế bào ở các giai đoạn khác nhau trong chu trình sống của tế bào tảo này. Chính vì vậy, trong bài báo này chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu bước đầu về các dạng tế bào, kiểu và thời gian phát triển của tế bào chủng PQ6 trong chu trình sống nhằm xác định được giai đoạn phát triển của tế bào giúp cho việc dễ dàng cung cấp mẫu cho làm các tiêu bản để quan sát được nhiễm sắc thể.

Các dạng tế bào, kiểu và thời gian phát triển của tế bào trong chu trình sống cũng được trình bày trong bài báo này nhằm từng bước làm sáng tỏ chu trình sống của loài *S. mangrovei* PQ6.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng *S. mangrovei* PQ6 được phân lập từ huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang vào năm 2006-2008 [9] do phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Tảo được lưu giữ trên môi trường GPY có bổ sung thêm agar 1%. Mẫu được hoạt hóa nuôi ở bình tam giác 250 mL chứa môi trường M1 có thành phần như công bố của Hong et al. (2011) [7], Hoàng Thị Lan Anh và nnk. (2008) [3] với điều kiện lắc 200 vòng/phút trong thời gian 1 đến 5 ngày ở 28-30°C. Các tế bào tảo sau khi hoạt hóa được quan sát hình thái và vòng đời tế bào dưới kính hiển vi quang học. Sau 15 giờ nuôi lắc, lấy khoảng 50 µL dịch nuôi nhỏ vào lam kính lõm để quan sát vòng đời. Lựa chọn tế bào có kích thước và trạng thái cần quan sát và hút chúng bằng micropipette sang lam kính lõm để quan sát vòng đời. Tại giếng lõm trên lam kính, chúng tôi tiến hành gắn đường viền xung quanh giếng bằng băng dính giấy (độ cao khoảng 1-2 mm) để có thể dễ dàng bổ sung được lượng dịch nuôi ở trong giếng (băng xy lạnh 1 mL) và hạn chế bay hơi môi trường bởi vì vòng đời tế bào phải được quan sát trong một khoảng thời gian dài; cứ sau 10-15 phút lại quan sát và đo kích thước tế bào dưới kính hiển vi quang học Eclipse 90i FI, Nikon (USA) với độ phóng đại 4500 lần và bằng phần mềm MapInfo professional (Version 7.5 SCP, Hoa Kỳ). Chụp ảnh tế bào bằng máy ảnh kỹ thuật số Nikon được tích hợp sẵn phần mềm NIS-Elements trên máy tính để

xử lý hình ảnh cho chất lượng cao.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Để có thể quan sát được các giai đoạn khác nhau trong chu trình sống của chủng *S. mangrovei* PQ6, chúng tôi đã xác định được một số điều kiện thí nghiệm để có thể dễ dàng bắt gặp được các dạng tế bào đặc trưng nhất xuất hiện trong vòng đời của loài này.

Ảnh hưởng của tuổi khuẩn lạc lên sự xuất hiện các dạng tế bào khác nhau của tảo *S. mangrovei* PQ6

Các dạng hình thái tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6 xuất hiện trong môi trường M1 lỏng phụ thuộc rất nhiều vào tuổi của khuẩn lạc. Sau khi được hoạt hóa trong môi trường lỏng với tuổi khuẩn lạc <9 ngày hoặc >15 ngày, tế bào chủ yếu ở dạng sinh dưỡng hình cầu, kích thước nhỏ, không xuất hiện dạng động bào tử hay tế bào dạng amíp có khả năng chuyển động.

Khuẩn lạc có thời gian cấy chuyển trong khoảng 9-15 ngày, các tế bào được hoạt hóa

trong môi trường M1 lỏng chủ yếu ở dạng động bào tử và amíp chiếm tỷ lệ 60-70%, trong khi đó, các tế bào dạng hình cầu chiếm tỷ lệ rất thấp (hình 1).

Ảnh hưởng của chế độ nuôi khuẩn lạc lên sự xuất hiện các dạng tế bào khác nhau của tảo *S. mangrovei* PQ6

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của chế độ nuôi khuẩn lạc đến sự xuất hiện các dạng tế bào khác nhau của tảo *S. mangrovei* PQ6 được trình bày ở bảng 1 cho thấy, khi mẫu được nuôi lắc liên tục trong 15 giờ, trong quần thể tảo xuất hiện cả 3 dạng tế bào: sinh dưỡng hình cầu, amíp và động bào tử. Tuy nhiên, mật độ tế bào của động bào tử và amíp chiếm tỷ lệ thấp. Khi tăng thời gian nuôi lắc liên tục trong 21 giờ, dạng amíp và động bào tử chiếm chủ yếu trong mẫu. Nhưng kéo dài thời gian nuôi lắc của mẫu lên >24 giờ hoặc từ 2-5 ngày, dạng động bào tử và amíp không xuất hiện, dạng tế bào sinh dưỡng hình cầu chiếm đến 100%, tế bào chia mũ giống mắt na và tích lũy lipid nhiều bên trong tế bào.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ nuôi khuẩn lạc lên xuất hiện các dạng tế bào khác nhau của tảo *S. mangrovei* PQ6

Chế độ nuôi	Hiện tượng
3 giờ lắc	Tế bào sinh dưỡng hình cầu, không xuất hiện động bào tử và amíp
6 giờ lắc	Tế bào sinh dưỡng hình cầu, không xuất hiện động bào tử và amíp
9 giờ lắc	Tế bào sinh dưỡng hình cầu, không xuất hiện động bào tử và amíp
15 giờ lắc	Tế bào sinh dưỡng hình cầu; xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào trung bình
3 giờ lắc + 5 giờ tĩnh	Xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào thấp
6 giờ lắc + 2 giờ tĩnh	Xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào thấp
3 giờ lắc + 21 giờ tĩnh	Xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào trung bình
6 giờ lắc + 18 giờ tĩnh	Xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào trung bình
21 giờ lắc	Xuất hiện động bào tử và amíp với mật độ tế bào cao chiếm chủ yếu trong mẫu
Nuôi lắc > 24 giờ	Động bào tử và amíp biến mất và tế bào chủ yếu ở dạng sinh dưỡng, hình cầu chiếm đến 100%
Nuôi tĩnh	Tế bào sinh dưỡng hình cầu, không xuất hiện động bào tử và amíp

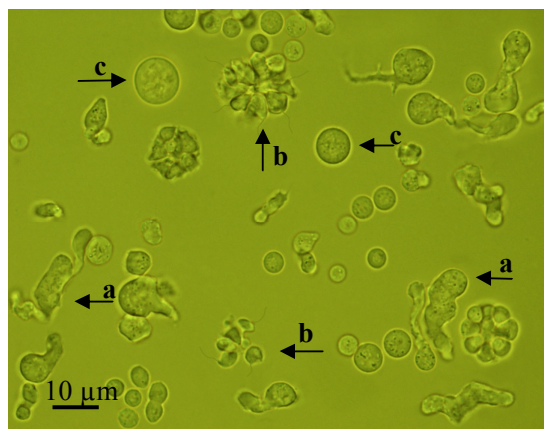
Các dạng tế bào trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6

Khi quan sát chu trình sống của chủng PQ6, chúng tôi nhận thấy có 4 dạng hình thái chính của tế bào: tế bào sinh dưỡng hình cầu, tế bào dạng amíp, động bào tử và tế bào dạng cụm

(giống như dạng palmella) (hình 2). Tế bào sinh dưỡng hình cầu (hình 2a) có kích thước tế bào dao động trong khoảng 9-25 μm , các tế bào này tích lũy lượng lớn lipid, trông giống như các mắt na. Khi điều kiện nuôi cấy thuận lợi cho sinh trưởng của tảo, dạng tế bào này chiếm chủ

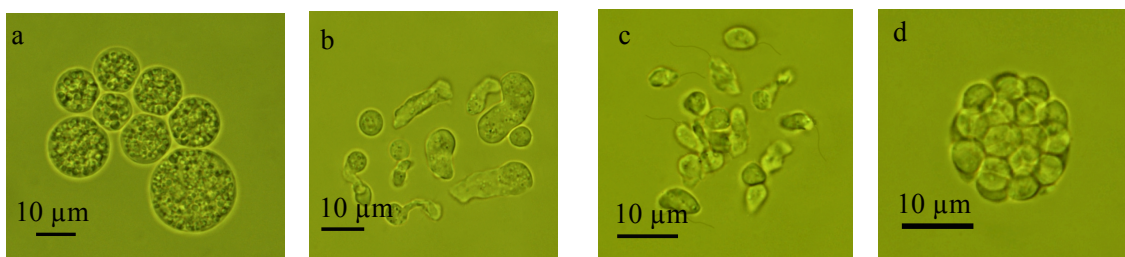
yếu trong mẫu. Tế bào dạng amip (hình 2b) không có hình dạng nhất định, có khả năng di chuyển, kích thước tế bào amip có chiều rộng 4-12 μm và chiều dài 10-48 μm ; có khả năng tự tròn lại để trở thành tế bào sinh dưỡng hình cầu. Trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi có thể quan sát thấy 4 và 8 tế bào amip giải phóng ra. Cũng giống như động bào tử, dạng tế bào amip cũng xuất hiện khi điều kiện nuôi cấy bất lợi. Dạng động bào tử (hình 2c) có hình ovan, có roi ở đỉnh, phía trước dài và phía sau ngắn hơn, có khả năng chuyển động. Các động bào tử có kích thước 3-4,5 x 5-7 μm . Dạng tế bào này chỉ xuất hiện khi tế bào gặp điều kiện nuôi cấy bất lợi cho sinh trưởng của tảo. Trong điều kiện của chúng tôi có thể quan sát thấy phóng 8, 16 và hiếm khi 32 động bào tử. Dạng cụm tế bào (hình 2d) là một dạng đặc biệt trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6. Tế bào được bao bọc bởi 1 màng, bên trong chứa các tế bào nhỏ. Các tế bào nhỏ này có thể thoát ra khỏi màng và phát sinh thành tế bào sinh dưỡng hình

cầu hoặc giải phóng động bào tử hoặc amip tùy từng điều kiện nuôi cụ thể.



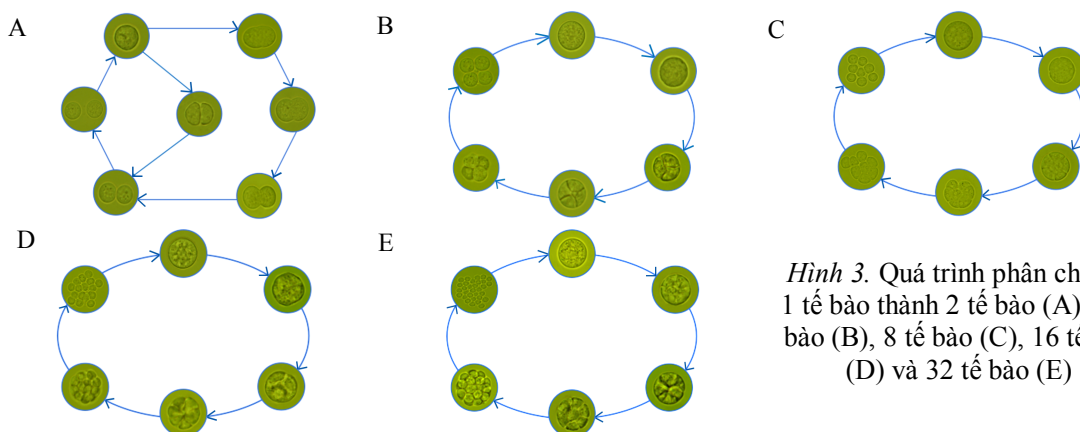
Hình 1. Các dạng tế bào xuất hiện trong môi trường M1 sau khi được hoạt hóa từ các khuẩn lạc có thời gian cấy chuyển 11 ngày

a. Amip; b. Động bào tử; c. Tế bào sinh dưỡng hình cầu

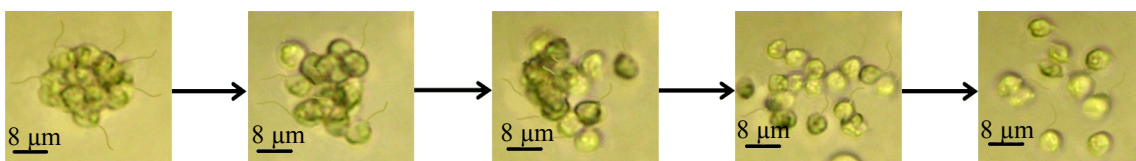


Hình 2. Các dạng tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6 xuất hiện trong chu trình sống

a. Tế bào sinh dưỡng hình cầu; b. Dạng amip; c. Động bào tử; d. Tế bào dạng cụm



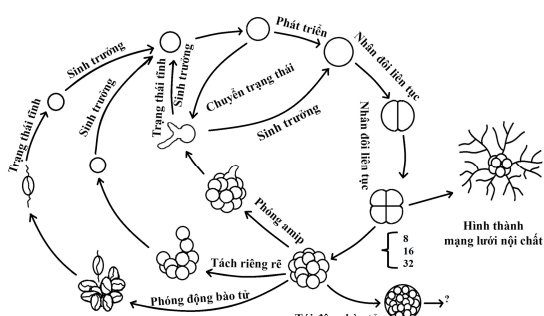
Hình 3. Quá trình phân chia từ 1 tế bào thành 2 tế bào (A), 4 tế bào (B), 8 tế bào (C), 16 tế bào (D) và 32 tế bào (E)



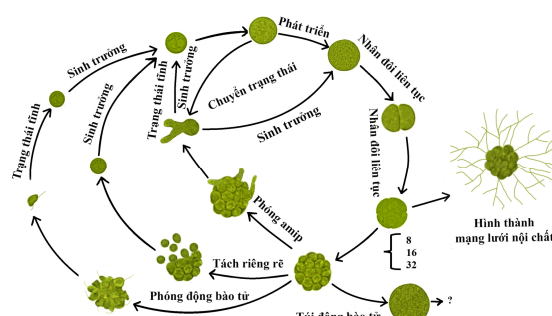
Hình 4. Ảnh minh họa giai đoạn giải phóng động bào tử ở tảo *S. mangrovei* PQ6



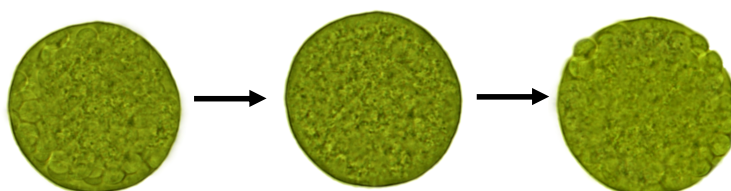
Hình 5. Ảnh minh họa giai đoạn giải phóng amip ở tảo *S. mangrovei* PQ6



Hình 6. Sơ đồ chu trình sống của tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6



Hình 7. Ảnh minh họa chu trình sống của tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6



Hình 8. Sự biến đổi nội chất bên trong tế bào và xuất hiện màng bao bọc lấy tế bào sau khi bổ sung môi trường M1 mới vào giếng lõm của lam kính

Các kiểu phân chia tế bào trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6

Các kiểu phân chia tế bào

Qua quá trình quan sát nhiều lần, chúng tôi thu nhận được các kiểu phân chia chính của tế bào *S. mangrovei* PQ6. Các kết quả được trình bày ở hình 3 đã cho thấy có một số kiểu phân chia chính tế bào trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6 như sau:

Tế bào sinh dưỡng hình cầu có khả năng phân chia nhân đôi liên tục thành 2, 4, 8, 16 và

32 tế bào (hình 3). Thời gian vòng đời tế bào phân chia theo kiểu này kéo dài trong khoảng 8 giờ 30 phút (tức 8,5 giờ) đến 10 giờ 50 phút (10,8 giờ) tùy vào kích thước và trạng thái tế bào được chọn để quan sát ban đầu. Sau khi đã có sự thích nghi với điều kiện môi trường sống, thời gian vòng đời của tế bào giảm xuống còn một nửa, khoảng 4-5 giờ.

Các tế bào dạng cụm có thể giải phóng ra các động bào tử có roi, có khả năng di động (hình 4). Thời gian giải phóng động bào tử kéo dài khoảng

10-20 phút. Số lượng động bào tử được giải phóng ra tùy thuộc vào nội tại của tế bào dạng cụm. Thông thường đều quan sát thấy >8, 16 động bào tử đã được giải phóng ra trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi.

Ngoài ra, tế bào dạng cụm cũng có thể giải phóng ra tế bào amip có hình dạng không nhất định, có khả năng chuyển động và biến đổi hình thái tế bào (hình 5). Thời gian giải phóng amip cũng giống như giải phóng động bào tử, kéo dài khoảng 10 đến 20 phút. Tuy nhiên, số lượng amip được giải phóng ra không nhiều, thường từ 4 đến 8 tế bào.

Mặt khác, tế bào cũng có thể phát triển và phân chia theo một dạng khác nữa: từ một cụm tế bào có thể trở thành một sorus (ổ túi bào tử), bên trong sản xuất và chứa nhiều động bào tử có roi hoặc dạng amip. Khi gặp điều kiện thuận lợi, chúng sẽ phân chia theo kiểu giải phóng động bào tử hoặc amip nêu trên.

Nhận dạng một số kiểu phân chia tế bào dựa vào kích thước tế bào

Tảo *S. mangrovei* PQ6 có kích thước tế bào thay đổi từ 9-25 μm tùy thuộc vào giai đoạn phát triển của chúng. Sự phân chia tế bào ở tảo *S. mangrovei* PQ6 phụ thuộc nhiều vào kích thước tế bào chọn để quan sát. Khi kích thước tế bào nhỏ (9-10 μm), khả năng phân chia nhân đôi hoặc dạng 4 tế bào là cao nhất. Nếu tế bào có kích thước trong khoảng 12-15 μm , khả năng phân chia thành dạng 8 và 16 tế bào là cao nhất. Khi tế bào có kích thước lớn hơn 15 μm và có thành tế bào dày, khả năng phân chia thành dạng 16 và 32 chiếm đa số.

Nhận dạng một số kiểu phân chia tế bào dựa vào sự phân bố không gian của tế bào

Bên cạnh việc xác định kiểu phân chia tế bào dựa vào kích thước tế bào nêu trên, sự phân chia tế bào còn có thể xác định được dựa vào sự phân bố không gian của các lớp tế bào. Khi tế bào phân chia từ 1 thành 2 tế bào, sự phân bố không gian của các lớp thường là lớp trên 2, lớp dưới 0 (2/0) hoặc 1/1 tế bào. Với cách phân chia từ 1 ra 4 tế bào, sự phân bố không gian thường là 4/0; 3/1; 2/2 tế bào. Trong khi đó, theo cách phân chia từ 1 thành 8 và 16 tế bào có các kiểu phân bố như sau: 8/0; 4/4; 5/3; 5/2/1; 4/3/1 và

16/0; 10/5/1 và 8/4/4 tế bào, tương ứng. Tuy nhiên, dạng phân chia thành 32 tế bào do số lượng tế bào con quá lớn nên chúng tôi đã gặp nhiều khó khăn trong quan sát sự sắp xếp phân bố tế bào giữa các lớp.

Các giai đoạn trong chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6

Từ các kết quả quan sát được về sự phát sinh hình thái, kiểu phân chia tế bào của chủng PQ6 ở các điều kiện khác nhau, chu trình sống của tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6 đã được sơ đồ hóa (hình 6). Ảnh chụp minh họa các giai đoạn trong chu trình sống của tế bào tảo này đã được trình bày ở hình 7.

Kết quả quan sát của chúng tôi cho thấy, tảo này có thể sinh sản theo nhiều phương thức khác nhau. Trong điều kiện thuận lợi cho phát triển, tảo này sinh trưởng bằng cách phân đôi liên tục (hình 3). Chu trình sống kiểu này diễn ra liên tục cho đến khi mật độ tế bào đạt cực đại hoặc điều kiện sống gặp bất lợi như cạn kiệt dinh dưỡng hay có một yếu tố môi trường nào đó thay đổi đột ngột.

Khi điều kiện môi trường nuôi bất lợi cho sinh trưởng của tảo, các tế bào sinh dưỡng hình cầu sẽ phát triển thành cụm tế bào, từ đó chúng giải phóng bào tử hoặc amip để thích nghi với môi trường sống (hình 4, 5). Trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi, tế bào amip hoặc động bào tử tồn tại trong môi trường nuôi một thời gian ngắn đã được quan sát rất rõ. Sau đó, động bào tử bị mất roi, tế bào amip thì chuyển dần sang dạng tế bào sinh dưỡng hình cầu. Chúng có thể phát triển tiếp theo kiểu phân chia thứ nhất (tức là tạo ra các tế bào sinh dưỡng hình cầu, tế bào này lớn lên và phân chia thành các tế bào hình cầu mới) hoặc chúng có thể tăng dần về kích thước, bên trong chứa nhiều tế bào con, bên ngoài được bao bọc bởi 1 màng (tức là tạo thành cụm tế bào). Sau đó, cụm tế bào này sẽ giải phóng bào tử hoặc phóng amip tùy từng điều kiện nuôi.

Trong thí nghiệm, do vẫn có sự bốc hơi nước trong quá trình quan sát vòng đời của tảo ở các giếng lõm của lam kính, vì vậy, chúng tôi đã phải bổ sung thêm môi trường M1 đã khử trùng vào mẫu để tránh hiện tượng mẫu bị khô. Tuy nhiên, khi bổ sung môi trường, chúng tôi đã

quan sát thấy sự xuất hiện ngay lập tức một màng bao bọc lấy tế bào. Nhưng chỉ sau khoảng 1 giờ màng bao phủ này lại bị biến mất, tế bào lại tiếp tục phân chia bình thường lại (hình 8). Đây có thể được xem là một cơ chế bảo vệ của tế bào tảo khi có sự thay đổi nào đó về môi trường nuôi.

Như vậy, trong điều kiện có bổ sung môi trường nuôi mới, thời gian chu trình sống của tảo này cần phải cộng thêm thời gian trễ khoảng 1 giờ và thời gian này mang tính tương đối tùy thuộc vào điều kiện thí nghiệm cụ thể. Trong điều kiện nuôi ít thay đổi có khuấy sục liên tục, chu trình sống của tảo này có thể giảm xuống.

Kết quả nghiên cứu thu được của chúng tôi nêu trên có nhiều nét tương đồng với công bố của Honda et al. (1998) [6] ở loài *S. limacinum* về việc xuất hiện 3 dạng tế bào trong chu trình sống của tảo, có hiện tượng giải phóng bào tử và amip.

Theo công bố của Honda et al. (1998) [6] về loài *S. limacinum* cho thấy, tảo này cũng có 3 dạng tế bào là dạng sinh dưỡng hình cầu (có đường kính 7-15 μm), dạng động bào tử hình trứng (dài 6-8,5 μm và rộng 5-7 μm , chiều dài của 2 roi không bằng nhau) và dạng amip trong vòng đời của tảo này. Bọc động bào tử có thể giải phóng ra 16-24 động bào tử; trong môi trường dinh dưỡng có bổ sung phần thông, các tế bào sinh dưỡng hình thành tế bào dạng amip, có kích thước chiều dài 12-20 μm và rộng 5-8 μm ; tế bào dạng amip cuộn tròn lại và hình thành 8 động bào tử có kích thước dài 4,5-6 μm và rộng 3,5-5 μm . Như vậy, so với loài *S. limacinum*, tế bào sinh dưỡng hình cầu và tế bào amip của loài *S. mangrovei* PQ6 có kích thước lớn hơn (9-25 μm so với 7-15 μm ; 4-12 μm rộng và 10-48 μm dài so với 12-20 μm rộng, 5-8 μm dài, tương ứng); động bào tử lại có kích thước nhỏ hơn (3-4,5 \times 5-7 μm so với 6-8,5 \times 5-7 μm); số lượng động bào tử được phóng ra là 8, 16 và 32 so với 16-24.

Theo công bố của Raghukumar (1988) [11] về đặc điểm của loài *S. mangrovei* đã cho thấy trong nước biển có bổ sung phần thông, loài *S. mangrovei* có thể giải phóng 2, 4, 8 và 12 động bào tử; động bào tử có hình elip, kích thước 4,1-4,8 $\mu\text{m} \times$ 2,6-3,3 μm ; 2 roi có chiều dài không

bằng nhau và không thấy xuất hiện amip. Trong điều kiện thí nghiệm của Hoàng Thị Lan Anh (2014) [1], tác giả đã không quan sát thấy việc giải phóng amip trong chu trình sống của loài *S. mangrovei* PQ6. Khóa định loại *S. mangrovei* đã được Raghukumar (1988) [11] đưa ra gồm bọc động bào tử phát triển và phân chia theo cách phân đôi liên tiếp để hình thành nên cụm các tế bào mà mỗi cụm tế bào này sẽ trở thành một động bào tử trong điều kiện môi trường nước biển có bổ sung phần thông.

Tuy nhiên, cũng theo công bố của Raghukumar (1988) [11], trong môi trường dinh dưỡng lỏng, sự phát triển của tế bào *S. mangrovei* có sự khác biệt so với trong nước biển có bổ sung phần thông ở 2 con đường: 1. Khi tế bào trưởng thành, tế bào hình cầu là kết quả từ các nang động bào tử có đường kính 5,0-12,0 μm , trở thành tế bào amip có hình dạng không đều do sự mất đi của thành tế bào mỏng. Ngay lập tức sau đó, chúng xoắn lại và tách ra thành 2, 4, 8, 16 hoặc 32 động bào tử. Các tế bào nhỏ tách ra duy nhất thành 2 tế bào. Các tế bào lớn đầu tiên giải phóng ra 4 tế bào có hoặc không có sự phân chia tiếp theo dẫn đến một số lượng lớn động bào tử; 2. Rất hiếm khi thành tế bào của các tản trưởng thành đã không bị mất đi. Phần chứa bên trong của các tản hình cầu phân chia thành 4, 8, 16 hoặc rất hiếm khi thành 32 tế bào. Những tế bào này không phát triển thành động bào tử nhưng khi mọc ở đúng điều kiện (môi trường đầy đủ dinh dưỡng), nó tiếp tục phát triển thành những cụm tế bào lớn.

Chi *Schizochytrium* đã được mô tả bao gồm các loài *S. mangrovei* Raghukumar (1988), *S. aggregatum* Goldstein & Belsky (1964), *S. octosporum* Raghukumar (1988), *S. minutum* Gaertner (1981) và *S. limacinum* Honda & Yokochi (1998) được phân biệt với nhau dựa trên các đặc điểm hình thành lên động bào tử; kích thước túi động bào tử và động bào tử cũng như số lượng động bào tử được giải phóng ra từ túi động bào tử. Cụ thể, loài *S. aggregatum* có khả năng phóng 32-64 động bào tử; loài *S. minutum*: 2 động bào tử đối với 1 túi động bào tử; *S. limacinum*: 16-24; *S. mangrovei*: 1 động bào tử (trong môi trường nước biển có bổ sung phần thông) hoặc 2, 4, 8, 12, 16 và 32

(trong điều kiện môi trường dinh dưỡng lỏng) [11].

Như vậy, dựa trên đặc điểm của các dạng tế bào trong chu trình sống của chủng PQ6 thu được trong nghiên cứu này đã cung cấp thêm những thông tin về đặc điểm sinh học của loài *S. mangrovei*-một loài đã được định tên khoa học chính xác bằng đọc và so sánh trình tự gen 18S rRNA đã được công bố [1].

KẾT LUẬN

Hình thái tế bào tảo *S. mangrovei* PQ6 phụ thuộc nhiều vào tuổi khuẩn lạc và chế độ nuôi cấy. Giải phóng động bào tử và amíp xuất hiện nhiều khi khuẩn lạc có thời gian từ 9-15 ngày tuổi và nuôi lắc trong 21 giờ.

Có 3 kiểu hình thái tế bào trong chu trình sống của tảo: Dạng tế bào sinh dưỡng hình cầu, dạng động bào tử có 2 roi lệch, có khả năng chuyển động và dạng tế bào amíp có hình dạng và kích thước thay đổi. Phân chia tế bào theo kiểu sinh sản sinh dưỡng là phổ biến trong cách thức sinh sản của tảo này.

Trong điều kiện thí nghiệm của chúng tôi, chu trình sống của tảo *S. mangrovei* PQ6 kéo dài trong khoảng từ 8,5 đến 10,8 giờ. Sau khi đã thích nghi với điều kiện môi trường, thì thời gian vòng đời giảm xuống còn một nửa khoảng 4-5 giờ. Thời gian giải phóng bào tử và amíp kéo dài trong khoảng 10-20 phút.

Các kết quả nghiên cứu thu được trong bài báo này đã cung cấp thêm những dẫn liệu khoa học hoàn toàn mới về đặc điểm sinh học như sự thay đổi hình thái tế bào trong chu trình sống của loài *Schizochytrium mangrovei* PQ6 được định tên khoa học dựa trên đặc điểm hình thái cũng như đọc và so sánh trình tự gen 18S rRNA đã được công bố trước đây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thị Lan Anh, 2014. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và khả năng ứng dụng của chủng vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* PQ6. Luận án Tiến sỹ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam, 143 trang.
2. Anh H. T. L., Thu N. T. H., Hong D. D., 2010. Isolation and screening of

Schizochytrium microalgae from Vietnamese coasts for polyunsaturated fatty acid production. Journal of Science and Technology in the Tropics, 6: 179-184

3. Hoàng Thị Lan Anh, Luru Thị Tâm, Nguyễn Thị Minh Thanh, Đinh Thị Ngọc Mai và Đặng Diễm Hồng, 2008. Nuôi cấy chủng *Schizochytrium* sp. PQ6 trong các hệ thống lên men khác nhau. Tạp chí Công nghệ sinh học, 6(4A): 705-711
4. Dick M. W. (ed.), 2001. Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes, including accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids, and Similar Organisms, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 276-287.
5. Hoang M. H., Ha N. C., Thom L. T., Tam L. T., Anh H. T. L., Thu N. T. H., Hong D. D., 2014. Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process. J. Biosci. Bioeng., 118(6): 632-639.
6. Honda D., Yokochi T., Nakahara T., Erata M., Higashihara T., 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustocytrid from a mangrove area in the West Pacific Ocean. Mycol. Res., 102: 439-448.
7. Hong D. D., Anh H. T. L., Thu N. T. H., 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga-*Schizochytrium mangrovei* PQ6 isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Vietnam. J. Phycol., 47(4): 944-954.
8. Hong D. D., Mai D. T. N., Thom L. T., Ha N. C., Lam B. D., Tam L. T., Anh H. T. L., Thu N.T.H., 2013. Biodiesel production from heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6. J. Biosci. Bioeng., 116(2): 180-185
9. Đặng Diễm Hồng, Hoàng Thị Lan Anh, Ngô Thị Hoài Thu, 2008. Phân lập được vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium* giàu DHA ở vùng biển huyện Đảo Phú Quốc. Tạp chí Sinh học, 30(2): 50-55.

10. Moss S. T., 1986. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales, in *Biology of marine fungi*, edited by S T Moss, (Cambridge University Press, Cambridge): 105-129.
11. Raghukumar S., 1988. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov.: a thraustochytrid from mangroves in India. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 90(4): 627-631.
12. Raghukumar S., 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and labyrinthulids). *Eur. J. Protistol.*, 38: 127-145.
13. Worden A. Z., Allen A.E., 2010. The voyage of the microbial eukaryote. *Curr. Opin. Microbiol.*, 13: 652-660.
14. Yokoyama R., Honda D., 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*, 48: 199-211.
15. Zeller S., Barclay W., Abril R., 2001. Production of docosahexaenoic acid from microalgae. In book. Omega 3 fatty acid, chemistry, nutrition and health effects, Shahidi F, Finley JW (eds), Chapter 9: 108-124.

CHARACTERISTICS OF CELL MORPHOLOGY IN DIFFERENT STAGES OF *Schizochytrium mangrovei* PQ6'S LIFE CYCLE

Dang Diem Hong, Pham Van Nhat, Hoang Thi Lan Anh

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Schizochytrium mangrovei PQ6 is a heterotrophic marine microalga, which was isolated from Phu Quoc Island, Kien Giang province, Vietnam, in 2006-2008. This is a potential strain for multiuse, such as live food for some aquaculture animals, raw material for functional food production, bio-oil rich in polyunsaturated fatty acids omega-3 and omega-6 (PUFAs omega-3/6), feedstock for biodiesel production, squalene for pharmacy application. However, basic research on the life cycle of this species has not yet been announced in all over the world as well as in Vietnam. The life cycle of this species is very complex including many stages with different cell types. In this article, we present the results of characteristics of cell morphology which were observed in different stages of PQ6 strain's life cycle, such as cell types, type and time of cell division as the basis for classifying species, determine the development stages of cells in order to provide the scientific basis for the proceeding to determine ploidy and the genome size. In the life cycle of alga *S. mangrovei* PQ6, the development was in three ways as: production of zoospores, amoeboid and cell dividing by style of vegetative cells division. The time that have required for the cycle of cell division under the above styles mentioned was about from 8.5 hours to 10.8 hours, depending on the size and cell status which were selected for the initial observations under our experimental conditions. In addition, the scientific evidences on changes in cell morphology in the life cycle of this alga has provided new additional scientific data for this microalgal species which had identified scientific name of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 based on the morphological characteristics and sequence of 18S rRNA gene reported previously.

Keywords: *Schizochytrium mangrovei* PQ6, amoeboid, cell division, life cycle of cell, zoospore.

Ngày nhận bài: 6-1-2016