

TẾ BÀO VI TẢO BẤT ĐỘNG VÀ HOẠT ĐỘNG TRAO ĐỔI CHẤT CỦA CHÚNG

TRẦN VĂN TỰA, LÊ THU THỦY
HOÀNG THỊ BẢO, ĐẶNG ĐÌNH KIM
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

I. MỞ ĐẦU

Cố định tế bào vi khuẩn, nấm men... đã được sử dụng trong công nghệ sinh học với các mục đích khác nhau. Khi tế bào sống được cố định, chúng có một số lợi thế so với tế bào dạng tự do. Nhiều công trình nghiên cứu cố định tế bào vi tảo đã được công bố nhằm vào mấy hướng sau:

- Sử dụng như là chất xúc tác sinh học để thực hiện việc biến đổi sinh học và tổng hợp mới.
- Trong việc sản xuất năng lượng (hidro và điện tích).
- Trong hệ thống cố định chung để cung cấp ôxy hoặc khử NADP cho các cấu thành dị dưỡng.
- Cho việc tích tụ các chất thải.
- Kéo dài thời gian sống của tảo. Danh sách các loại vi tảo đã được nghiên cứu cố định lên đến hàng chục loài (Mattiasson, B, 1983, Chibata et al., 1983, Bennemann et al., 1986, Robinson, P.K. et al., 1986).

Từ lâu, người ta đã nghiên cứu sử dụng vi tảo để làm sạch nước bằng biện pháp sinh học vì tảo có thể hấp thụ N, P cũng như các kim loại nặng (KLN) từ môi trường nước và làm sạch môi trường. Tuy vậy, một trong những trở ngại chính đối với vấn đề này là việc loại vi tảo ra khỏi môi trường đã được xử lý. Cố định tế bào vi tảo sống là hướng để giải quyết vấn đề này.

Chúng tôi giới thiệu trong bài báo này kết quả bước đầu nghiên cứu cố định tế bào vi tảo lên chất mang khác nhau và xác định một số thông số sinh học trên các tế bào này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu cố định là hai loài vi tảo (microalgae): *Chlorella pyrenoidosa* và *Spirulina platensis* trong tập đoàn giống của phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ Sinh học. Tảo giống được nuôi trong môi trường (MT) dinh dưỡng thích hợp (*Chlorella* trong môi trường Tamia còn *Spirulina* trong môi trường Zarrouk). Tảo thí nghiệm thu ở giai đoạn phát triển logarit. Vật liệu cố định là Polyurethan, agar và carrageenan (agar và carrageenan được tách chiết từ rong biển của Việt Nam). Kỹ thuật cố định dựa theo phương pháp đã được một số tác giả sử dụng cho vi tảo và có sự thay đổi của chúng tôi. Hàm lượng Chlorophyll xác định bằng chiết rút sắc tố trong axêton 90%. Hoạt tính quang hợp và hô hấp xác định theo sự thải và hấp thụ ôxy ở ngoài sáng và trong tối bằng điện cực ôxy. Hàm lượng NO_3^- và PO_4^{3-} trong nước xác định bằng kit chuẩn của hãng Pharmacia Biotech và đo trên máy quang phổ cùng hãng ở bước sóng 570nm và 490nm tương ứng. Hàm lượng Pb, Cr, Ni xác định theo phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử trên máy Perkin Elmer 3300 USA với ngọn lửa của hỗn hợp axêtilen và không khí.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Cố định tảo trên chất mang là polyurethane (mút xốp)

Dịch tảo được bơm chảy qua miếng mút xốp có độ dày 0,5 - 1cm đặt giữa 2 tấm kính trong suốt. Trong quá trình chảy, tế bào tảo được giữ lại trong các khoảng không bên trong tấm mút còn môi trường thì chảy ra ngoài (hình 1). Phương pháp này không chỉ cố định được các loại tảo đơn bào như *Chlorella*, *Spirulina* mà cả tảo *Scenedesmus*, *Dunaliella*. Ưu điểm của phương pháp này là giữ được trạng thái sinh lý tốt của tảo nhưng tế bào không được cố định hoàn toàn nên khi vận tốc dòng chảy lớn tảo dễ bị thoát ra ngoài.

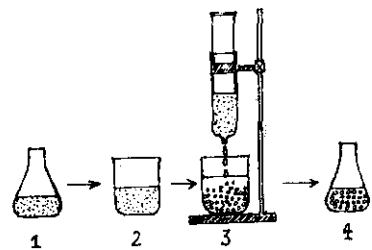
2. Cố định tế bào tảo trong chất mang là agar hoặc carageenan

Một trong các chất mang được sử dụng nhiều trong nghiên cứu cố định tế bào tảo là alginat. Tuy vậy, alginat khá đắt tiền nên không phù hợp trong điều kiện Việt Nam. Chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này hai chất mang là agar và carrageenan được sản xuất trong nước. Trước tiên, chuẩn bị môi trường Tamia chứa 1,5%

agar hoặc môi trường Zarrouk chứa 2% agar rồi để nguội đến 40°C. Tế bào tảo từ môi trường lỏng được đưa vào trong môi trường trên (môi trường Tamia đối với tảo *Chlorella*, môi trường Zarrouk đối với tảo *Spirulina*), khuấy đều, sau đó tạo viên tảo có kích thước khoảng 0,3 - 0,5 mm bằng nhỏ giọt qua xi lanh vào trong dung dịch cố định là CaCl₂ 5% đối với *Chlorella* hoặc KCl 5% đối với *Spirulina*. Giữ trong dung dịch này trong khoảng 4 giờ rồi chuyển sang môi trường dinh dưỡng bình thường (hình 2). Khi sử dụng carageenan làm chất mang thì nồng độ tăng lên 2,0 % đối với MT Tamia và 2,5% đối với MT Zarrouk.



Hình 1. Cố định tế bào vi tảo trên polyurethane



Hình 2. Sơ đồ quá trình cố định vi tảo lên chất mang agar

Chú thích hình 2: 1. Dịch tảo; 2. Khuấy đều dịch tảo trong môi trường có agar; 3. Nhỏ giọt qua xi lanh, tạo viên và cố định viên tảo; 4. Rửa và giữ viên tảo trong môi trường dinh dưỡng.

Trên thực tế, việc nhỏ giọt qua xi lanh chỉ thích hợp khi cố định tảo trong alginat vì chất keo này đông cứng chậm. Khi cố định tảo trong agar hoặc carageenan việc nhỏ giọt phải tiến hành nhanh vì các chất này đông lại khá nhanh. Để khắc phục nhược điểm này chúng tôi đã tạo các dạng cố định khác như: Viên tảo có kích thước khác nhau hoặc tạo lớp mỏng có lưới nylon bên trong làm khung bám cho tảo và chất mang (agar hay carageenan). Các bước chuẩn bị ban đầu như dịch tảo, MT với agar hay carageenan vẫn như bình thường. Sau khi đưa dịch tảo vào khuấy đều rồi trải trên kính sao cho dịch tảo có độ dày như mong muốn. Để 30 phút rồi dùng dao nhỏ cắt thành miếng (viên) có kích thước tùy ý.

3. Giải phóng tế bào khỏi chất mang

Giải phóng tế bào khỏi chất mang là bước cần thiết phục vụ cho những phân tích khác. Đối với chất mang là alginat, việc giải phóng tế bào khá dễ dàng bằng EDTA và KH₂PO₄. Để giải phóng tảo khỏi chất mang là agar hoặc carageenan trước hết cần ép viên tảo qua cái rây để có các kích thước nhỏ hơn sau đó đưa vào môi trường nước và nâng nhiệt độ lên 35 đến 40°C, đồng thời khuấy liên tục đến tan hết. Việc khuấy và nâng nhiệt độ thực hiện trên máy khuấy từ có điều nhiệt.

4. Sự thay đổi về hình thái

Một tháng sau khi cố định tảo trong agar chúng tôi quan sát sự thay đổi về hình thái và thấy rằng tế bào *Chlorella pyrenoidosa* dường như không có sự thay đổi về hình dạng và kích thước. Đường kính tế bào dạng tự do là 7,475 μm còn tế bào cố định có đường kính là 7,635 μm. Khác với *Chlorella* tảo *Spirulina platensis* sau khi cố định sợi tảo có xu hướng dần xoắn (độ dài bước xoắn tăng), giảm số vòng xoắn, đường kính sợi tảo tăng lên nhưng độ dài sợi tảo không thay đổi nhiều. Các số liệu chi tiết trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Sự thay đổi hình dạng và kích thước sợi tảo *Spirulina platensis* sau thời gian cố định trong agar

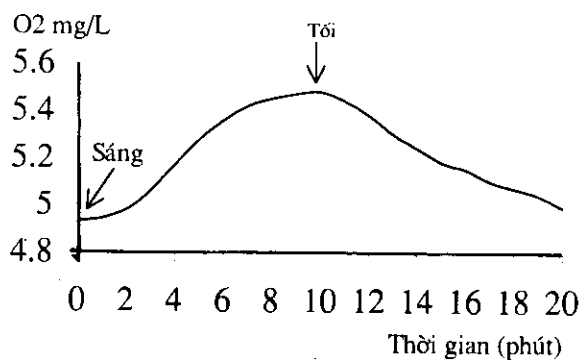
Điều kiện sống	Số vòng xoắn	Đường kính sợi (μm)	Dài sợi (μm)	Đường kính vòng xoắn (μm)	Độ dài bước xoắn (μm)
Tự do	4,45	9,43	388,24	26,56	83,63
Cố định	3,19	12,77	374,66	37,72	110,04

5. Sinh trưởng, quang hợp và hàm lượng sắc tố

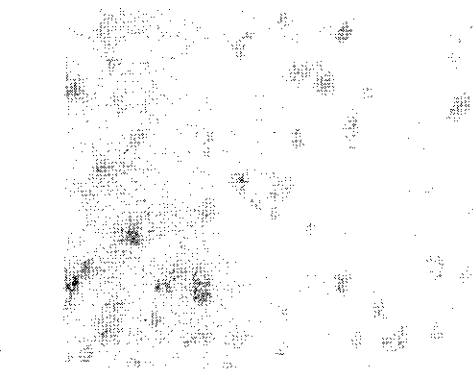
Sau khi cố định trong agar hay carageenan, tảo vẫn quang hợp và hô hấp bình thường. Hoạt động sống này còn diễn ra nhiều ngày sau khi cố định vì sau 2 tháng cố định vẫn xác định được sự trao đổi khí của tế bào. Cùng với quang hợp tế bào vẫn phân chia. Sau 1 tháng cố định từ những tế bào đơn lẻ, tảo *Chlorella* đã phát triển thành

các tập đoàn tế bào có kích thước từ 70 đến 80 μm (hình 4). Khi đo quang hợp của tảo sống trong từ môi trường không có N và P được chuyển sang môi trường đầy đủ thì quang hợp lại giảm đến 1 giờ sau tốc độ giải phóng oxy mới trở lại bình thường (số liệu không dẫn ra đây).

Cả tế bào *Chlorella* và *Spirulina* sau thời gian cố định đều tăng hàm lượng chloropyll (ở *Chlorella* từ 0,92% tăng lên 1,2% trọng lượng khô, ở *Spirulina* số liệu tương ứng là 1,23 và 1,64). Nguyên nhân có lẽ liên quan đến sự chiếu sáng giảm đi trong viên tảo.

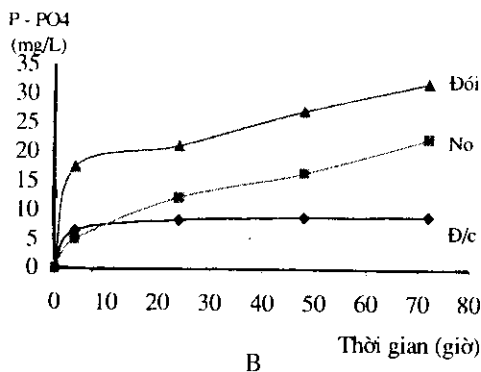
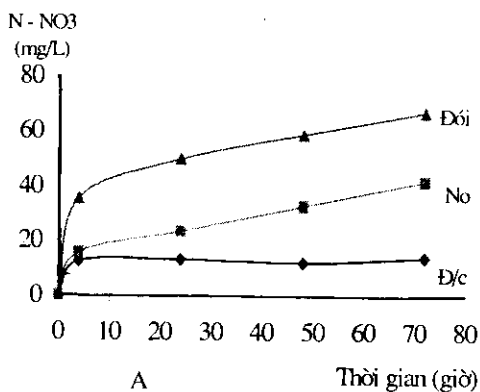


Hình 3. Quang hợp và hô hấp của tảo *Chlorella* cố định trong agar



Hình 4. Các tập đoàn tế bào *Chlorella* phát triển sau 2 tháng cố định trong agar

6. Khả năng hấp thu Nitơ và phospho từ môi trường



Hình 6. Sự hấp thu Nitơ (A) và Phospho (B) từ môi trường của tảo *Chlorella* cố định trong agar

Kết quả xác định khả năng hấp thu N và P của tế bào tảo *Chlorella* cố định (hình A, B) cho thấy tảo có thể hấp thu một lượng đáng kể N và P từ môi trường dinh dưỡng. Quá trình hấp thu phụ thuộc vào thời gian và trạng thái tảo. Trong 4 giờ đầu tảo hấp thu nhanh sau đó tốc độ chậm lại. Tế bào trước đó sống trong điều kiện đối N và P có khả năng hấp thu cao hơn tế bào bình thường. Sau 4 giờ tảo dạng đối hấp thu được khoảng 35 mg N/l và 17 mg P/l, trong khi đó tế bào tảo dạng no hấp thu được 17 mgN và 5 mg P/l. Sau 72 giờ tảo hấp thu được từ 40 đến 60 mg N/l và 20 đến 30 mg P/l. Khả năng này của các tế bào cố định có ý nghĩa cả về mặt lý luận và thực tiễn.

7. Khả năng hấp thu KLN từ môi trường của tảo

Về khả năng hấp thu KLN như crôm, niken và chì của tảo cố định hay loại bỏ các tác nhân này khỏi môi trường, kết quả (bảng 2) cho thấy xu hướng quá trình cũng giống như sự hấp thu dinh dưỡng tức là cũng phụ thuộc vào trạng thái tảo. Dạng đối dinh dưỡng có khả năng hấp thu cao hơn. Tuy vậy, nhìn chung khả năng hấp thu crôm, niken và chì của tế bào tảo *Chlorella* không cao

Bảng 2. Khả năng hấp thu KLN từ môi trường của tảo

KLN	Ban đầu	Nồng độ KLN (mg/L)					
		Đối chứng		Dạng đối		Dạng no	
		Sau 30 phút	Sau 4 giờ	Sau 30 phút	Sau 4 giờ	Sau 30 phút	Sau 4 giờ
Ni	4,60	1,22	1,39	2,79	3,20	2,20	2,16
Pb	5,30	0,82	0,87	2,48	3,55	2,10	2,59
Cr	8,26	2,12	2,26	3,92	5,62	3,17	4,08

Từ kết quả thu được trên đây chúng tôi rút ra mấy nhận xét chính như sau:

1. Đã xây dựng được phương pháp cố định tế bào vi tảo lên chất mang khác nhau như Polyurethan, agar và carageenan.
2. Sau khi cố định tế bào vi tảo vẫn có khả năng hoạt động sống bình thường trong một thời gian dài.
3. Tảo cố định có khả năng hấp thu tốt N và P từ môi trường. Khả năng hấp thu KLN như crôm, niken và chì thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Bennemann J.R. et al.*, 1986. Microalgae fuel economics. In : *Algal Biomass Tech.* Ed. Burclay M.
2. *Chibata I. Et al.*, 1983. Immobilized microbial cells. *Appl. Bioch. Bioeng.* 4:384.
3. *Costa A.C.A. et al.*, 1991. Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. *Biotech. Letters* 13(3): 261-279.
4. *Kaya V.M. et al.*, 1995. A comparative study of four systems for tertiary treatment by *Scenedesmus bicellularis*: New technology for immobilization. *Appl. Phycology* 7 : 85-95.
5. *Luvacky J.*, 1986. Metabolic activity and cell structure of immobilized algal cells. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73.2. *Algolo. Studies.* 43: 261-279.
6. *Mattiasson B.*, 1983. Immobilized cells and organelles. CRS Press. Boca Raton : 152-168
7. *Pant S.C.A. et al.*, 1992. Methyl mercury uptake by free and immobilized cyanobacterium. *Biometals* 5 : 229-234.
8. *Robinson P.K. et al.*, 1986. Immobilized algae: A review. *Process biochemistry.* August : 122-126.
9. *Travieso L.*, 1992. Sewage treatment using immobilized microalgae. *Bioresourse Tech.*, 40: 183- 187.
10. *Van Donk E. et al.*, 1992. Effects of Dursban 4E and its carrier on three algal species during exponential and P-limited growth. *Aquatic Toxicology*, 23: 181-192.

SUMMARY

IMMOBILIZED CELLS OF MICROALGAE AND IT'S METABOLIC ACTIVITIES

TRAN VAN TUA, LE THU THUY
HOANG THI BAO, DANG DINH KIM
Institute of Biotechnology, NCST

The method for immobilization of microalgal cells such as Chlorella pyrenoidosa and Spirulina platensis into agar or carageenan has been realized. The different forms such as bead, cubes, layers were formed. Morphological changes and metabolic activities as photosynthesis, N and P, heavy metals uptake of immobilized cells were examined.