

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Viện Ứng dụng Công nghệ
TRUNG TÂM SINH HỌC THỰC NGHIỆM
C6 Thanh Xuân Bắc, Hà Nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI:
NGHIÊN CỨU QUI 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

TS.HOÀNG THỊ KIM HOA

6123

25/9/2006

HÀ NỘI, 12-2005

Bản quyền 2005 thuộc TTSHTN

Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Giám đốc TTSHTN trừ trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu

THÔNG TIN VỀ ĐỀ TÀI

Tên đề tài:

“Nghiên cứu qui 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”.

1. *Chủ nhiệm* : TS. Hoàng Thị Kim Hoa
Điện thoại (CQ) : 8549438
2. *Địa chỉ cơ quan* : C6- Thanh xuân bắc - Đống đa – Hà Nội.
3. *Thời gian thực hiện* : 12 tháng (từ tháng 1/2005 đến tháng 12/ 2005)
4. *Cơ quan chủ trì thực hiện* : Trung tâm Sinh học Thực nghiệm
5. *Cơ quan chủ quản* : Viện Ứng dụng Công nghệ
6. *Tên tổ chức KH & CN*: Trung tâm Sinh học Thực nghiệm
7. *Kinh phí Tổng số* : 218.000.000 đ (Hai trăm mười tám triệu đồng)
8. *Từ ngân sách SNKH* : 218.000.000 đ (Hai trăm mười tám triệu đồng)

CÁN BỘ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

Chủ nhiệm đề tài:

TS. Hoàng Thị Kim Hoa, Trung tâm Sinh học thực nghiệm.

Các cán bộ thực hiện chính:

- CN Trần Bảo Trâm - Trung tâm Sinh học thực nghiệm
- Ths. Nguyễn Trâm Anh- Trung tâm Sinh học thực nghiệm.
- CN. Nguyễn Thanh Mai- Trung tâm Sinh học thực nghiệm.
- CN. Nguyễn Thị Huyền - Trung tâm Sinh học thực nghiệm.

MỤC TIÊU:

- Đưa ra qui trình phân lập làm sạch và bảo quản 5 giống vi tảo có giá trị dinh dưỡng cao ứng dụng trong nhân giống thủy sản là *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii*, *Nanochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*.
- Từng bước xây dựng tập đoàn giống tảo có chất lượng tốt để cung cấp cho các cơ sở sản xuất giống thủy sản.

NỘI DUNG:

- Nghiên cứu qui trình bỏ tảo lạ và động vật phù du tạo 5 giống tảo thuần (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii*, *Nanochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*).
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại kháng sinh lên sinh trưởng của tảo và vi sinh vật.
- Nghiên cứu bảo quản thử 5 giống tảo bằng kĩ thuật làm bất động.
- Đề xuất qui trình phân lập làm sạch và bảo quản giống tảo.

CHỮ VIẾT TẮT

TA – Ký hiệu kháng sinh thuộc nhóm carbohydrat

NĐKS – Nồng độ kháng sinh

TN – Thí nghiệm

D. salina – *Dunaliella salina*

N. oculata – *Nannochloropsis oculata*

T. chuii – *Tetraselmis chuii*

Ch. vulgaris – *Chlorella vulgaris*

I. galbana – *Isochrysis galbana*

EPA – Eicosapentaenoic acid

DHA – Docosahexanoic acid

LỜI MỞ ĐẦU

Trong một số công trình nghiên cứu trước đây chúng tôi đã giới thiệu về giá trị dinh dưỡng của vi tảo biển và sự cần thiết sử dụng tảo làm thức ăn cho con giống trong nuôi trồng nhân giống nhân tạo các loài hải sản. Do các loài vi tảo biển có giá trị dinh dưỡng cao, giàu các chất có hoạt tính sinh học rất phù hợp cho động vật biển giai đoạn còn non nên ở các nước có ngành nuôi trồng thủy sản phát triển, vấn đề sản xuất tảo ở các trại giống rất được chú trọng. Kinh phí đầu tư cho việc sản xuất tảo chiếm tới 50% kinh phí của trại giống.

Ở nước ta, trong những năm gần đây các loài vi tảo biển đã được nuôi trồng phục vụ nhân giống hải sản ở nhiều trại giống. Tuy nhiên việc sản xuất tảo ở các trại giống hải sản hiện nay gặp rất nhiều khó khăn do chưa có nguồn giống ổn định. Thực tế cho thấy các giống tảo sau một thời gian ngắn nuôi trồng đều bị nhiễm tạp các loài tảo lạ, vi khuẩn, nấm và động vật phù du, làm giảm năng suất và chất lượng tảo, ảnh hưởng đến quá trình sản xuất giống hải sản. Vì vậy cần có nguồn giống tốt để thường xuyên cung cấp cho sản xuất.

Việc nghiên cứu qui trình phân lập, làm sạch và bảo quản lâu dài một số giống tảo có giá trị kinh tế cao để cung cấp giống chủ động, ổn định, kịp thời cho việc sản xuất giống thủy sản tại các trại giống là hết sức cần thiết.

PHẦN I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Các loài vi tảo biển có kích thước bé, giàu dinh dưỡng, giàu các chất có hoạt tính sinh học rất phù hợp để sử dụng cho động vật biển giai đoạn còn non. Vì vậy vi tảo được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản như là nguồn thức ăn tươi sống thiết yếu của động vật thân mềm 2 mảnh vỏ (sò, điệp, ngao, vẹm, trai. . .), ấu trùng bào ngư, tôm, một số loài cá và động vật phù du sử dụng trong dây chuyền thức ăn phục vụ nuôi trồng thủy sản. Trong hơn bốn thập kỷ qua hàng trăm loài tảo đã được thử nghiệm và đã chọn được vài chục loài có khả năng nhân nuôi sinh khối ứng dụng trong thủy sản. Chúng thuộc ngành tảo lục (Chlorophycophyta), tảo khuê (Bacilariophyta) và tảo roi cụt (Haptophyta). Theo các tác giả Brown et al (1991, 1992, 1997, 1999), Renaud et al (1999), Knuckey et al (2002), các loại tảo này có kích thước nhỏ, thành tế bào mỏng, dễ tiêu hoá, giàu dinh dưỡng, hàm lượng protein, axit amin, lipít, cacbonhydrat và vitamin cao, thích hợp cho sinh trưởng của ấu trùng các động vật biển, đặc biệt các loài vi tảo này có hàm lượng axit béo rất cao, trong đó có các axit béo không no mạch dài (DHA, EPA) chiếm từ 49,7-77,9% ở tảo lục và chroomonas, từ 19,8-52,6% ở tảo diatoms và prymnesiophytes). Các axit này rất cần thiết cho sinh trưởng và phát triển của động vật biển giai đoạn ấu trùng. (inquiries@aquafauna.com). Vì vậy các trại giống rất chú trọng đến việc nuôi tảo. Kinh phí để sản xuất tảo chiếm từ 15-50% kinh phí của trại giống.

Để đảm bảo hiệu quả của quá trình sản xuất hải sản, cần có nguồn thức ăn tảo với chất lượng cao, muốn vậy nguồn giống tảo cho quá trình sản xuất sinh khối phải đạt chất lượng tốt. Thường các giống tảo sau một thời gian ngắn nuôi trồng đều bị nhiễm tạp các loài tảo lạ, vi khuẩn, nấm và động vật phù du. Để đáp ứng nguồn tảo giống cho các trại sản xuất thường xuyên phải cung cấp giống mới (sạch, tốt) từ tập đoàn giống gốc. Vì vậy, giống cần được thường xuyên phân lập và bảo quản trong điều kiện thích hợp. Ở các nước có ngành nuôi trồng thủy sản phát triển như Mỹ, Úc, Tây Ban Nha, Trung Quốc, Thái Lan, Đài Loan, Hàn Quốc, Singapore ... đều có các cơ sở cung cấp giống tảo chất lượng cao và các

dịch vụ đi kèm nhằm đảm bảo có giống tốt, cung cấp ổn định cho sản xuất. Tuy nhiên việc phân lập tảo gặp nhiều khó khăn do kích thước tế bào tảo nhỏ, sống kết hợp với vi sinh vật và các loài ký sinh khác. Vì vậy việc tách vi khuẩn khỏi tảo là rất khó. Gerloff và cộng sự (1950), Kbutko (1961) đã làm sạch tảo lam bằng cách sử dụng tia cực tím. Tuy nhiên phương pháp này có nhược điểm là có thể gây đột biến di truyền. Baccep và cộng sự (1989) đã sử dụng phương pháp cấy tảo trên thạch. Sau đó chọn khuẩn lạc mong muốn và cấy tiếp vào môi trường lỏng để tảo phát triển, tiếp tục lấy tảo từ môi trường lỏng cấy tiếp vào môi trường thạch. Quá trình được lặp lại nhiều lần cho đến khi thu được tảo sạch. Cách phân lập này hiện nay vẫn được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên với phương pháp như trên tốn rất nhiều thời gian và cũng không loại bỏ được vi khuẩn bám chặt vào lớp nhầy quanh tế bào tảo. Stein (1973) cho thấy tảo sạch cũng có thể nhận được bằng cách rửa kỹ và sử dụng một hoặc nhiều loại kháng sinh để diệt khuẩn nhưng không nêu sử dụng loại kháng sinh nào

Để nâng cao hiệu quả, rút ngắn thời gian phân lập, Alenkhina và cộng sự (2001) đã sử dụng chất diệt khuẩn Methiolat để tách vi khuẩn ra khỏi tảo lam. Kết quả cho thấy nồng độ Methiolat 2ppm có tác dụng diệt khuẩn nhưng không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của chủng tảo lam nghiên cứu. Việc nghiên cứu làm sạch khuẩn các loài vi tảo biển nói chung và các chủng tảo *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii*, *Chlorella vulgaris* còn ít được công bố.

Sau khi có được tảo sạch, vấn đề giữ giống cũng rất quan trọng. Thường tảo được giữ ở điều kiện nhiệt độ, ánh sáng thấp để hạn chế sinh trưởng. Tuy nhiên trong điều kiện này giống giữ không được lâu, dễ nhiễm, chất lượng kém. Vì vậy, vấn đề bảo quản giống trở nên bức xúc và được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Morris (1978), Fenwick và cộng sự (1992), Pedro Canavate và cộng sự (1995), Hong Quan Liu và cộng sự (2004) đã nghiên cứu bảo quản một số loài tảo bằng kỹ thuật đông lạnh, phương pháp này đòi hỏi phải áp dụng một số phương thức đặc biệt nhằm hạn chế tổn thương đối với tế bào (Moris, 1987) như dùng các chất chống đóng băng, điều khiển tốc độ làm lạnh, tốc độ làm ấm,

sử dụng các yếu tố điều hoà nhiệt độ, nồng độ muối,... Các tác giả trên cũng cho thấy: Có hai phương pháp đông lạnh là đông lạnh một bước và đông lạnh hai bước. Đông lạnh một bước là tảo sau khi ủ, cho vào cọng rạ và đưa thẳng vào nitơ lỏng (-196 ° C) (Tsuzu, 1973; Beu-Amotz và Gilboa, 1980). Đông lạnh 2 bước là đầu tiên tảo được đông lạnh trong điều kiện có kiểm soát nhằm giảm hư hại do quá trình tạo băng, sau đó đưa vào nitơ lỏng. Kết quả nghiên cứu của Pedro canavate và cộng sự (1995) cho thấy: Tùy theo phương pháp làm lạnh, nồng độ chất chống đóng băng, nồng độ muối, môi trường và đặc điểm của từng giống nên khả năng sống của tảo sau khi bảo quản rất khác nhau. Đối với *Chaetoceros glacilis*, tỉ lệ sống chỉ đạt 2,9-7,3%; *Rodomonas baltica* 2,2-3,1%; *Isochrysis galbana* từ 9,3-25,8%, *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis gaditana* và *Nannochloropsis atomus* không bị ảnh hưởng bởi quá trình làm lạnh.

Theo nhận xét của nhiều tác giả: bảo quản bằng kỹ thuật đông lạnh phức tạp, phụ thuộc nhiều yếu tố. Ngoài ra trong quá trình đông lạnh, sự hình thành băng đột ngột có thể xảy ra làm hư hại tế bào (Moris, 1987), hơn nữa việc sử dụng các hoá chất chống lạnh gây độc đối với tế bào và có thể làm ảnh hưởng đến khả năng sống của tảo. Điều này đã được mô tả đối với tảo *Chlorella* (Moris, 1976), tảo khuê (McLellan, 1989) và *Tetraselmis suecica* (Fenwick and Day, 1992). Ngoài ra, sử dụng kỹ thuật đông lạnh còn đòi hỏi một số thiết bị đặc chủng, chi phí cao, khó thực hiện. Vì vậy, công nghệ bảo quản mang tính ưu việt hơn: ít phức tạp, chi phí thấp, phù hợp cho điều kiện phòng thí nghiệm và cơ sở sản xuất đang được các nhà khoa học nghiên cứu áp dụng. Đó là bảo quản tảo bằng cách làm bất động (immobilization) (Tamponnet và cộng sự, 1985; Hertherg and Jensen, 1989; Susana Romo and Carmen Berer-Martiner, 1997; Yean-Chang-Chen, 2001, 2003). Kết quả nghiên cứu của Tamponnet và cộng sự (1985) và Hertzberg and Jensen (1989) cho thấy các giống tảo khuê được làm bất động trong gel vẫn duy trì được cấu trúc nguyên vẹn và hoạt tính sinh lí trong một số tháng, điều này gợi ý có thể sử dụng kỹ thuật này trong bảo quản giống tảo. Tuy nhiên các tác giả trên cũng lưu ý rằng trong 7 giống tảo thí nghiệm thì chỉ có 2 giống tảo *Phaeodactylum tricornutum* và *Skeletonema costatum* là cho kết quả

tốt. Tác giả Susana Romo and Carmen Perez Martinez (1997) đã thử nghiệm kỹ thuật làm bất động để bảo quản giống tảo lam *Pseudanabaena galeata* Bocher (cyanobacteria) và đánh giá khả năng sống, đặc điểm sinh lí, sinh hoá và cấu trúc của chúng sau thời gian bảo quản 14-18 tháng. Kết quả cho thấy tảo sau khi được bảo quản tỉ lệ sống đạt 93%, sinh trưởng tốt, không có sự khác biệt về cấu trúc tế bào, sinh hoá và tốc độ sinh trưởng giữa tảo thí nghiệm và tảo đối chứng. Các tác giả trên nhận xét việc xử lý đường như không có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và chức năng của tảo *Pseudanabaena galeata*, hàm lượng C, H, N và P trong tế bào tảo được bảo quản và tế bào tảo đối chứng không có sự khác biệt đáng tin cậy. Tảo sau khi bảo quản được đưa vào môi trường thích hợp để sinh trưởng.

Tác giả Yean-Chang-Chen (2001) đã nghiên cứu kỹ thuật làm bất động *Scenedesmus quadricauda* trong hạt gel để bảo quản tảo lâu dài. Tảo được cố định bằng kỹ thuật làm bất động vẫn giữ được hoạt tính sinh lí sau 3 năm bảo quản trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 4° C, không có môi trường dinh dưỡng. Sau khi cho vào môi trường thích hợp trong 4 tuần, số lượng tảo đã tăng lên 40 lần. Kết quả quan sát cho thấy sau quá trình bảo quản dài ngày, một số cơ quan tử (pyrenoids) của *Scenedesmus quadricauda* bị tiêu huỷ. Tuy nhiên cơ quan tử này sẽ phục hồi khi đưa vào điều kiện nuôi thích hợp về dinh dưỡng và ánh sáng. Kết quả nghiên cứu của Yean – Chang - Chen (2003) đối với tảo *Haptophyta*; Laz E. de Bashan và công sự (2002) đối với tảo *Chlorella* và *Azospirillum* cho thấy giống tảo sau khi bảo quản bằng phương pháp làm bất động có độ nảy mầm cao, sinh trưởng tốt và đặc biệt là chi phí bảo quản thấp. Giống có thể bảo quản được 1 – 3 năm vẫn đảm bảo chất lượng tốt. Qua những kết quả thu được, các tác giả trên nhận xét có thể sử dụng kỹ thuật làm bất động để bảo quản tảo lâu dài trong phòng thí nghiệm và ứng dụng vào thực tế sản xuất nuôi trồng thủy sản nhằm giảm chi phí sản xuất so với các phương pháp truyền thống.

Ở nước ta trong những năm gần đây, tảo đã được sử dụng làm thức ăn tươi sống phục vụ nhân giống hải sản (tôm, cá, bào ngư, ngao, sò, động vật hai

mảnh vỏ...). Hiện nay nhu cầu về tảo trong các trại giống rất lớn. Nhưng để sản xuất tảo mang lại hiệu quả như mong muốn, vấn đề giống là khâu đặc biệt quan trọng. Các cơ sở nhân giống thuỷ sản lớn như: Trại nhân giống thuỷ sản nước mặn tại Cát Bà, trại nghiên cứu nhân giống thuỷ sản nước lợ Quý Kim Đồ Sơn Hải Phòng, một số cơ sở nuôi trồng thuỷ sản ở Miền Trung (Nha Trang, Khánh Hoà, Cửu Hội, Nghệ An) đều có bộ phận nhân nuôi tảo phục vụ ương nuôi con giống. Tuy nhiên giống tảo sử dụng tại các trại giống hiện nay chủ yếu là nhập từ nước ngoài, trong quá trình sử dụng giống thường bị nhiễm dẫn đến giảm chất lượng. Các cơ sở này ít có điều kiện phân lập làm sạch. Vì vậy vấn đề sản xuất tảo nhân nuôi con giống gặp nhiều khó khăn. Ngoài ra, việc giữ giống thường được thực hiện bằng cách nuôi tảo trong môi trường lỏng, trong tủ mát với nhiệt độ 15-17°C. Trong điều kiện này tảo phát triển nhanh và dễ bị nhiễm tạp tảo lạ và vi khuẩn. Hiện nay công nghệ bảo quản bằng kỹ thuật làm bất động ở Việt Nam chưa được nghiên cứu áp dụng. Vì vậy việc nghiên cứu quy trình làm sạch tảo (bao gồm phân lập, loại bỏ tạp tảo, động vật phù du và làm sạch khuẩn tiến tới xây dựng tập đoàn giống có chất lượng tốt và nghiên cứu kỹ thuật nhằm bảo quản lâu dài các giống tảo nhằm chủ động phục vụ sản xuất là hết sức cần thiết. Với mục đích trên chúng tôi đề xuất đề tài ***“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 thuỷ sản”***.