



## ẢNH HƯỞNG CỦA SẮT ĐẾN SỰ TĂNG TRƯỞNG, TÍCH LŨY CAROTENOID VÀ HẤP THỤ DINH DƯỠNG CỦA TẢO LỤC (*Mesotaenium* sp. và *Dunaliella parva*)

### EFFECTS OF IRON ON GROWTH, CAROTENOID ACCUMULATION AND NUTRIENT UPTAKE IN *Mesotaenium* sp. AND *Dunaliella parva*

Trần Thị Linh Nhâm\*

Trường Đại học Bạc Liêu

\* ttlnham@blu.edu.vn

Ngày nhận bài:

12/3/2025

Ngày chấp nhận đăng:

20/6/2025

#### ABSTRACT

*The effect of iron on *Dunaliella parva* and *Mesotaenium* sp. on growth and carotenoid accumulation was studied under different culture conditions: with iron, without iron and shocked by adding high iron concentration (20 times higher than the iron concentration in F2 medium). Higher growth and carotenoid content were recorded in iron-containing culture medium than in iron-free culture medium for both *Dunaliella parva* and *Mesotaenium* sp. The astaxanthin,  $\beta$ -carotene and Lutein+ Zeaxanthin carotenoid contents of *Mesotaenium* sp. in iron-supplemented medium were higher than in iron-free medium with maximum values of 0.41, 1.13 and 0.31 mg/g dry weight, respectively. An increase in the content of astaxanthin,  $\beta$ -carotene and Lutein+ Zeaxanthin carotenoids in *Dunaliella parva* in culture with iron was also observed, with maximum values of 1.82, 5.72 and 2.77 mg/g dry weight and higher than those in culture medium without iron. In addition, different nutrient uptake (nitrate and phosphate) was observed in both species, with differences under the two environmental conditions mentioned above. The amount of nitrite released by both species was also noted to decrease when cultured in medium supplemented with iron compared to medium without iron.*

#### Keywords:

Carotenoid;

*Dunaliella parva*;

*Mesotaenium* sp.;

iron; nutrient uptake.

#### TÓM TẮT

*Ảnh hưởng của sắt lên *Dunaliella parva* và *Mesotaenium* sp. đến sự tăng trưởng và sự tích lũy carotenoid đã được nghiên cứu ở các điều kiện nuôi cấy bao gồm: có sắt, không có sắt và bị sốc bằng cách bổ sung nồng độ sắt cao (gấp 20 lần so với nồng độ sắt trong môi trường F2). Mức tăng trưởng và hàm lượng carotenoid được ghi nhận cao hơn trong môi trường nuôi cấy có sắt so với môi trường nuôi cấy không có sắt ở cả hai loài tảo *Dunaliella parva* và *Mesotaenium* sp. Hàm lượng astaxanthin,  $\beta$ -carotene và Lutein + Zeaxanthin carotenoid của tảo *Mesotaenium* sp. trong môi trường có bổ sung sắt cao hơn so với môi trường không có sắt với giá trị tối đa lần lượt là 0,41; 1,13 và 0,31 mg/g trọng lượng khô. Sự gia tăng hàm lượng astaxanthin,  $\beta$ -carotene và Lutein+ Zeaxanthin carotenoid trong *Dunaliella parva* nuôi cấy với sắt cũng được quan sát thấy với giá trị tối đa với 1,82, 5,72 và 2,77 mg/g trọng lượng khô*

**Từ khóa:** Carotenoid, *Dunaliella parva*, *Mesotaenium sp.*, sắt, hấp thụ dinh dưỡng.

và cao hơn so với môi trường nuôi cấy không có sắt. Ngoài ra, sự hấp thụ chất dinh dưỡng khác nhau (Nitrate và phosphate) đã được quan sát thấy ở cả hai loài có sự khác biệt với 2 điều kiện môi trường nói trên. Lượng nitrit giải phóng của cả hai loài cũng được ghi nhận giảm khi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung sắt so với môi trường không bổ sung sắt.

## 1. Giới thiệu

Carotenoid là các sắc tố polyene isoprenoid màu vàng đến đỏ, được tạo ra từ chuỗi polyene 40 carbon và xuất hiện tự nhiên trong lục lạp hoặc sắc lạp của tất cả các sinh vật quang hợp. Carotenoid cũng có thể được tổng hợp bởi các sinh vật không quang hợp như nấm và vi khuẩn. Động vật không tự tổng hợp được carotenoid mà phải hấp thụ qua chế độ ăn uống. Hiện nay, các nhà khoa học đã tìm ra được hơn 1.000 loại carotenoid khác nhau (Grainger và cộng sự, 2022). Carotenoid hấp thụ năng lượng ánh sáng để sử dụng trong quá trình quang hợp và bảo vệ diệp lục khỏi tổn thương do ánh sáng thông qua các đặc tính chống oxy hóa mạnh mẽ và khả năng loại bỏ gốc tự do (Maoka, 2020). Điều thú vị là carotenoid đã được chứng minh là có một số lợi ích cho sức khỏe con người như ngăn ngừa một số bệnh ung thư (Nishino và cộng sự, 2002) bệnh tim mạch, bệnh tim và thoái hóa điểm vàng do tuổi tác (Kristenson và cộng sự, 1997). Cụ thể hơn,  $\beta$  carotene, astaxanthin, canthaxanthin và zeaxanthin đã được chứng minh là thúc đẩy giảm kích thước và số lượng các khối u gan trong cơ thể sống (Nishino và cộng sự, 2002). Lutein và zeaxanthin được báo cáo là duy trì chức năng thị giác bình thường và bảo vệ điểm vàng của mắt người khỏi tổn thương quang hóa (Ma & Lin, 2010). Hầu hết các carotenoid cũng cung cấp phản ứng quang học của da chống lại tia UV (Wertz và cộng sự, 2005). Ngoài các lợi ích cho sức khỏe, các ứng dụng của carotenoid bao gồm phẩm màu thực phẩm và chất tăng cường màu trong thực phẩm tự nhiên bao gồm lòng đỏ trứng, thịt gà và cá, đặc biệt là cá hồi (Pulz & Gross, 2004). Do nhiều ứng dụng của chúng nên nhu cầu về carotenoid ngày càng tăng kéo theo việc sản xuất carotenoid bằng công nghệ tổng hợp hóa học và tổng hợp sinh học. Tuy nhiên, hầu hết các carotenoid tổng hợp hóa học là hỗn hợp đồng phân lập thể không thường thấy trong tự nhiên. Do đó, chúng có thể không sở hữu cùng các đặc tính như các đồng phân carotenoid có trong tự nhiên và có thể không được người tiêu dùng mong muốn hoặc có thể có các tác dụng phụ

không mong muốn thậm chí gây ra vấn đề nghiêm trọng về sức khỏe (Sundararajan & Ramasamy, 2024). Vì lý do này, việc sản xuất carotenoid bằng công nghệ tổng hợp sinh học đã trở thành trọng tâm của nghiên cứu sâu rộng, đặc biệt là nuôi cấy siêu nhỏ. Ngoài việc là nguồn carotenoid, nuôi vi tảo còn có nhiều lợi ích khác bao gồm cô lập CO<sub>2</sub>, xử lý nước thải và sản xuất sinh khối có thể được sử dụng để sản xuất các sản phẩm có giá trị gia tăng như nhiên liệu sinh học, thức ăn chăn nuôi và phân bón (Siddiki và cộng sự, 2022).

Để đảm bảo sản xuất carotenoid quy mô lớn bằng sản xuất sinh khối vi tảo là khả thi về mặt kinh tế, bền vững với môi trường và khả thi về mặt kỹ thuật, cần có nhiều nghiên cứu để xác định và tối ưu hóa một số thông số canh tác. Bao gồm: 1) xác định và lựa chọn các loài tảo tiềm năng từ các địa điểm canh tác đã chọn và 2) phát triển sản phẩm dựa trên năng suất sinh khối và hàm lượng sắc tố. Sự phát triển của vi tảo chịu ảnh hưởng của ánh sáng, nhiệt độ, chất dinh dưỡng (chủ yếu là N, P) và một số nguyên tố vi lượng và cộng sự, 2006; Naito và cộng sự, 2005). Ngoài ra, quá trình hấp thụ cacbon, nitơ và phốt pho có liên quan chặt chẽ đến sự sẵn có của các nguyên tố vi lượng cụ thể/riêng biệt. Trong số này, sắt là một trong những nguyên tố thiết yếu nhất mà vi tảo cần vì nó rất cần thiết cho các enzym trong quá trình đồng hóa nitrat và nitrit, các quá trình khử oxy sunfat, cố định nitơ, tổng hợp diệp lục cũng như một số phản ứng tổng hợp sinh học và phân hủy khác (Liu và cộng sự, 2005). Thiếu sắt có thể dẫn đến ức chế sự phát triển của vi tảo ngay cả trong môi trường nuôi có hàm lượng dinh dưỡng cao (Chen và cộng sự, 2022). Việc bổ sung sắt đã được đề xuất để kích thích sản xuất carotenoid trong vi tảo (Mojaat và cộng sự, 2008).

Tảo *Dunaliella parva* được tìm thấy trong tự nhiên ở môi trường nước mặn và là loài vi tảo chiếm ưu thế trong môi trường siêu mặn và giàu carotenoid (Zou và cộng sự, 2023). Tác động của điều kiện môi trường (ánh sáng, chất dinh dưỡng) đến sự phát triển của *D. parva* đã được báo cáo rộng rãi (Oren và cộng sự, 1995). Hiện nay, có

nghiên cứu về việc tăng hàm lượng carotenoid tăng đáng kể khi nuôi tảo *Dunaliella parva* trong môi trường bổ sung polyethylene glycol (PEG) và  $\text{CaCl}_2$  (Zou và cộng sự, 2023). Trong khi tác động của sắt đến sự phát triển, tiêu thụ chất dinh dưỡng và sản xuất carotenoid chưa được báo cáo.

Tảo *Mesotaenium* sp. là loài vi tảo nước ngọt (Mikhailyuk, 2008). Mặc dù một số nghiên cứu đã điều tra tác động của chất dinh dưỡng, ánh sáng và hóa chất đến sự phát triển, tiêu thụ chất dinh dưỡng và sản xuất carotenoid của *Mesotaenium* sp. (Malec và cộng sự, 1996; Thatcher và cộng sự, 1993), nhưng không có báo cáo nào về tác động của sắt đến sự phát triển, hấp thụ chất dinh dưỡng, hàm lượng diệp lục a, b và carotenoid đối với loài này. Mục đích của nghiên cứu này là xác định tác động của việc có hoặc không có sắt đến sự phát triển, hấp thụ chất dinh dưỡng (nitrat và phosphate) và sản xuất carotenoid trong các môi trường nuôi *Mesotaenium* sp. và *D. parva*. Tác động của việc bổ sung sắt (tức là thêm dung dịch sắt nồng độ cao) trước khi thu hoạch đối với sản xuất carotenoid cũng đã được nghiên cứu.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng Thí nghiệm Đại học James Cook, Úc.

Thời gian bố trí thí nghiệm: 30 ngày (04/12/2012 - 4/1/2013)

### 2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Tảo *Dunaliella parva* và *Mesotaenium* sp. được nuôi cấy ở nhiệt độ 24 °C với chu kỳ chiếu sáng 12 giờ sáng và 12 giờ tối, cường độ ánh sáng



Hình 1. Bố trí thí nghiệm

42  $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$  và được sục khí riêng lẻ mỗi bình qua bộ lọc có kích thước 0,45  $\mu\text{m}$ .

Nuôi cấy tảo ở bình thủy tinh với thể tích 2L trong môi trường F2 cải tiến (Hình 1). Môi trường nuôi cấy F2 cải tiến (Guillard, 1975) được chuẩn bị ở 2 nghiệm thức khác nhau: có sắt (7,18  $\mu\text{M FeCl}_3$ ) và không sắt (0  $\mu\text{M FeCl}_3$ ). Đối với tảo *Dunaliella parva* được nuôi với môi trường F2 pha trong nước biển đã lọc và tảo *Mesotaenium* sp. được nuôi trong môi trường F2 pha trong nước cất. Tất cả các nguyên liệu đều được khử trùng và được nuôi trong điều kiện vô trùng và mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. *D. parva* và *Mesotaenium* sp. được nuôi ở mật độ lần lượt là  $6 \times 10^4$  tế bào/mL và  $9,5 \times 10^5$  tế bào/mL.

Dung dịch sắt đậm đặc từ dung dịch gốc được thêm vào ngày 25 trong tất cả các môi trường nuôi cấy ngoại trừ môi trường nuôi cấy *Mesotaenium* sp. (có Sắt) vào ngày 24 để đạt nồng độ (143,6  $\mu\text{M FeCl}_3$ ) trong dung dịch.

Để tránh cạn kiệt hoàn toàn chất dinh dưỡng, phosphate được bổ sung vào môi trường nuôi vào các ngày 4, 7, 8 và 20. Riêng vào ngày 8 nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) được bổ sung cùng phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) và nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) được cung cấp trong tất cả các môi trường nuôi cấy.

### 2.3 Phương pháp gián tiếp để xác định sự phát triển của tảo

Các đường cong hiệu chuẩn được thiết lập bằng cách loạt pha loãng ba lần môi trường nuôi cấy *D. parva* và *Mesotaenium* sp. Tiến hành đếm tế bào trên ml, xác định trọng lượng khô (DW) [g/L] và đo độ đục (% truyền qua [%TA, mật độ quang] ở 750nm [OD750, Spectramax Plus; Thiết bị phân tử]) để tạo ra phương trình tuyến tính ( $R^2 > 0,95$ ) nhằm để xác định số lượng tế bào và trọng lượng khô tương ứng từ các phép đo độ đục đối với các mẫu nuôi cấy *D. parva* và *Mesotaenium* sp..

### 2.4 Tăng trưởng của tảo

Tăng trưởng của *D. parva* và *Mesotaenium* sp. được xác định hàng ngày qua độ đục từ ba mẫu 250  $\mu\text{l}$  cho mỗi lần nuôi cấy trong 25 ngày.

- Tốc độ tăng trưởng cụ thể do Levasseur et al. (1993) mô tả:

$$\mu = \frac{\ln \left( \frac{C_2}{C_1} \right)}{t_2 - t_1} \quad (\text{phương trình 1})$$

- Năng suất sinh khối thể tích được sửa đổi từ Su et al. (2011):

$$g\ DW/L/ngày = \frac{(DW_2 - DW_1)}{t_2 - t_1} \text{ (phương trình 2)}$$

- Năng suất sinh khối diện tích:

$$[g\ DW/m^2/ngày] = \left( \frac{2(DW_2 - DW_1)}{t_2 - t_1} \right) / SA \text{ (phương trình 3)}$$

Trong đó:

$C_2$  và  $C_1$ : số lượng tế bào ban đầu và cuối cùng (tế bào/mL)

$t_1$  và  $t_2$ : thời điểm nuôi cấy ban đầu và cuối cùng (ngày) trên mỗi giai đoạn tăng trưởng đã xác định

$DW_1$  và  $DW_2$ : trọng lượng khô ban đầu và cuối cùng (g/L),

SAbase = diện tích bề mặt đáy của bình nuôi cấy (0,0127m<sup>2</sup>)

## 2.5 Phân tích chất dinh dưỡng trong nước

Nồng độ nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) và phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) trong môi trường được xác định 2 ngày một lần bằng máy phân tích tự động Sysytem EasyChem (Analytical solution Australia (ASA)).

## 2.6 Phân tích carotenoid

Mẫu sinh khối tảo để phân tích carotenoid được lấy vào các thời điểm như sau: Trước khi cấy (thu trong môi trường gốc), ngày 25 trước

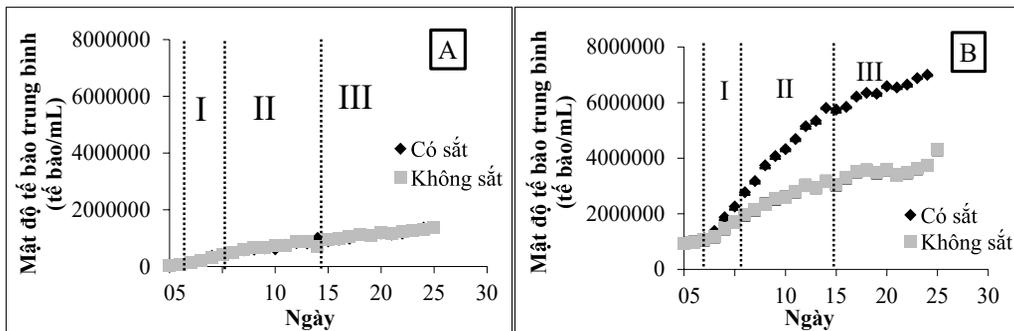
khi bổ sung sắt ở tất cả các nghiệm thức nuôi cấy ngoại trừ nghiệm thức nuôi cấy *Mesotaenium* sp. (có Sắt) vào ngày 24) và 3 ngày sau bổ sung sắt ở nồng độ cao. 200 mL tảo từ các nghiệm thức được ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút trong 20 phút ở 20°C, sau đó toàn bộ chất lỏng trên cùng được loại bỏ và chuyển vào ống eppendorf 1,5 ml. Tiếp đến, ống eppendorf 1,5 ml được ly tâm ở tốc độ 14.500 vòng/phút trong 5 phút, sau đó toàn bộ chất lỏng trên cùng được loại bỏ và đông khô trước khi chiết xuất để phân tích HPLC.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1 Sự phát triển của tảo trong nuôi cấy

Sự phát triển của *D. parva* và *Mesotaenium* sp. được chia thành 3 giai đoạn (từ ngày 2-5, 6-15 và 16-25) (Hình 2) trong đó tốc độ tăng trưởng cụ thể và năng suất sinh khối được xác định.

Sắt không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và sản xuất sinh khối của *D. parva* (Bảng 1, Hình 2 và 2 A) nhưng có ảnh hưởng đáng kể đến sự tăng trưởng và sản xuất sinh khối của *Mesotaenium* sp. (Bảng 1 và Hình 2 và 2 B). Các môi trường nuôi cấy *Mesotaenium* sp. không có sắt phát triển chậm hơn so với các nuôi cấy có sắt nói riêng kể từ ngày 5 (Bảng 1 và Hình 2 B). Tốc độ tăng trưởng giảm dần theo thời gian nuôi cấy ở cả hai loài.



Hình 2. Mật độ tế bào trung bình [tế bào/mL] *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) có và không có thêm sắt. N=3

Ở *D. parva*, năng suất sinh khối cao nhất được quan sát thấy ở cả hai phương pháp xử lý trong giai đoạn I (0,026 -0,027 [g DW/L/ngày]) (Bảng 1) sau đó giảm dần theo thời gian nuôi cấy (Bảng 1). Ngược lại, năng suất sinh khối của *Mesotaenium* sp. có sắt cao nhất trong giai đoạn II (0,20 [g DW/L/ngày]), trong khi năng suất sinh khối của *Mesotaenium* sp. cao nhất ở giai đoạn III không có sắt trong nuôi cấy (0,06 g DW/L/ngày). Có sự khác biệt về năng suất sinh khối giữa các

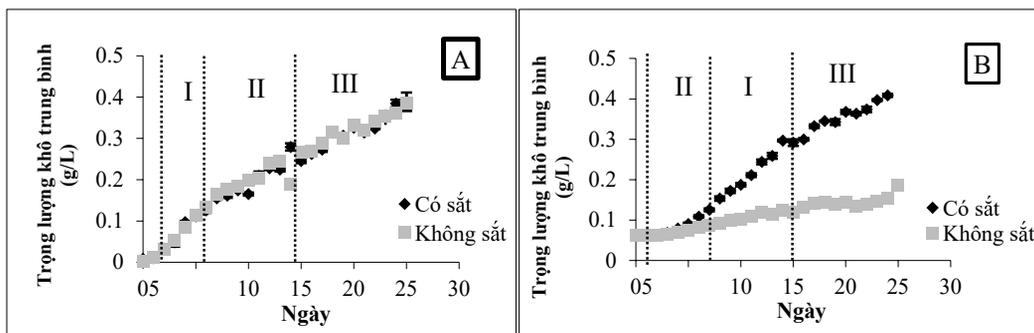
pha nuôi cấy có chứa sắt ( $p < 0,5$ ) và không có sự khác biệt về năng suất sinh khối giữa các pha nuôi cấy không chứa sắt ( $p > 0,5$ ). Tương tự như vậy, không có tác động của sắt lên năng suất sinh khối theo diện tích của *Dunaliella parva* giữa các điều kiện nuôi cấy khác nhau (có sắt và không có sắt). Tuy nhiên, có tác động lên năng suất sinh khối theo diện tích của *Mesotaenium* sp. giữa các điều kiện nuôi cấy khác nhau (có sắt và không có sắt).

**Bảng 1. Tốc độ tăng trưởng; Năng suất sinh khối thể tích và Năng suất sinh khối diện tích của *Dunaliella parva* và *Mesotaenium* sp**

Loài	Thời gian nuôi cấy (ngày)	Tốc độ tăng trưởng ( $\mu$ )		Năng suất sinh khối theo thể tích (g DW/L/ngày)		Năng suất sinh khối theo diện tích (g DW/m <sup>2</sup> /ngày)	
		Có sắt	Không có sắt	Có sắt	Không có sắt	Có sắt	Không có sắt
<i>D. parva</i>	2-5	0,339	0,352	0,026	0,027	4,123	4,250
	6-15	0,070	0,072	0,013	0,015	2,098	2,322
	15-25	0,042	0,039	0,014	0,013	2,213	2,043
<i>Mesotaenium</i> sp.	2-5	0,233	0,157	0,009	0,004	1,376	0,606
	6-15	0,081	0,049	0,020	0,004	3,206	0,666
	15-25	0,020	0,030	0,012	0,006	1,907	0,971

Nghiên cứu cho thấy việc cung cấp sắt có thể thúc đẩy sự phát triển của *Mesotaenium* sp. nhưng không thúc đẩy sự phát triển của *D. parva*. Mặc dù có nhiều ví dụ về các nghiên cứu cho thấy tác động của sắt đến tốc độ tăng trưởng ở vi tảo, nhưng ít được báo cáo hơn là việc không có tác động như được tìm thấy trong nghiên cứu này đối với *D. parva* điều này có thể giải thích do có sắt có sẵn trong môi trường nước biển đã lọc để pha môi trường nuôi *D. parva*. Sắt là nguyên tố quan trọng

nhất của các vi chất dinh dưỡng này. Sắt cần thiết cho sự phát triển của tất cả các loài thực vật phù du (Sunda và cộng sự 2005). Sự tham gia của chúng vào quá trình vận chuyển điện tử quang hợp bao gồm cả hệ thống quang hợp I và II. Vai trò của sắt trong cả sắc tố tế bào và sắt-mangan trong hệ thống quang hợp I ở *D. parva* đã được quan sát thấy và hạn chế sắt được báo cáo là ảnh hưởng đến hệ thống quang hợp II ở *D. tertiolecta* (Sunda & Huntsman, 1997).



**Hình 3. Trọng lượng khô trung bình [g/L] *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) có và không có sắt bổ sung. N=3**

### 3.2 Động lực hấp thụ chất dinh dưỡng

Sắt không ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ nitrat và phosphate của *D. parva* trong suốt thời gian nuôi cấy (Hình 3A và 5A). Toàn bộ nitrat được hấp thụ trong 8 ngày đầu sau đó giảm 50% trong 4 ngày tiếp theo khi bổ sung nitrat lại ở ngày thứ 8, việc hấp thụ nitrat giảm chậm ở những ngày tiếp theo. Mặt khác, hầu như toàn bộ phosphate trong quá trình nuôi cấy đều được hấp thụ trong 4 ngày đầu tiên với một số lần giảm đáng kể lượng hấp thụ phosphate ở các ngày 4-6, 7-8, 8-10 và 20-22. Ngoài ra, lượng phosphate hấp thụ cũng giảm

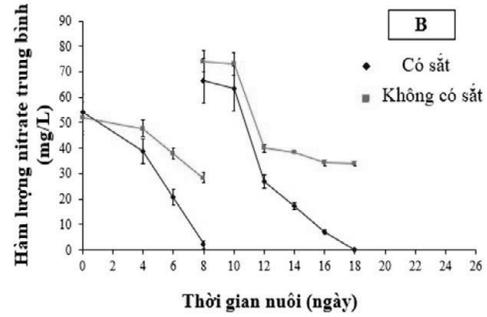
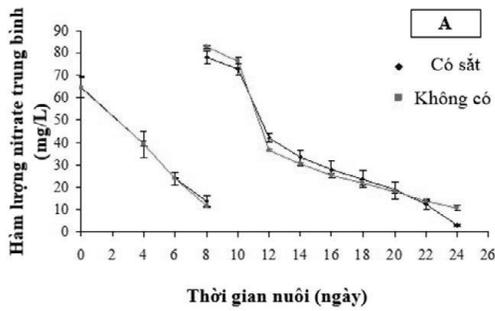
nhẹ từ ngày 10 (Hình 3A và 5A). Ngược lại, sắt có ảnh hưởng đến quá trình giải phóng nitrat của *D. parva* và quá trình giải phóng nitrat cao hơn đã được quan sát thấy trong quá trình nuôi cấy không có sắt (Hình 4A).

Trong những trường hợp khác, sắt có tác động đến sự hấp thụ nitrat và phosphate của *Mesotaenium* sp. trong suốt thời gian nuôi cấy (Hình 3B và 5B). Trong 8 ngày đầu, *Mesotaenium* sp. tiêu thụ toàn bộ nitrat trong môi trường có sắt, trong khi chỉ hấp thụ 50% nitrat trong môi trường không có sắt (Hình 3B). Sau khi bổ sung nitrat vào

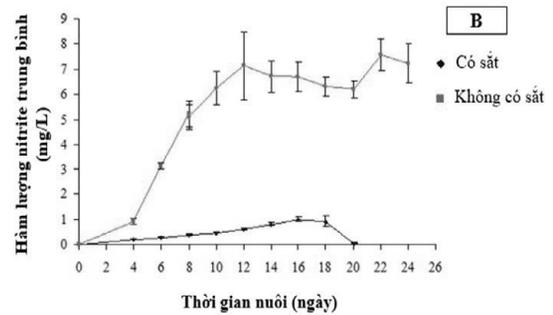
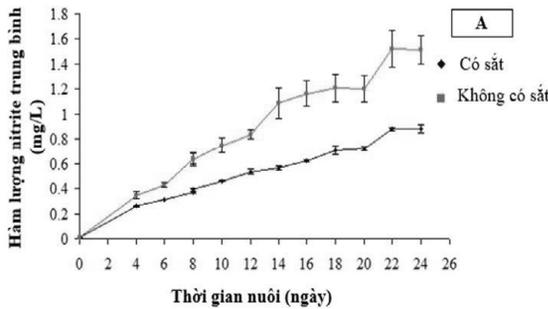
ngày thứ 8, lượng nitrat giảm 50% trong 4 ngày tiếp theo sau đó tốc độ hấp thu chậm lại. Toàn bộ nitrat được tảo *Mesotaenium* sp. hấp thu hoàn toàn vào ngày 24 trong môi trường không có sắt. Trong khi ở môi trường có sắt, sự suy giảm nitrat xảy ra sớm hơn vào ngày thứ 18 do quá trình hấp thu của tảo *Mesotaenium* sp..

Hầu như toàn bộ phosphate trong nuôi cấy được hấp thu trong 4 ngày đầu tiên. Và một số lần giảm đáng kể trong quá trình hấp thụ phosphate đã

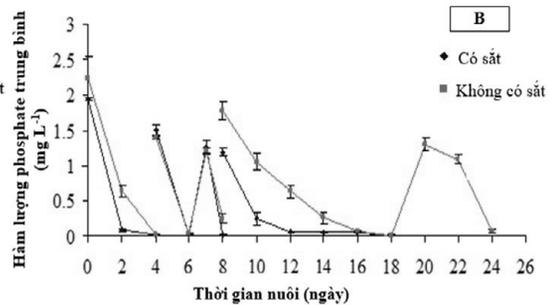
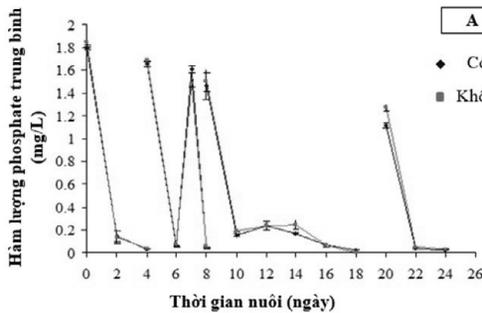
được quan sát thấy vào ngày 4-6, 7-8, 8-10 và 20-22. Sự giảm nhẹ trong quá trình hấp thụ phosphate đã được quan sát thấy từ ngày 10 (Hình 5B). Sự suy giảm phosphate trong nuôi cấy có sắt đã được quan sát thấy vào ngày 16, trong khi trong nuôi cấy không có sắt, sự suy giảm phosphate đã được quan sát thấy vào ngày 18 (Hình 5B). Ngoài ra, Sắt cũng ảnh hưởng đến việc giải phóng nitrate bởi *Mesotaenium* sp. và việc giải phóng nitrate cao hơn nhiều trong nuôi cấy không có sắt (Hình 4B).



Hình 4. Tác động của sắt lên quá trình đồng hóa nitrat trong môi trường [mg/L] của *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) có và không có sắt bổ sung



Hình 5. Ảnh hưởng của sắt đến động lực nitrit trong môi trường [mg/L] của *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) có và không có sắt bổ sung



Hình 6. Tác động của sắt lên quá trình đồng hóa phosphate môi trường [mg/L] của *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) có và không có sắt bổ sung

Ảnh hưởng của sự đồng hóa sắt đến quá trình hấp thụ nitrat, khử nitrit, khử sulfat, dinitơ (N<sub>2</sub>) trong vi tảo đã được báo cáo (Tao và cộng sự, 2020). Sự thay đổi về khả năng sử dụng sắt đã được chứng minh là kiểm soát quá trình cố định nitơ và sự phát triển của tảo ở một số hồ có hàm lượng photpho cao (Evans & Prepas, 1997). Bởi vì, nhu cầu sắt của tế bào cũng thay đổi khi các tế bào vi tảo phát triển trên các loại nguồn nitơ khác nhau (Maldonado & Price, 1996). Tác động của sắt đối với quá trình đồng hóa nitrat, photphat ở *Mesotaenium* sp. đã được quan sát trong nghiên cứu hiện tại. Lượng nitrat và photphat tiêu thụ của *Mesotaenium* sp. trong các môi trường có sắt cao hơn so với các môi trường không có sắt. Hơn nữa, quá trình giải phóng nitrit của *D. parva* và *Mesotaenium* sp. cũng bị ảnh hưởng bởi sắt. Có sự giải phóng nitrit thấp hơn khi *D. parva* và *Mesotaenium* sp. phát triển trong môi trường nuôi có chứa sắt so với môi trường nuôi không có sắt. Tuy nhiên, tác động của sắt đối với quá trình đồng hóa nitrat và photphat ở *D. parva* không được ghi nhận.

### 3.3 Hàm lượng carotenoid

Không có sự khác biệt về hàm lượng Astaxanthin, Leutine+ Zea và Chlorophyll a và b ở *D. parva* giữa môi trường nuôi cấy gốc và không có nuôi cấy sắt (Hình 6 và Bảng 2). Tuy nhiên, sắt có ảnh hưởng đến sự tích tụ  $\beta$ -carotene ở *D. parva*, với giá trị cao hơn 4,1 và 4,3 lần khi nuôi cấy có sắt so với khi nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy

gốc và không có sắt. Ngược lại, sự giảm đáng kể sự tích tụ  $\beta$ -carotene ở *D. parva* đã được quan sát thấy khi tiếp xúc với nồng độ sắt cao gấp 20 lần. (Bảng 2 và Hình 6A).

Không có sự khác biệt về sự tích lũy carotenoid ở *Mesotaenium* sp. giữa môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt (Hình 6B và Bảng 3). Tuy nhiên, sắt có ảnh hưởng đến sự tích lũy carotenoid ở *Mesotaenium* sp. Sự tích lũy carotenoid của *Mesotaenium* sp. trong môi trường nuôi cấy có sắt cao hơn trong môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt. Ví dụ, sự tích lũy astaxanthin cao hơn trong nuôi cấy có sắt so với môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt lần lượt là 3,6 và 4,4 lần, và sự tích lũy  $\beta$ -carotene Lutein + Zeaxanthin trong môi trường nuôi cấy có sắt cao hơn trong môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt lần lượt là 3,7 và 3,6 lần; và sự tích lũy Lutein + Zeaxanthin trong môi trường nuôi cấy có sắt cao hơn trong môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt lần lượt là 1,7 và 2,0 lần (bảng 3). Mặt khác, sắt cũng có ảnh hưởng đến diệp lục a và b. Có sự tích lũy Diệp lục a và b cao hơn trong môi trường nuôi cấy có sắt so với môi trường nuôi cấy gốc và môi trường nuôi cấy không có sắt. Ngược lại, sự tích tụ sắc tố thấp hơn được quan sát thấy khi *Mesotaenium* sp. được tiếp xúc với nồng độ sắt gấp 20 lần (Hình 6B và bảng 3).

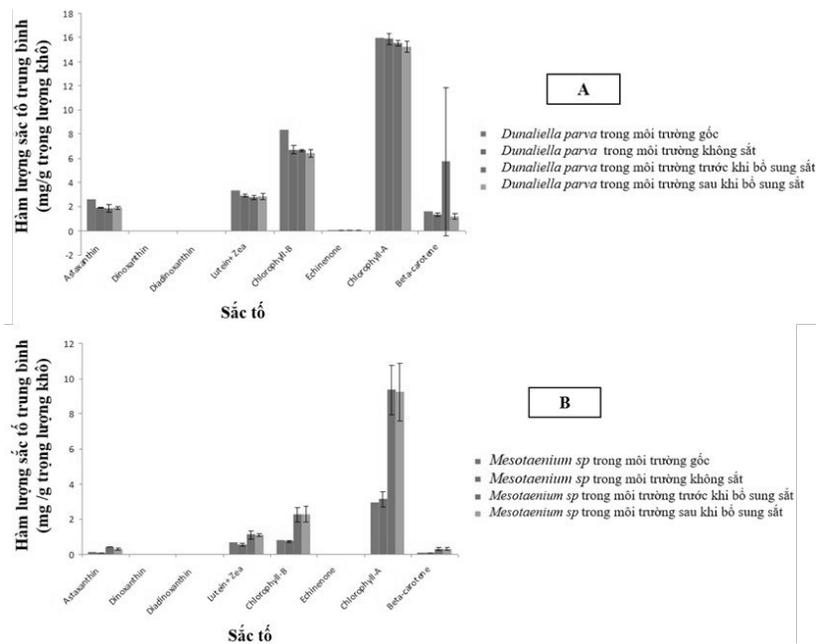
**Bảng 2: Hàm lượng carotenoid của *D. parva* với nồng độ sắt khác nhau trong nuôi cấy [mg/g trọng lượng khô]**

Môi trường nuôi cấy gốc	Môi trường nuôi cấy không có sắt	Môi trường nuôi cấy có sắt	
		Trước khi bổ sung [7.18 x 20 $\mu$ M FeCl <sub>3</sub> ]	Sau khi bổ sung [7.18 x 20 $\mu$ M FeCl <sub>3</sub> ]
2.59	1,92	1,82	1,92
3.30	2,91	2,77	2,85
8.32	6,68	6,63	6,45
15.95	15,87	15,51	15,31
1.57	1,32	5,72	1,18

**Bảng 3: Hàm lượng carotenoid của *Mesotaenium* sp. với nồng độ sắt khác nhau trong nuôi cấy [mg/g trọng lượng khô]**

Sắc tố	Môi trường nuôi cấy gốc	Môi trường nuôi cấy không có sắt	Môi trường nuôi cấy có sắt	
			Trước khi bổ sung [7.18 x 20 $\mu$ M FeCl <sub>3</sub> ]	Sau khi bổ sung [7.18 x 20 $\mu$ M FeCl <sub>3</sub> ]
Astaxanthin	0,11	0,09	0,41	0,23

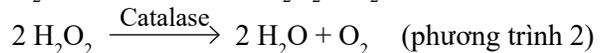
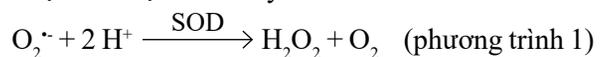
Leutine+ Zea	0,65	0,55	1,13	0,95
Chlorophyll-b	0,81	0,74	2,25	1,79
Chlorophyll-a	2,94	3,14	9,34	7,14
Beta-carotene	0,08	0,08	0,31	0,23



**Hình 7. Tác động của sắt lên sự tích lũy carotenoid (mg/g trọng lượng khô) của *D. parva* (A) và *Mesotaenium* sp. (B) môi trường nuôi cấy gốc, có và không có sắt bổ sung, trước và sau bổ sung sắt. n=2**

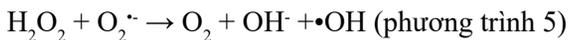
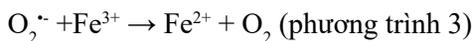
Bên cạnh tác động của sắt lên sự tăng trưởng, năng suất sinh khối và hấp thụ chất dinh dưỡng ở tảo siêu nhỏ, sắt cũng tác động đến sự tích tụ carotenoid ở vi tảo (Peng và cộng sự, 2024). Trong nghiên cứu này, trong khi sự tích tụ astaxanthin, lutein, zeaxanthin và  $\beta$ - carotene của sự phát triển *Mesotaenium* sp. trong môi trường nuôi cấy có sắt cao hơn so với môi trường nuôi cấy không có sắt, thì chỉ có sự tích tụ  $\beta$ - carotene của *D. parva* trong môi trường nuôi cấy có sắt cao hơn 4,3 lần so với môi trường nuôi cấy đối chứng (không có sắt). Sự cải thiện sự tích tụ  $\beta$ - carotene chắc chắn được giải thích bằng stress oxy hóa (Xi và cộng sự, 2021). Carotenoid được sản xuất để bảo vệ bộ máy quang hợp khỏi stress môi trường, và đặc biệt là stress oxy hóa do các loài oxy hoạt động gây ra, ví dụ, anion siêu oxy ( $O_2^{\cdot-}$ ) được tạo ra bởi quá trình quang oxy hóa và gốc hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) được tạo ra bởi phản ứng Fenton (Kobayashi và cộng sự, 1997). Tuy nhiên, cơ chế phản ứng của vi sinh vật với stress oxy hóa rất phức tạp. Quá trình chuyển hóa tảo thích nghi với stress oxy hóa không chỉ

bằng cách tích tụ  $\beta$ -carotene mà còn bằng cách tăng hoạt động của catalase và SOD (superoxide - dismutase) (Orosa và cộng sự, 2000). Cơ chế này được thể hiện dưới đây:



Các chất chống oxy hóa chính chịu trách nhiệm giải độc các ROS này là các enzyme superoxide dismutase (SOD) xúc tác quá trình chuyển đổi  $O_2^{\cdot-}$  thành  $H_2O_2$ , (phương trình 1) và catalase (CAT) xúc tác quá trình chuyển đổi  $H_2O_2$  thành  $O_2$  và  $H_2O$  (phương trình 2). Shaish và cộng sự, (1993) đã chỉ ra rằng việc bổ sung azide, một chất ức chế catalase, đã làm tăng đáng kể quá trình tổng hợp  $\beta$ -carotene của *D.bardawil*, đây là phản ứng ngăn ngừa sự tích tụ các loài oxy phản ứng. Do đó,  $\beta$ -carotene nội bào có thể hoạt động cùng với SOD và calalase (phương trình 1 và 2) để duy trì khả năng sống đối với quá trình sản xuất liên tục các gốc hydroxide trong tế bào.

Các kim loại chuyển tiếp Fe<sup>3+</sup> đặc biệt được biết là có thể gây ra sự hình thành ROS do các hóa trị thay đổi của chúng (đặc biệt là các kim loại từ nhóm 4-7 tức là Ti, V, Cr, Mo, W và Re (Conte & Floris, 2011), cho phép chúng trải qua các thay đổi về trạng thái oxy hóa liên quan đến một electron, sau đó kích thích sự hình thành các gốc tự do (Mallick, 2004). Điều này xảy ra thông qua phản ứng của các ion kim loại (ví dụ: Fe<sup>2+</sup>) với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tạo ra các gốc hydroxyl (•OH) (phản ứng giống Fenton. Phương trình 3 và 4) (Kehrer, 2000) hoặc thông qua quá trình phân hủy hydro peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) thành gốc hydroxyl có phản ứng cao (•OH) khi có các ion kim loại chuyển tiếp (ví dụ: phản ứng Haber-Weiss do sắt xúc tác. Phương trình 5) (Kehrer, 2000) cả hai đều dẫn đến sản xuất •OH và có khả năng gây ra căng thẳng oxy hóa nghiêm trọng (Stohs & Bagchi, 1995).



Vì các phân tử oxy hoạt động này không thể giải thích sự gia tăng tổng hợp β-carotene khi thêm Fe<sup>3+</sup>. Tuy nhiên, sự tích tụ carotenoid ở cả hai loài *D. parva* và *Mesotaenium* sp. đều giảm khi thêm nồng độ sắt gấp 20 lần. Nghiên cứu của Salguaro et al, 2003 đã chỉ ra rằng có mối quan hệ với quá trình tiêu tán các loài oxy lục lạp (Salguero và cộng sự, 2003). Trong trường hợp bổ sung quá nhiều sắt (II), carotenoid không bão hòa, như một cơ chế bảo vệ chống lại tổn thương oxy hóa quá mức. Hiện tượng như vậy có thể giải thích kết quả ở nồng độ sắt cao gấp 20 lần.

Mặt khác, ngoại trừ tác động của sắt lên sự tích lũy carotenoid ở *Mesotaenium* sp., sự tích lũy carotenoid cao hơn trong nuôi cấy có sắt cũng có thể được giải thích bằng sự suy giảm nitơ (Britton, 1993). Sự thiếu hụt nitơ có thể làm tăng sản xuất carotenoid thứ cấp ở tảo siêu nhỏ. Ở *Dunaliella*

sp., sự hạn chế hoặc thiếu nitrat làm tăng tích lũy β carotene nội bào (Mil'ko, 1963). Việc thiếu hụt nitơ trong môi trường nuôi cấy *Dunaliella bardawil* tạo ra một lượng lớn β-carotene đạt 227,2% so với đối chứng theo nghiên cứu của (Kobbia et al., 2010). Nghiên cứu của Taha và Kheir, 2012 cũng báo cáo rằng có sự gia tăng sản xuất carotenoid ở *D. salina* và *D. bardawill* với sự giảm dần nồng độ nitơ (Taha và cộng sự, 2012). Một nghiên cứu khác của Li và cộng sự (2012) báo cáo rằng nguồn cung nitrat thiếu hụt có thể gây ra sự tích tụ β carotene nội bào ở *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Li và cộng sự, 2012). Ngoài ra, nghiên cứu gần đây của Brocklehurst và cộng sự, 2024 cho thấy rằng việc thiếu nitơ có thể gây stress dẫn đến tăng cường sản xuất carotenoid ở *Cephaleuros* (Brocklehurst, 2024). Như vậy việc thiếu hụt nitơ làm tăng sự tích tụ carotenoid ở tảo.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu chỉ ra rằng việc bổ sung sắt có ảnh hưởng rõ rệt đến sự tăng trưởng và hàm lượng carotenoid của hai loài tảo *Mesotaenium* sp. và *Dunaliella parva*. Tảo *Mesotaenium* sp., tốc độ tăng trưởng đạt 0,233/ngày cao hơn đáng kể so với 0,157/ngày ở nghiệm thức không bổ sung sắt, trong khi *Dunaliella parva* không cho thấy sự khác biệt rõ ràng về tốc độ tăng trưởng giữa các nghiệm thức. Hàm lượng astaxanthin, β-carotene và lutein + zeaxanthin ở *Mesotaenium* sp. trong môi trường bổ sung sắt cao hơn so với môi trường không bổ sung sắt lần lượt là 0,41; 1,13 và 0,31 mg/g trọng lượng khô. Tảo *Dunaliella parva*, hàm lượng astaxanthin, β-carotene và lutein + zeaxanthin cao hơn lần lượt là 1,82; 5,72 và 2,77 mg/g khi nuôi ở môi trường có sắt so với không có sắt. Do đó, trong hệ thống nuôi cấy liên tục để nuôi tảo, việc cung cấp sắt phù hợp nên được chú ý để có hiệu quả xử lý sản phẩm cao hơn.

#### Lời cảm ơn:

Trân trọng cảm ơn Giáo sư Kirsten Heimann cùng cộng sự đã giúp đỡ tôi hoàn thành nghiên cứu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Britton, G. (1993). Biosynthesis of carotenoids. In *Carotenoids in photosynthesis* (pp. 96-126): Springer.
- Brocklehurst, T. W., Rattanapaiboonkit, K., Chanok, J. P., Phinyo, K., Duangjan, K., & Borirak, O. (2024). Uncovering the Potential of Nitrogen and Salt Stress for Enhanced β-Carotene Production and Antioxidant Capacity in Plant Pathogenic Alga *Cephaleuros*. *Progress in Applied Science and Technology*, 14(2), 24-32.

- Chen, G.-Q., & Chen, F. (2006). Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology letters*, 28, 607-616.
- Chen, X., Wang, J., Du, Z., Shu, Q., Zheng, Z., & Luo, X. (2022). Transcriptomic analysis of the molecular response mechanism of *Microcystis aeruginosa* to iron limitation stress. *Water*, 14(11), 1679.
- Conte, V., & Floris, B. (2011). Vanadium and molybdenum peroxides: synthesis and catalytic activity in oxidation reactions. *Dalton Transactions*, 40(7), 1419-1436.
- Evans, J. C., Prepas, E. E. J. L., & Oceanography. (1997). Relative importance of iron and molybdenum in restricting phytoplankton biomass in high phosphorus saline lakes. 42(3), 461-472.
- Grainger, E. M., Webb, M. Z., Simpson, C. M., Chitchumroonchokchai, C., Riedl, K., Moran, N. E., & Clinton, S. K. (2022). Assessment of dietary carotenoid intake and biologic measurement of exposure in humans. In *Methods in enzymology* (Vol. 674, pp. 255-295): Elsevier.
- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals: proceedings—1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport*, 29-60.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., & Tsuji, Y. (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 48, 351-356.
- Kobbia, I., Khalil, Z., Asker, M., & Abd-Elsayed, S. (2010). Effect of nitrogen on the biochemical constituents and antioxidant production by two green unicellular algae. *Egyptian Journal of Phycology*, 11(Second International Conference on Phycology, Limnology and Aquatic Sciences (February 14-15, 2010)), 151-170.
- Kristenson, M., Zieden, B., Kucinskiene, Z., Abaravicius, A., Razinkovienė, L., Elinder, L. S., Olsson, A. G. (1997). Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: concomitant cross sectional study of men aged 50. *Bmj*, 314(7081), 629.
- Levasseur, M., Thompson, P. A., & Harrison, P. J. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources 1. *Journal of Phycology*, 29(5), 587-595.
- Li, Z., Ma, X., Li, A., & Zhang, C. (2012). A novel potential source of  $\beta$ -carotene: *Eustigmatos* cf. *polyphem* (*Eustigmatophyceae*) and pilot  $\beta$ -carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. *Bioresource technology*, 117, 257-263.
- Liu, C., Zhang, Z., & Chen, X. (2005). Mutual effects of nitric oxide and iron on the growth of marine algae. *acta oceanologica sinica-english edition*, 24(5), 100.
- Ma, L., & Lin, X. M. (2010). Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 2-12.
- Maldonado, M. T., & Price, N. J. M. E. P. S. (1996). Influence of N substrate on Fe requirements of marine centric diatoms. 141, 161-172.
- Malec, P., Rinaldi, R. A., & Gabryś, H. (1996). Light-induced chloroplast movements in *Lemna trisulca*. Identification of the motile system. *Plant Science*, 120(2), 127-137.
- Mallick, N. (2004). Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 161(5), 591-597.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16.
- Mikhailyuk, T. I. (2008). Terrestrial lithophilic algae in a granite canyon of the Teteriv River (Ukraine). *Biologia*, 63, 824-830.
- Mil'ko, E. (1963). Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Microbiologiya*, 32, 299-307.
- Mojaat, M., Pruvost, J., Foucault, A., & Legrand, J. (2008). Effect of organic carbon sources and Fe<sup>2+</sup> ions on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 177-184.
- Naito, K., Matsui, M., & Imai, I. (2005). Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron.

*Harmful Algae*, 4(6), 1021-1032.

- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M.,... Ohsaka, Y. (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21, 257-264.
- Oren, A., Gurevich, P., Anati, D. A., Barkan, E., & Luz, B. (1995). A bloom of *Dunaliella parva* in the Dead Sea in 1992: biological and biogeochemical aspects. *Hydrobiologia*, 297, 173-185.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., & Abalde, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12, 553-556.
- Peng, K., Amenorfenyo, D. K., Rui, X., Huang, X., Li, C., & Li, F. (2024). Effect of iron concentration on the co-production of fucoxanthin and fatty acids in *Conticribra weissflogii*. *Marine Drugs*, 22(3), 106.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 635-648.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigara, J., Vega, J. M., Vilchez, C., & León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249-253.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U., & Ben-Amotz, A. (1993). Are active oxygen species involved in induction of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil*?. *Planta*, 190, 363-368.
- Siddiki, S. Y. A., Mofijur, M., Kumar, P. S., Ahmed, S. F., Inayat, A., Kusumo, F.,... Ong, H. C. (2022). Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel*, 307, 121782.
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology and medicine*, 18(2), 321-336.
- Su, C.-H., Chien, L.-J., Gomes, J., Lin, Y.-S., Yu, Y.-K., Liou, J.-S., & Syu, R.-J. (2011). Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, 23, 903-908.
- Sunda, W. G., & Huntsman, S. A. (1997). Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature*, 390(6658), 389-392.
- Sunda, W. G., Price, N. M., & Morel, F. M. (2005). Trace metal ion buffers and their use in culture studies. *Algal culturing techniques*, 4, 35-63.
- Sundararajan, P., & Ramasamy, S. P. (2024). Current perspectives on industrial application of microbial carotenoid as an alternative to synthetic pigments. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 37, 101353.
- Taha, O., Abo El-Kheir, W., Hammouda, F., & Abd El-Hady, H. (2012). Production of  $\beta$ -carotene and glycerol from *Dunaliella bardawil* and *D. salina* isolated from the Egyptian wet-lands Qarun and Bardawil. *In International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (ICEEBS'2012)*, 369-373.
- Tao, R., Bair, R., Lakaniemi, A.-M., van Hullebusch, E. D., & Rintala, J. A. J. J. o. A. P. (2020). Use of factorial experimental design to study the effects of iron and sulfur on growth of *Scenedesmus acuminatus* with different nitrogen sources. 32, 221-231.
- Thatcher, S. J., Davis, C. C., & Gardner, G. A. (1993). Physical and chemical effects of macrograzers and micrograzers on enclosed, in situ phytoplankton in a Newfoundland lake. *Hydrobiologia*, 250, 127-141.
- Wertz, K., Hunziker, P. B., Seifert, N., Riss, G., Neeb, M., Steiner, G., . . . Goralczyk, R. (2005).  $\beta$ -carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways. *Journal of investigative dermatology*, 124(2), 428-434.
- Xi, Y., Kong, F., & Chi, Z. (2021). ROS induce  $\beta$ -carotene biosynthesis caused by changes of photosynthesis efficiency and energy metabolism in *Dunaliella salina* under stress conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 613768.
- Zou, Q., Huang, L., Gu, J., Pang, B., & Shang, C. (2023). Physiological changes of microalga *Dunaliella parva* under the treatment of PEG, CaCl<sub>2</sub>. *PLoS One*, 18(12), e0295973.