# Sinh trưởng của chủng tảo lục *Chlorella vulgaris* dưới tác động của vật liệu nano bạc

Trần Thị Thu Hương<sup>1,2</sup>, Dương Thị Thuỷ<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Môi trường, Trường Đại học Mô Địa chất
<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
<sup>3</sup>Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017 Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

**Tóm tắt:** Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của vật liệu nano bạc lên sinh trưởng của chủng tảo lục *Chlorella vulgaris*. Vật liệu nano bạc được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa. Đặc tính của vật liệu được xác định bằng các phương pháp kính hiển vi điển tử truyền qua (TEM), kính hiển vi điện tử quét (SEM) và phổ hấp phụ phân tử (UV-VIS). Các hạt nano bạc cho thấy hoạt tính ức chế sinh trưởng đối với chủng tảo lục *Chlorella vulgaris*. Ở các nồng độ dung dịch bạc bổ sung là 0,05; 0,1 và 1 ppm cho thấy hoạt tính diệt tảo là lớn nhất sau 10 ngày thí nghiệm. Hiệu suất ức chế > 90 % được ghi nhận ở các nồng độ thử nghiệm từ 0,05 ppm đến 1 ppm.

Từ khoá: Úc chế, vật liệu nano bạc, tảo lục, Chlorella vulgaris.

#### 1. Mở đầu

Trong hệ sinh thái thuỷ vực, vi tảo đóng vai trò quan trọng trong chuỗi thức ăn và chu trình vật chất vì chúng có khả năng hấp thu muối dinh dưỡng vô cơ hòa tan trong môi trường nước và tổng hợp nên các chất hữu cơ thông qua quá trình quang hợp [1]. VKL là nhóm sinh vật có phân bố rộng khắp nơi trên trái đất, đa số sống trong nước ngọt, một số phân bố trong thuỷ vực nước mặn giàu chất hữu cơ hoặc trong nước lợ. Trong thủy vực, nhờ những đặc điểm thích ứng cao với nhiều điều kiện sống như tế bào chứa không bào khí, có tế bào dị hình với chức năng có thể chuyển hóa nitơ trong không khí thành amonium,... nên VKL có khả năng cạnh tranh rất lớn so với các vi tảo khác. Trong tự nhiên, VKL khi gặp điều kiện thuận lợi (chất dinh dưỡng chủ yếu là P và N, nhiệt độ và ánh sáng thích hợp), chúng phát triển rất nhanh tạo thành váng trên bề mặt nước hay còn gọi là sự nở hoa của nước [2]. Sự phát triển bùng nổ VKL trong nước gây ra hàng loạt các vấn đề về chất lượng nước như, gây ra mùi, váng, bọt, làm giảm lượng oxi, làm giảm đa dạng sinh học và gây tắc nghẽn các hệ thống cấp nước.. Hiện nay, ngay cả các quốc gia châu Âu cũng đang gặp nhiều vấn đề liên quan đến xử lý nước phú dưỡng, cũng như nước có ô nhiễm VKL trong các hồ chứa cung cấp nước sinh hoạt [3].

Xuất phát từ tác động tiêu cực và ảnh hưởng có thể rất nghiêm trọng đối với hệ sinh thái và sức khỏe của con người và từ sự phát triển của VKL độc nước ngọt, việc quản lý, ngăn ngừa và chống VKL độc được coi là

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup>Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-976567900.

Email: duongthuy0712@yahoo.com

https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4644

nhiệm vụ cấp thiết hiện nay [4]. Hướng nghiên cứu về ứng dung vật liệu nano trong xử lý nước nói chung và xử lý vi tảo nói riêng đang ngày càng được quan tâm do ưu điểm vượt trôi so với các hoạt chất diệt tảo dạng khối đưa vào môi trường như hiệu ứng bề mặt (tỉ lê mặt/khối lượng rất cao do vậy các nguyên tử của hạt nano liên kết với nhau yếu vì vây chúng có phản ứng mạnh hơn) và hiệu ứng lượng tử (các điện tử thay đổi vi trí trong giới han bề mặt của hạt nano do đó chúng dao động tập thể tạo ra hiệu ứng công hưởng plasmon bề mặt). Cho đến nay, hướng nghiên cứu nhằm giảm thiểu tác động độc hại của VKL độc và độc tố VKL còn khá mới mẻ ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, khả năng ức gây chế sinh trưởng của vật liêu nano bac tổng hợp bằng phương pháp điện hóa lên sinh trưởng của chủng tảo lục Chlorella vulgaris đã được khảo sát.

# 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

## 2.1. Đối tượng

Chủng tảo lục *Chlorella vulgaris* (được lưu giữ tại Phòng Thủy sinh học Môi trường, Viện Công nghệ Môi trường) và vật liệu nano bạc tổng hợp bằng phương pháp điện hóa.

# 2.2. Phương pháp điều chế và xác định các đặc trưng của vật liệu nano bạc

Nội dung phương pháp điều chế và xác định đặc trưng cấu trúc vật liệu đã được tác giả Trần Thị Thu Hương trình bày trong công trình được công bố năm 2016 [5].

## 2.3. Đánh giá ảnh hưởng của vật liệu nano bạc lên sinh trưởng của chủng tảo lục Chlorella vulgaris

Chủng tảo lục *Chlorella vulgaris* thu nhận từ bộ sưu tập giống của Phòng Thuỷ sinh học môi trường - Viện Công nghệ môi trường -Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam được sử dụng để đánh giá độc tính của các vật liệu nano bạc chế tạo bằng phương pháp điện hóa. Chủng *C. vulgaris* được nuôi cấy trong môi trường CB ở điều kiện: nhiệt độ  $25 \pm$   $2^{\circ}$ C và chiếu sáng huỳnh quang ở chế độ (1000 lux, 14 giờ sáng/8 giờ tối). Môi trường nuôi cây CB bao gồm các thành phần cơ bản sau (ppm):  $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ : 150: KNO<sub>3</sub>: 100: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 40; β-disodium glycerophosphate: 50; bicine: 500; biotin: 0,0001; vitamin B12: 0,0001; thiamine hydrochloride: 0,01 và 3 ml PIV. Thành phần vi lượng PIV bao gồm (mg/100 mL nước cất deion): FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O: 19,6; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O: 3,6; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2,2; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0.4: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,25 và disodium EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid).2H<sub>2</sub>0: 100. pH môi trường CB = 9 [6]. Để đánh giá độc tính của vật liệu nano bạc đến sinh trưởng của chủng tảo lục, 5 mL môi trường nuôi cấy có chứa chủng tảo lục C. vulgaris được bổ sung vào bình tam giác chứa 145 mL môi trường CB. Dung dịch nano bạc được bố sung vào các bình tam giác có chứa sinh khối của chủng tảo lục C. vulgaris với các nồng độ dung dịch nano bạc 0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm. Tảo lục C. vulgaris được nuôi ở điều kiện nuôi cấy như sau: nhiệt độ khoảng  $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ , khoảng thời gian ngày: đêm là 14h sáng: 8h tối và cường độ ánh sáng 1000 lux. Động thái sinh trưởng của chủng tảo lục được theo dõi ở các ngày D0, D2, D6 và D10 của thí nghiêm. Sinh trưởng của chủng tảo lục được đánh giá qua mật đô quang học (OD) ở bước sóng 680 nm sử dụng máy đo quang phổ UV-VIS (Simadzu) và mật độ tế bào. Các công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hiệu suất ức chế sinh trưởng của VKL được tính bằng công thức sau:

Hiệu suất ức chế sinh trưởng của VKL (%) = [(sinh khối mẫu đối chứng - sinh khối mẫu thí nghiệm)/sinh khối mẫu đối chứng] x 100 [7].

#### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Đặc trưng của vật liệu nano đồng điều chế bằng phương pháp khử hoá học

Vật liệu nano bạc được điều chế bằng phương pháp điện hóa và một số yếu tố ảnh

hưởng đến cấu trúc, tính chất của vật liệu như tỷ lệ chất bọc PVP, điện áp, điện cực, phổ UV-VIS, cấu trúc vật liệu đã được khảo sát theo công trình được tác giả Trần Thị Thu Hương công bố năm 2016 [5].

# 3.2. Ảnh hưởng của các vật liệu nano bạc điện hóa đến sinh trưởng của chủng tảo lục C. vulgaris

Ånh hưởng của vật liệu nano bạc tổng hợp bằng phương pháp điện hóa đến sinh trưởng của chủng tảo lục C. vulgaris được đánh giá với 6 dải nồng đô tăng dần từ 0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm theo thời gian được trình bày tại hình 1a. Các phương pháp đo mật đô quang học (OD) ở bước sóng 680 nm và xác đinh mật đô tế bào được khảo sát để xác đinh tăng trưởng sinh khối của chủng tảo lục ở thời điểm D0, D2, D6 và D10 tiếp xúc với vật liêu nano. Với các nồng độ dung dịch nano bạc tiếp xúc khác nhau sinh trưởng chủng tảo lục C. vulgaris cũng khác nhau. Thật vậy, khi bố sung các nồng độ dung dịch nano bạc thấp (0,005 và 0,01 ppm), nano bạc gần như không ảnh hưởng đến sinh trưởng của tảo lục so với mẫu đối chứng. Các tế bào tảo lục vẫn phát triển và đạt sinh khối cao nhất tạo thời điểm D10. Mật độ quang sinh khối tế bào C. vulgaris tại thời điểm D0 ở công thức đối chứng và ở mẫu có bố sung nano bạc với nồng đô 0,005 và 0,01 ppm tương ứng là: 0,032; 0,031 và 0,030. Mật đô quang sinh khối tế bào C. vulgaris tại thời điểm D10 ở công thức đối chứng và nồng đô dung dịch bac 0,005 và 0,01 ppm tăng so với thời thời điểm D0 gấp 10 lần cụ thể là: 0,35; 0,38 và 0,1.

Trong khi đó, ở các nồng độ dung dịch 0,05; 0,1 và 1 ppm, ngay sau khi tiếp xúc với dung dịch nano bạc, các tế bào tảo lục *C. vulgaris* bị ức chế, sinh khối tế bào không tăng hoặc giảm so với thời điểm ban đầu D0 và so với công thức đối chứng. Dựa vào sinh trưởng tính theo phương pháp đo mật độ quang, nồng độ gây ảnh hưởng 50% quần thể tảo lục *C. vulgaris* (EC50) của vật liệu nano bac là 0,008 ppm. Theo Griffitt và cs. (2008), nồng độ gây ảnh hưởng 50% của vật liệu nano

bac phủ citrate đối với loài tảo thử nghiêm Pseudokirchneriella subcapitata dao dông trong khoảng từ 0,19 đến 0,72 ppm [8]. Độc tính và nồng đô gây ảnh hưởng của vật liệu nano bạc đến các loài tảo thử nghiệm rất đa dang. Sư khác biệt này được cho là do kích thước hạt nano, bề mặt phủ của vật liệu nano, cấu trúc màng tế bào của sinh vật thử nghiệm...[9-11]. Dựa vào kết quả phân tích EC50, chúng tôi thấy rằng dung dịch nano bac có độc tính thấp hơn đối với các tế bào tảo luc C. vulgaris (EC 50: 0,008) so với các tế bào M. aeruginosa (EC 50: 0,0038 - 0,0075) [12]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với công bố của Qian và cs. (2016) [13]. Nghiên cứu độc tính của vật liêu nano bac ở các loài vi khuẩn lam M. aeruginosa và tảo luc C. vulgaris sử dung các phân tích tương tác protein, phiên mã gen và đặc điểm sinh lý, Qian và cs. (2016) cho rằng, nano bạc tác động đến sinh trưởng, quang hợp, trao đổi carbon hydrate ở loài M. aeruginosa mạnh hơn so với ở loài C. vulgaris. Theo các tác giả, C. vulgaris có khả năng khử độc tính của nano bac nhờ hê enzym cảm ứng (Superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) và sinh tổng hợp glutamine) cho phép quá trình quang hợp tiếp tục được tiếp diễn ở nông độ nano bạc gây ức chế sinh trưởng [13]. Trong khi đó, phiên mã và biểu hiện SOD và POD bị ức chế ở loài M. aeruginosa khi tiếp xúc với cùng nồng độ nano bạc. Độ nhạy cảm của vi khuẩn lam M. aeruginosa so với một số loài tảo luc như Ankistrodesmus convolutes và Scenedesmus quadricauda khi tiếp xúc với nồng đô nano bac (1ppm) đã được nghiên cứu với mô hình thu nhỏ ở điều kiện phòng thí nghiêm và thực nghiêm in situ [7]. Theo Park và cs. (2010), hiệu suất ức chế sinh trưởng của M. aeruginosa sau 10 ngày tiếp xúc với nano bạc được ghi nhận 93-95% trong điều kiện thực nghiêm mô hình thu nhỏ và 55-64% ở điều kiên thực nghiệm in situ. Trong khi đó, sinh trưởng của các loài tảo lục không bị ức chế hoặc ức chế thấp sau khi tiếp xúc với nano bạc (1ppm) được ghi nhận [7].

Hình 1b trình bày sinh trưởng của các tế bào tảo lục *C. vulgaris* ở các nồng độ dung dịch bạc từ 0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm thông qua phương pháp xác định mật độ tế bào. Kết quả xác định mật độ tế bào cho kết quả tương tự với phương pháp phân tích mật độ quang (OD). Ở các nồng độ 0 (đối chứng), 0,005 và 0,01 ppm, mật độ tế bào tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở ngày kết thúc thí nghiệm D10. Trong khi đó, ở các công thức thí nghiệm có bổ sung nồng độ dung dịch nano bạc là 0,05; 0,1 và 1 ppm tương ứng, số lượng tế bào tảo lục ở các thời điểm D2, D6 và D10 giảm và thấp hơn so với với thời điểm D0.



Hình 1. Sinh trưởng tính theo mật độ quang (a) và mật độ tế bào (b) của chủng tảo lục *C. vulgaris* ở các nồng độ dung dịch nano bạc khác nhau (0; 0,005;0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm).



Hình 2. Hiệu suất ức chế sinh trưởng chủng tảo lục *C. vulgaris* của vật liệu nano bạc ở các nồng độ dung dịch khác nhau (0,005; 0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm).

Hiệu suất ức chế sinh trưởng tảo lục *C. vulgaris* sau 10 ngày tiếp xúc với dung dịch nano bạc ở các nồng độ từ 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 và 1 ppm được trình bày ở hình 2. Hiệu suất ức chế > 90% được ghi nhận ở các nồng độ thử nghiệm từ 0,05 ppm đến 1 ppm.

Để xác định sự thay đổi về hình thái và siêu cấu trúc tế bào, các tế bào tảo lục *C. vulgaris* 

sau 48h tiếp xúc với vật liệu nano bạc ở nồng đô 1 ppm được phân tích dưới kính hiển vi quét (SEM-EDX) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Hình 3 thể hiện cấu trúc tế bào tảo lục C. vulgaris được quan sát dưới kính hiển vi quét (SEM-EDX) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Tế bào C. vulgaris ở công thức đối chứng tế bào hình cầu hoặc elip, các tế bào nhẵn và bào quan trong tế bào nhìn rõ. Trong khi đó, khi tiếp xúc với dung dịch nano bạc (1 ppm) sau 48 giờ, các tế bào tảo lục C. vulgaris gần như bi méo, bề ngoài tế bào sân sùi và co cụm. Phân tích SEM-EDX xác đinh các nguyên tố có trên bề mặt các tế bào C. vulgaris đã khẳng định sự hiện diện của nano bac. Cấu trúc siêu tế bào cho thấy, thành tế bào bị co lại và không bị phá vỡ. Khi phân tích cấu trúc siêu tế bào của chủng tảo lục C. vulgaris dưới tác động của vật liệu nano bạc ở nồng độ dưới ngưỡng ức chế sinh trưởng 50% (< IC50), Kalman và cs. (2016) không phát hiên hat nano bac bên trong tế bào [14]. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nano bạc lên cao 200-285 lần, hập thu kim loại vào nội bào sau

4h đã được ghi nhận. Tiếp xúc với nồng độ kim loại cao làm tăng tính thấm của màng tế bào dẫn đến xâm nhập các hạt nano vào bên trong tế bào. Theo các tác giả, các hạt nano bạc được phát hiện nằm bên trong các hạt tinh bột và đây là nơi thu hút các hạt nano. Hạt tinh bột được cho là một cơ chế bảo vệ chống lại các ion kim loại và có khả năng sử dụng để cô lập các chất độc hại [15].



Hình 3. Hình thái tế bào *C. vulgaris* dưới kính hiển vi quét (a và b) và kính hiển vi truyền qua (c và d). a) và c): tế bào *C. vulgaris* không tiếp xúc với vật liệu nano; b) và d): tế bào tiếp xúc với nano bạc (1ppm) sau 48h.

# 4. Kết luận

Dung dịch nano bạc sử dụng trong nghiên cứu này được chế tạo bằng phương pháp điện hóa với điện áp 9V, khoảng cách giữa 2 điện cực là 2 cm. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ vật liệu nano bạc thử nghiệm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chủng tảo lục *Chlorella vulgaris*. Sinh trưởng chủng tảo lục *Chlorella vulgaris* bị ức chế mạnh nhất khi tiếp xúc với vật liệu nano bạc ở nồng độ 0,05; 0,1 và 1 ppm sau 10 ngày thử nghiệm. Hiệu suất ức chế > 90 % được ghi nhận ở các nồng độ thử nghiệm từ 0,05 ppm đến 1 ppm.

#### Tài liệu tham khảo

- Hulyal SB., Kaliwal BB. Dynamics of phytoplankton in relation to physico-chemical factors of Almatti reservoir of Bijapur District, Karnataka State. Environ Monit Assess. 153(1-4) (2009) 45.
- [2] Whitton BA., Potts M. The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space. 645p, (2000).

- [3] Stefan J. Hoeger, Bettina C. Hitzfeld, Daniel R. Dietricha. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. Toxicology and applied pharmacology 203 3 (2005) 231.
- [4] Oberholster, P.J., Botha, A.M., & Cloete. T.E. An overview of toxic cyanobacteria in South Africa with special reference to risk, impact and detection by molecular marker tools. Biokemistri, 17(2) (2005) 57.
- [5] Trần Thị Thu Hương và cộng sự. Ảnh hưởng của vật liệu nano bạc đến sinh trưởng của bèo Lemna sp. Tạp chí Công nghệ Sinh học 14(2) (2016) 1.
- [6] +6Shirai M., Matumaru K., Ohotake A., Takamura Y., Tokujiro A., Nakano M. Development of a Solid Medium for Growth and Isolation of Axenic Microcystis Strains (Cyanobacteria). Applie an environmental Microbiology (1989) 2569. [7]. Park M.H., Kim K.H., Lee H.H., Kim J.S., Hwang S.J. Selective inhibitory potential of silver nanoparticles on the
- [7] harmful cyanobac- terium Microcystis aeruginosa. Biotechnol Lett 32(3) (2010) 423.
- [8] Griffitt, R. J.; Weil, R.; Hyndman, K. A.; Denslow, N. D.; Powers, K.; Taylor, D.; Barber, D. S. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (Danio rerio). Environ. Sci. Technol 41 (23) (2007) 8178.

- [9] Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. Toxicity of silver nanoparticles to Chlamydomonas reinhardtii. Environ. Sci. Technol 42 (2008) 8959.
- [10] Marambio J C and Hoek EMC. J. Nano. Research 12 (2010) 1531.
- [11] McLaughlin J and Bonzongo J C J. Environ Toxicol Chem 31 (2012) 68.
- [12] Thi Thuy Duong, Thanh Son Le, Thi Thu Huong Tran et al, Inhibition effect of engineered silver nanoparticles to bloom forming cyanobacteria, journal Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. issue 3, volume 7 (2016).
- [13] Qian H., Zhu K., Lu H., Lavoie M., Chen S., Zhou Z., Deng Z., Chen J., Fu Z. Contrasting silver nanoparticle toxicity and detoxification

strategies in Microcystis aeruginosa and Chlorella vulgaris: New insights from proteomic and physiological analyses. Science of the Total Environment 572 (2016) 1213.

- [14] Kalman J., Paul K.B., Khan F.R., Stone V., Fernandes T.F. Characterisation of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain. Environmental Chemistry 12(6) (2016) 662.
- [15] Zhou G. J., Peng F. Q., Zhang L. J., Ying G. G. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus obliquus. Environ. Sci. Pollut. Res., 19(7) (2012) 2918.

# Chlorella vulgaris Green Algae under the Affection of Silver Nanomaterial

# Tran Thi Thu Huong<sup>1,2</sup>, Duong Thi Thuy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Environment, Hanoi University of Mining and Geology <sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology <sup>3</sup>Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

Abstract: The aim of this work was to investigate the influence of silver nanoparticles on growth of green algae strain (*Chlorella vulgaris*). The silver nanoparticles were synthesized by electrochemical method. Characterizations of these nanoparticles were determined by Transmission electron microscopy (TEM), Scanning Electron Microscope (SEM) and UV - VIS methods. Silver nanoparticles show growth inhibition against green algae Chlorella vulgaris. At concentrations of 0.05; 0.1 and 1 ppm of addition silver nanoparticles, the maximum anti-algal activity was observed after 10<sup>th</sup> day of the experiment. The grow inhibition reached > 90% at concentrations from 0.05 to 1 ppm.

*Keywords*: Inhibition, silver nanomaterial, green algae, *Chlorella vulgaris*.