VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

------ꕥ✧ꕥ------

NGUYỄN THỊ THU THỦY

NGHIÊN CỨU HỆ VI KHUẨN ANODE TRONG QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CẢM BIẾN PIN NHIÊN LIỆU VI SINH VẬT PHÁT HIỆN SẮT

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

HÀ NỘI - 2013

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT
------ꕥ✧ꕥ------

NGUYỄN THỊ THU THỦY

NGHIÊN CỨU HỆ VI KHUẨN ANODE TRONG QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN THIẾT BỊ CẢM BIẾN PIN NHIÊN LIỆU VI SINH VẬT PHÁT HIỆN SẮT

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 62420103

Người hướng dẫn khoa học: TS. PHẠM THẾ HẢI

HÀ NỘI - 2013

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phạm Thế Hải - Giảng viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã định hướng nghiên cứu, trực tiếp hướng dẫn và chỉ bảo tận tình cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban lãnh đạo Bộ môn Vi sinh vật - Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi về máy móc, trang thiết bị và cơ sở vật chất trong quá trình nghiên cứu.

Tôi cũng mong muốn được gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Đinh Thúy Hằng và TS. Nguyễn Kim Nữ Thảo, Viện Vi sinh vật & CNSH, Đại học Quốc gia Hà Nội về những tư vấn, giúp đỡ trong quá trình nghiên cứu.

Qua đây, tôi xin bày tỏ sự biết ơn đối với các Giáo sư, Phó giáo sư, Tiến sĩ của Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam đã trực tiếp giảng dạy trong suốt quá trình tôi được học tập tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Hợp tác nghiên cứu giữa Trường Đại học Khoa học Tự nhiên với Viện Khoa học Công nghệ Hàn Quốc (KIST), và đề tài thuộc Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia - Nafosted, mã số 103.06-2012.06.

Hà Nội, tháng 12 năm 2013

Học viên

Nguyễn Thị Thu Thủy

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN .....
MỤC LỤC .....
DANH MỤC HÌNH VẼ .....
DANH MỤC BẢNG BIỂU .....
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Pin nhiên liệu vi sinh vật (Microbial fuel cell - MFC) 3
1.1.1 Lịch sử phát triển của MFC 3
1.1.2. Cấu tạo của MFC 4
1.1.3. Nguyên lý hoạt động của MFC 5
1.1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động của MFC 6
1.1.5. Ứng dụng của MFC 7
1.2. Vi khuẩn oxi hoá sắt 10
1.2.1 Đặc điểm vi khuẩn oxi hóa sắt 10
1.2.2 Phân bố của vi khuẩn oxi hóa sắt 11
1.2.3 Phân loại vi khuẩn oxi hóa sắt 11
1.3 Ảnh hưởng của sự thừa sắt đến con người 15
1.5 Khả năng ứng dụng MFC làm thiết bị cảm biến phát hiện sắt 17
1.6 Ý nghĩa của việc nghiên cứu tính đa dạng và và sự biến đổi của quần xã vi sinh vật ở anode của một MFC 18
1.7 Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu hệ vi sinh vật 19
1.7.1 Phương pháp phân lập vi sinh truyền thống 19
1.7.2 Phương pháp Sinh học phân tử 21
CHƯƠNG 2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 232
2.1 Mục tiêu của đề tài 232
2.2 Nội dung của đề tài 232
2.3.1 Đối tượng nghiên cứu 232
2.3.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ 24

2.4 Phương pháp nghiên cứu 25
2.4.1 Thiết kế, xây dựng và vận hành MFC 25
2.4.2 Làm giàu vi khuẩn ôxi hóa sắt trong các MFC 28
2.4.3 Phân lập, nuôi cấy vi khuẩn theo phương pháp truyền thống 29
2.4.4 Phương pháp nhuộm Gram và quan sát hiển vi 30
2.4.5 Tách ADN tổng số từ mẫu bùn, mẫu dịch anode và chủng đơn 30
2.4.6 Phương pháp điện di gel biến tính (DGGE) 32
2.4.7 Giải và phân tích trình tự gen 16S rARN 34
2.4.8 Phương pháp lai huỳnh quang (FISH) 35
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 38
3.1 Sự sản sinh dòng điện ở các MFC - dấu hiệu của sự làm giàu thành công vi khuẩn oxi hóa sắt 38
3.2 Khả năng cảm biến sắt (II) của MFC 39
3.3 Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn trong các MFC 40
3.4 Nghiên cứu động thái quần xã vi khuẩn trong các MFC bằng phương pháp DGGE 45
3.5 Lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) 51
THẢO LUẬN CHUNG 52
KẾT LUẬN 56
HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO 57
TÀI LIỆU THAM KHẢO 58
PHỤ LỤC .....

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1: Sơ đồ cấu tạo của một MFC 5
Hình 2. Nguyên lý hoạt động của một MFC 6
Hình 3:Nguyên lý của một MFC dùng để khử muối trong nước 8
Hình 4: MFC tích hợp vào lòng sông 10
Hình 5: Cây phát sinh loài của vi khuẩn oxi hóa sắt 14
Hình 6: Nước bị ô nhiễm bởi kim loại và chất thải..... 15
Hình 7: Pin nhiên liệu vi sinh vật thiết kế theo mô hình NCBE 26
Hình 8: Đồ thị thể hiện sự phát sinh dòng điện bởi các MFC trong giai đoạn làm giàu vi khuẩn điện hóa sử dụng Fe(II) làm nguồn cho điện tử. 38
Hình9: Quan hệ giữa cường độ dòng điện với nồng độ Fe(II) trong dịch anode của MFC2 và MFC3 39
Hình 10: Khuẩn lạc và tế bào các chủng phân lập từ MFC1. 41
Hình 11: Khuẩn lạc và tế bào các chủng phân lập từ MFC2. 42
Hình 12: Khuẩn lạc và tế bào các chủng phân lập từ MFC3. 43
Hình 13: Thống kê tỷ lệ các chủng vi khuẩn phân lập được từ anode của mỗi MFC trong nghiên cứu. 44
Hình 14: Kết quả PCR khuếch đại đoạn 16S rADN với cặp mồi p61F & p1378R từ sản phẩm tách ADN tổng số. 46
Hình 15: Kết quả PCR khuếch đại đoạn 16SrADN dùng cho phân tích DGGE bằng cặp mồi (p338F & p518R). 47
Hình 16: So sánh kết quả điện di DGGE phân tích quần xã anode của MFC1 và MFC2. 47
Hình 17: So sánh kết quả điện di DGGE phân tích quần xã anode của MFC1 và MFC3. 49
Hình 18: So sánh kết quả điện di DGGE phân tích quần xã anode của MFC2 và MFC3. 50

Hình 19: Kết quả phân tích vi khuẩn oxi hóa sắt trong thiết bị bằng kỹ thuật FISH. 51

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1: Môi trường M9 cải tiến cho khoang anode 26
Bảng 2: Hỗn hợp vi lượng 27
Bảng 3: Dung dịch đệm cho khoang cathode 27
Bảng 4: Môi trường Winograsky 29
Bảng 5: Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt của PCR cho DGGE 32
Bảng 6: Thành phần dung dịch chất biến tính 0% và 60% 33
Bảng 7: Thành phần "Working solutions" 33

MỞ ĐẦU

Ở hầu hết các vùng nông thôn Việt Nam, vì không có điều kiện sử dụng nước sạch (nước đã qua xử lý), sinh hoạt hàng ngày của người dân phải dựa vào các nguồn nước ngầm như nước giếng, ao, hồ...mà phần nhiều bị ô nhiễm bởi các kim loại như sắt, mangan, chì, arsen, ... Ngoài ra, ở các khu đô thị và khu công nghiệp, việc xả thải bừa bãi không qua xử lý của các nhà máy, xí nghiệp hay cơ sở sản xuất nhỏ cũng gây ra ô nhiễm kim loại cho khu vực lân cận [26].

Theo một nghiên cứu gần đây, hàm lượng các kim loại có hại như sắt, mangan và arsen trong nhiều nguồn nước ngầm ở miền Bắc Việt Nam đã cao ở mức báo động [31]. Ô nhiễm nước bởi kim loại có tác động tiêu cực tới môi trường sống của sinh vật và con người. Qua việc tiếp xúc thường xuyên với các nguồn nước ô nhiễm này, các kim loại sẽ thâm nhập vào cơ thể người dẫn đến nhiều hậu quả bệnh lý, đặc biệt là đối với hệ thần kinh [32].

Để hạn chế và ngăn chặn tác hại của sự ô nhiễm kim loại, cần phải tăng cường các biện pháp phân tích, phát hiện kim loại và xử lý nước. Các phân tích để phát hiện các kim loại đòi hỏi phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm và khá mất thời gian. Vì vậy, một thiết bị cảm biến sinh học, có thể dùng nhiều lần với quy trình đơn giản và có thể phát hiện tại chỗ sự có mặt của kim loại trong nước ngầm sẽ có ý nghĩa rất lớn, giúp người dân nông thôn đánh giá nguồn nước ngầm họ đang sử dụng, góp phần cải thiện cuộc sống. Pin nhiên liệu vi sinh vật, một dạng hệ thống sinh điện hóa được phát triển gần đây, thể hiện nhiều tiềm năng sử dụng như một cảm biến sinh học đáp ứng các yêu cầu trên.

Hiện nay chưa có nghiên cứu nào sử dụng pin nhiên liệu vi sinh vật để làm cảm biến phát hiện kim loại. Dựa trên nguyên lý vận hành của thiết bị là hóa năng trong cơ chất được chuyển hóa thành dòng điện tỷ lệ thuận và dựa trên tính đặc hiệu cơ chất của quần xã vi sinh vật được làm giàu, chúng tôi đã

tiến hành làm giàu các vi khuẩn oxi hóa sắt trong MFC để phát triển cảm biến sinh học nhằm phát hiện sắt - một loại kim loại ô nhiễm phổ biến trong nước ngầm. Việc tìm hiểu về sự biến đổi của hệ vi sinh vật anode của MFC trong quá trình làm giàu này và về quan hệ giữa thành phần vi sinh vật với hoạt động của thiết bị là rất quan trọng để có thể phát triển thành công thiết bị như một cảm biến sinh học. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: ***"Nghiên cứu hệ vi khuẩn anode trong quá trình phát triển thiết bị cảm biến pin nhiên liệu vi sinh vật phát hiện sắt"*** .

CHƯƠNG I
TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Pin nhiên liệu vi sinh vật (Microbial fuel cell - MFC)

1.1.1 Lịch sử phát triển của MFC

Ý tưởng sử dụng các tế bào vi sinh vật để sản xuất điện lần đầu tiên được hình thành vào đầu thế kỷ XX. Năm 1911, MC. Potter - một Giáo sư Thực vật học tại Đại học Durham là người đầu tiên thực hiện những nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực này [29]. Trong các nghiên cứu của ông về phương thức mà vi sinh vật phân hủy các hợp chất hữu cơ, ông đã phát hiện ra rằng năng lượng điện cũng được sản sinh cùng quá trình đó. Potter đã có ý tưởng thu lại nguồn năng lượng mới này cho mục đích sử dụng của con người. Ông đã có thể xây dựng một pin nhiên liệu vi sinh vật nguyên thủy, nhưng do chưa có những hiểu biết đầy đủ về sự trao đổi chất của vi khuẩn mà việc thiết kế này không được cải thiện [33].

Năm 1931, Barnet Cohen đã thu hút sự chú ý hơn khi ông tạo ra một số những pin nhiên liệu bán vi sinh vật mà khi mắc nối tiếp với nhau chúng có khả năng sản sinh trên 35 vol mặc dù chỉ với dòng điện 2 miliampe [38] .

Tiếp theo đó, những nghiên cứu về MFC phát triển hơn khi DelDuca và cộng sự đã sử dụng hydro được tạo ra bởi quá trình lên men đường của *Clostridium butyricum* như các chất phản ứng ở cực dương của một pin nhiên liệu hydro và không khí. Mặc dù pin này có chức năng là sản sinh hydro nhưng lại không đáng tin cậy do tính chất không ổn định của việc sản sinh hydro bởi vi sinh vật. Vấn đề này sau đó đã được Suzuki và cộng sự giải quyết [33].

Trên thực tế, việc cải thiện thiết kế MFC rất ít được nghiên cứu cho đến những năm 1980, MJ Allen và H. Peter Bennetto ở trường Đại học Kings - London nước Anh đã thực hiện một cuộc cách mạng thiết kế pin nhiên liệu vi sinh vật đầu tiên.Với mong muốn cung cấp nguồn năng lượng giá rẻ và đáng