

BƯỚC ĐẦU PHÁT TRIỂN PIN NHIÊN LIỆU VI SINH VẬT CHỨA VI KHUẨN SẮT ĐƯỢC LÀM GIÀU ĐỂ LÀM CẢM BIẾN SINH HỌC PHÁT HIỆN TẠI CHỖ SẮT TRONG NƯỚC

Phạm Thế Hải¹, Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Nguyễn Hoàng Phương², Lương Thị Thanh Trà
¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Ở nhiều vùng nông thôn Việt Nam, vì không có điều kiện sử dụng nước sạch, người dân phải dựa vào các nguồn nước ngầm mà phần nhiều bị ô nhiễm bởi các kim loại như sắt, mangan và asen. Hiện tại, việc phát hiện các kim loại này trong các mẫu nước còn khá phức tạp và khá tốn kém. Thiết bị dạng pin nhiên liệu vi sinh vật (microbial fuel cell-MFC) chứa các vi khuẩn sắt được làm giàu có thể được sử dụng như cảm biến sinh học phát hiện tại chỗ các kim loại này với quy trình đơn giản. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bước đầu tìm hiểu khả năng làm giàu vi khuẩn sắt trong MFC và khả năng phát hiện Fe(II) của một MFC như vậy. Sau hai tuần khởi động, thiết bị MFC đã sản sinh dòng điện với cường độ trung bình 0,6 mA tương ứng với nồng độ Fe(II) trong môi trường đầu vào là 20 mM. Với khoảng nồng độ Fe(II) thí nghiệm từ 1mM – 15 mM, cường độ dòng điện tỷ lệ thuận với nồng độ Fe(II) trong môi trường đầu vào theo quan hệ tuyến tính với hệ số hồi quy đạt 0,955. Kết quả phân lập vi sinh và kết quả lai huyết quang tại chỗ (FISH) cho thấy sự chiếm ưu thế của vi khuẩn sắt trong dịch anode của thiết bị. Các kết quả trên bước đầu khẳng định khả năng của thiết bị như một cảm biến sinh học phát hiện sắt, nhờ hoạt tính của các vi khuẩn sắt đã được làm giàu trong thiết bị.

Từ khóa: pin nhiên liệu vi sinh vật, vi khuẩn sắt, cảm biến sinh học, phát hiện kim loại

MỞ ĐẦU

Ở nhiều vùng nông thôn Việt Nam, vì không có điều kiện sử dụng nước sạch, người dân phải dựa vào các nguồn nước ngầm mà phần nhiều bị ô nhiễm bởi các kim loại. Theo một nghiên cứu gần đây, hàm lượng các kim loại có hại như sắt, mangan và asen trong nhiều nguồn nước ngầm ở miền Bắc Việt Nam đã cao ở mức báo động (Winkel LHE *et al.*, 2011). Việc tiếp xúc thường xuyên với các nguồn nước chứa hàm lượng lớn các kim loại này sẽ dẫn đến nhiều hậu quả bệnh lý, đặc biệt là đối với hệ thần kinh. Các phân tích để phát hiện các kim loại này đòi hỏi phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm và khá mất thời gian hoặc tốn kém. Vì vậy, một thiết bị cảm biến sinh học, có thể dùng nhiều lần và có thể phát hiện tại chỗ sự có mặt của các kim loại này trong nước ngầm, sẽ có ý nghĩa rất lớn, giúp người dân nông thôn đánh giá nguồn nước ngầm họ định sử dụng với chi phí không quá cao, góp phần cải thiện cuộc sống của họ. 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.

Pin nhiên liệu vi sinh vật (microbial fuel cell) (MFC) thuộc nhóm các hệ sinh điện hóa (bioelectrochemical systems – BESs), trong đó vi sinh vật đóng vai trò xúc tác cho các phản ứng điện hóa thông qua tương tác của chúng với các điện cực (Rabaey K và Verstraete W, 2005). Trong một pin nhiên liệu vi sinh vật, ở cực âm (anode), nhờ các vi sinh vật có hoạt tính phân hóa đã được làm giàu, các cơ chất được oxy hóa và điện tử sinh ra được truyền cho điện cực. Điện tử sau đó di chuyển theo chênh lệch thế oxy hóa khử qua một mạch ngoài từ cực âm sang cực dương, và được tiếp nhận bởi chất nhận điện tử cuối cùng, thường là oxy, ở cực dương. Như vậy, trong một pin nhiên liệu vi sinh vật, hóa năng trong các liên kết hóa học trong cơ chất được chuyển hóa thành điện năng nhờ hoạt tính của các vi sinh vật (Rabaey K và Verstraete W, 2005). Đồng thời, dòng điện tạo ra bởi thiết bị tương đối tỷ lệ thuận với nồng độ/hàm lượng các cơ chất. Trong trường hợp cơ chất là các chất hữu cơ trong nước thải, nồng độ/hàm lượng cơ chất được thể hiện bằng chỉ số BOD. Vì vậy, MFC đã được nghiên cứu và thử nghiệm để làm cảm biến sinh học đo chỉ số BOD (BOD sensor) để đánh giá hàm lượng chất hữu cơ trong nước thải, ở Hàn Quốc, từ năm 1999 (Chang IS *et al.*, 2004; Kim BH *et al.*, 2003).

Một điều đáng lưu ý là tập hợp vi sinh vật được làm giàu trong một MFC có tính đặc thù cao với cơ chất được cung cấp. Kim và cs. đã chứng minh khi sử dụng nước thải làm cơ chất đầu vào thì do nước thải chứa nhiều loại chất hữu cơ đa dạng, tập hợp vi sinh vật được làm giàu trong MFC thường là các vi sinh vật đa dưỡng, phát triển trên môi trường giàu dinh dưỡng (copiotrophic) (Chang IS *et al.*, 2004). Ngược lại, các vi sinh vật đặc thù với môi trường nghèo dinh dưỡng (oligotrophic) tại được làm giàu khi MFC được cung cấp nước thải nhân tạo với hàm lượng BOD thấp ở đầu vào (Phung NT *et al.*, 2004). Trong nhiều nghiên cứu khác khi những cơ chất đặc biệt như acetat, hay fuc-mat được sử dụng thì tập hợp vi sinh vật được làm giàu trong các MFC đều mang tính đặc hiệu cơ chất cao (Ha PT *et al.*, 2008; Lee JY *et al.*, 2003).

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 đề xuất phương án làm giàu các vi khuẩn sắt trong MFC để phát triển cảm biến sinh học giúp phát hiện kim loại như sắt và mangan trong các mẫu nước. Khả năng phát hiện kim loại dựa trên các đặc tính đặc biệt của các vi khuẩn sắt. Vi khuẩn sắt, đa số thuộc nhóm vi khuẩn hóa dưỡng vô cơ kỵ khí tùy tiện, có khả năng thu năng lượng cho hoạt động sống và trao đổi chất của chúng thông qua việc oxy hóa ion sắt (II) thành sắt (III), hoặc ion mangan với số oxy hóa thấp thành ion với số oxy hóa cao (Madigan MT *et al.*, 2004). Chính vì vậy, một MFC được làm giàu thành công với các vi khuẩn này sẽ có khả năng phát hiện sắt và mangan trong nước ngầm. Các MFC thường nhỏ gọn, có thể được dễ dàng vận chuyển, có thể sử dụng được nhiều lần, nên rất phù hợp để sử dụng làm cảm biến sinh học phát hiện tại chỗ các kim loại trên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu tìm hiểu khả năng làm giàu vi khuẩn sắt trong thiết bị MFC và khả năng cảm biến phát hiện sắt của thiết bị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chế tạo và vận hành pin nhiên liệu vi sinh vật

Hai thiết bị pin nhiên liệu vi sinh vật được chế tạo theo mô hình của Trung tâm Quốc gia Anh và Giáo dục Công nghệ sinh học (National Centre for Biotechnology Education) (Allen RM và Bennetto HP, 1993) nhưng với kích thước nhỏ hơn để phù hợp hơn với mục đích sử dụng làm cảm biến sinh học. Cụ thể, mỗi thiết bị bao gồm 2 khung perlex lớn kích thước 12 cm × 12 cm × 2 cm, 2 khung nhỏ (của khoang anode và cathode) với kích thước 8 cm × 8 cm × 1,5 cm, ở giữa khung dạng hình vuông kích thước 5 cm × 5 cm. Các hạt than chì đường kính 3-5 mm (Aelsterman P et al., 2006) được sử dụng như điện cực, được đặt lấp đầy mỗi khoang, đảm bảo tiếp xúc với nhau và tiếp xúc với một que than chì (đường kính 5mm) được gắn vào khung lớn và thông ra bên ngoài. Giữa các khung có các tấm lót cao su để đảm bảo độ kín chặt của các khoang anode và cathode. Màng Nafion N117 (DuPont, Hoa Kỳ) kích thước 6cm × 6cm được sử dụng để ngăn cách khoang anode và cathode. Thiết bị được lắp ráp và cố định nhờ ốc vít bu-lông xuyên qua 4 điểm ở mỗi khung lớn. Các đầu điện cực que than chì được nối với ngàm cá sấu và dây dẫn điện (đường kính 1 mm) và nối với một điện trở mạch ngoài (10 ohm).

Để tạo đường vào và ra cho dịch anode và cathode, các khung lớn ở anode và cathode được khoan lỗ và ống nhựa PVC đường kính 5cm được gắn vào các lỗ đó. Ống dẫn dịch vào anode được nối qua ống nhỏ giọt với bình chứa môi trường M9 cải tiến (Clauwaert P et al., 2007) (0,44 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, 0,34 g $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{L}$, 0,5 g NaCl/L , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 0,0146 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, pH 7). Bình chứa môi trường được súc khí N_2 từ 30:60 phút để đuổi hết khí O_2 (chất nhận điện từ cạnh tranh tiềm tàng) trước khi cấp vào anode của mỗi thiết bị.

Thiết bị được vận hành theo mẻ (batch mode). Khi bắt đầu một mẻ, Fe(II) dưới dạng dung dịch FeCl_2 được cung cấp cùng với dịch các nguyên tố vi lượng (thành phần theo (Clauwaert P et al., 2007)) vào khoang anode, bằng xi-lanh qua một ống chữ T trên ống dẫn dịch vào anode. Thể tích và nồng độ dịch FeCl_2 được tính toán sao cho nồng độ Fe(II) cuối cùng trong khoang anode sẽ đạt được giá trị cần thử nghiệm. Thể tích dịch vi lượng được tính toán sao cho nồng độ cuối cùng đạt 0,1% (v/v) dịch anode. Tiếp đó, dung dịch M9 (bệt trùng, đã súc khí N_2) được hút từ bình một trường bằng xi-lanh, cũng qua ống chữ T trên, rồi được bơm vào khoang anode của thiết bị. Thể tích bơm được tính sao cho mỗi lần, 1/2 dịch trong khoang anode được thay mới (khoảng 20 mL). Sau cùng, HCO_3^- nguồn cac-bon cho vi khuẩn sắt, được cung cấp dưới dạng dung dịch NaHCO_3 vào khoang anode, theo cách tương tự như cách Fe(II) được cung cấp, sao cho đạt nồng độ cuối cùng trong dịch anode là 2 g/L (Clauwaert P et al., 2007). Cách cung cấp các thành phần dịch anode như trên đảm bảo tránh sự tạo thành các muối carbonate kết tủa trong dịch anode. Ở khoang cathode, trước khi mở vận hành, dịch cathode được thay mới đơn giản bằng cách hút và bơm dung dịch đệm (4,4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, 3,4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{L}$, 0,5 g NaCl/L) mới vào. Khoang cathode được súc khí bằng máy súc khí SL-2800 (Silver Lake, Trung Quốc) để cung cấp O_2 (chất nhận điện từ ưu tiên), tốc độ súc khí được điều chỉnh vào phải để tránh dòng dịch cathode bay hơi quá nhanh. Một mẻ vận hành được tính từ lúc bắt đầu cấp dịch vào anode cho đến khi dòng điện sinh ra giảm về giá trị ban đầu (thường khoảng 2 h).

Đo đạc và tính toán các thông số điện

Thiết bị điện kế (model DT9205A+, Honeytek, Hàn Quốc) được sử dụng để đo hiệu điện thế ở hai đầu điện trở. Cường độ dòng điện I (A) sinh ra được tính theo công thức vật lý cơ bản: $I = U/R$, trong đó U (V) là hiệu điện thế ở hai đầu điện trở mạch ngoài, R (ohm) là điện trở mạch ngoài. Tương tự, điện lượng Q (C) = $I_0 \times t$, trong đó I_0 (A) là cường độ dòng điện trung bình của một mẻ vận hành, t (s) là thời gian theo dõi (một mẻ vận hành).

Trừ phi được giải thích cụ thể, các giá trị cường độ dòng điện trung bình và điện lượng trình bày trong báo cáo này đều là kết quả của 3 lần lặp lại thí nghiệm (3 mẻ vận hành).

Quy trình làm giàu vi khuẩn sắt trong thiết bị

Các thiết bị pin nhiên liệu vi sinh vật (MFC) sau khi chế tạo, được kiểm tra để đảm bảo không rò rỉ, các kết nối đảm bảo tiếp xúc tốt. Một thiết bị (MFC1) được sử dụng làm đối chứng; một thiết bị khác (MFC2) được sử dụng làm thiết bị thử nghiệm. Quá trình làm giàu được thực hiện chỉ với MFC2. Trong 3 ngày vận hành đầu tiên, dịch anode cấp vào thiết bị được bổ sung nguồn vi sinh vật; 1mL dịch M9 trộn đều với phần cân sau ly tâm (và rửa bằng dịch M9) của 2 mL dịch bùn tự nhiên (lấy dưới độ sâu 20cm tại một cơn suối có màu nước vàng óng đặc trưng của khu vực có nhiều sắt tại xã Đồng Tân, huyện Ứng Hòa, thành phố Hà Nội). Đối với MFC1, quá trình vận hành được diễn ra mà không có sự bổ sung nguồn vi sinh vật.

Trong vòng hai tuần, dòng điện sinh ra bởi các thiết bị liên tục được theo dõi và mẫu dịch anode (2 mL) của mỗi thiết bị được lấy mỗi ngày để phục vụ các phân tích vi sinh và sinh học phân tử.

Các phương pháp vi sinh

Vi sinh vật trong khoang anode của các thiết bị được phân tích theo phương pháp truyền thống (pha loãng và nước cấy trên đĩa petri) trên môi trường Luria-Bertani (LB) và môi trường Winogradsky (0,5 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, 0,5 g NaNO_3/L , 0,2 g CaCl_2/L , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 0,5 g $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{L}$, 6 g Ammonium Ferric Citrat/L; 16 g agar/L). Các khuẩn lạc được quan sát sau 24 h nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C.

Phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ (FISH)

Các mẫu cần phân tích được cố định theo quy trình sau: 1 mL mẫu được trộn với 0,1 mL PBS (đệm phot-phat, pH 7); 1 mL formaldehyde 37% được bổ sung vào mẫu và giữ ở 4°C trong thời gian ít nhất là 30 phút nhưng không quá 24 giờ. Hỗn hợp này sau đó được ly tâm loại bỏ phần dịch và tiếp theo phần cận tế bào được rửa lại bằng PBS. Sau đó dịch huyền phù lại được ly tâm loại bỏ PBS và phần cận tế bào được bổ sung 1,5 mL hỗn hợp dung dịch ethanol/PBS (1:1). Mẫu đã cố định được bảo quản tại -20°C.

Các mẫu đã cố định được lai với mẫu dò theo quy trình sau: 20 μL mỗi mẫu được hòa với 2 mL nước cất vô trùng và đưa lên màng polycarbonate. Mẫu trên màng polycarbonate được để khô tự nhiên trong không khí. Để chuẩn bị cho quá trình lai, 2 μL mẫu dò PSI được trộn với 18 μL đệm lai (bao gồm 180 μL NaCl 5M/mL; 20 μL Tris-HCl 1M/mL; 350 μL

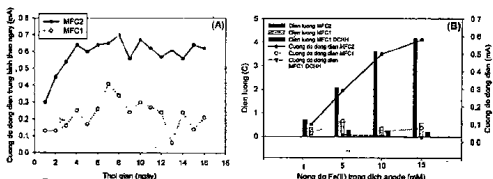
formamide/mL, và 1 μ L SDS 10%/mL bổ sung sau cùng để tránh kết tủa), giữ trong đá và tránh ánh sáng. Mẫu do PS1 (cung cấp bởi Integrated DNA Technologies) bao gồm đoạn oligonucleotide PS1 có trình tự (5'-AC GGU AGA GGA GCA AUC -3') đặc hiệu với nhiều vi khuẩn sắt (Siening PL và Ghiorse WC, 1997), gắn với chất phát tín hiệu huỳnh quang Cy3. Màng polycarbonate mang mẫu đã khô được đặt lên lam kính và được nhỏ dung dịch đệm lại chứa mẫu đã lên trên trước khi được ủ trong buồng lai ở 46°C trong 1,5 - 3 giờ. Sau khi lai, màng mang mẫu được chuyển nhanh sang đệm rửa (bao gồm: 800 μ L NaCl 5M; 1 mL Tris/HCl 1M; 0,5 mL EDTA 0,5M; nước cất vô trùng dần tới 50 mL; và 50 μ L SDS 10% bổ sung sau cùng để tránh kết tủa) đã được làm nóng trong bể ổn nhiệt tại 48°C, trong 15 phút. Sau đó, màng mang mẫu được nhúng trong nước cất vô trùng trong vài giây và được đặt lên giấy thấm cho khô (mặt có mẫu lên trên). Tiếp đó, mỗi mẫu được nhỏ 50 μ L dung dịch thuốc nhuộm DAPI lên trên, giữ 3 phút trong tối; sau đó được rửa nhanh trong nước cất vô trùng và rửa trong ethanol 80% trong vài giây, rồi để khô tự nhiên trong không khí (trong buồng tối). Cuối cùng, mẫu được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Carl-Zeiss, Đức) có trang bị kính lọc chuyên biệt cho tín hiệu từ Cy3. Kính hiển vi này cũng cho phép quan sát tín hiệu từ DAPI nhờ kính lọc blue/cyan.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự sản sinh dòng điện của các pin nhiên liệu vi sinh vật và vai trò của vi sinh vật điện hóa được làm giàu

Chỉ trong 1-2 ngày đầu của quá trình làm giàu, ở thiết bị pin nhiên liệu vi sinh vật MFC2 (với nguồn vi sinh vật làm giàu từ bùn tự nhiên) đã thấy xuất hiện dòng điện sản sinh trong khi dòng điện ở đối chứng MFC1 là thấp (Hình 1(A)). Sau 2 tuần vận hành với nguồn chất cho điện tử duy nhất là Fe(II) ở nồng độ 20 mM, thiết bị sản sinh dòng điện ổn định với giá trị trung bình là khoảng 0,6 mA (Hình 1(A)). Trong khi đó, dòng điện do đối chứng sinh ra ổn định ở mức trung bình khoảng 0,2 mA. Sự khác biệt duy nhất giữa hai MFC là ở nguồn giống ban đầu cung cấp cho MFC2. Vì vậy, các kết quả trên gợi ý rằng dòng điện sinh ra ở MFC2 chính là nhờ các vi sinh vật điện hóa được làm giàu từ nguồn ban đầu; trong khi dòng điện sinh ra ở đối chứng (vẫn ở mức nhỏ) có thể là do vi sinh vật trong môi trường xâm nhập vào anode của MFC1 và thích nghi dần nhưng với hoạt tính chuyên biệt không mạnh bằng các vi sinh vật trong MFC2.

Thông thường, khoảng thời gian để các quần xã vi sinh vật điện hóa trong MFC được hình thành và ổn định là khoảng 2 tuần (Kim BH et al., 2003; Rabaei K và Verstraete W, 2005). Mô hình phát sinh dòng điện của MFC2 từ lúc bắt đầu làm giàu đến thời điểm 2 tuần sau đó (ổn định) cũng tương tự với mô hình phát sinh dòng điện điển hình trong quá trình làm giàu của một pin nhiên liệu vi sinh vật (Rabaei K và Verstraete W, 2005). Kết quả này bước đầu thể hiện rằng thiết bị của chúng tôi đã có những đặc điểm và chức năng giống như một pin nhiên liệu vi sinh vật: sinh dòng điện, có thể trên cơ sở sự hình thành/làm giàu một tập hợp vi sinh vật điện hóa trong anode.



Hình 1. (A) Đồ thị thể hiện sự phát sinh dòng điện bởi MFC2 và đối chứng MFC1 trong giai đoạn làm giàu vi khuẩn điện hóa sử dụng Fe(II) làm nguồn cho điện tử. (B) Quan hệ tương quan giữa điện lượng sinh ra (trong 1 mã vận hành) và cường độ dòng điện với nồng độ Fe(II) trong dịch anode của MFC2 và đối chứng MFC1. Ghi chú: MFC2 được bổ sung nguồn vi sinh vật (bùn tự nhiên) trong 3 ngày đầu vận hành. MFC1 (đối chứng) không được bổ sung nguồn vi sinh vật. MFC1 DCHH ("đối chứng hóa học") thể hiện phản ứng của MFC1 sau khi được khử trùng (khoảng anode) bằng ethanol 70% trong 24 h; trạng 3 lần bằng môi trường M9 vô trùng và thử với các nồng độ Fe(II) khác nhau ngay trong 3h đầu tiên (trong điều kiện coi như vô trùng - chỉ có phản ứng hóa học phi sinh học diễn ra). Các MFC được vận hành với ở 25°C với điện trở mạch ngoài 10 ohm.

Thật vậy, vai trò của của vi sinh vật điện hóa thể hiện rõ khi so sánh mối tương quan dòng điện - nồng độ Fe(II) ở MFC2 và ở đối chứng MFC1. Đáng chú ý là, điện lượng sinh ra (trong 1 mã vận hành) bởi MFC2 có phản ứng tăng giảm tương ứng rất rõ ràng với sự tăng giảm nồng độ Fe(II) trong dịch anode; trong khi đó điện lượng sinh ra bởi MFC1 hoàn toàn không thể hiện sự tương ứng (Hình 1(B)). Để loại bỏ khả năng dòng điện sinh ra có thể chỉ là do phản ứng hóa học, một thí nghiệm đối chứng khác được thực hiện: khoảng anode của MFC1 được khử trùng bằng ethanol 70% trong 24h, trạng 3 lần bằng môi trường M9 vô trùng và thử với các nồng độ Fe(II) khác nhau ngay trong 3h đầu tiên (trong điều kiện coi như vô trùng - đã kiểm chứng bằng nuôi cấy khuẩn lạc trên đĩa thạch Winogradsky - dữ liệu không báo cáo). Trong điều kiện như vậy, khi mà chỉ có phản ứng hóa học phi sinh học diễn ra, điện lượng cũng như cường độ dòng điện sinh ra là không đáng kể (Hình 1(B), MFC DCHH). Kết quả này chứng tỏ lượng điện sinh ra bởi sự o-xi hóa hóa học Fe(II) một cách tự nhiên là rất thấp, và chỉ đóng góp một tỷ lệ không đáng kể vào lượng điện sinh ra của thiết bị MFC2. Điều này cũng có nghĩa là dòng điện sinh ra bởi MFC2 chủ yếu là do sự khác biệt của thiết bị này: có vi sinh vật điện hóa được làm giàu trong anode.

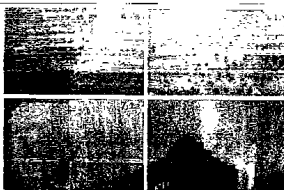
Các kết quả trên chỉ ra rằng thiết bị MFC2 đã được phát triển thành một dạng pin nhiên liệu vi sinh vật với dòng điện sinh ra nhờ sự có mặt và/hoặc hoạt tính của các vi sinh vật điện hóa được làm giàu.

Vi khuẩn sắt trong thiết bị MFC phản ứng với Fe(II) (MFC2)

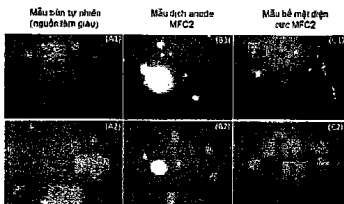
Để tìm hiểu về vi sinh vật trong khoang anode của MFC2, chúng tôi tiến hành các phân tích vi sinh theo các phương pháp truyền thống nhằm so sánh các vi sinh vật ở anode của MFC2 và anode của đối chứng MFC1. Kết quả phân lập trên môi trường LB và môi trường Winogradsky cho thấy chỉ có vi khuẩn có mặt trong khoang anode của các MFC này. Từ khoang anode của MFC2 chúng tôi phân lập được 7 chủng vi khuẩn đều thể hiện hình thái khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn sắt trên môi trường Winogradsky: khuẩn lạc màu nâu vàng hoặc nâu đỏ, đa số có ánh dầu (Hình 2). Trong khi đó, từ khoang anode của MFC1, chúng tôi chỉ phân lập được 4 chủng vi khuẩn trong đó có 3 chủng có hình thái khuẩn lạc giống vi khuẩn sắt.

Để khẳng định sự có mặt của vi khuẩn sắt trong khoang anode của MFC2, chúng tôi thực hiện phương pháp lai huỳnh quang tại chỗ sử dụng mẫu dò PS1 đặc hiệu chung cho nhiều vi khuẩn sắt (Stering PL và Ghiorse WC, 1997). Kết quả (Hình 3A1, 3A2) cho thấy trong mẫu nguồn làm giàu (bùn tự nhiên), với mật độ tế bào thưa thớt, vi khuẩn sắt không chiếm ưu thế. Trong khi đó, trong dịch anode của MFC2, vi khuẩn sắt thể hiện sự có mặt ưu thế, chiếm tỷ lệ cao trong tổng số vi sinh vật có mặt trong anode (Hình 3B1, 3B2). Một điều đáng ngạc nhiên là vi khuẩn sắt không có mặt nhiều trên bề mặt điện cực anode của MFC2 (Hình 3C2).

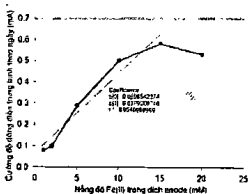
Các kết quả trên gợi ý rằng vi khuẩn sắt chủ yếu chỉ có mặt và chiếm ưu thế trong phần dịch anode chứ không phải trên bề mặt điện cực anode của thiết bị thử nghiệm (MFC2). Điều này dẫn đến một giả thuyết là: Vi khuẩn sắt không truyền điện từ trực tiếp đến điện cực. Trong các công trình về sự truyền điện từ trực tiếp cho điện cực (bằng protein ngoài màng hoặc bằng nanowire), các tế bào vi khuẩn luôn được quan sát thấy có sự gắn kết với bề mặt điện cực (Kim BH *et al.*, 2003; Rabaey K và Verstraete W, 2005). Như vậy, có hai giả thuyết đặt ra về vai trò của vi khuẩn sắt trong anode của thiết bị. Giả thuyết thứ nhất là vi khuẩn sắt truyền điện từ đến điện cực thông qua một chất truyền điện từ do chúng sinh ra (vi trong môi trường không có một chất trung gian truyền điện từ liên quan năng lượng). Cơ chế này đã được phát hiện ở nhiều MFC vận hành với các vi khuẩn điện hóa khác (Rabaey K và Verstraete W, 2005), ví dụ như *Pseudomonas aeruginosa*. Giả thuyết thứ hai là vi khuẩn sắt sử dụng năng lượng từ sự ô-xi hóa sắt để tổng hợp cơ chất có thể sử dụng được bởi một loại vi khuẩn khác tương tác trực tiếp với điện cực. Tuy nhiên, xét mức năng lượng thấp từ được từ sự ô-xi hóa sắt, cùng với quan sát rằng trên bề mặt điện cực cũng rất nghèo vi sinh vật, giả thuyết này kém thuyết phục hơn.



Hình 2. Hình ảnh khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn phân lập từ MFC2 trên môi trường Winogradsky. Màu nâu ánh dầu của khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn sắt. (Ghi chú: ở góc mỗi hình là số hiệu chủng).



Hình 3. Kết quả phân tích vi khuẩn sắt trong thiết bị bằng kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ. Từ trái qua phải lần lượt là hình ảnh tương ứng của các mẫu: bùn tự nhiên (nguồn làm giàu) (A), dịch anode của MFC2 (B), và bề mặt điện cực anode của MFC2 (C). Các hình ở trên (1) là các ảnh hiển vi tổng hợp tín hiệu huỳnh quang từ DAPI, phản ánh sự có mặt của toàn bộ vi sinh vật trong mẫu. Các hình ở dưới (2) là các ảnh hiển vi tổng hợp tín hiệu huỳnh quang từ Cy3, phát ra từ đầu dò PS1; phản ánh sự có mặt của vi khuẩn sắt trong mẫu. (Bar ở hình A1 tương đương 5 μ m).



Hình 4. Đồ thị biểu diễn quan hệ giữa cường độ dòng điện với nồng độ Fe(II) trong dịch anode của MFC 2. Đường thẳng đứt đoạn là đường hồi quy thể hiện quan hệ trên trong khoảng nồng độ Fe(II) ≤ 15 mM. Các hệ số trong hình là các hệ số của phương trình hồi quy, bao gồm cả giá trị R^2 . Các giá trị cường độ dòng điện trung bình là kết quả của ba lần lặp lại thí nghiệm.

Khả năng cảm biến Fe (II) của thiết bị

Để đánh giá khả năng cảm biến phát hiện Fe(II) của MFC2, thiết bị được thử nghiệm với các nồng độ Fe(II) khác nhau. Kết quả (Hình 4) cho thấy dòng điện sinh ra có quan hệ tuyến tính với nồng độ Fe (II) trong dịch anode của thiết bị (MFC2) trong khoảng nồng độ Fe(II) từ 1-15 mM. Phương trình hồi quy phản ánh quan hệ giữa cường độ dòng điện với nồng độ Fe(II) có thể được tính toán như sau: $I(\text{mA}) = [\text{Fe}](\text{mM}) \times 0,06 + 0,038$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,9955$ (chấp nhận được). Tuy vậy, nồng độ Fe(II) trên 15 mM, dòng điện có biểu hiện không tiếp tục tăng mà có phần giảm dần. Điều này, cho thấy thiết bị có thể được áp dụng tốt nhất để đo nồng độ Fe(II) trong khoảng nồng độ là dưới 15 mM.

Một trong những nguyên nhân khiến dòng điện sinh ra bởi MFC2 không tiếp tục tăng (thậm chí giảm) ở nồng độ Fe(II) >15 mM có thể là độc tính của sắt (khi đạt nồng độ nhất định) đối với vi khuẩn. Đã có một số công bố cho thấy các kim loại có thể ảnh hưởng làm suy giảm hoạt động trao đổi chất ở vi khuẩn. Tuy nhiên, cũng không loại bỏ khả năng dòng điện không tăng chỉ là do nồng độ Fe(II) tăng vượt quá mức độ tối đa mà vi khuẩn sắt có thể ô-xi hóa.

Sự không tuyến tính của dòng điện với nồng độ cơ chất ở dải nồng độ cơ chất cao cũng được quan sát thấy đối với thiết bị MFC dạng BOD sensor (cảm biến đo BOD), phát triển bởi Kim và cs. (Kim BH et al., 2003). Thiết bị này cho dòng điện có cường độ ở mức "bão hòa" khi giá trị BOD vượt hơn 100 ppm. Kim và cs. nhận xét rằng nếu sử dụng điện lượng làm chỉ số đánh giá thì quan hệ tuyến tính vẫn đạt được tới nồng độ 200 ppm BOD nhưng thời gian đo khá dài (lên đến 10h). Tuy vậy, một giải pháp đơn giản nhất để khắc phục là pha loãng mẫu có nồng độ cơ chất cao. Cách làm này cũng có thể được áp dụng cho thiết bị của chúng tôi. Như vậy, về cơ bản, phản ứng của thiết bị MFC (MFC2) do chúng tôi phát triển với nồng độ Fe(II) khá giống với phản ứng của thiết bị BOD sensor nói trên với BOD. Thiết bị BOD sensor đã được ứng dụng thực tế tại Hàn Quốc (Kim BH et al., 2003). Thêm vào đó, MFC2 thể hiện độ lặp lại khá cao với sự chênh lệch giữa các lần đo khác nhau cho cùng một nồng độ Fe(II) không quá 10% giá trị cường độ dòng điện (dữ liệu không báo cáo). Vì vậy, thiết bị MFC chứa vi-khuẩn sắt được làm giàu thể hiện nhiều tiềm năng sử dụng như một cảm biến sinh học phát hiện sắt.

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã bước đầu cho thấy vi khuẩn sắt đã được làm giàu thành công trong thiết bị pin nhiên liệu vi sinh vật. Giả thuyết hiện tại về hoạt tính của các vi khuẩn này là: chúng ô-xi hóa Fe(II) trong dịch anode, thu điện tử và electron khác nhau của điện tử này được truyền đến điện cực nhờ một chất truyền điện tử trung gian do các vi khuẩn sắt sinh ra. Thiết bị pin nhiên liệu chứa các vi khuẩn sắt được làm giàu này đã bước đầu thể hiện các đặc điểm của một cảm biến sinh học phát hiện nhanh Fe(II) có mặt trong mẫu dịch anode.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.03-2012.06. Đồng thời, nghiên cứu cũng được hỗ trợ bởi chương trình Alumni Project của Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc (KIST) và quỹ International Foundation for Science (Thụy Điển). Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn TS. Đinh Thủy Hằng, tập thể phòng thí nghiệm Sinh thái học Vi sinh vật – Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học – ĐHQGHN, và TS. Nguyễn Kim Nữ Thảo vì những giúp đỡ quý báu trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aalsterman P, Rabeyek K, Pham HT, Boon N, and Verstraete W (2006). Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 40(10), 3358-3394.
- Allen RM, and Bannett HP (1993). Microbial fuel cells - Electricity production from carbohydrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39, 27-40.
- Chang IS, Jang JK, Gil GC, Kim M, Kim HJ, Cho BW, and Kim BH (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 19(6), 607-613.
- Claussent P, Rabeyek K, Aalsterman P, De Schampelaere L, Ham TH, Boeckx P, Boon N, and Verstraete W (2007). Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 41(9), 3354-3360.
- Ha PT, Tae B, and Chang IS (2008). Performance and bacterial consortium of microbial fuel cell fed with formate. *Energy & Fuels*, 22(1), 164-168.
- Kim BH, Chang IS, Gil GC, Park HS, and Kim HJ (2003). Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnology Letters*, 25(7), 541-545.
- Lee JY, Phung NT, Chang IS, Kim BH, and Sung HC (2003). Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *Fems Microbiology Letters*, 223(2), 185-191.
- Madigan MT, Martinko J, and Parker J (2004). *Brook Biology of Microorganisms*, 10 ed., 991 pp., Pearson Education Inc., NJ.
- Phung NT, Lee J, Kang KH, Chang IS, Gadd GM, and Kim BH (2004). Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *Fems Microbiology Letters*, 233(1), 77-82.
- Rabeyek K, and Verstraete W (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291-298.
- Siering PL, and Giorse WC (1997). Development and application of 16S rRNA-targeted probes for detection of iron- and manganese-oxidizing sheathed bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 644-651.
- Winkel LHE, Trang PTK, Lan VM, Stengel C, Amin M, Ha NT, Viet PH, and Berg M (2011). Arsenic pollution of groundwater in Vietnam exacerbated by deep aquifer exploitation for more than a century. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1246-1251.

PRELIMINARY STUDY ON DEVELOPING A MICROBIAL FUEL CELL ENRICHED WITH IRON BACTERIA TO BE USED AS AN ON-SITE DETECTOR FOR IRON IN WATER SOURCES

Hal Pham*, Thuy Nguyen, Phuong Tran*, Tha Luong*

University of Sciences, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

In many rural areas in Vietnam, having no access to clean water, people have to use ground water as their water sources, many of which are contaminated with metals such as iron, manganese and arsenic. Currently, the detection of these metals in water samples is complicated and costly. A microbial fuel cell (MFC) typed reactor with iron bacteria enriched in its anode compartment could be promisingly used as an on-site biosensor to detect these metals with a simple procedure. In this study, we preliminarily investigated the possibility of enriching iron bacteria in a MFC and the capability of such a MFC to detect Fe(II, #757). After two weeks of start-up, our MFC typed reactor generated an average electrical current of 0.6 mA, while being operated with an inflow containing Fe(II, #757) at the concentration of 20 mM. With the inflow Fe(II, #757) concentration ranging from 1-15 mM, the generated current was proportional to the Fe(II, #757) concentration in a linear relation ($R^2 = 0.955$). Results of microbial isolation and fluorescent DNA hybridization experiments demonstrated the dominant presence of iron bacteria in the analyte of our reactor. The results, altogether, proved the capability of the device as a biosensor detecting iron, owing to the electrochemical activity of the iron bacteria enriched in its anode.

Keywords: microbial fuel cell, iron bacteria, biosensor, detection of metals

*Author for correspondence: email: hal.phamthe@gmail.com