

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO KHÍ HYDRO SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN Tr2 PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM TRONG ĐIỀU KIỆN VI HIẾU KHÍ

Đặng Thị Yến, Vương Thị Nga, Lại Thuý Hiền, Nguyễn Thị Thu Huyền*

Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

*Email: ntthuyen@ibt.ac.vn hoặc huyen308@gmail.com

Đến Tòa soạn: 2/4/2013; Chấp nhận đăng: 7/11/2013

TÓM TẮT

Năng lượng hydro đại diện cho một nguồn năng lượng sạch và bền vững trong tương lai. Quá trình sản xuất hydro bằng con đường lên men tối nhờ vi khuẩn mang lại hy vọng mới cho ngành công nghiệp năng lượng của thế giới. Trong nghiên cứu này, một số chủng vi khuẩn có khả năng tạo khí hydro sinh học đã được phân lập từ phân gia súc tại Việt Nam. Trong đó, chủng vi khuẩn Gram âm Tr2 được tuyển chọn do chủng này có khả năng tạo khí hydro cao nhất trong điều kiện nuôi cấy vi hiếu khí. Các yếu tố môi trường khác nhau (tuổi của giống, tỉ lệ giống, nguồn cacbon, nitơ, sắt, NaCl, nhiệt độ và pH) đã ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2. Điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 gồm các thông số sau: 10 % giống đầu vào đang ở giai đoạn giữa pha log, 10 g/l glucose, 3 g/l cao men, 100 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 6.5 và nuôi cấy ở 30 °C. Kết quả bước đầu của nghiên cứu này chứng tỏ tiềm năng ứng dụng chủng Tr2 cho quá trình lên men thu khí hydro từ vi khuẩn phân lập tại Việt Nam là khả thi.

Từ khóa: sản xuất hydro sinh học, vi khuẩn lên men, lên men tối, điều kiện vi hiếu khí, Việt Nam

1. MỞ ĐẦU

Nguồn năng lượng chính hiện nay mà con người sử dụng trong sinh hoạt và sản xuất là nguồn năng lượng hoá thạch: than đá, dầu mỏ, khí đốt. Quá trình đốt cháy năng lượng hoá thạch thải ra một lượng lớn khí CO_2 vào bầu khí quyển. Ngay từ năm 1896, Svante Arrhenius đã chứng minh rằng lượng CO_2 trong khí quyển tăng lên gấp đôi thì nhiệt độ trái đất tăng lên 5 – 6 °C. Từ 1990 - 2001, nhiệt độ tăng lên 1,4 - 5,8 °C, điều này kéo theo các hiện tượng thời tiết khắc nghiệt: hạn hán, lũ lụt, băng tan, nước biển dâng... [1]. Nền kinh tế ngày càng phát triển thì nhu cầu sử dụng năng lượng ngày càng tăng, năng lượng dùng trong sinh hoạt, năng lượng dùng chiếu sáng, năng lượng dùng trong giao thông vận tải, năng lượng sản xuất. Theo dự báo của Cơ quan Năng lượng Thế giới (IEA), trong vòng 24 năm từ 2001 - 2025 mức tiêu thụ năng lượng hóa thạch trên toàn thế giới tăng lên 54 %, nhu cầu tiêu thụ chủ yếu là các quốc gia đang phát triển: Trung Quốc, Hàn Quốc, Ấn Độ,... trong đó có Việt Nam.

Đứng trước yêu cầu thực tiễn, đòi hỏi các nhà khoa học cần tìm ra một nguồn năng lượng mới có khả năng tái tạo, thân thiện với môi trường và đáp ứng nhu cầu năng lượng của thế giới. Năng lượng hydro là một ứng cử viên sáng giá đáp ứng yêu cầu này. Đây là nguồn năng lượng sạch, quá trình đốt cháy hydro không thải ra khí CO₂ hoặc CO, do đó không gây ô nhiễm môi trường, không gây hiệu ứng nhà kính và đảm bảo đáp ứng nhu cầu năng lượng của thế giới. Có nhiều phương pháp sản xuất hydro, trong đó phương pháp sinh học sản xuất hydro bởi các vi khuẩn dị dưỡng lên men tối (dark fermentation) hứa hẹn một hướng đi mới cho ngành công nghiệp năng lượng thế giới. Bởi vì quá trình lên men tối có các ưu điểm nổi bật như không cần ánh sáng, tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn nhanh, năng suất cao và ổn định, kỹ thuật vận hành và kiểm soát quy trình đơn giản, yêu cầu năng lượng thấp, giá thành vận hành thấp, giảm thiểu tối đa ô nhiễm môi trường, khả năng ứng dụng sản xuất công nghiệp cao [2, 3, 4, 5]. Hơn nữa, nguồn nguyên liệu tái tạo biomass (nguồn phế thải nông nghiệp, công nghiệp chế biến...) có thể sử dụng làm cơ chất cho quá trình lên men sinh khí hydro. Chính vì vậy, trong đề tài này, chúng tôi tập trung phân lập và tuyển chọn cũng như nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men sinh khí hydro của vi khuẩn Tr2 phân lập được từ phân gia súc nhằm ứng dụng chủng vi khuẩn này trong lên men tối sản xuất hydro sinh học.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu, môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy

Các mẫu phân gia súc lấy từ Đông Anh và Chương Mỹ - Hà Nội được dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng sinh khí hydro.

Môi trường nuôi cấy phân lập và bảo quản giống vi khuẩn có khả năng sinh khí hydro là môi trường NMV (pH 6,5) với thành phần: glucose 10 g/l; cao men 3 g/l, cao thịt 1 g/l, pepton 1 g/l, NH₄Cl 1 g/l, KH₂PO₄ 0,5 g/l, K₂HPO₄ 0,5 g/l, KCl 0,1 g/l NaCl 1 g/l, CaCl₂ 0,1 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,3 g/l, FeSO₄.7 H₂O 0,1 g/l, L-cystein HCl.H₂O 0,5 g/l, dung dịch vi lượng 1 ml/l, dung dịch vitamin 1ml/l, vitamin C (100 ml/l) 0,5 ml/l, resazurin (0,2 %) 1 ml/l. Dung dịch vi lượng gồm MnSO₄.7H₂O 1 g/l, ZnSO₄.7H₂O 5 g/l, H₃BO₃ 1 g/l, CaCl₂.2H₂O 1 g/l, NiSO₄ 1,6 g/l, CuCl₂.2H₂O 1,5 g/l, EDTA 1 g/l. Dung dịch vitamin gồm có cyanocobalamin 1 g/l, riboflavin 2.5 g/l, sodium citrate 2 g/l, pyridoxine 0,5 g/l, folic acid 1 g/l, 4-aminobenzoic acid 1 g/l. Đối với môi trường rắn dùng để phân lập vi khuẩn sinh hydro, 15 g/l thạch được bổ sung vào.

Các thí nghiệm đều được nuôi cấy trong điều kiện vi hiếu khí ở 30 °C. Trong các thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng sinh khí hydro của chủng lựa chọn, thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy được điều chỉnh với từng yếu tố ảnh hưởng.

2.2. Phương pháp

- Phân lập vi khuẩn có khả năng sinh khí hydro theo phương pháp nuôi cấy vi hiếu khí trên môi trường thạch đĩa [6].

- Xác định Gram bằng phương pháp nhuộm Gram (Phương pháp Hucker cải tiến) [6].

- Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM-Scanning Electron Microscope S4800).
- Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đo độ đục tế bào trên máy quang phổ (Secoman) ở bước sóng 660 nm.
- Xác định thể tích khí hydro tạo thành theo phương pháp thay thế nước (water displacement method).
- Phân tích chất lượng khí hydro tạo thành bằng máy sắc ký khí GC-TCD (Thermo Trace GC-Thermo Electro-USA) với phương pháp thử EDC VI-003 GC.

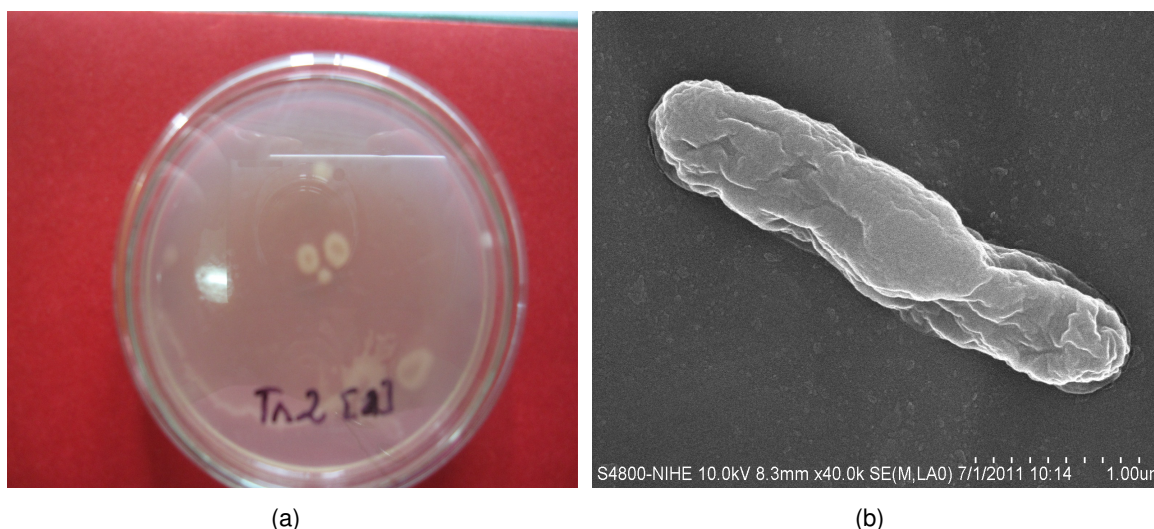
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng tạo khí hydro

Các mẫu phân trâu, phân bò được biết đến như là nguồn nguyên liệu chứa vi khuẩn có khả năng tạo khí hydro sinh học [7]. Do đó, chúng tôi tiến hành phân lập vi khuẩn có khả năng sinh khí hydro từ các mẫu phân gia súc lấy từ vùng Đông Anh và Chương Mỹ (Hà Nội). Trong số 8 đơn chủng thu được, chủng vi khuẩn Gram âm Tr2 có khuẩn lạc màu trắng đục, hai vòng tròn đồng tâm, mép lan dẹt và có khả năng sinh khí tốt nhất (bảng 1, hình 1). Kết quả phân tích khí cho thấy, lượng khí hydro do chủng này sinh ra chiếm 72,6 % thể tích khí (kết quả chưa công bố). Do đó, chủng Tr2 được lựa chọn.

Bảng 1. Khả năng sinh khí hydro của các chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu phân gia súc.

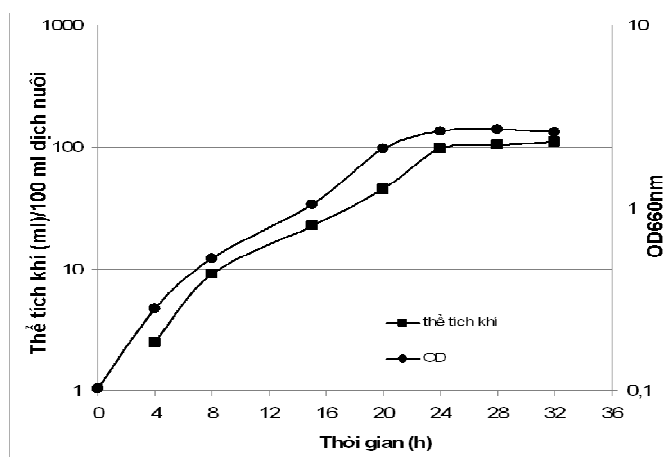
STT	Chủng vi khuẩn	Thể tích khí ml/100ml dịch nuôi cấy	OD đầu vào (660 nm)	OD cực đại (660 nm)
1	Tr1	22	0,098	2,52
2	Tr2	80	0,102	2,74
3	Tr3	12	0,10	1,93
4	Bo1	12	0,103	1,83
5	Bo2	12	0,102	1,82
6	Ng1	12	0,098	1,81
7	Be1	40	0,099	2,54
8	Be2	50	0,10	2,65



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (a) và tế bào (b) của chủng Tr2.

3.2. Động thái sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

Quá trình tạo khí là một trong các quá trình trao đổi chất của vi khuẩn có khả năng sinh hydro. Để có thể ứng dụng sản xuất hydro ở qui mô công nghiệp thì hiệu quả tổng thể của quá trình được đặt lên hàng đầu. Do đó, động thái sinh trưởng và khả năng tạo khí theo thời gian của chủng Tr 2 được nghiên cứu trước tiên để xem xét mối liên hệ giữa 2 quá trình này để từ đó định hướng nghiên cứu sao hiệu quả thu khí đạt cao nhất. Kết quả được nêu ở hình 2.



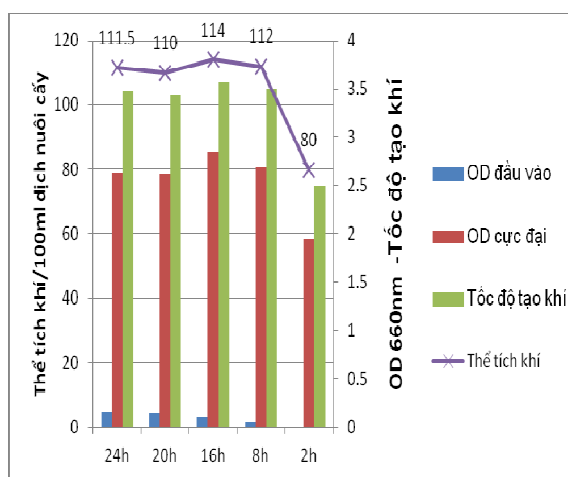
Hình 2. Khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2.

Kết quả cho thấy quá trình sinh trưởng và tạo khí đi liền với nhau, có nghĩa là khi tế bào sinh trưởng thì cũng sản sinh ra khí. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho rằng quá trình sinh hydro đi kèm với quá trình sinh trưởng của vi khuẩn sinh hydro [8, 9]. Chủng Tr2 đạt cực đại sau 24 giờ nuôi cấy với lượng khí đạt 110 ml khí/100 ml dịch nuôi cấy.

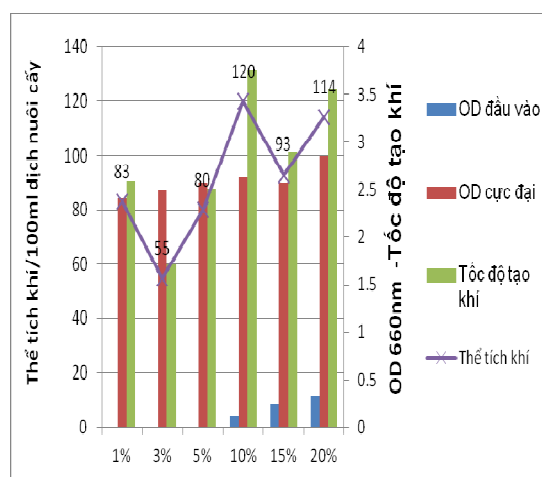
3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện môi trường tới khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2

3.3.1. Ảnh hưởng của tuổi giống

Trong quá trình nuôi cấy vi khuẩn, tuổi của giống đầu vào có vai trò rất quan trọng. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu với giống đầu vào ở các giai đoạn hoạt hóa khác nhau: 2 giờ, 8 giờ, 16 giờ, 20 giờ, 24 giờ. Kết quả hình 3 cho thấy khi bổ sung giống đầu vào ở các giai đoạn khác nhau thì thời gian để vi khuẩn đạt pha log cũng khác nhau. Với chủng giống đang ở pha lag (2 giờ) thì phải sau 28 giờ nuôi cấy mới đạt pha log và lượng khí sinh ra đạt 80 ml. Nếu giống đầu vào đang ở pha cân bằng (24 giờ) thì sau 24 giờ nuôi cấy chủng đạt pha log lượng khí tạo thành là 111,5 ml. Khi bổ sung lượng giống đầu vào đang ở đầu pha log (8 giờ), giữa pha log (16 giờ) và cuối pha log (20 giờ) thì lượng khí tạo thành chênh lệch nhau không đáng kể và thời gian vào pha log cũng ngắn hơn so với sử dụng giống đầu vào đang ở pha cân bằng, lượng khí tạo thành cao nhất (114 ml khí/100 ml dịch nuôi cấy) khi bổ sung giống đang ở giữa pha log (16 giờ). Do đó, chúng tôi lựa chọn tuổi của giống đang ở giữa pha log cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của tuổi giống đến quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống đầu vào đến quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.

3.3.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống đầu vào

Để đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ giống đầu vào tới khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với các tỉ lệ giống đầu vào khác nhau: 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 % và 20 % (thể tích giống/thể tích dịch nuôi cấy). Thể tích khí tạo thành và mật độ tế bào theo thời gian của chủng Tr2 được thể hiện ở hình 4. Kết quả cho thấy tỉ lệ giống đầu vào có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2. Theo nghiên cứu của Ferchichi và cs (2005), chủng *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 tạo khí hydro tốt nhất khi bổ sung 1 % thể tích giống/thể tích dịch nuôi cấy [8]. Tuy nhiên, đối với chủng Tr2, khi bổ sung 1 % thể tích giống đầu vào thì lượng khí hydro thu được chưa đạt mức tốt nhất. Chủng này sinh khí hydro cao nhất khi lượng giống đầu vào là 10 %. Với tỉ lệ giống đầu vào này, chủng Tr2 cũng vẫn sinh trưởng tốt (khả năng sinh trưởng tương đương với trường hợp tỉ lệ giống đầu

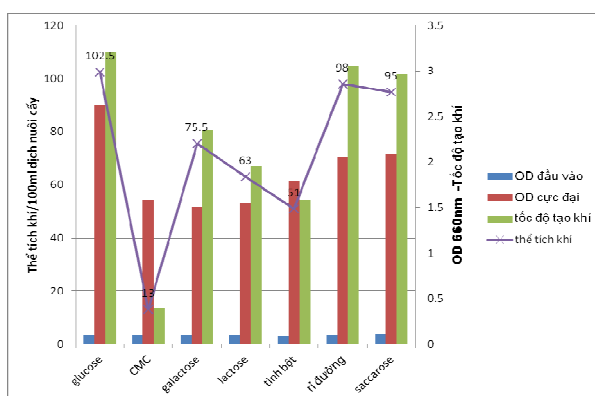
vào là 15 % và gần bằng với trường hợp tỉ lệ giống đầu vào là 20 %). Do đó, tỉ lệ giống đầu vào 10 % là thích hợp cho khả năng tạo khí hydro cũng như sinh trưởng của chủng Tr2 và 10 % giống được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

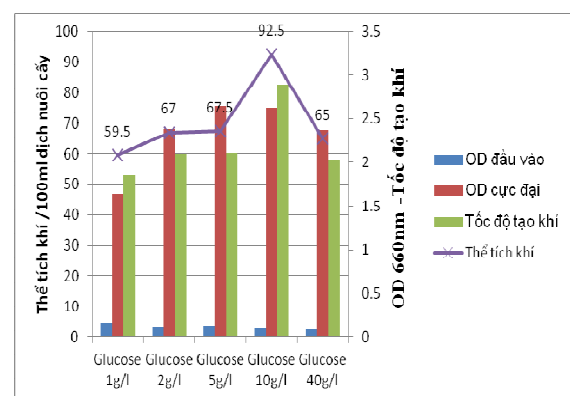
Nguồn cacbon có vai trò rất quan trọng trong quá trình sinh trưởng của vi sinh vật nói chung và vi khuẩn sinh khí hydro nói riêng. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn cacbon khác nhau (glucose, galactose, lactose, saccharose, tinh bột, CMC và ri đường) đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy glucose làm nguồn cacbon ưa thích cho quá trình sinh khí hydro [9, 10] trong khi đó cũng có tác giả lại phát hiện ra rằng glycerol làm nguồn cacbon chính cho quá trình sinh trưởng và tạo khí H_2 của vi khuẩn [11]. Kết quả của nghiên cứu này (hình 5) cho thấy chủng Tr2 đều có khả năng sinh trưởng được trên cả 7 nguồn cacbon nghiên cứu với lượng khí hydro tạo ra dao động từ $12,45 \div 98,2$ ml/100 ml dịch nuôi cấy. Với nguồn glucose, khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2 là tốt nhất (OD 660 nm = 2,63; thể tích khí hydro đạt 98,2 ml/100 ml dịch nuôi cấy). Do đó chúng tôi lựa chọn glucose làm nguồn cacbon cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ glucose

Sau khi chọn được nguồn glucose, chúng tôi tiến hành thí nghiệm chọn nồng độ glucose tối ưu cho quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro. Hàm lượng glucose bổ sung đầu vào khác nhau (g/l) : 1, 2, 5, 10, 40. Đồ thị hình 6 cho thấy chủng Tr2 đều sinh trưởng và tạo khí hydro tốt trong tất cả các trường hợp có lượng đường đầu vào khác nhau. Khi bổ sung hàm lượng glucose 1g/l thì vi khuẩn sử dụng nhanh, lượng khí hydro tạo thành thấp (57 ml/100 ml dịch nuôi cấy). Khi lượng glucose quá cao (40 g/l) thì lượng khí hydro tạo thành cũng thấp (62,2 ml/100ml dịch nuôi cấy). Khi bổ sung 10 g/l glucose thì lượng khí hydro tạo thành cũng như mật độ tế bào đều đạt cực đại (thể tích khí hydro đạt 88,6 ml/100 ml dịch nuôi cấy và OD 660 nm = 2,63). Như vậy, nồng độ glucose quá cao hay quá thấp đều không hiệu quả cho quá trình sinh khí hydro và nồng độ glucose thích hợp cho quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2 là 10 g/l. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của nhóm Alalayah, lượng hydro tạo thành cao nhất khi bổ sung 10 g/l glucose [9].



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.



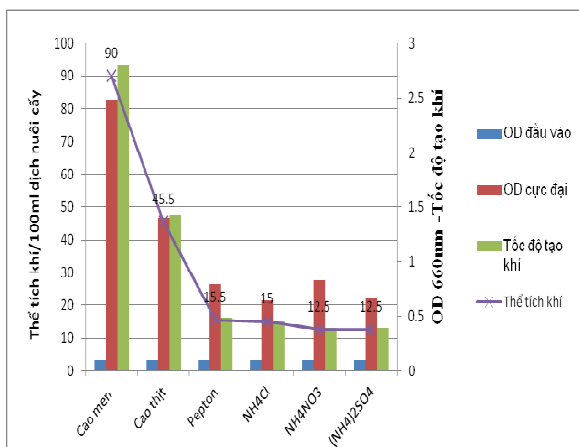
Hình 6. Ảnh hưởng nồng độ glucose đến quá trình sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.

3.3.5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

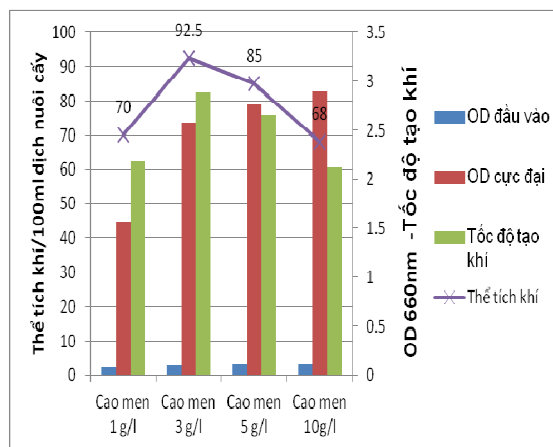
Nguồn nitơ có vai trò quan trọng đối với quá trình phát triển của vi khuẩn tạo khí, nguồn nitơ bao gồm nitơ vô cơ và nitơ hữu cơ. Chúng tôi lựa chọn các nguồn nitơ vô cơ (NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) và nguồn nitơ hữu cơ (cao men, cao thịt, pepton) cho nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2. Kết quả hình 7 cho thấy chủng Tr2 có thể sinh trưởng và tạo khí hydro trên cả nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ. Tuy nhiên, chủng này sinh trưởng và tạo khí hydro tốt hơn trên nguồn nitơ hữu cơ. Trong đó, cao men là nguồn nitơ tối ưu cho sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng này với lượng khí hydro đạt được là 88,6 ml/100 ml dịch nuôi cấy và sinh khối tế bào cực đại ($\text{OD } 660 \text{ nm} = 2,49$). Kết quả của Ferchichi và cs (2005) cũng cho thấy nguồn cao men là nguồn cơ chất thích hợp cho tế bào vi khuẩn *Clostridium saccharoperbutylacetoricum* ATCC 27021 sinh trưởng và tạo khí hydro trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt [8]. Điều đó cho thấy mặc dù điều kiện nuôi cấy khác nhau, chủng giống khác nhau nhưng quá trình sinh khí hydro của các chủng này lại chịu tác động của các yếu tố môi trường tương tự nhau.

3.3.6. Ảnh hưởng của nồng độ cao men

Nguồn cao men là một trong những nguồn cơ chất chính cho vi khuẩn sinh trưởng. Chúng tôi bổ sung hàm lượng cao men với các nồng độ khác nhau: 1, 3, 5 và 10 g/l để nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2. Kết quả trong hình 8 cho thấy chủng Tr2 đều sinh trưởng và tạo khí tốt ở tất cả các nồng độ cao men. Lượng cao men bổ sung ít (1 %) lượng khí hydro tạo thành ít (67 ml/100 ml dịch nuôi cấy) sinh khối vi khuẩn cũng không cao ($\text{OD } 660 \text{ nm}$ cực đại = 1,57). Nếu bổ sung hàm lượng cao men quá nhiều (10 g/l) thì chính nguồn cao men lại là nhân tố ức chế quá trình phát triển của vi khuẩn, lượng khí hydro tạo thành thấp (65,1 ml/100 ml dịch nuôi cấy). Hàm lượng cao men phù hợp nhất là 3 g/l (lượng khí hydro tạo thành cao nhất đạt 88,6 ml/ 100 ml dịch nuôi cấy, $\text{OD } 660 \text{ nm}$ cực đại = 2,57). Nghiên cứu của Ferchichi và cs (2005) cho thấy bổ sung 0,1 % cao men vào dịch nuôi cấy là thích hợp cho *Clostridium saccharoperbutylacetoricum* ATCC 27021 sinh trưởng và tạo khí [8]. Như vậy, có thể thấy cao men là nguồn nitơ ưa thích cho quá trình tạo khí hydro, tuy nhiên hàm lượng cao men tối ưu cho quá trình tạo khí của các chủng khác nhau lại khác nhau. So với công bố của Ferchichi và cs (2005) thì chủng Tr2 đòi hỏi lượng cao men nhiều hơn cho quá trình tạo khí và chủng này tạo khí tốt nhất trong môi trường chứa 3 g/l cao men.



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.



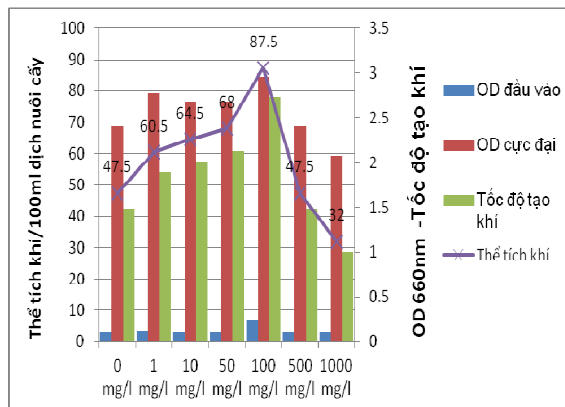
Hình 8. Ảnh hưởng của nồng độ cao men đến sự sinh trưởng và tạo khí H_2 của chủng Tr2.

3.3.7. Ảnh hưởng của hàm lượng $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

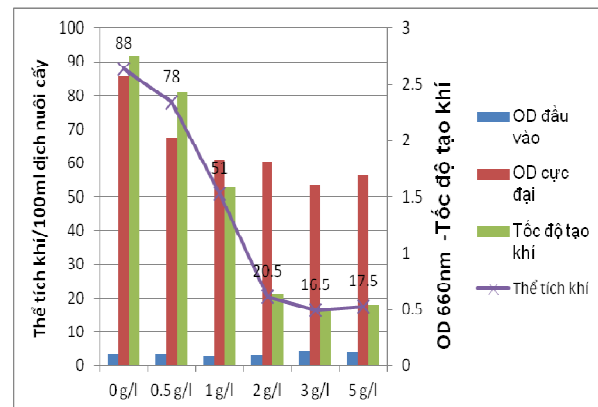
Fe^{2+} có ảnh hưởng đến khả năng tạo khí của vi khuẩn trong quá trình lên men thông qua ảnh hưởng đến hoạt động của enzym hydrogenase enzyme chìa khóa trong quá trình sản sinh hydro [8, 9], vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 với các nồng độ (mg/l) khác nhau: 0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000. Kết quả thể hiện ở hình 9 cho thấy chủng Tr2 có thể sinh trưởng trong môi trường chứa hàm lượng Fe^{2+} khác nhau với lượng khí H_2 tạo thành dao động trong khoảng $30,6 \div 83,7$ ml H_2 /100 ml dịch nuôi cấy. Với nồng độ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ là 100 mg/l thì lượng hydro tạo thành đạt mức cao nhất 83,7 ml/100 ml dịch nuôi cấy và lượng sinh khối đạt cực đại (OD 660 nm = 2,956) sau 24 giờ nuôi cấy. Như vậy, nồng độ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l là thích hợp cho quá trình tạo khí hydro của vi khuẩn và được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo của vi khuẩn. Nghiên cứu của Aalayal và cs cho thấy, với chủng *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 hàm lượng Fe^{2+} thích hợp là 25 mg/l [9]. Như vậy, mặc dù quá trình tạo khí phụ thuộc vào hàm lượng sắt nhưng mỗi chủng khác nhau lại đòi hỏi hàm lượng sắt tối ưu khác nhau cho quá trình tạo khí và lượng sắt tối ưu cho quá trình tạo khí của chủng Tr2 là 100 ml/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.3.8. Ảnh hưởng của hàm lượng NaCl

Tiến hành nghiên cứu quá trình phát triển và tạo khí của chủng Tr2 trong môi trường có nồng độ muối NaCl khác nhau (g/l): 1, 0,5, 1, 3, 5 (hình 10) cho thấy chủng Tr2 có thể sinh trưởng trong môi trường với các nồng độ muối khác nhau. Tuy nhiên, khi nồng độ NaCl càng cao thì khả năng tạo khí của chủng Tr2 càng giảm. Hàm lượng muối NaCl trong môi trường là: 2 g/l, 3 g/l, 5 g/l, thì lượng khí tạo thành chỉ khoảng $15,8 \div 19,6$ ml / 100 ml dịch nuôi cấy. Với lượng muối bổ sung vào môi trường là: 0, 0,5, 1 g/l thì lượng khí hydro tạo thành cao hơn ($48,8 \div 84,3$ ml khí H_2 / 100 ml dịch nuôi cấy). Môi trường không chứa NaCl là môi trường thích hợp nhất cho sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2.



Hình 9. Ảnh hưởng của nồng độ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.



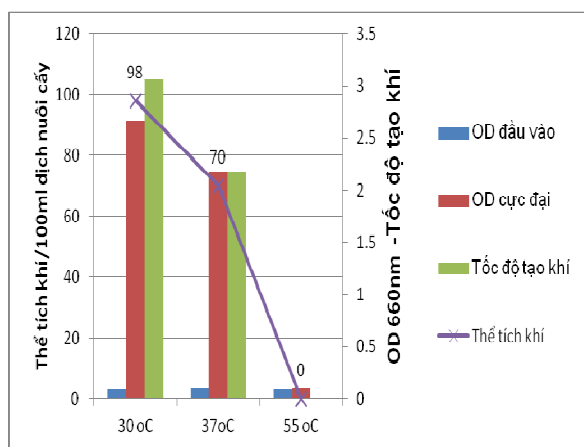
Hình 10. Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro của chủng Tr2.

3.3.9. Ảnh hưởng của nhiệt độ

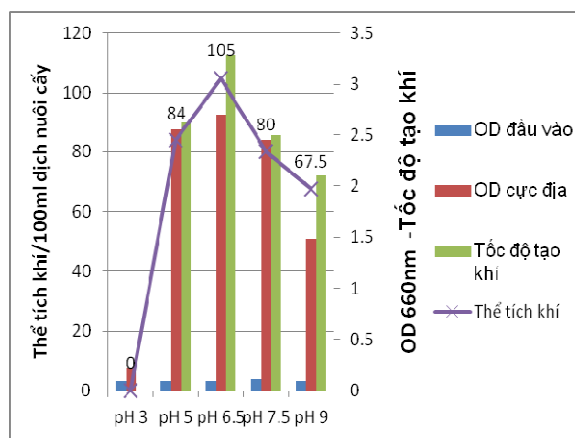
Mỗi chủng vi khuẩn ưa thích một dải nhiệt độ thích hợp. Kết quả nghiên cứu khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 ở nhiệt độ 30 °C, 37 °C và 55 °C (hình 11) cho thấy, với nhiệt độ 30 °C chủng Tr2 sinh trưởng tạo khí tốt (thể tích khí hydro đạt 93,9 ml/100 ml dịch nuôi cấy và OD 660 nm = 2,67) nhưng khi ở nhiệt độ 55 °C (nhiệt độ tối ưu cho các chủng vi khuẩn ưa nhiệt) thì chủng ưa ấm này không sinh trưởng được. Theo O-Thong và cs (2011), nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của vi khuẩn, một số vi khuẩn ưa nhiệt: *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermoanaerobacterium lactoethylicum* được phân lập từ suối nước nóng lại có khả năng sinh trưởng và tạo khí hydro ở khoảng nhiệt độ 55 - 70 °C [10]. Tuy nhiên, chủng Tr2 là chủng vi khuẩn ưa ấm, Gram âm với dải nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng là 30 – 37 °C. Vì vậy, chủng này không thể sinh trưởng và tạo khí được khi nuôi cấy ở nhiệt độ 55 °C.

3.3.10. Ảnh hưởng của pH

pH của môi trường là một yếu tố quan trọng trong quá trình sinh trưởng của vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn sinh khí hydro. Mỗi loại vi khuẩn chỉ có thể sinh trưởng trong một dải pH nhất định, nếu pH thay đổi thì quá trình sinh trưởng của vi khuẩn cũng thay đổi [12, 13]. Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm nuôi cấy chủng Tr2 trên các loại môi trường có pH khác nhau: 3, 5, 6,5, 7,5, 9,0. Kết quả trong hình 12 cho thấy pH có ảnh hưởng lớn tới quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2. Trong môi trường có pH quá axit (pH 3), chủng này không thể sinh trưởng được. Chủng Tr2 chỉ có thể sinh trưởng trong dải pH từ 5 ÷ 9 với lượng khí hydro tạo thành từ 64,6 ÷ 100 ml/100 ml dịch nuôi cấy. Trong đó, pH 6,5 là pH tối ưu cho quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng này với lượng khí hydro đạt được là 100 ml/100 ml dịch nuôi cấy.



Hình 11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2.



Hình 12. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và tạo khí H₂ của chủng Tr2.

Theo Li và cs (2010), pH có ảnh hưởng đến hiệu suất tạo hydro, pH còn ảnh hưởng đến hoạt động của Fe²⁺ trong enzyme hydrogenase. Ngoài ra pH còn ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa cơ chất và tạo ra các sản phẩm phụ CO₂, CH₄. Theo nhóm tác giả này pH thích hợp cho *Clostridium butylicum* và *Clostridium acetobutylicum* sinh trưởng và tạo khí là pH 6 [13]. Trong khi đó, chủng Tr sinh trưởng và tạo khí tốt nhất khi pH đầu vào của môi trường nuôi cấy

là pH 6,5. Khi chủng này bước vào pha log của quá trình sinh trưởng thì pH môi trường giảm dần và tạo khí nhiều nhất ở pH 6 (kết quả không trình bày ở đây). Vì vậy, có thể nói pH 6 là pH tối ưu cho quá trình tạo khí của chủng Tr2 và pH đầu vào 6,5 có tác dụng giúp cho chủng Tr2 sinh trưởng tốt hơn để chuẩn bị cho quá trình tạo khí diễn ra mạnh mẽ ở pha log của quá trình sinh trưởng.

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu phân gia súc ở khu vực Đông Anh, Chương Mỹ - Hà Nội đã chọn được chủng vi khuẩn Tr2 Gram âm, hình que có khả năng tạo khí hydro cao và ổn định.

Đã nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến quá trình sinh trưởng và tạo khí của chủng Tr2 và đưa ra điều kiện môi trường thích hợp cho chủng này sinh trưởng và tạo khí hydro cao như sau: tuổi của giống đang ở giai đoạn giữa của pha log, tỉ lệ tiếp giống 10 %, glucose (10 g/l), cao men (3 g/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 mg/l), pH 6,5, nhiệt độ 30 °C.

Lời cảm ơn. Công trình được thực hiện dưới sự tài trợ của đề tài nghiên cứu cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST 05.02/11-12) do Tiến sĩ Nguyễn Thị Thu Huyền, Trưởng Phòng Vi sinh vật Dầu mỏ, Viện Công nghệ Sinh học làm chủ nhiệm với sự cộng tác của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Viện Nghiên cứu và phát triển ứng dụng các hợp chất thiên nhiên (Trường Đại học Bách khoa Hà Nội).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Holladay J. D., Hu J., King D. L., and Wang Y. - An overview of hydrogen production technologies, *Catalysis Today* **139** (2009) 244-260.
2. Angenent L. T., Sung S., and Raskin L. - Formation of granules and Methanosaeta fibres in an anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), *Environmental Microbiology* **6** (4) (2004) 315-322.
3. Hawkes F. R., Dinsdale R., Hawkes D. L., and Hussey I. - Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimization, *International Journal of Hydrogen Energy* **27** (11-12) (2002) 1339-1347.
4. Levin D. B., Pitt L., and Love M. - Biohydrogen production: prospects and limitation to practical application", *International Journal of Hydrogen Energy* **29** (2) (2004) 173-185.
5. Redwood M. D., Paterson-Beedle M., and Macaskie L. E. - Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy, *Review of Environmental Scientific Biotechnology* **8** (2009) 149-185.
6. Egorov N. X. - Thực tập vi sinh vật học, Nhà xuất bản Mir, Maxcova (người dịch Nguyễn Lâm Dũng) 1976.
7. Romano I., Dipasquale L., Orlando P., Lama L., d'Ippolito G., Pascual J., and Gambacorta A. - *Thermoanaerobacterium thermostercus* sp. nov., a new anaerobic thermophilic hydrogen-producing bacterium from buffalo-dung, *Extremophiles* **14** (2010) 233-240.
8. Ferchichi M., Crabbe E., Hintz W., Gil G. H., and Almadidy A. - Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21** (2005) 855-862.

9. Alalayal W. M., Kalil M. S., Kadhum A. H., Jamalial M. D., Alauj N. M. - Effect of environmental parameters on hydrogen production using *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum* NI(ATCC 13564), American Journal of Environmental Sciences **5** (2009) 80-86.
10. O-Thong S., Hniman A., Prasertsan P., and Imai T. - Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures, International Journal of Hydrogen Energy **36** (2011) 3409-3416.
11. Sakai S., and Yagishita T. - Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine, Biotechnology and Bioengineering **98** (2007) 340-348.
12. Kawagoshi Y., Hino N., Fujimoto A., Nakao M., Fujita Y., Sugimura S., and Furukawa K. - Effect of inoculums conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production, Journal of Bioscience and Bioengineering **100** (2005) 524-530.
13. Li Y., Zhu J., Wu X., Miller C., and Wang L. - The Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from Swine Wastewater Supplemented with Glucose, Journal of Applied Biochemical Biotechnology **162** (2010) 1286-1296.

ABSTRACT

EFFECT OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS ON HYDROGEN PRODUCTION OF STRAIN Tr2 ISOLATED IN VIETNAM UNDER MICROAEROBIC CONDITION

Dang Thi Yen, Vuong Thi Nga, Lai Thuy Hien, Nguyen Thi Thu Huyen*

Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet street, Cau Giay district, Hanoi

*Email: ntthuyen@ibt.ac.vn or huyen308@gmail.com

Hydrogen energy represents a source of clean and sustainable energy future. Process of hydrogen production by fermentative bacteria brings a new hope to the world's energy industry. In present study, some bacterial strains having potentiality of hydrogen production were isolated from cattle dungs in Vietnam. Amongst, Gram-negative bacterial strain Tr2 was selected since its capacity of hydrogen production was the highest. Various environmental factors (pre-culture age, inoculum ratio, carbon source, nitrogen source, iron, sodium chloride, temperature and pH) did affect the growth and hydrogen production of strain Tr2. Optimal conditions for its growth and hydrogen production consisted of age of pre-culture (in the middle of logarithmic phase), inoculum ratio (10 % v/v), glucose (10 g/l), yeast extract (3 g/l), FeSO₄.7H₂O (100 mg/l), pH 6,5 at 30 °C. Obtained results showed the high potentiality of strain Tr2 in application to dark fermentation for biohydrogen production by native bacteria in Vietnam.

Keywords: bio-hydrogen production, fermentative bacteria, dark fermentation, microaerobic condition, Vietnam.