



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 62 - Số 6 - Tháng 6 năm 2020

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục - Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Buu - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016
Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Khảo sát sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 cố định trong alginate

Hà Danh Đức*

Trường Đại học Đồng Tháp

Ngày nhận bài 31/12/2019; ngày chuyển phản biện 6/1/2020; ngày nhận phản biện 10/2/2020; ngày chấp nhận đăng 17/2/2020

Tóm tắt:

Toluene cũng như chlorotoluene là những hợp chất được sử dụng phổ biến và thường được phát hiện trong môi trường bị ô nhiễm, nhất là môi trường nước. Vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 có khả năng phân hủy hiệu quả các chất này. Khảo sát khả năng làm sạch toluene cũng như chlorotoluene trong môi trường đất và nước của vi khuẩn *Comamonas testosterone* KT5 dạng tự do và cố định cho thấy, KT5 được cố định trong alginate phân hủy các chất này với tốc độ cao hơn so với dạng tự do. Vi khuẩn cố định còn chịu đựng tốt hơn so với dạng tự do ở độ pH quá thấp hay quá cao. Ngoài ra, vi khuẩn cố định trong alginate còn có thể phân hủy tốt hơn dạng tự do khi môi trường bị nhiễm kim loại nặng. Mức độ ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene là $As^{5+} \approx Cd^{2+} \approx Hg^{2+} \approx Cu^{2+} > Pb^{2+} \approx Ni^{2+}$.

Từ khóa: alginate, chlorotoluene, *Comamonas testosterone*, kim loại nặng, toluene.

Chỉ số phân loại: 1.5

Đặt vấn đề

Toluene cũng như chlorotoluenes được sản xuất một lượng lớn trên toàn thế giới vì chúng được sử dụng phổ biến để sản xuất nhiều loại hóa chất như chất chống cháy, thuốc nhuộm, thuốc trừ sâu..., dùng trong y tế, sản xuất vải, polymer và nhiều sản phẩm khác [1]. Ngoài ra, chúng còn được sử dụng trong chất tẩy rửa và dung môi. Hàng năm, một lượng lớn các hợp chất này được thải ra môi trường, gây ô nhiễm nguồn nước. Toluene và chlorotoluene được phát hiện trong môi trường, bao gồm đất, nước mặt và nước ngầm [2-7], ngoài ra chúng còn được phát hiện trong không khí [8] và thực phẩm [9].

Toluene và chlorotoluenes là những chất khá độc nên việc tẩy sạch chúng là cần thiết. Một trong những cách tẩy sạch chúng là dùng các phương pháp sinh học. Phương pháp này an toàn, rẻ tiền, thân thiện với môi trường và hiệu quả cao so với các phương pháp khác. Trên thế giới đã có những nghiên cứu về các vi sinh vật có thể phân hủy được hợp chất toluene [1, 10-20] nhưng chỉ có một công bố được thực hiện ở Việt Nam [21].

Mặc dù vậy, đa số các khảo sát trước đây đều thực hiện trong môi trường lỏng và sử dụng vi sinh vật dạng lơ lửng mà ít đề cập đến phân hủy trong đất và sử dụng dạng cố định. Một trong những giải pháp cố định vi khuẩn là sử dụng alginate. Alginate có nguồn gốc tự nhiên, dễ phân hủy

trong môi trường, rẻ tiền, dễ sử dụng, không độc nên thường được dùng trong y tế, thực phẩm cũng như dùng để cố định vi sinh vật. *C. testosterone* KT5 được phân lập từ đất và bùn, và đã được khảo sát về khả năng phân hủy nhiều loại chlorotoluene [21]. Bài báo nghiên cứu sự phân hủy của các hợp chất này bởi vi khuẩn *C. testosterone* KT5 được cố định trong alginate.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Vi khuẩn *C. testosterone* KT5 được nuôi cấy trong dung dịch khoáng chất có các thành phần (g/l) như sau: Na_2HPO_4 2,79; KH_2PO_4 1,00; $(NH_4)_2SO_4$ 1,00; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,20 và 1,00 ml các nguyên tố vi lượng. Các nguyên tố vi lượng bao gồm H_3BO_3 0,30; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,20; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,10; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,03; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,03; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,02; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01. Độ pH của môi trường được điều chỉnh bằng dung dịch HCl và NaOH. Môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút trước khi sử dụng. Tất cả hóa chất đều được mua từ Sigma-Aldrich hoặc Merck với độ tinh khiết >98%.

Phương pháp cố định vi khuẩn trong alginate

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường khoáng như trên ở 150 v/ph và ở nhiệt độ phòng (trung bình là 30°C). Toluene (2 mM) và yeast extract (1,0 g/l) được bổ sung

*Email: hadanhduc@gmail.com

Determination of degradation of toluene and chlorotoluenes by *Comamonas testosterone* KT5 immobilized in alginate

Danh Duc Ha*

Dong Thap University

Received 31 December 2019; accepted 17 February 2020

Abstract:

Toluene and chlorotoluenes are widely used ingredients in industries and commonly detected in polluted environments, especially in wastewater. *Comamonas testosterone* KT5 that effectively degraded these compounds was determined to disintegrate the toxic chemicals in liquid culture and soil. The results presented that the bacteria immobilized in alginate degraded toluene and chlorotoluenes more effectively than those of free cells. Besides, the immobilized cells showed higher toleration in extremely low and high pH levels. Moreover, the immobilized form reduced the effects of heavy metals during the degradation process. The effects of heavy metals on toluene degradation were in order of $As^{5+} \approx Cd^{2+} \approx Hg^{2+} \approx Cu^{2+} > Pb^{2+} \approx Ni^{2+}$.

Keywords: alginate, chlorotoluenes, *Comamonas testosterone*, heavy metals, toluene.

Classification number: 1.5

nhằm kích thích vi khuẩn sinh sôi. Số lượng vi khuẩn trong môi trường lúc này trung bình là $3,5 \times 10^8$ CFU/ml (đếm bằng số khuẩn lạc xuất hiện trên thạch agar). Sau 24 giờ, môi trường lỏng được ly tâm ở 8.000 v/ph trong 10 phút. Vi khuẩn thu được được chuyển vào môi trường khoáng, khuấy đều rồi được ly tâm lần 2 nhằm làm sạch hoá chất có thể còn sót lại bám vào vi khuẩn. Vi khuẩn sau đó được cho vào môi trường khoáng mới, trộn đều với dung dịch chứa alginate đã khử trùng để thu được dung dịch cuối cùng có $3,5 \times 10^9$ CFU/ml và 3% alginate. Dựa vào số lượng vi khuẩn ban đầu và số lượng hạt alginate tạo ra số lượng vi khuẩn trung bình trong mỗi hạt được xác định.

Quá trình cố định vi khuẩn được thực hiện bằng cách: dung dịch chứa vi khuẩn và alginate được nhỏ giọt vào dung dịch chứa 3% $CaCl_2$ bằng syringe. Dung dịch 3% $CaCl_2$ này được khuấy đều bằng khuấy từ ở tốc độ 500 v/ph trong suốt quá trình nhỏ giọt. Hạt được tạo ra, rửa lại rồi chuyển sang dịch chứa 3% $CaCl_2$ và bảo quản trong 24 giờ ở nhiệt độ $4^\circ C$ để hoàn tất quá trình cố định.

Thí nghiệm phân hủy toluene và chlorotoluene trong môi trường lỏng

Quá trình phân hủy hóa chất của vi khuẩn được thực hiện ở 150 v/ph và nhiệt độ phòng với nồng độ hóa chất là 2 mM trong 12 giờ. Đối với thí nghiệm ảnh hưởng của kim loại đến sự phân hủy, kim loại nặng bao gồm As^{5+} (As_2O_5), Cd^{2+} ($CdCl_2$), Cu^{2+} ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), Hg^{2+} ($HgCl_2$) và Ni^{2+} ($NiCl_2$) được thêm vào môi trường khoáng với nồng độ các ion là 2 mM. Lượng vi khuẩn trong dung dịch là $3,5 \times 10^9$ CFU/ml áp dụng cho cả thí nghiệm phân hủy bởi vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định.

Xác định sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng và trong alginate

Số lượng vi khuẩn trong môi trường lỏng sau một thời gian ủ được xác định dựa vào số lượng khuẩn lạc hình thành trên đĩa agar. Phương pháp xác định số lượng vi khuẩn trong hạt alginate được thực hiện theo mô tả của Schoebitz và ctv (2012) [22]. Môi trường sau khi ủ được bổ sung $NaNO_3$ đến nồng độ 6% và lắc đều cho đến khi hạt alginate tan hết (khoảng 10 phút). Dung dịch được pha loãng rồi trải đều trên đĩa agar chứa môi trường khoáng chất đã mô tả ở trên và đếm số khuẩn lạc hình thành sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ $30^\circ C$.

Thí nghiệm phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất

Đất được thu từ vườn cây trong Trường Đại học Đồng Tháp ở độ sâu 10-50 cm, nơi chưa từng bị nhiễm toluene hay chlorotoluene. Mẫu đất sau đó được bóp nhỏ bằng tay, trộn đều rồi rây sàng qua tấm lưới thép cho phép những hạt có kích thước nhỏ hơn 2 mm đi qua. Mẫu đất được xác định thành phần trước khi tiến hành thí nghiệm (bảng 1).

Bảng 1. Thành phần của đất (tính theo trọng lượng đất khô).

Thành phần	Hàm lượng
Cát	43,6±5,6%
Phù sa	34,7±7,7%
Đất sét	19,0±6,6%
Chất hữu cơ	21,4±3,5 g/kg
Nitơ	1,27±0,4 g/kg
Phốtpho	1,13±0,2 g/kg
pH	6,6±0,7
Khối lượng riêng	1,56±0,3 g/cm ³
Toluene và chlorotoluene	0

Đối với thí nghiệm phân hủy hóa chất bằng vi khuẩn tự do, vi khuẩn được làm giàu trong môi trường khoáng rồi xít vào đất và trộn đều. Tương tự, đối với vi khuẩn cố định trong alginate, hạt alginate cũng được trộn lẫn với đất. Lượng vi khuẩn được bổ sung vào đất ở nghiệm thức vi khuẩn cố định và vi khuẩn tự do đều là 10^7 CFU/g đất khô. Đất được bảo quản trong bình nhựa, đậy kín bằng nắp. Đất được thêm nước để có độ ẩm 25%. Hàng ngày nắp được mở ra chừng 2 phút để O_2 có thể khuếch tán vào và CO_2 khuếch tán ra ngoài. Đất cũng được lắc đều 1 lần khoảng 5 phút để trộn lại và để ôxy khuếch tán xuống lớp đất sâu. Do đây nắp thường xuyên nên độ ẩm trong đất thay đổi không đáng kể trong suốt quá trình ủ. Các nghiệm thức đối chứng, alginate không chứa vi khuẩn được trộn vào đất.

Mẫu đất được lấy để phân tích hóa chất còn lại sau một thời gian ủ. Toluene và chlorotoluene trong đất được trích ly bằng methylene chloride (CH_2Cl_2). 5 g đất được cho vào dung dịch chứa 15 ml methylene chloride, thêm nước để được 25 ml rồi trộn đều, vortex trong 5 phút. Mẫu được để yên trong vòng 10 phút. Phần methylene chloride phía trên tách khỏi dung dịch được chuyển sang ống tube mới. Quá trình này được thực hiện 2 lần. Dung dịch methylene chloride được làm sạch bằng 0,22 μm syringe filter. Hiệu quả thu hồi trung bình của toluene, 2-chlorotoluene (2CT), 3-chlorotoluene (3CT) và 4-chlorotoluene (4CT) từ đất tương ứng là 92,4, 93,0, 95,5 và 96,6%.

Scanning cấu trúc bên trong của alginate

Quá trình chụp hình cấu trúc bên trong của hạt alginate được thực hiện tại Đại học Chulalongkorn, Thái Lan. Quá trình scanning được thực hiện nhờ máy Scanning Electron Microscope Analysis (SEM). Hạt alginate được cố định bằng 1% osmium tetroxide (O_8O_4) 1% trong 24 giờ rồi được rửa lại bằng nước nguyên chất. Mẫu được dehydrate hóa bằng ethanol lần lượt là 30, 50, 70, 90% và cồn tuyệt đối. Mẫu sau đó được làm khô bằng CO_2 , được định khung bằng vàng-palladium, rồi được scanning bằng JEOL microscope (JSM-5410LV, Jeol, Tokyo, Nhật Bản) ở 15 kV.

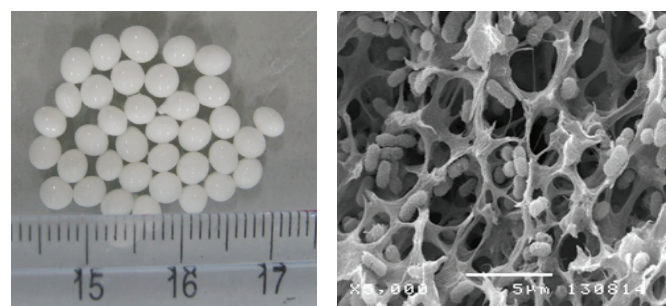
Phương pháp phân tích

Nồng độ của hóa chất được phân tích bằng HPLC và GC/MS đã được mô tả theo nghiên cứu [21]. Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 22.0 với mức độ tin cậy là 95% từ phân tích Duncan test.

Kết quả và thảo luận

Khảo sát khả năng phân hủy toluene và chlorotoluene của C. testosterone KT5

Các hạt alginate sau khi hình thành có hình cầu hoặc hơi bầu dục, với kích thước khoảng 3 cm và các hạt có kích thước gần như nhau (hình 1). Các hạt được bảo quản ở nhiệt độ 4°C nếu chưa sử dụng ngay. Kiểm tra sự phát tán của vi khuẩn ra dung dịch trong quá trình cố định cho thấy lượng vi khuẩn thoát ra ngoài môi trường lỏng là $3,6 \times 10^6$ CFU/ml, tức chỉ chiếm 0,1%. Hình scanning bên trong hạt alginate cho thấy, chúng có các khoang nhỏ để môi trường có thể khuếch tán vào bên trong, vi khuẩn có thể nhận được được ôxy để hoạt động. Trên hình chụp, vi khuẩn dính vào các thành alginate ở các khoang rỗng bên trong. Vi khuẩn sau khi được cố định trong alginate, chúng ít di chuyển nhưng thực hiện được các hoạt động khác, và chúng ít tiếp xúc với các chất trong môi trường hơn.

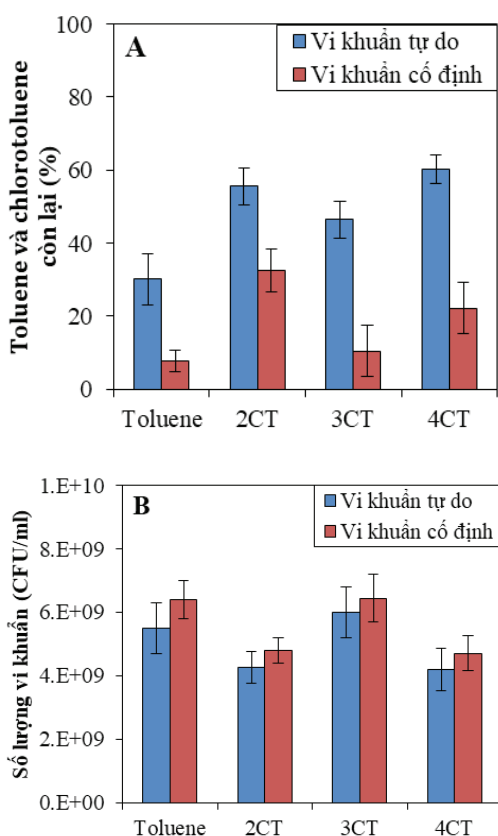


Hình 1. Hình ảnh chụp hạt alginate (trái) và mặt scan cắt ngang của hạt alginate (phải). Hình scan cho thấy vi khuẩn được cố định trong hạt. Hình ảnh hạt alginate bên ngoài và scan cắt ngang ở độ phóng đại tương ứng là 1 và 5.000 lần.

Ở pH=7, vi khuẩn được cố định trong alginate có tốc độ phân hủy cao hơn so với vi khuẩn tự do cho dù chúng có số lượng như nhau. Từ hình 2 cho thấy, tốc độ phân hủy 2CT và 4CT bởi vi khuẩn lơ lửng là như nhau, và chậm hơn so với tốc độ phân hủy 3CT và toluene. Sự phân hủy toluene diễn ra nhanh hơn so với các monochlorotoluene, kết quả này cũng được mô tả từ công bố trước đây được thực hiện bởi Duc (2017) [21]. Sự phân hủy toluene và 2CT, 3CT và 4CT được thực hiện do vi khuẩn cố định có tốc độ khác biệt không đáng kể. Số lượng vi khuẩn sau 12 giờ ủ tăng lên từ 1,22 đến 1,84 lần so với ban đầu. Sau khi ủ, số lượng vi khuẩn trong môi trường có chất dễ phân hủy hơn có phần

hiều hơn so với môi trường có chất khó phân hủy, nhưng trong môi trường chủng vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định không khác nhau đáng kể (hình 2B). Sau 12 giờ ủ, một số vi khuẩn trong hạt alginate phát tán ra môi trường lỏng. Số lượng này dao động trong khoảng từ 16 đến 20% tổng số vi khuẩn.

Trước đây đã có các dòng vi khuẩn phân hủy chlorotoluene như *Rhodococcus* sp. OCT 10 [1], *Ralstonia* sp. PS12 [23], *Burkholderia*. PS12 [24] và *Achromobacter* sp. KW1 [25] được công bố. Các dòng vi khuẩn khác có khả năng phân hủy toluene nhưng không đề cập đến phân hủy chlorotoluene như một số dòng được phân lập bởi Jacob và Irshaid (2015) từ đất ô nhiễm [26], một số dòng vi khuẩn phân hủy toluene phân lập từ phân bò [27] và mới đây nhất là *Acinetobacter junii* CH005 phân lập từ đất ô nhiễm dầu [28]. Nhưng sự phân hủy của các dòng vi khuẩn này được thực hiện ở dạng tự do và không khảo sát ảnh hưởng của pH cũng như kim loại nặng đến tốc độ phân hủy. Việc khảo sát khả năng phân hủy ở trạng thái cố định và ảnh hưởng của môi trường đến sự phân hủy giúp ta có thể áp dụng trong thực tế.

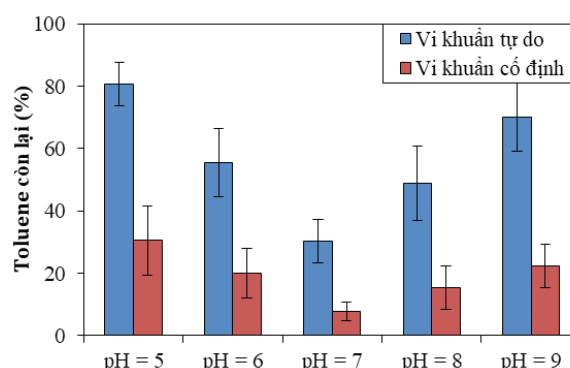


Hình 2. Sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi *C. testosterone* KT5 (A) và số lượng vi khuẩn ở dạng tự do và cố định trong alginate (B). Thí nghiệm được tiến hành trong môi trường lỏng có độ pH=7 với nồng độ hóa chất là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

Ảnh hưởng của độ pH đến sự phân hủy toluene bởi vi khuẩn *C. testosterone* KT5 ở dạng tự do và cố định

Khảo sát sự phân hủy toluene ở các độ pH khác nhau cho thấy, lượng hóa chất còn lại ở các độ pH quá thấp hay quá cao đều nhiều hơn ở độ pH=7 (hình 3), điều này chứng tỏ rằng vi khuẩn khá nhạy cảm với sự thay đổi của pH. Ở các độ pH khác nhau, tốc độ của vi khuẩn cố định đều nhanh hơn so với dạng tự do và sự thay đổi pH ít làm thay đổi tốc độ hơn so với dạng tự do.

Tất cả các trường hợp phân hủy trong môi trường lỏng đã mô tả trên đây cho thấy, vi khuẩn được cố định có tốc độ cao hơn hẳn dạng tự do. Cassidy và ctv cho rằng, sự không tiếp xúc trực tiếp với hóa chất khi được cố định trong alginate giúp giảm tính độc hại đến vi khuẩn, giúp làm tăng tốc độ phân hủy [29].

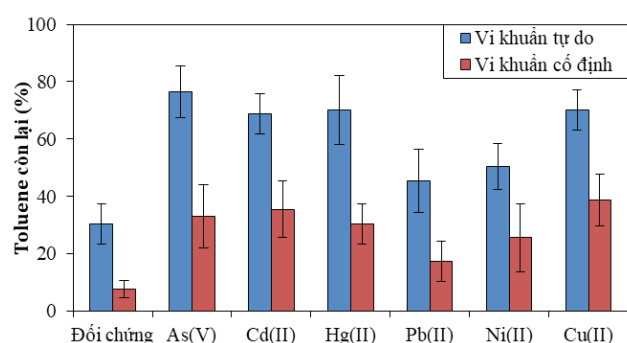


Hình 3. Ảnh hưởng của độ pH đến sự phân hủy toluene của *C. testosterone* KT5 ở dạng tự do và cố định trong alginate. Thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ hóa chất là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

Ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene bởi vi khuẩn *C. testosterone* KT5

Các kim loại nặng có thể tồn tại trong đất hay trong nước và ảnh hưởng đến các hoạt động của vi sinh vật. Kim loại nặng có mặt trong đất đã được khảo sát ở một số địa phương nước ta [30]. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene trong môi trường lỏng cho thấy, vi khuẩn được cố định có tốc độ phân hủy nhanh hơn so với vi khuẩn tự do. Sự cố định trong alginate, lớp alginate bảo vệ cho vi khuẩn giúp chúng giảm được sự độc hại của kim loại nặng so với tiếp xúc trực tiếp trong môi trường lỏng.

Trong số các kim loại nặng được khảo sát, As^{5+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} và Cu^{2+} có mức độ ức chế tương đương nhau. Sự phân hủy toluene, Pb^{2+} và Ni^{2+} cũng có mức độ độc đối với vi khuẩn tương đương và ít hơn so với các kim loại nêu trên (hình 4). Nghiên cứu trước đây được tiến hành bởi Lin và cs (2004) cho thấy, *Mycobacterium* sp. CHXY119 được cố định trong polyvinyl alcohol - alginate cũng có khả năng chịu đựng được với nồng toluene và một số chất hữu cơ khác cao hơn so với dạng tự do [31]. *Mycobacterium* sp.



Hình 4. Ảnh hưởng của kim loại nặng đến sự phân hủy toluene của *C. testosterone* KT5 ở dạng tự do và cố định trong alginate. Thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ hóa chất cũng như kim loại nặng là 2 mM và thời gian ủ là 12 giờ.

CHXY119 được cố định cũng ít bị ảnh hưởng bởi kim loại nặng như Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} hơn so với dạng tự do. Kết quả này cho thấy sử dụng dạng cố định có ưu thế hơn khi xử lý ô nhiễm toluene trong các điều kiện môi trường khác nhau.

Phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất bởi vi khuẩn *C. testosterone* KT5

Trong công bố trước đây, *C. testosterone* KT5 dạng tự do đã được khảo sát về khả năng phân hủy toluene và 3CT và 34DCT trong đất. Trong bài báo này, sự phân hủy các chất này cũng được thực hiện nhưng có số lượng vi khuẩn cao hơn. Kết quả cho thấy, với lượng vi khuẩn cao hơn thì tốc độ phân hủy trong đất cao hơn. Chẳng hạn, trong bài báo trước, số lượng vi khuẩn là 10^6 CFU/g đất khô, 78,6±4,7% toluene bị phân hủy sau 15 ngày [21]. Trong thí nghiệm này,

Bảng 2. Sự phân hủy toluene và chlorotoluene trong đất sau 7 ngày của vi khuẩn *C. testosterone* KT5 dạng tự do và cố định trong alginate.

Thí nghiệm	Toluene và chlorotoluene còn lại trong đất (%)*					
	Alginate không có vi khuẩn		Vi khuẩn tự do		Vi khuẩn cố định	
	Đất không khử trùng	Đất đã khử trùng	Đất không khử trùng	Đất đã khử trùng	Đất không khử trùng	Đất đã khử trùng
Toluene	88,3±6,3 ^{aA}	92,3±3,6 ^{aA}	35,5±7,3 ^{abA}	41,2±8,8 ^{bA}	26,5±6,9 ^{aA}	40,2±7,7 ^{bA}
2CT	90,5±4,2 ^{aA}	96,5±2,7 ^{aA}	68,5±8,7 ^{abB}	75,5±8,6 ^{bB}	53,9±10,0 ^{abB}	64,5±11,7 ^{abC}
3CT	91,0±4,0 ^{aA}	95,0±2,2 ^{aA}	42,4±11,1 ^{aA}	65,4±10,2 ^{bB}	35,7±11,2 ^{aA}	44,7±8,7 ^{aAB}
4CT	94,1±3,4 ^{aA}	94,5±3,8 ^{aA}	51,1±10,8 ^{abAB}	61,1±8,4 ^{bB}	42,5±7,9 ^{aAB}	61,5±8,7 ^{abC}

*: các chữ in thường khác nhau đi kèm với các số thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê trong cùng một hàng và in hoa thể hiện trong cùng một cột. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

với $3,5 \times 10^9$ CFU/g đất thì toluene đã hoàn toàn bị phân hủy trong đất sau 10 ngày. Tuy nhiên, sự phân hủy trong đất diễn ra chậm hơn rất nhiều trong môi trường lỏng. Điều này cũng được xác nhận ở bài báo trước. Trong môi trường đất, sự di chuyển tự do của vi khuẩn, cũng như sự khuếch tán chậm của hóa chất và oxy thường là nguyên nhân chính dẫn đến sự phân hủy chậm hơn ở môi trường lỏng. Ngoài ra, các yếu tố khác như thành phần và kết cấu của đất, độ pH cũng góp

phần tạo ra sự khác biệt về tốc độ phân hủy.

Từ bảng 2 có thể thấy rằng, sự chênh lệch về khả năng phân hủy của vi khuẩn cố định và tự do trong đất là không nhiều như trong môi trường lỏng. Mặc dù có thể chịu đựng được độc tố của môi trường tốt hơn so với dạng tự do, nhưng vi khuẩn bị cố định gò bó trong khoảng không gian hẹp hơn nên không được tiếp xúc với môi trường ngoài trong thời gian đầu. Sự khuếch tán hóa chất trong đất bị hạn chế cũng là nguyên nhân làm vi khuẩn bị cố định khó tiếp xúc với hóa chất. Sau khoảng 5-6 ngày, các hạt alginate có hiện tượng vỡ ra hoặc phân hủy một phần. Alginate có nguồn gốc từ các loại tảo nâu (Phaeophyceae) nên việc bị phân hủy là bình thường và góp phần phòng thích vi khuẩn ra môi trường ngoài. Toluene dễ phân hủy trong đất hơn so với các chlorotoluene khác. Một nghiên cứu trước đây cho thấy, cố định vi khuẩn *Pseudomonas* sp UG14Lr trong alginate để phân hủy hóa chất trong đất làm giảm khả năng sống sót và phân hủy so với dạng tự do [32]. Độ ẩm trong đất thấp là yếu tố chính dẫn đến sự giảm sút này [32].

Ở một số thí nghiệm, sự phân hủy của hóa chất trong đất chưa khử trùng nhanh hơn đất đã khử trùng là do hoạt động của vi khuẩn trong đất. Vi khuẩn đã chùng vào môi trường đất chưa khử trùng phân hủy nhanh hơn đất đã khử trùng ở một số trường hợp, chứng tỏ vi khuẩn được chùng có sự cộng tác với vi khuẩn bản địa mà không bị vi khuẩn bản địa cạnh tranh hay ức chế. Trong các thí nghiệm đối chứng không chùng vi khuẩn, sự giảm lượng hóa chất là không nhiều, chứng tỏ vi khuẩn *C. testosterone* KT5 phát huy được vai trò của chúng.

Kết luận

C. testosterone KT5 được phân lập từ đất bị ô nhiễm có khả năng ứng dụng để tẩy sạch toluene và các monochlorotoluene khác tồn dư trong đất và trong nước. Vi khuẩn cố định trong alginate thể hiện khả năng phân hủy vượt trội so với dạng tự do trong điều kiện thường hay khi độ pH thay đổi và sự nhiễm độc của kim loại nặng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Dobslaw, K.H. Engesser (2012), "Degradation of 2-chlorotoluene by *Rhodococcus* sp. OCT 10", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**(5), pp.2205-2214.
- [2] L.H. Keith (1981), "Organic pollutants in water: identification and analysis", *Environ. Sci. Technol.*, **15**(2), pp.156-162.
- [3] R.M. Krill, W.D. Sonzogni (1986), "Chemical monitoring of Wisconsin's ground water", *J. AWWA*, **78**, pp.70-75.
- [4] I. Martí, R. Lloret, J. Martín-Alonso, F. Ventura (2005), "Determination of chlorinated toluenes in raw and treated water samples from the Llobregat river by closed loop stripping analysis and gas chromatography-mass spectrometry detection", *J. Chromatogr. A*, **1077**(1), pp.68-73.
- [5] A.D. Nikolaou, G. Golfinopoulos, M.N. Kostopoulou, G.A. Kolokythas, T.D. Lekkas (2002), "Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece", *Water Res.*, **36**(11), pp.2883-2890.
- [6] J.J. Westrick, J.W. Mello, R.F. Thomas (1984), "The groundwater supply survey", *J. Am. Water Works Assoc.*, **76**, pp.52-59.
- [7] B.C.F. Zoeteman, K. Harsen, J.B.H.J. Linders, C.F.H. Morra, W. Slooff (1980), "Persistent organic pollutants in river water and ground water of the Netherlands", *Chemosphere*, **9**(4), pp.231-249.
- [8] S.S. Buhamra (1998), "The analysis of VOCs survey data from residences in Kuwait", *Environmetrics*, **9**(1), pp.245-253.
- [9] D.L. Heikes, S.R. Jensen, M.E. Fleming-Jones (1995), "Purge and trap extraction with GC-MS determination of volatile organic compounds in table-ready foods", *J. Agric. Food. Chem.*, **43**(11), pp.2869-2875.
- [10] U. Brinkmann, W. Reineke (1992), "Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of meta-pathway", *FEMS Microbiol. Lett.*, **75**(1), pp.81-87.
- [11] B.E. Haigler, C.A. Pettigrew, J.C. Spain (1992), "Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150", *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(7), pp.2237-2244.
- [12] M.A. Haro, V. Lorenzo (2001), "Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene", *J. Biotech.*, **85**(2), pp.103-113.
- [13] J.G. Leahy, K.D. Tracy, M.H. Eley (2003), "Degradation of volatile hydrocarbons from steam-classified solid waste by a mixture of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria", *Biotechnol. Lett.*, **25**(6), pp.479-483.
- [14] O.V. Maltseva, I.P. Solyanikova, L.A. Golovleva, M. Schlömann, H.J. Knackmuss (1994), "Dienlacton hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* 1CP: purification and properties", *Arch. Microbiol.*, **162**(5), pp.368-374.
- [15] T. Nishio, A. Patel, Y. Wang, P.C.K. Lau (2001), "Biotransformations catalyzed by cloned p-cymene monooxygenase from *Pseudomonas putida* F1", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**(3), pp.321-325.
- [16] K. Pollmann, S. Beil, D.H. Pieper (2001), "Transformation of chlorinated benzenes and toluenes by TecA tetrachlorobenzene dioxygenase and TecB chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Ralstonia* sp. strain PS12", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(9), pp.4057-4063.
- [17] H. Raschke, M. Meier, J.G. Burken, R. Hany, M.D. Müller, J.R. van der Meer, H.P.E. Kohler (2001), "Biotransformation of various substituted aromatic compounds the chiral dihydrodihydroxy derivatives", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(8), pp.3333-3339.
- [18] P. Sander, R.M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes, W. Francke (1991), "Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(5), pp.1430-1440.
- [19] P.A. Vandenberg, R.H. Olsen, J.F. Colaruotolo (1981), "Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compounds", *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(4), pp.737-739.
- [20] J.S. Yadav, R.E. Wallace, C.A. Reddy (1995), "Mineralization of mono and dichlorobenzenes and simultaneous degradation of chloro and methyl-substituted benzenes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(2), pp.677-680.
- [21] H.D. Duc (2017), "Degradation of chlorotoluenes by *Comamonas testosteroni* KT5", *Appl. Biol. Chem.*, **60**(4), pp.457-465.
- [22] M. Schoebitz, H. Simonin, D. Poncelet (2012), "Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads", *J. Microencapsul.*, **29**(6), pp.532-538.
- [23] K. Pollmann, S. Kaschabek, V. Wray, W. Reineke, D.H. Pieper (2002), "Metabolism of dichloromethylcatechols as central intermediates in the degradation of dichlorotoluenes by *Ralstonia* sp. strain PS12", *J. Bacteriol.*, **184**(19), pp.5261-5274.
- [24] A. Lehning, U. Fock, R. Wittich, K.N. Timmis, D.H. Pieper (1997), "Metabolism of chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. strain PS12 and toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: evidence for monooxygenation by toluene and chlorobenzene dioxygenases", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(5), pp.1974-1979.
- [25] A. Pacholak, W. Smulek, T. Jesionowski, E. Kaczorek (2017), "The ability of *Achromobacter* sp. KW1 strain to biodegrade isomers of chlorotoluene", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92**(8), pp.2134-2141.
- [26] J.H. Jacob, F.I. Irshaid (2015), "Toluene biodegradation by novel bacteria isolated from polluted soil surrounding car body repair and spray painting workshops", *J. Environ. Prot. Ecol.*, **6**(12), pp.1417-1429.
- [27] R. Rajamanickam, K. Kaliyamoorthi, N. Ramachandran, D. Baskaran, J. Krishnan (2017), "Batch biodegradation of toluene by mixed microbial consortia and its kinetics", *Int. Biodeter. Biodegr.*, **119**, pp.282-288.
- [28] P. Singh, V. Kumar Singh, R. Singh, A. Kumar, D. Tiwary, P.K. Mishra (2018), "Biological degradation of toluene by indigenous bacteria *Acinetobacter junii* CH005 isolated from petroleum contaminated sites in India", *Energy Ecol. Environ.*, **3**(3), pp.162-170.
- [29] M.B. Cassidy, H. Lee, J.T. Trevors (1996), "Environmental applications of immobilized microbial cells: A review", *J. Ind. Microbiol.*, **16**(2), pp.79-101.
- [30] Chu Thi Thu Ha (2011), "Survey on heavy metals contaminated soils in Thai Nguyen and Hung Yen provinces in Northern Vietnam", *Journal of Vietnamese Environment*, **1**, pp.34-39.
- [31] C.W. Lin, C.H. Wu, H.C. Sun, S.H. Chang (2014), "Alleviation of metal and BTEX inhibition on BTEX degradation using PVA-immobilized degrader: kinetic model of BTEX degradation", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **37**(6), pp.1085-1093.
- [32] S.C. Weir, M.A. Providenti, H. Lee, J.T. Trevors (1996), "Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG14Lr in creosote-contaminated soil", *J. Ind. Microbiol.*, **6**(1), pp.62-67.

Đánh giá lượng phát thải khí CH₄ trong canh tác lúa nước tại tỉnh Nam Định

Lưu Thế Anh^{1*}, Hoàng Thị Thu Duyên², Đinh Mai Vân³, Đặng Thị Thanh Nga⁴, Hoàng Quốc Nam⁵

¹*Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội*

²*Trường Đại học Việt Nhật, Đại học Quốc gia Hà Nội*

³*Trường Đại học Lâm nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*

⁴*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

⁵*Viện Địa lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Ngày nhận bài 24/2/2020; ngày chuyển phản biện 26/2/2020; ngày nhận phản biện 25/3/2020; ngày chấp nhận đăng 31/3/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đo đạc lượng phát thải CH₄ từ hai hệ thống canh tác lúa nước gồm: chuyên 2 vụ lúa và 2 vụ lúa + 1 vụ màu tại xã Trục Hùng, huyện Trục Ninh, tỉnh Nam Định. Kết quả nghiên cứu cho thấy, lượng khí thải CH₄ trong ruộng chuyên 2 vụ lúa đạt cực đại là 413,7 mg/m²/ngày sau 61-67 ngày cấy; trong khi lượng phát thải CH₄ trong ruộng 2 vụ lúa + 1 vụ màu đạt cực đại là 540,6 mg/m²/ngày sau 73-77 ngày cấy. Sự khác nhau này được giải thích do chế độ bón phân khác nhau giữa hai phương thức canh tác. Ruộng chuyên 2 vụ lúa chủ yếu sử dụng phân bón vô cơ nên cây trồng dễ hấp thu hơn và cây lúa sinh trưởng nhanh hơn, do đó đỉnh phát thải khí CH₄ cũng sớm hơn. Trong khi ruộng trồng 2 vụ lúa + 1 vụ màu chủ yếu bón phân chuồng hoai mục (phân compost) nên phải mất một thời gian để vi sinh vật phân giải, khiến cho giai đoạn dậy thì của lúa muộn hơn và đỉnh phát thải khí CH₄ cũng chậm hơn. Đây là lý do giải thích cho lượng CH₄ phát thải trong đất trồng 2 vụ lúa + 1 vụ màu (quy đổi 2,668 tấn CO₂e/tấn thóc) cao hơn so với đất chuyên 2 vụ lúa (quy đổi 2,194 tấn CO₂e/tấn thóc). Đây mới chỉ là kết quả nghiên cứu bước đầu về ảnh hưởng của các yếu tố phân bón và giai đoạn sinh trưởng của lúa đến phát thải khí CH₄ trong canh tác lúa nước ở vùng Đồng bằng sông Hồng. Để đánh giá chính xác mức phát thải CH₄ trong điều kiện canh tác của Việt Nam, cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu khác, trong đó quan tâm đến vấn đề phát thải khí N₂O thường đi kèm với phát thải CH₄.

Từ khóa: CH₄, Nam Định, phát thải, 2 vụ lúa.

Chỉ số phân loại: 1.5

Mở đầu

Biến đổi khí hậu (BĐKH) là một trong những thách thức toàn cầu đối với sự phát triển và tồn tại của nhân loại trong thế kỷ XXI [1], làm gia tăng tần suất và cường độ các hiện tượng thời tiết cực đoan và thiên tai [2]. Phát thải khí nhà kính (KNK) như CO₂, CH₄, N₂O và các khí fluoride (HFCs, PFCs, SF₆, NF₃) là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến BĐKH toàn cầu [3]. Nguồn phát thải KNK chủ yếu từ đốt nhiên liệu hóa thạch (xăng, dầu, than đá...), khai thác khoáng sản, sử dụng đất, thay đổi sử dụng đất và lâm nghiệp. Trong các nguồn phát thải KNK, lượng phát thải từ phá rừng nhiệt đới, thay đổi sử dụng đất và lâm nghiệp chiếm tới 20% tổng lượng KNK phát thải. Lượng phát thải từ lĩnh vực nông nghiệp chiếm 10-12% tổng lượng KNK phát thải hàng năm trên toàn cầu [4] và chiếm 20% lượng KNK hiện nay trong khí quyển [5]. Hệ thống canh tác cạn chủ yếu phát thải N₂O, trồng lúa nước phát thải N₂O và CH₄. CH₄ hình thành từ đất quanh rễ lúa và phát thải vào khí quyển nhờ khuếch tán qua hệ thống mạch thông khí và phụ thuộc vào tính chất lý hoá và sinh học đất; kỹ thuật canh tác (làm

đất, bón phân, chế độ ngập nước...) hay đặc điểm khí hậu [6]. CH₄ phát sinh trong đất vùng rễ lúa và đi vào khí quyển bằng 3 cách: (i) Từ các mô khí bên trong thân cây lúa phát tán qua lông và phiến lá lúa (chiếm 90% tổng lượng CH₄ phát thải từ ruộng lúa); (ii) Qua tầng nước mặt ruộng và bay vào không khí thông qua khuếch tán gradient nồng độ (chiếm 9%); (iii) Sủi bọt khí trong tầng nước mặt trên ruộng lúa (chiếm 1%) [7]. Wang và cs (1997) [8] chỉ rõ, CH₄ phát thải chủ yếu thông qua lá lúa, đặc biệt vào giai đoạn sinh trưởng của cây lúa, khoảng 50% lượng CH₄ phát thải thông qua phiến lá vào trước giai đoạn cây lúa vươn lóng. Pathak và cs (2005) [9] cũng chỉ rõ, phát thải CH₄ thường tập trung vào giai đoạn cây lúa bắt đầu đẻ nhánh đến khi trổ bông, do ở giai đoạn này quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ trong đất diễn ra mạnh, cùng với sự phát triển mạnh của cây lúa. Trong khi đó, giai đoạn từ khi lúa chín sục tới khi thu hoạch, lượng CH₄ phát thải giảm dần và đạt thấp nhất vào thời điểm thu hoạch, vì giai đoạn này người dân thường rút nước phơi ruộng để chuẩn bị thu hoạch.

Hệ thống trồng lúa nước đóng vai trò đặc biệt quan trọng

*Tác giả liên hệ: Email: luutheanhig@yahoo.com/ltanh@cres.edu.vn

Assessment of methane emission from paddy rice cultivation in Nam Dinh province

The Anh Luu^{1*}, Thi Thu Duyen Hoang², Mai Van Dinh³,
Thi Thanh Nga Dang⁴, Quoc Nam Hoang⁵

¹*Institute for Natural Resources and Environment Studies,
Vietnam National University, Hanoi*

²*Vietnam Japan University, Vietnam National University, Hanoi*

³*Vietnam National University of Forest,*

Ministry of Agriculture and Rural Development

⁴*University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

⁵*Institute of Geography, Vietnam Academy of Science and Technology*

Received 24 February 2020; accepted 31 March 2020

Abstract:

The study has been conducted to examine CH₄ emission from two paddy rice cultivation systems including two specific paddy rice crops (RL) and two paddy rice crops rotated with one another crop (RM) in Truc Hung commune, Truc Ninh district, Nam Dinh province. CH₄ emission was found peaking at 413.7 mg/m²/day in the RL system after 61-67 days of transplantation; while one in the RM system peaking at 540.6 mg/m²/day after 73-77 days of transplantation. The main reason for the difference was blamed on distinguished feritiser applications between RL and RM systems. Accordingly, the RL system which mainly applied inorganic fertilisers, so the plants easily absorbed the nutrients and grew faster, inducing earlier CH₄ emission peak. In contrast, the RM applied mainly compost which took a longer time for microorganisms to decompose and make nutrients available for crops. As a result, the CH₄ emission peak was delayed in comparison with the RL system. Therefore, the total emission of CH₄ in RM (2.668 tons CO₂e/ton rice equivalent) was higher than that in RL (2.194 tons CO₂e/ton rice, equivalent). These preliminary findings have demonstrated the effects of fertilisers and rice growth stages on CH₄ emission in the Red river delta. Further researches should be implemented to precisely evaluate CH₄ emission in cultivating conditions in Vietnam, in which N₂O emission should be included along with CH₄ emission.

Keywords: CH₄, emission, Nam Dinh province, two paddy rice crops.

Classification number: 1.5

trong an ninh lương thực toàn cầu, là nguồn cung cấp lương thực cho một nửa dân số thế giới [10]. Đến năm 2011, diện tích trồng lúa nước chiếm 11% tổng diện tích canh tác toàn cầu và có thể tăng liên tục trong 20 năm tiếp theo do sức ép gia tăng nhu cầu về gạo được dự báo lên đến 24% [11]. Trong trồng lúa nước, việc tưới định kỳ giúp giảm khoảng 40% lượng CH₄ phát thải, việc bón phân chuồng hay phân xanh lại làm tăng 41% lượng khí này [12]. Lượng phân nitơ bón cho lúa cũng ảnh hưởng đến lượng CH₄ phát thải: lượng phân nitơ thấp (trung bình 79 kg N/ha) làm tăng phát thải CH₄ lên 18% so với không bón; lượng phân nitơ cao (trung bình 249 kg N/ha) làm giảm 15% lượng CH₄ phát thải; thay thế phân urê bằng phân amoni sulphat làm giảm phát thải CH₄ tới 40% nhưng lại làm tăng lượng N₂O phát thải [13]. Như vậy, việc trồng lúa nước nhằm đảm bảo năng suất tối đa, đồng thời giữ mức phát thải KNK thấp nhất để hạn chế BĐKH là vấn đề cần giải quyết để phát triển bền vững nền nông nghiệp. Giảm thời gian ngập nước trong canh tác lúa để hạn chế sự phân hủy yếm khí các hợp chất hữu cơ và giảm lượng các bon đầu vào thông qua kiểm soát phân bón sẽ góp phần quan trọng giảm phát thải CH₄.

Việt Nam có nền nông nghiệp lúa nước lâu đời, với diện tích chiếm 52,5% tổng diện tích đất nông nghiệp [14]. Tổng KNK phát thải từ lĩnh vực nông nghiệp năm 2010 là 88,4 triệu tấn CO₂ tương đương (chiếm hơn 53,1% tổng lượng KNK của cả nước); trong đó 50,5% là từ trồng lúa nước [15]. Trong điều kiện trồng lúa nước ở Việt Nam, thành phần phân bón có ảnh hưởng rõ rệt đến lượng CH₄ phát thải [16, 17]. Theo Nguyễn Đức Hùng và cs (2018) [16], bón rơm rạ làm tăng phát thải CH₄ cao nhất nhưng cho năng suất lúa thấp nhất, trong khi bón phân compost làm giảm phát thải CH₄ và tăng năng suất lúa khoảng 19,8-26,3% so với bón rơm rạ; sự biến động lượng phát thải CH₄ thay đổi theo mùa vụ, cao hơn vào vụ mùa và thấp hơn vào vụ xuân. Kỹ thuật canh tác lúa nước cũng ảnh hưởng đến phát thải CH₄; tưới ngập và để khô xen kẽ với áp dụng bón phân đạm theo bảng so màu lá giúp nâng cao năng suất lúa và giảm phát thải CH₄ 19-31% so với để ngập nước thường xuyên [17]. Các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước về phát thải CH₄ trong trồng lúa nước còn cho thấy có sự biến động phát thải do tập quán canh tác khác nhau. Để cung cấp thêm dữ liệu và hoàn thiện hơn bức tranh về phát thải KNK từ trồng lúa nước vùng Đồng bằng sông Hồng, các tác giả đã tiến hành thí nghiệm đo phát thải CH₄ vụ mùa năm 2017 tại xã Trục Hùng, huyện Trục Ninh, tỉnh Nam Định nhằm các mục tiêu: (i) Làm rõ mối quan hệ giữa phát thải khí CH₄ và các giai đoạn sinh trưởng của cây lúa; (ii) Ảnh hưởng của phương thức canh tác đến lượng khí thải CH₄.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thực nghiệm trên đồng ruộng

Khu vực thực nghiệm: bố trí 6 điểm thu mẫu để đo phát thải CH₄ (bảng 1) tại 2 khu vực có kỹ thuật làm đất khác nhau và bón phân khác nhau của xã Trục Hùng, huyện Trục Ninh, tỉnh Nam Định trên đất canh tác 2 vụ lúa nước/năm (hình 1). Tổng diện tích đất nông nghiệp tại khu vực thực nghiệm là 47 ha,

trong đó khoảng 70% đất trồng lúa nước và 30% đất trồng màu. Vụ mùa năm 2017, do ảnh hưởng lớn của mưa bão bất thường nên toàn tỉnh Nam Định có đến 9.000 ha lúa phải gieo cấy lại 2-3 lần sau 1 tháng theo lịch thời vụ. Riêng tại xã Trực Hùng, lúa gần như không bị ảnh hưởng, chỉ có một số điểm cần cấy dặm. Khoảng 70% diện tích vụ mùa của xã cấy giống lúa Bắc thơm 7, thời gian thu hoạch là 100 ngày sau cấy.

Giai đoạn từ cuối phân nhánh, làm đồng đến khi thu hoạch là thời kỳ cây lúa phát thải CH_4 cực đại và giảm dần về cuối vụ [9], do đó lựa chọn thời gian thí nghiệm đo phát thải CH_4 từ cuối thời kỳ phân nhánh đến khi thu hoạch lúa; mẫu lấy 3 đợt từ ngày 8/9-7/10/2017; thời điểm lấy mẫu từ 8-11 giờ sáng hàng ngày.

Bảng 1. Các vị trí thực nghiệm lấy mẫu KNK.

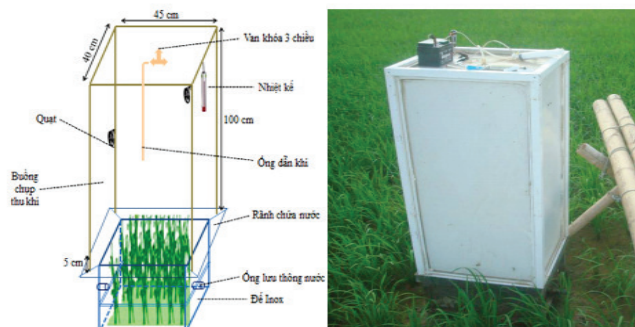
STT	Ký hiệu	Tọa độ		Đặc điểm
		Vĩ độ	Kinh độ	
1	RL1	20°14'542"	106°18'124"	- Đất chuyên 2 vụ lúa, địa hình thấp trũng
2	RL2	20°14'544"	106°18'149"	- Đất phù sa trong đê sông Ninh Cơ
				- Chế độ nước ngập thường xuyên theo lịch điều tiết nước của địa phương
3	RL3	20°14'543"	106°18'169"	- Kỹ thuật làm đất dầm ngâm giữa hai vụ lúa
				- Bón phân NPK
4	RM1	20°14'971"	106°18'106"	- Đất lúa nước 2 vụ + 1 vụ màu, địa hình cao
5	RM2	20°14'968"	106°18'091"	- Đất phù sa không được bồi ven đê sông Ninh Cơ
				- Chế độ nước ngập thường xuyên theo lịch điều tiết nước của địa phương
6	RM3	20°14'970"	106°18'074"	- Kỹ thuật phơi ải giữa 2 vụ
				- Bón lót phân chuồng ủ hoai mục (compost)



Hình 1. Sơ đồ khu vực thực nghiệm.

Dụng cụ thực nghiệm: dùng 6 bộ thiết bị thu mẫu khí phát thải có hình hộp chữ nhật (chamber). Cấu tạo của chamber gồm 2 bộ phận: (i) Thân chamber làm bằng vật liệu nhựa trắng nhôm và mica với kích thước dài x rộng x cao là 45x40x100 cm; (ii) Chân đế bằng vật liệu inox (45x40x30 cm) (hình 2). Hai mặt bên của chân đế có đặt ống lưu thông nước đường kính 0,18 cm giữa bên trong và bên ngoài chân đế (bình thường để mở, đến khi lấy mẫu chúng được đóng lại bằng 2 nút nhựa). Phía trên của chân đế có rãnh (kích thước: 4x4 cm) chứa nước

để đặt thân chamber (hình 3). Trong quá trình lấy mẫu khí, rãnh luôn chứa đầy nước sao cho thân và đế của chamber tạo thành 1 hộp kín nhằm ngăn không cho không khí lưu thông vào và ra khỏi chamber.



Hình 2. Cấu tạo chamber thu mẫu khí phát thải [18].

Các thiết bị lắp đặt bên trong chamber lấy mẫu khí gồm: 1 nhiệt kế dùng để đo nhiệt độ trong hộp lấy mẫu khí ở mỗi lần lấy mẫu; 2 quạt gió để trộn đều không khí trong hộp lấy mẫu trong suốt quá trình lấy mẫu. Thiết bị bên ngoài chamber gồm: bình ắc quy (12 V) nối với quạt gió bên trong; bộ phận điều áp (ống nhựa đường kính 0,2 mm; dài 0,72 m và van điều áp để điều chỉnh cân bằng áp suất); van 3 chiều; ống lấy mẫu khí đường kính 4,8 mm, dài 80 cm, gắn với van 3 chiều và nối với xi lanh hút mẫu; xi lanh lấy mẫu (50 ml) có đầu gắn kim tiêm loại nhỏ 2,5 μm; lọ đựng mẫu khí và đồng hồ để xác định thời gian khi lấy mẫu khí.

Chân đế của chamber lấy mẫu được đặt cách bờ ruộng khoảng 3 m, sâu dưới mặt đất từ 7-10 cm. Chân đế được đặt cố định trên ruộng lúa trong suốt quá trình lấy mẫu, đặt trước 1 ngày của đợt thu mẫu đầu tiên. Đặt cầu tre dài 3,5 m nối từ bờ ruộng đến vị trí đặt chamber sao cho vị trí cầu tre cách vị trí đặt chân đế khoảng 20 cm để thuận lợi cho quá trình thao tác lấy mẫu và tránh làm xáo trộn tầng đất dưới chân đế, dẫn tới ảnh hưởng đến kết quả đo phát thải CH_4 . Quy cách đặt thiết bị được kiểm tra kỹ lưỡng trước khi lấy mẫu để đảm bảo chất lượng mẫu trong suốt quá trình đo đạc tại hiện trường.



Hình 3. Cấu tạo và cách đặt chân đế của chamber [18].

Cách thu mẫu khí:

+ Bước 1: đổ đầy nước vào rãnh nước phía trên chân đế của chamber và lắp đặt thân chamber vào chân đế.

+ Bước 2: khóa van điều áp và bật quạt chạy để đảm bảo khí được trộn và đảo đều trong toàn bộ chamber.

+ Bước 3: lấy mẫu khí, dùng xi lanh dung tích 50 ml hút khí từ chamber tại các thời điểm t_0, t_1, t_2, t_3 . Trong đó, t_0 là thời điểm ngay sau khi lắp đặt thân chamber lên chân đế và khóa van điều áp; t_1, t_2, t_3 tương ứng là các thời điểm 10, 20 và 30 phút. Lưu ý trước khi lấy mẫu, khí trong chamber được hút đầy 5 lần thông qua van ba chiều. Khí được hút và bơm vào lọ đựng mẫu. Mỗi lần lấy mẫu, thông số nhiệt độ và mực nước ruộng được ghi chép vào phiếu theo dõi.

Phương pháp phân tích

Các mẫu khí trong lọ đựng mẫu được đưa về Phòng phân tích và thí nghiệm tổng hợp địa lý, Viện Địa lý để phân tích nồng độ CH_4 bằng máy sắc ký khí GC6810C. Cường độ phát thải khí CH_4 ($mg/m^2/h$) được tính bằng phương trình của Smith và Conen (2004) [19] như sau:

$$f = \frac{\Delta C}{\Delta t} * \frac{v}{A} * \frac{M}{V} * \frac{P}{P_0} * \frac{273}{T_{kelvin}}$$

Trong đó: ΔC là sự thay đổi nồng độ khí CH_4 trong thời gian Δt ; v và A là thể tích chamber và diện tích chân đế; M là khối lượng nguyên tử của khí; V là thể tích chiếm bởi 1 mol khí ở nhiệt độ và áp suất tiêu chuẩn (22,4 l); P là áp suất khí quyển (mbar); P_0 là áp suất tiêu chuẩn (1013 mbar); $T_{kelvin} = 273 + T_{tb}$ và $T_{tb} = (T_0 + T_1 + T_2 + T_3)/4$.

Tổng tích lũy phát thải của CH_4 trong cả vụ lúa được tính theo công thức hình thang sau:

$$GWP = (n_1 - n_2) * \frac{F_{n1} + F_{n2}}{2} + (n_2 - n_3) * \frac{F_{n2} + F_{n3}}{2} + \dots + (n_c - n_x) * \frac{F_{nx} + F_{nc}}{2}$$

Trong đó: n_1, n_2, n_3 là ngày của lần lấy mẫu thứ 1, 2, 3; n_x là ngày lấy mẫu thứ x trước lần lấy mẫu cuối cùng; n_c là ngày của lần lấy mẫu cuối cùng; $F_{n1}, F_{n2}, F_{n3}, F_{nx}$ và F_{nc} lần lượt là lượng phát thải trung bình ngày của khí CH_4 ($mg/m^2/ngày$) ứng với các ngày lấy mẫu n_1, n_2, n_3, n_x và n_c .

Dựa vào cách tính của IPCC (2007), tính toán tiềm năng nóng lên toàn cầu bằng việc quy đổi tất cả các loại KNK về CO_2 (tương đương CO_2e). Hệ số quy đổi CH_4 về $CO_2e = 25 * CH_4$.

$$\text{Hệ số phát thải theo năng suất lúa: } k = \frac{GWP(CO_2e)}{\text{sản lượng}}$$

Xử lý số liệu phân tích: kết quả phân tích được xử lý bằng phần mềm Excel và phần mềm thống kê R. Để phân tích sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, chúng tôi sử dụng phân tích phương sai ANOVA một nhân tố bằng hàm một biến (One-way ANOVA).

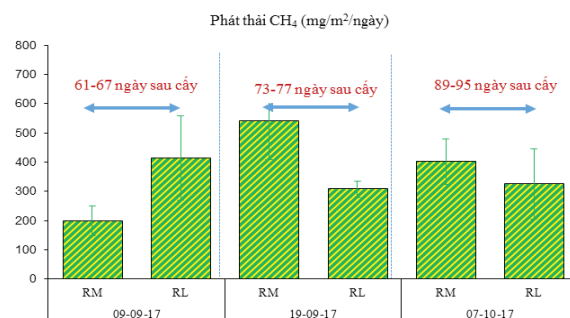
Kết quả và thảo luận

Phát thải CH_4 theo các giai đoạn phát triển của lúa

Theo kết quả điều tra thực tế, trồng lúa nước tại xã Trục Hùng, Trục Ninh, Nam Định theo truyền thống ruộng ngập nước, tháo nước 1 lần. Mực nước trong ruộng lúa được điều tiết theo kênh nội đồng. Về phân bón, người dân chủ động về

liều lượng và chủng loại phân bón, dựa theo kinh nghiệm canh tác và thời tiết mùa vụ. Kết quả tính toán cho thấy, lượng CH_4 phát thải trên đất chuyên 2 vụ lúa (RL) đạt cao nhất (413,7 $mg/m^2/ngày$) trong giai đoạn từ 61-67 ngày cấy, trùng với thời kỳ sinh sản của cây lúa (hình 4). Trong khi đó, ruộng 2 vụ lúa + 1 vụ màu (RM) có lượng CH_4 phát thải đạt cực đại (540,6 $mg/m^2/ngày$) trong giai đoạn từ 73-77 ngày sau cấy. Chế độ bón phân và điều kiện nền đất ruộng có thể là nguyên nhân chính dẫn đến sự khác biệt này. Tại 3 điểm đo RL1, RL2 và RL3, người dân sử dụng hoàn toàn phân hóa học nên cây trồng dễ hấp thu và tốc độ phát triển của lúa nhanh hơn, lúa đạt đến giai đoạn sinh sản sớm hơn. Trong khi đó, trên 3 điểm đo RM1, RM2 và RM3, người dân chủ yếu bón lót vào đầu vụ bằng phân chuồng ủ hoai mục, lượng phân hóa học dùng trong vụ giảm hơn so với các điểm RL. Phải mất một khoảng thời gian nhất định để vi sinh vật có thể phân giải phân compost này thành dinh dưỡng dễ tiêu cho lúa. Vì vậy, thời gian thành thực của lúa chậm hơn, khiến cho đỉnh phát thải khí CH_4 xuất hiện chậm hơn so với trên chân ruộng chuyên 2 vụ lúa (RL).

Đỉnh phát thải CH_4 trên đất chuyên 2 vụ lúa (RL) khu vực nghiên cứu có giá trị tương đương với kết quả công bố của Quynh Duong Vu, et al. (2015) [20] khi thực nghiệm trên đất trồng lúa tại huyện Hiệp Hòa, Bắc Giang. Tuy nhiên, nghiên cứu của Phạm Quang Hà và cs (2013) [21] trong chậu thực nghiệm tại Viện Môi trường Nông nghiệp (Tứ Liêm, Hà Nội) vụ xuân lại cho kết quả thấp hơn, với đỉnh phát thải khí CH_4 vào khoảng 45-60 ngày sau cấy. Sự khác nhau này có thể là do sự ảnh hưởng của các tính chất hoá, lý, sinh học của đất và kỹ thuật canh tác như làm đất, bón phân, tưới nước, gieo trồng hay nền khí hậu mùa trồng [9]. Kết quả nghiên cứu cũng tại Nam Định của Nguyễn Hữu Thành (2012) [22] lại cho thấy, lượng phát thải CH_4 vượt trội so với các giá trị thu được của nghiên cứu này, giá trị phát thải CH_4 lên đến 94,2 $mg CH_4/m^2/h$; tương đương 2260 $mg CH_4/m^2/ngày$. Tuy có sự chênh lệch lớn với kết quả của nghiên cứu này, nhưng những kết quả công bố của tác giả Nguyễn Hữu Thành có biên độ dao động khá lớn. Vì vậy, cần có nhiều thực nghiệm đồng ruộng để khẳng định lại.



Hình 4. Phát thải khí CH_4 từ cây lúa ở các giai đoạn khác nhau.

Đối với 3 vị trí thực nghiệm RM, cùng điều kiện thời tiết, thời điểm phát thải cao nhất của cây lúa khảo sát ghi nhận được vào khoảng 73-77 ngày sau cấy và lượng CH_4 phát thải với cường độ lớn hơn so với mẫu thu được tại RL 75% ($p < 0,05$). Sự khác biệt này có thể do cách dùng phân bón khác nhau,

dẫn đến hàm lượng chất hữu cơ trong đất của 2 khu vực thực nghiệm có sự khác nhau. Tuy nhiên, nguyên nhân của sai khác này cần được tiếp tục nghiên cứu thêm. Kết quả tương tự cũng đã được khẳng định trong nghiên cứu của Phạm Quang Hà và cs (2013) [21]. Kết quả thu được tại khu vực khảo sát cho thấy, hàm lượng chất hữu cơ trong đất tỷ lệ thuận với lượng phát thải CH_4 và tỷ lệ nghịch với thời gian phát thải CH_4 . Phát thải CH_4 giảm dần về cuối vụ, thể hiện rõ ở các điểm khảo sát RL; giảm chậm ở chân ruộng RM. Kết quả này tương đồng với kết quả được công bố của Quynh Duong Vu, et al. (2015) [20] đã thực hiện tại Bắc Giang vụ mùa 2011 và nghiên cứu của Mai Văn Trinh và cs (2014) [23] tại Thịnh Long (Nam Định) vụ mùa 2014. Sự giảm cường độ phát thải CH_4 ở giai đoạn cuối vụ là do người dân rút nước phơi ruộng để chuẩn bị thu hoạch, nên đã làm giảm quá trình phân hủy chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí. Ngoài ra, sự suy giảm động năng của lá lúa ở giai đoạn sắp thu hoạch cũng đã hạn chế đường dẫn khí CH_4 ra khỏi ruộng lúa [22, 24].

Tổng tích lũy phát thải và hệ số phát thải CH_4 vụ mùa 2017

Thực nghiệm đồng ruộng tại Trục Hùng, Trục Ninh, Nam Định diễn ra trong 28 ngày, với 3 đợt lấy mẫu, tổng giá trị phát thải cho toàn vụ được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Tổng phát thải KNK vụ mùa 2017.

Khu vực thực nghiệm	Tổng lượng phát thải	Lượng CH_4 phát thải (kg/ha)	Lượng CO_2 quy đổi (tấn CO_2 /ha)
RM	GWP trong 28 ngày	122	3,044
	GWP cả vụ	435	10,871
RL	GWP trong 28 ngày	91	2,276
	GWP cả vụ	325	8,127

Với mẫu RL, tổng lượng phát thải cả vụ là 325 kg CH_4 /ha, chưa bằng 50% so với kết quả thu được tại Thịnh Long, vụ mùa 2014 với tổng giá trị là 789 kg CH_4 /ha với mẫu dùng hoàn toàn phân bón NPK trong nghiên cứu của Mai Văn Trinh và cs (2014) [23]. Tuy nhiên, kết quả thu được tại khu vực lấy mẫu RL lại không có sự sai khác nhiều so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Bộ và cs (2016) [25] với giá trị 443 kg CH_4 /ha tại Thịnh Long (Nam Định). Sai khác này có thể do cách lựa chọn chủng loại, lượng phân bón sử dụng, chất lượng đất hoặc giống và mật độ cấy lúa. Để có kết quả so sánh chi tiết hơn về sự sai khác và nguyên nhân của sự sai khác, các thí nghiệm cần thực hiện khảo sát trong cả vụ lúa, tại các thời kỳ phát triển của cây.

Kết quả tổng tích lũy phát thải một lần nữa khẳng định, đất có hàm lượng chất hữu cơ cao (do sử dụng phân chuồng hoai mục) phát thải lượng khí CH_4 vượt hơn 33% so với chỉ sử dụng phân NPK thông thường. Lượng CH_4 phát thải ước tính trong riêng vụ mùa 2017 tại vùng khảo sát đạt giá trị khá lớn (10,871 tấn CO_2 /ha) với đất ruộng 2 lúa + 1 vụ màu (RM) và 8,127 tấn CO_2 /ha ở ruộng chuyên 2 vụ lúa (RL). So sánh với các kết quả nghiên cứu đã được công bố của Mai Văn Trinh và cs (2014),

Nguyễn Văn Bộ và cs (2016) [23, 25], giá trị tổng tích lũy phát thải CH_4 tính toán được trong nghiên cứu này còn thấp. Đây là kết quả nội suy, mang tính dự báo.

Xét về sản lượng thu hoạch cuối vụ, ruộng dùng phân chuồng bón lót (RM) cho năng suất vượt trội hơn ruộng dùng phân hóa học trong vụ mùa 2017. Năng suất thu hoạch thực tế tại các điểm khảo sát như trong bảng 3.

Bảng 3. Năng suất lúa vụ mùa 2017.

	Năng suất tại các điểm			Năng suất trung bình	
	tạ thóc/sào Bắc Bộ			tạ thóc/sào Bắc Bộ	tấn/ha
RM	1,5	1,5	1,4	1,467	4,074
RL	1,4	1,3	1,3	1,333	3,704

Sản lượng thu hoạch vụ mùa 2017 tại vùng khảo sát thấp hơn sản lượng trung bình hàng năm. Nguyên nhân được cho là do những bất thường về thời tiết trong thời kỳ gieo cấy. Theo Niên giám thống kê 2016 tỉnh Nam Định, năng suất lúa vụ mùa trên toàn tỉnh trung bình đạt 5 tấn/ha. Đặc biệt, huyện Trục Ninh là vùng canh tác lúa trọng điểm của tỉnh, năng suất vụ mùa các năm trước đều đạt mức trên 5,2 tấn/ha. Với kết quả thu được cho thấy, năng suất vụ mùa 2017 tại khu vực khảo sát thấp hơn nhiều so với cùng kỳ hàng năm. Hệ số phát thải CH_4 cho vụ mùa 2017 được tính như sau:

- Với ruộng 2 vụ lúa + 1 vụ màu, dùng phân chuồng bón lót:
 $k_{RM} = 10,871/4,074 = 2,668$ (tấn CO_2 /tấn thóc).

- Với ruộng chuyên 2 vụ lúa, chỉ dùng NPK:
 $k_{RL} = 8,127/3,704 = 2,194$ (tấn CO_2 /tấn thóc).

Kết quả này một lần nữa khẳng định, việc sử dụng phân chuồng hoai mục để bổ sung chất hữu cơ cho đất là một yếu tố làm gia tăng phát thải CH_4 vào khí quyển, làm gia tăng nồng độ KNK. Tuy nhiên, nghiên cứu của Phạm Quang Hà và cs (2013) [21] chỉ ra rằng, lượng phát thải CH_4 trên đất xám bạc màu cao hơn trên đất phù sa. Vì vậy, tối ưu hóa sử dụng phân bón còn tùy thuộc vào đặc tính đất nền của từng khu vực cụ thể và cần nghiên cứu bổ sung. Ngoài ra, theo phương thức canh tác thực tế tại Nam Định, hiện nay số hộ gia đình sử dụng phân chuồng bón lót là không nhiều, cần đẩy mạnh hoạt động tuyên truyền để thay đổi thói quen canh tác của người dân.

Hệ số phát thải CH_4 thu được trong nghiên cứu này lần lượt là 2,194 và 2,668 tấn CO_2 /tấn thóc tương ứng với chân ruộng chuyên 2 vụ lúa và ruộng 2 vụ lúa + 1 vụ màu. Tuy nhiên, vụ mùa 2017 tại Nam Định đã gặp điều kiện thời tiết bất lợi ngay từ thời kỳ gieo cấy, gặp mưa lụt vào lúc thu hoạch nên ảnh hưởng khá nhiều đến năng suất lúa, ảnh hưởng đến hệ số phát thải CH_4 trong sản xuất lúa.

Đến nay, Việt Nam vẫn chưa có bộ hệ số phát thải riêng cho các lĩnh vực, ngành cụ thể mà sử dụng hệ số khuyến cáo của IPCC. Các hệ số này không hoàn toàn phù hợp với thực tế. Ngoài ra, có thể thấy các nghiên cứu thực nghiệm về phát thải KNK trên đồng ruộng trong nước còn hạn chế, chưa đầy đủ

và chưa lập được hệ số phát thải riêng cho lĩnh vực này. Các kết quả thu được xét riêng khu vực Đồng bằng sông Hồng và tỉnh Nam Định vẫn chưa hoàn toàn đồng nhất. Sai lệch này do nhiều nguyên nhân như phương thức canh tác, điều kiện thời tiết... Việc xây dựng hệ số phát thải riêng cho Việt Nam còn rất nhiều khó khăn. Tuy nhiên, đây là mục tiêu cấp thiết, cần sớm hoàn thiện.

Kết luận và khuyến nghị

Nghiên cứu thực nghiệm đo phát thải khí CH_4 tại ruộng lúa thuộc xã Trực Hùng, huyện Trực Ninh, Nam Định cho thấy, đỉnh phát thải khí CH_4 phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của cây lúa và đạt cao nhất vào giai đoạn lúa thành thực. Lúa canh tác trên đất ruộng trồng xen màu (2 vụ lúa + 1 vụ màu) có đỉnh phát thải CH_4 ở thời gian muộn hơn so với lúa canh tác trên đất chuyên 2 vụ lúa, nhưng lượng phát thải cao hơn 75%. Hệ số phát thải CH_4 trên ruộng 2 vụ lúa + 1 vụ màu đạt 2,668 (tấn CO_2e /tấn thóc); trên ruộng chuyên 2 vụ lúa thấp hơn, đạt 2,194 (tấn CO_2e /tấn thóc). Kết quả nghiên cứu đã góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc tính toán hệ số phát thải CH_4 từ canh tác lúa nước trong điều kiện ở Việt Nam hiện nay.

Nghiên cứu còn một số hạn chế như: chưa tính toán được lượng phát thải khí N_2O thường đi kèm với phát thải CH_4 ở các ruộng lúa nước; chưa làm rõ mối liên hệ giữa các tính chất lý hóa của đất canh tác với lượng khí thải, cũng như chế độ phân bón khác nhau ảnh hưởng như thế nào đến lượng phát thải khí CH_4 và các loại KNK khác trong bối cảnh tác động của BĐKH ở nước ta. Do đó, cần có nghiên cứu mở rộng để làm rõ các mối quan hệ này.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin cảm ơn Bộ KH&CN đã tài trợ kinh phí cho đề tài KH&CN độc lập cấp quốc gia: “Nghiên cứu, đánh giá tác động của BĐKH đến tài nguyên đất vùng Đồng bằng sông Hồng và đề xuất các giải pháp chủ động ứng phó”, mã số ĐTĐLCN.48/16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Tài nguyên và Môi trường, Cơ quan Hợp tác quốc tế Nhật Bản (2017), “Đề xuất khung chính sách kiểm kê khí nhà kính và thực hiện hành động giảm phát thải khí nhà kính phù hợp với điều kiện TP Hồ Chí Minh”, *Báo cáo Dự án Hỗ trợ lên kế hoạch và thực hiện các hành động giảm nhẹ phát thải khí nhà kính phù hợp với điều kiện quốc gia theo cách có thể đo đạc - báo cáo - thẩm định được*.
- [2] P. Vellinga and W.J. Van Verseveld (2000), *Climate Change and Extreme Weather Events*, 50pp, World Wide Fund for Nature, Gland, Switzerland.
- [3] IPCC (2014), *Climate Change 2014: Synthesis Report*, 151pp, Part of the Working Groups I, II and III contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press.
- [4] B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer (Eds.) (2007), *Climate Change 2007: Mitigation, Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, pp.497-540, Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- [5] B.W. Hüttsch (2001), “Methane oxidation in non-flooded soil as affected by crop production”, *European Journal of Agronomy*, **14**(4), pp.237-260.

- [6] K. Inubushi, M. Umebayashi, H. Wada (1990), “Methane emission from paddy fields”, *Transactions, 14th International Congress of Soil Science*, Kyoto, Japan, **Vol.II**, pp.249-254.
- [7] H. Schütz, W. Seiler, R. Conrad (1989), “Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies”, *Biogeochemistry*, **7**, pp.33-53.
- [8] B. Wang, H.U. Neue, H.P. Samonte (1997), “Role of rice in mediating methane emission”, *Plant and Soil*, **189**(1), pp.107-115.
- [9] H. Pathak, C. Li, R. Wassmann (2005), “Greenhouse gas emissions from Indian rice fields: calibration and upscaling using the DNDC model”, *Biogeosciences*, **2**, pp.113-123.
- [10] FAO (2011), *The State of Food Insecurity in the World: How Does International Price Volatility Affect Domestic Economics and Food Security?* 55pp, Rome, Italy.
- [11] N. Van Nguyen, A. Ferrero (2006), “Meeting the challenges of global rice production”, *Paddy Water Environment*, **4**(1), pp.1-9.
- [12] A. Bhatia, P.K. Aggarwal, N. Jain, H. Pathak (2011), “Greenhouse gas emission from rice and wheat-growing areas in India: spatial analysis and upscaling”, *Greenhouse Gas Science Technology*, **2**, pp.115-125.
- [13] B.A. Linquist, M.A. Adviento-Borbe, C.M. Pittelkow, C. Van Kessel, K. Jan, Van Groenigen (2012), “Fertilizer management practices and greenhouse gas emissions from rice systems: a quantitative review and analysis”, *Field Crops Research*, **135**, pp.10-21.
- [14] Tổng cục Thống kê (2018), *Niên giám thống kê 2017*, Nhà xuất bản Thống kê, Hà Nội.
- [15] Bộ Tài nguyên và Môi trường (2015), *Đóng góp dự kiến do quốc gia tự quyết định của Việt Nam*, 16tr, Báo cáo kỹ thuật.
- [16] Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Thọ Hoàng, Nguyễn Hữu Thành (2018), “Phát thải khí mê tan từ đất lúa nước được bón vật liệu hữu cơ khác nhau trên đất phù sa sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **16**, tr.662-670.
- [17] Huỳnh Quang Tín, Nguyễn Hồng Cúc, Nguyễn Văn Sánh, Nguyễn Việt Anh, Jane Hughes, Trịnh Thị Hòa, Trần Thu Hà (2012), “Canh tác lúa ít khí thải nhà kính tỉnh An Giang vụ đông xuân 2010-2011”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **23A**, tr.31-41.
- [18] Mai Văn Trinh (chủ biên) và nnk (2016), *Sổ tay hướng dẫn đo phát thải khí nhà kính trong canh tác lúa*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [19] K.A. Smith, F. Conen (2004), “Impacts of land management on fluxes of trace greenhouse gases”, *Soil Use and Management*, **20**(2), pp.255-263.
- [20] Quỳnh Duong Vu, Andreas de Neergaard, Toan Duc Tran, Quan Quang Hoang, Proyuth Ly, Tien Minh Tran (2015), “Manure, biogas digestate and crop residue management affects methane gas emissions from rice paddy fields on Vietnamese smallholder livestock farms”, *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **103**, pp.329-346.
- [21] Phạm Quang Hà, Vũ Thắng, Nguyễn Thị Khánh, Kimio Ito, Koichi Endoh, Kazuyuki Inubushi (2013), “Đánh giá mức độ phát thải CH_4 từ đất phù sa sông Hồng và đất xám bạc màu trồng lúa ở miền Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **3**, tr.37-40.
- [22] Nguyễn Hữu Thành (2012), “Tình hình phát thải khí metan (CH_4) do hoạt động canh tác lúa nước ở khu vực Đồng bằng sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*, **10**(1), tr.165-172.
- [23] Mai Văn Trinh, Bùi Thị Phương Loan, Trần Văn Thế và cs (2014), “Xây dựng mô hình thu gom, xử lý phế phụ phẩm trồng trọt nhằm giảm phát thải khí nhà kính nông thôn ở vùng Đồng bằng sông Hồng”, *Báo cáo tổng kết nhiệm vụ giai đoạn 2012-2014*, Viện Môi trường Nông nghiệp, Hà Nội.
- [24] Wassmann (2010), “Fertilizer use and GHG emissions in agriculture/paddy field”, *Climate Change and Crop Production*, pp.151-176, Oxford shire, UK.
- [25] Nguyễn Văn Bộ, Mai Văn Trinh, Bùi Thị Phương Loan, Lê Quốc Thanh, Phạm Anh Cường, Nguyễn Lê Trang (2016), “Urea-agrotain và phát thải khí nhà kính”, *Báo cáo Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ 2*.

Thành phần loài và phân bố của các loài cua (Crustacea: Decapoda: Brachyura) ở rừng ngập mặn huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng

Lê Văn Thọ^{1*}, Đặng Văn Sơn¹, Nguyễn Thị Mai Hương¹, Phan Doãn Đăng¹, Trần Ngọc Diễm My²

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 8/1/2020; ngày chuyển phản biện 16/1/2020; ngày nhận phản biện 3/3/2020; ngày chấp nhận đăng 26/3/2020

Tóm tắt:

Cua (Brachyuran crabs) là nhóm giáp xác (Crustacea) có thành phần loài đa dạng, phân bố rộng và giữ vai trò sinh thái quan trọng ở khu vực rừng ngập mặn (mangrove forest area). Trong nghiên cứu này, các mẫu cua được thu tại 12 điểm nghiên cứu thuộc hai kiểu sinh cảnh, gồm: sinh cảnh rừng ngập mặn và sinh cảnh bãi bồi ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng vào tháng 4 (mùa khô) và tháng 9 (mùa mưa) năm 2019. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 34 loài thuộc 17 giống, 7 họ. Trong đó, họ Ocypodidae có đa dạng loài lớn nhất với 11 loài, tiếp theo là họ Sesamididae (7 loài), Portunidae (6 loài), Varunidae (4 loài), Grapsidae (3 loài), Matutidae (2 loài) và thấp nhất là họ Xanthidae chỉ ghi nhận được 1 loài. Đa dạng loài và mật độ quần thể cua tại sinh cảnh rừng ngập mặn (ghi nhận 26 loài và mật độ dao động từ $34,0 \pm 8,4$ đến $53,8 \pm 15,4$ cá thể/m²) cao hơn tại sinh cảnh bãi bồi (ghi nhận được 15 loài và mật độ dao động từ $12,4 \pm 1,9$ đến $13,6 \pm 3,6$ cá thể/m²). Đa dạng loài và mật độ quần thể cua trong đợt khảo sát vào mùa mưa (ghi nhận được 28 loài và mật độ dao động từ $13,6 \pm 3,6$ đến $53,8 \pm 8,4$ cá thể/m²) cao hơn trong đợt khảo sát vào mùa khô (ghi nhận được 14 loài và mật độ dao động từ $12,4 \pm 1,9$ đến $34,0 \pm 8,4$ cá thể/m²).

Từ khóa: cua, khu vực rừng ngập mặn, phân bố, sinh cảnh bãi bồi, thành phần loài.

Chỉ số phân loại: 1.6

Mở đầu

Cua là nhóm các loài giáp xác thuộc phân bộ cua (Brachyura), bộ mười chân (Decapoda), lớp giáp xác lớn (Malacostraca) của phân ngành giáp xác (Crustacea). Hiện nay, trên thế giới đã ghi nhận được khoảng 7.000 loài thuộc 1271 giống, 93 họ. Các loài cua phân bố rộng, từ khu vực biển sâu cho tới vùng núi cao và nhiều nhất ở khu vực rừng ngập mặn, cửa sông ven biển [1]. Ở khu vực rừng ngập mặn, cửa sông ven biển, nhóm các loài cua không chỉ có thành phần loài đa dạng, mật độ quần thể cao mà còn giữ nhiều vai trò sinh thái quan trọng [2, 3]. Các loài cua với tập tính sống đào hang và ăn vật liệu hữu cơ, tảo bám, vi sinh vật đã giúp làm tơi xốp đất, thoáng khí, thay đổi dòng chảy nước, tăng mức độ trao đổi dinh dưỡng, cung cấp nguồn thức ăn để phân hủy cho các loài thực vật [4].

Khu vực rừng ngập mặn (Mangrove forest area) thuộc huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng có đa dạng sinh học cao và có vai trò quan trọng trong bảo vệ bờ biển, chống xói lở và ngập lụt. Khu vực rừng ngập mặn cũng là môi

trường sống, sinh sản và cung cấp nguồn thức ăn cho nhiều loài động, thực vật [5], đặc biệt là các loài thủy sinh như cá (Fishes), thân mềm (Mollusca), giáp xác (Crustacea). Ở khu vực này cũng đã ghi nhận được 74 loài cá và 13 loài tôm [6]. Tuy nhiên, nhiều nhóm loài còn ít được nghiên cứu ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung, trong đó có các loài cua. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về thành phần loài và phân bố của các loài cua ở đây.

Phương pháp nghiên cứu

Khu vực nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện tại khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng. Đây là khu vực nằm ở giữa hai cửa Trần Đề và Định An ở cuối sông Hậu thuộc Đồng bằng sông Cửu Long. Khu vực rừng ngập mặn có diện tích gần 1.200 ha. Đây là nơi có đa dạng sinh học cao nhất của tỉnh Sóc Trăng. Ở khu vực này có 3 kiểu sinh cảnh chính, gồm: sinh cảnh rừng ngập mặn (mangrove forest habitat), sinh cảnh bãi bồi (mudflat habitat) và sinh

*Tác giả liên hệ: Email: tho1010@gmail.com

Species diversity and distribution of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the mangrove forest area in Cu Lao Dung district, Soc Trang province

Van Tho Le^{1*}, Van Son Dang¹, Thi Mai Huong Nguyen¹, Doan Dang Phan¹, Ngoc Diem My Tran²

¹Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

²University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 8 January 2020; accepted 26 March 2020

Abstract:

Brachyuran crabs are crustacean groups with high species diversity, widely distribute and play an important ecological role in the mangrove forest area. In this study, samples of the brachyuran crabs were collected at 12 sampling sites in the mangrove forest and mudflat habitat in the mangrove forest area in Cu Lao Dung district, Soc Trang province in April (dry season) and September (rainy season) in 2019. There were 34 species belonging to 17 genera and 7 families, recorded in the mangrove forest area. The Ocypodidae family were recorded with the highest number of species of 11 species, following by Sesamididae family (7 species), Portunidae family (6 species), Varunidae family (4 species), Grapsidae family (3 species), Matutidae family (2 species), and Xanthidae family (1 species). The species diversity and population density of brachyuran crabs in mangrove forest habitat (with 26 species and the population density ranged from 34.0 ± 8.4 to 53.8 ± 15.4 (inds/m²)) were higher than in the mudflat habitat (with 15 species and the population density ranged from 12.4 ± 1.9 to 13.6 ± 3.6 (inds/m²)). The species diversity and population density of brachyuran crabs in the rainy season (with 28 species and the population density ranged from 13.6 ± 3.6 to 53.8 ± 8.4 (inds/m²)) were higher than in the dry season (with 14 species and the population density ranged from 12.4 ± 1.9 to 34.0 ± 8.4 (inds/m²)).

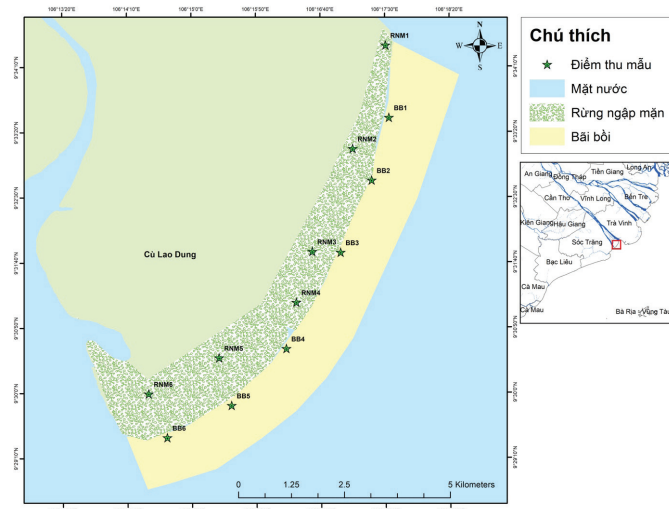
Keywords: brachyuran crabs, distribution, mangrove forest area, mudflat habitat, species diversity.

Classification number: 1.6

cảnh vùng cửa sông (estuary habitat). Huyện Cù Lao Dung cũng như Đồng bằng sông Cửu Long là nơi có khí hậu nhiệt đới gió mùa với hai mùa: mùa mưa thường bắt đầu từ tháng 5 kéo dài đến tháng 11 và mùa khô thường bắt đầu vào tháng 12 và kéo dài đến tháng 4 của năm sau. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát hai đợt vào tháng 4 (mùa khô) và tháng 9 (mùa mưa) của năm 2019 tại hai kiểu sinh cảnh: sinh cảnh rừng ngập mặn và sinh cảnh bãi bồi ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung. Tại mỗi kiểu sinh cảnh tiến hành thu mẫu tại 6 điểm nghiên cứu. Ký hiệu, tọa độ, kiểu sinh cảnh của các điểm nghiên cứu được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Ký hiệu, tọa độ và kiểu sinh cảnh các điểm nghiên cứu.

Stt	Ký hiệu	Sinh cảnh	Tọa độ điểm nghiên cứu	
			Kinh độ (E)	Vĩ độ (N)
1	BB1	Bãi bồi	106°17'33.06"E	9°33'30.95"N
2	BB2		106°17'32.25"E	9°33'18.61"N
3	BB3		106°16'57.34"E	9°31'44.42"N
4	BB4		106°16'25.33"E	9°30'39.92"N
5	BB5		106°15'30.56"E	9°29'50.55"N
6	BB6		106°14'33.62"E	9°28'55.50"N
7	RNM1	Rừng ngập mặn	106°17'29.89"E	9°34'33.23"N
8	RNM2		106°17'15.17"E	9°33'22.24"N
9	RNM3		106°16'27.71"E	9°32'0.11"N
10	RNM4		106°15'54.19"E	9°31'9.81"N
11	RNM5		106°15'20.93"E	9°30'27.01"N
12	RNM6		106°13'45.82"E	9°30'34.40"N



Hình 1. Bản đồ các điểm nghiên cứu ở khu vực rừng ngập mặn.

Phương pháp thu mẫu ngoài thực địa

Mẫu cua được thu vào tháng 4 và tháng 9/2019 tại 12 điểm nghiên cứu thuộc 2 kiểu sinh cảnh ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung, gồm: sinh cảnh rừng ngập mặn (6 điểm từ RNM1 đến RNM6) và sinh cảnh bãi bồi (6 điểm từ BB1 đến BB6). Tại mỗi điểm nghiên cứu tiến hành thu mẫu định tính và 3 mẫu định lượng. Tại mỗi điểm nghiên cứu, mẫu định lượng được thu trong ô tiêu chuẩn 50x50 cm. Dùng xẻng đào sâu 20 cm, mẫu sau khi thu được cho vào sàng có kích thước mắt lưới 0,5 mm để rửa mẫu. Các mẫu định tính được thu bắt trực tiếp bằng tay, thu từ các ngư dân khai thác bằng lưới đóng đáy, đăng đáy, lú, cào đáy và từ những người dân bắt bằng tay. Mẫu cua sau khi thu thập được bảo quản bằng cồn 96° và đưa về phòng thí nghiệm để phân tích [7, 8].

Phương pháp trong phòng thí nghiệm

Tại phòng thí nghiệm, mẫu cua được chia thành các nhóm và định loại mẫu dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại từ 20 đến 40 lần. Mẫu cua được phân loại dựa trên các tài liệu: FAO (1998) [9], Ng và cộng sự (2008, 2001) [1, 10], Ng và Davie (2002) [11], Shih và cộng sự (2010) [12], Chertoprud và cộng sự (2012) [13] và Davie (2012) [14].

Phương pháp phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để nhập dữ liệu và xử lý thống kê. Các thông số về mật độ quần thể được kiểm tra phân phối chuẩn bằng phương pháp Levene's test. Sử dụng phân tích ANOVA hai nhân tố bằng phần mềm SPSS v.20 (IBM Corp., Armonk, New York, Mỹ).

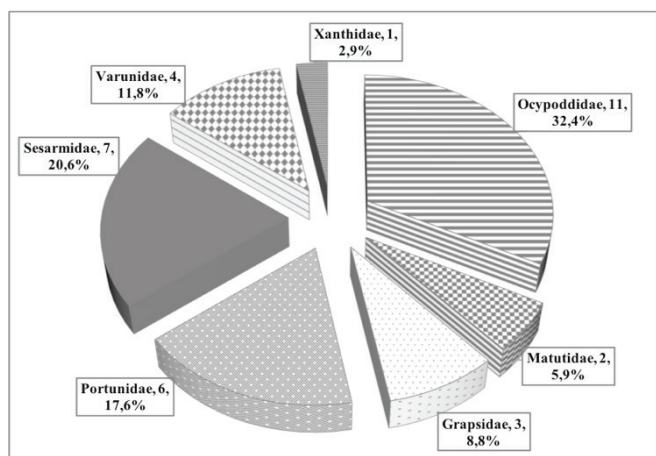
Kết quả nghiên cứu

Thành phần loài

Kết quả khảo sát khu hệ cua ở khu vực rừng ngập mặn huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng vào năm 2019 đã ghi nhận được 34 loài thuộc 17 giống của 7 họ (bảng 2), bao gồm: Ocypodidae, Xanthidae, Varunidae, Sesarmidae, Portunidae, Grapsidae và Matutidae. Trong số các họ, họ Ocypodidae có đa dạng loài cao nhất với 11 loài, chiếm tỷ lệ 32,4%, tiếp theo là họ Sesarmidae (7 loài), Portunidae (6 loài), Varunidae (4 loài), Grapsidae (3 loài), Matutidae (2 loài) và chiếm tỷ lệ tương ứng là 20,6%, 17,6%, 11,8%, 8,8% và 5,9%. Họ Xanthidae có đa dạng loài thấp nhất với chỉ 1 loài và chiếm tỷ lệ 2,9% (hình 2). Trong số các giống ghi nhận được ở khu vực rừng ngập mặn, giống *Uca* có đa dạng loài cao nhất với 9 loài. Các giống còn lại có đa dạng loài thấp dao động từ 1-3 loài/giống.

Bảng 2. Thành phần loài cua ghi nhận được ở khu vực rừng ngập mặn.

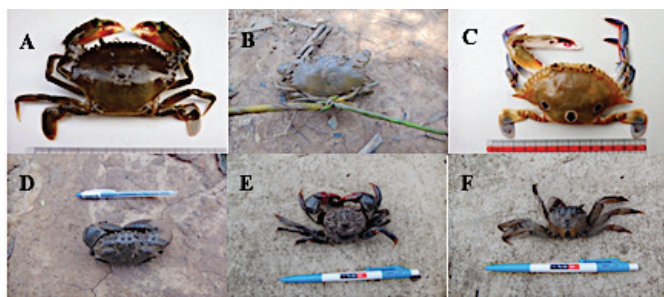
Ngành Arthropoda		
Phân ngành Crustacea		
Lớp Malacostraca		
Bộ Decapoda		
Phân bộ Brachyura		
Họ	Stt	Loài
Ocypodidae	1	<i>Ocypode cerathophthalmus</i> (Pallas, 1772)
	2	<i>Ocypode</i> sp.
	3	<i>Uca (Gelasimus) borealis</i> (Crane, 1975)
	4	<i>Uca (Tubuca) arcuata</i> (De Haan, 1835)
	5	<i>Uca dussumieri</i> (Milne Edwards, 1852)
	6	<i>Uca flammula</i> (Crane, 1975)
	7	<i>Uca urvillei</i> (H. Milne Edwards, 1852)
	8	<i>Uca annulipes</i> (H. Milne-Edwards, 1837)
	9	<i>Uca crassipes</i> (White, 1847)
	10	<i>Uca paradossumieri</i> (Bott, 1973)
	11	<i>Uca</i> sp.
Matutidae	12	<i>Ashtoret lunaris</i> (Forskål, 1775)
	13	<i>Matuta planipes</i> (Fabricius, 1798)
Grapsidae	14	<i>Metopograpsus</i> sp.
	15	<i>Metopograpsus latifrons</i> (White, 1847)
	16	<i>Parasesarma unguatum</i> (H. Milne Edwards, 1853)
Portunidae	17	<i>Scylla serrata</i> (Forskål, 1775)
	18	<i>Scylla olivacea</i> (Herbst, 1796)
	19	<i>Charybdis (Charybdis) miles</i> (de Haan, 1835)
	20	<i>Charybdis (Charybdis) natator</i> (Herbst, 1794)
	21	<i>Charybdis affinis</i> (Dana, 1852)
	22	<i>Portunus (Portunus) sanguinolentus</i> (Herbst, 1783)
Sesarmidae	23	<i>Episesarma mederi</i> (H. Milne Edwards, 1853)
	24	<i>Episesarma versicolor</i> (Tweedie, 1940)
	25	<i>Perisesarma eumolpe</i> (De Man, 1895)
	26	<i>Episesarma singaporense</i> (Tweedie, 1936)
	27	<i>Parasesarma plicatum</i> (Latreille, 1806)
	28	<i>Pseudosesarma bocourti</i> (A. Milne-Edwards, 1869)
	29	<i>Neosarmatium smithi</i> (H. Milne Edwards, 1853)
Varunidae	30	<i>Metaplex crenulata</i> (Gerstaecker, 1856)
	31	<i>Metaplex</i> sp.
	32	<i>Varuna litterata</i> (Fabricius, 1798)
	33	<i>Varuna</i> sp.
Xanthidae	34	<i>Platypodia granulosa</i> (Ruppell, 1830)



Hình 2. Cấu trúc thành phần loài của ở khu vực rừng ngập mặn.

Tại đây ghi nhận sự đa dạng và phong phú của các loài của có giá trị kinh tế như của biển (*S. serrata*, *S. Olivacea*); ghẹ ba chấu (*Portunus sanguinolentus*); của đá (*Platypodia granulosa*); chủ ụ (*Neosarmatium smithi*); ba khía (*Episesarma mederi*).

Đây là nhóm loài có kích thước lớn, có giá trị cao về mặt kinh tế và là đối tượng chính trong khai thác và nuôi trồng ở khu vực rừng ngập mặn (hình 3). Bên cạnh đó cũng ghi nhận sự đa dạng của các loài của thuộc họ Ocypodidae (11 loài). Chúng có vai trò quan trọng và được xem như các kỹ sư sinh thái ở khu vực rừng ngập mặn. Sự đa dạng của các loài của giúp làm toi xốp đất, tạo nguồn dinh dưỡng cho các sinh vật trong đất cũng như các loài thực vật ngập mặn [15, 16].



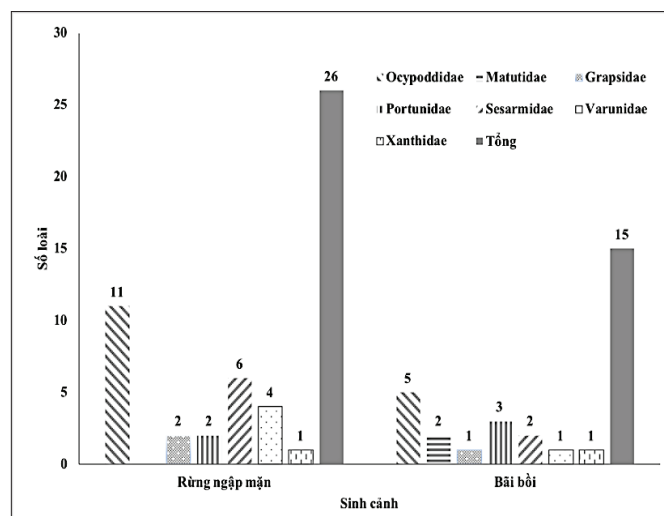
Hình 3. Một số loài của có giá trị kinh tế ở khu vực Cù Lao Dung.

(A) *S. serrata*; (B) *S. olivacea*; (C) *Portunus (Portunus) sanguinolentus*; (D) *Platypodia granulosa*; (E) *Neosarmatium smithi*; (F) *Episesarma mederi*.

Phân bố của các loài của

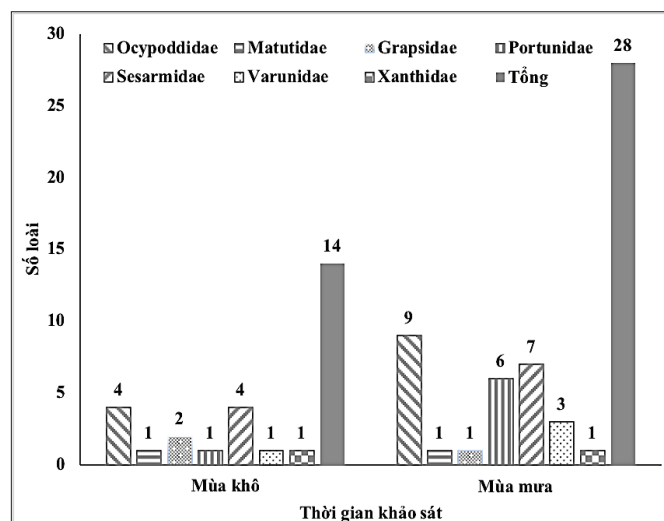
Khảo sát sự phân bố của khu hệ của tại hai kiểu sinh cảnh ở khu vực rừng ngập mặn cho thấy ở sinh cảnh rừng ngập mặn ghi nhận được 26 loài, cao hơn ở sinh cảnh bãi bồi ghi nhận được 15 loài. Tại sinh cảnh rừng ngập mặn ghi nhận đa dạng loài cao của các loài thuộc họ Ocypodidae, Sesarmidae

và Varunidae với số loài dao động từ 4-11. Tại sinh cảnh bãi bồi, ngoài họ Ocypodidae có số loài cao (5 loài) còn ghi nhận nhóm các loài thuộc họ của bơi Portunidae và họ Matutidae với đa dạng loài dao động từ 2-3 loài. Trong đó, họ Matutidae ghi nhận được 2 loài ở sinh cảnh bãi bồi, chưa ghi nhận được ở sinh cảnh rừng ngập mặn (hình 4).



Hình 4. Thành phần loài của tại các sinh cảnh.

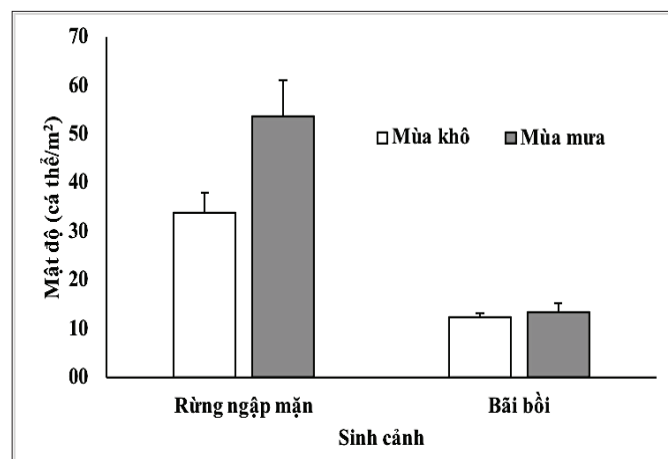
Khảo sát theo mùa cho thấy đa dạng loài của trong đợt khảo sát vào mùa mưa (28 loài) cao hơn đợt khảo sát vào mùa khô (14 loài). Trong đợt khảo sát mùa mưa các họ Ocypodidae, Portunidae và Sesarmidae có đa dạng loài cao, dao động từ 6-9 loài. Trong đợt khảo sát vào mùa khô họ Ocypodidae và Sesarmidae vẫn có đa dạng loài cao với 4 loài/họ nhưng giảm hơn nhiều so với mùa mưa. Các nhóm loài còn lại trong cả hai mùa khảo sát đều có số loài thấp, dao động từ 1-3 loài/họ và ít biến động theo mùa khảo sát (hình 5).



Hình 5. Thành phần các loài của qua hai mùa khảo sát.

Mật độ quần thể của ghi nhận được tại các điểm nghiên cứu trung bình dao động từ $12,4 \pm 1,9$ đến $53,8 \pm 15,4$ cá thể/ m^2 . Mật độ quần thể của có sự khác nhau giữa các kiểu sinh cảnh ($p < 0,05$) và giữa các mùa khảo sát ($p = 0,037 < 0,05$). Tại sinh cảnh rừng ngập mặn có mật độ quần thể của trung bình dao động từ $34,0 \pm 8,4$ đến $53,8 \pm 15,4$ cá thể/ m^2 , cao hơn tại sinh cảnh bãi bồi có mật độ quần thể trung bình dao động từ $12,4 \pm 1,9$ đến $13,6 \pm 3,6$ cá thể/ m^2 . Mật độ quần thể của ghi nhận trong đợt khảo sát vào mùa mưa trung bình dao động từ $13,6 \pm 3,6$ đến $53,8 \pm 8,4$ cá thể/ m^2 , cao hơn trong đợt khảo sát vào mùa khô trung bình dao động từ $12,4 \pm 1,9$ đến $34,0 \pm 8,4$ cá thể/ m^2 (hình 6).

Tại khu vực rừng ngập mặn ghi nhận đa dạng loài và mật độ quần thể cao của các loài thuộc họ Ocypodidae, Sesarmidae và Portunidae. Trong đó, nhóm các loài thuộc họ Sesarmidae và họ Ocypodidae có mật độ cao tại sinh cảnh rừng ngập mặn. Tại sinh cảnh bãi bồi ghi nhận mật độ quần thể cao của các loài thuộc họ của bơi Portunidae.



Hình 6. Mật độ quần thể của tại các sinh cảnh và mùa khảo sát.

Thảo luận

Với 34 loài ghi nhận được qua 2 đợt khảo sát năm 2019 cho thấy đa dạng loài của ở khu vực Cù Lao Dung tương đương với đa dạng loài của ghi nhận ở khu vực lân cận là cửa Trần Đề (tỉnh Sóc Trăng) (34 loài) [17] và cao hơn khu vực rừng ngập mặn có diện tích nhỏ hơn và không được bảo vệ là khu vực Duyên Hải (tỉnh Trà Vinh) (22 loài) [18]. Bên cạnh đó, số loài của ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung thấp hơn những khu vực rừng ngập mặn có diện tích và lưu vực lớn như khu vực rừng ngập mặn Cần Giờ (49 loài) [19] và khu vực rừng ngập mặn cửa sông Hồng (62 loài) [20]. Đa dạng loài của ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung tương đương với đa dạng loài của tại khu vực cửa Trần Đề là 34 loài, nhưng có số họ (7 họ) ít hơn ở Trần Đề (9 họ). Trong đó, ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung chưa ghi nhận được một số họ có số loài thấp như họ Pilimnidae (1 loài),

họ Macrophthalmidae (2 loài) và họ Dotillidae (2 loài). Bên cạnh đó, cũng ghi nhận thêm họ Xanthidae (1 loài). Hai nghiên cứu tuy tiến hành ở gần khu vực nhưng khác nhau về vị trí, thời gian, số lượng điểm nghiên cứu và phương pháp thu mẫu nên có một số khác biệt về thành phần loài. Tuy nhiên, nhóm các loài phổ biến ở khu vực rừng ngập mặn vùng Đồng bằng sông Cửu Long như họ Ocypodidae, Sesarmidae, Varunidae và họ Grapsidae đều ghi nhận được ở cả hai nghiên cứu và đều có đa dạng loài cao trong khu vực rừng ngập mặn.

Thành phần loài của ghi nhận được ở khu vực rừng ngập mặn chủ yếu là nhóm loài sống ở gần và ở trong sinh cảnh rừng ngập mặn. Đây là nơi có nguồn thức ăn là các trầm tích ở nền đáy, các mùn bã hữu cơ của thực vật. Các loài này đều có quá trình thích nghi tiến hoá lâu dài với môi trường đầy biến động theo không gian và thời gian [17]. Tại sinh cảnh rừng ngập mặn ghi nhận chủ yếu các loài thuộc họ Sesarmidae, Varunidae, Grapsidae sống đào hang dưới sàn rừng, xung quanh các gốc cây ở trong rừng. Bên cạnh đó còn ghi nhận nhóm các loài thuộc họ Ocypodidae sống đào hang ven bờ rừng, hoặc nơi có khoảng trống trong rừng. Tại sinh cảnh bãi bồi thường gặp các loài thuộc họ Portunidae, họ Matutidae sống bơi lội ở các kênh, rạch nhỏ. Nhóm các loài của thuộc họ Ocypodidae, Sesarmidae và Grapsidae là những nhóm loài phân bố thường xuyên ở các khu vực rừng ngập mặn nước ta từ miền Bắc đến miền Nam [17]. Trong đó, giống Uca thuộc họ Ocypodidae là giống có đa dạng loài cao ở khu vực rừng ngập mặn từ Quảng Ninh đến Thái Bình, Cần Giờ đến Trà Vinh [19].

Sự phân bố của cua phụ thuộc vào khả năng thích ứng sinh thái rộng hay hẹp của từng loài hay nhóm loài và phụ thuộc điều kiện sinh thái của thủy vực. Các loài của ở khu vực rừng ngập mặn có nhiều biến động về thành phần loài và mật độ vì chúng phụ thuộc vào kiểu sinh cảnh [21]. Tại sinh cảnh rừng ngập mặn có thảm thực vật dày giúp cung cấp nơi ở, trú ẩn và nguồn thức ăn cho nhiều loài cua, đặc biệt là các loài sống xung quanh gốc cây rừng ngập mặn như các loài thuộc họ Varunidae [17]. Do đó đa dạng loài và mật độ quần thể của ở sinh cảnh rừng ngập mặn thường cao hơn sinh cảnh bãi bồi. Bên cạnh đó, sự phân bố của cua còn phụ thuộc vào mùa. Trong mùa mưa, ở khu vực rừng ngập mặn ngoài các loài sống thường xuyên trong sinh cảnh rừng ngập mặn như họ Grapsidae, họ Ocypodidae còn ghi nhận các loài ở biển di nhập tạm thời vào kiếm ăn và rút ra theo thủy triều như các loài thuộc họ Portunidae, họ Matutidae. Ngoài ra, trong mùa mưa còn ghi nhận các loài nước mặn có khả năng thích ứng sinh thái rộng xâm nhập vào vùng nước lợ như các loài thuộc họ Sesarmidae. Do đó, trong đợt khảo sát vào mùa mưa ghi nhận được sự đa dạng về loài và mật độ quần thể của cao hơn đợt khảo sát vào mùa khô.

Kết luận

Nghiên cứu thành phần loài của ở khu vực rừng ngập mặn thuộc huyện Cù Lao Dung đã ghi nhận được 34 loài thuộc 17 giống, 7 họ. Trong đó, họ Ocypodidae có đa dạng loài cao nhất. Tại đây ghi nhận sự đa dạng và phong phú của các loài cua có giá trị kinh tế như cua biển (*S. serrata*, *S. olivacea*); ghẹ ba chấm (*Portunus sanguinolentus*); cua đá (*Platypodia granulosa*); chù ụ (*Neosarmatium smithi*); ba khía (*Episesarma mederi*).

Đa dạng loài và mật độ quần thể của cua ghi nhận được ở sinh cảnh rừng ngập mặn cao hơn tại sinh cảnh bãi bồi và trong đợt khảo sát vào mùa mưa cao hơn mùa khô. Nhóm các loài cua thuộc họ Ocypodidae, Sesamididae và Varunidae sống đào hang trên sàn rừng, xung quanh gốc cây rừng có thành phần loài đa dạng và phân bố tập trung ở sinh cảnh rừng ngập mặn. Ngược lại, nhóm các loài thuộc họ cua bơi Portunidae và Matutidae ghi nhận chủ yếu ở sinh cảnh bãi bồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.K.L. Ng, D. Guinot, P.J.F. Davie (2008), "Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world", *The Raffles Bulletin of Zoology*, **17**(1), pp.1-286.
- [2] Trần Ngọc Diễm My, Nguyễn Doãn Hạnh, Đỗ Thị Thu Hương (2011), "So sánh thành phần, tỷ lệ thức ăn của *Perisesarma eumolpe* giữa vùng rừng và vùng gây đở tại rừng ngập mặn Cần Giờ - TP Hồ Chí Minh", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **9**(5), tr.780-786.
- [3] P. Satheeshkumar (2012), "Mangrove vegetation and community structure of brachyuran crabs as ecological indicators of Pondicherry coast, South east coast of India", *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **11**(1), pp.184-203.
- [4] K. Diele, N.D.M Tran, S.J. Geist, F.W. Meyer, Q.H. Pham, U. Saint-Paul, T. Tran, U. Berger (2013), "Impact of typhoon disturbance on the diversity of key ecosystem engineers in a monoculture mangrove forest plantation, Can Gio Biosphere Reserve, Vietnam", *Global and Planetary Change*, **110**, pp.236-248.
- [5] Nguyễn Thị Kim Liên, Huỳnh Trường Giang, Vũ Ngọc Út (2013), "Đa dạng động vật phiêu sinh trong hệ sinh thái rừng ngập mặn Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **25**, tr.149-157.
- [6] Nguyễn Huỳnh Ngọc Châu, Trương Hoàng Minh (2013), "Thành phần loài tôm, cá phân bố ở khu vực ven biển huyện Cù Lao Dung, tỉnh Sóc Trăng", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **25**, tr.239-246.
- [7] Tổng cục Môi trường (2016), *Hướng dẫn điều tra đa dạng sinh học động vật không xương sống cỡ lớn ở đây*.
- [8] J.N. Trivedi, M.K. Gadhavi, K.D. Vachhrajani (2012), "Diversity and habitat preference of brachyuran crabs in Gulf of Kutch, Gujarat, India", *Arthropods*, **1**(1), pp.13-23.

- [9] FAO (1998), *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*, **2**, pp.1045-1156.
- [10] P.K.L. Ng, C.H. Wang, P.H. Ho, H.T. Shih (2001), "An annotated checklist of brachyuran crabs from Taiwan (Crustacea: Decapoda)", *National Taiwan Museum Special Publication Series*, **11**, pp.1-86.
- [11] P.K.L. Ng, P.J.F. Davie (2002), "A checklist of the brachyuran crabs of Phuket and western Thailand", *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, **23**(2), pp.369-384.
- [12] H.T. Shih, P.K.L. Ng, S.H. Fang, B.K. Chan, K.J. Wong (2010), "Diversity and distribution of fiddler crabs (Brachyura: Ocypodidae: Uca) from China, with new records from Hainan Island in the South China Sea", *Zootaxa*, pp.1-19.
- [13] E.S. Chertoprud, V.A. Spiridonov, I.N. Marin, V.O. Mokievsky (2012), "Brachyuran crabs (Crustacea Decapoda Brachyura) of the mangrove intertidal zone of southern Vietnam", *Benthic Fauna of the Bay of Nhatrang, Southern Vietnam*, **2**, p.235.
- [14] P.J. Davie (2012), "A revision of Neosarma (Crustacea: Brachyura: Sesamididae) with the description of a new species", *Memoirs of the Queensland Museum*, **56**(1), pp.221-233.
- [15] A. Aschenbroich, E. Michaud, T. Stieglitz, F. Fromard, A. Gardel, M. Tavares, G. Thouzeau (2016), "Brachyuran crab community structure and associated sediment reworking activities in pioneer and young mangroves of French Guiana, South America", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **182**, pp.60-71.
- [16] Trần Ngọc Diễm My, Karen Diele, Trần Triết (2011), "Thành phần loài và vai trò của nhóm cua công đối với phân hủy lá rụng tại đầm gây đở trong rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, **3**T, tr.46-53.
- [17] H.N. Khac, D.V. Nhung, N.T. Tung, N.T.T. Huong (2012), "Preliminary data of three zoobenthos groups (Brachyura, Gastropoda and Bivalvia) found in the mangrove forest ecosystems of the Tran De Estuary, Soc Trang Province", *Journal of Science of HNUE*, **57**, pp.72-80.
- [18] L.V. Tho, N.V. Tu, T.N.D. My, L. Damin, K. Won, D.V. Son, P.D. Dang, L.D. Thien (2018), "Species composition and distribution of brachyuran crabs in Duyen Hai town, Tra Vinh province", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **60**(4), pp.39-44.
- [19] Đỗ Văn Nhượng (2003), "Dẫn liệu bước đầu về cua (Brachyuran) ở rừng ngập mặn Cần Giờ, Thành phố Hồ Chí Minh", *Tạp chí Sinh học*, **25**(4), tr.6-10.
- [20] Đỗ Văn Nhượng, Hoàng Ngọc Khắc (2004), "Dẫn liệu bước đầu về các loài cua ở rừng ngập mặn vùng cửa sông Hồng", *Tạp chí Sinh học*, **24**(4), tr.13-19.
- [21] Đỗ Văn Nhượng, Hoàng Ngọc Khắc (2006), "Dẫn liệu bước đầu về nhóm cua (Brachyuran, Crustacea) ở rừng ngập mặn ven biển từ Tĩnh Gia (tỉnh Thanh Hoá) đến Hội An (tỉnh Quảng Nam)", *Tạp chí Sinh học*, **28**(1), tr.35-39.

Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.)

Bùi Thị Thanh Phương*, Nguyễn Phương Lan, Đỗ Thị Kim Trang,
Trần Bảo Trâm, Phan Xuân Bình Minh

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

Ngày nhận bài 3/2/2020; ngày chuyển phản biện 7/2/2020; ngày nhận phản biện 11/3/2020; ngày chấp nhận đăng 18/3/2020

Tóm tắt:

Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.) là một loài dược liệu quý hiếm được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam với cấp đánh giá “đang nguy cấp”. Loài này phân bố tự nhiên ở một số điểm thuộc vùng núi phía Bắc nhưng số cá thể không nhiều và đang ngày càng suy giảm, do vậy việc nhân giống Trầu tiên phục vụ công tác bảo tồn là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu này, nano bạc (nAg) được sử dụng làm chất khử trùng mẫu đốt thân rễ cây Trầu tiên ở các nồng độ 75, 100, 125, 150 và 200 ppm trong các khoảng thời gian 20, 30, 40, 50 và 60 phút. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, mẫu được khử trùng bằng nAg ở nồng độ 150 ppm trong 40 phút cho tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh đạt cao nhất (tương ứng là 70,32 và 65,34%). Từ vật liệu khởi đầu, mẫu được đưa vào nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, 1 mg/l BAP và chứa nAg với các nồng độ 0, 2, 4, 6, 8 ppm. Kết quả cho thấy, môi trường tối ưu tạo chồi có bổ sung 6 ppm nAg, sau 4 tuần có tỷ lệ mẫu sinh chồi đạt 69,34%, số chồi trung bình/mẫu đạt 1,58. Môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, 2 mg/l BAP và 6 ppm nAg thích hợp nhất trong giai đoạn nhân nhanh, sau 6 tuần nuôi cấy, hệ số nhân và chiều cao trung bình của chồi tương ứng đạt 2,81 lần và 1,78 cm.

Từ khóa: khử trùng, nano bạc, nhân giống, Trầu tiên.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.) là loài thân thảo, cao 20-30 cm, sống lâu năm, thuộc chi Hoa tiên (*Asarum*), họ Mộc hương (Aristolochiaceae). Thân rễ tròn có đốt, mang nhiều rễ phụ, có thể phân nhánh. Cây đặc biệt ưa ẩm, ưa bóng, thường mọc trên đất nhiều mùn dọc theo hành lang khe suối, dưới tán rừng kín thường xanh ẩm ở độ cao 1.000-1.600 m. Trong tự nhiên, loài này phân bố ở một số nơi thuộc vùng núi phía Bắc như Lai Châu, Lào Cai, Quảng Ninh... Do trữ lượng không lớn, lại bị khai thác và mất nơi sống vì diện tích rừng bị thu hẹp, dẫn đến loài này đang trong tình trạng nguy cấp, cần được bảo tồn [1]. Trong y học cổ truyền, người ta thường sử dụng thân và rễ của Trầu tiên làm thuốc chữa các bệnh ho, viêm phế quản, hen suyễn, phong hàn, tê thấp; còn hoa là vị thuốc bổ dùng để ngâm rượu uống. Nghiên cứu của Trần Huy Thái và cộng sự (2010) [2] cho thấy, trong thân và thân rễ khô Trầu tiên có chứa 0,36% tinh dầu, tỷ lệ này thay đổi theo mùa và nơi thu hái. Hoạt chất chủ yếu trong tinh dầu Trầu tiên là safrol (42,24%), apiol (27,11%) và myristicin (6,13%).

Nuôi cấy mô tế bào thực vật đóng vai trò quan trọng trong nhân giống cây trồng nói chung và cây dược liệu nói

riêng. Đây là phương pháp làm gia tăng nhanh về số lượng cũng như chất lượng cây trồng, cung cấp nguồn cây sạch bệnh với số lượng lớn trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, yếu tố cản trở lớn nhất của kỹ thuật này là sự ảnh hưởng của nấm và vi khuẩn trong mẫu vật liệu. Với ưu điểm tăng tiếp xúc và bám dính lên bề mặt tế bào, làm tăng hiệu quả tác động, nên xu hướng sử dụng nAg thay thế cho các chất khử trùng khác như $HgCl_2$, $Ca(ClO)_2$, NaOCl cũng như bổ sung vào môi trường nuôi cấy để nâng cao hiệu quả khử trùng, tránh ô nhiễm môi trường và giảm thiểu sự độc hại cho người và các sinh vật khác đã và đang được nhiều nghiên cứu áp dụng. Rostami và Shahsavari (2009) [3] đã bổ sung nAg ở nồng độ 4 mg/l vào môi trường nuôi cấy cây ô liu cho khả năng kháng khuẩn tốt nhất mà không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Nasser và cộng sự (2013) [4] đã sử dụng nAg ở các nồng độ khác nhau để khử trùng mẫu cà chua, khoai tây, sau đó chuyển các mẫu vào nhân nuôi trên môi trường MS có bổ sung nAg ở nồng độ thấp. Kết quả cho thấy, nguyên liệu này có khả năng kháng khuẩn tốt và không có tác dụng phụ đối với khả năng sống và phát triển của mầm. Tại Việt Nam cũng đã có một số nghiên cứu sử dụng nAg trong khử trùng mẫu và bổ sung vào môi trường nuôi cấy một số cây như: hoa hồng, hoa cúc, lan hồ

*Tác giả liên hệ: Email: thanhphuong7788@gmail.com

Effect of nanosilver on the *in vitro* propagation of *Asarum glabrum* Merr.

Thi Thanh Phuong Bui*, Phuong Lan Nguyen,
Thi Kim Trang Do, Bao Tram Tran, Xuan Binh Minh Phan

Center for Experimental Biology,
National Center for Technological Progress

Received 3 February 2020; accepted 18 March 2020

Abstract:

Asarum glabrum Merr. is a rare and precious medicinal herb in the Red Data Book of Vietnam with the rating of “endangered”. This species naturally distributed in some areas of the northern mountains with small amount of individuals and increasingly declined, therefore the propagation of *Asarum glabrum* Merr. for conservation is extremely necessary. In this study, nanosilver (nAg) is used as a surface sterilisation for the rhizome samples with different concentrations: 75, 100, 125, 150 and 200 ppm within 20, 30, 40, 50 and 60 minutes. The explants were sterilised by nAg at the concentration of 150 ppm within 40 minutes, obtaining the highest percentage of alive and aseptic explants (70.32% and 65.34%, respectively) after 4 weeks of culture. The explants were cultured on MS media added with 20 g/l sucrose, 8.5 g/l agar, 1 mg/l BAP and containing different concentrations of nAg: 0, 2, 4, 6, 8 ppm. The results showed that the medium supplemented with 6 ppm nAg was optimal for the induction of callus obtained the highest percentage of callus (69.34%) and the average number of shoots per samples reached 1.58 after 4 weeks. The MS media supplemented with 20 g/l sucrose, 8.5 g/l agar, 2 mg/l BAP and 6 ppm nAg was the best for multiplying with the average height of shoots reached 2.81 and 1.78 cm (respectively) after 6 weeks of rapid propagation.

Keywords: *Asarum glabrum* Merr., nanosilver, propagation, sterilisation.

Classification number: 1.6

diệp, dầu tây. Kết quả đều cho thấy, nAg là nguyên liệu khử khuẩn hiệu quả, có thể thay thế các chất diệt khuẩn thường dùng như HgCl_2 , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ trong nuôi cấy *in vitro* tế bào thực vật [5-10].

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cây Trầu tiên được thu tại rừng quốc gia Yên Tử, xã Thượng Yên Công, thành phố Uông Bí, tỉnh Quảng Ninh ở độ cao 1.068 m. Mẫu được đưa về nuôi trồng tại vườn ươm của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, sau đó lựa chọn những đốt thân rễ có chứa mầm ngủ làm nguyên liệu ban đầu.

Dung dịch nAg do Viện Công nghệ môi trường cung cấp. Các hạt nAg có kích thước trung bình ≤ 20 nm được tạo thành trong hỗn hợp có chứa AgNO_3 750 ppm, β -chitosan 250 ppm, NaBH_4 200 ppm [11].

Môi trường nuôi cấy: sử dụng môi trường như của Murashige và Skoog (1962) [12] - MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, pH 5,8. Toàn bộ môi trường được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C , áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút, sau đó phân vào các bình thủy tinh 250 ml với 40 ml môi trường.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của nAg đến khả năng khử trùng mẫu ban đầu: phần thân rễ của cây trưởng thành được cắt thành những đoạn có chứa mắt ngủ, làm sạch bề mặt bằng xà phòng và rửa sạch dưới vòi nước chảy. Mẫu sau đó được xử lý tiếp tục với cồn 70° trong 30 giây, tiến hành khử trùng tiếp bằng dung dịch nAg với các nồng độ khác nhau: 75, 100, 125, 150 và 200 ppm trong 40 phút, đối chứng là NaOCl 5% trong 20 phút. Rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng và đưa vào môi trường tạo vật liệu khởi đầu (MS+1 mg/l BA+8,5 g/l agar). Sau 2 tuần nuôi cấy, theo dõi các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh để lựa chọn sử dụng nồng độ nAg tối ưu tiếp tục thực hiện đánh giá ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu với các khoảng thời gian 20, 30, 40, 50, 60 phút.

Nghiên cứu ảnh hưởng của dung dịch nAg bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến quá trình hình thành và phát triển của chồi Trầu tiên: tiến hành khử trùng mẫu với nồng độ nAg thích hợp theo thời gian đã lựa chọn, thử nghiệm nhân tạo vật liệu khởi đầu trên môi trường MS chứa 1 mg/l BA và 8,5 g/l agar với các công thức bổ sung nAg ở nồng độ khác nhau: 0, 2, 4, 6, 8 ppm. Theo dõi các chỉ tiêu sau 4 tuần nuôi cấy: tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh, tỷ lệ mẫu sinh chồi, số chồi trung bình trên mẫu. Các cụm chồi Trầu tiên phát triển ổn định sau 4 tuần nuôi cấy trong môi trường tạo vật liệu khởi đầu được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh

(MS+2 mg/l BA+8,5 g/l agar) có bổ sung các nồng độ nAg khác nhau (0, 2, 4, 6, 8 ppm). Tiến hành đánh giá chỉ tiêu sau 6 tuần: tỷ lệ mẫu sạch bệnh, hệ số nhân chồi và chiều cao chồi.

Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần đặt 20 mẫu/công thức. Thí nghiệm được đặt trong điều kiện ánh sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 12/24h, nhiệt độ $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Số liệu thu được trong các thí nghiệm được xử lý bằng chương trình Excel 2010 và phần mềm thống kê IRRISTAT 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của nồng độ nAg đến khả năng khử trùng mẫu đốt thân Trầu tiên

Đánh giá hiệu quả sử dụng nAg khử trùng mẫu đốt thân rễ Trầu tiên tạo vật liệu khởi đầu với các nồng độ khác nhau: 75, 100, 125, 150 và 200 ppm; đối chứng sử dụng chất khử khuẩn thông dụng NaOCl 5%, thu được kết quả như ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ nAg đến hiệu quả khử trùng mẫu Trầu tiên.

Công thức	Nồng độ (ppm)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh (%)
ĐC	NaOCl 5%	51,23 ^f	38,09 ^f
CT1	75	56,54 ^e	42,5 ^e
CT2	100	60,65 ^d	47,48 ^d
CT3	125	73,01 ^a	61,12 ^b
CT4	150	70,32 ^b	65,34 ^a
CT5	200	64,19 ^c	54,31 ^c
LSD _{0,05}		2,32	2,93
CV%		1,59	2,21

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy, tất cả các công thức sử dụng nAg đều có tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh lớn hơn so với công thức đối chứng (sử dụng NaOCl 5%). Trong các công thức sử dụng nAg thì CT3 (nồng độ nAg 125 ppm) cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất là 73,01% nhưng tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh là 61,12% lại thấp hơn so với CT4 (nồng độ nAg 150 ppm) với tỷ lệ mẫu sống là 70,32%, tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh là 65,34% đạt cao nhất. So sánh với một số nghiên cứu khác đã sử dụng nAg nhưng với nồng độ thấp hơn khử trùng các loại mẫu, như kết quả nghiên cứu của Nasser và cộng sự (2013) [4] khi sử dụng nAg để khử trùng mẫu lá khoai tây, nồng độ 100 ppm nAg cho tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh là 100%, hay Đồng Huy Giới và cộng sự (2019) [7] lại cho thấy nồng độ nAg thích hợp nhất để khử trùng phát hoa lan hồ điệp vàng là 125 ppm cho tỷ lệ mẫu sống, sạch bệnh là

72,12%. Việc sử dụng nAg có nồng độ cao hơn khử trùng mẫu Trầu tiên cho kết quả thấp hơn có thể do đây là loại cây lâu năm sống dưới tán rừng tự nhiên trong điều kiện quanh năm ẩm ướt nên mẫu bị nhiễm nhiều vi sinh vật, dẫn đến việc khử trùng mẫu khó khăn hơn so với các mẫu nuôi trồng trong vườn ươm.

Như vậy với nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nAg ở nồng độ 150 ppm khử trùng mẫu cho hiệu quả khử trùng cao nhất. Tiếp tục thực hiện khử trùng mẫu bằng dung dịch nAg nồng độ 150 ppm trong các khoảng thời gian khác nhau thu được kết quả như bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu quả khử trùng mẫu Trầu tiên.

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh (%)
TG1	20	72,67 ^c	42,5 ^c
TG2	30	75,34 ^a	47,48 ^d
TG3	40	70,32 ^b	65,34 ^a
TG4	50	66,21 ^d	62,43 ^b
TG5	60	61,72 ^e	58,26 ^c
LSD _{0,05}		1,85	2,14
CV%		1,13	1,53

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả bảng 2 cho thấy, khi ngâm mẫu trong dung dịch nAg ở nồng độ cao trong thời gian dài cũng ảnh hưởng đến sự sống của các tế bào. Diễn hình là ở các mẫu có thời gian khử trùng lâu (50-60 phút) có hiện tượng một số mẫu bị chết (chuyển sang màu nâu đen), không có khả năng tái tạo tế bào, dẫn đến tỷ lệ mẫu sống thấp hơn so với các mẫu có thời gian khử trùng ngắn. Tuy nhiên, ở những công thức có thời gian khử trùng ngắn (20-30 phút) thì tỷ lệ mẫu nhiễm lại lớn hơn so với ở các công thức có thời gian khử trùng dài. Với kết quả thu được cho thấy, TG3 (thời gian khử trùng 40 phút) cho hiệu quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu sống đạt 70,32%, mẫu sống sạch bệnh đạt 65,34%.

Tổng hợp kết quả thử nghiệm cho thấy, sử dụng dung dịch nAg 150 ppm khử trùng mẫu Trầu tiên trong 40 phút cho tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh cao nhất, đạt 65,34%.

Ảnh hưởng của nAg đến khả năng nhân nhanh chồi Trầu tiên

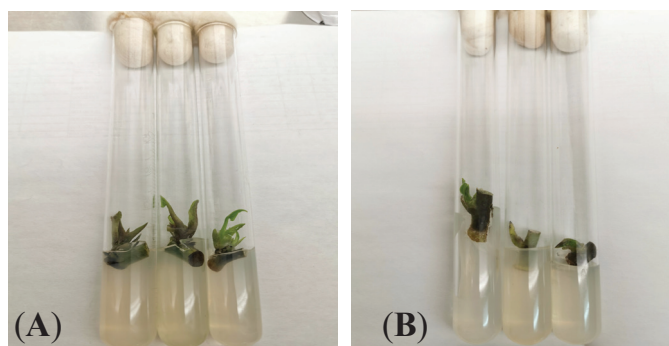
Nghiên cứu của Salama (2012) [13] cho thấy, nAg giúp tăng sinh trưởng của cây ngô và đậu, hay như của Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2015) [8] cũng cho thấy, nAg ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và phát triển của hoa hồng nuôi cấy *in vitro*. Công bố của Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2018) [5] cũng cho thấy, nAg có tác dụng kích thích mẫu cấy cảm ứng nhanh, tác động tốt đến sự hình thành mô sẹo, tái sinh chồi và hoàn toàn không gây ra tác

động tiêu cực nào. Dựa trên những kết quả nghiên cứu đã có, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ nAg bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu đốt thân Trầu tiên sau 4 tuần nhân giống, kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ nAg đến khả năng tạo chồi Trầu tiên.

Công thức	Nồng độ (ppm)	Tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh (%)	Tỷ lệ mẫu sinh chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu (chồi)
ĐC	0	58,67 ^c	55,43 ^c	1 ^c
MT1	2	60,95 ^d	58,85 ^d	1,09 ^d
MT2	4	65,27 ^b	65,27 ^b	1,21 ^c
MT3	6	69,34 ^a	69,34 ^a	1,58 ^a
MT4	8	62,13 ^c	60,39 ^c	1,29 ^b
LSD _{0,05}		1,23	1,87	0,07
CV%		1,9	1,7	0,09

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.



Hình 1. Trầu tiên sau 4 tuần nuôi cấy trong môi trường tạo vật liệu khởi đầu. (A) Môi trường bổ sung 6 ppm nAg; (B) Môi trường không bổ sung nAg.

Kết quả bảng 3 cho thấy, bổ sung nAg vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh cao hơn so với công thức đối chứng, trong đó công thức bổ sung 6 ppm có tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh cao nhất đạt 69,34%, mẫu đối chứng cho tỷ lệ thấp nhất, chỉ đạt 58,67%. Ngoài ra, nAg cũng có hiệu quả tích cực đến sự hình thành và phát triển của chồi sau 4 tuần nuôi cấy: ở các công thức bổ sung nAg với nồng độ 4 ppm và 6 ppm, các mẫu sống và sạch bệnh đều phát triển chồi, trong đó có mẫu phát triển 2-3 chồi, tỷ lệ mẫu sinh chồi và số chồi trung bình/mẫu nhìn chung cao hơn so với các công thức thí nghiệm khác và đối chứng (hình 1).

Như vậy, đối với cây Trầu tiên, bổ sung 6 ppm nAg cho kết quả các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu sống sạch bệnh cũng như mẫu sinh chồi tốt nhất sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả này có khác biệt với kết quả nghiên cứu của Đồng Huy Giới và cộng sự (2019) [7] khi nghiên cứu trên đối tượng phát hoa lan hồ điệp vàng: bổ sung 4 ppm nAg vào môi trường cho kết quả

tối ưu đối với sự hình thành chồi từ phát hoa với tỷ lệ tạo chồi đạt 92,53%, hệ số nhân chồi đạt 2,97 lần. Các kết quả đều cho thấy nAg có ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành của chồi, nhưng sự ảnh hưởng này là khác nhau ở mỗi loài.

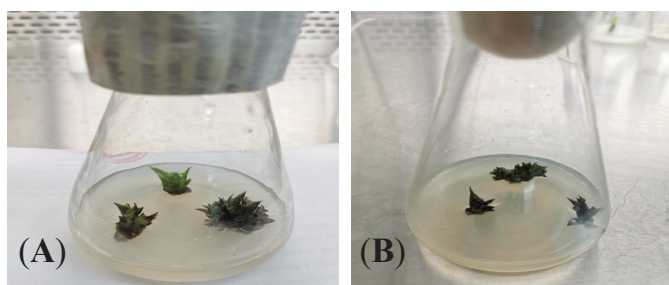
Ngoài ra, nAg còn được biết đến với vai trò giúp tăng khả năng sinh trưởng, phát triển (chiều dài chồi và rễ, diện tích lá), tăng cường các quá trình biến dưỡng trong cây (tổng hợp chlorophyll, tăng hàm lượng carbohydrate, protein và tổng hợp các enzyme oxy hóa) ở cải *Brassica juncea*, đậu và ngô cũng như tăng cường khả năng hình thành rễ, ức chế hình thành ethylene ở cây *Crocus sativus* [13]. Bên cạnh đó, nAg còn được biết đến là chất có khả năng kích thích sự phát triển của tế bào thực vật như trong nghiên cứu của Đỗ Mạnh Cường và cộng sự (2018) [5] trên đối tượng dâu tây cho thấy, nAg không những giúp gia tăng số lượng chồi mà các chồi còn có cuống lá to hơn, lá mở rộng và có màu xanh đậm hơn so với công thức đối chứng. Các nghiên cứu khác trên đối tượng cây hoa hồng, lan hồ điệp đều cho kết quả tương tự [7, 8]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nAg đến sự phát triển của chồi Trầu tiên sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4 và hình 2.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nAg đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi Trầu tiên.

Công thức	Nồng độ (ppm)	Tỷ lệ không nhiễm (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao trung bình chồi (cm)
ĐC	0	85,67 ^d	1,95 ^c	1,29 ^d
MT1	2	90,05 ^c	2,21 ^d	1,43 ^c
MT2	4	94,45 ^b	2,63 ^b	1,61 ^b
MT3	6	97,42 ^{ab}	2,81 ^a	1,78 ^a
MT4	8	98,73 ^a	2,49 ^c	1,52 ^{bc}
LSD _{0,05}		2,9	0,11	0,13
CV%		2,2	0,09	0,5

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả bảng 4 cho thấy, nAg có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi Trầu tiên: tất cả các công thức thí nghiệm đều có hệ số nhân chồi cũng như chiều cao trung bình của chồi cao hơn so với mẫu đối chứng. Công thức bổ sung 6 ppm nAg cho hiệu quả tốt nhất với tỷ lệ tạo chồi không nhiễm đạt 97,42%; hệ số nhân chồi là 2,81 lần; chiều cao chồi trung bình đạt 1,78 cm, cao hơn so với đối chứng 0,49 cm. Tương tự như các nghiên cứu trên hoa hồng, lan hồ điệp, ô liu..., nAg cũng có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi Trầu tiên nuôi cấy *in vitro* [3, 7, 8, 14].



Hình 2. Trầu tiên sau 6 tuần nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh. (A) Môi trường bổ sung 6 ppm nAg; (B) Môi trường không bổ sung nAg.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng nAg với nồng độ 150 ppm trong thời gian 40 phút có thể thay thế hiệu quả các chất khử trùng khác trong nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên. Bên cạnh đó, việc bổ sung 6 ppm nAg vào môi trường nuôi cấy còn có tác dụng kích thích sự phát sinh chồi, sự tăng trưởng và phát triển của chồi, hệ số nhân chồi đạt kết quả cao nhất mà hoàn toàn không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực nào đến mẫu cấy.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Viện Ứng dụng Công nghệ - Bộ KH&CN cho nhiệm vụ KH&CN “Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.) phân bố tại vùng Yên Tử của Việt Nam”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam, Phần II - Thực vật*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.97-98.
- [2] Trần Huy Thái, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Minh, Nguyễn Anh Tuấn (2010), “Thành phần hóa học của tinh dầu Hoa tiên (*Asarum glabrum* Merr.) ở Hà Giang, Việt Nam”, *Tạp chí Sinh học*, **32(1)**, tr.94-96.
- [3] A.A. Rostami and A. Shahsavari (2009), “Nanosilver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive ‘mission’ explants”, *Journal of Plant Sciences*, **8(7)**, pp.505-509.
- [4] M. Nasser, Z.V. Sepideh, K. Sajjad (2013), “Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *Ex vitro* explants”, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, **4(2)**, pp.1-4.

[5] Đỗ Mạnh Cường, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2018), “Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria xananassa*) nuôi cấy *in vitro*”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, **127(1C)**, tr.61-70.

[6] Đồng Huy Giới, Ngô Thị Ánh (2017), “Nghiên cứu sử dụng chế phẩm nano trong nuôi cấy mô cây mía (*Saccharum officinarum* L.)”, *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **6**, tr.35-41.

[7] Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương (2019), “Nghiên cứu sử dụng nano bạc trong nhân giống *in vitro* lan hồ điệp vàng (*Phalaenopsis* sp.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, **1**, tr.19-24.

[8] Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thị Thùy Anh, Hồ Viết Long, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bửu (2015), “Nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc lên sự nhân chồi, sinh trưởng và phát triển của cây hoa hồng (*Rosa* sp.) *in vitro*”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **13(2)**, tr.231-239.

[9] Dương Tấn Nhựt, Hoàng Thanh Tùng, Lương Thiện Nghĩa, Nguyễn Duy Anh, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền (2017), “Nano bạc trong khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* cây hoa cúc (*Chrysanthemum morifolium* ramat cv. jimba)”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **15(3)**, tr.505-513.

[10] Dương Tấn Nhựt, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu (2018), “Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây african violet (*saintpaulia ionantha* h. wendl.)”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **16(1)**, tr.87-97.

[11] H.N. Chau, L.A. Bang, N.Q. Buu, T.T.N. Dung, H.T. Ha, D.V. Quang (2008), “Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection”, *Advances in Natural Sciences*, **9**, pp.241-248.

[12] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiologia Plantarum*, **15**, pp.473-497.

[13] H.M.H. Salama (2012), “Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.)”, *Int. Res. J. Biotech.*, **3(10)**, pp.190-197.

[14] S. Shokri, A. Babaei, M. Ahmadian, M.M. Arab, S. Hessami (2015), “The effects of different concentrations of nano silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture”, *International Society for Horticultural Science*, **3(1)**, pp.50-54.

Bài toán tối ưu kết cấu dàn phẳng sử dụng phân tích trực tiếp có xét đến điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng

Hà Mạnh Hùng^{1*}, Trương Việt Hùng²

¹Khoa Xây dựng dân dụng và công nghiệp, Trường Đại học Xây dựng

²Khoa Công trình, Trường Đại học Thủy lợi

Ngày nhận bài 17/2/2020; ngày chuyển phản biện 21/2/2020; ngày nhận phản biện 27/3/2020; ngày chấp nhận đăng 10/4/2020

Tóm tắt:

Trong bài báo này, các tác giả trình bày cách thiết lập và giải quyết bài toán tối ưu dàn thép chịu các tổ hợp tải trọng khác nhau có xét đến điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng. Phân tích trực tiếp được sử dụng để xét đến các ứng xử phi tuyến tính, phi đàn hồi của kết cấu. Hàm mục tiêu của bài toán tối ưu là tổng giá thành của công trình được đơn giản hóa như hàm tổng khối lượng. Các điều kiện ràng buộc của bài toán tối ưu gồm các yêu cầu về cường độ, sử dụng và tần số dao động riêng. Thuật toán tiến hóa vi phân được sử dụng để giải bài toán tối ưu đề ra. Dàn thép phẳng 10 thanh được xem xét để minh họa cho nghiên cứu này.

Từ khóa: dàn thép, phân tích trực tiếp, tiến hóa vi phân, tối ưu.

Chỉ số phân loại: 2.1

Đặt vấn đề

Kết cấu dàn là một trong những loại kết cấu được sử dụng phổ biến hiện nay nhờ khả năng vượt nhịp lớn, hình thức đẹp và phong phú, phát huy tối đa khả năng của vật liệu nên khối lượng nhẹ... Việc thiết kế dàn thép hiện nay thường được áp dụng theo cách tiếp cận gián tiếp với 2 bước thiết kế nhằm có thể xét đến các tính chất phi tuyến hình học của kết cấu và phi đàn hồi của vật liệu. Ở bước đầu tiên, nội lực của các thanh dàn được xác định dựa trên phân tích tuyến tính đàn hồi. Từ các nội lực đã được tính toán này, trong bước thứ hai các thanh dàn sẽ được thiết kế riêng lẻ bằng việc áp dụng các công thức có xét đến các ứng xử phi tuyến của kết cấu được cung cấp trong các tiêu chuẩn hiện hành như AISC LRFD [1], Eurocode [2]... Phương pháp thiết kế truyền thống này có nhiều ưu điểm như thiết kế rất nhanh, đơn giản và kết quả có độ chính xác chấp nhận được. Tuy nhiên, việc tiếp cận gián tiếp như trên khiến cho các ứng xử của toàn bộ kết cấu không được mô tả một cách chính xác. Ngoài ra, tính tương thích của các phần tử riêng lẻ đối với toàn hệ thống cũng không được đảm bảo. Để khắc phục các nhược điểm này, gần đây các phương pháp phân tích trực tiếp được nhiều nhà khoa học chú ý nghiên cứu, mở ra hướng đi mới trong thiết kế kết cấu dàn thép nói riêng và công trình xây dựng nói chung. Ưu điểm của phân tích trực tiếp là tính toán được khả năng chịu tải của toàn bộ công trình cũng như các ứng xử phi tuyến của công trình trong các giai đoạn đàn hồi và ngoài đàn hồi [3-6].

Để phát huy hiệu quả công tác thiết kế, thiết kế tối ưu cũng được quan tâm nghiên cứu và áp dụng rộng rãi trong kết cấu dàn thép. Ưu điểm của thiết kế tối ưu là nó cho phép đưa ra các giải pháp thiết kế có chi phí về xây dựng thấp hơn rất nhiều so với các phương pháp thiết kế thông thường mà các yêu cầu về thiết kế đối với công trình vẫn được đảm bảo. Tùy thuộc vào mục đích của nhà thiết kế mà bài toán tối ưu thanh dàn có thể chia ra làm 3 loại cơ bản là tối ưu tiết diện (sizing optimization), tối ưu hình học (shape optimization) hay tối ưu vật liệu (topology optimization). Trong bài toán tối ưu tiết diện, tiết diện của các thanh dàn là các biến thiết kế và được lựa chọn sao cho tổng giá thành xây dựng hoặc tổng khối lượng của cả hệ được tối thiểu hóa mà vẫn đảm bảo các điều kiện về thiết kế. Bài toán tối ưu kết cấu dàn sẽ trở nên phức tạp với độ phi tuyến cao khi các ứng xử phi tuyến tính, phi đàn hồi của công trình được xét đến. Trong trường hợp này, các thuật toán meta he-rít-tíc thường được sử dụng để giải bài toán tối ưu [7-9]. Một số thuật toán meta he-rít-tíc hiệu quả cao trong việc giải quyết các bài toán tối ưu tiết diện của dàn thép là: tiến hóa vi phân (Differential Evolution - DE), tối ưu bầy đàn (Particle Swarm Optimization - PSO), giải thuật di truyền (Genetic Algorithm - GA), thuật toán bầy ong (Bee)...

Các điều kiện ràng buộc trong bài toán tối ưu tiết diện dàn thép thường được giới hạn là các điều kiện chuyển vị và cường độ theo các tổ hợp tải trọng được quy định trong các tiêu chuẩn. Bên cạnh đó, để cải thiện hiệu suất làm việc của cấu trúc và ngăn chặn các hiện tượng cộng hưởng, các

*Tác giả liên hệ: Email: hungmh@nuce.edu.vn

Optimisation of planar trusses using direct design considering frequency constraints

Manh Hung Ha^{1*}, Viet Hung Truong²

¹Faculty of Building and Industrial Construction,
National University of Civil Engineering

²Faculty of Civil Engineering, Thuyloi University

Received 17 February 2020; accepted 10 April 2020

Abstract:

In this paper, the authors presented the method to establish and solve the optimisation of steel trusses subjected to several load combinations and frequency constraints. A direct design was employed to account for the non-geometric non-linear behaviour of the structure. The objective function of the optimisation problem was the total cost of the structure which was simplified as a function of total weight. The constraints of the optimisation included the strength and serviceability conditions, and structural frequency requirements. The differential evolution algorithm was applied to solve the proposed optimisation problem. A 10-bar planar truss was studied to illustrate this work.

Keywords: differential evolution, direct design, optimisation, steel truss.

Classification number: 2.1

ràng buộc động rất cần được xét đến trong các bài toán tối ưu [10]. Để thực hiện điều này, các điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng của kết cấu được xét đến. Một số nghiên cứu nổi bật về bài toán tối ưu dàn thép có điều kiện ràng buộc là tần số dao động riêng có thể kể đến như P.H. Anh [11], Kaveh và Zolghadr [12], Farshchin và cs [13]... Tuy số lượng các nghiên cứu về tối ưu dàn thép chịu điều kiện ràng buộc là các tổ hợp tải trọng hoặc là tần số dao động riêng của kết cấu khá nhiều, nhưng theo hiểu biết của tác giả chưa có một nghiên cứu nào xét đến các điều kiện ràng buộc nêu trên một cách đồng thời. Điều này khiến cho các nghiên cứu tối ưu về kết cấu dàn có khoảng trống cần được bổ khuyết.

Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày bài toán tối ưu dàn thép có điều kiện ràng buộc, gồm cả điều kiện ràng buộc về chuyển vị và cường độ dưới các tổ hợp tải trọng khác nhau và điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng của kết cấu. Hàm mục tiêu của bài toán tối ưu được đơn giản hóa như hàm tổng khối lượng. Các điều kiện ràng buộc về cường độ và sử dụng được xác định dựa vào phân tích trực tiếp cho phép xét đến các tính chất phi tuyến hình học của kết cấu và phi tuyến vật liệu. Thuật toán tiến hóa vi phân được sử dụng để giải bài toán tối ưu đề ra. Dàn thép phẳng 10 thanh được xem xét để minh họa cho nghiên cứu này.

Thiết lập bài toán tối ưu dàn thép

Tổng khối lượng của kết cấu được chọn là hàm mục tiêu của bài toán và được tối thiểu hóa theo phương trình (1).

$$\text{Min } W(\mathbf{Y}) = \rho \sum_{i=1}^d \left(y_i \sum_{j=1}^{d_i} L_{ij} \right) \quad (1)$$

trong đó ρ là khối lượng riêng của vật liệu; $\mathbf{Y} = (y_1, y_2, \dots, y_d)$ là vec tơ biến thiết kế, cũng chính là diện tích tiết diện của các thanh dàn; d là số lượng biến thiết kế; d_i là số thanh dàn trong nhóm phần tử thanh thứ i ; L_{ij} là chiều dài của thanh dàn thứ j trong nhóm phần tử thứ i . Trong bài toán thiết kế có biến là biến liên tục thì biến thiết kế y_i ($i = 1, \dots, d$) được chọn trong khoảng giá trị cho trước $[y_i^{\text{lowb}}, y_i^{\text{upb}}]$. Trong bài toán thiết kế có biến là biến rời rạc thì y_i được chọn từ một tập hợp các giá trị rời rạc cho trước.

Đối với tổ hợp trạng thái giới hạn cường độ, bằng việc sử dụng phân tích trực tiếp cho phép tính toán khả năng chịu tải của cả công trình, điều kiện ràng buộc được thể hiện bằng công thức (2).

$$C_k^{\text{str}} = 1 - \frac{R_k}{S_k} \leq 0 \quad (2)$$

trong đó R_k là khả năng chịu tải của kết cấu đối với tổ hợp tải trọng thứ k và S_k là hiệu ứng do tổ hợp tải trọng cường độ thứ k gây ra.

Đối với tổ hợp trạng thái giới hạn sử dụng, điều kiện về chuyển vị sẽ được xem xét thông qua công thức (3).

$$C_{j,l}^{disp} = \left| \frac{\Delta_{j,l}}{\Delta_{j,l}^u} \right| - 1 \leq 0, \quad j=1,...,nn \quad (3)$$

trong đó nn là số nút cần được xét điều kiện chuyển vị, $\Delta_{j,l}$ và $\Delta_{j,l}^u$ là chuyển vị và giới hạn chuyển vị của nút thứ j tương ứng với tổ hợp trạng thái giới hạn sử dụng thứ l .

Điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng của kết cấu được thể hiện như (4).

$$C_m^{fre} = \frac{f_{j,m}}{f_{j,m}^u} - 1 \leq 0, \quad j=1,...,nm \quad (4)$$

trong đó nm là số tần số dao động riêng được xét đến, $f_{j,m}$ và $f_{j,m}^u$ là tần số dao động riêng thứ j của kết cấu và giá trị cho phép của nó.

Đối với bài toán tối ưu có điều kiện ràng buộc ở trên, để áp dụng các thuật toán meta heuristic chúng ta cần sử dụng các kỹ thuật để xử lý các điều kiện ràng buộc. Trong nghiên cứu này, phương pháp hàm phạt được sử dụng do kỹ thuật này khá đơn giản và hiệu quả tốt cho hầu hết các loại ràng buộc khác nhau. Khi đó, hàm mục tiêu của bài toán được viết lại như sau:

$$W_{unstr}(\mathbf{Y}) = (1 + \alpha_{str}\beta_1 + \alpha_{disp}\beta_2 + \alpha_{fre}\beta_3) \times \rho \sum_{i=1}^d \left(y_i \sum_{j=1}^{d_i} L_{ij} \right) \quad (5)$$

trong đó:

$$\begin{aligned} \beta_1 &= \sum (\max(C_k^{str}, 0)) \\ \beta_2 &= \sum \left(\sum_{j=1}^{nn} \max(C_{j,l}^{disp}, 0) \right) \\ \beta_3 &= \sum \left(\sum_{j=1}^{nm} \max(C_{j,m}^{fre}, 0) \right) \end{aligned} \quad (6)$$

với α_{str} , α_{disp} và α_{fre} là các tham số phạt tương ứng với các điều kiện ràng buộc về cường độ, chuyển vị và tần số dao động riêng. Công thức (5) cho thấy rằng, nếu một thiết kế mà vi phạm điều kiện ràng buộc thì hàm mục tiêu tương ứng sẽ được cộng thêm một giá trị gọi là giá trị phạt tương ứng cho vi phạm đó. Do quá trình tối ưu là tối thiểu hóa hàm mục tiêu, các thiết kế vi phạm điều kiện ràng buộc sẽ dần bị loại bỏ.

Giá trị của các tham số phạt này không phụ thuộc vào bài toán tối ưu, tuy nhiên thường được lấy giá trị đủ lớn nhằm loại bỏ các thiết kế bị vi phạm và chỉ còn lại các thiết kế thỏa mãn tất cả các điều kiện ràng buộc. Trong nghiên cứu này, các tham số phạt được lấy bằng 10.000.

Thuật toán tối ưu tiến hóa vi phân

Thuật toán tiến hóa vi phân (DE) được Storn và Price phát minh [14] và được ứng dụng thành công trong khá nhiều dạng bài toán tối ưu khác nhau, trong đó có các bài toán tối ưu về dàn [3, 11, 15]. Nội dung chính của thuật toán DE có thể tóm tắt như sau.

Giả thiết rằng chúng ta cần tối thiểu hóa hàm mục tiêu (7):

$$f(\mathbf{x}): R^n \rightarrow R, \mathbf{x} = \{x_i\}, x_i \in [x_{i,min}, x_{i,max}], i=1,...,d \quad (7)$$

trong đó d là số lượng biến, $x_{i,min}$ và $x_{i,max}$ lần lượt là giá trị biên dưới và biên trên của biến x_i . Để giải bài toán tối ưu này bằng thuật toán DE, đầu tiên một quần thể ban đầu gồm NP cá thể được tạo ra, $\mathbf{x}_k(0)$, $k=1,...,NP$, theo công thức (8):

$$x_{k,i}(0) = x_{i,min} + rand[0,1] \times (x_{i,max} - x_{i,min}), i=1,...,d \quad (8)$$

trong đó, $rand[0,1]$ là số thực chọn ngẫu nhiên trong khoảng từ 0 đến 1. Ở thế hệ thứ $(t+1)$, tương ứng với cá thể thứ k trong quần thể, $\mathbf{x}_k(t)$, một cá thể mới được tạo ra bằng phép đột biến như sau:

$$\mathbf{u} = \mathbf{x}_{r_1}(t) + F \times [\mathbf{x}_{r_2}(t) - \mathbf{x}_{r_3}(t)] \quad (9)$$

trong đó, r_1, r_2, r_3 là ba số tự nhiên được chọn ngẫu nhiên thỏa mãn điều kiện $1 \leq r_1 \neq r_2 \neq r_3 \leq NP$; F là hệ số khuếch đại thường được chọn trong khoảng (0,1). Trong nghiên cứu này chọn $F = 0.7$. Trong công thức (9), nếu xảy ra trường hợp một biến số u_j của véc tơ $\mathbf{u}$ vượt ra ngoài khoảng giá trị của nó $[x_{i,min}, x_{i,max}]$ thì u_j nhận giá trị biên nó vi phạm. Từ cá thể $\mathbf{u}$, một cá thể mới, $\mathbf{v}$, được tạo ra bằng cách lai ghép với $\mathbf{x}_k(t)$ theo nguyên tắc sau:

$$v_i = \begin{cases} u_i & \text{ khi } rand[0,1] \leq Cr \\ x_{k,i}(t) & \text{ khi } rand[0,1] > Cr \end{cases} \quad (10)$$

trong đó Cr là tham số lai ghép có giá trị trong khoảng (0,1). Thực hiện so sánh hàm mục tiêu của $\mathbf{v}$ và $\mathbf{x}_k(t)$, cá thể nào có giá trị hàm mục tiêu nhỏ hơn sẽ là cá thể thứ k trong quần thể ở thế hệ thứ $(t+1)$.

Lưu ý rằng, trong phương trình (9), cá thể $\mathbf{x}_{r_1}(t)$ đang được chọn là ngẫu nhiên trong quần thể. Tương ứng với trường hợp này ta gọi là kỹ thuật 'DE/rand/1'. Tuy nhiên, nếu $\mathbf{x}_{r_1}(t)$ được chọn là cá thể tốt nhất trong quần thể thì ta có kỹ thuật 'DE/best/1'. Đây là 2 kỹ thuật đột biến được sử dụng rộng rãi hiện nay. Điểm khác biệt giữa 2 kỹ thuật này là ở khả năng tìm kiếm tổng quát và tốc độ hội tụ của quá trình tối ưu. Cụ thể, kỹ thuật 'DE/rand/1' duy trì tốt sự đa dạng của quần thể và khả năng tìm kiếm toàn miền tốt hơn kỹ thuật 'DE/best/1'. Tuy nhiên, khả năng tìm kiếm địa

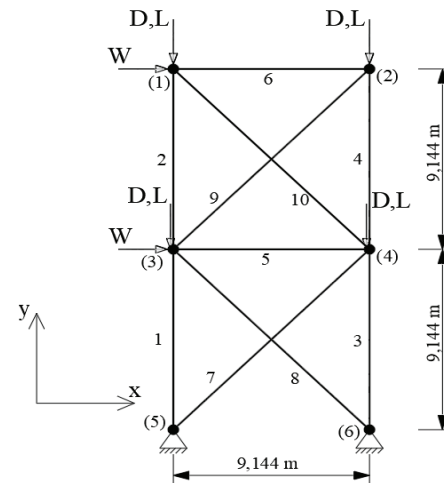
phương và tốc độ hội tụ của kỹ thuật 'DE/rand/1' lại kém hơn 'DE/best/1'.

Ví dụ minh họa

Dàn phẳng 10 thanh

Để minh họa cho bài toán tối ưu có xét đến điều kiện ràng buộc là tần số dao động riêng, trong phần này chúng ta sẽ xem xét một dàn phẳng 10 thanh như trong hình 1. Nhịp dàn là 9.144 (mm). Tải trọng tác dụng gồm tĩnh tải DL , hoạt tải LL và tải trọng gió W được quy về thành các tải tập trung tại các nút dàn. Giá trị của DL , LL và W lần lượt là 400 (kN), 300 (kN) và 300 (kN). Vật liệu có cường độ chảy là $F_y = 344,7 \text{ MPa}$ và mô đun đàn hồi là $E = 200 \text{ GPa}$. Tải trọng khối tập trung, $mass$, dùng để tính tần số dao động riêng của kết cấu được giả thiết đặt tại nút dàn và có khối lượng là 454 (kg). Khối lượng riêng của vật liệu là $7.850 \text{ (kg/m}^3\text{)}$.

Bài toán tối ưu có 10 biến thiết kế là tiết diện các thanh dàn được chọn trong khoảng giá trị $[64,5; 22.580,6]$ (mm^2). Điều kiện ràng buộc gồm: 2 điều kiện về cường độ tương ứng với tổ hợp tải trọng $(1,6DL + 1,2LL)$ và $(1,2DL + 1,6W + 0,5LL)$; 1 điều kiện về chuyển vị tương ứng với tổ hợp $(1,0DL + 0,7W + 0,5LL)$ với giới hạn chuyển vị của các nút dàn theo phương ngang không vượt quá $h/400 = 22,86 \text{ (mm)}$ với h là chiều cao của tầng; 3 điều kiện về tần số dao động riêng: $f_1 \geq 7$, $f_2 \geq 15$ và $f_3 \geq 20 \text{ (Hz)}$ với f_1 , f_2 và f_3 là 3 tần số dao động riêng đầu tiên của kết cấu. Các tổ hợp tải trọng được xét đến trong bài toán dựa theo tiêu chuẩn AISC-LRFD của Mỹ [1]. Phần mềm phân tích phi tuyến PAAP sẽ được sử dụng để tính toán ứng xử phi tuyến của kết cấu nhằm đánh giá điều kiện ràng buộc. Chi tiết về phần mềm PAAP độc giả có thể tìm đọc trong các tài liệu [3, 4, 8, 9]. Các thông số áp dụng của thuật toán DE được lựa chọn như sau: số biến thiết kế (d) là 10, quy mô quần thể (NP) là 25, số thế hệ tối đa ($MaxIteration$) là 4.000, biên độ đột biến (F) bằng 0,7, xác suất lai ghép (Cr) bằng 0,6. Lưu ý rằng, việc lựa chọn các tham số NP , F và Cr có ảnh hưởng đến kết quả của chương trình tối ưu. Ví dụ, nếu NP chọn lớn sẽ giúp quá trình tối ưu tránh bị tối ưu cục bộ tốt hơn nhưng lại hội tụ chậm hơn và tốn nhiều thời gian tính toán. Do vậy, tùy thuộc vào từng bài toán tối ưu khác nhau mà các giá trị này cần lựa chọn một cách thích hợp. Trong trường hợp nghiên cứu này, các giá trị của các tham số được lựa chọn dựa trên sự tham khảo tài liệu [3]. Điều kiện dừng lại của chương trình tối ưu là khi số thế hệ tối đa đạt đến giá trị cho trước, hoặc khi giá trị của hàm mục tiêu không thay đổi trong 1.000 thế hệ liên tục.



Hình 1. Dàn phẳng 10 thanh.

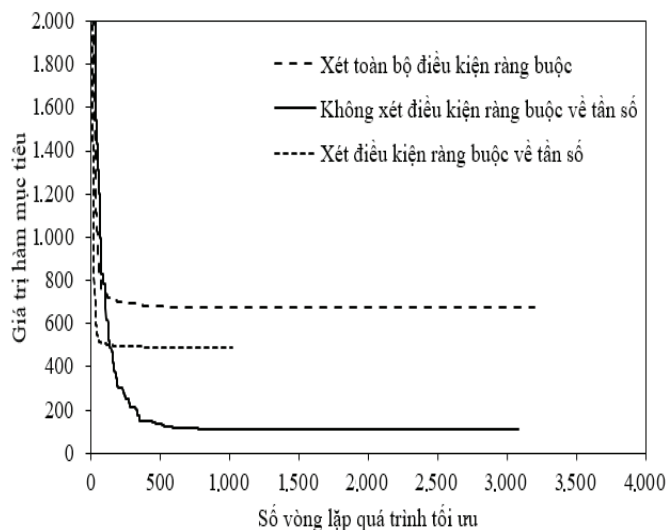
Kết quả tính toán và trao đổi

Ba trường hợp bài toán tối ưu được xem xét là: (1) Tất cả các điều kiện ràng buộc được xét, (2) Các điều kiện ràng buộc về tần số không được xét đến và (3) Chỉ xét các điều kiện ràng buộc về tần số. Để xét đến yếu tố ngẫu nhiên của các giải thuật meta he-rít-tíc, chương trình tối ưu được chạy 10 lần độc lập. Chỉ kết quả tối ưu tốt nhất được trình bày trong bảng 1. Dựa vào bảng 1 ta có thể thấy rằng, khi xét tất cả các điều kiện ràng buộc, giá trị tối ưu tìm được của dàn là 675,54 (kg), lớn hơn khá nhiều so với hai trường hợp còn lại. Điều này cho thấy rằng, bài toán tối ưu không chịu sự ảnh hưởng lớn của tất cả các điều kiện ràng buộc về cường độ, chuyển vị và tần số dao động riêng. Hay nói một cách khác, các điều kiện ràng buộc này đều đóng vai trò quan trọng trong bài toán tối ưu đang xét. Do đó, việc xét đến tất cả các điều kiện về cường độ, chuyển vị và tần số dao động riêng là cần thiết trong bài toán tối ưu kết cấu dàn.

Bảng 1. Kết quả tối ưu tốt nhất.

Phần tử	Tất cả điều kiện ràng buộc được xét	Không xét các điều kiện ràng buộc về tần số	Chỉ xét các điều kiện ràng buộc về tần số
1	597,55	64,50	1.143,60
2	365,33	64,50	520,33
3	2.763,90	370,95	1.131,10
4	733,74	126,45	483,73
5	499,06	276,05	64,50
6	64,50	64,50	150,34
7	1.339,60	226,25	727,75
8	817,69	64,50	794,48
9	490,71	70,39	437,94
10	454,19	64,50	419,85
Khối lượng tối ưu của dàn (kg)	675,54	112,62	492,38

Hình 2 trình bày đường cong hội tụ của 3 bài toán tối ưu. Bài toán xét điều kiện ràng buộc về tần số có tốc độ tối ưu nhanh hơn 2 bài toán kia và dừng lại khi số vòng lặp của quá trình tối ưu khoảng hơn 1.000 lần. Bài toán xét tất cả các điều kiện ràng buộc hội tụ chậm nhất và dừng lại khi số vòng lặp trên 3.500. Điều này có nghĩa là, việc xét đến điều kiện ràng buộc bao gồm cả tần số dao động riêng, cường độ và chuyển vị khiến cho bài toán tối ưu trở nên phức tạp hơn rất nhiều so với việc chỉ xét tần số dao động riêng. Nói một cách khác, bài toán tối ưu được xem xét trong bài báo này có tính phức tạp cao hơn rất nhiều so với bài toán tối ưu chỉ xét tần số dao động riêng.



Hình 2. Đường cong hội tụ của bài toán tối ưu hệ dàn 10 thanh.

Kết luận

Nghiên cứu đã trình bày một dạng bài toán tối ưu mới cho dàn thép trong đó có xét đến các điều kiện ràng buộc về chuyển vị và cường độ dưới các tổ hợp tải trọng khác nhau và điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng của kết cấu. Hàm mục tiêu của bài toán tối ưu là hàm tổng khối lượng. Các điều kiện ràng buộc về cường độ và sử dụng được xác định dựa vào phân tích trực tiếp cho phép xét đến các tính chất phi tuyến hình học của kết cấu và phi tuyến vật liệu. Thuật toán tiến hóa vi phân được sử dụng để giải bài toán tối ưu đề ra. Kết quả phân tích dàn thép phẳng 10 thanh cho thấy các điều kiện ràng buộc về cường độ, chuyển vị và tần số dao động riêng đều ảnh hưởng lớn đến kết quả tối ưu cho nên cần phải được xem xét. Bên cạnh đó, bài toán tối ưu có xét tất cả điều kiện ràng buộc về chuyển vị, cường độ và tần số dao động riêng có tính phức tạp cao hơn rất nhiều so với bài toán chỉ xét tần số dao động riêng. Điều này mở ra một lớp bài toán mới về tối ưu kết cấu dàn có tính phức tạp cao hơn và cũng thực tế hơn so với các bài toán tối ưu đã xét đến trước đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] AISC-LRFD (1999), "Manual of steel construction - load and resistance factor design", *Chicago (IL): American Institute of Steel Construction*.
- [2] EN 1993-1-1 Eurocode 3 (2005), "Design of steel structures - part 1-1: general rules and rules for building", *Brussels: European Committee for Standardization*.
- [3] T.V. Hung, S.E. Kim (2018), "Reliability-based design optimization of nonlinear inelastic trusses using improved differential evolution algorithm", *Advances in Engineering Software*, **121**, pp.59-74.
- [4] T.H. Tai, S.E. Kim (2011), "Nonlinear inelastic time-history analysis of truss structures", *Journal of Constructional Steel Research*, **67**(12), pp.1966-1972.
- [5] H. Shi, H. Salim, F. Wei (2015), "Geometric and material nonlinear static and dynamic analysis of space truss structures", *Mechanics Based Design of Structures and Machines: An International Journal*, **43**(1), pp.38-56.
- [6] H. Saffari, N.M. Mirzai, I. Mansouri, M.H. Bagheripour (2013), "Efficient numerical method in second-order inelastic analysis of space trusses", *Journal of Computing in Civil Engineering*, **27**(2), pp.129-138.
- [7] T.V. Hung, S.E. Kim (2017), "An efficient method for reliability-based design optimization of nonlinear inelastic steel space frames", *Struct. Multidisc. Optim.*, **56**, pp.331-351.
- [8] H.M. Hung, V.Q. Anh, T.V. Hung (2018), "Optimum design of stay cables of steel cable-stayed bridges using nonlinear inelastic analysis and genetic algorithm", *Structures*, **16**, pp.288-302.
- [9] H.M. Hung, V.Q. Viet, T.V. Hung (2020), "Optimization of nonlinear inelastic steel frames considering panel zones", *Advances in Engineering Software*, **142**, pp.102771.
- [10] R. Grandhi (1993), "Structural optimization with frequency constraints-a review", *AIAA J.*, **31**(12), pp.2296-2303.
- [11] P.H. Anh (2016), "Truss optimization with frequency constraints using enhanced differential evolution based on adaptive directional mutation and nearest neighbor comparison", *Advances in Engineering Software*, **102**, pp.142-154.
- [12] A. Kaveh, A. Zolghadr (2014), "Democratic PSO for truss layout and size optimization with frequency constraints", *Computers & Structures*, **130**, pp.10-21.
- [13] M. Farshchin, C.V. Camp, M. Maniat (2016), "Multi-class teaching-learning-based optimization for truss design with frequency constraints", *Engineering Structures*, **106**, pp.355-369.
- [14] R. Storn, K. Price (1997), "Differential evolution - a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces", *Journal of Global Optimization*, **11**(4), pp.341-359.
- [15] X.Q. Lieu, D.T.T. Dieu, J.H. Lee (2018), "An adaptive hybrid evolutionary firefly algorithm for shape and size optimization of truss structures with frequency constraints", *Computers & Structures*, **195**, pp.99-112.

Nghiên cứu khả năng thu nước của ống lọc và bê tông rỗng dùng trong giếng khai thác nước ngầm bằng mô hình thí nghiệm vật lý

Vũ Bá Thao*, Nguyễn Thành Công, Nguyễn Huy Vượng

Viện Thủy công, Viện Khoa học Thủy lợi Việt Nam

Ngày nhận bài 4/5/2020; ngày chuyển phản biện 6/5/2020; ngày nhận phản biện 5/6/2020; ngày chấp nhận đăng 8/6/2020

Tóm tắt:

Bài báo trình bày kết quả thí nghiệm mô hình vật lý về khả năng thu nước của ống lọc và bê tông rỗng dùng trong giếng tia và giếng đào thu nước thành bên để khai thác nước ngầm. Thí nghiệm mô hình nhằm xác định các tương quan giữa thành phần cấp phối, hệ số thấm, cột nước, độ chặt, độ dốc đặt ống với khả năng thu nước của các loại kết cấu ống lọc khác nhau. Kết quả thí nghiệm tìm ra khả năng thu nước của ống lọc và bê tông rỗng lần lượt là 2,162-12,238 l/ph/m và từ 0,0053-0,0227 l/ph/cm². Kết cấu thu nước nằm ngang bằng ống lọc hoặc bê tông rỗng có thể dùng trong các loại giếng đứng để khai thác nước ngầm trong môi trường trầm tích biển gió.

Từ khóa: cồn cát, kết cấu thu nước, tầng chứa nước, thu nước nằm ngang.

Chỉ số phân loại: 2.1

Đặt vấn đề

Dải cồn cát ven biển thuộc 4 tỉnh khu vực Bắc Trung Bộ (Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị) có tổng chiều dài khoảng 271,9 km, diện tích 443,7 km², thường phân bố song song với đường bờ biển hiện tại và bị phân cắt bởi mạng lưới sông suối trong vùng thành 11 dải cồn cát. Thành phần thạch học của tầng chứa nước trong các dải cồn cát chủ yếu là cát hạt mịn đến vừa thuộc thành tạo biển gió (mvQ), chiều dày của tầng chứa nước thay đổi từ 3,0-15,0 m. Nước trong các thấu kính nước nhạt là nguồn cung cấp chủ yếu phục vụ nhu cầu sinh hoạt và sản xuất cho nhân dân sinh sống trên và lân cận khu vực cồn cát. Tổng lưu lượng khai thác vào khoảng 41.601,7 m³/ngày đêm, trong đó lưu lượng phục vụ sinh hoạt là 25.940,8 m³/ngày đêm, phục vụ sản xuất là 15.660,9 m³/ngày đêm [1].

Các mô hình khai thác nước ngầm theo phương thẳng đứng như giếng đào, giếng khoan đơn, hành lang giếng là các mô hình chủ yếu đang khai thác nước ngầm trong các dải cồn cát ven biển miền Trung. Các mô hình này đôi khi hoặc không đáp ứng đủ nhu cầu cấp nước hoặc khai thác quá mức làm hạ thấp mực nước ngầm và dịch chuyển biên mặn làm nhiễm mặn đới nước ngọt. Quy mô khai thác chủ yếu là hộ gia đình nên việc quản lý khai thác về trữ lượng và chất lượng cũng gặp khó khăn.

Để đáp ứng nhu cầu dùng nước ngày một tăng và giảm thiểu tác động đến tầng chứa nước, một số công nghệ khai

thác nước ngầm theo phương ngang đã được nghiên cứu và áp dụng vào thực tế. Hệ thống thu nước ngầm theo phương ngang (TNNN) thường được áp dụng tại các khu vực có chiều dày tầng chứa nước mỏng, mực nước ngầm nằm nông. Phân tích các ưu điểm của hệ thống TNNN và phạm vi ứng dụng đã được trình bày trong nghiên cứu của Hunt và cs (2002) [2]. Hệ thống TNNN có ưu điểm là thu được lưu lượng lớn khi bố trí khai thác ở khu vực cồn cát.

Hệ thống thu nước trong cồn cát ngày càng trở nên phổ biến. Tại Hoa Kỳ, hệ thống TNNN phổ biến ở Louisville, Kentucky và ở Sonoma County, California; tại Hàn Quốc có mô hình giếng tia cấp nước ven sông Nakh Dong, thành phố Chang Won; tại Nhật Bản có nhà máy nước Kinuta, khu vực Tokyo Metropolitan, thành phố Tokyo. Tại Việt Nam cũng đã có các nghiên cứu tương tự, như mô hình khai thác nước ngầm trong cồn cát ven sông Trường Giang, tỉnh Quảng Nam [3]. Nghiên cứu sự biến thiên của cột nước thấm dọc theo ống lọc nằm ngang bằng mô hình vật lý đã được trình bày trong kết quả nghiên cứu của Chen và cs (2003) [4]. Nghiên cứu sự hạ thấp mực nước xung quanh một ống lọc nằm ngang trong tầng chứa nước không áp được trình bày trong nghiên cứu của Hongbin Zhan (2002) [5]. Phân tích tốc độ dòng chảy của nước thông qua một ống thu nước nằm ngang dưới đáy sông lần đầu tiên được trình bày bởi Hantush và Papadopoulos (1962) [6]. Nghiên cứu sự vận động của nước dưới đất bao gồm lưu lượng và vận tốc dòng chảy đến một ống lọc nằm ngang có đường kính 30 mm và

*Tác giả liên hệ: Email: vubathao@gmail.com

A study on water collecting capacity of filter tubes and porous concrete applied in groundwater wells by using physical experiments

Ba Thao Vu*, Thanh Cong Nguyen, Huy Vuong Nguyen

Hydraulic Construction Institute,
Vietnam Academy for Water Resources

Received 4 May 2020; accepted 8 June 2020

Abstract:

This paper presents the results of the physical experiment on water collecting capacity of the filter tubes and porous concrete used in the radial and shallow wells for groundwater collecting purposes. The physical experiment aimed at determining the correlations between various parameters such as grading composition, permeability coefficient, water head, density, and tube slope with water collecting capacity of different types of filter structures. Experimental results showed that the ability of collecting water of filter tubes and hollow concrete were from 2.162 little/minute/m to 12.238 little/minute/m, and from 0.0053 little/minute/cm² to 0.0227 little/minute/cm², respectively. The horizontal water collection structures including filter tubes and porous concrete can be used in many kinds of vertical wells to exploit groundwater in windy marine sediments environment.

Keywords: aquifer, horizontal water collection, sand dunes, water collecting structures.

Classification number: 2.1

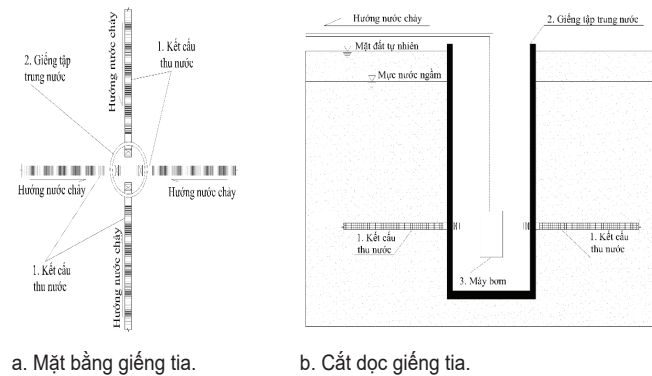
chiều dài 2,6 m đã được trình bày trong nghiên cứu của Kim và cs (2012) [7]. Ảnh hưởng của môi trường địa chất đến ống lọc thu nước nằm ngang và giếng gom nước đã được Mohamed và Rushton (2006) [8] nghiên cứu và công bố. Tại châu Âu, thiết kế và xây dựng hệ thống thu nước dưới đất có nghiên cứu của Grischek và cs (2002) [9].

Tại khu vực dải cồn cát ven biển Bắc Trung Bộ chưa có công bố khoa học về các tương quan giữa các yếu tố địa chất thủy văn như: thành phần hạt, độ chặt, hệ số thấm, cột nước thấm... và kết cấu ống lọc như: độ mở, tỷ lệ khe hở và đường kính, độ dốc của ống lọc. Nghiên cứu này sử dụng mô hình vật lý để thí nghiệm xác định các tương quan giữa các thông số địa chất thủy văn đặc trưng của tầng chứa nước với khả năng thu nước của các kết cấu thu nước ngầm khác nhau.

Mô hình thí nghiệm

Giếng tia

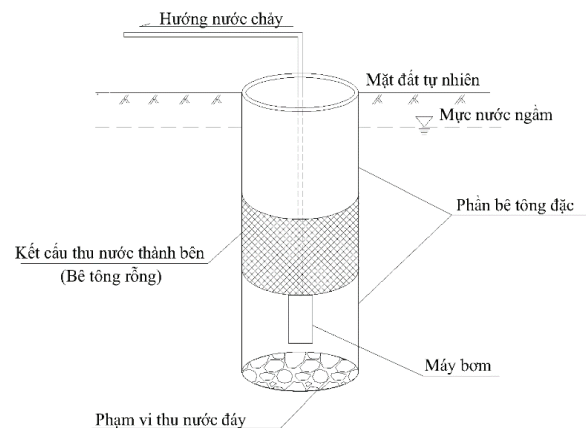
Kết cấu mô hình giếng tia (hình 1) thường bao gồm: 1. Kết cấu thu nước (các tia thu nước); 2. Giếng tập trung nước; 3. Máy bơm nước. Số lượng tia phụ thuộc vào lưu lượng khai thác, khả năng thu nước của tia và trữ lượng khai thác cho phép của tầng chứa nước.



Hình 1. Sơ họa mô hình giếng tia.

Giếng đào thu nước thành bên

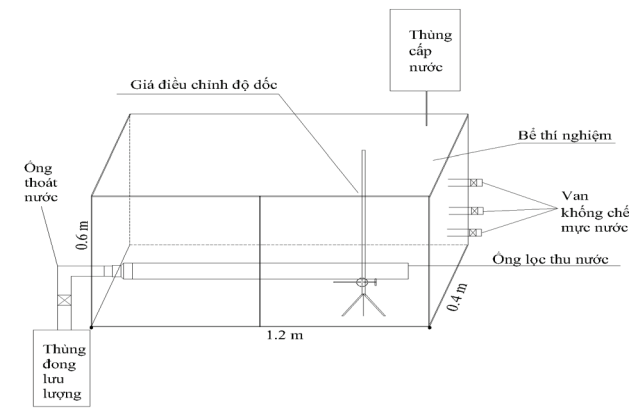
Giếng đào thu nước thành bên (hình 2) có phạm vi áp dụng đối với các công trình quy mô khai thác từ 5-20 m³/ngày, và nên áp dụng khi chiều dày tầng chứa nước mỏng, độ sâu khai thác <6 m.



Hình 2. Sơ họa giếng đào thu nước thành bên.

Kích thước mô hình thí nghiệm

Thí nghiệm mô hình nhằm xác định các tương quan giữa thành phần cấp phối, hệ số thấm, cột nước, độ chặt, độ dốc thủy lực với khả năng thu nước của các loại kết cấu ống lọc khác nhau. Sơ đồ và hình ảnh mô hình thí nghiệm được thể hiện như hình 3. Kích thước mô hình thí nghiệm có chiều dài 1,2 m, rộng 0,4 m, cao 0,6 m.



a) Sơ đồ thí nghiệm



b) Mô hình thí nghiệm trong cát c) Mô hình thí nghiệm trong nước

Hình 3. Sơ đồ và hình ảnh mô hình thí nghiệm.

Vật liệu mô phỏng

Vật liệu mô phỏng môi trường thấm cho kết cấu thu nước giếng đào thu nước thành bên được dùng là cát hạt mịn, cát hạt thô và cuội sỏi. Thành phần cấp phối và đặc tính thấm của vật liệu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các thông số vật liệu mô phỏng môi trường thấm cho kết cấu giếng đào thu nước thành bên.

STT	Chỉ tiêu	Ký hiệu	Đơn vị	Giá trị		
				Cát mịn (mvQ)	Cát thô (amQ)	Cuội sỏi
1	Thành phần hạt					
	+ Hạt cuội (>20) mm					
	+ Hạt sỏi sạn (5,0-10,0) mm	P				25,9
	+ Hạt sỏi sạn (2,0-5,0) mm	%		0,2	0,6	64,8
	+ Hạt cát to (0,5-2,0) mm	%		8,9	42,6	8,3
	+ Hạt cát vừa (0,25-0,5) mm	%		67,2	33,6	0,2
	+ Hạt cát nhỏ (0,1-0,25) mm	%		18,7	17,0	0,3
	+ Hạt cát mịn (0,05-0,1) mm	%		0,8	4,5	0,4
	+ Hạt bụi (0,005-0,05) mm	%		4,2	1,8	0
	+ Nhóm hạt sét <0,005 mm	%		0,0	0,0	0
2	Hệ số rỗng max	e_{max}		0,985	0,750	
3	Hệ số rỗng min	e_{min}		0,638	0,486	
4	Khối lượng riêng	Δs	-	2,66	2,66	
5	Hệ số thấm	K	cm/s	$2,18 \times 10^{-3}$	$5,37 \times 10^{-3}$	$3,09 \times 10^{-2}$

Mô phỏng các kết cấu thu nước cho giếng tia

Các kết cấu thu nước dùng cho giếng tia được thí nghiệm trong nghiên cứu này gồm 3 dạng ống lọc có cấu tạo và đường kính khác nhau. Các thông số của ống lọc được trình bày ở bảng 2. Đây là các loại ống sử dụng phổ biến trên thị trường hiện nay (hình 4).

Bảng 2. Thông số kỹ thuật của các loại ống lọc.

STT	Loại ống lọc	Chiều dài (m)	Đường kính (mm)	Độ rộng khe (mm)	Độ mở (%)
1	Ống thu quần bằng Waterbelt - Capiphon pipe (WP76)	1,0	76		
2	Ống lọc kiểu Johnson JS (JS48)	1,0	46	0,508	33,3
3	Ống lọc kiểu Johnson JS (JS90)	1,0	90	0,508	13,83



Hình 4. Các loại ống lọc thí nghiệm.

Mô phỏng kết cấu thu nước của giếng đào thu nước thành bên

Lưu lượng khai thác của loại hình giếng thu nước thành bên bằng bê tông rỗng phụ thuộc vào khả năng thu nước của vật liệu thu nước bố trí tại đoạn giữa của giếng. Bên cạnh khả năng thu nước thì các kết cấu thu nước này còn phải có khả năng chịu lực để giữ cho thành giếng được ổn định. Để đảm bảo các điều kiện đó, chọn vật liệu bê tông rỗng để tiến hành thí nghiệm. Khả năng thu nước của ống bê tông rỗng được xác định thông qua mô hình thí nghiệm vật lý.

Sử dụng hai loại bê tông rỗng. Loại một là bê tông rỗng cốt liệu là 100% đá dăm có cấp phối hạt $2,5 \text{ mm} \leq d \leq 5,0 \text{ mm}$; loại hai là bê tông rỗng cốt liệu gồm 80% đá dăm có cấp phối hạt $2,5 \text{ mm} \leq d \leq 5,0 \text{ mm}$ và 20% cát thô (cát có 50% hạt với $1,0 \text{ mm} \leq d \leq 2,5 \text{ mm}$). Sản phẩm bê tông rỗng sau khi chế tạo và đưa vào thí nghiệm có dạng hình trụ tròn (hình 5).



Hình 5. Bê tông rỗng sau khi chế tạo.

Các kịch bản thí nghiệm

Cột nước thấm: với đặc điểm chiều dày tầng chứa nước mỏng, mực nước ngầm nằm nông, mực nước ngầm dao động giữa các mùa trong năm khoảng 2 m, dự kiến đặt hệ thống ống nằm ngang sâu tối thiểu dưới mực nước ngầm mùa kiệt là 0,5 m. Trên hình 3, cột nước thấm là khoảng cách từ bề mặt mô hình đến tim đầu vào của ống thu nước.

Khi mô phỏng cột nước thấm trong giếng tia, chọn các mức mô phỏng là: 10, 20, 30, 40 và 50 cm. Đối với giếng thu nước thành bên, để đánh giá ảnh hưởng của cột nước thấm đến khả năng thu nước của bê tông rỗng, đề tài đã tiến hành thí nghiệm với các chiều cao cột nước 1, 2, 3, 4, 5 và 6 m.

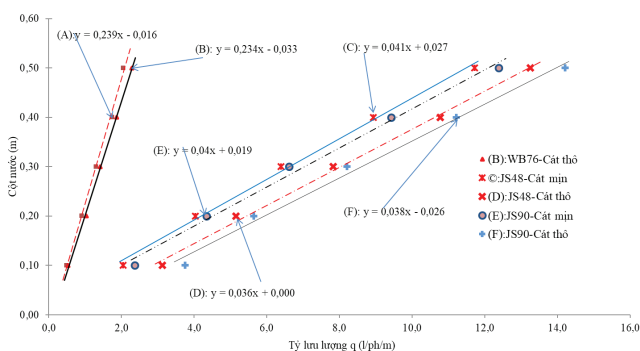
Độ dốc ống lọc: để lựa chọn được độ dốc ống lọc hợp lý trong giếng tia trên thực tế, tiến hành thí nghiệm với các độ dốc ống lọc là 1, 3 và 5%.

Kết quả thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm xác định các thông số của kết cấu thu nước phục vụ thiết kế giếng tia

Tương quan giữa cột nước thấm và khả năng thu nước của các loại ống lọc trong các môi trường thấm khác nhau:

Khả năng thu nước của ống lọc phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như hệ số thấm của môi trường làm việc, cột nước thấm, kết cấu của ống lọc... Để xây dựng tương quan giữa khả năng thu nước của ống lọc với các mức cột nước thấm trong các môi trường thấm khác nhau, chúng tôi tiến hành thí nghiệm với các điều kiện mô phỏng như đã nêu trên. Kết quả thí nghiệm về tương quan giữa khả năng thu nước của ống lọc với cột nước thấm trong các môi trường thấm được thể hiện ở hình 6.

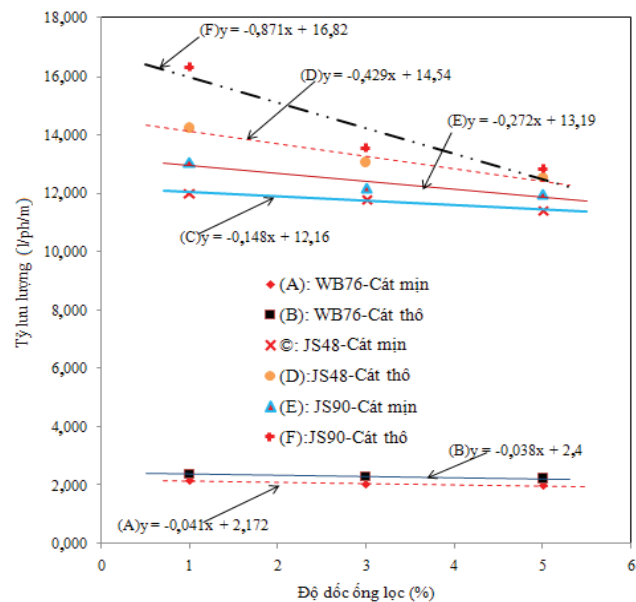


Hình 6. Tương quan giữa khả năng thu nước của một số loại ống lọc và gradien thấm trong các môi trường thấm khác nhau.

Tỷ lưu lượng q là khả năng thu nước của 1 m chiều dài ống lọc trong thời gian 1 phút. Đây là chỉ tiêu cần được xác định trong quá trình thiết kế tính toán hệ thống thu nước của giếng tia. Tương quan giữa tỷ lưu lượng của các loại

ống lọc trong các môi trường thấm khác nhau với cột nước thấm có dạng tuyến tính, tuy nhiên tương quan này sẽ thay đổi khi khả năng cung cấp nước của môi trường thấm cũng như cột nước thấm vượt qua khả năng thu nước của ống lọc. Trên hình 6 có thể thấy, với cột nước thấm thay đổi từ 0,1 đến 0,5 m thì trong môi trường trầm tích biển gió khả năng thu nước của các loại ống lọc có thể đạt từ 2,162 l/ph/m đến 12,238 l/ph/m.

Ảnh hưởng của độ dốc ống lọc đến khả năng thu nước của ống lọc



Hình 7. Tương quan giữa khả năng thu nước và độ dốc của một số ống lọc trong các môi trường thấm khác nhau.

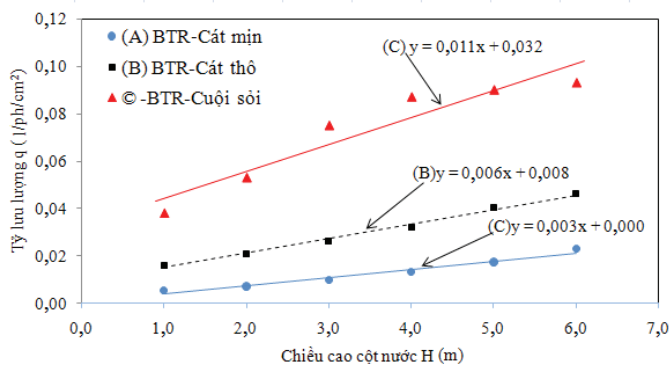
Độ dốc của ống lọc là một trong các yếu tố cần thiết khi tính toán thiết kế giếng tia. Để đánh giá ảnh hưởng của độ dốc đến khả năng thu nước của ống lọc trong các môi trường thấm khác nhau, tiến hành thí nghiệm với các độ dốc ống lọc 1, 2 và 5% trong các môi trường cát mịn, cát thô với các chiều cao cột nước là 10, 20, 30, 40 và 50 cm. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 7.

Thông thường đối với ống dẫn nước, độ dốc ống càng cao, vận tốc dòng chảy càng lớn và theo đó lưu lượng cũng tăng. Tuy nhiên, mục tiêu thí nghiệm này là đánh giá khả năng lọc và thu nước của ống lọc đặt trong đất cát. Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng thu nước của ống lọc tỷ lệ nghịch với độ dốc ống, độ dốc càng lớn tỷ lưu lượng thu càng nhỏ. Nguyên nhân là với cao độ đầu ra của ống lọc cố định tại đáy bể thí nghiệm, điều chỉnh độ dốc ống lọc bằng cách nâng cao đầu vào ống lọc (xem hình 3), dẫn tới độ dốc ống càng lớn thì cột nước thấm (khoảng cách từ mặt mô hình đến tim ống) càng giảm, do đó tỷ lưu lượng giảm theo.

Để đảm bảo giảm thiểu lắng đọng trong ống thu nước, kiến nghị nên chọn góc nghiêng ống thu từ 3 đến 5%.

Kết quả thí nghiệm xác định các thông số của kết cấu thu nước phục vụ thiết kế giếng đào thu nước thành bên

Kết quả thí nghiệm với 2 loại cấp phối bê tông rỗng, tuy nhiên chỉ có loại cấp phối BTR.100% M2.5 đạt hiệu quả thu nước có thể chọn làm kết cấu thu nước. Kết quả thí nghiệm tương quan giữa khả năng thu nước của bê tông rỗng trong các môi trường thấm khác nhau với chiều cao cột nước thấm được thể hiện trên hình 8.



Hình 8. Tương quan giữa khả năng thu nước của bê tông rỗng và chiều cao cột nước.

Kết quả thí nghiệm cho thấy có thể dùng bê tông rỗng cho các kết cấu thu nước ngầm trong môi trường lỗ rỗng. Khả năng thu nước của bê tông rỗng phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chiều cao cột nước, hệ số thấm của môi trường thu nước. Trong khoảng cột nước thí nghiệm từ 1 đến 7 m thì khả năng thu nước tuyến tính với chiều cao cột nước và tăng dần trong các môi trường lần lượt là cuội, cát thô, cát mịn.

Kết luận

- Tỷ lệ lưu lượng các loại ống lọc trong các môi trường thấm thay đổi theo trị số cột nước thấm và có quan hệ tuyến tính. Với cột nước thấm thay đổi từ 0,1 đến 0,5 m thì trong môi trường trầm tích biển gió khả năng thu nước của các loại ống lọc đạt từ 2,162 đến 12,238 l/ph/m.

- Khả năng thu nước của ống lọc tỷ lệ nghịch với độ dốc đặt ống. Tuy nhiên, để giảm thiểu lắng đọng trong ống thu nước, nên chọn góc nghiêng ống thu từ 3 đến 5%.

- Bê tông rỗng đủ khả năng thu nước để dùng làm kết cấu thu nước của giếng đào thu nước thành bên. Khi thay đổi chiều cao cột nước thí nghiệm từ 0 đến 7 m thì khả năng thu nước của bê tông rỗng trong môi trường trầm tích biển gió (mvQ) thay đổi từ 0,0053 đến 0,0227 l/ph/cm².

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thành Công và cs (2019), Báo cáo tổng kết Đề tài độc lập cấp quốc gia “Nghiên cứu đề xuất mô hình khai thác bền vững thấu kính nước nhạt trong các cồn cát ven biển phục vụ cấp nước sinh hoạt cho vùng khan hiếm nước khu vực Bắc Trung Bộ”.
- [2] H. Hunt, M. Schubert and C. Ray (2002), “Conceptual design of riverbank filtration systems”, *Riverbank Filtration, Improving Source-Water Quality*, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp.19-27.
- [3] Dương Thị Thanh Thủy và cs (2010), *Nghiên cứu và xây dựng mô hình khai thác nước ngầm trong cồn cát ven sông Trường Giang, tỉnh Quảng Nam bằng hành lang thu nước phục vụ phát triển bền vững kinh tế - xã hội*, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp bộ, Bộ Giáo dục và Đào tạo, Mã số: B2008-02-48.
- [4] C. Chen, J. Wan and H. Zhan (2003), “Theoretical and experimental studies of coupled seepage-pipe flow to a horizontal well”, *Journal of Hydrology*, **281**, pp.159-171.
- [5] Hongbin Zhan (2002), “Groundwater flow to a horizontal or slanted well in an unconfined aquifer”, *Water Resources Research*, **38**(7), <https://doi.org/10.1029/2001WR000401>
- [6] M.S. Hantush and I.S. Papadopoulos (1962), “Flow of ground water to collector wells”, *Journal of Hydraulic Engineering Division*, **88**, pp.221-245.
- [7] S.H. Kim, K-H Ahn, S.O. Prasher and R.M. Patel (2012), “Extending riverbed filtration design velocity for orizontal wells from model to prototypes”, *Canadian Biosystems Engineering*, **54**, pp.1.1-1.6.
- [8] A. Mohamed and K. Rushton (2006), “Horizontal wells in shallow aquifers: field experiment and numerical model”, *Journal of Hydrology*, **329**, pp.98-109.
- [9] T. Grischek, D. Schoenheinz and C. Ray (2002), “Siting and design issues for riverbank filtration schemes”, *Riverbank Filtration, Improving Source-Water Quality*, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp.291-302.

So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu *Sargassum* bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH

Trần Thị Ngọc Mai*

Viện Khoa học Ứng dụng, Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh (HUTECH)

Ngày nhận bài 22/11/2019; ngày chuyển phản biện 27/11/2019; ngày nhận phản biện 31/12/2019; ngày chấp nhận đăng 10/1/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành trên hai loại rong nâu *Sargassum feldmannii* và *Sargassum polycystum* thu từ vùng biển Khánh Hoà và Ninh Thuận. Thu nhận cao chiết từ hai loại rong này bằng ba phương pháp: Soxhlet, sử dụng sóng siêu âm và chiết kết hợp xử lý enzyme Viscozyme L. Kết quả, phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm cho tỉ lệ thu hồi cao chiết là $7,095 \pm 0,055\%$ ở *S. feldmannii* và $8,373 \pm 0,122\%$ ở *S. polycystum*; khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 63,037% và 62,720%. Đối với phương pháp xử lý Viscozyme L thì tỉ lệ thu hồi cao chiết là $7,192 \pm 0,213\%$ ở *S. feldmannii* và $8,020 \pm 0,186\%$ ở *S. polycystum*; khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 61,642% và 62,766%. Hai phương pháp này cho hiệu quả của quá trình chiết cao hơn so với phương pháp Soxhlet, tỉ lệ thu hồi cao chiết là $6,774 \pm 0,060\%$ ở *S. feldmannii* và $6,575 \pm 0,413\%$ ở *S. polycystum*; khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 54,301% và 56,503% so với chất đối chiếu là vitamin C ở cùng nồng độ.

Từ khóa: phương pháp DPPH, *Sargassum*, Soxhlet, sóng siêu âm, Viscozyme L.

Chỉ số phân loại: 2.4

Đặt vấn đề

Rong biển là nguồn tài nguyên phong phú, đa dạng về chủng loại. Theo thống kê, nước ta có khoảng 794 loài rong biển; phân bố ở vùng biển phía Bắc 310 loài, phía Nam 484 loài, 156 loài tìm thấy ở cả hai miền. Sản lượng của chúng tương đối lớn với mật độ trung bình $43,8 \pm 20,2$ cây/m² và sinh lượng trung bình đạt $456,1 \pm 64,2$ g khô/m². Rong biển, đặc biệt là rong nâu có chứa các thành phần có hoạt tính sinh học cao như fucoxanthin, α -tocopherol, fucosterol, β -caroten, các polyphenol... [1-3]. Trong rong nâu chứa tổng lượng ω -3 cao trung bình khoảng 20%, ω -9 chiếm khoảng 15% và ω -6 (arachidonic acid) chiếm khoảng 9% [4, 5]. Do đó, việc xử lý rong để thu chất chiết là cần thiết. Những nghiên cứu chiết tách các hợp chất có hoạt tính sinh học hướng đến việc bổ sung chúng vào thực phẩm nhằm tăng giá trị chức năng của thực phẩm đã và đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trong nước và trên thế giới [6-8]. Trong nghiên cứu này, các phương pháp chiết được sử dụng là các phương pháp: Soxhlet, sử dụng sóng siêu âm, ngâm chiết kết hợp xử lý enzyme.

Phương pháp sử dụng sóng siêu âm là phương pháp mới được ứng dụng trong kỹ thuật phân tách, chiết xuất hiện nay, với ưu điểm cho hiệu suất thu nhận cao hơn so với phương pháp thông thường, thời gian trích ly ngắn, chất lượng của sản phẩm tốt, thân thiện với môi trường và nhiều tiềm năng

ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Siêu âm là sóng cơ học hình thành do sự lan truyền dao động của các phần tử trong không gian có tần số khoảng 20-100 kHz. Sóng siêu âm có độ dài sóng khoảng $10-10^{-3}$ cm nên không đủ năng lượng để tương tác trực tiếp lên liên kết hoá học. Tuy nhiên, sự phát sóng siêu âm trong môi trường lỏng lại sản sinh ra một năng lượng lớn, gây nên hiện tượng vật lý gọi là sự tạo và vỡ bọt khí. Khi truyền sóng siêu âm qua môi trường lỏng, dưới tác dụng của sóng, các bọt khí bị kéo nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí nổ vỡ. Khi sự nổ vỡ của các bọt khí ở gần bề mặt pha rắn, xảy ra sự mất đối xứng, sinh ra tia dung môi có tốc độ cao vào thành tế bào, do đó làm tăng sự xâm nhập của dung môi vào tế bào và làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa pha rắn và pha lỏng. Điều này làm tăng sự truyền khối và phá vỡ cấu trúc tế bào (hình 1). Sự nổ vỡ của các bọt khí làm tăng sự thoát ra của các chất nội bào vào dung dịch [9].

Enzyme Viscozyme L chứa các enzyme bao gồm arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase và pentosanase; thủy phân ngẫu nhiên liên kết β -1,4-glycoside của các glucan (chủ yếu là cellulose) có trong thành tế bào rong để giải phóng ra cellulosedextrin, cellobiose và glucose (hình 2). Việc sử dụng enzyme Viscozyme L giúp xúc tác phân hủy thành tế bào rong hỗ trợ làm tăng hiệu suất chiết [10].

*Email: ttn.mai79@hutech.edu.vn

Comparison of extraction process from brown seaweed *Sargassum* by different methods and evaluation of antioxidant possibility by DPPH method

Thi Ngoc Mai Tran*

Institute of Applied Sciences, University of Technology,
Ho Chi Minh city (HUTECH)

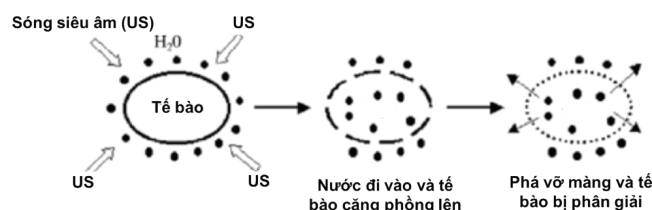
Received 22 November 2019; accepted 10 January 2020

Abstract:

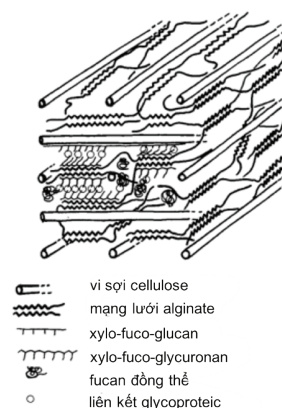
The study was conducted on two types of brown seaweed *Sargassum feldmannii* and *Sargassum polycystum* which were collected from the sea of Khanh Hoa and Ninh Thuan provinces. Acquisition of extraction from the samples was operated by three methods: Soxhlet, ultrasound method and method using enzyme Viscozyme L. Results of ultrasound method showed that the extract recovery was $7.095 \pm 0.055\%$ in *S. feldmannii* and $8.373 \pm 0.122\%$ in *S. polycystum*; their free radical scavenging activities (DPPH) were 63.037% and 62.720% respectively. For methods using enzymes Viscozyme L, the extract recovery was $7.192 \pm 0.213\%$ in *S. feldmannii* and $8.020 \pm 0.186\%$ in *S. polycystum*; their free radical scavenging activities (DPPH) were 61.642% and 62.766% respectively. The effective extraction of these two methods was higher than that of the Soxhlet method which the extract recovery was $6.774 \pm 0.060\%$ in *S. feldmannii* and $6.575 \pm 0.413\%$ in *S. polycystum*; their free radical scavenging activities (DPPH) were 54.301% and 56.503% respectively, compared to the reference substances as vitamin C at the same concentration.

Keywords: DPPH method, *Sargassum*, Soxhlet method, ultrasound, Viscozyme L.

Classification number: 2.4



Hình 1. Quá trình tác động của sóng siêu âm lên tế bào [9].



Hình 2. Cấu tạo thành tế bào rong nâu [5].

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Nguyên liệu rong mơ thu từ vùng biển Khánh Hoà có tên khoa học là *Sargassum feldmannii* và rong chi *Sargassum polycystum* thu từ vùng biển Ninh Thuận. Rong được ngâm, rửa sạch, phơi/sấy ở 45-50°C đến khô (độ ẩm 16%) và xay nghiền nhỏ thành bột với 3 kích cỡ 0,25; 0,5 và 0,63 mm.

Viscozyme L được sản xuất từ nấm *Aspergillus aculeatus*, hoạt động tốt ở pH 3,3-5,5 và nhiệt độ 25-55°C. Viscozyme L bản chất là β -glucanase (endo-1,3(4)-) chứa các enzyme bao gồm arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, xylanase và pentosanase. Hoạt tính 100 FBG/g.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp Soxhlet: cân M_T (g) bột rong nâu đã được sấy khô đến khối lượng không đổi cho vào bộ chiết Soxhlet, tiến hành chiết. Sau khi kết thúc quá trình chiết, bột rong được sấy đến khối lượng không đổi và cân được M_S (g).

Phương pháp sử dụng sóng siêu âm: thiết bị phát sóng siêu âm sử dụng trong nghiên cứu là thiết bị siêu âm dạng thanh. Mẫu được chuẩn bị trong các cốc, nhúng thanh phát sóng siêu âm vào dung dịch lỏng - rắn (dung môi - nguyên liệu). Các thí nghiệm khảo sát thực hiện ở cùng tần số 20 kHz. Sau khi trích ly M_T (g) bột rong nâu bằng sóng siêu âm, tách bã bằng máy ly tâm với tốc độ 3500 vòng/phút trong 10 phút, toàn bộ bã được sấy đến khối lượng không đổi được M_S (g). Hỗn hợp dung môi và chất chiết được đưa qua hệ thống cô quay chân không để cất loại dung môi, sản phẩm thu được ở dạng cao chiết khô kiệt.

Phương pháp chiết kết hợp xử lý enzyme: bột rong được

ngâm trong nước với tỉ lệ 1/9, sau đó khảo sát quá trình bổ sung enzyme Viscozyme L. Sau khảo sát bã bột rong được thu bằng cách ly tâm 3500 vòng/phút, trong 10 phút và sấy ở 45-50°C đến độ ẩm ban đầu 16%. Cân M_T (g) bột rong sau xử lý enzyme, tiến hành chiết bằng phương pháp ngâm lắc 100 vòng/phút trên máy lắc, sử dụng dung môi dichloromethane/methanol là 1/1, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 7/1, thời gian chiết là 18 giờ. Sau khi kết thúc quá trình chiết, bã bột rong được thu bằng cách ly tâm 3500 vòng/phút, trong 10 phút, sấy đến độ ẩm ban đầu và cân được M_S (g). Hỗn hợp dung môi và chất chiết được đưa qua hệ thống cô quay chân không để cất loại dung môi, sản phẩm thu được ở dạng cao chiết khô kiệt.

Tỉ lệ thu hồi cao chiết có trong 100 g nguyên liệu tính theo công thức sau:

$$\text{Tỉ lệ thu hồi cao chiết (\%)} = \frac{M_T - M_S}{M_T} \times 100 \quad (1)$$

Phương pháp DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là một gốc tự do bền, có màu tím và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi có mặt chất chống oxy hóa, nó sẽ bị khử thành 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), có màu vàng. Đo độ hấp thụ tại bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa trong mẫu cần phân tích. Acid ascorbic được sử dụng làm chất đối chiếu. Phần trăm bất gốc tự do DPPH của mẫu cần phân tích được tính theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ bất gốc tự do DPPH (\%)} = \frac{OD_C - OD_T}{OD_C} \times 100 \quad (2)$$

trong đó: OD_C là mật độ quang của chứng (dung môi); OD_T là mật độ quang của mẫu thử hay đối chiếu.

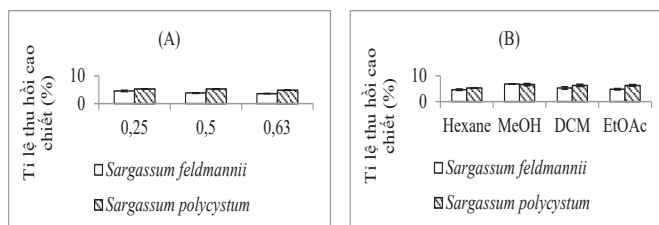
Phương pháp xử lý số liệu: tất cả số liệu được biểu diễn dưới dạng Trung bình $\pm$ SD ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Sử dụng phần mềm xử lý số liệu Statgraphics Centurion XV.

Kết quả và Bàn luận

Chiết bằng phương pháp Soxhlet

Kích thước nguyên liệu và việc lựa chọn dung môi sẽ ảnh hưởng đến tỉ lệ cao chiết thu hồi. Việc xay nhỏ nguyên liệu góp phần phá vỡ vách tế bào dễ dàng hơn, tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi, tăng khả năng khuếch tán của các chất tan vào dung môi, tạo điều kiện cho chất tan thoát ra ngoài dễ dàng hơn. Tuy nhiên, độ mịn của nguyên liệu cũng phải có giới hạn, nếu quá mịn sẽ làm giảm khả năng thấm của dung môi vào lớp vật liệu rắn do làm tắc các ống mao dẫn, cản trở tiến trình trích ly ở một vài vị trí, nơi mà dung môi không thể thấm qua.

Kết quả hình 3 cho thấy kích thước nguyên liệu và dung môi chiết có ảnh hưởng đến tỉ lệ thu hồi cao chiết rong nâu ở độ tin cậy 95%. Đối với rong mơ *S. feldmannii* thì ở kích thước 0,25 mm và dung môi chiết MeOH cho tỉ lệ thu hồi cao chiết cao hơn hai kích thước và các dung môi còn lại, còn ở rong chỉ *S. polycystum* thì ở kích thước 0,25 mm và 0,5 mm; dung môi MeOH, DCM và EtOAc cho tỉ lệ thu hồi cao chiết không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Do đó, chọn kích thước 0,25 mm và dung môi chiết là MeOH cho cả hai loại rong.



Chú thích: EtOAc: ethyl acetate, MeOH: methanol, DCM: dichloromethane.

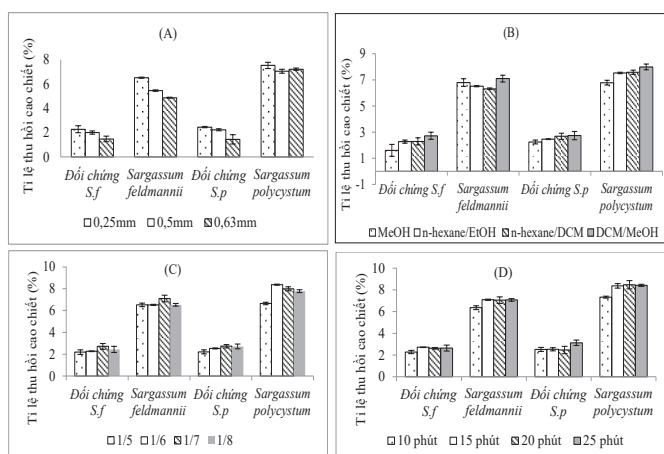
Hình 3. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu (A) và dung môi chiết (B) đến tỉ lệ thu hồi cao chiết bằng phương pháp Soxhlet.

Chiết bằng phương pháp sử dụng sóng siêu âm

Khi truyền sóng siêu âm qua môi trường lỏng/rắn, dưới tác dụng của sóng, các bọt khí bị kéo nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí nổ vỡ. Do đó, pha rắn (nguyên liệu) trong môi trường có kích thước càng nhỏ, thì diện tích bề mặt càng lớn nên sự lan truyền các dao động của sóng siêu âm lên pha rắn càng lớn, dẫn đến khả năng phá vỡ cấu trúc tế bào càng cao. Khi đó các thành phần bên trong tế bào hoà tan vào dung môi dễ dàng hơn, tỉ lệ thu hồi các chất chiết sẽ cao trong thời gian ngắn. Tuy nhiên, thời gian chiết phải đủ dài để các chất trong nguyên liệu được chiết xuất hoàn toàn vào dung môi. Khi sử dụng sóng siêu âm để hỗ trợ quá trình chiết, thì yếu tố thời gian được rút ngắn đáng kể so với phương pháp chiết truyền thống.

Việc lựa chọn dung môi hay hệ dung môi phải dựa vào mối quan hệ giữa chất chiết và dung môi. Khi chất chiết đa dạng thì việc chọn hệ dung môi là cần thiết. Điều này sẽ hỗ trợ cho quá trình chiết tách các chất chiết có độ phân cực khác nhau, thay vì chiết phân đoạn. Sự chênh lệch giữa tỉ lệ nguyên liệu/dung môi càng lớn càng làm tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi, khi đó động lực của quá trình khuếch tán và hoà tan sẽ càng lớn, làm cho các thành phần trong nguyên liệu có xu hướng đi vào dung môi nhiều hơn. Do đó, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi càng lớn thì tỉ lệ thu hồi cao chiết càng cao. Tuy nhiên, ở tỉ lệ chênh lệch càng cao thì quá trình trích ly càng tăng dần và dừng lại ở một tỉ lệ nhất định, đồng thời nếu dung môi sử dụng càng nhiều thì quá trình tách dung môi để thu nhận cao chiết càng mất nhiều thời gian, điều này sẽ ảnh hưởng đến chất lượng cao chiết.

Kết quả hình 4A cho thấy kích thước nguyên liệu, dung môi chiết, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian xử lý sóng siêu âm có ảnh hưởng đến tỉ lệ thu hồi cao chiết rong nâu ở độ tin cậy 95%. Ở kích thước nguyên liệu nhỏ nhất (0,25 mm) cho tỉ lệ thu hồi cao chiết trung bình cao nhất ở cả hai loại rong. Trong hình 4B, hỗn hợp dung môi DCM/MeOH cho tỉ lệ thu hồi cao chiết cao nhất ở rong mơ *S. feldmannii*, cao hơn so với mẫu đối chiếu là chỉ dùng một loại dung môi MeOH. Tương tự, ở *S. polycystum* tỉ lệ thu hồi cao chiết ở cả ba loại dung môi kết hợp không khác biệt ở mức ý nghĩa 95% và cao hơn khi chỉ sử dụng MeOH. Điều này cho thấy hiệu quả của việc sử dụng dung môi kết hợp. Vì vậy, hỗn hợp dung môi DCM/MeOH được sử dụng cho cả hai loại rong. Hình 4C ở rong mơ *S. feldmannii* thì tỉ lệ nguyên liệu/dung môi cho tỉ lệ thu hồi cao chiết cao nhất là 1/7, còn ở *S. polycystum* là tỉ lệ 1/6. Hình 4D ở cả hai loại rong thời gian xử lý sóng siêu âm 15 phút, 20 phút và 25 phút cho tỉ lệ thu hồi cao không khác biệt ở mức ý nghĩa



S.f: *S. feldmannii*, S.p: *S. polycystum*; EtOH: ethanol, MeOH: methanol, DCM: dichloromethane

Hình 4. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu (A), dung môi chiết (B), tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (C) và thời gian xử lý sóng siêu âm (D) đến tỉ lệ thu hồi cao chiết.

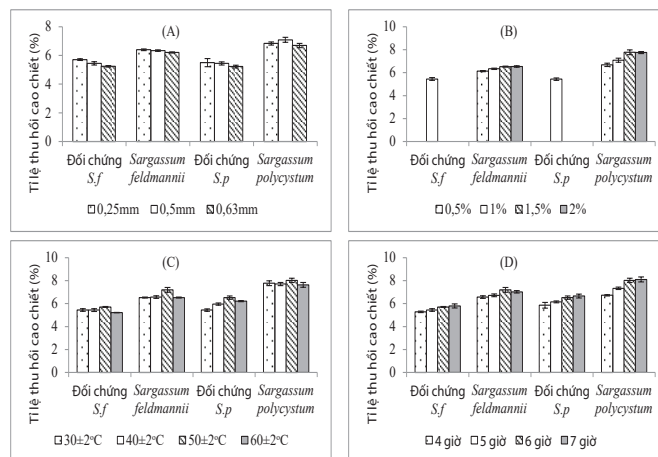
95%. Để hạn chế sự ảnh hưởng của nhiệt độ sinh ra do phát sóng siêu âm lên chất chiết, quá trình trích ly được chọn cho cả hai loại rong là 15 phút. Theo Dina Rodrigues và cộng sự, sử dụng sóng siêu âm xử lý bột rong trong nước hiệu suất chiết thu được từ 26-49% [11]. Sự khác nhau về tỉ lệ thu hồi cao chiết tùy thuộc nhiều vào dung môi chiết khi chiết cùng một mẫu nguyên liệu, và việc thu cao tổng trong dung môi có độ phân cực khác nhau tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu chiết tách các nhóm chất khác nhau sau đó.

Chiết kết hợp xử lý enzyme

Cellulose là thành phần chủ yếu tạo nên vỏ cây rong. Enzyme được sử dụng trong nghiên cứu này là Viscoenzyme L với mục đích hỗ trợ cho quá trình thủy phân lớp thành tế bào rong, làm cho các chất chiết được giải phóng dễ dàng hơn, giúp tăng hiệu quả thu hồi chất chiết [12].

Qua biểu đồ hình 5A cho thấy ở cả hai loại rong tỉ lệ thu hồi cao chiết ở các kích thước khảo sát đều cao hơn đối chứng. Điều này cho thấy tác dụng của enzyme trong việc hỗ trợ quá trình chiết. Ở rong mơ *S. feldmannii* thì kích thước 0,25 mm và 0,5 mm có tỉ lệ thu hồi cao chiết không khác biệt ở mức ý nghĩa 95% và cao hơn kích thước 0,63 mm. Còn ở *S. polycystum* thì kích thước 0,5 mm có tỉ lệ thu hồi cao chiết cao hơn hai trường hợp còn lại. Do đó, kích thước chọn là 0,5 mm cho cả hai loại rong. Hình 5B cho thấy tốc độ phản ứng tăng tỉ lệ thuận với nồng độ enzyme, khi đó thành tế bào bị phá hủy nhiều, các chất tan dễ dàng được chiết xuất ra ngoài. Ở cả hai loại rong nồng độ enzyme 1,5% và 2% có tỉ lệ thu hồi cao chiết không khác biệt ở mức ý nghĩa 95% và cao hơn so với các nồng độ còn lại. Do đó để giảm chi phí, nồng độ 1,5% được chọn để xử lý mẫu trước khi chiết. Nhiệt độ hoạt động của Viscozyme L là 25-55°C, hình 5C cho thấy cả hai loại rong mơ *S. feldmannii* và rong chỉ *S. polycystum* ở nhiệt độ 50±2°C có tỉ lệ thu hồi cao chiết cao nhất. Việc kéo dài thời gian chiết có thể gây ảnh

hưởng đến độ ổn định cũng như hoạt tính của các chất chiết, hình 5D cho thấy cả hai loại rong thời gian chiết 6 giờ và 7 giờ không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Do đó, thời gian xử lý enzyme Viscozyme L trước khi chiết được chọn là 6 giờ, tỉ lệ thu hồi cao chiết 7,192-8,020%. So với nghiên cứu của Sabeena Farvin và cộng sự, Dina Rodrigues và cộng sự thì hiệu suất chiết thu được khi xử lý Viscozyme ở nồng độ 0,1% trong dung môi chiết là nước dao động 37,7-72,7%; sự khác biệt về tỉ lệ thu hồi cao chiết này do sự khác nhau về loài rong nguyên liệu và dung môi chiết [11, 13].



S.f: *S. feldmannii*, S.p: *S. polycystum*

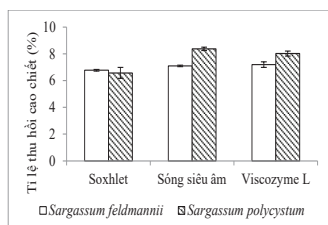
Hình 5. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu (A), nồng độ enzyme (B), nhiệt độ (C) và thời gian ủ enzyme (D) đến tỉ lệ thu hồi cao chiết.

So sánh tỉ lệ thu hồi cao chiết và đánh giá khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết ở ba phương pháp

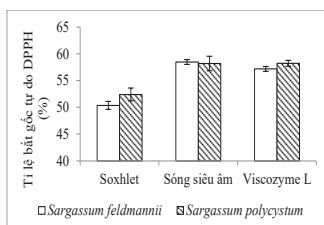
Từ kết quả nghiên cứu của ba phương pháp chiết trên, chọn điều kiện chiết tối ưu của từng phương pháp. Kết quả so sánh được trình bày trong hình 6, tỉ lệ thu hồi cao chiết ở phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm và phương pháp ngâm lắc kết hợp xử lý enzyme cao hơn so với phương pháp Soxhlet cho cả hai loại rong. Về điều kiện thực hiện của hai phương pháp này thì quá trình chiết có thể tiến hành được trên số lượng lớn, đây cũng là ưu điểm so với phương pháp Soxhlet. Tỉ lệ thu hồi cao chiết của cả 3 phương pháp sử dụng trong nghiên cứu này dao động trong khoảng 6,575-8,373%, cao hơn so với kết quả của Hong-Yu Luo và cộng sự là 3,34-6,54% [14] và thấp hơn so với nghiên cứu của Sujin Lim và cộng sự là 16,7-27,3% [8], điều này thể hiện sự ảnh hưởng của điều kiện chiết, phương pháp chiết và đặc biệt là nguồn thu nhận nguyên liệu.

Ở hình 7, khả năng bắt gốc tự do của cao chiết thu bằng phương pháp Soxhlet thấp hơn so với hai phương pháp còn lại, do quá trình này thực hiện ở nhiệt độ cao, điều đó sẽ làm biến đổi các thành phần nhạy với nhiệt có trong cao chiết nên ảnh hưởng đến hoạt tính kháng oxy hoá. Ở phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm và xử lý enzyme thì không có

sự khác biệt ở mức ý nghĩa 95%. Do đó, xét về hiệu quả thu hồi chất chiết, bao gồm tỉ lệ thu nhận cao chiết và khả năng quét gốc tự do DPPH thì hai phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm và chiết bằng phương pháp ngâm lắc kết hợp xử lý enzyme được đề nghị sử dụng cho đối tượng rong nâu. Khả năng kháng oxy hoá của cao chiết rong nâu đánh giá qua khả năng bắt gốc tự do DPPH nhìn chung thấp hơn so với các nghiên cứu đã công bố [10, 14, 15], so với chất đối



Hình 6. So sánh tỉ lệ thu hồi cao chiết ở ba phương pháp chiết.



Hình 7. So sánh khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao chiết ở ba phương pháp chiết.

chiếu là acid ascorbic thì chỉ bằng khoảng 63%.

Kết luận

Chiết bằng phương pháp Soxhlet tốt nhất ở kích thước bột rong 0,25 mm; dung môi chiết MeOH và thời gian chiết là 8 giờ ở cả hai loại rong. Tỉ lệ thu hồi cao chiết là $6,774 \pm 0,060\%$ ở *S. feldmannii* và $6,575 \pm 0,413\%$ ở *S. polycystum*. Khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 54,301% và 56,503% so với chất đối chiếu là vitamin C ở cùng nồng độ.

Phương pháp chiết sử dụng sóng siêu âm thực hiện ở tần số 20 kHz; kích thước bột rong 0,25 mm; hỗn hợp dung môi DCM/MeOH cho cả hai loại rong; tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/7 ở *S. feldmannii*, 1/6 ở *S. polycystum*; thời gian xử lý là 15 phút. Tỉ lệ thu hồi cao chiết là $7,095 \pm 0,055\%$ ở *S. feldmannii* và $8,373 \pm 0,122\%$ ở *S. polycystum*. Khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 63,037% và 62,720% so với vitamin C ở cùng nồng độ.

Phương pháp ngâm lắc kết hợp xử lý Viscozyme L thu được kích thước bột rong là 0,5 mm; nồng độ enzyme 1,5%; nhiệt độ ủ enzyme $50 \pm 2^\circ\text{C}$; thời gian ủ enzyme 6 giờ ở cả hai loại rong. Rong sau khi được xử lý, được chiết bằng dung môi DCM/MeOH (1/1), tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 7/1, thời gian chiết là 18 giờ. Tỉ lệ thu hồi cao chiết là $7,192 \pm 0,213\%$ ở *S. feldmannii* và $8,020 \pm 0,186\%$ ở *S. polycystum*. Khả năng bắt gốc tự do DPPH tương ứng là 61,642% và 62,766% so với vitamin C ở cùng nồng độ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.M. O'Sullivan, Y.C. O'Callaghan, M.N. O'Grady, B. Queguineur, D. Hanniffy, D.J. Troy, J.P. Kerry, N.M. O'Brien (2011), "In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland", *Food Chemistry*, **126**(3), pp.1064-1070.

[2] S. Meenakshi, S. Umayaparthi, M. Arumugam, T. Balasubramanian (2011), "In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1**(1), pp.S66-S70.

[3] G.K. Devi, K. Manivannan, G. Thirumaran, F.A.A. Rajathi, P. Anantharaman (2011), "In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **4**(3), pp.205-211.

[4] S. Gupta, N. Abu-Ghannam (2011), "Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds", *Trends in Food Science & Technology*, **22**(6), pp.315-326.

[5] K. Se-Kwon (2012), *Handbook of Marine Macroalgae - Biotechnology and Applied Phycology*, A John Wiley & Sons, Ltd.

[6] P. Fradinho, A. Raymundo, I. Sousa, H. Dominguez, M.D. Torres (2019), "Edible Brown Seaweed in Gluten-Free Pasta: Technological and Nutritional Evaluation", *Foods (Basel, Switzerland)*, **8**(12), pp.1-18.

[7] Y. Li, X. Fu, D. Duan, X. Liu, J. Xu, X. Gao (2017), "Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell", *Marine Drugs*, **15**(2), pp.1-15.

[8] S. Lim, A.-H. Choi, M. Kwon, E.-J. Joung, T. Shin, S.-G. Lee, N.-G. Kim, H.-R. Kim (2019), "Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components", *Food Chemistry*, **278**, pp.178-184.

[9] T.S. Awad, H.A. Moharram, O.E. Shaltout, D. Asker, M.M. Youssef (2012), "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review", *Food Research International*, **48**(2), pp.410-427.

[10] S.J. Heo, E.J. Park, K.W. Lee, Y.J. Jeon (2005), "Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds", *Bioresour. Technology*, **96**(14), pp.1613-1623.

[11] D. Rodrigues, S. Sousa, A. Silva, M. Amorim, L. Pereira, T.A. Rocha-Santos, A.M. Gomes, A.C. Duarte, A.C. Freitas (2015), "Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(12), pp.3177-3188.

[12] W.A. Wijesinghe, Y.J. Jeon (2012), "Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: a useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: a review", *Fitoterapia*, **83**(1), pp.6-12.

[13] S. Farvin, S. Alagarsamy, Z. Sattari, S. Alhaddad, S. Fakhraldeen, A. Alghunaim, F. al-Yamani (2019), "Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from brown seaweeds and characterization", *Journal of Applied Phycology*, **63**(12), pp.3177-3188.

[14] H.Y. Luo, B. Wang, C.G. Yu, Y.I. Qu, C.I. Su (2010), "Evaluation of antioxidant activities of five selected brown seaweeds from China", *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(18), pp.2557-2565.

[15] P.A. Hwang, C.H. Wu, S.Y. Gau, S.Y. Chien, D.F. Hwang (2010), "Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*", *Journal of Marine Science and Technology*, **18**(1), pp.41-46.

Phân lập một số hợp chất từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây Dây lửa ít gân (*Rourea oligophlebia* Merr.)

Đinh Ngọc Thúc^{1*}, Lê Nguyễn Thành²

¹Trường Đại học Hồng Đức

²Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 15/11/2019; ngày chuyển phản biện 19/11/2019; ngày nhận phản biện 20/12/2019; ngày chấp nhận đăng 6/1/2020

Tóm tắt:

Cây Dây lửa ít gân có tên khoa học là *Rourea oligophlebia* Merr. thuộc họ Dây trường điều (*Connaraceae*). Theo y học cổ truyền, loài *Rourea oligophlebia* có hoạt tính kháng sinh và được sử dụng để điều trị các trường hợp chảy máu, gãy xương. Cây còn được sử dụng để tăng cường sinh lý. Trong nghiên cứu này, từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây đã phân tách và xác định cấu trúc ba hợp chất là β -sitostenone (1), sitoindoside I (2) và bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (3). Các hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài Dây lửa ít gân cũng như chi *Rourea*.

Từ khóa: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate, phân lập, *Rourea oligophlebia*, sitoindoside I, β -sitostenone.

Chỉ số phân loại: 2.4

Mở đầu

Chi Dây khế *Rourea* thuộc họ Dây trường điều (*Connaraceae*) bao gồm khoảng 100 loài, phân bố ở châu Á và Nam Mỹ như Trung Quốc, Ấn Độ, Myanmar, Thái Lan, Lào, Campuchia, Việt Nam, Braxin, Panama. Các loài thuộc chi *Rourea* được sử dụng làm thuốc chữa thấp khớp, bệnh chagas, sốt rét. Các nghiên cứu về các loài thuộc chi *Rourea* cho thấy, thành phần hóa học có chứa đa dạng các hợp chất như flavonoid, triterpen, coumarin, quinon. Dịch chiết và các hợp chất phân lập thể hiện một số hoạt tính sinh học đáng quan tâm như kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, chống tiểu đường và chống sốt rét.

Tại Việt Nam, đã tìm thấy 7 loài thuộc chi *Rourea* phân bố tại các vùng rừng núi của các tỉnh Tuyên Quang, Thái Nguyên, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Trị, Đồng Nai, Kiên Giang [1, 2]. Trong đó, loài Dây lửa ít gân (còn được gọi là Mú tùm) có tên khoa học là *Rourea oligophlebia* Merr., là dạng dây leo thân gỗ, mới chỉ tìm thấy tại Việt Nam và Malaysia [3]. Theo y học cổ truyền, loài *Rourea oligophlebia* có hoạt tính kháng sinh và được sử dụng để điều trị các trường hợp chảy máu, gãy xương. Gần đây, loài này còn được ngâm rượu uống để tăng cường sinh lý. Tại Nghệ An, đã có dự án nghiên cứu về bảo tồn và phát triển loài cây này nhằm hướng đến mục tiêu cung cấp nguồn dược liệu cho sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng [4, 5]. Tuy nhiên có ít công bố về thành phần hóa học của loài này [6-8]. Nghiên cứu của Đỗ Ngọc Đài và cs về thành phần hóa học tinh dầu cây *Rourea oligophlebia* thu hái ở Nghệ An cho thấy, hàm lượng tinh dầu thu được từ lá và rễ cây này tương

ứng là 0,07 và 0,05% về khối lượng. Trong lá có 41 cấu tử thành phần, chiếm 90,8% tổng thành phần của tinh dầu với các chất chính là nerolidol (45,2%), spathulenol (10,3%), myrcene (7,05%) và neral (6,6%). Trong rễ có 30 cấu tử thành phần trong tinh dầu rễ, chiếm 91,7% tổng thành phần tinh dầu với các chất chính là nerolidol (22,7%), myrcene (15,9%), spathulenol (12,7%) [9]. Một công bố gần đây của chúng tôi nghiên cứu về thành phần hóa học của các chất không bay hơi từ lá của cây này đã xác định được các hợp chất là phytol, 3 β -hydroxystigmast-5-en-7-on, 3 β ,16 α ,17-trihydroxy-ent-kauran [10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo phân lập 3 hợp chất là β -sitostenone (1), sitoindoside I (2) và bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (3) từ dịch chiết ethyl acetate của lá cây. Các hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài này cũng như chi *Rourea*.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu thực vật được lấy nguyên cành lá tại Vườn quốc gia Bến En, huyện Như Thanh, tỉnh Thanh Hóa vào tháng 10/2018 và được TS Đỗ Ngọc Đài (Trường Đại học Kinh tế Nghệ An) giám định tên khoa học là *Rourea oligophlebia* Merr., họ Dây trường điều (*Connariaceae*). Mẫu tiêu bản (MT-201) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hóa chất, dung môi, máy móc, trang thiết bị

Dung môi, hóa chất dùng để chiết xuất và phân lập gồm n-hexan, ethyl acetat, methanol, dicloromethan đạt tiêu

*Tác giả liên hệ: Email: dinhngocthuc@hdu.edu.vn

Isolation of some compounds from ethyl acetate extract of leaves of *Rourea oligophlebia* Merr.

Ngoc Thuc Dinh^{1*}, Nguyen Thanh Le²

¹Hong Duc University

²Institute of Marine Biochemistry,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 15 November 2019; accepted 6 January 2020

Abstract:

Rourea oligophlebia is a species which belongs to the family of Connaraceae. According to the traditional medicine, *Rourea oligophlebia* species has antibiotic activity and has been used for treatment of bleeding and fractures. This plant has also been used to enhance physiology. In this study, from the ethyl acetate extract of the leaves of *Rourea oligophlebia*, three compounds have been isolated and structurally elucidated as β -sitostenone (1), sitoindoside I (2) and bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (3). These compounds have been isolated from *Rourea oligophlebia* species as well as *Rourea* genus for the first time.

Keywords: bis-(2-ethylhexyl) terephthalate, isolation, *Rourea oligophlebia*, sitoindoside I, β -sitostenone.

Classification number: 2.4

chuẩn thí nghiệm. Sắc ký cột thường được thực hiện trên silica gel (Merck) cỡ hạt 40-63 μ m hay Sephadex LH-20. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (Merck 60 F₂₅₄), hiện màu bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 nm hay thuốc thử Ce-Mo.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT) được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz (Viện Hóa học) với dung môi đo phổ CDCl₃ hãng Sigma-Aldrich. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS Agilent 1260, sử dụng phương pháp phun mù điện tử. Nhiệt độ nóng chảy và góc quay cực được đo trên máy MELT-TEMP 3.0. (Viện Hóa sinh biển).

Kết quả và thảo luận

Thực nghiệm và kết quả

Lá cây Dây lữa ít gân được phơi khô dưới bóng râm, sau đó xay nhỏ. Lá khô (0,7 kg) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ (6 lít $\times$ 3 lần). Dịch chiết được gộp lại và cô dưới áp suất giảm thu được 20 g cặn MeOH. Hòa cặn MeOH với 1 lít nước cất, chiết phân bố với dung môi ethyl acetat. Dịch chiết sau khi loại bỏ dung môi thu được 18 g cặn ethyl acetat.

Cặn ethyl acetat (18 g) được phân tách trên cột silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi *n*-hexan/acetone (0-100% acetone). Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng, gộp các ống có cùng thành phần và cất loại dung môi để thu được 12 phân đoạn (T1-T12).

Phân đoạn T4 (1,3 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/acetone (9/1) thu được 3 phân đoạn (T4.1-T4.3). Phân đoạn T4.3 (15 mg) được tinh chế qua sắc ký silica gel điều chế với hệ dung môi *n*-hexan/dichloromethan (8/2) thu được hợp chất (1) (4 mg).

Phân đoạn T9 (0,7 g) được tinh chế qua cột chế trên cột Sephadex, rửa giải với hệ dung môi dichloromethan/methanol (1/9) thu được 2 phân đoạn T9.1 và LMT9.2. Phân đoạn T9.1 (0,51 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/acetone (7/3) thu được hợp chất (2) (12 mg).

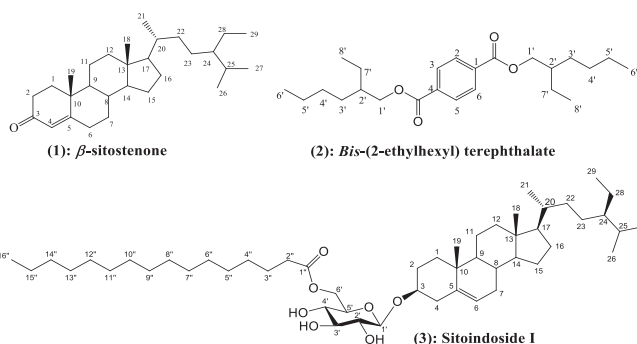
Phân đoạn T10 (0,9 g) được tinh chế qua cột trên cột Sephadex, rửa giải với hệ dung môi dichloromethan/methanol (1/9) thu được hợp chất (3) (10 mg).

β -sitostenone (1): chất rắn, màu trắng; ESI-MS *m/z*: 413 [M+H]⁺. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5,71 (1H, s, H-4); 1,17 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, *J*=6,5 Hz, H-21); 0,84 (3H, t, *J*=7,5 Hz, H-29); 0,83 (3H, d, *J*=7,0 Hz, H-27); 0,81 (3H, d, *J*=7,0 Hz, H-26); 0,70 (3H, s, H-18). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 199,6 (C-3); 171,6 (C-5); 123,7 (C-4); 56,0 (C-14); 55,9 (C-17); 53,8 (C-9); 45,8 (C-24); 42,4

(C-13); 39,6 (C-12); 38,6 (C-10); 36,1 (C-20); 35,7 (C-1); 35,6 (C-8); 33,9 (C-2); 33,9 (C-22); 32,9 (C-6); 32,0 (C-7); 29,1 (C-25); 28,1 (C-16); 26,1 (C-23); 24,1 (C-15); 23,0 (C-28); 21,0 (C-11); 19,8 (C-26); 19,0 (C-27); 18,7 (C-21); 17,3 (C-19); 11,9 (C-29); 11,9 (C-18).

Bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (2): chất dầu màu trắng, ESI-MS m/z : 391 $[M+H]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H (ppm) 8,09 (4H, s, H-2, 3, 5, 6), 4,26 (4H, m, 2 x H-1'), 1,73 (2H, septet, $J=5,0$ Hz, 2 x H-2'), 1,48-1,26 (16H, m, 2 x H-3', 4', 5', 7'), 0,95 (t, $J=7,5$ Hz, 6H, H-8'), 0,90 (6H, t, $J=7,5$ Hz, H-6'). ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ_C (ppm) 165,9 (2 x C=O), 134,2 (C-1, C-4), 129,4 (C-2, C-3, C-5, C-6), 67,7 (2 x C-1'), 38,9 (2x C-2'), 30,5 (C-3'), 28,9 (C-4'), 24,0 (C-7'), 22,9 (C-5'), 14,0 (C-8'), 11,0 (C-6').

Sitoindoside I (3): chất rắn, màu trắng; ESI-MS m/z : 815,2 $[M+H]^+$. 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 5,37 (1H, m, H-6); 4,48 (1H, dd, $J=12,5$ Hz, 4,5 Hz, H-6'a); 4,38 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-1'); 4,28 (1H, br, d, $J=12,5$ Hz, H-6'b); 3,4-3,6 (5H, m, H-3, 2', 3', 4', 5'); 1,01 (3H, s, Me-19); 0,92 (3H, d, $J=6,5$ Hz, Me-21); 0,88 (3H, t, $J=7,0$ Hz, Me-16''); 0,85 (3H, t, $J=7,5$ Hz, Me-29). 0,84 (3H, d, $J=6,5$ Hz, Me-27). 0,82 (3H, d, $J=6,5$ Hz, Me-26). 0,68 (3H, s, Me-18). ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ : 174,7 (C-1''); 140,3 (C-5); 122,2 (C-6); 101,2 (C-1'); 79,6 (C-3); 76,0 (C-3'); 74,0 (C-5'); 73,6 (C-2'); 70,1 (C-4'); 63,2 (C-6'); 56,8 (C-14); 56,1 (C-17); 50,2 (C-9); 45,9 (C-24); 42,3 (C-13); 39,8 (C-12); 38,9 (C-4); 37,3 (C-1); 36,7 (C-10); 36,2 (C-20); 34,2 (C-2''); 34,0 (C-22); 31,9 (C-7, 8, 14''); 29,2-29,7 (C-2, 4-13''); 28,3 (C-16); 26,1 (C-23); 25,0 (C-3''); 24,3 (C-15); 23,1 (C-28); 22,7 (C-15''); 21,1 (C-11); 19,8 (C-27); 19,4 (C-19); 19,0 (C-26); 18,8 (C-21); 14,1 (C-16''); 12,0 (C-29); 11,9 (C-18).



Cấu trúc của các hợp chất phân lập từ lá cây Dây lười ít gân.

Cấu trúc của các hợp chất phân lập từ lá cây Dây lười ít gân.

Bàn luận

β -sitostenone (1)

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất **1** xuất hiện pic ion phân

từ proton hóa ở m/z 413 $[M+H]^+$, tương ứng với công thức phân tử $C_{29}H_{48}O$ có khối lượng phân tử là 412.

Phổ 1H -NMR có các tín hiệu đặc trưng của hợp chất sterol với tín hiệu của 6 nhóm methyl ở các vị trí δ_H 1,17 (3H, s, H-19); 0,91 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-21); 0,84 (3H, t, $J=7,5$ Hz, H-29); 0,83 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-27); 0,81 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-26); 0,70 (3H, s, H-18). Ngoài ra, còn có tín hiệu proton của 1 nối đôi tại δ_H 5,81 (1H, s, H-4).

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho thấy tín hiệu của 29 carbon trong đó có 6 tín hiệu nhóm CH_3 , 11 tín hiệu nhóm CH_2 , 8 tín hiệu nhóm CH (trong đó tín hiệu $\underline{CH}=C$ ở vị trí 123,7 (C-4)), 4 tín hiệu C bậc 4 trong đó có 1 nhóm carboxyl $C=O$ ở vị trí 199,6 (C-3).

Từ các dữ liệu phổ khối và phổ NMR đã phân tích ở trên, đồng thời so sánh với nghiên cứu của Qiu-Yue Wang và cs [11] nhận thấy hợp chất **1** là hợp chất β -sitostenone. Các kết quả thu được hoàn toàn tương đồng với tài liệu tham khảo [11].

Bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (2)

Hợp chất **2** thu được dưới dạng chất dầu màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất **2** xuất hiện pic ion phân tử proton hóa ở m/z 391 $[M+H]^+$, tương ứng với công thức phân tử $C_{24}H_{38}O_4$ có khối lượng phân tử là 390. Kết hợp với phổ NMR gợi ý cho hợp chất với cấu trúc đối xứng.

Trên phổ 1H -NMR xuất hiện 1 tín hiệu ở vùng thơm tại δ_H 8,09 (4H, s), tín hiệu nhóm chức methylene ester tại 4,26 (4H, m, 2 x H-1'), còn lại là tín hiệu của mạch nhánh 1,73 (2H, septet, $J=5,0$ Hz, 2 x H-2'), 1,48-1,26 (16H, m, H-3', 4', 5', 7'), 0,95 (t, $J=7,5$ Hz, 6H, H-8'), 0,90 (6H, t, $J=7,5$ Hz, H-6').

Phổ ^{13}C cho tín hiệu của 11 carbon trong đó có nhóm carbonyl tại 165,9 (2 x C=O), 2 tín hiệu C vùng thơm là 134,2 (C-1, C-4), 129,4 (C-2, C-3, C-5, C-6), tín hiệu nhóm methylene oxy tại 67,7 (C-1'), còn lại là tín hiệu 2-ethylhexyl tại 38,9 (C-2'), 30,5 (C-3'), 28,9 (C-4'), 24,0 (C-7'), 22,9 (C-5'), 14,0 (C-8'), 11,0 (C-6').

Từ phổ khối và phổ NMR đã phân tích ở trên cho phép xác định hợp chất **2** là dẫn chất bis-(2-ethylhexyl) terephthalate. Hợp chất này được báo cáo phân lập từ cây *Melodinus fusiformis*. Kết hợp so sánh với các nghiên cứu của Wang và cs, Firdovsi và cs đã công bố có thể kết luận hợp chất **2** là bis-(2-ethylhexyl) terephthalate [12, 13].

Sitoindoside I (3)

Hợp chất **3** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS của hợp chất **2** xuất hiện pic ion phân tử proton hóa ở m/z 815,2 $[M+H]^+$, tương ứng với công thức phân tử $C_{51}H_{90}O_7$ có khối lượng phân tử là 814.

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện các tín hiệu đặc trưng cho hợp chất sterol glucoside este. Các tín hiệu của khung sterol được quan sát thấy với một nối đôi ở vị trí δ_{H} 5,37 (1H, m, H-6); có một nhóm CH-O ở vị trí δ_{H} 3,4-3,6 (1H, m, H-3) và 6 nhóm methyl trong đó có 2 singlet tại δ_{H} 0,68 (3H, s) và 1,01 (3H, s); 3 tín hiệu doublet tại δ 0,92 (3H, d, $J=6,5$ Hz); 0,84 (3H, d, $J=6,5$ Hz); 0,82 (3H, d, $J=6,5$ Hz) và một tín hiệu triplet tại δ 0,85 (3H, t, $J=7,5$ Hz). Tín hiệu của phân tử đường glucose được phát hiện bởi 4 nhóm CHOH ở vị trí δ_{H} 3,4-3,6 (4H, m). Tín hiệu nhóm CH_2O tại δ_{H} 4,48 (1H, dd, $J=12,5$ Hz, 4,5 Hz, H-6'a); 4,28 (1H, br, d, $J=12,5$ Hz, H-6'b); và đặc biệt là tín hiệu proton anome của đường ở vị trí δ_{H} 4,38 (1H, d, $J=7,5$ Hz). Tín hiệu của một acid béo được phát hiện dựa trên tín hiệu nhóm CH_2 tại δ_{H} 2,35 (2H, t, $J=7,0$ Hz). nhóm methyl CH_3 cuối mạch dài ở vị trí δ_{H} 0,88 (3H, t, $J=7,0$ Hz) và tín hiệu nhóm CH_2 mạch dài ở δ_{H} 1,25 (m).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cũng cho các tín hiệu đặc trưng của hợp chất sterol glucoside este. Các tín hiệu của nhân sterol gồm 6 nhóm methyl tại δ_{C} 19,8 (C-27); 19,4 (C-19); 19,0 (C-26); 18,8 (C-21); 12,0 (C-29); 11,9 (C-18); nhóm CH-O tại δ_{C} 79,6 (C-3) và tín hiệu của 1 nối đôi $\text{CH}=\text{C}$ tại δ_{C} 140,3 (C-5); 122,2 (C-6). Tín hiệu của nhóm đường trong phân tử được phát hiện dựa trên tín hiệu C anomer tại δ_{C} 101,2 (C-1') cùng với 5 tín hiệu khác của các nhóm $\text{CH}_2\text{-O-}$ và CHOH tại δ_{C} 76,0 (C-3'); 74,0 (C-5'); 73,6 (C-2'); 70,1 (C-4'); 63,2 (C-6'). Nhóm chức este được phát hiện bằng tín hiệu nhóm $\text{C}=\text{O}$ tại δ_{C} 174,7 (C-1"). Các tín hiệu khác của acid béo mạch dài gồm tín hiệu tại δ_{C} 34,2 (C-2"); tín hiệu mạch bão hòa CH_2 tại 29,2 đến 29,7 (C-2, 4-13") và 1 nhóm methyl tại δ_{C} 14,1 (C-16").

Từ phổ khối và phổ NMR đã phân tích ở trên cho phép xác định hợp chất **3** là một dẫn chất sterol glucoside este với acid béo bão hòa mạch dài. Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo có thể kết luận hợp chất **3** là sitoindoside I [14].

Kết luận

Từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây Dây lữa ít gân đã phân lập và xác định được cấu trúc của 3 hợp chất bao gồm β -sitostenone (**1**), bis-(2-ethylhexyl) terephthalate (**2**) và sitoindoside I (**3**). Những hợp chất này lần đầu được phân lập từ loài Dây lữa ít gân. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các chất sẽ được công bố trong thời gian tới.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 104.01-2018.08.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Tiến Bản (2003), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [2] Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ TP Hồ Chí Minh, **Quyển 1**, tr.758-760.
- [3] R. van Crevel (1958), *Flora Malesiana*, National Parks Board Singapore.
- [4] Phạm Hồng Ban, Đỗ Ngọc Đài (2015a), "Dẫn liệu về cây Mú tùm", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nghệ An*, **7**, tr.31.
- [5] Phạm Hồng Ban, Đỗ Ngọc Đài (2015b), "Kết quả bước đầu xây dựng mô hình bảo tồn cây thuốc Mú tùm tại xã Mường Nọc, huyện Quế Phong", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nghệ An*, **9**, tr.7.
- [6] M. Kalegari, et al. (2014), "Chemical composition and antinociceptive effect of aqueous extract from *Rourea induta* Planch. leaves in acute and chronic pain models", *Journal of Ethnopharmacology*, **153**(3), pp.801-809.
- [7] M.M. Laikowski, et al. (2017), "*Rourea cuspidata*: chemical composition and hypoglycemic activity", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **7**(8), pp.712-718.
- [8] Z.D. He, et al. (2006), "Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*", *Phytochemistry*, **67**(13), pp.1378-1384.
- [9] Đỗ Ngọc Đài, Tăng Văn Tân, Phạm Hồng Ban, Trần Đình Thắng (2013), *Thành phần hóa học tinh dầu loài Dây lữa ít gân (*Rourea oligophlebia* Merr.) họ Dây khế ở Nghệ An*, Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6.
- [10] Đinh Ngọc Thúc, Đỗ Văn Dục, Lê Nguyễn Thành (2018), "Một số hợp chất phân lập từ lá cây Dây lữa ít gân (*Rourea oligophlebia* Merr.)", *Tạp chí Dược học*, **520**(59), tr.33-36.
- [11] Qiu-Yue Wang, Guang-Xin Cui, Ji-Chun Wu, Ye-Gao Chen (2015), "Steroid from *Trigonostemon heterophyllus*", *Chemistry of Natural Compounds*, **51**(6), pp.1196-1198.
- [12] Wang Dingwei, Luo Xiaodong, Jiang Bei (2012), "Chemical constituents in twigs and leaves of *Melodinus fusiformis*", *Zhongcaoyao*, **43**(4), pp.653-657.
- [13] S.T. Firdovsi, M. Yagoub, A.E. Parvin (2007), "Transesterification reaction of dimethyl terephthalate by 2-Ethylhexanol in the presence of heterogeneous catalysts under solvent-free condition", *Chinese Journal of Chemistry*, **25**(2), pp.246-249.
- [14] Chuan-Rui Zhang, Saleh A. Aldosari, Polana S.P.V. Vidyasagar, Karun M. Nair, Muraleedharan G. Nair (2013), "Antioxidant and anti-inflammatory assays confirm bioactive compounds in Ajwa date fruit", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(24), pp.5834-5840.

Tổng hợp và khảo sát tính chất điện hóa của vật liệu điện cực dương $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ sử dụng cho pin Na-ion

Nguyễn Thị Kiều Duyên¹, Lê Phạm Phương Nam¹, Châu Hồng Diễm¹, Huỳnh Lê Thanh Nguyên¹,
Nguyễn Thị Thu Trang², Lê Mỹ Loan Phụng^{1*}, Trần Văn Mẫn¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 9/9/2019; ngày chuyển phản biện 12/9/2019; ngày nhận phản biện 14/10/2019; ngày chấp nhận đăng 18/10/2019

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, vật liệu điện cực dương $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ (NaFMO) được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa trong môi trường khí trơ. Pha $\text{O3-Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ thu được sau khi nung hỗn hợp kết tủa và NaOH ở 900°C trong các khoảng thời gian 12, 15, 24 và 36 giờ. Trong đó, mẫu nung trong thời gian 12 giờ thể hiện đặc tính tốt nhất để làm vật liệu điện cực, bao gồm kích thước ô mạng lớn ($a=b=2,9738 \text{ \AA}$, $c=16,3815 \text{ \AA}$, $V=125,46 \text{ \AA}^3$) và dung lượng riêng cao lên đến 118 mAh/g trong vùng thế 1,5-4 V (vs. Na^+/Na) ở tốc độ C/10. Dung lượng này của vật liệu NaFMO do sự đóng góp đồng thời của hai cặp oxy hóa khử $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$ và $\text{Fe}^{4+}/\text{Fe}^{3+}$. Tuy nhiên sự thể hiện quá thế phóng sạc lớn (~ 500 mV) cho thấy vật liệu có điện trở nội lớn.

Từ khóa: cấu trúc, $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$, pin sạc Na-ion, tính chất điện hóa.

Chỉ số phân loại: 2.5

Tổng quan

Hiện nay, việc nghiên cứu tìm kiếm các nguồn năng lượng xanh và bền vững thay thế cho nhiên liệu hóa thạch đang nhận được rất nhiều sự quan tâm. Với sự chú trọng phát triển công nghệ “xanh”, pin Li-ion đã được sử dụng trong các thiết bị có kích thước lớn như xe điện (EV), lưới điện thông minh (smart-grid)... [1, 2]. Tuy nhiên, trữ lượng lithi trong vỏ trái đất khá thấp, chi phí sản xuất cao đã làm hạn chế khả năng ứng dụng của pin Li-ion. Do đó, pin Na-ion đang được đẩy mạnh nghiên cứu trong thời gian gần đây vì natri có nhiều tính chất tương tự như lithi, nhưng nguồn trữ lượng lớn, khai thác dễ dàng, chi phí thấp hơn so với lithi [3, 4].

Các oxit kim loại chuyển tiếp cấu trúc lớp dạng NaMO_2 ($M =$ kim loại chuyển tiếp) được xem là vật liệu điện cực dương tiềm năng cho pin Na-ion nhờ vào dung lượng lý thuyết cao cùng khả năng ứng dụng các kim loại chuyển tiếp giá thành rẻ [5].

Trong các cấu trúc lớp dạng NaMO_2 , vật liệu Na_xMnO_2 thường được quan tâm nghiên cứu do có dung lượng ban đầu lớn, chu kỳ sạc/phóng dài, vùng thế hoạt động khá rộng và độ phân cực thấp, tuy nhiên lại có một số hạn chế như ion Mn^{2+} (gây ra bởi sự tự oxy hóa khử của Mn^{3+} thành Mn^{4+} và Mn^{2+}) có khả năng hòa tan trong dung dịch điện giải, dung lượng giảm nhanh do thay đổi cấu trúc gây ra bởi biến dạng

Jahn-Teller đối với ion Mn^{3+} [6]. Như vậy, để khắc phục, một phần Mn^{3+} cần được thay thế bằng kim loại chuyển tiếp khác, khi đó vật liệu sẽ có dạng $\text{Na}_x\text{M}_y\text{Mn}_{1-y}\text{O}_2$, nồng độ Mn^{3+} trong vật liệu pha tạp lúc này sẽ giảm đi so với vật liệu không pha tạp nhưng vẫn đảm bảo tính trung hòa về điện tích, tức là đã giảm được hiệu ứng Jahn-Teller.

Vật liệu Na_xFeO_2 có ưu điểm nổi bật là độ bền cấu trúc ổn định, cấu trúc tinh thể không thay đổi trong quá trình phóng và sạc. Công suất lý thuyết của Na_xFeO_2 đạt tới 241,8 mAh/g trong điều kiện phản ứng oxy hóa khử $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$ không phá hủy mạng tinh thể [7]. Hơn nữa, sắt là nguồn nguyên liệu rẻ, dồi dào và thân thiện với môi trường, vật liệu điện cực dựa trên sắt là ứng cử viên đầy triển vọng cho các ứng dụng pin Na-ion. Tuy nhiên, khi hàm lượng natri thấp, xảy ra sự di chuyển Fe vào các vị trí tứ diện có chung mặt với bát diện FeO_6 [4]. Cấu trúc này có thể được ổn định bằng cách thay thế một phần Fe bởi Mn [8]. Vật liệu oxit dạng $\text{Na}_x\text{Fe}_y\text{Mn}_{1-y}\text{O}_2$, với nhiều tính chất kết hợp các ưu điểm về cấu trúc và tính chất điện hóa của Na_xFeO_2 và Na_xMnO_2 , có thể đạt được dung lượng lên tới 110 đến 220 mAh/g [8-10]. Năm 2012, Naoaki Yabuuchi cùng các cộng sự đã nghiên cứu và tổng hợp thành công vật liệu điện cực dương là $\text{P2-Na}_{2/3}\text{Fe}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}\text{O}_2$ ở 900°C trong 12 giờ và bằng phản ứng nung pha rắn trong môi trường không khí, sau đó vật liệu được lưu trữ trong glove box, kết quả cho thấy $\text{P2-Na}_{2/3}\text{Fe}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}\text{O}_2$ có cấu trúc giống với $\text{P2-Na}_x\text{CoO}_2$, quá

*Tác giả liên hệ: Email: lmlphung@hcmus.edu.vn

Synthesis and electrochemical characterisation of anode material $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ for Na-ion batteries

Thi Kieu Duyen Nguyen¹, Pham Phuong Nam Le¹,
Hong Diem Chau¹, Le Thanh Nguyen Huynh¹,

Thi Thu Trang Nguyen², My Loan Phung Le^{3*}, Van Man Tran¹

¹Applied Physical Chemistry, VNUHCM-University of Science

³Ho Chi Minh City University of Education

Received 9 September 2019; accepted 18 October 2019

Abstract:

In this research, the anode material $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ (NaFMO) has been successfully prepared by the co-precipitation method in an inert atmosphere. $\text{O3-Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ phase was formed after calcination of the precipitation at 900°C for 12, 15, 24, and 36 hours. After calcination for 12 hours, the obtained material had the best characteristics, with large lattice parameters ($a=b=2.9738$ Å, $c=16.3815$ Å and $V=125.46$ Å³) and a specific capacity up to 118 mAh/g in the voltage range of 1.5-4 V (vs. Na^+/Na) at the current rate C/10. The specific capacity of the $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ material was due to the contribution of both redox pairs $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$ and $\text{Fe}^{4+}/\text{Fe}^{3+}$. In addition, the charge-discharge curves shown a large drop of ~ 500 mV, which indicated a large internal resistance of the material.

Keywords: electrochemical properties, $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$, sodium-ion battery, structure.

Classification number: 2.5

trình đơn cải thiện nghịch tốt và dung lượng đạt được là 190 mAh/g trong vùng thế 1,5-4,2 V (vs Na^+/Na) [11]. Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Jiantie Xu đã tổng hợp vật liệu $\text{P2-Na}_{0.66}\text{Fe}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_2$ và đo dung lượng trong 2 vùng thế là 1,5-4,0 V và 1,5-4,3 V, kết quả đạt được là trong vùng thế 1,5-4,0 V thì dung lượng là 110 mAh/g, thấp hơn khi đo trong vùng thế 1,5-4,3 V là 158,1 mAh/g. Tuy nhiên, hiệu suất dòng trong vùng thế 1,5-4,0 V lại ổn định hơn, sau 50 chu kỳ, hiệu suất dòng là 98,2%, trong khi ở vùng thế 1,5-4,3 V thì đạt 77,2% [12]. Năm 2017, Wesley M. Dose cùng các cộng sự đã nghiên cứu vật liệu điện cực dương $\text{Na}_{2/3}\text{Fe}_{0.2}\text{Mn}_{0.8}\text{O}_2$ với dung lượng đạt 189,81 mAh/g trong vùng thế 1,5-4,2 V (vs Na^+/Na), và sau 50 chu kỳ thì hiệu suất dòng là 71,7% [13]. Cùng năm 2017, nhóm của Hilder đã tổng hợp vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ bằng phương pháp phản ứng pha rắn với dung lượng tương ứng đối với pha P2 và O3 lần lượt là 130 mAh/g và 184 mAh/g [14].

Trong nghiên cứu này, vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa trong môi trường khí trơ, sau đó là quá trình nung pha rắn. Bên cạnh đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian nung lên cấu trúc, hình thái và tính chất điện hóa của vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$.

Thực nghiệm

Tổng hợp vật liệu

Các mẫu vật liệu trong nghiên cứu này được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa với tiền chất kim loại là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ và NaOH. Dung dịch hỗn hợp muối kim loại chuyển tiếp được pha với tỷ lệ số mol Fe:Mn = 2:1 được nhỏ từ từ vào bình cầu chứa dung dịch NaOH 4 M trong môi trường N_2 . Nhiệt độ phản ứng là 50°C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút được giữ đến sau khi kết thúc thời gian phản ứng 12 giờ. Sau đó, kết tủa được lọc bằng phương pháp lọc áp suất thấp và rửa bằng nước cất nhiều lần đến khi pH của nước rửa trung tính, cuối cùng được sấy chân không ở 80°C trong 15 giờ. Đồng kết tủa $\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}(\text{OH})_2$ sau đó được trộn và nghiền mịn với Na_2CO_3 theo tỷ lệ mol (Fe+Mn):Na = 1:1,1 (10% lượng Na dư để tránh thất thoát Na trong cấu trúc do sự hóa hơi của Na trong quá trình nung). Hỗn hợp sau đó được nung ở 900°C trong lần lượt 12, 15, 24 và 36 giờ nhằm khảo sát và tối ưu hóa thời gian nung.

Khảo sát cấu trúc tinh thể, hình thái vật liệu và thành phần nguyên tố

Cấu trúc tinh thể của các mẫu vật liệu được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD), tốc độ quét 0,02°/step và 0,25s/step, góc quét $2\theta = 10-70^\circ$. Mẫu vật liệu có độ tinh thể hóa cao và dung lượng riêng cao nhất được tiến

hành khảo sát hình thái bề mặt, hình dạng và kích thước hạt bằng kính hiển vi điện tử Hitachi FE-SEM S-4800 (Nhật). Thành phần nguyên tố của mẫu tối ưu được khảo sát bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử (AAS).

Khảo sát tính chất điện hóa của vật liệu

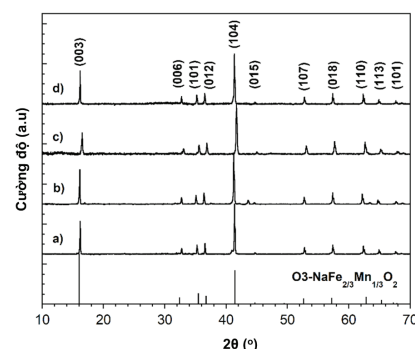
Quá trình tạo màng và ráp pin được thực hiện trong glove box nạp đầy Argon. Vật liệu sau khi nung được trộn, và nghiền kỹ với carbon C65 và chất kết dính PTFE theo tỷ lệ khối lượng 80:15:5. Hỗn hợp được cán thành màng mỏng có đường kính 10 mm, với khối lượng mỗi màng không quá 10 mg. Màng điện cực dương sau đó được ráp trong mô hình pin Swagelok, với cực âm là natri, dung dịch điện ly là NaClO_4 1 M trong dung môi PC (polyethylene carbonate) với 2% FEC (fluoroethylene carbonate) về thể tích. Pin sau khi lắp được tiến hành đo phóng sục trong vùng thế 1,5-4,0 V (so với Na^+/Na) với mật độ dòng không đổi C/10, trong đó, C là dung lượng lý thuyết của vật liệu. Các thí nghiệm phân tích tính chất điện hóa được thực hiện trên hệ máy Potentiostat MPG2 (Bio Logic) điều khiển bởi phần mềm EC-Lab 10.36.

Kết quả và thảo luận

Cấu trúc và hình thái vật liệu

Giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ (NaFMO) với thời gian nung khác nhau được thể hiện trong hình 1. Tất cả các mẫu đều có cấu trúc tương đồng với giản đồ chuẩn $\text{O3-NaFe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ (JCPDS: 00-053-0349), với cấu trúc lục phương, nhóm không gian R-3m. Các peak nhiễu xạ có cường độ nhiễu xạ lớn, chân mũi hẹp, sắc, chứng tỏ các mẫu đều có độ tinh thể hóa cao. So với giản đồ chuẩn, peak nhiễu xạ (003) của các mẫu vật liệu đều lệch về phía bên phải, chứng tỏ có sự giảm thông số mạng c, tương ứng với khoảng cách giữa các lớp $[\text{MO}_6]$. So sánh giữa các mẫu với nhau có thể thấy, peak (003) của mẫu NaFMO nung trong 24 giờ bị lệch về bên phải nhiều nhất. Điều này chứng tỏ thông số mạng c của mẫu nung trong 24 giờ bị giảm mạnh nhất, làm hạn chế khả năng đan cài ion Na^+ vào cấu trúc vật liệu.

Sự thay đổi về khoảng cách giữa các mặt mạng, mà cụ thể là mặt mạng được chọn đại diện là (104) của các mẫu NaFMO theo các khoảng thời gian nung khác nhau được thể hiện trong bảng 1. Có thể thấy khoảng cách d giảm dần khi tăng thời gian nung (từ 12, lên 15 và 24 giờ), dẫn đến khả năng đan cài ion Na^+ giảm. Riêng mẫu nung trong 36 giờ thì giá trị d tăng lên, nhưng không có sự thay đổi nhiều so với mẫu nung trong 12 giờ. Từ đây có thể dự đoán khả năng đan cài ion Na^+ và dung lượng riêng của các mẫu sẽ giảm theo thời gian nung, và riêng mẫu nung trong 36 giờ sẽ có kết quả điện hóa gần với mẫu nung trong 12 giờ.



Hình 1. Giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu NaFMO nung trong 12 giờ (a), 15 giờ (b), 24 giờ (c) và 36 giờ (d) so sánh với giản đồ chuẩn $\text{O3-NaFe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$.

Bảng 1. Khoảng cách d của mặt mạng (104) của các mẫu NaFMO theo thời gian khác nhau.

STT	Ký hiệu mẫu	$d_{(104)}$
1	NaFMO_12	2,18113 (Å)
2	NaFMO_15	2,17398 (Å)
3	NaFMO_24	2,16565 (Å)
4	NaFMO_36	2,18159 (Å)

Thông số mạng của các mẫu NaFMO tính bằng phần mềm Cel Ref được liệt kê trong bảng 2. Có thể thấy, mẫu NaFMO_12 có giá trị thông số mạng và thể tích lớn hơn mẫu NaFMO_15 và NaFMO_24, điều đó chứng tỏ mẫu NaFMO_12 có các cạnh lớn hơn, tạo không gian rộng hơn, thuận lợi cho các ion Na^+ đan cài vào cấu trúc, tuy các giá trị thông số này còn thấp hơn so với mẫu NaFMO_36 nhưng không đáng kể.

Từ các kết quả trên có thể thấy, thời gian nung tối ưu cho vật liệu NaFMO là 12 giờ. Vì vậy, mẫu NaFMO_12 được chọn để tiến hành khảo sát hình thái vật liệu và thành phần nguyên tố.

Bảng 2. Thông số mạng các mẫu NaFMO nung trong các khoảng thời gian khác nhau.

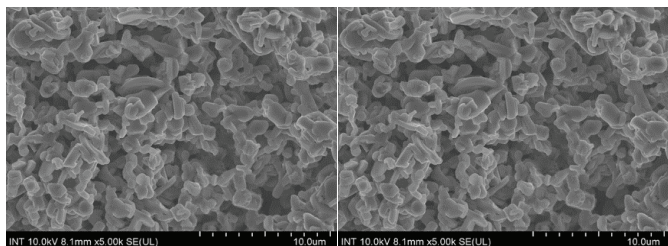
Mẫu	a=b (Å)	c (Å)	V (Å ³)
NaFMO_12	2,9738	16,3815	125,46
NaFMO_15	2,9688	16,3335	124,67
NaFMO_24	2,9589	16,2909	123,52
NaFMO_36	2,9747	16,4011	125,98

Kết quả phân tích thành phần nguyên tố Fe, Mn bằng phương pháp phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa (F-AAS) được thể hiện trong bảng 3. Tỷ lệ mol Fe:Mn của mẫu là 2,120:1,000 phù hợp với giá trị lý thuyết.

Bảng 3. Thành phần nguyên tố Fe và Mn của mẫu NaFMO_12.

Nguyên tố	Fe	Mn
Phần trăm (%)	23,80	24,71
%/M	0,426	0,449
Tỷ lệ	0,949	1,000

Hình 2 là ảnh SEM của mẫu NaFMO_12. Các hạt vật liệu có hình dạng chủ yếu là các khối đa diện, với kích thước đồng đều trong khoảng 2-3 μm . Các hạt có xu hướng kết tụ tạo thành các hạt thứ cấp có kích thước ở thang micromet.



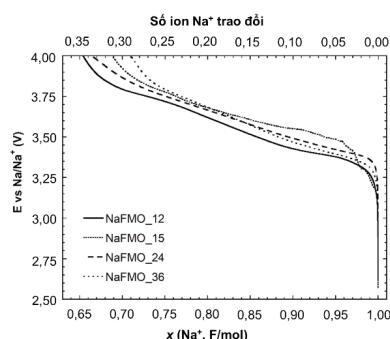
Hình 2. Ảnh SEM của mẫu NaFMO_12.

Tính chất điện hóa

Tính chất điện hóa của vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ nung trong 12 giờ được nghiên cứu bằng phương pháp phóng sắc dòng cố định trong pin mô hình Swagelok hai điện cực ở vùng thế 1,5-4 V (vs. Na^+/Na) và tốc độ phóng sắc C/10. Trong quá trình sạc, các ion Na^+ di chuyển từ cực dương $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ sang cực âm theo các phản ứng (1) và (2). Trong quá trình phóng, các ion Na^+ đan cài vào cấu trúc cực dương, các phản ứng xảy ra theo chiều ngược lại.



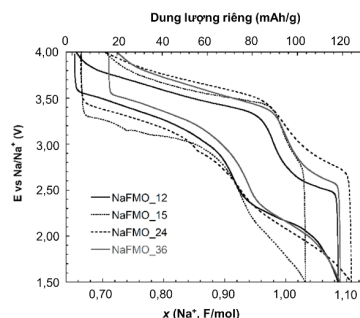
Hình 3 biểu diễn quá trình oxy hóa đầu tiên đến 4 V của các mẫu NaFMO. Trong quá trình này, số ion Na^+ di chuyển ra khỏi cấu trúc giảm theo thời gian nung và lần lượt là 0,35 (NaFMO_12), 0,33 (NaFMO_15), 0,31 (NaFMO_24) và 0,29 (NaFMO_36). Ngoài ra, đường oxy hóa đầu tiên của các mẫu NaFMO thể hiện rõ điểm uốn tại vùng thế 3,6 V tương ứng với quá trình oxy hóa Fe^{3+} thành Fe^{4+} .



Hình 3. Đường cong oxy hóa đầu tiên của các mẫu NaFMO nung trong 12, 15, 24 và 36 giờ.

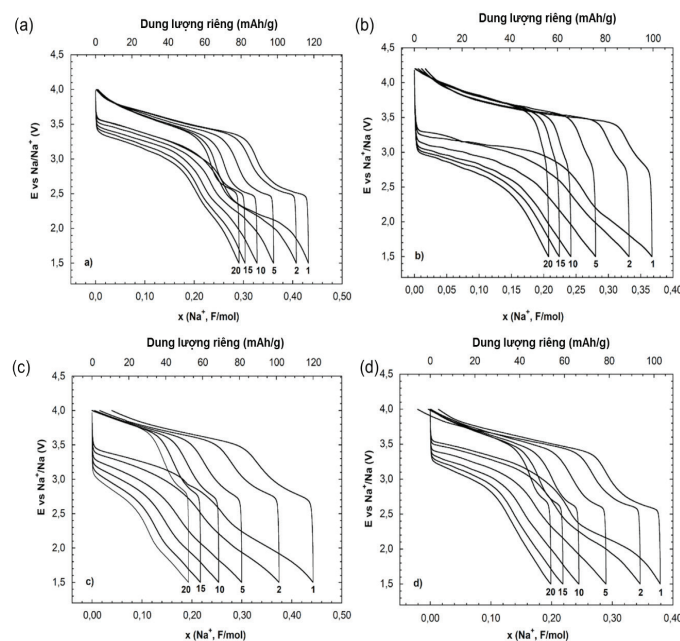
Đường cong phóng sắc trong chu kỳ đầu tiên của vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ tương ứng với các mẫu NaFMO_12, NaFMO_15, NaFMO_24 và NaFMO_36 được biểu diễn ở hình 4. Các đường cong phóng sắc đều xuất hiện điểm uốn tại thế $\sim 3,5$ V tương ứng với phản ứng oxy hóa - khử

của cặp $\text{Fe}^{4+}/\text{Fe}^{3+}$ và một điểm uốn ngắn tại vùng thế 2,3 V tương ứng phản ứng oxy hóa - khử $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$. Dung lượng riêng của vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ có được do sự đóng góp của cả hai cặp oxy hóa khử trên. Ngoài ra, các đường cong phóng sắc có độ sụt thế lớn (~ 500 mV), điều này cho thấy nội trở lớn của màng vật liệu khi tiến hành phóng sắc.



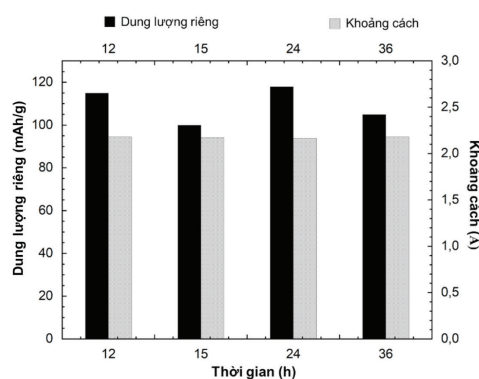
Hình 4. Đường cong phóng sắc chu kỳ thứ nhất của các mẫu NaFMO.

Sự thay đổi của đường cong phóng sắc của các mẫu NaFMO_12, NaFMO_15, NaFMO_24 và NaFMO_36 được thể hiện ở hình 5. Khả năng đan cài ion Na^+ của mẫu NaFMO_12 là khoảng 0,42 F/mol, tương ứng với dung lượng là 120 mAh/g. Mẫu M01_912 có dung lượng ổn định hơn so với các mẫu có thời gian nung dài, dung lượng đạt được 80 mAh/g sau 20 chu kỳ. Các mẫu có thời gian nung dài NaFMO_15, NaFMO_24 và NaFMO_36 có dung lượng giảm nhanh qua từng chu kỳ, dung lượng duy trì ở 60 mAh/g sau 20 chu kỳ.

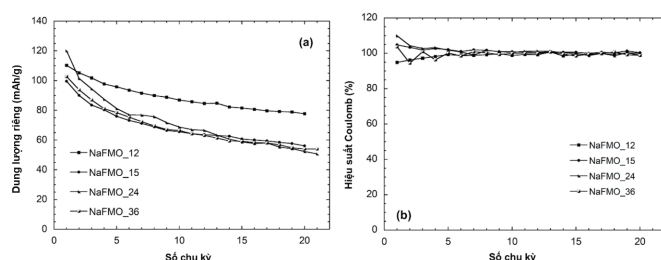


Hình 5. Đường cong phóng sắc của các mẫu NaFMO_12(a), NaFMO_15 (b), NaFMO_24 (c) và NaFMO_36 (d) trong vùng thế 1,5-4 V.

Kết quả dung lượng riêng của mẫu NaFeMO trong các thời gian nung cho thấy thời gian là 12 giờ đạt dung lượng cao nhất (118 mAh/g), điều này cũng phù hợp với các giá trị về khoảng cách d giữa các mặt mạng được thể hiện như trong hình 6. vì khoảng cách d càng lớn thì khả năng đan cài ion càng dễ dàng hơn. Bên cạnh đó, kết quả hiệu suất dòng của các mẫu cho thấy các mẫu có hiệu suất dòng khá ổn định trong 20 chu kỳ (hình 7), chứng tỏ quá trình đan cài thuận nghịch của ion Na^+ vào cấu trúc và vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ có hàm lượng của sắt cao nên không cần thời gian nung quá dài.



Hình 6. Biểu đồ thể hiện mối quan hệ giữa dung lượng riêng và khoảng cách giữa các mặt mạng của mẫu NaFeMO.



Hình 7. Biến thiên dung lượng riêng (a) và hiệu suất dòng (b) theo số chu kỳ của các mẫu NaFeMO_12, NaFeMO_15, NaFeMO_24 và NaFeMO_36.

Kết luận

Vật liệu $\text{Na}_x\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}\text{O}_2$ được tổng hợp với độ tinh khiết và độ tinh thể hóa cao với thời gian nung tối ưu là 12 giờ. Trong vùng thế là 1,5-4 V (vs. Na^+/Na), sau 20 chu kỳ với tốc độ dòng là C/10, mẫu NaFeMO_12 cho dung lượng 110 mAh/g, đạt yêu cầu cho vật liệu điện cực pin. Sau 20 chu kỳ, dung lượng pin giảm còn 73% so với ban đầu, với hiệu suất dòng đạt gần 100%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số NV2019-18-01. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Diouf, B. Pode (2015), "Potential of lithium-ion batteries in renewable energy", *Renewable Energy*, **76**, pp.375-380.
- [2] H. Rahimi-Eichi, U. Ojha, F. Baronti, M.Y. Chow (2013), "Battery management system: An overview of its application in the smart grid and electric vehicles", *IEEE Industrial Electronics Magazine*, **7**(2), pp.4-16.
- [3] H. Hou, M. Jing, Y. Yang, Y. Zhu, L. Fang, W. Song, X. Ji (2014), "Sodium/lithium storage behavior of antimony hollow nanospheres for rechargeable batteries", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**(18), pp.16189-16196.
- [4] N. Yabuuchi, K. Kubota, M. Dahbi, S. Komaba (2014), "Research development on sodium-ion batteries", *Chem. Rev.*, **114**(23), pp.11636-11682.
- [5] V. Palomares, M. Casas-Cabanas, E. Castillo-Martínez, M.H. Han, T. Rojo (2013), "Update on Na-based battery materials. A growing research path", *Energy Environ. Sci.*, **6**(8), pp.2312-2337.
- [6] W.M. Dose, N. Sharma, J.C. Pramudita, J.A. Kimpton, E. Gonzalo, M.H. Han, T. Rojo (2016), "Crystallographic evolution of $\text{P2-Na}_{2/3}\text{Fe}_{0.4}\text{Mn}_{0.6}\text{O}_2$ electrodes during electrochemical cycling", *Chem. Mater.*, **28**(17), pp.6342-6354.
- [7] N. Yabuuchi, H. Yoshida, S. Komaba (2012), "Crystal structures and electrode performance of $\alpha\text{-NaFeO}_2$ for rechargeable sodium batteries", *Electrochemistry*, **80**(10), pp.716-719.
- [8] W.M. Dose, N. Sharma, J.C. Pramudita, M. Avdeev, E. Gonzalo, T. Rojo (2018), "Rate and Composition Dependence on the Structural-Electrochemical Relationships in $\text{P2-Na}_{2/3}\text{Fe}_{1-y}\text{Mn}_y\text{O}_2$ Positive Electrodes for Sodium-Ion Batteries", *Chem. Mater.*, **30**(21), pp.7503-7510.
- [9] M.H. Han, B. Acebedo, E. Gonzalo, P.S. Fontecoba, S. Clarke, D. Saurel, T. Rojo (2015), "Synthesis and Electrochemistry Study of P2- and O3-phase $\text{Na}_{2/3}\text{Fe}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}\text{O}_2$ ", *Electrochim. Acta*, **182**, pp.1029-1036.
- [10] M. Yoncheva, R. Stoyanova, E. Zhecheva, E. Kuzmanova, M. Sendova-Vassileva, D. Nihtianova, C. Delmas (2012), "Structure and reversible lithium intercalation in a new P3-phase: $\text{Na}_{2/3}\text{Mn}_{1-y}\text{Fe}_y\text{O}_2$ ($y = 0, 1/3, 2/3$)", *J. Mater. Chem.*, **22**(44), pp.23418-23427.
- [11] Naoaki Yabuuchi, Masataka Kajiyama, Junichi Iwatate, Heisuke Nishikawa, Shuji Hitomi (2012), "P2-type $\text{Na}_x[\text{Fe}_{1/2}\text{Mn}_{1/2}]\text{O}_2$ made from earth-abundant elements for rechargeable Na batteries", *Nature Materials*, pp.513-517.
- [12] Jiantie Xu, Shu-Lei Chou (2013), "Layered $\text{P2-Na}_{0.66}\text{Fe}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_2$ Cathode Material for Rechargeable Sodium-Ion Batteries", *Chem. Electro. Chem.*, pp.1-4.
- [13] Wesley M. Dose (2017), "Structure-Electrochemical Evolution of a Mn-Rich P2 $\text{Na}_{2/3}\text{Fe}_{0.2}\text{Mn}_{0.8}\text{O}_2$ Na-Ion Battery Cathode", *Chem. Mater.*, pp.7416-7423.
- [14] M. Hilder, P.C. Howlett, D. Saurel, E. Gonzalo, M. Armand, T. Rojo, M. Forsyth (2017), "Small quaternary alkyl phosphonium bis (fluorosulfonyl) imide ionic liquid electrolytes for sodium-ion batteries with P2- and O3- $\text{Na}_{2/3}[\text{Fe}_{2/3}\text{Mn}_{1/3}]\text{O}_2$ cathode material", *J. Power Sources*, **349**, pp.45-51.

Nghiên cứu chế tạo và ứng dụng vật liệu nano Fe_3O_4 pha tạp mangan (Mn) để xử lý nước ô nhiễm As(III)

Đào Đình Thuần*, Nguyễn Văn Dũng

Khoa Môi trường, Trường Đại học Mỏ - Địa chất

Ngày nhận bài 6/12/2019; ngày chuyển phản biện 9/12/2019; ngày nhận phản biện 30/1/2020; ngày chấp nhận đăng 14/2/2020

Tóm tắt:

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu điều chế và sử dụng vật liệu nano Fe_3O_4 pha tạp Mn (Fe_3O_4 -x%Mn) để xử lý nước ô nhiễm As(III). Các hạt nano được tổng hợp bằng phương pháp hoá học và kiểm tra kích thước bằng các kỹ thuật phân tích nhiễu xạ tia X (XRD), chụp ảnh qua kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả thực nghiệm cho thấy, vật liệu có cấu trúc tinh thể dạng lập phương tâm mặt với kích thước hạt trong khoảng 8÷12 nm. Vật liệu có tính thuận từ với giá trị nhiễm từ (Ms) dao động từ 53 đến 65,8 emu/g ở nhiệt độ phòng. Khả năng hấp phụ As tốt nhất của vật liệu thể hiện trong môi trường nước có pH trung tính.

Từ khóa: chụp ảnh TEM, hấp phụ asen, kỹ thuật XRD, vật liệu nano Fe_3O_4 pha tạp Mn.

Chỉ số phân loại: 2.7

Mở đầu

Vật liệu nano từ tính Fe_3O_4 pha tạp kim loại chuyển tiếp được nghiên cứu, chế tạo do chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như lưu trữ thông tin, ngành in, nam châm từ mềm, điều trị ung thư, siêu âm từ, xử lý môi trường... [1-5]. Các hạt nano thể hiện những tính chất đặc biệt vì tỷ số giữa diện tích bề mặt và khối lượng của chúng tăng lên [1-3]. Khi tỷ số giữa diện tích bề mặt và khối lượng hạt tăng lên, các tính chất điện, từ thay đổi đáng kể do hiệu ứng lượng tử kích thước hạt. Đồng thời, các hạt có xu hướng chuyển đến các mức năng lượng tự do cực tiểu qua một số hình thái như chuyển pha, mọc mầm, thay đổi cấu trúc bề mặt [3, 4]. Đặc tính quan trọng của vật liệu nano oxit sắt từ Fe_3O_4 là không độc hại đối với môi trường và dễ tách các chất bị hấp phụ ra khỏi vật liệu. Do vậy các nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu nhằm nâng cao khả năng hấp phụ As của vật liệu nano oxit sắt từ Fe_3O_4 trong môi trường nước [5-6]. Tuy nhiên, các công bố chưa đề cập đầy đủ về ảnh hưởng của pha tạp kim loại chuyển tiếp Mn đến cấu trúc vi mô và từ tính của vật liệu nano oxit sắt từ Fe_3O_4 cũng như khả năng ứng dụng của vật liệu để xử lý As trong môi trường nước.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu cấu trúc vi mô, tính chất từ của vật liệu nano oxit sắt từ Fe_3O_4 pha tạp Mn và khảo sát khả năng hấp phụ As trong môi trường nước có độ pH khác nhau.

*Tác giả liên hệ: Email: daothuan64@gmail.com

Phương pháp thực nghiệm

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng là $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, độ sạch 99%; Na_2SO_3 độ sạch 99%; $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ độ sạch 99% (Merck), axeton độ sạch 99% (Merck). Dung dịch NH_3 25%, dung dịch As gốc pha từ As_2O_3 nồng độ 1 g/l (1g/l=10⁶ ppb, gấp 10⁵ lần hàm lượng As cho phép) trong nước sinh hoạt [7]. Dung dịch NaOH (50%, độ sạch 99%, Merck) và HCl (32%, độ sạch 99%, Merck) được pha trong nước khử ion để điều chỉnh độ pH trong nghiên cứu khả năng hấp phụ As của vật liệu.

Dụng cụ

Máy đo pH (TOA - Nhật Bản) được sử dụng để đo pH của dung dịch nước chứa As. Đặc tính tinh thể và kích thước hạt của vật liệu được nghiên cứu bằng các kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD) và chụp ảnh dưới hiển vi điện tử truyền qua (TEM) sử dụng thiết bị tương ứng là D5005 (Bruker, Đức) và thiết bị JEOL TEM 5410NV (Bruker, Đức). Phân tích XRD và TEM được tiến hành tại Phòng thí nghiệm hóa phân tích, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam.

Từ tính của vật liệu được xác định bằng từ kế mẫu rung (VSMVibrating Sample Magnetometer) trên máy MICROSENE EV11 (Nhật Bản).

Research on the manufacture and application of nano Fe_3O_4 materials doped with manganese for treatment of water contaminated with arsenic (III)

Dinh Thuan Dao*, Van Dung Nguyen

Faculty of Environment, Hanoi University of Mining and Geology

Received 6 December 2019; accepted 14 February 2020

Abstract:

This article reports results of a research on manufacture and application of nano Fe_3O_4 materials doped with Mn ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-x}\%\text{Mn}$) for the treatment of water contaminated with As(III). The nanoparticles were synthesised by chemical method and were studied their size by the XRD and TEM techniques. The experimental results showed that the materials were in crystallised form of cubic face centered structure with particles sizes ranging from 8 to 12 nm. The materials have paramagnetic properties with values of magnetisation (Ms) of 53÷65.8 emu/g at room temperature. The best arsenic adsorption property of the materials was observed in water culture with neutral PH levels.

Keywords: arsenic adsorption, nano Fe_3O_4 materials doped with Mn, TEM technique, XRD technique.

Classification number: 2.7

Nồng độ As trong dung dịch được định lượng bằng phương pháp hấp thụ nguyên tử sử dụng thiết bị AAS Shimadzu 630 của Viện Khoa học và Kỹ thuật Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam.

Thực nghiệm

Trộn dung dịch Fe^{3+} vào dung dịch Mn^{2+} sao cho có tỷ lệ pha tạp là 0, 5, 10, 15, 20 và 30%. Đổ hỗn hợp các dung dịch Fe^{3+} và Mn^{2+} với các tỷ lệ pha tạp khác nhau vào 200 ml dung dịch Na_2SO_3 rồi khuấy đều cho đến khi dung dịch chuyển sang màu vàng. Sau đó, nhỏ từ từ dung dịch NH_3 cho đến khi pH=10, khuấy đều dung dịch trong 30 phút,

thu được dung dịch màu đen. Dùng nam châm để lắng các hạt vật liệu từ. Sau đó, gạn bỏ phần dung dịch. Đem ủ vật liệu ở 50°C trong điều kiện áp suất thấp (dưới 0,1 atm) trong 2 ngày thì thu được vật liệu nano từ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Mn}$ với các hàm lượng pha tạp Mn khác nhau, ký hiệu là Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-5}\%\text{Mn}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-10}\%\text{Mn}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-15}\%\text{Mn}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-20}\%\text{Mn}$ và $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-30}\%\text{Mn}$. Cho một lượng vật liệu nhất định với các hàm lượng pha tạp Mn nêu trên vào dung dịch nước chứa As(III) có nồng độ cao gấp 10 lần so với mức cho phép đối với nước sinh hoạt rồi khuấy đều dung dịch trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các thí nghiệm trước đó cho thấy với 20 phút khuấy thì hấp phụ As lên vật liệu sẽ đạt cân bằng. Dùng nam châm để tách vật liệu khỏi dung dịch. Định lượng nồng độ As trong dung dịch sau hấp phụ để xác định khả năng hấp phụ As của vật liệu.

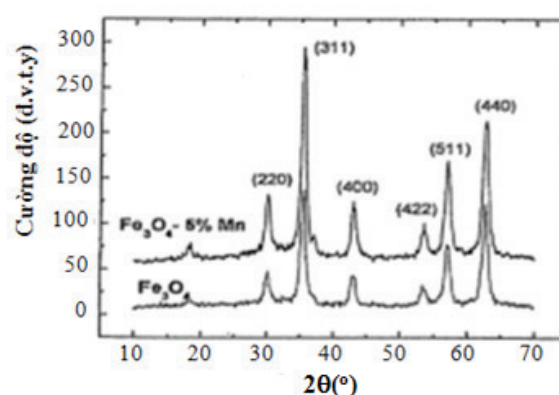
Kết quả và thảo luận

Cấu trúc vi mô của nano Fe_3O_4 pha tạp Mn

Hình 1 trình bày phổ nhiễu xạ tia X của mẫu Fe_3O_4 và $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-5}\%\text{Mn}$. Từ hình 1 nhận thấy, các đỉnh nhiễu xạ của vật liệu trùng với phổ chuẩn của mạng tinh thể NaCl thể hiện các mẫu của vật liệu là đơn pha và có cấu trúc lập phương tâm mặt. Hằng số mạng d của mẫu nano Fe_3O_4 được tính theo công thức Bragg:

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (1)$$

với θ là góc nhiễu xạ (hay còn được gọi là góc Bragg), n là số nguyên và λ là bước sóng của chùm tia X chiếu vào mẫu.



Hình 1. Phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu Fe_3O_4 và $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-5}\%\text{Mn}$ so với phổ nhiễu xạ chuẩn của mạng tinh thể NaCl có cấu trúc lập phương tâm mặt.

Giá trị hằng số mạng d xác định được là 0,8389 nm, khá tương đồng với hằng số mạng chuẩn của tinh thể NaCl là 0,8396 nm.

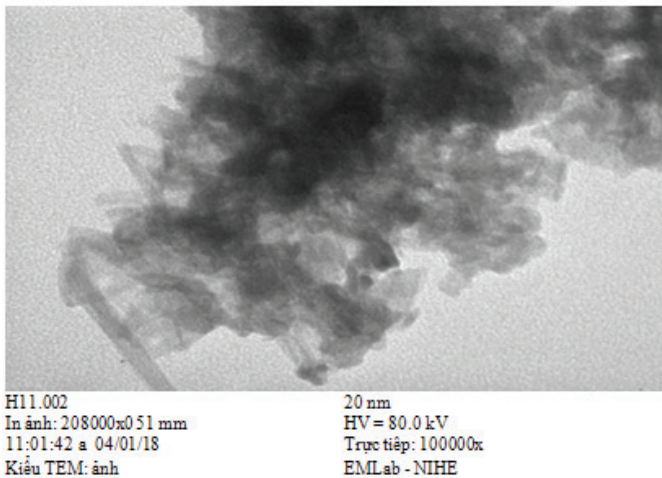
Kích thước các hạt tinh thể vật liệu được tính bằng công thức Debay - Scherrer:

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

Trong đó β là độ rộng ở độ cao một nửa của đỉnh cường độ (FWHM) chùm tia nhiễu xạ trong phép phân tích XRD, tính bằng radian. Các ký hiệu λ và θ là tương tự như trong biểu thức (1).

Kết quả thực nghiệm cho thấy, các hạt tinh thể Fe_3O_4 có kích thước $D=8,8$ nm.

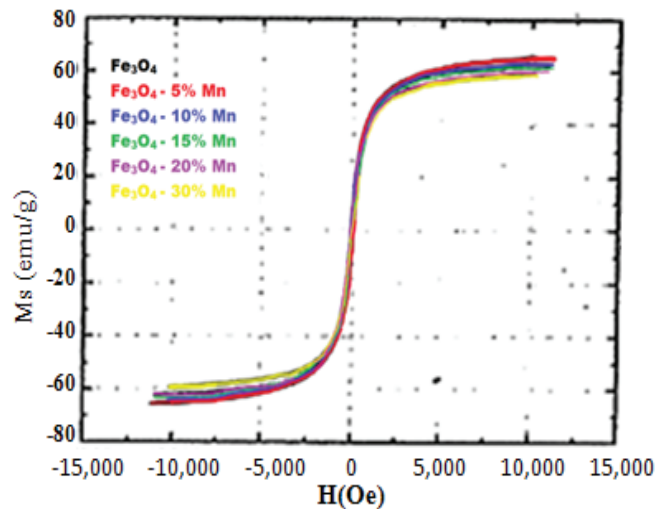
Hình 2 là ảnh TEM của mẫu Fe_3O_4 thể hiện có sự tụ đám của các hạt. Tuy nhiên, có thể thấy nhiều hạt có kích thước trong khoảng từ 8,4 đến 12,7 nm. Tương tự như mẫu Fe_3O_4 , kết quả phân tích XRD (hình 1) cho phép tính được hằng số mạng (d) của mẫu Fe_3O_4 -5%Mn là 0,8377 nm. So với hằng số mạng của tinh thể Fe_3O_4 thì giá trị d của mạng tinh thể Fe_3O_4 -5%Mn là hẹp hơn, nhưng sự khác nhau là rất nhỏ. Điều này được giải thích là do bán kính ion Mn^{2+} nhỏ hơn bán kính ion Fe^{2+} nên khi ion Mn^{2+} thế chỗ ion Fe^{2+} trong mạng đã làm cho khoảng cách giữa các mặt tinh thể thu hẹp lại.



Hình 2. Ảnh TEM của mẫu tinh thể nano Fe_3O_4 .

Tính chất từ của các mẫu

Hình 3 trình bày momen từ tính (M_s) của vật liệu nano oxit sắt từ có hàm lượng pha tạp Mn khác nhau. Từ hình 3 nhận thấy, ở nhiệt độ phòng vật liệu Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -5%Mn, Fe_3O_4 -10%Mn, Fe_3O_4 -15%Mn, Fe_3O_4 -20%Mn và Fe_3O_4 -30%Mn thể hiện tính siêu thuận từ với momen từ bão hoà đạt khoảng 65,8 emu/g. Đây là bằng chứng cho thấy Mn đã thay thế Fe trong mạng tinh thể vật liệu vì Mn có đặc tính thuận từ.



Hình 3. Momen từ (M_s) của các mẫu nano oxit sắt từ có hàm lượng pha tạp Mn khác nhau.

Giá trị momen từ bão hoà của Fe_3O_4 và Fe_3O_4 pha Mn với các hàm lượng khác nhau được trình bày trong bảng 1. Kết quả 1 cho thấy, momen từ bão hoà của vật liệu giảm khi nồng độ tạp Mn tăng, nhưng sự thăng giáng momen từ trong khoảng hàm lượng pha tạp Mn 20-30% là không đáng kể. Sự suy giảm momen từ bão hoà khi hàm lượng Mn trong vật liệu tăng được giải thích là do Mn có từ tính yếu hơn Fe nên khi Mn^{2+} thế chỗ Fe^{2+} trong mạng tinh thể sẽ làm cho từ tính của vật liệu giảm.

Bảng 1. Momen từ bão hoà (M_s) của các mẫu Fe_3O_4 và Fe_3O_4 pha tạp Mn.

Mẫu	M_s , emu/g
Fe_3O_4	65,8
Fe_3O_4 -5%Mn	65,3
Fe_3O_4 -10%Mn	62,9
Fe_3O_4 -15%Mn	61,9
Fe_3O_4 -20%Mn	59,3
Fe_3O_4 -30%Mn	59,5

Khả năng hấp phụ As của vật liệu nano Fe_3O_4 -x%Mn ($x=0, 5, 10, 15$)

Bảng 2 trình bày khả năng hấp phụ As trong nước của vật liệu nano Fe_3O_4 và Fe_3O_4 pha tạp Mn với hàm lượng khác nhau. Trong bảng 2 các cột từ số 2 đến số 5 là nồng độ As còn lại trong dung dịch sau thời gian khuấy 20 phút với những lượng (cột 1) và loại vật liệu hấp phụ khác nhau.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm khả năng hấp phụ As trong nước của vật liệu nano Fe_3O_4 -x%Mn sau thời gian hấp phụ 20 phút ở nhiệt độ phòng.

Lượng chất hấp phụ (g/l)	Nồng độ As còn lại trong dung dịch (ppb). Vật liệu: Fe_3O_4	Nồng độ As còn lại trong dung dịch (ppb). Vật liệu: Fe_3O_4 -5%Mn	Nồng độ As còn lại trong dung dịch (ppb). Vật liệu: Fe_3O_4 -10%Mn	Nồng độ As còn lại trong dung dịch (ppb). Vật liệu: Fe_3O_4 -15%Mn
0	113	113	113	113
0,6	30,3460	31,6188	27,0847	37,0277
0,8	19,0508	27,2011	21,3576	29,5506
1,0	17,1020	24,2212	22,1530	26,1700
1,2	12,0111	21,9144	16,7012	25,653
1,4	8,5510	16,9429	14,1588	13,4827
1,6	8,1135	17,1020	9,1078	17,7648
1,8	6,2417	9,5453	12,5680	15,6702
2,0	8,5510	5,1204	9,2271	12,8464
2,2	6,5823	9,5453	7,5965	16,1872

Các kết quả thử nghiệm cho thấy vật liệu có khả năng hấp phụ tốt As trong môi trường nước có độ pH từ trung tính đến kiềm yếu (pH=5-8). Trong môi trường kiềm, pH>10, vật liệu thể hiện tính hấp phụ kém đối với As.

Kết quả bảng 2 cho thấy, trong trường hợp vật liệu nano oxit sắt từ có 10% Mn thay thế sắt trong mạng tinh thể và lượng vật liệu (chất hấp phụ) là 1,6 g/l, sau 20 phút hấp phụ nồng độ As trong nước đã giảm từ mức 113 ppb, tức là cao gấp 10 lần theo tiêu chuẩn cho phép [7], xuống dưới mức tiêu chuẩn là 10 ppb (bảng 2). Các mẫu vật liệu pha tạp Mn có hàm lượng tạp càng tăng, khả năng hấp phụ As càng giảm. Loại vật liệu Fe_3O_4 -5%Mn và Fe_3O_4 -10%Mn thể hiện tính hấp phụ tốt nhất: với lượng 2 g/l loại vật liệu này đã có thể làm giảm nồng độ As trong nước từ 113 ppb xuống dưới 10 ppb, tức là làm giảm hàng chục lần so với nồng độ ban đầu.

Kết luận

Vật liệu nano Fe_3O_4 -x%Mn (x=0; 5; 10; 15; 20 và 30) đã được tổng hợp bằng phương pháp hóa học và nghiên cứu cấu trúc, tính chất từ bằng các kỹ thuật phân tích XRD, TEM. Vật liệu nghiên cứu có kích thước hạt dao động từ 8,42 đến 12,7 nm, thể hiện tính siêu thuận từ ở nhiệt độ phòng và có momen từ bão hòa trong khoảng 53÷65,8 emu/g. Vật liệu với hàm lượng <10% Mn thay thế Fe trong mạng tinh thể có khả năng hấp phụ làm giảm nồng độ As(III) trong nước từ mức cao hàng trăm ppb xuống mức thấp hơn 10 ppb, nếu độ pH của môi trường là trung tính.

Hạn chế của nghiên cứu này là chưa xác định được cơ chế hấp phụ cũng như các thông số nhiệt động học là dung lượng hấp phụ cực đại, hằng số cân bằng hấp phụ, năng lượng tự do Gibb (ΔG^0), enthalpy (ΔH^0), entropy (ΔS^0) của quá trình hấp phụ As trong nước của vật liệu. Những nghiên cứu này sẽ được triển khai trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Prasanna Shah, Mitsugu Souma, Kenji Kawaguchi, Iwao Yamaguchi (2002), "Growth conditions, structural and magnetic properties of $\text{M}/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{I}$ (M = Al, Ag and I = Al_2O_3 , MgO) multilayers", *Journal of Magnetic and Materials*, **247**, pp.1-5.
- [2] Jun Liu, Yuezheng Bin and Masaru Matsuo (2012), "Magnetic behavior of Zx - doped Fe_3O_4 nanoparticles estimated in term of crystal domain size", *Journal of Physical Chemistry C*, **116**, pp.134-143.
- [3] J.F. Bertone, et al. (2003), "Hydrothermal synthesis of quartz nanocrystal", *Nano Letter*, **3**, pp.655-659.
- [4] A. Khodabakhshi, M.M. Amin, M. Mozaffari (2011), "Synthesis of magnetite nanoparticles and evaluation of its efficiency for arsenic removal from simulated industrial wastewater", *Iran. J. Environ. Healthy. Sci. Eng.*, **8(3)**, pp.189-200.
- [5] Malanie Auffan, Jerome Pose, Oliver Proux, et al. (2008), "Enhanced adsorption of arsenic onto maghemite nanoparticles: As(III) as a probe of surface structure and heterogeneity", *Langmuir*, **24**, pp.3215-3222.
- [6] Nguyen Van Dung, Dao Dinh Thuan (2019), "Study on arsenic treatment of groundwater in Thanh Liem, Ha Nam areas by nano iron oxide", *Proceedings of a Vietnam International Water Week Conference (VACI 2019)*, pp.198-205, Ha Noi, March 2019.
- [7] QCVN 01:2009/BYT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước ăn uống.

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng khử màu nước thải dệt nhuộm

Nguyễn Huy Thuần¹, Nguyễn Văn Giang^{2*}, Lê Thị Vân Anh²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao, Trường Đại học Duy Tân

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 22/10/2019; ngày chuyển phản biện 30/10/2019; ngày nhận phản biện 30/12/2019; ngày chấp nhận đăng 3/1/2020

Tóm tắt:

Nước thải dệt nhuộm không qua xử lý, xả trực tiếp vào nguồn nước sẽ gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Nhiều phương pháp vật lý, hoá học như lọc, kết tủa, keo tụ đã được tiến hành, tuy nhiên giá thành cao, tiêu thụ nhiều năng lượng, tạo ra chất thải khó xử lý, ảnh hưởng tới hệ sinh thái. Sử dụng vi sinh vật để xử lý nước thải dệt nhuộm được xem là phương pháp thay thế vì giá thành không cao, thân thiện với môi trường. Nhiều chủng vi sinh vật thuộc các chi vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn và tảo có khả năng phân huỷ thuốc nhuộm. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích khảo sát khả năng khử màu thuốc nhuộm Red FN2BL của một số chủng vi khuẩn được phân lập từ nước thải dệt nhuộm. Ba chủng vi khuẩn A2, A9 và A14 có hiệu quả khử màu đã được tuyển chọn. Hiệu quả khử màu của chủng A9 (80,6%)>A14 (67,5%)>A2 (34,6%) trong điều kiện nuôi tĩnh; trong điều kiện nuôi lắc, hiệu quả phân huỷ thuốc nhuộm của chủng A9 (63,3%)>A14 (34,9%)>A2 (26,9%). Chủng A9 được chọn để khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường nuôi cấy. Hiệu quả khử màu của chủng A9 mạnh nhất khi trong môi trường nuôi cấy có nguồn carbon là tinh bột, nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl hay cao nấm men, mật độ vi khuẩn 5-15%, pH môi trường trong khoảng 6-7, nhiệt độ 35°C. Chủng A9 có tiềm năng ứng dụng xử lý nước thải dệt nhuộm.

Từ khóa: khử màu, nước thải, phân huỷ sinh học, thuốc nhuộm.

Chỉ số phân loại: 2.7

Đặt vấn đề

Trong ngành công nghiệp dệt nhuộm, hàng năm khoảng 200.000 tấn thuốc nhuộm các loại được thải ra dưới dạng nước thải trong quá trình nhuộm và hoàn thiện sản phẩm [1]. Phần lớn các loại thuốc nhuộm tồn tại rất lâu trong tự nhiên do tính ổn định cao của chúng đối với ánh sáng, nhiệt độ. Xả trực tiếp nước thải từ quá trình dệt nhuộm, in vào nguồn nước sẽ gây ô nhiễm nghiêm trọng. Thuốc nhuộm trong nước làm tăng độ đục, không chỉ gây giảm độ hòa tan oxy trong nước mà còn làm giảm khả năng xuyên qua nước của ánh sáng mặt trời, do đó ảnh hưởng đến quang hợp và toàn bộ hệ sinh thái dưới nước [2]. Xả nước thải dệt nhuộm vào ao, hồ, sông sẽ làm thay đổi pH và tăng nhu cầu oxy sinh hoá, nhu cầu oxy hoá học và tổng carbon hữu cơ [3]. Một số thuốc nhuộm như azo và các sản phẩm phân huỷ chúng có tính độc, có khả năng gây ung thư, ảnh hưởng tới sức khoẻ con người. Nhiều phương pháp vật lý, hoá học như lọc, kết tủa, keo tụ đã được tiến hành, tuy nhiên giá thành cao, tiêu thụ nhiều năng lượng, tạo ra chất thải khó xử lý cũng như ảnh hưởng tới hệ sinh thái [4, 5]. Phương pháp sinh học được xem là giải pháp thay thế hiệu quả vì giá thành không cao, thân thiện với môi trường [6]. Khử màu nước thải dệt nhuộm có thể diễn ra theo hai cách: hấp phụ

trên sinh khối vi sinh vật hay phân huỷ sinh học bởi tế bào vi sinh vật [1]. Hiện nay, biện pháp phân huỷ sinh học được ứng dụng để loại bỏ nhiều chất gây ô nhiễm. Nhiều loài vi sinh vật, gồm vi nấm, vi khuẩn, vi tảo, nấm men có khả năng loại bỏ nhiều dạng thuốc nhuộm [6]. Các loài vi sinh vật sinh tổng hợp nhiều enzyme cần thiết cho quá trình làm mất màu và khoáng hoá thuốc nhuộm trong các điều kiện môi trường thích hợp [4]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn từ nước thải làng nghề dệt nhuộm và khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường tới khả năng làm mất màu thuốc nhuộm trong điều kiện *in vitro*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Trong nghiên cứu này thuốc nhuộm Red FN2BL (Reactive dye) với $\lambda=526$ nm đã được sử dụng. Nước thải dệt nhuộm được lấy từ làng nghề dệt nhuộm phường Vạn Phúc, quận Hà Đông, TP Hà Nội.

Sàng lọc lần đầu các chủng vi khuẩn khử màu thuốc nhuộm

Phân lập vi khuẩn từ nước thải dệt nhuộm được tiến hành

*Tác giả liên hệ: Email: nvgiang@vnua.edu.vn

Isolation and characterisation of decolorising bacterial strains isolated from textile dyeing wastewater

Huy Thuan Nguyen¹, Van Giang Nguyen^{2*},
Thi Van Anh Le²

¹Institute of Research and Development, Duy Tan University

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

Received 22 October 2019; accepted 3 January 2020

Abstract:

Directed discharge into water sources of untreated textile dyeing wastewater will cause seriously environmental contamination. Various kinds of physico-chemical methods have been in use for the treatment of the wastewater. However, these methods are not environment friendly and cost-effective, and hence become commercially unattractive. Many microorganisms strains belonging to the different taxonomic groups of bacteria, fungi, actinomycetes, and algae have been reported for their ability to decolourise dyes. This study was conducted to investigate the decolorisation of Red FN2BL by using bacterial strains isolated from textile dyeing wastewater. Three different bacterial strains A2, A9 and A14 exhibited high decolorization effects were selected. Decolorisation effect of strain A9 was 80.6% > A14 (67.5%) > A2 (34.6%) in stable cultural condition and was A9 (63.3%) > A14 (34.9%) > A2 (26.9%) in shaking cultural condition. The strain A9 was selected for evaluating the effects of some cultural conditions. Strain A9 showed maximum decolorisation ability at pH between 6 and 7, temperature of 35°C, and bacterial density of 5-15%. Starch and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl or yeast extract were found to be the optimum condition for decolorisation. In brief, the strain A9 reveals a great potential for application in the textile dyeing wastewater treatment.

Keywords: biodegradation, decolorisation, dyes, wastewater.

Classification number: 2.7

bằng cách pha loãng mẫu nước thải trong nước cất và cấy chang trên đĩa thạch dinh dưỡng. Các đĩa thạch này được ủ ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 24h. Những khuẩn lạc với hình thái khác nhau được tách riêng và nuôi cấy làm thuần [7]. Các mẫu vi khuẩn sau khi đã được làm thuần được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng lỏng NB (gồm (g/l): Peptone 10, Beef extract 10, NaCl 5, pH=7,3±0,1) trong 24h trước khi cấy chuyển sang môi trường muối khoáng tối thiểu (gồm (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1, NaCl 5, glucose 3, nước cất 1000 ml, pH=7). Sau 24h nuôi, 10% (v/v) dịch nuôi các chủng vi khuẩn được chuyển sang ống nghiệm có chứa 200 mg/l dung dịch thuốc nhuộm. Quan sát sự khử màu của các chủng vi khuẩn sau 48h ủ các ống thí nghiệm ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Chủng nào biểu hiện tiềm năng khử màu mạnh nhất được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo [8].

Sàng lọc lần cuối và đánh giá hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn phân lập

Thí nghiệm này được tiến hành bằng cách sử dụng thuốc nhuộm Red FN2BL trong môi trường MS lỏng. Mỗi chủng vi khuẩn được chọn được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó chuyển 5% (v/v) của mỗi chủng sang bình Erlenmeyer (V=250 ml) chứa 50 ml môi trường MS và 100 mg/l thuốc nhuộm Red FN2BL. Các bình này sẽ được nuôi cấy ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 24-72h, điều kiện tĩnh và lắc (150 vòng/phút). Độ hấp thụ ánh sáng của các mẫu thí nghiệm được đo tại $\lambda=526$ nm ở thời điểm 24 và 72h [8]. Dựa trên kết quả giảm độ hấp thụ, % khử màu thuốc nhuộm được tính toán, chủng vi khuẩn có tiềm năng khử màu thuốc nhuộm cao sẽ được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Hiệu quả khử màu thuốc nhuộm được biểu hiện bằng %. 5 ml mẫu thí nghiệm đã khử màu được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút và đo độ hấp thụ ánh sáng tại $\lambda=526$ nm. Ống đối chứng chỉ chứa thuốc nhuộm và môi trường nuôi chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Hiệu quả loại bỏ màu của các chủng vi khuẩn thí nghiệm được xác định theo công thức sau [8]:

$$\text{Hiệu quả khử màu (\%)} = [(I - F) \times 100] / I \quad (1)$$

Trong đó: I là độ hấp thụ của ống đối chứng; F là độ hấp thụ của ống thí nghiệm.

Khảo sát ảnh hưởng của một số chỉ tiêu đến khả năng khử màu của các chủng vi khuẩn thí nghiệm [5]

Anh hưởng của nồng độ thuốc nhuộm Red FN2BL: các chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó 5% (v/v) dịch nuôi vi khuẩn được chuyển sang bình Erlenmeyer (V=250 ml) chứa 50 ml môi trường MS được bổ sung 100, 200 và 300 mg/l thuốc nhuộm, pH=7. Các bình này sẽ được nuôi cấy ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 72h, điều kiện tĩnh. Hiệu quả khử màu được tính theo công thức (1).

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống: các chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó lần lượt bổ sung vi khuẩn ở các nồng độ khác nhau (v/v): 1, 5, 10 và 15% vào bình Erlenmeyer (V=250 ml) có chứa 50 ml môi trường MS và 100 mg/l thuốc nhuộm, chuẩn độ môi trường về pH=7. Các bình này sẽ được nuôi cấy ở $30\pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 72h, điều kiện tĩnh. Hiệu quả khử màu được tính như công thức (1).

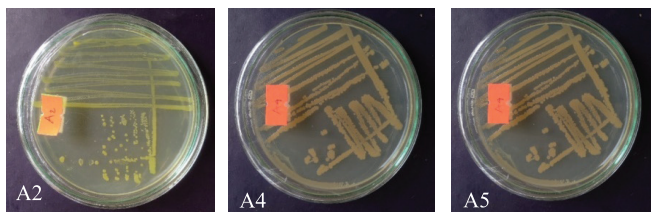
Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ: các chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó 5% (v/v) dịch nuôi vi khuẩn được chuyển vào bình Erlenmeyer (V=250 ml) chứa 50 ml môi trường MS được bổ sung 100 mg/l thuốc nhuộm. pH của các bình thí nghiệm được điều chỉnh đạt 5, 6, 7 và 8. Các bình này được nuôi cấy ở $30\pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 72h, điều kiện tĩnh. Tương tự như vậy, chỉnh pH của bình thí nghiệm để đạt giá trị pH=7, nhưng các bình được ủ ở nhiệt độ 15, 25, 30 và 40°C , trong thời gian 72h, điều kiện tĩnh. Hiệu quả khử màu được tính theo công thức (1).

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ: các chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó 5% (v/v) dịch nuôi vi khuẩn được chuyển vào bình Erlenmeyer (V=250 ml) chứa 50 ml môi trường MS được bổ sung 100 mg/l thuốc nhuộm, nguồn đường glucose trong môi trường MS được thay thế bằng Saccarose, tinh bột, Lactose, Xylose, Maltose và Fructose. Tiến hành thí nghiệm tương tự, nhưng thay nguồn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ trong môi trường MS bằng NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 và peptone, cao thịt, cao nấm men. Các bình này được nuôi cấy ở $30\pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 72h, ở điều kiện tĩnh. Hiệu quả khử màu được tính theo công thức (1).

Kết quả và thảo luận

Kết quả phân lập chủng vi khuẩn từ nước thải dệt nhuộm

Một số khuẩn lạc có hình thái, màu sắc khác nhau đã xuất hiện trên đĩa môi trường thạch dinh dưỡng sau khi để đĩa ở 37°C sau 24h (hình 1). Các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu nước thải thu tại làng nghề dệt nhuộm phường Vạn Phúc, quận Hà Đông, TP Hà Nội được lần lượt đặt tên là A1 đến A14.

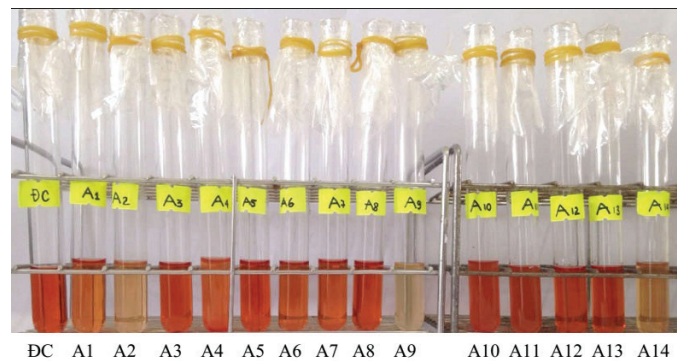


Hình 1. Khuẩn lạc chủng A2, A4 và A5 phân lập được từ nước thải dệt nhuộm.

Nhiều nhà nghiên cứu đã phân lập thành công các chủng vi khuẩn khử màu nước thải nhuộm [1, 6, 9] và từ đất nhiễm thuốc nhuộm azo [8]. Kết quả này cho thấy khả năng thích nghi tự nhiên của các chủng vi khuẩn phân lập với môi trường bị nhiễm thuốc nhuộm và khả năng sống sót trong điều kiện có thuốc nhuộm độc hại.

Sàng lọc lần đầu các chủng vi khuẩn khử màu thuốc nhuộm

Các khuẩn lạc với hình thái khác nhau được tách riêng và nuôi cấy làm thuần [7]. Các mẫu vi khuẩn sau khi đã được làm thuần được nuôi cấy 24h trong môi trường dinh dưỡng lỏng NB trước khi cấy chuyển sang môi trường muối khoáng tối thiểu. Sau 24h nuôi, 10% (v/v) dịch nuôi các chủng vi khuẩn được chuyển sang ống nghiệm có chứa 200 mg/l dung dịch thuốc nhuộm. Kết quả khử màu của các chủng vi khuẩn sau 48h ủ các ống thí nghiệm ở $30\pm 2^\circ\text{C}$ được thể hiện ở hình 2.

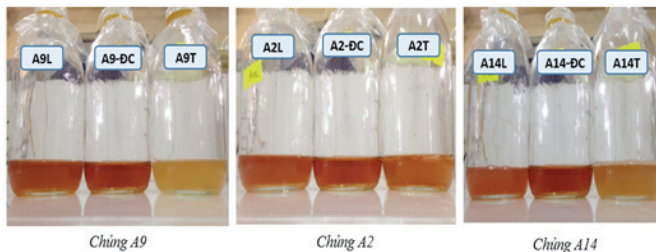


Hình 2. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng khử màu thuốc nhuộm.

Kết quả quan sát cho thấy, chủng A2, A9 và A14 biểu hiện hiệu quả khử màu thuốc nhuộm mạnh nhất, được chọn để tiến hành đánh giá hiệu quả khử màu trong thí nghiệm tiếp theo. Anamika và cs (2013) [8] cũng đã sàng lọc được nhiều chủng vi khuẩn có khả năng khử màu một số loại thuốc nhuộm như Balck WNN, Blue FRN, Blue RC, TURQ blue, nhưng chỉ sàng lọc được một chủng vi khuẩn khử màu thuốc nhuộm Red FN2BL là thuốc nhuộm được sử dụng trong thí nghiệm này. Ogugbue và Sawidis (2011) [1] đã tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn có khả năng khử màu thuốc nhuộm Basic violet 3. Trong thí nghiệm của mình, Ken Meerbergen và cs (2018) [2] đã tuyển chọn được các chủng vi khuẩn thuộc chi *Acinetobacter* và *Klebsiella* biểu hiện tiềm năng khử màu thuốc nhuộm azo. Từ các mẫu nước thải thu thập tại vùng bị nhiễm thuốc nhuộm, Maulin và cs (2013) [4] cũng đã phân lập được 50 chủng vi khuẩn có thể loại bỏ thuốc nhuộm. Như vậy có thể kết luận rằng, các chủng vi khuẩn mới được phân lập từ nước thải dệt nhuộm có thể sống và sinh trưởng trong môi trường có các loại thuốc nhuộm khác nhau.

Sàng lọc lần cuối và đánh giá hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn mới phân lập

Chủng vi khuẩn A2, A9 và A14 được nuôi 24h trong môi trường NB, sau đó chuyển 5% (v/v) của mỗi chủng sang bình Erlenmeyer (V=250 ml) chứa 50 ml môi trường MS và 100 mg/l thuốc nhuộm Red FN2BL. Các bình này sẽ được ủ tại $30 \pm 2^\circ\text{C}$, trong thời gian 24-72h, ở điều kiện tĩnh và lắc (150 vòng/phút). Hiệu quả khử màu (hình 3) của chủng A9 (80,6%) > A14 (67,5%) > A2 (34,6%) trong điều kiện nuôi tĩnh, còn trong điều kiện nuôi lắc, hiệu quả phân hủy thuốc nhuộm của chủng A9 (63,3%) > A14 (34,9%) > A2 (26,9%). Kết quả sàng lọc cho thấy, hiệu quả loại bỏ thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn thí nghiệm trong điều kiện tĩnh cao hơn trong điều kiện lắc. Thí nghiệm của Anamika và cs (2013) [8] cũng cho thấy, khả năng khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn trong điều kiện tĩnh cao hơn trong điều kiện lắc. Theo công bố của Chen và cs (2003) [10], vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* khử màu thuốc nhuộm (80%) trong điều kiện tĩnh (kỵ khí hay hiếu khí). Wang và cs (2009) [11] cũng ghi nhận hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của chủng vi khuẩn đạt 96% trong điều kiện kỵ khí, và chỉ đạt 13% trong điều kiện hiếu khí, lắc 150 vòng/phút. Tuy nhiên, một số kết quả nghiên cứu của Ogugbue và Sawidis (2011) [1], Saad El-Din Hassan và cs (2015) [5] cho thấy, hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn thí nghiệm cao nhất trong điều kiện hiếu khí (nuôi lắc). Như vậy, hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn không chỉ phụ thuộc vào điều kiện hiếu khí hay kỵ khí, có thể còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như khả năng sinh trưởng, tổng hợp enzyme phân hủy thuốc nhuộm của chủng vi khuẩn.



Hình 3. Khả năng khử màu thuốc nhuộm của chủng A2, A9 và A14 sau 72h trong điều kiện tĩnh (T) và lắc (L).

Kết quả thí nghiệm này cho thấy 3 chủng vi khuẩn A2, A9 và A14 là các chủng vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc, oxy cần thiết cho sinh trưởng của vi khuẩn, nhưng ức chế hiệu quả khử màu của chúng. Dựa trên hiệu quả khử màu, chủng A9 được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo và được nuôi trong điều kiện tĩnh.

Khảo sát ảnh hưởng của một số chỉ tiêu đến khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9

Ảnh hưởng của nồng độ thuốc nhuộm Red FN2BL: sau

72h nuôi cấy với các nồng độ thuốc nhuộm khác nhau, hiệu quả khử màu của chủng A9 đạt 76,7-81,3% phụ thuộc vào nồng độ thuốc nhuộm (bảng 1). Khi tăng nồng độ thuốc nhuộm, hiệu quả khử màu của chủng A9 giảm. Hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của các chủng vi khuẩn giảm khi tăng nồng độ thuốc nhuộm đã được nhiều nhà nghiên cứu công bố. Saad El-Din Hassan và cs (2015) [5] khi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ thuốc nhuộm tới hiệu quả khử màu của các chủng vi khuẩn *Klebsiella* đã ghi nhận kết quả khi nồng độ thuốc nhuộm tăng, hiệu quả khử màu của các chủng vi khuẩn giảm rõ rệt. Nồng độ thuốc nhuộm Reactive Black 5 nhiều hơn 200 mg/l đã giảm hiệu quả khử màu của chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. [11]. Hai chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* và *Klebsiella variicola* đã giảm khả năng khử màu thuốc nhuộm khi tăng nồng độ thuốc nhuộm từ 50 đến 100 mg/l [6]. Nồng độ cao các loại thuốc nhuộm ức chế khả năng loại bỏ màu từ cơ chất của vi khuẩn và ảnh hưởng tới sinh trưởng, trao đổi chất và tổng hợp enzyme của tế bào vi khuẩn [1, 5].

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ thuốc nhuộm tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

Nồng độ thuốc nhuộm (mg/l)	Giá trị OD		% khử màu
	Đối chứng	Thí nghiệm	
100	0,209	0,039	81,3
200	0,694	0,151	77,6
300	1,439	0,335	76,7

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống: hiệu quả khử màu thuốc nhuộm của vi sinh vật phụ thuộc vào nhiều quá trình như phân hủy sinh học, hấp phụ sinh học, kết tủa [5]. Vì thế, sinh khối tế bào có vai trò quan trọng trong quá trình khử màu nước thải. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi (bảng 2) cho thấy, khi mật độ vi khuẩn tăng từ 1 đến 15%, hiệu quả khử màu tăng tương ứng từ 40,0 đến 88,0%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Nồng độ thuốc nhuộm	Giá trị OD		% khử màu
		Đối chứng	Thí nghiệm	
1	100 mg/l	0,209	0,130	40,0
5			0,039	81,3
10			0,035	83,3
15			0,025	88,0

Hiệu quả khử màu cao nhất (88,0%) đạt được khi lượng giống vi khuẩn ban đầu là 15%. Mohan và cs (2013) [12] ghi nhận chủng *Bacillus* sp. và *Planococcus* sp. đạt hiệu quả khử màu cao nhất khi nồng độ chủng giống ban đầu là 10% và thấp hơn ở các nồng độ 1, 2 và 5%. Kết quả tương tự cũng đã được công bố bởi Kumar và cs (2009) [13].

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ: pH của môi trường nuôi

cây đóng vai trò quan trọng đối với hoạt động sinh lý của các tế bào vi khuẩn và sự trao đổi của các thành phần dinh dưỡng khác nhau qua màng. Hiệu quả khử màu của chủng vi khuẩn A9 đạt cao nhất tại pH=6-7, khi tăng hay giảm giá trị pH so với 6-7, hiệu quả khử màu đều giảm (bảng 3). Saad El-Din Hassan và cs (2015) [5] đã kết luận rằng, pH tối ưu để đạt hiệu quả khử màu cao nhất của 2 chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* và *Klebsiella variicola* là 5-7, nếu tăng hay giảm pH so với giá trị này, hiệu quả khử màu giảm. Maulin và cs (2013) [4] trong thí nghiệm của mình đã khẳng định, pH môi trường tăng từ 5 đến 7, hiệu quả khử màu tăng và đạt hiệu quả cao nhất tại pH=7, nếu tiếp tục tăng pH tới 9, hiệu quả khử màu giảm. Nghiên cứu của Kumar và cs (2009) [13], Ken Meerbergen và cs (2018) [2] cũng cho kết quả tương tự, hiệu quả khử màu cao nhất của hỗn hợp vi sinh vật đạt được khi môi trường có giá trị pH=7-8. pH môi trường ảnh hưởng tới hiệu quả khử màu của các chủng vi sinh vật, pH tối ưu để loại bỏ màu nhiều loại thuốc nhuộm thường trong ngưỡng từ 6 đến 10 [5]. Từ kết quả nghiên cứu này, có thể kết luận pH=6-7 thích hợp cho hoạt động khử màu thuốc nhuộm Red FN2BL của chủng vi khuẩn A9.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá trị pH tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

pH	Nồng độ thuốc nhuộm	Giá trị OD		% khử màu
		Đối chứng	Thí nghiệm	
5	100 mg/l	0,209	0,082	60,8
6			0,030	85,6
7			0,040	81,0
8			0,095	54,5

Hiệu quả khử màu thuốc nhuộm Red FN2BL của chủng vi khuẩn A9 cao nhất (81,3%) tại nhiệt độ 35°C (bảng 4). Tại nhiệt độ 25 và 40°C hiệu quả loại bỏ màu thuốc nhuộm của chủng A9 không khác nhau nhiều. Hiệu quả khử màu thấp nhất (34,2%) khi nhiệt độ môi trường là 15°C. Khả năng khử màu của chủng vi khuẩn thí nghiệm giảm tại 45°C có thể do giảm khả năng sinh trưởng của tế bào hoặc biến tính enzyme chịu trách nhiệm khử màu tại 45°C. Chủng vi khuẩn A9 sinh trưởng tốt tại 35°C và tăng cường tổng hợp enzyme phân hủy, do đó hiệu quả phân hủy thuốc nhuộm tăng. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của một số nhà khoa học khác.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

Nhiệt độ (°C)	Nồng độ thuốc nhuộm	Giá trị OD		% khử màu
		Đối chứng	Thí nghiệm	
15	100 mg/l	0,209	0,138	34,2
25			0,096	54,3
35			0,039	81,3
40			0,095	52,4

Kumar và cs (2009) [13] đã kết luận, hỗn hợp chủng vi sinh vật loại bỏ màu thuốc nhuộm tốt nhất tại 30 và 35°C, hiệu quả loại bỏ màu giảm dần khi nhiệt độ tăng lên và bị giảm đáng kể tại 45°C. Chủng vi khuẩn *Planococcus* sp. và *Bacillus* sp. trong nghiên cứu của Mohan và cs (2013) [12] đạt hiệu quả khử màu cao nhất tại 37°C, khi tăng nhiệt độ tới 45°C hay giảm về 27°C hiệu quả khử màu giảm. Trong thí nghiệm của Hadi Eslami và cs (2019) [6], hai chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* và *Klebsiella variicola* đạt hiệu quả khử màu cao nhất tại 37°C, nếu tăng nhiệt độ tới 45°C, hiệu quả khử màu giảm. Ken Meerbergen và cs (2018) [2] cũng khẳng định các chủng vi khuẩn *Acinetobacter* (ST16.16/164) và *Klebsiella* (ST16.16/034) biểu hiện khả năng khử màu mạnh nhất trong dải nhiệt độ 20-40°C. Kết quả nghiên cứu của Maulin và cs (2013) [4] cho thấy, các chủng vi khuẩn ETL-1 và ETL-2 đạt hiệu quả khử màu thuốc nhuộm cao nhất tại 35°C và thấp nhất tại 45°C.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ: carbon là nguồn năng lượng cần thiết cho sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật và tác động như chất nhường điện tử cần thiết để bề gãy các cầu nối trong phân tử thuốc nhuộm. Chủng A9 biểu hiện khả năng khử màu tốt nhất khi nguồn carbon là tinh bột (bảng 5), tiếp theo là saccarose và lactose. Khi sử dụng nguồn carbon là xylose, hiệu quả khử màu của chủng A9 thấp nhất (41,6%). Nguồn carbon khác nhau đã ảnh hưởng tới hiệu quả khử màu. Kết quả này tương tự với kết quả được công bố bởi Palanivelan và cs (2014) [14]. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. (ESL-52), *Micrococcus* sp. (TSL-7) và *Lactobacillus* sp. (TS-5) trong nghiên cứu của Palanivelan biểu hiện khả năng khử màu cao nhất khi trong môi trường nuôi vi khuẩn có tinh bột, các chủng vi khuẩn *Staphylococcus* sp. (ES-37), *Pseudomonas* sp. (M-1) và *Bacillus* sp. (TSL-9) biểu hiện tối đa khả năng khử màu khi nguồn carbon là lactose. Chủng *Bacillus* sp. trong thí nghiệm của Pushpa và cs (2017) [15] khử màu tốt nhất khi môi trường nuôi có chứa tinh bột, ngược lại maltose và saccarose cho hiệu quả khử màu thấp.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn carbon tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

Nguồn carbon	Nồng độ thuốc nhuộm	Giá trị OD		% khử màu
		Đối chứng	Thí nghiệm	
Saccarose	100 mg/l	0,625	0,097	84,5
Tinh bột			0,080	87,2
Lactose			0,151	75,8
Maltose			0,239	61,8
Fructose			0,213	65,9
Xylose			0,365	41,6

Để đánh giá ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng làm mất màu thuốc nhuộm của chủng A9, các nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ đã được sử dụng (bảng 6). Kết quả thí nghiệm cho

thấy, nguồn nitơ vô cơ NH_4Cl và cao nấm men giúp chủng A9 khử màu tốt hơn các nguồn nitơ khác, tuy nhiên không bằng nguồn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Saad El-Din Hassan và cs (2015) [5] kết luận cao nấm men và NaNO_3 đã làm tăng khả năng khử màu thuốc nhuộm disperse yellow (D4) của chủng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* và *Klebsiella variicola*. Mohan và cs (2013) [12] đã ghi nhận peptone là nguồn nitơ thích hợp nhất để chủng *Planococcus* sp. khử màu của thuốc nhuộm Coractive Blue P-3R, nhưng cao nấm men lại là nguồn nitơ ưa thích để khử màu của chủng *Bacillus* sp.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới khả năng khử màu của chủng vi khuẩn A9.

Nguồn nitơ	Nồng độ thuốc nhuộm	Giá trị OD		% khử màu
		Đối chứng	Thí nghiệm	
Nitơ vô cơ	NH_4Cl		0,185	70,3
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0,117	81,25
	NaNO_3		0,434	30,4
	KNO_3	100 mg/l	0,499	20,0
Nitơ hữu cơ	Cao thịt		0,603	3,3
	Cao nấm men		0,302	51,6
	Peptone		0,522	16,3

Kết luận

Ba chủng vi khuẩn A2, A9 và A14 có khả năng khử màu đã được phân lập từ mẫu nước thải dệt nhuộm, hiệu quả khử màu của chủng A9 cao nhất.

Hiệu quả khử màu thuốc nhuộm Red FN2BL của chủng A9 cao nhất khi sử dụng nguồn carbon là tinh bột, nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl và cao nấm men, nhiệt độ 35°C và pH thích hợp trong khoảng 6-7. Chủng A9 có tiềm năng loại bỏ màu của nước thải chứa thuốc nhuộm Red FN2BL từ các cơ sở dệt nhuộm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.J. Ogugbue, T. Sawidis (2011), "Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent", *Biotechnology Research International*, **967925**, p.11, DOI: 10.4061/2011/967925.
- [2] Ken Meerbergen, et al. (2018), "Isolation and screening of bacterial isolates from wastewater treatment plants to decolorize azo dyes", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **125(4)**, pp.448-456.
- [3] H.S. Lade, et al. (2012), "Enhanced biodegradation and

detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium", *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **72**, pp.94-107.

[4] Maulin P. Shah, et al. (2013), "Selection of bacterial strains efficient in decolorization of Remazol Black-B", *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, **72(4)**, pp.234-241.

[5] Saad El-Din Hassan, et al. (2015), "Biological decolorization of different azo dyes using two bacterial strains of *Klebsiella* spp. and their consortium", *International Journal of Environmental Biology*, **5(4)**, pp.104-114.

[6] Hadi Eslami, et al. (2019), "Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis* - *Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35(3)**, p.38, DOI: 10.1007/s11274-019-2608-y.

[7] J.G. Cappuccino, et al. (2014), *Microbiology: A Laboratory Manual*, Spiral Bound.

[8] Anamika Pokharia, Sarabjeet Singh Ahluwalia (2013), "Isolation and screening of dye decolorizing *Bacterial Isolates* from contaminated sites", *Textiles and Light Industrial Science and Technology*, **2(2)**, pp.54-61.

[9] Rashid Mahmood, et al. (2014), "Biodegradation of textile dye by indigenously isolated bacteria *Bacillus* and *Pseudomonas* sp. and their discard after bio-treatment", *Asian Journal of Chemistry*, **26(10)**, pp.2945-2948.

[10] K.C. Chen, J.Y. Wu, D.J. Liou (2003), "Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains", *Journal of Biotechnology*, **101**, pp.57-68.

[11] H. Wang, et al. (2009), "Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye reactive red 180 by *Citrobacter* sp. CK3q", *Int. Biodeterioration Biodegradation*, **63**, pp.395-399.

[12] V. Mohan, et al. (2013), "Isolation and screening of potential dye decolorizing bacteria from textile dye effluents in Tamil Nadu, India", *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, **2(2)**, pp.74-79.

[13] Kumar Kapil, et al. (2009), "Effect of process parameters on aerobic decolorization of reactive azo dye using mixed culture", *International Journal of Biomedical and Biological Engineering*, **3(10)**, pp.525-528.

[14] R. Palanivelan, S. Rajakumar, P.M. Ayyasamy (2014), "Effect of various carbon and nitrogen sources on decolorization of textile dye remazol golden yellow using bacterial species", *Journal of Environmental Biology*, **35**, pp.781-787.

[15] V. Pushpa, et al. (2017), "Effect of carbon and nitrogen sources for the degradation of red 2G by *Bacillus* sp.", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **47(1)**, pp.108-113.

Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus acidophilus* VTCC 12257 ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l

Đào Thị Lương*, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp

Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 7/1/2020; ngày chuyển phản biện 10/1/2020; ngày nhận phản biện 13/2/2020; ngày chấp nhận đăng 9/3/2020

Tóm tắt:

Đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) VTCC 12257 phân lập từ tôm lên men đã được đánh giá dựa vào các đặc điểm sinh học và khả năng chống chịu trong môi trường ruột mô phỏng. Trong nghiên cứu này, chủng VTCC 12257 được nghiên cứu về động học sinh trưởng cho sản xuất sinh khối cao ở quy mô phòng thí nghiệm và trong thiết bị lên men 30 l. Nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm, sinh khối cao nhất thu được trên môi trường SPY, nhiệt độ 37°C, pH 6,5, tỷ lệ giống cấy 3%, nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là hỗn hợp của pepton và cao nấm men, thời gian nuôi 32 giờ, khối lượng tế bào đạt 0,59 g/l. Nuôi trong thiết bị lên men 30 l, sinh khối đạt cao nhất ở tốc độ khuấy 50 v/ph, thời gian lên men 16-24 giờ, đạt 0,72 g/l dưới điều kiện pH được kiểm soát và 0,64 g/l khi pH không kiểm soát. Đây được coi là bước khởi đầu để sản xuất ở quy mô công nghiệp cho vi khuẩn probiotic này.

Từ khóa: *L. acidophilus* VTCC 12257, lợi khuẩn, quy mô phòng thí nghiệm và 30 l probiotic, sinh khối.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Ngày nay, vai trò của các sản phẩm tự nhiên trong việc thúc đẩy sức khỏe và bảo vệ con người chống lại sự gia tăng của bệnh tật ngày càng nhận được sự quan tâm của cộng đồng. Trong đó, các sản phẩm sử dụng vi sinh vật sống (probiotic) như các thực phẩm dinh dưỡng ngày càng gia tăng trên thế giới [1]. Probiotic là các vi sinh vật sống mà khi được dùng đủ lượng sẽ mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ [2]. Các vi sinh vật probiotic thuộc các nhóm khác nhau được sử dụng dưới dạng các chủng đơn lẻ hoặc kết hợp. Tuy nhiên, vi khuẩn thuộc nhóm *Lactobacillus* và *Bifidobacteria* là các nhóm điển hình được sử dụng trong nhiều sản phẩm probiotic cho người và động vật. Hầu hết các sản phẩm probiotic thương mại bao gồm các chủng *Lactobacillus* khác nhau như *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* và *Lactococcus lactis*. Các nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của hoạt tính probiotic và lợi ích sức khỏe khi sử dụng *Lactobacillus* với số lượng khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ngày [3]. Điều này dựa trên thực tế là một số lượng lớn vi sinh vật sẽ bị ngừng hoạt động trong quá trình đi qua đường tiêu hóa (GIT) có axit cao và bị ảnh hưởng bởi muối mật. Để sản phẩm probiotic hữu ích, cần có một số lượng lớn tế bào cho mỗi liều. Do vậy, các nghiên cứu về động học sinh

trưởng và nuôi cấy các chủng probiotic tạo sinh khối tế bào cao đang được các ngành công nghiệp lên men sản xuất probiotic và giống cấy ngày càng quan tâm [4].

Trong số các loài *Lactobacillus*, các chủng thuộc loài *L. acidophilus* được sử dụng làm probiotic nhiều nhất. *L. acidophilus* là nhóm vi khuẩn không gây bệnh và có mặt trong hệ vi sinh vật đường ruột, được sử dụng phổ biến làm giống khởi động lên men sữa với các hoạt tính có lợi nhờ khả năng cân bằng vi sinh vật đường tiêu hóa. Chúng cũng được sử dụng trong các thực phẩm lên men và làm probiotic trong các thuốc và thực phẩm bổ sung [5]. Các hợp chất protein như bacteriocin hoặc tương tự bacteriocin do *L. acidophilus* sản xuất phần lớn được biết đến và được tìm thấy có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các vi khuẩn có quan hệ họ hàng gần và các vi sinh vật gây hại không mong muốn. Chúng rất hữu ích trong các lĩnh vực bảo quản thực phẩm hoặc ứng dụng trong dược phẩm, chăm sóc sức khỏe. Một số chủng *L. acidophilus* có thể tạo ra các chất cạnh tranh và ngăn ngừa vi khuẩn gây bệnh từ việc bám dính vào các thụ thể trên các tế bào biểu mô của bề mặt ruột [6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phát triển mô hình bán công nghiệp sản xuất sinh khối *L. acidophilus* cho các ứng dụng trị liệu sinh học và probiotic, sử dụng các

*Tác giả liên hệ: Email: luongimbt@gmail.com

Culture condition for the growth of *L. acidophilus* VTCC 12257 in lab and 30 litre bioreactor scale

Thi Luong Dao*, Thi Hang Ha, Van Hop Duong

*Institute of Microbiology and Biotechnology,
Vietnam National University, Hanoi*

Received 7 January 2020; accepted 9 March 2020

Abstract:

Probiotic properties *in vitro* of the *L. acidophilus* T12.2 (VTCC 12257), were isolated from fermented shrimp were evaluated based on biological characteristics and tolerance under simulated intestinal conditions. In this study, the growth kinetics of the VTCC 12257 strain was studied for high biomass production in a lab and 30 litre bioreactor scale. In case of a lab, the highest biomass was obtained under the culture conditions as SPY medium, at 37°C, pH 6.5, inoculum size of 3% in 32 h; the best sources of carbon and nitrogen were found to be glucose and mixture of peptone and yeast extract; cell dry weight reached 0.59 g/l. During 30 litre bioreactor cultivation, the maximal cell mass obtained at the agitation speed of 50 rpm, and 16-24 h of incubation, was 0.72 g/l in pH-controlled culture and 0.64 g/l in the uncontrolled pH. This is considered as the first step for cell mass production of this probiotic bacterium in the industrial scale.

Keywords: biomass, lab and 30 litre bioreactor scale, *L. acidophilus* VTCC 12257, probiotic.

Classification number: 2.8

môi trường và thông số khác nhau ở cả hai điều kiện: nuôi trong phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l, làm tiền đề cho sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Đối tượng và phương pháp

Vĩ sinh vật

- Chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn Việt Nam (VTCC), Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

- Vi sinh vật kiểm định: *Salmonella enterica* VTCC-B-0480.

Môi trường

- Môi trường MRSA (g/l): pepton-10,0; cao nấm men-5,0; cao thịt-10,0; glucoza-20,0; K₂HPO₄-2,0; CaCO₃-5,0; CH₃COONa-5,0; triamoni citrat-2,0; MgSO₄.7H₂O-0,58; MnSO₄.4H₂O-0,28; tween 80-1 ml; thạch-15,0; nước cất vừa đủ-1 l; pH 6,5±0,2.

- Môi trường NA (g/l): cao thịt-3,0; pepton-5,0; NaCl-5,0; pH 7,0±0,2.

- Môi trường dịch thể (g/l): MT1 (MRS): pepton-10,0; cao nấm men-5,0; cao thịt-10,0; glucoza-20,0; K₂HPO₄-2,0; CaCO₃-5,0; CH₃COONa-5,0; triamoni citrat-2,0; MgSO₄.7H₂O-0,58; MnSO₄.4H₂O-0,28; tween 80-1 ml; nước cất vừa đủ-1 l; pH 6,5±0,2. MT2: tryptone-30,4; cao nấm men-8,92; glucose-15,0; pH 6,8. MT3: glucose-13,4; cao thịt-7,2; sodium pyruvate-3,4; K₂HPO₄-2; sodium acetate-5; ammonium citrate-2; pH 6,5. MT4: glucose-20; cao nấm men-6; KH₂PO₄-0,25; sodium acetate-5; triammonium citrate-2; MgSO₄.7H₂O-0,05; pH 6,5. MT5: cao nấm men-3; peptone-5; cao malt-3; glucose-10; sodium sulphite-2,92; basic fushsin-0,47; pH 6,9. MT6: peptone-6; cao nấm men-6; KH₂PO₄-1,5; ammonium citrate-1; tween 80-1; sodium acetate-1; citric acid-0,5; MgSO₄.7H₂O-0,4; MnSO₄-0,05; glucose-30; pH 6,8. MT7 (SPY): peptone-25; glucose-25; cao nấm men-25, pH 6,5. MT8: lactose-17,7; cao nấm men-18,6; CaCl₂-0,9; pH 6,5.

Phương pháp

Xác định khả năng sinh trưởng: xác định sinh khối: vi khuẩn được nuôi tĩnh trong ống nghiệm nút xoáy chứa 20 ml dịch lên men trong phòng thí nghiệm hoặc trong thiết bị lên men 30 l chứa 20 l môi trường. Mật độ tế bào được đo ở OD₆₀₀ và 1 OD₆₀₀ tương đương với 0,3 g/l [7].

Hoạt tính kháng khuẩn: sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch theo mô tả của Jamaly và cs (2011) [8].

Phương pháp xác định hàm lượng glucose: sử dụng

thuốc thử DNS theo phương pháp của Miller (1959) [9].

pH môi trường được kiểm tra trên thiết bị đo pH theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nghiên cứu điều kiện nuôi:

- Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trong phòng thí nghiệm: chủng vi khuẩn được nuôi tĩnh trong ống nghiệm nút xoáy (20 ml) trên 8 loại môi trường (MT1-MT8). Thử nghiệm sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau (20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C); pH thay đổi từ 3 đến 9; tỷ lệ giống cấy từ 0,2 đến 10%; các nguồn cacbon thay thế là fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, saccharose, tinh bột; nguồn nitơ thay thế là cao malt, cao nấm men, cao thịt, casein, pepton, NaNO_3 , NaNO_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và urê. Thời gian nuôi liên tục từ 0 đến 48 giờ đã được thử nghiệm cho khả năng tạo sinh khối, pH sau nuôi và hàm lượng glucose.

- Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trên thiết bị lên men 30 l: vi khuẩn được nuôi trong thiết bị lên men 30 l chứa 20 l môi trường, cấy 5% giống; nhiệt độ nuôi ở 37°C; pH ban đầu được điều chỉnh đến 6,5 sau khi khử trùng. pH kiểm soát ở cùng một giá trị trong quá trình nuôi được điều chỉnh bằng 2,5M NaOH và 2,5M HCl. Trong quá trình nuôi sử dụng chất chống tạo bọt vô trùng. Khối lượng tế bào được xác định ở các tốc độ khuấy 10, 30, 50, 100 và 150 v/ph. Xác định pH sau nuôi; hàm lượng glucose và khối lượng tế bào theo thời gian nuôi 8, 16, 24, 32, 40 và 48 giờ dưới điều kiện pH được kiểm soát và không kiểm soát.

Các thí nghiệm được tiến hành 3 lần, kết quả là trung bình của 3 thử nghiệm độc lập.

Kết quả và thảo luận

Đặc tính probiotic trong điều kiện *in vitro* của chủng vi khuẩn VTCC 12257 (T12.2), phân lập từ tôm lên men ở đảo Phú Quốc, đã được đánh giá dựa vào các đặc điểm sinh học và khả năng chống chịu trong điều kiện ruột mô phỏng. Chủng vi khuẩn được định danh là *L. acidophilus* VTCC 12257 dựa vào hình thái và trình tự ADN_r 16S. Chủng này mang đầy đủ đặc tính probiotic như: sinh trưởng ở 37°C, có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (β -galactosidase, cellulase và protease), có khả năng ức chế một số vi khuẩn gây bệnh đường ruột và phổ kháng rộng từ dịch nuôi, chịu muối mật (0,5%), tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và ruột, có khả năng bám dính tốt vào các tế bào biểu mô ruột và nhạy cảm với một số loại kháng sinh thông dụng thử nghiệm. Các kết quả đã chứng minh *L. acidophilus* VTCC 12257 là một chủng probiotic đầy hứa hẹn [10]. Trong nghiên cứu này, chủng VTCC 12257 được nghiên cứu các điều kiện nuôi thích hợp cho sản xuất sinh khối cao ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l.

Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trong phòng thí nghiệm

Nuôi chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 trong ống nghiệm nút xoáy chứa 20 ml môi trường cho các thực nghiệm: lựa chọn môi trường, nhiệt độ, giá trị pH, tỷ lệ giống, nguồn cacbon, nguồn nitơ và thời gian nuôi được đánh giá riêng biệt.

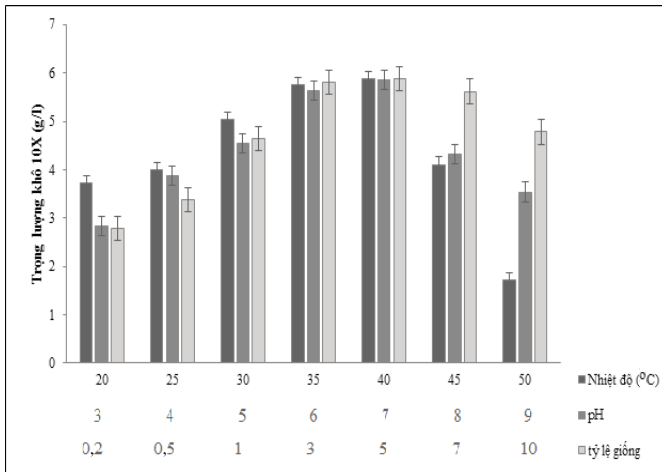
8 môi trường nuôi dựa trên các nghiên cứu trước đây được thực hiện với vi khuẩn axit lactic, được dùng để nghiên cứu khả năng tạo sinh khối và khả năng kháng *Salmonella enterica* của *L. acidophilus* VTCC 12257. Quá trình tạo sinh khối tế bào phụ thuộc vào nhiều điều kiện, trong đó thành phần môi trường có vai trò vô cùng quan trọng. Kết quả trong hình 1 cho thấy, tất cả các môi trường được thử nghiệm đều có thể hỗ trợ tế bào sinh trưởng và sản sinh chất kháng khuẩn, nhưng ở mức độ khác nhau. Trong thí nghiệm này, môi trường MT1 (MRS) và MT7 (SPY) có thể tạo ra khối lượng tế bào khô cao nhất trong số những môi trường nuôi sau 24 giờ (0,57-0,59 g/l).



Hình 1. Lựa chọn môi trường nuôi thích hợp.

Khả năng kháng *Salmonella enterica* cũng thay đổi giữa các môi trường thử nghiệm, kết quả kháng khuẩn cao nhất trên 2 môi trường MRS và SPY và không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 môi trường này (27 và 28 mm). Sản xuất bacteriocin phụ thuộc vào loại môi trường nuôi cấy và bị ảnh hưởng bởi thành phần môi trường, MRS dường như là môi trường phù hợp hơn so với các môi trường được thử nghiệm khác, kết quả tương tự đã được quan sát trong các nghiên cứu trước đây [11], vì nó có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn và mật độ tế bào cao thường có lợi cho việc sản xuất bacteriocin, nhưng những năm gần đây, việc sử dụng một số thực phẩm làm nguyên liệu thô sẽ kinh tế hơn [7]. Heenan và cs (2002) [12] đã nuôi vi khuẩn probiotic trong môi trường cơ bản có chứa peptone đậu nành, cao nấm men và glucose monohydrate. Trong thí nghiệm của Elsayed

và cs (2014) [7], lựa chọn môi trường SPY có khối lượng tế bào khô cao nhất (2,84 g/l) trong số những môi trường thử nghiệm sau 24 giờ nuôi *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02. Môi trường MT7 (SPY) được chọn cho các bước nghiên cứu tiếp theo trong báo cáo này.



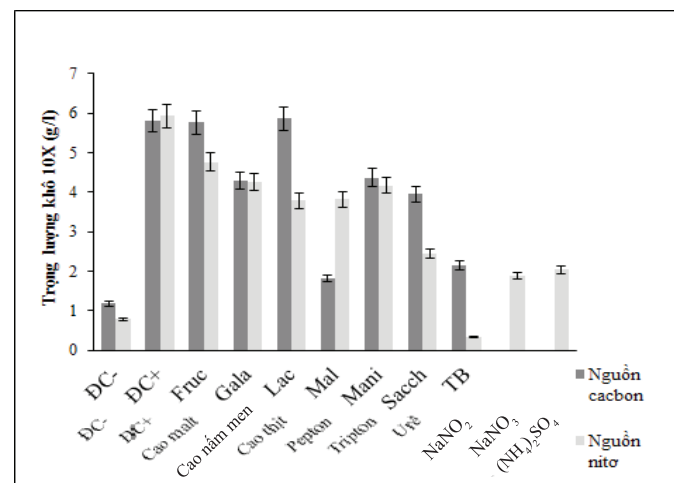
Hình 2. Lựa chọn nhiệt độ, pH nuôi và tỷ lệ giống cấy thích hợp.

Nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố vật lý (bao gồm nhiệt độ và pH) đến việc sản xuất sinh khối của chủng VTCC 12257 được thực hiện trên môi trường MT7 dịch thể (hình 2). Ở tất cả các nhiệt độ được thử nghiệm (20, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C), sinh khối tăng lên khi tăng nhiệt độ đến 40°C, sinh khối cao nhất được quan sát thấy ở 35-40°C đạt 0,575-0,587 g/l. Tăng quá 40°C, nhiệt độ nuôi có ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng. Hầu hết các thành viên của vi khuẩn lactic là mesophilic, tăng trưởng tối ưu ở nhiệt độ 35-40°C và tất cả các hoạt động trao đổi chất, bao gồm sản xuất bacteriocin cũng xảy ra trong khoảng nhiệt độ này [13]. Kết quả của Kheirallah và cs (2014) [14] công bố hoạt tính kháng khuẩn tối đa của các chất chuyển hóa của *B. bifidum* trùng với nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của tế bào ở 37°C. Favaro và cs (2012) [15] cũng có kết quả tương tự khi nghiên cứu trên *Enterococcus faecium*. Việc giảm hoạt tính kháng khuẩn do các chất chuyển hóa được tạo ra ở nhiệt độ cao hơn và thấp hơn có thể được coi là tăng trưởng chậm, dẫn đến làm chậm quá trình tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn [16]. Nhiệt độ 37°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Độ pH được biết là rất quan trọng đối với sinh khối cũng như sản phẩm bacteriocin của vi khuẩn lactic, bởi sự tổng hợp, hấp phụ của bacteriocin vào tế bào và sự phân hủy protein phụ thuộc vào pH [13]. Chủng VTCC 12257 có khả năng sinh trưởng ở các pH nghiên cứu từ 3-9; sinh khối tăng từ pH 3-7 và giảm từ pH 8-9; đạt giá trị cao nhất ở pH 6-7. Đây là chủng có khả năng chịu pH thấp tốt, sinh khối đạt

gần 50% ở pH3 so với sinh khối cao nhất ở pH 6-7 (hình 2). pH được chọn để nuôi vi khuẩn VTCC 12257 là 6,5. Kết quả trên tương tự với báo cáo của Enan và Alamri (2006) [17] nuôi *L. plantarum*, sinh khối và hợp chất kháng khuẩn cao nhất (plantaricin Ugl), khi độ pH ban đầu được kiểm soát ở mức 6,5. Các nghiên cứu khác cũng báo cáo hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được tạo ra với pH ban đầu 6,5 bởi *Enterococcus faecium* trong Cheese Whey bổ sung [15] và *Lactococcus lactis* trong váng sữa [18]. Mặt khác, Ghaly và cs (2003) [19] đã báo cáo rằng, việc sản xuất axit lactic của *Lactobacillus helveticus* được tăng cường rất nhiều từ Cheese Whey được bổ sung cao nấm men và lactamine dưới pH kiểm soát 5,5.

Tỷ lệ giống cấy là một trong những thông số quan trọng trong nghiên cứu điều kiện lên men. Trong thí nghiệm này, tỷ lệ giống 0,2-10% (v/v) được kiểm tra, sinh khối thấp nhất khi cấy 0,2% giống; sinh khối tăng dần khi cấy lượng giống tăng đến 5% và có xu hướng giảm nhẹ khi cấy giống trên 7% (hình 2). Tỷ lệ giống tốt nhất của chủng VTCC 12257 để tạo sinh khối là 3-5%. Kheirallah và cs (2014) [14] báo cáo tỷ lệ giống tốt nhất nuôi *Bifidobacterium bifidum* để tạo hợp chất kháng khuẩn là 2%. Khi tỷ lệ giống thấp hơn hoặc cao hơn tỷ lệ này, hoạt tính kháng khuẩn giảm. Tỷ lệ giống thấp, tế bào *B. bifidum* không đủ để tạo các hợp chất kháng khuẩn, khi tăng tỷ lệ giống tối ưu làm cho các tế bào ở trạng thái hoàn thiện và bắt đầu sản xuất các hợp chất kháng khuẩn để duy trì sự sống của vi khuẩn. Việc sản xuất tối đa các hợp chất kháng khuẩn tương ứng với sinh khối tế bào tối đa.

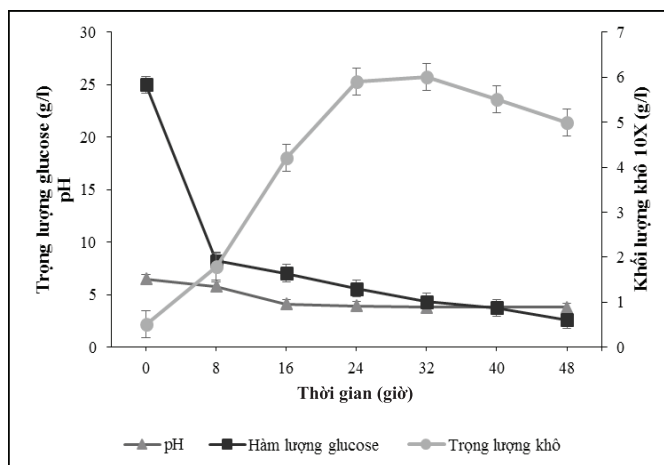


Hình 3. Lựa chọn nguồn cacbon, nitơ thích hợp.

Các nguồn carbon khác nhau đã được sử dụng cho sinh trưởng của chủng VTCC 12257 (hình 3), glucose, maltose và fructose là nguồn carbon tốt nhất trong số các nguồn được thử nghiệm, trọng lượng tế bào khô tối đa là 0,58-0,59

g/l. Mannitol và tinh bột tan cho trọng lượng tế bào khô thấp nhất (0,18-0,21 g/l). Trong báo cáo của Dailin và cs (2015) [20], sinh khối tế bào của *Lactobacillus kefirifaciens* đạt 0,96 g/l khi nuôi trên glucose, sau đó là sucrose, lactose và mannitol. Tuy nhiên, đối với *L. acidophilus* A12, glucose là nguồn carbon cho mật độ tế bào thấp hơn lactose, glycerol, mannitol, ethanol và fructose. Ở *L. acidophilus* ATCC 4962, mannitol được xác định là nguồn carbon tốt nhất để tăng trưởng tế bào và loại bỏ cholesterol [21]. Các loại đường khác nhau đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để tối ưu sản xuất bacteriocin ở các chủng vi khuẩn khác nhau, tuy nhiên, glucose vẫn được coi là nguồn carbon tốt nhất kích thích sản xuất bacteriocin, phần lớn các thực nghiệm đã chứng minh năng suất bacteriocin cao liên quan đến sự hiện diện của glucose trong môi trường sinh trưởng chứ không phải các monosacarit khác. Glucose được coi là nguồn carbon chính của hầu hết các vi sinh vật bởi vì nó được đồng hóa và chuyển hóa năng lượng tế bào nhanh. Tác động tiêu cực của tinh bột đối với bacteriocin có thể do vi khuẩn đã bị hấp phụ lên bề mặt của các phân tử tinh bột, làm hạn chế sử dụng của chúng [13].

Hầu hết các môi trường nuôi được sử dụng cho vi khuẩn lactic thường được bổ sung nguồn nitơ, là nguồn có ảnh hưởng lớn đến sản xuất sinh khối. Nuôi chủng VTCC 12257 trên môi trường MT7, thay lần lượt các nguồn nitơ hữu cơ là cao malt, cao nấm men, cao thịt, pepton, tryptone, urê; và các nguồn vô cơ: NaNO_2 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nguồn nitơ ảnh hưởng nhiều đến sinh trưởng của chủng VTCC 12257, sinh khối cao hơn khi thay bằng các nguồn hữu cơ đơn từ 0,24-0,47 g/l. Các nguồn nitơ vô cơ đều cho kết quả thấp hơn đáng kể so với nguồn nitơ hữu cơ, chỉ đạt 0,03-0,20 g/l. NaNO_2 còn gây ức chế sự sinh trưởng. Khối lượng tế bào cho mỗi nguồn nitơ theo thứ tự giảm dần như sau: cao nấm men > peptone > tryptone > cao malt > cao thịt > urê > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NaNO_3 > NaNO_2 (hình 3). Tuy nhiên, nguồn nitơ hỗn hợp của cao nấm men và pepton (ĐC +) cho sinh khối cao nhất, đạt 0,59 g/l. Do đó, hỗn hợp của cao nấm men và pepton đã được sử dụng làm nguồn nitơ cho các thí nghiệm tiếp theo. Cao nấm men là nguồn nitơ được sử dụng phổ biến nhất cung cấp hàm lượng phức hợp vitamin và tiền chất DNA bên cạnh nitơ hữu cơ cho vi khuẩn lactic. Lee và cs (2010) [21] thu được mật độ tế bào cao nhất khi cao nấm men được sử dụng làm nguồn nitơ nuôi *L. acidophilus* A12, đạt giá trị 8,15 Log CFU/ml. Mật độ tế bào tương đối cho mỗi nguồn nitơ theo thứ tự giảm dần như sau: cao nấm men > peptone > tryptone > cao malt > cao thịt. Thi và cs (2003) [22] đã chứng minh rằng, sự kết hợp của peptone thịt với các nguồn nitơ khác như cao nấm men giúp vi khuẩn phát triển tốt.

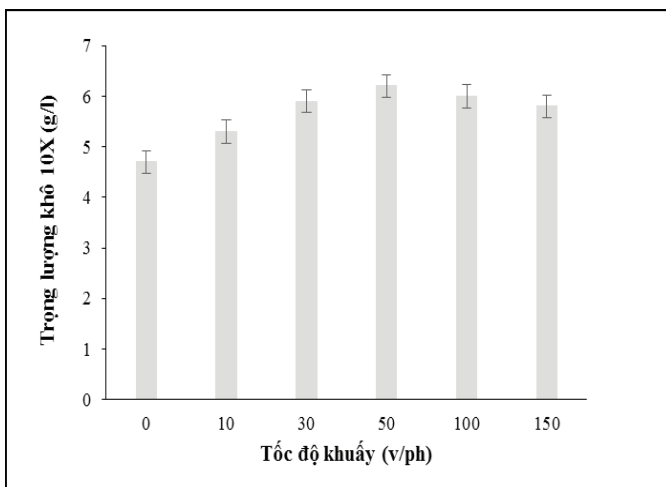


Hình 4. Lựa chọn thời gian nuôi thích hợp ở quy mô phòng thí nghiệm.

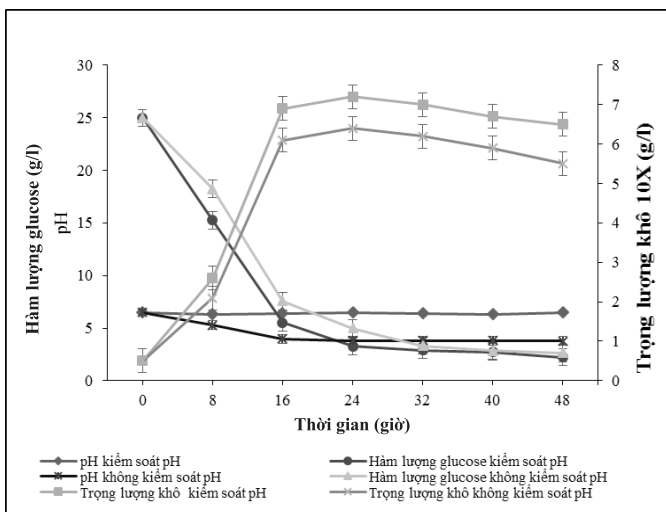
Nghiên cứu động học phát triển của tế bào, pH thay đổi và lượng glucose tiêu thụ trong quá trình nuôi của *L. acidophilus* VTCC 12257 được tiến hành trong thời gian 48 giờ liên tục. Tế bào phát triển với pha lag ngắn và đạt khối lượng tế bào cao nhất (0,59 g/l) sau 24 giờ nuôi. Khối lượng tế bào duy trì đến 40 giờ nuôi và giảm nhẹ sau đó, đạt 0,45 g/l vào 48 giờ nuôi. Điều này cho thấy, sinh trưởng đạt đến pha ổn định sau 32 giờ có thể là kết quả của sự tích tụ các sản phẩm phụ hoặc giới hạn chất dinh dưỡng. Trong quá trình tăng trưởng tế bào, pH môi trường giảm dần và đạt giá trị 3,92 sau 24 giờ nuôi. Sau thời gian đó, pH vẫn giữ nguyên trong khoảng 3,8 cho đến khi kết thúc quá trình nuôi. Tốc độ tiêu thụ glucose nhanh hơn trong 16 giờ nuôi ban đầu. Vào cuối thời gian nuôi, 10,48% lượng glucose đã không được sử dụng bởi tế bào bước vào pha ổn định và hạn chế sử dụng nguồn cacbon (hình 4). Đường cong sinh trưởng tế bào của *L. acidophilus* A12 được xây dựng trong môi trường MRS bởi Lee và cs (2010) [21]. Pha lag khoảng 2 giờ sau đó là pha logarit từ 2 đến 8 giờ. Tăng trưởng tế bào được duy trì thêm 8 giờ. Số lượng tối đa của tế bào được quan sát thấy ở 16 giờ với mật độ tế bào là 8,23 Log CFU/ml [21]. Động học của sự tăng trưởng tế bào và sản xuất axit lactic của *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC B-02 được nuôi trong môi trường tối ưu hóa chứa 3 thành phần chính glucose, cao nấm men và peptone được báo cáo [7]. Tế bào bước vào pha lag trong 2 giờ nuôi, sau tế bào bắt đầu tăng theo cấp số nhân, đạt trọng lượng khô tối đa là 3,14 g/l, giai đoạn ổn định sau 10 giờ. Độ pH của môi trường giảm dần và thấp nhất là 5,28; sau đó tăng lên 5,76 khi kết thúc quá trình nuôi. Điều này có thể được quy cho sự hình thành các ion amoni tự do từ phản ứng của axit lactic và axit amin của *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* do giải thích sự gia tăng độ pH của môi trường.

Lựa chọn điều kiện nuôi thích hợp trên thiết bị lên men 30 l

Tốc độ khuấy có vai trò lớn đối với sinh trưởng của các vi sinh vật khi nuôi trong các thiết bị lên men, nó vừa có tác dụng đảo trộn môi trường vừa giúp phân tán đều dinh dưỡng tiếp xúc với bề mặt, làm tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng của tế bào. Chuồng VTCC 12257 được nuôi trên thiết bị 30 l chứa 20 l môi trường MT7, ở 37°C, với 3% giống, thời gian 24 giờ. Sinh khối tăng khi tăng tốc độ khuấy từ 10-50 v/ph và có xu thế giảm nhẹ khi tăng cao hơn. Tốc độ khuấy thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng VTCC 12257 là 50 v/ph với sinh khối đạt 0,62 g/l (hình 5).



Hình 5. Lựa chọn chế độ khuấy thích hợp.



Hình 6. Lựa chọn thời gian nuôi thích hợp trên thiết bị 30 l.

Ảnh hưởng của pH được kiểm soát và không được kiểm soát trong quá trình lên men theo mẻ của chủng VTCC 12257 trên thiết bị lên men 30 l, ở 37°C trong 48 giờ với pH ban đầu là 6,5. Hình 6 biểu thị sự thay đổi của sinh khối, tiêu

thụ glucose và thay đổi pH trong điều kiện pH được kiểm soát và không kiểm soát, các mẫu được lấy trong mỗi 8 giờ. Khối lượng tế bào thu được từ cả hai quá trình lên men trên thiết bị 30 l đều cao hơn so với kết quả thu được từ quy mô phòng thí nghiệm. Sinh khối tế bào tối đa thu được lần lượt là 0,72 và 0,64 g/l đối với quá trình lên men được kiểm soát và không kiểm soát pH, tăng khoảng 16,7 và 6,3% so với khối lượng tối đa thu được trong quy mô phòng thí nghiệm (0,6 g/l, hình 4). Điều này có thể được quy cho các điều kiện nuôi tốt hơn từ thiết bị được khuấy trộn và phân phối các thành phần môi trường cũng như các sản phẩm chuyển hóa. Ngoài ra, sự giảm của sinh khối tế bào trong quá trình lên men không được kiểm soát pH có thể được giải thích dựa trên thực tế là việc sản sinh lactic tạo ra một môi trường có tính axit cao, ức chế sự phát triển của tế bào.

Ở điều kiện nuôi pH kiểm soát, khối lượng tế bào đạt tối đa sau 16-24 giờ và duy trì đến 32 giờ, sau đó giảm nhẹ. Tốc độ tiêu thụ glucose nhanh trong 16 giờ nuôi. Vào cuối thời gian nuôi, lượng glucose còn lại là 8,9%. Nuôi ở điều kiện pH không kiểm soát (pH ban đầu là 6,5), sinh trưởng của chủng VTCC 12257 cũng tăng theo cấp số nhân, sinh khối cũng đạt tối đa sau 16-24 giờ. Tuy nhiên, giá trị này thấp hơn so với quá trình nuôi pH được kiểm soát và cao hơn khi nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm. Mặt khác, pH của môi trường giảm đáng kể, đạt giá trị khoảng 3,96 trong 16 giờ đầu tiên do sự hình thành axit. Tốc độ tiêu thụ glucose của chủng VTCC 12257 nhanh hơn trong 16 giờ nuôi ban đầu, lượng glucose còn lại là 10,5% vào thời gian cuối.

Trong nghiên cứu của Elsayed và cs (2014) [7], nuôi chủng *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* trên thiết bị lên men 16 l, chứa 8 l môi trường tối ưu ở chế độ pH được kiểm soát và không kiểm soát, khối lượng tế bào tối đa 6,59 g/l đạt được sau 8 giờ dưới điều kiện pH được kiểm soát và 4,88 g/l sau 12 giờ dưới điều kiện pH không kiểm soát. Glucose giảm rất nhanh trong 6 giờ nuôi dưới điều kiện pH được kiểm soát và 10 giờ trong điều kiện pH không kiểm soát. Khối lượng tế bào tối đa cũng cao hơn trong điều kiện pH được kiểm soát (7,5 g/l) so với điều kiện pH không được kiểm soát (5,38 g/l) khi nuôi *L. salivarius* trong thiết bị lên men 16 l [23].

Kết luận

- Chủng *L. acidophilus* VTCC 12257 cho sinh khối cao nhất trên môi trường MT7 (SPY), nhiệt độ 37°C, pH 6,5, tỷ lệ giống cấy 3%, nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là hỗn hợp của pepton và cao nấm men; thời gian nuôi 24-32 giờ trong quy mô phòng thí nghiệm.

- Khối lượng tế bào tối đa cao hơn trong điều kiện pH được kiểm soát so với điều kiện pH không được kiểm soát khi nuôi VTCC 12257 trong thiết bị lên men 30 l ở tốc độ khuấy 50 v/ph; thời gian lên men 16-24 giờ.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn Dự án FIRST - Tiểu hợp phần 2a của Nhóm hợp tác “Tăng cường năng lực làm chủ công nghệ lên men sản xuất enzyme, probiotic đáp ứng nhu cầu trong nước và nâng cao khả năng tự chủ của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội” đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.C. Senok, A.Y. Ismaeel, C.A. Butta (2005), “Probiotics: facts and myths”, *Clinical Microbiology and Infection*, **11**, pp.958-966.
- [2] FAO, WHO (2002), *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.
- [3] M.E. Sanders (1999), “Probiotics”, *Food Technology*, **53**, pp.67-75.
- [4] N. Elmarzugi, H.E. Enshasy, R.A. Malek, Z. Othman, M.R. Sarmidi, and R.A. Aziz (2015), “Optimization of cell mass production of the probiotic strain *Lactococcus lactis* in batch and fed-batch culture in pilot scale levels”, *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.873-879.
- [5] M.E. Sanders, T.R. Klaenhammer (2001), “Invited review: the scientific basis of *L. acidophilus* NCFM functionality as a probiotic”, *Journal of Dairy Science*, **84**, pp.319-331.
- [6] Z. Ahmed, Y. Wang, Q. Cheng, and M. Imran (2010), “*L. acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview”, *African Journal of Biotechnology*, **9**(20), pp.2843-2850.
- [7] A.E. Elsayed, N.Z. Othman, R. Malek, T. Tang, and A.E.E. Hesham (2014), “Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02: a newly isolated probiotic strain from mother’s milk”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **4**(11), pp.8-14.
- [8] U. Jamaly, N.A. Benjouad, and M. Bouksaim (2011), “Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products”, *British Microbiology Research Journal*, **1**(4), pp.79-94.
- [9] G.L. Miller (1959), “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, **31**, pp.426-428.
- [10] N.T. Hoa, N.H. Tuấn, H.T. Hằng, D.V. Hợp, Đ.T. Lương (2018), “Đặc tính probiotic của 2 chủng *L. acidophilus* T5.1 và T12.2, phân lập từ thực phẩm lên men”, *Hội nghị khoa học quốc gia lần thứ 3, Quy Nhơn*, Nhà Xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.163-172.
- [11] S.R. Biswas, P. Ray, M.C. Johnson, and B. Ray (1991), “Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, Pidiocin AcH, by *Pediococcus acidilacticus* H”, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, pp.1262-1267.
- [12] C.N. Heenan, M.C. Adams, R.W. Hosken, G.H. Fleet (2002), “Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products”, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **35**, pp.171-176.
- [13] S. Abas, A. Wendawi, A. Abead, A. Saady (2012), “Screening for bacteriocins production in Enteric *Bifidobacterium* isolates and study of some production affecting factors”, *Medical Journal of Babylon*, **9**(2), pp.386-396.
- [14] Z.M.H. Kheirallah, A.Y. Okda, M.M. Abdelrazek, M.M. Abonor, M.I. Mabrouk, and E.A.E. Saker (2014), “Optimization of conditions for production of antimicrobial activity by *Bifidobacterium bifidum* in alternative whey based medium”, *Middle East Journal of Applied Sciences*, **4**(4), pp.949-958.
- [15] L. Favaro, S. Schirru, R. Comunian, M. Basaglia, S. Casella, A. Paba, E. Daga, B.D.G.M. Franco, R.P.S. Oliveira, and S.D. Todorov (2012), “Composition of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimized commercial MRS medium”, *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**(3), p.73.
- [16] E. Khay, M. Ouhsassi, A. El Harsal, M. Idaomar, and J. Abrini (2013), “Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco”, *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, **1**(4), pp.155-159.
- [17] G. Enan and A. Alamri (2006), “Novel plantaricin UG1 production by *Lactobacillus plantarum* UG1 in enriched whey permeate in batch fermentation process”, *The Journal of Food, Agric culture and Environment*, **4**(2), pp.85-88.
- [18] A.F. Jozala, D.P. Silva, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, A.P. Junior, and C.V. Penna (2011), “Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*”, *African Journal of Biotechnology*, **10**(66), pp.14920-14925.
- [19] A.E. Ghaly, M.S.A. Tango, and M.A. Adams (2003), “Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition”, *Agricultural Engineering International: CIGR Journal Science Research and Development*, pp.1-20.
- [20] A.J. Dailin, E.A. Elsayed, N. Othman, R.A. Malek, M.R. Sarmidi, and H.E. Enshasy (2015), “Development of cultivation medium for high yield Kefiran production by *Lactobacillus kefirianofaciens*”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **7**(3), pp.159-163.
- [21] N-K. Lee, Y-L. Park, G.J. Choe, H-I. Chang, and H-D. Paik (2010), “Medium optimization for the production of probiotic *L. acidophilus* A12 using response surface methodology”, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **30**(3), pp.359-364.
- [22] L.N. Thi, C.P. Champagne, B.H. Lee, J. Gouletb (2003), “Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey”, *The International Journal of Food Microbiology*, **8**(1), pp.67-75.
- [23] R.A. Malek, S. Hamdan, H. El Enshasy, N.Z. Othman, N.A. Zainol, M.R. Sarmidi, R. Aziz (2010), “Production of *Lactobacillus salivarius*, a new probiotic strain isolated from human breast milk, in semi-industrial scale and studies on its functional characterization”, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Spain: Formatex Research Centre, Badajoz, **2**, pp.1196-1204.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, không gạch chân hay viết nghiêng.

- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.

- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số (^{1,2...}) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

Định nghĩa vấn đề, tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài.

Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài.

Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách...

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được in nghiêng).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa soạn không trả lại bản thảo.

- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.

- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 62 - Number 6 - June 2020

Khảo sát sự phân hủy toluene và chlorotoluene bởi vi khuẩn *Comamonas testosteroni* KT5 cố định trong alginate.

Hà Danh Đức

Đánh giá lượng phát thải khí CH₄ trong canh tác lúa nước tại tỉnh Nam Định.

Lưu Thế Anh, Hoàng Thị Thu Duyên, Đinh Mai Vân, Đặng Thị Thanh Nga, Hoàng Quốc Nam

Thành phần loài và phân bố của các loài cua (Crustacea: Decapoda: Brachyura) ở rừng ngập mặn huyện Cù Lao Dung, Sóc Trăng.

Lê Văn Thọ, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Thị Mai Hương, Phan Doãn Đăng, Trần Ngọc Diễm My

Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.).

Bùi Thị Thanh Phương, Nguyễn Phương Lan, Đỗ Thị Kim Trang, Trần Bảo Trâm, Phan Xuân Bình Minh

Bài toán tối ưu kết cấu dàn phẳng sử dụng phân tích trực tiếp có xét đến điều kiện ràng buộc về tần số dao động riêng.

Hà Mạnh Hùng, Trương Việt Hùng

Nghiên cứu khả năng thu nước của ống lọc và bê tông rỗng dùng trong giếng khai thác nước ngầm bằng mô hình thí nghiệm vật lý.

Vũ Bá Thao, Nguyễn Thành Công, Nguyễn Huy Vượng

So sánh quá trình thu nhận cao chiết rong nâu *Sargassum* bằng các phương pháp chiết khác nhau và đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH.

Trần Thị Ngọc Mai

Phân lập một số hợp chất từ dịch chiết ethyl acetat của lá cây Dây lữa ít gân (*Rourea oligophlebia* Merr.).

Đinh Ngọc Thúc, Lê Nguyễn Thành

Tổng hợp và khảo sát tính chất điện hóa của vật liệu điện cực dương Na_xFe_{2/3}Mn_{1/3}O₂ sử dụng cho pin Na-ion.

Nguyễn Thị Kiều Duyên, Lê Phạm Phương Nam, Châu Hồng Diễm, Huỳnh Lê Thanh Nguyên, Nguyễn Thị Thu Trang, Lê Mỹ Loan Phụng, Trần Văn Mẫn

Nghiên cứu chế tạo và ứng dụng vật liệu nano Fe₃O₄ pha tạp mangan (Mn) để xử lý nước ô nhiễm As(III).

Đào Đình Thuần, Nguyễn Văn Dũng

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng khử màu nước thải dệt nhuộm.

Nguyễn Huy Thuần, Nguyễn Văn Giang, Lê Thị Vân Anh

Điều kiện nuôi thích hợp cho sinh trưởng của vi khuẩn probiotic *L. acidophilus* VTCC 12257 ở quy mô phòng thí nghiệm và thiết bị lên men 30 l.

Đào Thị Lương, Hà Thị Hằng, Dương Văn Hợp

1 Determination of degradation of toluene and chlorotoluenes by *Comamonas testosteroni* KT5 immobilized in alginate.

Danh Duc Ha

7 Assessment of methane emission from paddy rice cultivation in Nam Dinh province.

The Anh Luu, Thi Thu Duyen Hoang, Mai Van Dinh, Thi Thanh Nga Dang, Quoc Nam Hoang

13 Species diversity and distribution of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the mangrove forest area in Cu Lao Dung district, Soc Trang province.

Van Tho Le, Van Son Dang, Thi Mai Huong Nguyen, Doan Dang Phan, Ngoc Diem My Tran

19 Effect of nanosilver on the *in vitro* propagation of *Asarum glabrum* Merr.

Thi Thanh Phuong Bui, Phuong Lan Nguyen, Thi Kim Trang Do, Bao Tram Tran, Xuan Binh Minh Phan

24 Optimisation of planar trusses using direct design considering frequency constraints.

Manh Hung Ha, Viet Hung Truong

29 A study on water collecting capacity of filter tubes and porous concrete applied in groundwater wells by using physical experiments.

Ba Thao Vu, Thanh Cong Nguyen, Huy Vuong Nguyen

34 Comparison of extraction process from brown seaweed *Sargassum* by different methods and evaluation of antioxidant possibility by DPPH method.

Thi Ngoc Mai Tran

39 Isolation of some compounds from ethyl acetate extract of leaves of *Rourea oligophlebia* Merr.

Ngoc Thuc Dinh, Nguyen Thanh Le

43 Synthesis and electrochemical characterisation of anode material Na_xFe_{2/3}Mn_{1/3}O₂ for Na-ion batteries.

Thi Kieu Duyen Nguyen, Pham Phuong Nam Le, Hong Diem Chau, Le Thanh Nguyen Huynh, Thi Thu Trang Nguyen, My Loan Phung Le, Van Man Tran

48 Research on the manufacture and application of nano Fe₃O₄ materials doped with manganese for treatment of water contaminated with arsenic (III).

Dinh Thuan Dao, Van Dung Nguyen

52 Isolation and characterisation of decolorising bacterial strains isolated from textile dyeing wastewater.

Thuan Nguyen Huy, Van Giang Nguyen, Thi Van Anh Le

58 Culture condition for the growth of *L. acidophilus* VTCC 12257 in lab and 30 litre bioreactor scale.

Thi Luong Dao, Thi Hang Ha, Van Hop Duong