

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Lương

**NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU
BẰNG VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN
THAN SINH HỌC CÓ NGUỒN GỐC TỪ TRÁU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Lương

**NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU
BẰNG VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN
THAN SINH HỌC CÓ NGUỒN GỐC TỪ TRẤU**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Cung Thị Ngọc Mai
2. PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 30 tháng 05 năm 2023

Tác giả

Trần Thị Lương

LỜI CẢM ƠN

Sau thời gian học tập và nghiên cứu tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, nay tôi đã hoàn thành luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm. Để đạt được thành quả như ngày hôm nay, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến **TS. Cung Thị Ngọc Mai** và **PGS. TS. Lê Thị Nhi Công**, cán bộ phòng Công nghệ Sinh học môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là những người đã trực tiếp hướng dẫn tôi, luôn tận tâm chỉ bảo và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, Khoa Công nghệ sinh học, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và toàn thể quý thầy, cô đã truyền đạt những kiến thức quý báu và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian tôi theo học tại Học viện và hoàn thành luận văn.

Tôi cũng xin được cảm ơn ban Lãnh đạo và các đồng nghiệp Trung tâm Kiểm nghiệm Bắc Ninh đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi được học tập, nghiên cứu và hoàn thành đề tài.

Tôi, Trần Thị Lương được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.ThS.051. Tôi xin chân thành cảm ơn Quỹ VINIF đã tài trợ để giúp tôi hoàn thành việc học tập và nghiên cứu thuận lợi.

Cuối cùng, tôi xin được cảm ơn gia đình thân yêu đã luôn bên cạnh, ủng hộ và là nguồn động viên lớn lao nhất, luôn hy sinh nhiều nhất để tôi có được thành quả của ngày hôm nay.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả

Trần Thị Lương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH VẼ	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. HIỆN TRẠNG Ô NHIỄM DẦU TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM	4
1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG MÀNG SINH HỌC.....	7
1.2.1. Tình hình nghiên cứu của màng sinh học trên thế giới và Việt Nam	7
1.2.2. Ứng dụng màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu.....	11
1.3. THAN SINH HỌC VÀ ỨNG DỤNG.....	15
1.3.1. Khái niệm than sinh học (biochar).....	15
1.3.2. Một số ứng dụng của than sinh học	15
1.3.3. Ứng dụng than sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu.....	18
1.3.4. Than sinh học có nguồn gốc từ trấu.....	19
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	22
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	22
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ	22
2.2.1. Vật liệu	22
2.2.2. Hóa chất, môi trường	23
2.2.3. Trang thiết bị	23
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	25
2.3.1. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn.....	25
2.3.2. Đánh giá khả năng sử dụng nguồn hydrocarbon của chủng vi khuẩn ..	26
2.3.3. Kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lựa chọn.....	26

2.3.4. Nghiên cứu một số điều kiện lên men của các vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu	27
2.3.5. Tạo chế phẩm	28
2.3.6. Đánh giá mật độ tế bào trong chế phẩm và khả năng gắn lên vật liệu mang	28
2.3.7. Đánh giá hiệu quả xử lý các thành phần hydrocarbon no và thơm của chế phẩm tạo thành.....	30
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	32
3.1. KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC VÀ SINH TRƯỞNG TRÊN CÁC NGUỒN HYDROCARBON CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN	32
3.2. KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG LÃN NHAU CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LỰA CHỌN.....	34
3.3. XÁC ĐỊNH NHIỆT ĐỘ LÊN MEN TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU	36
3.3.1. Lên men ở các nhiệt độ khác nhau.....	36
3.3.2. Đánh giá khả năng loại bỏ dầu diesel của các chế phẩm tạo thành ở các nhiệt độ khác nhau	38
3.4. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM LÊN MEN TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU	40
3.4.1. Lên men ở các độ ẩm khác nhau.....	40
3.4.2. Đánh giá khả năng loại bỏ dầu diesel của các chế phẩm than sinh học tạo thành ở các độ ẩm khác nhau	41
3.5. ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ TẾ BÀO TRONG MẪU CHẾ PHẨM TẠO THÀNH VÀ KHẢ NĂNG GẮN CỦA VI KHUẨN LÊN THAN SINH HỌC	43
3.6. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ XỬ LÝ HYDROCARBON NO VÀ THƠM CỦA CHẾ PHẨM TẠO THÀNH	44
3.6.1. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon no có trong dầu diesel của chế phẩm tạo thành	44

3.6.2. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon thơm của chế phẩm tạo thành... 48	
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	60
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	61
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	62

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

<i>Từ viết tắt</i>	<i>Tiếng Anh</i>	<i>Tiếng Việt</i>
BFB	Biofilm fluided bed	Màng sinh học tầng sôi
Biochar	Biochar	Than sinh học
Biofilm	Biofilm	Màng sinh học
BUSB	Biofilm upflow sludge blanket	Màng sinh học tấm bùn ngược dòng
DO	Diesel oil	Dầu diesel
EGSB	Expanded granular sludge blanket	Màng sinh học tấm bùn dạng hạt
FBBR	Fluidized bed bioreactor	Bể phản ứng màng sinh học tầng sôi
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc kí lỏng cao áp
MBBR	Moving bed biofilm reactor	Màng sinh học chuyển động ngang
MBR	Membrane bioreactor	Bể phản ứng màng sinh học
MFC	Microbial fuel cell	Tế bào nhiên liệu vi sinh vật
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon	Hydrocarbon thơm đa vòng
PPM	Part per million	Phần triệu
RHB	Rice husk biochar	Than sinh học từ trấu
TF	Trickling filter	Bể lọc sinh học nhỏ giọt

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1. Các ứng dụng của than sinh học trong xử lý ô nhiễm đất và nước</i>	16
<i>Bảng 2.1. Các chủng vi khuẩn phân hủy dầu được phân lập tại Việt Nam....</i>	22
<i>Bảng 2.2. Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu.....</i>	23
<i>Bảng 2.3. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu</i>	24
<i>Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng trên các nguồn hydrocarbon của các chủng vi khuẩn lựa chọn</i>	33
<i>Bảng 3.2. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn.....</i>	35
<i>Bảng 3.3. Mật độ tế bào của chế phẩm.....</i>	38
<i>Bảng 3.4. Hiệu suất phân hủy dầu diesel của chế phẩm</i>	39
<i>Bảng 3.5. Các độ ẩm khác nhau của chế phẩm thu được.....</i>	40
<i>Bảng 3.6. Hiệu suất phân hủy một số hydrocarbon thơm trong dầu diesel của chế phẩm</i>	57

DANH MỤC HÌNH VẼ

<i>Hình 1.1. Một số hình ảnh ô nhiễm dầu tại Việt Nam</i>	5
<i>Hình 1.2. Sự hình thành và phát triển của biofilm trong công nghệ xử lý nước thải.....</i>	9
<i>Hình 1.3. Ứng dụng của vỏ trấu và than sinh học từ trấu.....</i>	20
<i>Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu.....</i>	25
<i>Hình 3.1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn.....</i>	32
<i>Hình 3.2. Sự đối kháng nhau của các chủng vi sinh vật lựa chọn.....</i>	34
<i>Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng vi khuẩn</i>	36
<i>Hình 3.4. Các mẫu chế phẩm được lên men ở các nhiệt độ khác nhau.....</i>	37
<i>Hình 3.5. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm lên men ở các nhiệt độ khác nhau sau 72 h với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10%.....</i>	38
<i>Hình 3.6. Chế phẩm thu được sau quá trình lên men xốp</i>	41
<i>Hình 3.7. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10%.....</i>	42
<i>Hình 3.8. Mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn trong màng sinh học sau 7 ngày nuôi trên dầu DO (n=3).</i>	43
<i>Hình 3.9. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét của biochar và chế phẩm vi sinh thu được ở độ phóng đại 5000 lần</i>	44
<i>Hình 3.10(A). Mẫu nước ô nhiễm dầu DO 1, 3, 5 và 10% tại thời điểm bắt đầu bổ sung chế phẩm (mẫu số 6).....</i>	47
<i>Hình 3.10(B). Mẫu nước ô nhiễm dầu DO 1, 3, 5 và 10% sau 7 ngày bổ sung chế phẩm (mẫu số 6)</i>	47
<i>Hình 3.11. Khả năng phân hủy hydrocarbon no tổng số của các mẫu sau 7 ngày thử nghiệm.....</i>	47
<i>Hình 3.12. Khả năng phân hủy anthracene của các mẫu sau 7 ngày</i>	49
<i>Hình 3.13. Sắc ký đồ của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với anthracene.....</i>	50
<i>Hình 3.14. Khả năng phân hủy naphthalene của các mẫu sau 7 ngày.....</i>	51

<i>Hình 3.15. Sắc ký đồ chế phẩm sau 7 ngày xử lý với naphthlene.....</i>	<i>52</i>
<i>Hình 3.16. Khả năng phân hủy phenanthrene của các mẫu sau 7 ngày</i>	<i>53</i>
<i>Hình 3.17. Sắc ký đồ của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với phenanthrene.....</i>	<i>53</i>
<i>Hình 3.18. Khả năng phân hủy pyrene của các mẫu sau 7 ngày.....</i>	<i>55</i>
<i>Hình 3.19. Sắc ký đồ của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với pyrene.....</i>	<i>55</i>
<i>Hình 3.20. Hiệu suất phân hủy một số hydrocarbon thơm trong dầu diesel của chế phẩm</i>	<i>58</i>

MỞ ĐẦU

Hiện nay, vấn đề ô nhiễm môi trường nói chung và ô nhiễm dầu nói riêng đang là một trong những vấn đề đáng quan tâm trên toàn cầu. Yêu cầu đặt ra là cần phải có những giải pháp bảo vệ môi trường hiệu quả và bền vững. Tại Việt Nam, một số công nghệ xử lý ô nhiễm dầu đã được áp dụng (như tuyển nổi, lắng lọc, chưng cất) và có hiệu quả nhất định. Các phương pháp này có ưu điểm là xử lý nhanh, tuy nhiên quá trình xử lý không được triệt để và thường tạo ra các sản phẩm phụ thứ cấp ảnh hưởng tới môi trường xung quanh đồng thời đòi hỏi đầu tư ban đầu lớn, diện tích nhiều hoặc phải dùng năng lượng và hóa chất thường xuyên cũng như có nguy cơ gây ô nhiễm thứ cấp. Phương pháp phân hủy sinh học sử dụng các chủng vi sinh vật và các chất có hoạt tính sinh học do vi sinh vật sản sinh ra đã được sử dụng ngày càng rộng rãi do hiệu quả cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường. Đặc biệt, đối với các vi sinh vật có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm) thì hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm cao hơn khi ở dạng tế bào tự do.

Màng sinh học (biofilm) là một tập hợp các vi sinh vật bám trên một bề mặt của vật thể rắn hoặc bề mặt chất lỏng, tạo thành lớp màng bao phủ bề mặt đó. Khu hệ vi sinh vật trong biofilm có khả năng chống chịu các điều kiện khắc nghiệt của môi trường (sự thay đổi về pH, nhiệt độ, sự thẩm thấu hay sự mất nước của tế bào, v.v...) tốt hơn, hỗ trợ trao đổi chất tốt hơn và hạn chế sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác từ đó làm tăng hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm khi xử lý ngoài hiện trường. Do vậy, công nghệ sử dụng biofilm đã được ứng dụng thành công trong xử lý nước thải ô nhiễm dầu tại một số nước trên thế giới và hứa hẹn trở thành một công nghệ mới đem lại hiệu quả kinh tế cao và thân thiện với môi trường.

Đa số các chủng vi sinh vật sẽ hình thành biofilm dưới mọi điều kiện mà chúng có thể sinh trưởng được. Một số yếu tố như pH, nhiệt độ, nồng độ muối, chất dinh dưỡng, đặc tính bề mặt, đặc tính tế bào, tốc độ dòng chảy và tín hiệu liên hệ giữa các tế bào đều ảnh hưởng tới sự hình thành và tồn tại của màng sinh học. Trong các yếu tố kể trên thì đặc tính bề mặt là một trong những yếu tố quyết định tới sự hình thành và ổn định của biofilm. Việc bổ sung các loại giá thể giúp tăng khả năng bám dính của vi sinh vật từ đó tăng diện tích tiếp xúc giữa vi sinh vật và các chất ô nhiễm và làm tăng hiệu quả

xử lý. Việc lựa chọn giá thể cần đảm bảo được các yêu cầu như: tải trọng nhỏ, diện tích bề mặt tiếp xúc trên một đơn vị thể tích lớn, độ nhám cao, có độ bền phù hợp (không bị ăn mòn, hòa tan, phản ứng...) với các hợp chất hòa tan trong nước. Bề mặt tiếp xúc của chất mang càng lớn thì càng tạo điều kiện tối ưu cho quá trình sinh trưởng phát triển và tạo biofilm của vi sinh vật, từ đó làm tăng hiệu quả xử lý.

Trong các loại giá thể thì than sinh học (biochar) là một loại giá thể còn tương đối mới ở Việt Nam. Biochar là các chất dạng xốp, giàu thành phần carbon, có nguồn gốc từ các chất hữu cơ trải qua quá trình nhiệt phân thiếu hoặc không có oxy. Do khả năng hấp phụ mạnh, biochar thường được dùng để xử lý các chất ô nhiễm khác nhau khỏi nước thải. Các chất gây ô nhiễm có thể được hấp phụ bao gồm các kim loại như Pb, Cu, Zn, As, Ni và Cd và các hợp chất hữu cơ như thuốc trừ sâu và phenol. Với các đặc tính ưu việt, biochar thường được sử dụng làm chất mang trong xử lý môi trường. Sự hấp phụ trên biochar có thể được coi là một phương pháp khả thi do hiệu quả cao, chi phí thấp, dễ áp dụng và sản phẩm phụ nhỏ hơn so với các phương án truyền thống và có thể dễ dàng áp dụng trong nhiều điều kiện địa hình khác nhau.

Hiện nay, đã có nhiều công bố trên thế giới về khả năng hấp thụ các hợp chất hydrocarbon dầu mỏ có trong đất và nước nhiễm dầu bởi biochar. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu bằng biochar cũng như sử dụng biochar làm chất mang cho các vi khuẩn tạo biofilm để tăng hiệu quả xử lý đất/nước nhiễm dầu còn hạn chế. Vì vậy, nếu thành công trong việc sử dụng các chủng vi khuẩn vừa tạo biofilm, vừa có khả năng phân hủy/chuyển hóa các thành phần của dầu, đồng thời sử dụng biochar có nguồn gốc từ trấu để làm giá thể sẽ không chỉ giúp xử lý ô nhiễm dầu hiệu quả, thân thiện với môi trường, tiết kiệm chi phí mà còn tận dụng được nguồn tài nguyên, sinh vật phong phú của Việt Nam. Do vậy, dựa trên thực trạng ô nhiễm dầu hiện nay tại Việt Nam, tôi nhận thấy được tiềm năng cũng như tính thiết thực của việc thực hiện đề tài ***“Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu”***. Điểm khác biệt chính của chế phẩm này so với các sản phẩm khác trên thị trường là sự kết hợp của cả 3 phương pháp vật lý (cơ chế

hấp phụ), hóa học (sự chuyển hóa các chất) và sinh học (sử dụng vi sinh và giá thể sinh học), tận dụng được lượng lớn phế thải nông nghiệp, thân thiện với môi trường và có thể được sử dụng trong môi trường đất và nước ô nhiễm dầu.

Mục tiêu nghiên cứu:

Tạo ra được chế phẩm sinh học dạng rắn để xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo biofilm trên biochar có nguồn gốc từ trấu.

Nội dung nghiên cứu:

- Nội dung 1: Sàng lọc các chủng vi khuẩn tạo biofilm và có khả năng phân huỷ các thành phần hydrocarbon tốt.

- Nội dung 2: Nghiên cứu một số điều kiện lên men của các vi khuẩn tạo biofilm trên biochar có nguồn gốc từ trấu như nhiệt độ, độ ẩm (tỉ lệ phối trộn).

- Nội dung 3: Đánh giá hiệu quả xử lý một số thành phần hydrocarbon no và thơm của chế phẩm tạo thành với nồng độ dầu đưa vào ban đầu từ 1-10%.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. HIỆN TRẠNG Ô NHIỄM DẦU TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM

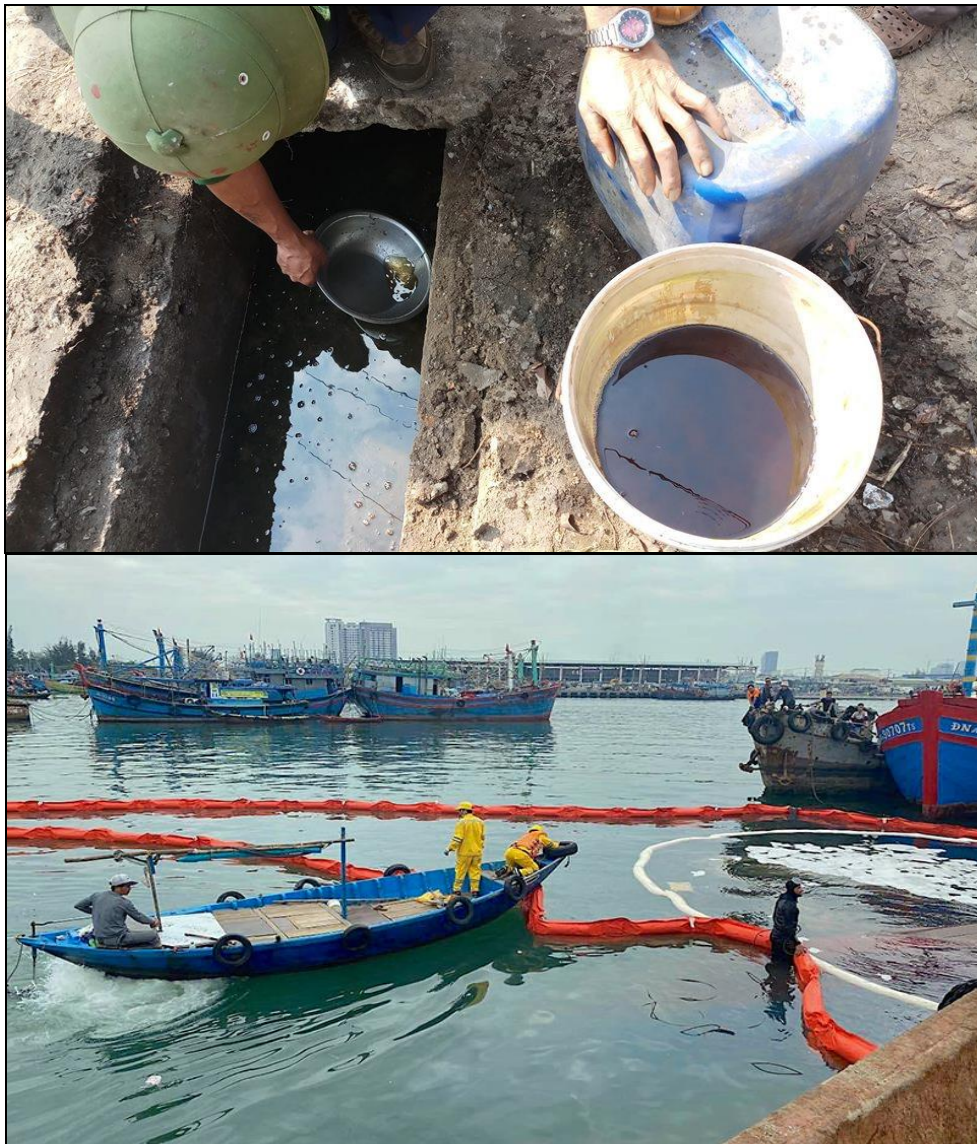
Hiện nay, ngành công nghiệp khai thác và chế biến dầu trên thế giới đang là ngành công nghiệp trọng điểm mang lại lợi ích kinh tế - xã hội rất lớn. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển không ngừng của ngành dầu khí, vấn đề ô nhiễm môi trường do dầu và các sản phẩm của nó gây ra đang ở mức báo động [1]. Ở đâu có sự xuất hiện của các nhà máy hóa dầu thì ở đó có sự gia tăng ô nhiễm môi trường. Không chỉ gây ô nhiễm nguồn nước ngầm mà đất cũng bị ô nhiễm do các bể chứa dầu, đường ống dẫn hoặc các sự cố rò rỉ, tràn dầu [2, 3].

Theo thống kê, chỉ tính riêng trong năm 2022, tổng lượng dầu tràn trên toàn thế giới lên tới 15.000 tấn. Trong đó, có 3 vụ tràn dầu lớn (trên 700 tấn) và 4 vụ tràn dầu trung bình (7-700 tấn) xảy ra tại Bắc Mỹ, Châu Á và Châu Phi. Tình trạng này được dự báo có thể sẽ còn tiếp tục gia tăng trong các năm tiếp theo [3].

Dầu thường có chứa hàng ngàn các hợp chất khác nhau, nhưng phần lớn là các hydrocarbon no có số carbon từ 2 đến 26 và các hydrocarbon thơm như hydrocarbon đa vòng (PAH), phenol, benzene, v.v. [4]. Do đó, dầu thường có độc tính cao và tương đối bền vững trong môi trường nước [5]. Yin và cộng sự (2009) đã chỉ ra rằng tùy thuộc vào các loại dầu mà độc tính và tác động của nó đến hệ sinh thái là khác nhau. Dầu nhiễm trong nước thải nhiễm sẽ gây ô nhiễm nguồn nước và tác động xấu đến môi trường sinh thái, đặc biệt là nguồn lợi thủy sản và tài nguyên nước [6]. Các hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) thường có trong dầu, không tan trong nước, ít bay hơi, có ái lực hấp phụ mạnh với các chất hữu cơ trong đất. Do đó, PAH có thể tích tụ dưới trầm tích, đất đá theo thời gian và là một trong số chỉ số quan trọng đánh giá ô nhiễm đất [7]. PAH ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme trong đất, có thể được sử dụng để đánh giá các đặc tính của vi sinh vật trong đất. Hoạt tính của các enzyme đất là một trong những thông số được sử dụng để đánh giá chất lượng đất bị ô nhiễm bởi các hợp chất hữu cơ, bao gồm PAH [2]. Do tính chất kỵ nước nên khi thấm vào đất, dầu đẩy nước ra ngoài làm giảm lượng nước và oxy trong đất, gây tổn hại nghiêm trọng đến hệ sinh thái. Ngoài ra, dầu còn làm thay đổi kết cấu và đặc tính lý hóa tính của đất, khiến các hạt keo

đất tro ra và không còn khả năng hấp thụ và trao đổi. Ô nhiễm đất ở mức độ độc hại cao có thể dẫn đến sự biến mất của các sinh vật, do đó làm vô hiệu hóa quá trình tự thanh lọc của môi trường đất [7]. Bên cạnh đó, khi dầu thấm qua đất xuống mạch nước ngầm có thể gián tiếp gây ô nhiễm nguồn nước ngầm. Các chất ô nhiễm này không chỉ làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng, làm suy giảm chất lượng môi trường nước và không khí mà còn đặc biệt gây nguy hại tới sức khỏe con người [8].

Để giải quyết vấn đề trên, các quy trình xử lý như cơ học, vật lý, sinh học đã được áp dụng tại nhiều nơi trên thế giới. Trong đó, quá trình xử lý sinh học là một trong những quá trình thường được xử lý sau các quá trình vật lý hay hóa học trước đó vì xử lý được triệt để, thân thiện với môi trường và có chi phí thấp [9].



Hình 1.1. Một số hình ảnh ô nhiễm dầu tại Việt Nam.

Nguồn: <https://xulydau.com/thong-ke-nhung-vu-tran-dau-o-viet-nam/> [10].

Tại Việt Nam, ô nhiễm dầu hiện đang là một vấn đề nóng và được cả xã hội quan tâm. Dầu khí là một trong những ngành công nghiệp quan trọng của Việt Nam. Theo thống kê của Tập đoàn dầu khí Việt nam (PVN), tính đến năm 2022, ngành dầu khí tại nước ta đã khai thác được hơn 420 triệu tấn và hơn 160 tỷ mét khối khí. Riêng PVN trung bình hàng năm đóng góp hàng trăm nghìn tỷ đồng vào ngân sách nhà nước, chiếm 20% đến 25% (giai đoạn 2006 – 2015) và 10% (giai đoạn 2015 – 2022) tổng thu ngân sách nhà nước trung ương [11].

Việt Nam là nước đứng thứ tư về khai thác dầu khí ở khu vực Đông Nam Á (chỉ đứng sau Malaysia, Indonesia, Philippine) và xếp thứ 44 trong danh sách các nước sản xuất dầu lửa trên thế giới. Theo thống kê từ năm 1987 đến nay, đã xảy ra hơn 90 vụ tràn dầu, gây ra tổn thất lớn về sinh thái và kinh tế xã hội. Trong đó, có ba nguyên nhân chính dẫn đến sự cố tràn dầu là do va chạm, quá trình bốc dỡ và đắm tàu. Lượng dầu tràn gây ô nhiễm biển Việt Nam trong năm 1992 là 7.380 tấn, năm 1995 là 10.020 tấn và theo mức độ gia tăng của vận tải biển, khai thác dầu khí và công nghiệp hóa, năm 2000 lên đến 17.650 tấn [12].

Theo thống kê của Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế, từ năm 2005 đến năm 2014, Việt Nam là một trong ba quốc gia (cùng với Trung Quốc và Hoa Kỳ) có số lượng sự cố tràn dầu nhiều nhất trong số 39 quốc gia được thống kê. Một số vụ tràn dầu lớn tại nước ta trong những năm gần đây có thể kể đến như: sự cố chìm tàu chở dầu Đức Cường 06 tại vùng biển Nghệ An (2017); sự cố tràn dầu từ cây xăng tại Thanh Hóa (2018); sự cố chìm tàu tại Đà Nẵng (2021). Lượng dầu tràn được dự báo sẽ tiếp tục tăng mạnh trong các năm tiếp theo. Đặc biệt, ở các đô thị lớn, nơi tập trung dân cư đông đúc như thành phố Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh, thực trạng ô nhiễm dầu càng nghiêm trọng [10].

Trong những năm gần đây, do các sự cố tràn dầu hoặc do sự thiếu ý thức của một số cá nhân, tổ chức khiến cho tình trạng nước và đất bị nhiễm dầu tại một số khu vực của Việt Nam ngày càng trầm trọng. Chỉ cần một lượng rất nhỏ hàm lượng các thành phần có trong dầu như styrene, naphthalene, pyrene, phenol... cũng đe dọa trầm trọng tới sức khỏe cộng đồng. Từ những con số và ví dụ trên, ta có thể thấy rằng vấn đề ô nhiễm dầu đang là một vấn đề gây bức xúc toàn cầu, ảnh hưởng lớn tới môi trường, sinh

vật và đời sống kinh tế - xã hội của con người. Đứng trước những hiểm họa đó đòi hỏi phải có một phương pháp giải quyết toàn diện và triệt để, cần sự nghiên cứu của nhiều nhà khoa học kết hợp với sự phát triển của công nghệ và chính sách từ Nhà nước cũng như sự hợp tác giữa các đơn vị khai thác, chế biến, vận chuyển và kinh doanh dầu mỏ trên toàn thế giới. Do vậy, vấn đề cấp thiết đặt ra là rất cần có các sản phẩm để xử lý nước và đất bị ô nhiễm dầu.

Một số phương pháp xử lý nước thải nhiễm dầu đã được áp dụng (như vật lý, cơ học, hóa học) và có hiệu quả nhất định tại Việt Nam [5]. Tuy nhiên, các phương pháp này thường không xử lý triệt để được ô nhiễm đồng thời đòi hỏi chi phí xây dựng, lắp đặt và vận hành lớn hoặc phải dùng lượng lớn năng lượng, hóa chất và cũng có nguy cơ gây ô nhiễm thứ cấp cho môi trường. Trong khi đó, việc sử dụng các sản phẩm sinh học sẽ giải quyết triệt để được vấn đề đó bởi sản phẩm cuối cùng của các con đường này là CO_2 và H_2O , an toàn cho môi trường. Đây được coi là phương pháp thân thiện với môi trường và có chi phí thấp [9, 13]. Trong số các quy trình phân hủy sinh học, biofilm được xem là quy trình xử lý ô nhiễm dầu hiệu quả, an toàn và chi phí thấp, do đó đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi tại nhiều quốc gia trên thế giới [14].

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG MÀNG SINH HỌC

1.2.1. Tình hình nghiên cứu của màng sinh học trên thế giới và Việt Nam

Biofilm là một cấu trúc liên kết phức tạp của các tế bào và các sản phẩm của chúng, chẳng hạn như các polymer ngoại bào tạo thành các hạt lơ lửng trong môi trường nuôi cấy hoặc được gắn trên một bề mặt vật thể rắn [15]. Biofilm có thể được hình thành trên nhiều bề mặt khác nhau bao gồm các mô của tế bào sống, các dụng cụ y tế, các hệ thống ống xử lý nước thải công nghiệp hoặc các hệ thống nước trong tự nhiên. Các tế bào vi sinh vật trong biofilm có mật độ liên kết cao, liên kết với nhau một cách chặt chẽ, tạo thành một cấu trúc bền vững. Vì thế chúng có khả năng đồng hóa, trao đổi chất, phân hủy các hydrocarbon xảy ra nhanh và mạnh mẽ hơn tế bào ở dạng đơn lẻ. Mặt khác, khi tồn tại ở dạng biofilm, vi sinh vật có khả năng thích nghi với môi trường tốt hơn nhờ sự hỗ trợ trao đổi chất hiệu quả và hạn chế sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác [16].

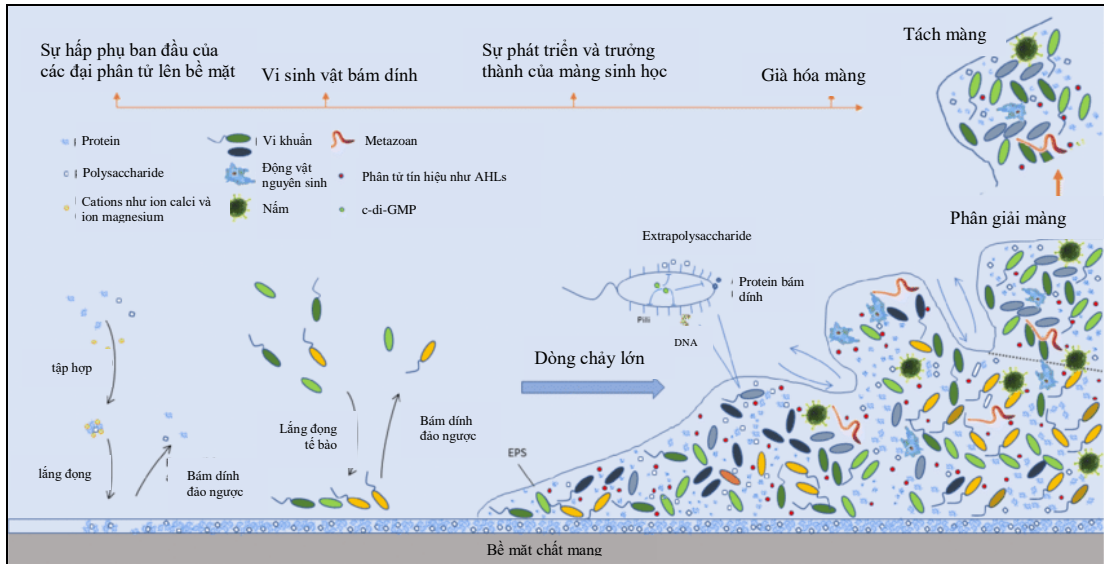
Biofilm được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như bảo vệ thực vật, hạn chế sự ăn mòn, xử lý sinh học hoặc xử lý ô nhiễm [17, 18]. Trong xử lý sinh học, biofilm cho hiệu quả cao và an toàn hơn các phương pháp sử dụng vi sinh vật dạng huyền phù. Các tế bào trong biofilm dễ dàng thay đổi để thích ứng và tồn tại, đặc biệt trong điều kiện khắc nghiệt, giống như chúng được bảo vệ trong khung polymer ngoại bào [19]. Với mật độ sinh khối cao, mối quan hệ gần gũi, các tương tác vật lý và sinh lý hỗ trợ giữa các vi sinh vật trong biofilm mà việc sử dụng các chất độc hại tốt hơn thông qua khả năng cố định các hợp chất nhờ hấp phụ sinh học, sự tích lũy sinh học và sự khoáng hóa sinh học. Vì vậy, biofilm được ứng dụng trong xử lý sinh học theo nhiều hướng như: xử lý các hợp chất hydrocarbon, xử lý ô nhiễm kim loại nặng và chất phóng xạ, xử lý ô nhiễm dầu, xử lý đất và trầm tích bị ô nhiễm vì dư lượng NAPLs (Nonaqueous phase liquids – các chất lỏng ở pha không chứa nước),... [20, 21].

1.2.1.1. Trên thế giới

Ngày nay, các kỹ thuật ứng dụng biofilm đã chứng tỏ ưu điểm về khả năng hấp phụ, bám dính và phân hủy/chuyển hóa các chất gây ô nhiễm tốt hơn so với các kỹ thuật khác. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng biofilm trong xử lý nước thải hay còn gọi là công nghệ lọc sinh học – biofilter [22]. Các ứng dụng này bao gồm biofilm tấm bùn ngược dòng (Biofilm upflow sludge blanket – BUSB), biofilm tầng sôi (Biofilm fluidized bed – BFB), biofilm tấm bùn dạng hạt mở rộng (expanded granular sludge blanket – EGSB). Bản chất của công nghệ xử lý nước thải này chủ yếu là nhờ bùn hoạt tính làm từ biofilm nên gọi là “particle biofilm”. Đây là quá trình xử lý bằng biofilm với sinh khối phát triển trên giá thể lơ lửng, mà những giá thể lơ lửng này có thể di chuyển tự do và được giữ lại bên trong bể phản ứng. Một trong những yếu tố quyết định trong quá trình này là diện tích tiếp xúc của các giá thể có lớp biofilm dính bám trên bề mặt. Những giá thể này được thiết kế sao cho có được bề mặt tiếp xúc lớn nhất, từ đó tạo điều kiện tối ưu cho vi sinh vật hoạt động và tiếp xúc với các chất dinh dưỡng [23].

Ngoài ra, biofilm còn được sử dụng hiệu quả trong các bể phản ứng sinh học (bioreactor) [1]. Đây được xem là kỹ thuật có tiềm năng trong công nghệ làm sạch với chi phí thấp. Dựa trên cơ sở xây dựng các bể phản ứng sinh

học này, các công nghệ đã được đưa ra và áp dụng tại nhiều quốc gia như các bể phản ứng biofilm MBR (membrane bioreactor), các bể phản ứng biofilm chuyển động ngang (moving bed biofilm reactor – MBBR), các bể phản ứng biofilm tầng sôi (fluidized bed biofilm reactor – FBBR), bể lọc sinh học nhỏ giọt (tricking filter – TF) và các MFC (microbial fuel cell) [23, 24].



Hình 1.2. Sự hình thành và phát triển của biofilm trong công nghệ xử lý nước thải. Nguồn: Huang Hui et al., 2019 [25].

Ngoài ra, biofilm còn được ứng dụng hiệu quả trong các hệ thống xử lý mùi tại một số quốc gia như Mỹ, Hà Lan, Đức, Nhật Bản. Trong phương pháp này, biofilm tạo thành từ các vi sinh vật có khả năng phân hủy các chất khí có mùi và các hợp chất hữu cơ bay hơi có nồng độ thấp. Lớp biofilm mỏng và ẩm được dùng để bao quanh các nguyên liệu lọc. Khi khí thải đi qua hệ thống lọc, các chất ô nhiễm trong khí thải sẽ bị các vật liệu lọc và biofilm hấp thụ. Tại đây, các vi sinh vật sẽ sử dụng chúng làm nguồn carbon để tạo năng lượng và sinh trưởng. Các sản phẩm cuối cùng của quá trình này thường là khí CO_2 và H_2O , do đó an toàn với môi trường. Trong xử lý khí thải, biofilm thường đạt hiệu quả cao hơn 90% đối với khí thải có nồng độ các chất ô nhiễm < 1000 ppm. Ngày nay, ngoài ứng dụng để xử lý mùi của hệ thống nước thải, hệ thống biofilm còn được ứng dụng rộng rãi trong xử lý các chất ô nhiễm khác nhau [21, 26].

Gần đây, nghiên cứu của các nhà khoa học tại Mỹ đã công bố một loại biofilm mới được ứng dụng để xử lý nước và phân tán thuốc. Điểm nổi trội

của các biofilm này là có độ thấm cao hơn đáng kể so với các màng thấm thấu ngược đang dùng trong quá trình khử muối và làm sạch nước [27].

Nhìn chung, với nhiều ưu điểm như hiệu quả xử lý cao, chi phí xây dựng và vận hành thấp, thân thiện với môi trường, thiết kế dễ dàng và phù hợp với nhiều điều kiện và quy mô xử lý nên hệ thống biofilm được ứng dụng rộng rãi trong xử lý mùi cũng như các hợp chất gây ô nhiễm [22, 25].

1.2.1.2. Tại Việt Nam

Tại Việt Nam, những nghiên cứu về ứng dụng biofilm trong xử lý nước thải nói chung và xử lý nước thải nhiễm dầu nói riêng còn rất hạn chế. Những nghiên cứu mới được thực hiện trong những năm gần đây và chỉ tập trung vào một vài tác giả. Tác giả Nhi Công và cộng sự (2011) đã đánh giá khả năng phân hủy dầu và hình thành biofilm của một số chủng vi sinh vật được phân lập từ các mẫu nước bị ô nhiễm dầu tại một số vùng biển Việt Nam. Kết quả cho thấy, đã xác định được các chủng thuộc các chi như *Candida*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*... là những chủng vừa tạo biofilm vừa có khả năng phân huỷ và chuyển hoá các thành phần dầu mỡ rất tốt. Đặc biệt, sau 24 giờ nuôi cấy, các chủng vi sinh vật tạo biofilm cho thấy khả năng xử lý cá thành phần hydrocarbon tốt hơn ở dạng tế bào tự do. Như vậy có thể thấy được tiềm năng phong phú về chủng loại vi sinh vật vừa tạo biofilm vừa phân huỷ và chuyển hoá hydrocarbon trong các mẫu đất và nước bị ô nhiễm dầu ở Việt Nam [28].

Ngoài ra, năm 2016, Hoàng Phương Hà và cộng sự đã nghiên cứu phát triển công nghệ biofilm trong xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm ammonium [29]. Năm 2009, Đỗ Khắc Uẩn và cộng sự đã nghiên cứu ứng dụng hệ thống màng lọc vật lý gồm các đơn nguyên màng vi lọc (kích thước lỗ 0,22 μm) để xử lý nitrogen, phosphorus và các chất ô nhiễm trong nước thải đô thị [30].

Có thể nói công nghệ sử dụng chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm tại Việt Nam đã được nghiên cứu từ lâu, tuy nhiên, việc lựa chọn được vật liệu mang phù hợp đảm bảo hiệu quả xử lý, thân thiện với môi trường và chi phí thấp còn hạn chế. Nghiên cứu này tập trung vào nguồn nguyên liệu là than sinh học đảm bảo đầy đủ các yếu tố trên, và điểm khác biệt chính so với các

ngiên cứu trước đó là chế phẩm ở dạng rắn nên có thể dễ dàng ứng dụng trong các điều kiện địa lý khác nhau.

1.2.2. Ứng dụng màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu

1.2.2.1. Cơ sở khoa học của ứng dụng của màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu

Biofilm được xem như là một chiến lược thích nghi và sinh tồn quan trọng của vi sinh vật. Khi môi trường trở nên khắc nghiệt, vi sinh vật hình thành biofilm, do khi tồn tại ở dạng biofilm chúng có thể hấp thụ được các chất dinh dưỡng tốt hơn, tạo được mối liên hệ giữa các tế bào với nhau và hạn chế được sự cạnh tranh của các vi sinh vật khác, từ đó chúng có thể thích nghi tốt hơn với môi trường [31].

❖ Vai trò của vi sinh vật trong phân hủy dầu

Dầu mỏ là một hỗn hợp các hợp chất hữu cơ có khả năng gây ô nhiễm môi trường. Thành phần chủ yếu của dầu mỏ là các hợp chất hydrocarbon nên dễ bị vi sinh vật phân hủy trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí [32]. Nhiều công bố đã chỉ ra rằng, có thể tìm thấy các vi sinh vật phân hủy dầu trong các hệ sinh thái khác nhau và vô cùng đa dạng về chủng loài [33, 34]. Các chi vi khuẩn phân hủy dầu như: *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*..., các chi xạ khuẩn như: *Streptomyces* sp., *Actinomyces* sp..., các chi nấm như: *Allescheria*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Hansenula*..., và một số loài tảo khác [32].

Vai trò của các nhóm vi sinh vật sử dụng dầu thể hiện rất khác nhau trong các môi trường khác nhau. Mỗi loại vi sinh vật chỉ có thể phân hủy mạnh một vài hydrocarbon khác nhau. Không một vi sinh vật riêng lẻ nào có khả năng chuyển hóa tất cả các loại hydrocarbon có trong thành phần dầu mỏ [35]. Vì vậy việc sử dụng biofilm – tập hợp các vi sinh vật sẽ giúp tăng cường hiệu quả loại bỏ các thành phần hydrocarbon có trong dầu.

❖ Cơ chế phân hủy hydrocarbon nhờ vi sinh vật

Nhiều nghiên cứu về cơ chế phân huỷ các hydrocarbon của vi sinh vật đã được thực hiện. Vi sinh vật sử dụng hydrocarbon làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển. Việc sử dụng các hydrocarbon của vi sinh vật có thể xảy ra theo hai hướng [36]:

- Đối với một số các hydrocarbon tan trong nước, vi sinh vật có thể hấp thụ trực tiếp.
- Đối với các hydrocarbon khó tan mà có thể tan dưới dạng nhũ tương dầu - nước thì quá trình phân huỷ vi sinh theo trình tự các bước: đầu tiên là hòa tan các hydrocarbon dưới dạng nhũ tương dầu nước, sau đó vi sinh vật tiếp xúc với dầu, cuối cùng nó tiết ra các enzyme để chuyển hoá các hydrocarbon thành các chất mà nó có thể sử dụng được.

Nhìn chung, các hydrocarbon khác nhau bị phân huỷ bởi nhiều loại vi khuẩn và bằng nhiều con đường khác nhau [36].

Ngoài ra, các nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành thử nghiệm và tạo biofilm từ các chủng nấm men có khả năng phân huỷ một số thành phần dầu mỏ. Nghiên cứu của nhóm tác giả Guieysse và cộng sự (2000) đã công bố kết quả về việc sử dụng hệ thống biofilm để xử lý các hợp chất hydrocarbon như acenaphthene, phenanthrene và pyrene [37].

1.2.2.2. Một số ứng dụng của màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu

Hiện nay, phương pháp phân huỷ sinh học đã được ứng dụng thành công trong ngành công nghiệp dầu khí và xử lý nước thải ô nhiễm dầu [1, 38]. Phương pháp xử lý ô nhiễm bằng phân huỷ sinh học là phương pháp an toàn, chi phí thấp và có thể áp dụng ở các qui mô rất lớn ngoài tự nhiên. Sản phẩm cuối cùng của phân huỷ sinh học thường là các chất khí (CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2S), các chất vô cơ (NH_4^+ , PO_4^{3-}) và sinh khối vi sinh vật. Các sản phẩm này không độc hại và không gây ô nhiễm thứ cấp cho môi trường [39]. Ngoài ra, các chủng vi sinh vật tạo biofilm này thường có khả năng chuyển hóa các thành phần dầu mỏ rất tốt nên việc ứng dụng biofilm trong ngành công nghiệp dầu khí và xử lý ô nhiễm hứa hẹn trở thành một công nghệ mới đem lại hiệu quả kinh tế cao và thân thiện với môi trường [16].

Một trong những nghiên cứu đầu tiên về khả năng phân huỷ các thành phần hydrocarbon của biofilm là của Teh và Lee (1973) đã sử dụng 2 chủng vi khuẩn tạo biofilm được phân lập trong các kho xăng tại Úc và cho thấy chúng có khả năng phân huỷ tốt các thành phần n-alkane từ C_{13} - C_{18} [40]. Năm 1989, Prince và Morton chứng minh lớp biofilm hình thành giữa dầu và nước có khả năng phân cắt dầu thành các hạt nhỏ hơn, nhờ đó chúng có thể dễ dàng

phân hủy và chuyển hóa các thành phần dầu mỏ. Các chủng vi sinh vật tạo biofilm này có khả năng sử dụng các loại nhiên liệu như xăng máy bay, dầu diesel,... rất tốt [41].

El-Masry và cộng sự (2004) đã chứng minh các vi sinh vật tạo biofilm thường thuộc các chi *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Neurospora*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, v.v., có khả năng sử dụng hydrocarbon có trong dầu mỏ làm nguồn carbon và năng lượng. Do đó, các nhóm vi sinh vật này đã được nghiên cứu để ứng dụng trong việc loại bỏ ô nhiễm dầu trong nước và đất [42].

Liu và cộng sự (2013) đã ứng dụng biofilm đa chủng vi khuẩn thuộc bộ *Bacillales* và *Rhodobacterales* trong công nghệ tấm bùn kỵ khí ngược dòng (Upflow anaerobic sludge blanket – UASB) để xử lý nước thải nhiễm dầu, hiệu quả xử lý đạt 74% COD, 94% ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) và 98% chất rắn lơ lửng [43]. Biofilm của hai chủng vi khuẩn chịu lạnh phân lập từ nước biển được ứng dụng trong xử lý các thành phần dầu DO cho hiệu quả xử lý đạt trên 85% sau 60 ngày xử lý ở 20°C [44]. Các chủng vi sinh vật tạo biofilm có khả năng phân hủy hầu hết các thành phần alkanes, cycloalkanes, alkenes trong dầu thành các sản phẩm đơn giản là CO_2 và nước nên không chỉ đem lại hiệu quả xử lý mà còn an toàn với môi trường và hệ sinh thái [45].

Trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu và công bố về các chủng vi sinh vật tạo biofilm nhằm ứng dụng trong xử lý các hydrocarbon thơm như benzen, naphthalen, phenol, toluen, xylen, v.v. [46, 47]. Biofilm của các chủng vi khuẩn phân lập ở bắc cực thuộc các chi *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* được ứng dụng để xử lý các thành phần hydrocarbon thơm độc hại trong dầu. Biofilm các chủng vi sinh vật này có khả năng phân hủy lên tới 20 $\mu\text{g/ml}$ pyrene và 39 $\mu\text{g/ml}$ phenanthrene sau 60 ngày xử lý [48]. Kumar và cộng sự (2008) đã ứng dụng công nghệ MBR (membrane bioreactor) sử dụng biofilm chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* để xử lý toluene, hiệu quả xử lý đạt 99% sau 44 ngày với nồng độ toluene ban đầu là 4 g/m^3 [49].

Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các điều kiện môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, pH,.. có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất xử lý dầu của các vi sinh vật. Vì vậy, để đạt được hiệu quả xử lý dầu cao nhất, tùy thuộc vào các chủng vi

khuẩn lựa chọn và các điều kiện thực tế mà các điều kiện để lên men hay sản xuất (nhiệt độ, độ ẩm,..) các chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu có thể khác nhau. Hiện nay, trên thế giới đã có một số công bố về nhiệt độ tối ưu để cho các vi sinh vật phân hủy dầu đạt hiệu suất phân hủy hydrocarbon tối đa [50, 51]. Forhad Hossain và cộng sự (2022) đã chỉ ra điều kiện tối ưu để cho 3 chủng vi sinh vật *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., and *Enterobacter* sp. sinh trưởng tối ưu tại 37°C, pH 7.0 sau 48 giờ và có khả năng phân hủy cả dầu DO 4% và dầu máy 8% [50]. Vào năm 2017, nhóm nghiên cứu của Parach đã công bố kết quả khả năng phân hủy hydrocarbon tổng số có trong dầu của chủng *Rhodococcus ruber* KE1 đạt hiệu suất cao nhất là 90%, sau 7 ngày khi được sinh trưởng trong điều kiện môi trường tối ưu ở nhiệt độ 40°C, pH 8,5 và 1% dầu thô [52].

Cho tới nay, chưa có nhiều nghiên cứu trong nước về việc sử dụng các chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm trên đó. Trong khi đó, các công bố trên thế giới đã cho thấy việc sử dụng vi sinh vật tạo biofilm trên chất mang đã làm tăng đáng kể hiệu suất phân huỷ/chuyển hoá các chất ô nhiễm [53, 54]. Việc sử dụng chất mang (xơ dừa, sỏi nhẹ, mút polymer tổng hợp) đã được sử dụng tại Việt Nam để xử lý ô nhiễm dầu mỏ ở trong nước, tuy nhiên, chưa có nhiều công bố về các chế phẩm sinh học dạng rắn.

Các vật liệu mang được ưu tiên sử dụng thường là những vật liệu có giá thành thấp, thân thiện với môi trường và có thể phân hủy thứ cấp. Trong đó, than sinh học (biochar) được coi là một chất mang tiềm năng do đặc tính xốp, hàm lượng carbon cao và có thể được sản xuất từ nhiều nguồn nguyên liệu phong phú và giá thành rẻ. Nhờ đó, biochar có khả năng giữ nước và hấp phụ các chất ô nhiễm hiệu quả, đồng thời giúp cải thiện chất lượng đất, tăng năng suất cây trồng nên được mệnh danh là “vàng đen” trong lĩnh vực nông nghiệp và môi trường. Ngoài ra, biochar còn có khả năng khử mùi tốt do đó đặc biệt thích hợp để ứng dụng trong xử lý các hợp chất có trong dầu mỏ thường là các hợp chất dễ bay hơi và có mùi độc hại [55].

1.3. THAN SINH HỌC VÀ ỨNG DỤNG

1.3.1. Khái niệm than sinh học (biochar)

Than sinh học (biochar) là một chất xốp có các gốc carbon và có nguồn gốc từ quá trình nhiệt phân sinh khối các loại chất thải, xác động, thực vật,... dưới điều kiện hạn chế oxy hoặc không có oxy [4]. Biochar có thể được tạo ra từ quá trình nhiệt phân ở nhiệt độ vừa phải, 350-800°C với thời gian lưu khác nhau, từ vài phút đến vài ngày. Ngoài ra, có thể dùng phương pháp khí hóa để sản xuất biochar. Tuy nhiên, quá trình nhiệt phân chậm sẽ cho hiệu suất biochar cao hơn (30%) so với nhiệt phân nhanh (12%) hoặc khí hoá (10%) [56].

1.3.2. Một số ứng dụng của than sinh học

Gần đây, biochar được xem như là công nghệ tiềm năng cho việc xử lý môi trường nhờ vào các đặc tính hấp thụ các chất ô nhiễm cao, diện tích bề mặt riêng lớn và có khả năng trao đổi ion tốt [4, 57]. Các nghiên cứu đã chứng minh khả năng của biochar để ứng dụng như một chất hấp thụ “môi trường xanh”. Biochar có khả năng làm sạch đất và nước bị ô nhiễm bởi các tạp chất hữu cơ và vô cơ. Tuy nhiên, một loại biochar có thể không thích hợp cho việc xử lý tất cả các chất gây ô nhiễm [4]. Các đặc tính hóa lý của biochar có thể thay đổi phụ thuộc vào nguyên liệu và điều kiện nhiệt phân được sử dụng trong quá trình sản xuất. Hai yếu tố này làm thay đổi đáng kể các tính chất hóa lý như diện tích bề mặt, độ phân cực, tỷ lệ nguyên tử, pH, thành phần nguyên tố, do đó làm thay đổi tính chất bề mặt tổng thể của biochar [4, 58-60]. Những thay đổi trong các đặc tính của biochar có ý nghĩa quan trọng đối với tính phù hợp và hiệu quả của nó trong việc xử lý các chất ô nhiễm mục tiêu.

Nhìn chung, biochar được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực xử lý môi trường. Các ứng dụng của biochar trong xử lý ô nhiễm đất và nước được tổng hợp trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Các ứng dụng của than sinh học trong xử lý ô nhiễm đất và nước.

Nguồn: Ahmad Mahtab et al., 2014 [4].

Loại ô nhiễm	Loại biochar	Môi trường	Cơ chế tác động
<i>Các chất hóa học nông nghiệp</i>			
Atrazine	Phân bón từ nhà máy sữa (450°C)	Đất	Hấp thụ
Atrazine	Phân bón từ nhà máy sữa (200°C)	Nước	Hấp thụ vào C hữu cơ
Atrazine và simazine	Rác thải từ thực vật (450°C)	Nước	Sự hút bám và phân chia
Chloropyrifos và carbofuran	Gỗ nhỏ (450 và 850°C)	Đất	Sự hút bám do diện tích bề mặt cao và các lỗ rỗng có kích thước nano
Chloropyrifos và fipronil	Rơm (450 và 850°C)	Nước	Sự hút bám do diện tích bề mặt cao và các vi lỗ
Deisopropylatrazine	Rác thiêu (350 và 700°C)	Nước	Hấp thụ do diện tích bề mặt cao và có các nhóm thơm; hấp thụ trên các phần không có nhóm carbon
Pentachlorophenol	Tre (600°C)	Đất	Khuếch tán và phân chia
Pentachlorophenol	Tro gạo	Đất	Hấp thụ do diện tích bề mặt cao và vi lỗ
Pyrimethanil	Gỗ nhỏ (450 và 850°C)	Nước	Hấp thụ do diện tích bề mặt cao và vi lỗ
Simazine	Gỗ cứng (450 và 600°C)	Đất	Hấp thụ do số lượng vi lỗ nhiều
Norflurazon và fluridone	Cỏ và gỗ (200-600°C)	Nước	Hấp thụ trên pha C vô định hình
<i>Các chất kháng sinh</i>			
Sulfamethazine	Gỗ cứng (600°C)	Nước	Hấp thụ do tương tác của các electron π - π giữa chất cho –

Loại ô nhiễm	Loại biochar	Môi trường	Cơ chế tác động
			chất nhận; lực liên kết Hydro
Sulphamethoxazole	Tre (450 và 600°C)	Nước	Hấp thụ
Tylosin	Gỗ cây hồ tiêu (450 và 600°C) Rác bã cây mía (450 và 600°C) Gỗ cây sồi (450 và 600°C) Gỗ cứng và các đoạn gỗ mềm (850 và 900°C)	Đất	Hấp thụ
Tetracycline	Tro gạo (450 - 500°C)	Nước	Sự hình thành các tương tác π - π giữa cấu trúc vòng của phân tử tetracycline và các biochar dạng graphit
Các hợp chất hydrocarbon khác			
Thuốc nhuộm	Tro gạo và tro cây mì	Nước	Liên kết tĩnh điện và các liên kết hydro bên trong phân tử
Catechol và acid humic	Gỗ cứng, gỗ mềm và cỏ (250, 400 và 600°C)	Nước	Hấp thụ nhờ các lỗ nano
m-Dinitrobenzene	Thân cây dừa (100-700°C)	Nước	Khuếch tán và phân chia
Tím methyl	Phế phụ phẩm nông nghiệp	Nước	Liên kết tĩnh điện; liên kết giữa các nhóm OH, COOH có trong phân tử
Naphthalene	Thân cây dừa (100-700 °C)	Nước	Khuếch tán và phân chia
Naphthalene	Vỏ cam (250, 400 và 700°C)	Nước	Khuếch tán và phân chia

Loại ô nhiễm	Loại biochar	Môi trường	Cơ chế tác động
Naphthalene và 1-naphthol	Vỏ cam (150 - 700°C)	Nước	Khuếch tán và phân chia
Nitrobenzene	Thân cây dừa (100-700°C)	Nước	Khuếch tán và phân chia
Phenanthrene	Thân cây dừa (100-700°C)	Nước	Bẫy dính vào các vi lỗ và trung lỗ trên biochar
Phenanthrene	Đậu nành (300-700°C)	Đất	Phân chia
p-Nitrotoluene	Vỏ cam (250, 400 và 700 °C)	Nước	Hấp thụ và phân chia
PAHs	Gỗ cứng	Đất	Hấp thụ và phân hủy sinh học
PAHs	Bùn	Đất	Phân chia
Pyrene	Thân ngô (600°C)	Nước	Hấp thụ nhờ các lỗ có kích thước nano
Pyrene	Chất thải rắn (400-700°C)	Nước	Hấp thụ
Trichloroethylene	Đậu nành (300 và 700°C) Vỏ lạc (300 và 700°C)	Nước	Hấp thụ

1.3.3. Ứng dụng than sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu

Ngày nay, biochar đã được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực xử lý môi trường. Đặc biệt, biochar còn được chứng minh là có thể phân hủy các thành phần hydrocarbon dầu mỏ có trong đất và nước. Cho tới nay, đã có nhiều công bố trên thế giới về khả năng hấp thụ các hợp chất hydrocarbon dầu mỏ có trong đất và nước nhiễm dầu bởi biochar. Chẳng hạn như biochar được sử dụng để xử lý một số thành phần hydrocarbon khó phân hủy như naphthalene, phenanthrene [60], PAH [61, 62], pyrene [63].

Năm 2016, Chen và cs đã sử dụng biochar từ tre để làm chất mang cho vi khuẩn *Acinetobacter venetianus* tạo biofilm và sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học dầu diesel (DO). Kết quả cho thấy, sau 3 ngày nuôi cấy, 94% lượng dầu đã được loại bỏ với hàm lượng ban đầu là 200 mg/l.

Trong khi đó, ở dạng tế bào tự do, chủng vi khuẩn này chỉ loại bỏ được 82 % [15].

Bên cạnh đó, Oleszczuk và cs (2012) cũng công bố rằng biochar có khả năng hấp phụ 0-57% các hợp chất hydrocarbon thơm đa vòng không tan trong bùn tùy thuộc vào lượng biochar được sử dụng [64]. Ngoài ra, các công bố còn cho thấy các hợp chất gây ô nhiễm môi trường khác như chất phóng xạ, kim loại nặng,... cũng được loại bỏ nhờ các vi sinh vật tạo biofilm trên biochar [65].

Như vậy, có thể thấy rằng, việc sử dụng các phế phụ phẩm nông nghiệp để tạo biochar làm chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm vừa giải quyết được vấn đề gây ô nhiễm môi trường bởi các phế phụ phẩm này, vừa tăng cường khả năng hấp thụ và loại bỏ các chất gây ô nhiễm khác trong môi trường. Đồng thời, đây được xem là giải pháp có hiệu quả kinh tế lại thân thiện với môi trường.

Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố ở Việt Nam về hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu bằng các chế phẩm sử dụng chất mang là biochar. Đối với đất nhiễm dầu, việc sử dụng biochar còn tốn nhiều thời gian và còn nhiều hạn chế do hệ thống đất và chất thải rắn có tính chất phức tạp. Bên cạnh đó, việc tìm được các điều kiện lên men thích hợp của vi khuẩn tạo biofilm trên biochar như nhiệt độ, độ ẩm (tỉ lệ phối trộn) sẽ mang lại hiệu quả cao nhất trong xử lý ô nhiễm dầu.

1.3.4. Than sinh học có nguồn gốc từ trấu

Nguyên liệu sản xuất biochar rất phong phú và đa dạng từ vỏ đậu phộng, bã mía, vỏ dừa, vỏ ca cao đến cây tre, lau sậy, phế thải từ khai thác rừng, cùng rất nhiều các chất thải xanh khác. Đặc biệt, biochar còn có thể được sản xuất từ vỏ trấu, một phế phẩm gần gũi với người nông dân Việt Nam. Trấu có thể được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, chất độn chuồng gia cầm, phân bón, làm sạch vi khuẩn, chôn lấp hoặc lát nền, nhiên liệu trong đun nấu, vách ngăn và tấm ghép, và năng lượng sinh học [66, 67]. Tuy nhiên, ở Việt Nam trấu thường bị loại bỏ hoặc được dùng để đun nấu nhưng hiệu quả mang lại không đáng kể đồng thời có tác động không nhỏ tới môi trường, nay

với công nghệ sản xuất biochar có thể tận dụng tốt được nguồn nguyên liệu này.

Trải qua quá trình nhiệt phân, biochar sản xuất từ trấu (rice husk biochar – RHB) có thể được ứng dụng trong cải tạo đất, nâng cao năng suất cây trồng, cố định kim loại nặng, giảm rửa trôi nitrate, quản lý chất thải, sản xuất năng lượng, hấp thụ carbon và giảm lượng khí thải N_2O và CH_4 [66, 67]. Thành phần chính của RHB bao gồm carbon (C), hydro (H), oxy (O), N, P, K và silic (Si). Nhiệt độ của quá trình nhiệt phân có thể ảnh hưởng tới tỉ lệ C-H và các nhóm chức trong biochar. Trong khi các nhóm chức silica (Si – OH, Si – O – Si và Si – H) chiếm ưu thế trong các RHB được tạo ra ở nhiệt độ nhiệt phân thấp, các nhóm chức C – H béo và thơm có thể tăng đáng kể khi tăng nhiệt độ nhiệt phân. RHB được tạo ra vẫn giữ nguyên khung silica lớp ngoài của trấu nhưng có cấu trúc rất xốp do các thành phần hữu cơ bao gồm lignin và cellulose được đốt cháy trong quá trình carbon hóa, tạo ra nhiều lỗ và kênh nhờ đó giúp tăng diện tích bề mặt tiếp xúc đáng kể [68].



Hình 1.3. Ứng dụng của vỏ trấu và than sinh học từ trấu. Nguồn: Pode, R. , 2016 và Bodie et al., 2019 [66, 67]

RHB được tạo ra nhờ quá trình nhiệt phân nhanh ở 450°C và với tốc độ 1 tấn/h có diện tích bề mặt đặc hiệu là 34 m²/g, hàm lượng tro 42% và một lượng lớn các nhóm C-O, ví dụ phenolic, hydroxyl và ether moieties làm cho chúng thích hợp để hấp thụ các hợp chất hữu cơ phân cực như các hydrocarbon thơm có trong các thành phần của dầu và dầu mỡ [69].

RHB đã được chứng minh là có tiềm năng lớn trong phát triển nông nghiệp bền vững do vừa giúp cải tạo đất, tăng năng suất cây trồng mà vẫn đảm bảo bảo vệ môi trường [70, 71]. Bên cạnh đó, RHB cũng rất được quan tâm ứng dụng trong lĩnh vực xử lý ô nhiễm. Ưu điểm của RHB dùng trong xử lý ô nhiễm là có diện tích bề mặt tiếp xúc lớn, có khả năng trao đổi cation, và được tạo ra từ nhiều loại nguyên vật liệu khác nhau với các giá trị nhiệt độ nhiệt phân khác nhau, nhờ đó có thể tăng cường khả năng hấp thụ các chất ô nhiễm hữu cơ và vô cơ lên bề mặt của các loại vật liệu này đồng thời giữ lại các chất ô nhiễm [4]. Ngoài ra, nhờ hiệu ứng bẫy dính hoặc nhả carbon vào đất có thể làm tăng khả năng hấp thụ các kim loại nặng như arsen do đó nó duy trì các chất dinh dưỡng cho thực vật. Sự kết hợp của các loại phân bón sinh học (compost), phân bón hóa học và các chất xử lý khác cùng với biochar có thể làm tăng tối đa hiệu quả xử lý các loại đất [68].

Tuy nhiên, hiện nay, chưa có nhiều công bố ở Việt Nam về việc ứng dụng biochar sản xuất từ trấu, một loại phế phụ phẩm nông nghiệp rất phổ biến ở nước ta, làm chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm nhằm tăng cường khả năng loại bỏ dầu DO nói riêng và các thành phần hydrocarbon dầu mỡ nói chung. Do vậy, nghiên cứu này sẽ góp phần đưa ra giải pháp giải quyết bài toán môi trường do phế phụ phẩm nông nghiệp gây ra, đồng thời lại có thể xử lý ô nhiễm do dầu mỡ và các thành phần dầu mỡ.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đề tài tập trung nghiên cứu chủ yếu trên các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu đã được phân lập tại một số địa điểm ô nhiễm dầu tại Việt Nam, được lấy từ Bộ sưu tập chủng vi sinh vật của Phòng Công nghệ Sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Các chủng vi khuẩn phân hủy dầu được phân lập tại Việt Nam

TT	Tên chủng	Địa điểm phân lập
1	<i>Rhodococcus</i> sp. BN5	Hà Nội
2	<i>Pseudomonas</i> sp. BQN21	Quảng Ninh
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> QNG02	Quảng Ngãi
4	<i>Klebsiella</i> sp. VTD8	Vũng Tàu
5	<i>Acinetobacter baumannii</i> QN01	Quảng Ngãi
6	<i>Paracoccus</i> sp. DG25	Hà Nội
7	<i>Pseudomonas</i> sp. B6	Thanh Hoá
8	<i>Ochrobactrum</i> sp. DGP2	Hà Nội
9	<i>Rhizobium</i> sp. DG2	Hà Nội

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật như trên Bảng 2.1.

Chủng *Acinetobacter calcoacetius* P23 được nhóm nghiên cứu của GS. TS. Morikawa, Khoa Khoa học Trái đất Môi trường, Đại học Hokkaido, tặng và được sử dụng làm đối chứng dương

Biochar từ trấu sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Công ty Dabaco (Bắc Ninh), trấu có màu đen, kích thước: 1 x 3 x 0,5 (mm), độ ẩm dưới 10 %; được nhiệt hóa ở nhiệt độ 480-530°C.

2.2.2. Hóa chất, môi trường

➤ Hóa chất

Các hóa chất sử dụng có độ tinh khiết cao, của các hãng Sigma, Merk (Đức).

➤ Môi trường

Các môi trường nuôi cấy được sử dụng có thành phần như trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu

Tên môi trường	Thành phần	Số lượng (g/l)	Thành phần	Số lượng (g/l)
Gost	Na ₂ HPO ₄	0,7	MgSO ₄	0,4
	KH ₂ PO ₄	0,3	NaCl	1
	KNO ₃	3	pH	6,9 - 7,2
MPA	NaCl	5	Cao thịt	3
	Peptone	10	pH	7 - 7,2
LB	Tryptone	10	NaCl	10
	Cao nấm men	5		

2.2.3. Trang thiết bị

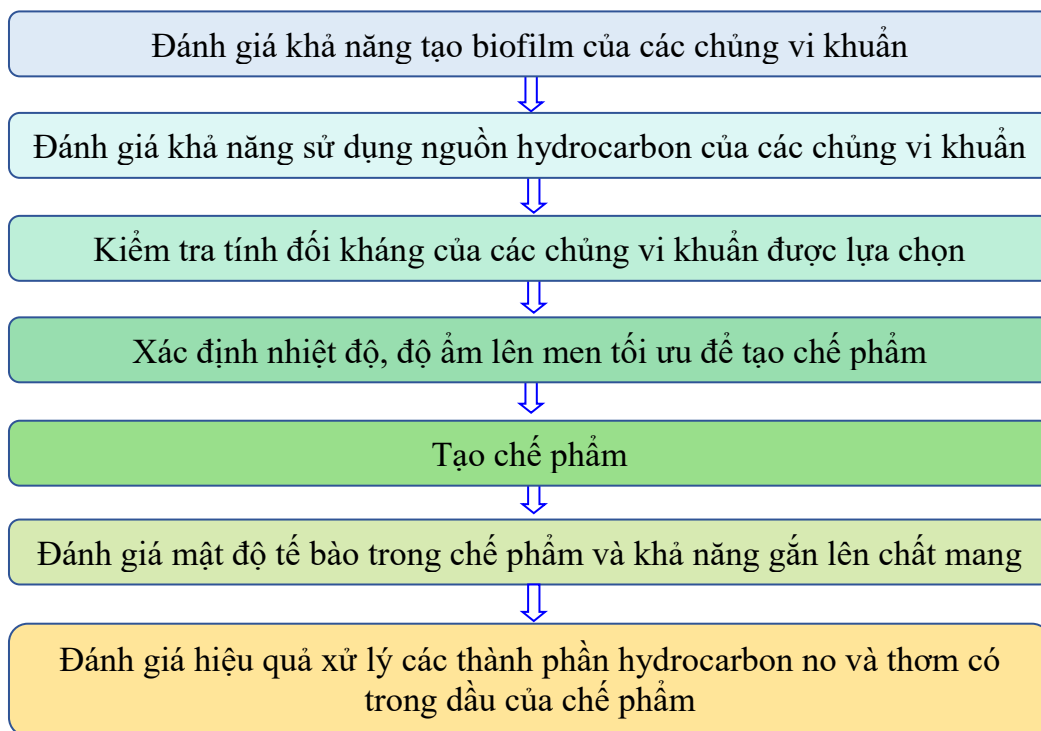
Các trang thiết bị dùng trong nghiên cứu được liệt kê dưới Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Tên thiết bị	Hãng/nước sản xuất
Cân kỹ thuật BJ 610C	Precisa, Thụy Sĩ
Hệ thiết bị quang phổ hấp phụ phân tử vùng tử ngoại – khả kiến UV- VIS GBC- CINTRA 40	GBC, Mỹ
Kính hiển vi điện tử quét S-4800	Hitachi, Nhật Bản
Kính hiển vi Eclipse LV-UDM	Nikon, Nhật Bản
Lò vi sóng NN-S215WF	Panasonic, Trung Quốc
Máy chuẩn pH-CyberScan pH 620	Eutech, Singapore
Máy đo quang phổ UV-1601-220V	Shimadzu, Nhật Bản
Máy làm đá	CamLab, Mỹ
Máy ly tâm eppendorf 5417R	Eppendorf, Đức
Máy phân tích HPLC Hewlett-Packard	HP Hewlett-Packard, Đức
Máy vortex BR-2000	Biorad, Mỹ
Nồi hấp tiệt trùng MC – 30L	Alp, Nhật Bản
Tủ ấm và tủ lắc nuôi cấy NB205QF	N – Biotek, Hàn Quốc
Tủ cấy vô trùng AVC-4A1	Esco, Singapore
Tủ lạnh sâu -80 °C MDF-192	Sanyo, Nhật Bản
Tủ lạnh SJ-169S-DS	Sharp, Thái Lan
Tủ sấy dụng cụ JSOF - 100	Jsr, Hàn Quốc

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tiến trình các bước nghiên cứu được minh họa bởi sơ đồ sau:



Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn

Các chủng vi sinh vật được đánh giá khả năng tạo biofilm theo mô tả của Morikawa và cộng sự (2006) và O'Toole và Kolter (1998) [15, 72].

Nguyên lý:

Thành tế bào vi khuẩn trong biofilm có khả năng bắt giữ tím tinh thể sau khi nhuộm cố định ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa lại 2 lần bằng nước cất nhằm loại bỏ tím tinh thể bên ngoài, ta bổ sung thêm acid acetic 33% nhằm loại bỏ tím tinh thể còn sót lại ở thành tế bào và sẽ được giải phóng hòa tan vào trong dung môi. Đo OD_{570nm} thể hiện độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch tím tinh thể và tỷ lệ với lượng tím tinh thể được cố định. Đây chính là giá trị đặc trưng cho mật độ tế bào trong cấu trúc biofilm hay khả năng tạo biofilm của chủng vi sinh vật.

Tiến hành:

Nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường MPA dịch thể. Sau 16 giờ nuôi, ly tâm 1 ml loại dịch và thu sinh khối (ly tâm ở 4.000 rpm, 4°C trong

vòng 10 phút, lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy). Hòa tan sinh khối trong 1 ml nước cất vô trùng và tiến hành pha loãng để đạt OD₆₀₀ là 0,3. Thêm 3 µl dịch này vào các ống eppendorf 1,5 ml chứa 297 µl môi trường MPA. Cứ sau 24 giờ, lấy các ống eppendorf chứa mẫu nuôi để đánh giá khả năng tạo biofilm (mỗi chủng tương ứng với 3 ống eppendorf cho mỗi ngày trong 3 ngày liên tiếp). Dùng pipetman hút nhẹ dịch nuôi (không làm vỡ biofilm), rửa bằng 500 µl nước cất vô trùng (lặp lại 2 lần). Sau đó, bổ sung 300 µl dung dịch tím kết tinh 0, % vào các ống eppendorf, cố định 10 phút ở nhiệt độ phòng và rửa 2 lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, bổ sung 300 µl dung dịch acetic acid 33% trộn đều rồi pha loãng và đo OD ở bước sóng 570 nm. Giá trị OD₅₇₀ tỉ lệ thuận với khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.2. Đánh giá khả năng sử dụng nguồn hydrocarbon của chủng vi khuẩn

Để có thể tuyển chọn được các chủng có khả năng phân hủy nguồn hydrocarbon, các chủng vi sinh vật từ bộ sưu tập chủng vi sinh vật của đơn vị sẽ được nuôi cấy ở 30°C từ 5 - 9 ngày trong môi trường khoáng Gost có bổ sung các nguồn hydrocarbon khác nhau như: dầu DO, phenol, hydrocarbon thơm,... Sau đó, tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của chúng bằng cách đo OD ở bước sóng 600 nm. Dựa vào lượng sinh khối tạo ra để lựa chọn các chủng có khả năng sinh trưởng và phân hủy nguồn hydrocarbon tốt.

2.3.3. Kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lựa chọn

Chuẩn bị đĩa petri và môi trường MPA thạch. Tiến hành cấy các chủng giống lên đĩa petri sao cho chúng cắt nhau từng cặp một. Sau khi cấy xong tiến hành nuôi ở 37°C đối với vi khuẩn trong vòng 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, nếu các chủng có sự đối kháng nhau thì vạch cấy sẽ bị gián đoạn tại các vị trí giao nhau của chúng [73].

2.3.4. Nghiên cứu một số điều kiện lên men của các vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu

Bước 1: Xử lý sơ bộ biochar: Biochar trước khi sử dụng được khử trùng ước ở 121°C trong 30 phút để loại bỏ các vi sinh vật ngoại lai, tạo biofilm trên vật liệu mang biochar.

Bước 2: Xác định nhiệt độ lên men phù hợp bằng cách nhân nuôi các chủng vi khuẩn lựa chọn qua đêm trong môi trường LB, nhằm làm tươi mới sinh khối; sau đó được nuôi lắc trong bình tam giác có thể tích 500 ml chứa môi trường LB. Ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 150 rpm trong 10 phút và pha loãng trở lại để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24 giờ nuôi, bổ sung 100 g biochar vào 100 ml môi trường LB và 10 ml hỗn hợp giống (tỉ lệ giống 1:1:1:1). Cho hỗn hợp vào các tủ nuôi cấy có nhiệt độ khác nhau như 30, 35, 40 và 45°C. Sau 24, 48 và 72 giờ lên men, mẫu được lấy ra, đánh giá mật độ tế bào bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc (CFU/ml) và đánh giá hiệu quả phân huỷ dầu DO, từ đó tìm ra các điều kiện lên men thích hợp nhất cho việc tạo chế phẩm.

Bước 3: Xác định độ ẩm của chế phẩm phù hợp bằng cách nhân nuôi các chủng vi khuẩn lựa chọn qua đêm trong môi trường LB, nhằm làm mới chủng, sau đó nuôi lắc trên bình tam giác có thể tích 500 ml chứa môi trường LB. Ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 150 rpm trong 10 phút và pha loãng trở lại để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24 giờ, bổ sung 100 g biochar vào 0, 100, 150 và 200 ml môi trường LB và 10 ml hỗn hợp giống (tỉ lệ giống 1:1:1:1) ở nhiệt độ thích hợp đã được lựa chọn từ Bước 2.

Độ ẩm của chế phẩm được xác định bằng phương pháp Khối lượng theo TCVN 10788:2015. 20 g mẫu thử được nghiền nhỏ, trộn kỹ và đưa ngay khoảng 5 g phần mẫu thử đã nghiền vào chén cân khô, sạch đã biết trước khối lượng (cân trừ bì), chính xác đến 1 mg. Đậy nắp chén và cân ngay, chính xác đến 1 mg. Mở nắp chén cân, đưa chén cùng với nắp vào tủ sấy đã gia nhiệt trước đến nhiệt độ chuẩn hóa ở 105 – 106°C, sấy trong 3 giờ. Đậy nắp và lấy chén cân ra khỏi tủ sấy. Để nguội trong bình hút ẩm ít nhất 20 phút ở nhiệt độ phòng. Cân lại chén cân cùng với lượng chứa trong chén, chính xác đến 1 mg.

Độ ẩm của chế phẩm được xác định như sau:

$$\text{Độ ẩm} = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \times 100\%$$

Trong đó:

V_1 : Khối lượng của phần mẫu thử trước sấy (g)

V_2 : Khối lượng của phần mẫu thử sau sấy (g)

Sau 24, 48 và 72 giờ lên men, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào và hiệu quả phân huỷ dầu DO của chế phẩm ở các độ ẩm đó để tìm ra được điều kiện và thời gian lên men tốt nhất cho chế phẩm tạo thành.

2.3.5. Tạo chế phẩm

Sau khi xác định được nhiệt độ và độ ẩm lên men thích hợp, xây dựng được quy trình sản xuất chế phẩm cụ thể như sau:

Bước 1: Hoạt hoá chủng giống

Các chủng vi khuẩn từ bộ sưu tập chủng giống có khả năng tạo biofilm tốt, sinh trưởng tốt trên các nguồn hydrocarbon lựa chọn và không đối kháng nhau được lựa chọn để hoạt hóa chủng giống tạo chế phẩm.

Chủng giống được hoạt hoá trong điều kiện vô trùng và được kiểm tra độ thuần chủng của từng chủng để tránh bị nhiễm các loại vi sinh vật khác. Chủng giống này sẽ được dùng cho bước nhân giống tiếp theo.

Bước 2: Nhân giống vi sinh vật

Các dịch chủng giống tươi sau đó được chuyển sang các bình tam giác thủy tinh 500 ml chứa 90 ml với môi trường LB với tỷ lệ dịch lên men cấp 1: môi trường là 1:9 (ml/ml) - nghĩa là cho 10 ml dịch lên men cấp 1 vào 90 ml môi trường. Bình được lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28 đến 37°C trong thời gian 24 giờ.

Bước 3: Thu sinh khối

Sinh khối vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm từng dịch lên men vi khuẩn thu được từ bước 2 với tốc độ 4000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 10

phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất đã khử trùng và phối trộn các sinh khối với tỷ lệ bằng nhau, bổ sung dung dịch muối sinh lý để thu dịch vi khuẩn gốc có nồng độ 10^7 CFU/ml.

Bước 4: Thu sản phẩm

Sản phẩm phối trộn được thu bằng cách trộn dịch vi khuẩn gốc, môi trường LB và biochar theo độ ẩm phù hợp đã được xác định ở Mục 2.3.4, sau khi trộn đều, thu được sản phẩm phối trộn; và thu chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học bằng cách lên men sản phẩm phối trộn trong điều kiện đã được xác định ở Mục 2.3.4, lên men phù hợp, đảo trộn theo chu kỳ 6 giờ, để thu được vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học có độ ẩm thích hợp.

2.3.6. Đánh giá mật độ tế bào trong chế phẩm và khả năng gắn lên vật liệu mang

2.3.6.1. Đánh giá mật độ tế bào vi khuẩn trong chế phẩm

Chế phẩm tạo thành được đánh giá mật độ tế bào trước, trong và sau quá trình thử nghiệm với dầu DO. Bố trí thí nghiệm gồm các mẫu sau: từng chủng đơn QN01, DG2, QNG02, BN5; hỗn hợp 4 chủng này không có chất mang biochar và chế phẩm. Các mẫu sau đó được trộn với mẫu đất đã được bổ sung 10 % dầu DO và tiến hành ủ ở 28 – 30°C trong 7 ngày. Tất cả các mẫu đều được kiểm tra mật độ vi sinh tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm và sau 7 ngày.

Mật độ tế bào vi khuẩn trong các mẫu được xác định bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc CFU (colony forming unit).

Để đánh giá được mật độ tế bào có trong 1 g chế phẩm, phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc CFU đã được sử dụng. Cụ thể như sau:

Một gram chế phẩm được hòa trong 9 ml nước muối sinh lý, lắc mẫu từ 1-2 giờ ở nhiệt độ lên men tốt nhất. Hút 0,5 ml mẫu hòa trong 4,5 ml nước muối sinh lý. Mẫu được pha loãng tới hạn và lặp lại mỗi độ pha loãng 3 lần. Sau khi pha loãng tới hạn, hút 0,1 ml từ các nồng độ pha loãng vào đĩa môi trường MPA thạch đã được chuẩn bị trước và tiến hành cấy gọt. Các đĩa sau khi gọt được bao gói cẩn thận và nuôi ở tủ ấm đến khi khuẩn lạc phát triển.

Tiến hành đếm chỉ số số lượng khuẩn lạc ở số mũ cao nhất sau đó dựa vào công thức tính chỉ số khuẩn lạc (CFU/g) như sau:

$$\text{CFU /g} = \text{X} \cdot 10 \cdot 10^n \cdot 10 = \text{X} \cdot 10^{(n+2)}$$

Trong đó: X: là số khuẩn lạc đếm được; 10: độ pha loãng 10 lần

n: số lần pha loãng; 10: 100 µl/1ml

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần

2.3.6.2. Khả năng gắn vi khuẩn lên vật liệu mang than sinh học

Khả năng gắn vi khuẩn lên vật liệu mang than sinh học được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét. Chế phẩm được chuyển lên tấm lamén có kích thước 1 cm² (đã được nhỏ poly-L-lysine 0,1% (w/v) để cố định biofilm). Cố định mẫu trong đĩa 6 giếng vô trùng bằng 2,5 – 3% glutaraldehyde/cacodylate 0,1 M pH 7,2 - 7,4 trong 1 giờ và rửa bằng dung dịch cacodylate 0,1 M (5 phút/lần x 3 lần). Tiếp đó mẫu được cố định mẫu bằng OsO₄ 1% trong cacodylate 0,1 M trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, rửa lại bằng dung dịch cacodylate 0,1 M (5 phút/lần x 2 lần). Hút nước trong mẫu bằng cồn các nồng độ 50°, 70°, 80°, 90°, 100° (5 phút/lần x 2 lần). Gắn mẫu trên giấy bạc, để khô, phủ mẫu bằng một lớp dẫn điện Pt – Pd và soi mẫu, chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử quét S-4800, Hitachi, Nhật Bản. Quá trình này được thực hiện với sự phối hợp của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2.3.7. Đánh giá hiệu quả xử lý các thành phần hydrocarbon no và thơm của chế phẩm tạo thành

Bố trí thí nghiệm như sau:

Mật độ vi sinh vật ở tất cả các mẫu được cân bằng và tính toán sao cho đạt từ 10⁸ – 10⁹ CFU/ml hoặc 10⁸ – 10⁹ CFU/g (đối với biochar).

- Mẫu số 1: từng chủng vi khuẩn tạo biofilm không có chất mang biochar trộn với 100 ml nước có bổ sung 1, 3, 5, 10% dầu diesel; đối với thí nghiệm hydrocarbon thơm, bổ sung 200 mg/l (gọi là mẫu ô nhiễm).
- Mẫu số 2: hỗn hợp các chủng vi khuẩn lựa chọn (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 3: 1 g chế phẩm trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.

- Mẫu số 4: 100 ml mẫu ô nhiễm trộn với 1 g chất mang biochar không có chứa vi khuẩn.
- Mẫu số 5: 100 ml mẫu ô nhiễm không bổ sung vi khuẩn và biochar.

2.3.7.1. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon no của chế phẩm

Đặt các khay chứa các mẫu như trên vào tủ ẩm nhiệt độ từ 28 đến 30°C, sau mỗi 6 giờ đảo trộn một lần. Sau mỗi 24 giờ, lấy mẫu, đánh giá mật độ vi sinh vật và sau 7 ngày mẫu được gửi đi phân tích hàm lượng dầu tổng số trước và sau khi sử dụng chế phẩm.

Hàm lượng dầu trong mẫu được đánh giá bằng phương pháp chiết - khối lượng SMEWW 5520B&F:2017. 1L mẫu cần phân tích (trước và sau khi xử lý) được hòa tan hoàn toàn trong dung môi hexane (quá trình chiết được tiến hành 3 lần). Khi đó, dầu và dung môi sẽ tách làm 2 lớp, dùng phiếu chiết lấy phần dung môi. Loại bỏ toàn bộ dung môi bằng cách chưng cất thông qua hệ thống chưng cất trong bể nước 85°C. Xác định khối lượng ban đầu và khi kết thúc thí nghiệm của lọ đựng mẫu, sẽ tính được khối lượng của dầu mỡ tổng có trong mẫu.

2.3.7.2. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon thơm của chế phẩm

Đặt các khay chứa các mẫu như trên vào tủ ẩm nhiệt độ từ 28 đến 30°C, sau mỗi 6 giờ đảo trộn một lần. Sau 7 ngày, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào của biofilm tạo thành trên biochar và đánh giá hàm lượng hydrocarbon thơm còn lại bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC).

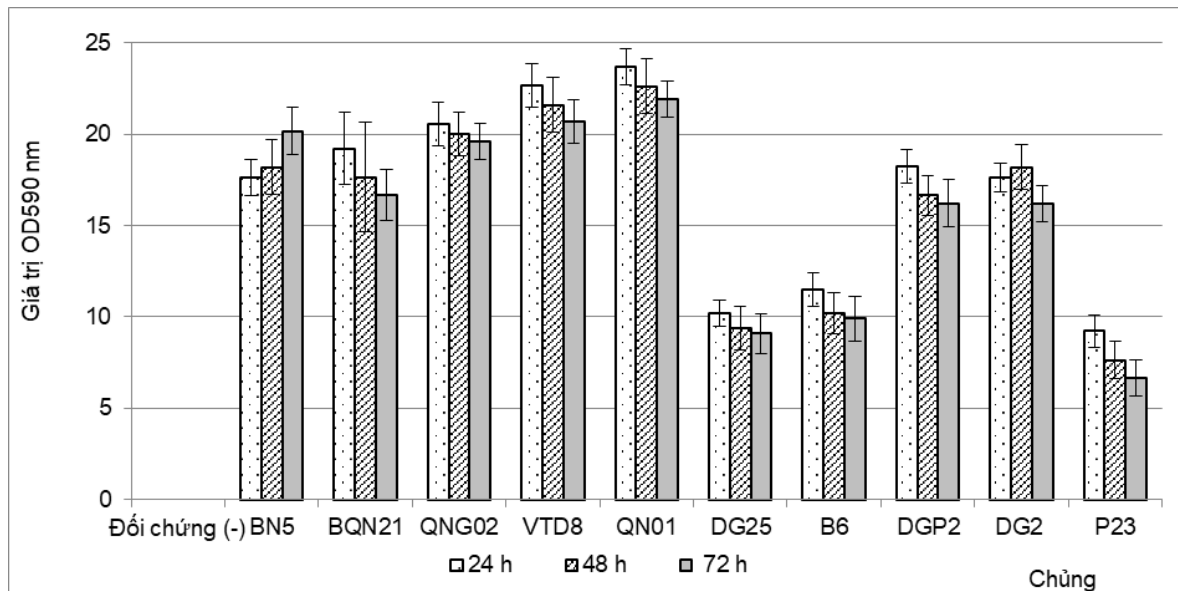
Cách tiến hành như sau:

Mẫu nuôi cấy sẽ được chiết 3 lần bằng dung môi ethylacetat với tỷ lệ 1:1. Phân tích dịch chiết bằng phương pháp HPLC trên máy Hewlett-Packard (Bad Homburg, Germany). Nhờ hệ thống LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5- μ m) column (Merck, Darmstadt, Germany), các sản phẩm của quá trình chuyển hoá các thành phần dầu mỡ sẽ được phân tách. Nồng độ dung môi chạy mẫu ban đầu gồm 30% methanol - 70% phosphoric acid (0.1%), sau 14 phút thì đạt 100% methanol, tốc độ chảy 1 ml/phút. Tùy vào điều kiện cụ thể, các chương trình chạy để phân tích mẫu sẽ có những thay đổi cho phù hợp. Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KHẢ NĂNG TẠO MÀNG SINH HỌC VÀ SINH TRƯỞNG TRÊN CÁC NGUỒN HYDROCARBON CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN

Các chủng vi khuẩn đã được kiểm tra, đánh giá khả năng tạo biofilm. Chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được cung cấp bởi GS Morikawa (trường Đại học Hokkaido, Nhật Bản) là một chủng có khả năng tạo biofilm tốt, đã được sử dụng làm đối chứng dương. Đối chứng âm là ống thí nghiệm không có vi sinh vật. Kết quả theo dõi đánh giá khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn với các thời điểm 24, 48 và 72 giờ đã được thể hiện trên Hình 3.1.



Hình 3.1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn

Kết quả trên Hình 3.1 cho thấy, so với chủng đối chứng dương *Acinetobacter calcoaceticus* P23, cả 9 chủng lựa chọn đều có khả năng tạo màng tốt hơn. Đặc biệt, sau 72 giờ, khả năng tạo biofilm của chủng *Rhodococcus* BN5 không bị giảm đi trong khi các chủng còn lại và chủng P23 đều giảm đi. Tuy nhiên, lượng giảm đi là không đáng kể.

Ngoài ra, các chủng vi khuẩn tạo biofilm trên cũng được đánh giá hiệu suất phân hủy các thành phần hydrocarbon dầu mỡ. Kết quả thể hiện trên Bảng 3.1. Tất cả các chủng đều có khả năng sinh trưởng trên các nguồn hydrocarbon là dầu DO, naphthalene, phenol, pyrene và toluene.

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng trên các nguồn hydrocarbon của các chủng vi khuẩn lựa chọn

TT	Tên chủng	Nguồn cơ chất				
		DO	Naphthalene	Phenol	Pyrene	Toluene
1	<i>Rhodococcus</i> sp. BN5	+++	++	+++	+++	+++
2	<i>Pseudomonas</i> sp. BQN21	+++	+	+++	+	+++
3	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> QNG02	+++	+	+++	++	+++
4	<i>Klebsiella</i> sp. VTD8	+++	++	+++	++	+++
5	<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> QN01	+++	+++	+++	+++	+++
6	<i>Paracoccus</i> sp. DG25	+++	+	+++	+	+++
7	<i>Pseudomonas</i> sp. B6	++	+	++	++	+++
8	<i>Ochrobactrum</i> sp. DGP2	++	+++	+++	+	+
9	<i>Rhizobium</i> sp. DG2	++	+	++	++	+++

(+++ , sinh trưởng rất tốt; ++, sinh trưởng tốt; +, có sinh trưởng)

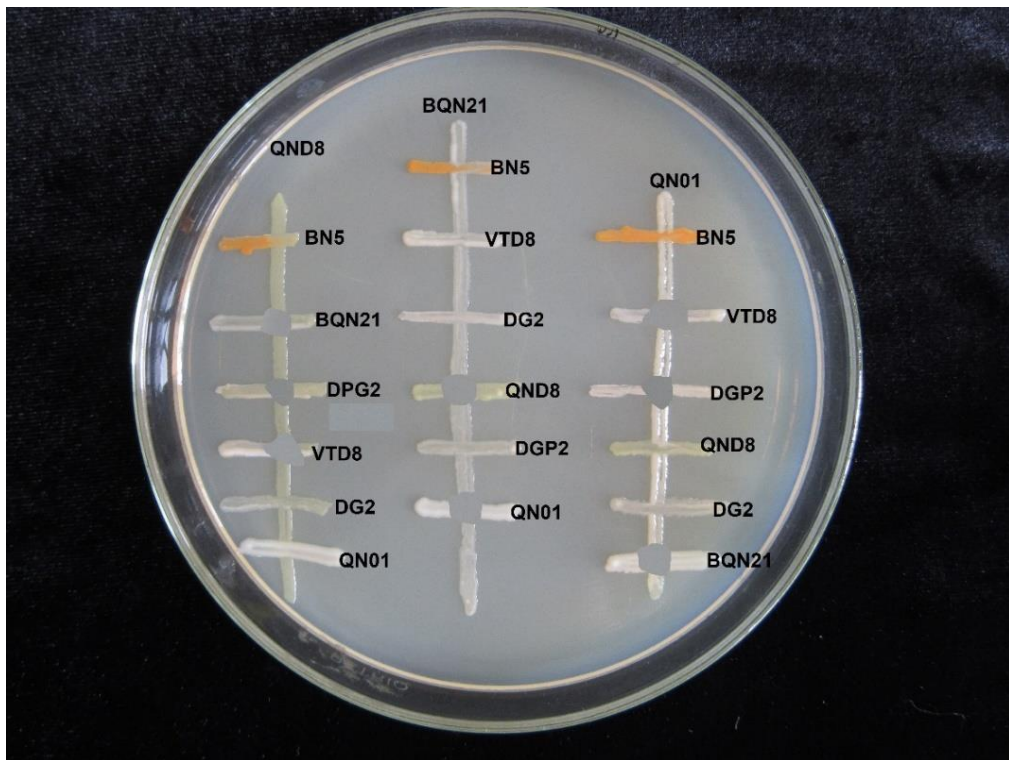
Trong số 9 chủng này, 2 chủng DG25 và B6 có khả năng tạo biofilm không tốt bằng 7 chủng còn lại. Do đó, 7 chủng vi khuẩn gồm BN5, BQN21, QNG02, VTD8, QN01, DGP2 và DG2 vừa có khả năng tạo biofilm tốt vừa có khả năng sử dụng các nguồn hydrocarbon có trong dầu mỡ sẽ được sử dụng trong những nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu của Shimada và cs (2012), Gross và cs (2007) cũng chỉ ra rằng các chi *Pseudomonas*, *Rhodococcus* là các chi có khả năng tạo biofilm tốt. Đặc biệt, chủng *P. stutzeri* T102 còn cho thấy khả năng tạo biofilm hiệu

quả sau 120 giờ nuôi cấy [46, 74]. Vì vậy, có thể nói rằng các chủng vi khuẩn được lựa chọn là phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố.

3.2. KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG LÃN NHAU CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LỰA CHỌN

Mục tiêu nghiên cứu của đề tài là tạo ra chế phẩm biofilm từ hỗn kết hợp các chủng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm và phân hủy tốt các thành phần hydrocarbon nhằm xử lý nước/đất ô nhiễm dầu. Do đó, 7 chủng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm tốt đã được tiến hành đánh giá tính đối kháng. Như đã trình bày trong phần phương pháp, những chủng có tính đối kháng nhau thì vạch cấy sẽ bị gián đoạn tại các vị trí giao nhau của chúng [73]. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.2 và Bảng 3.2.



Hình 3.2. Sự đối kháng nhau của các chủng vi sinh vật lựa chọn

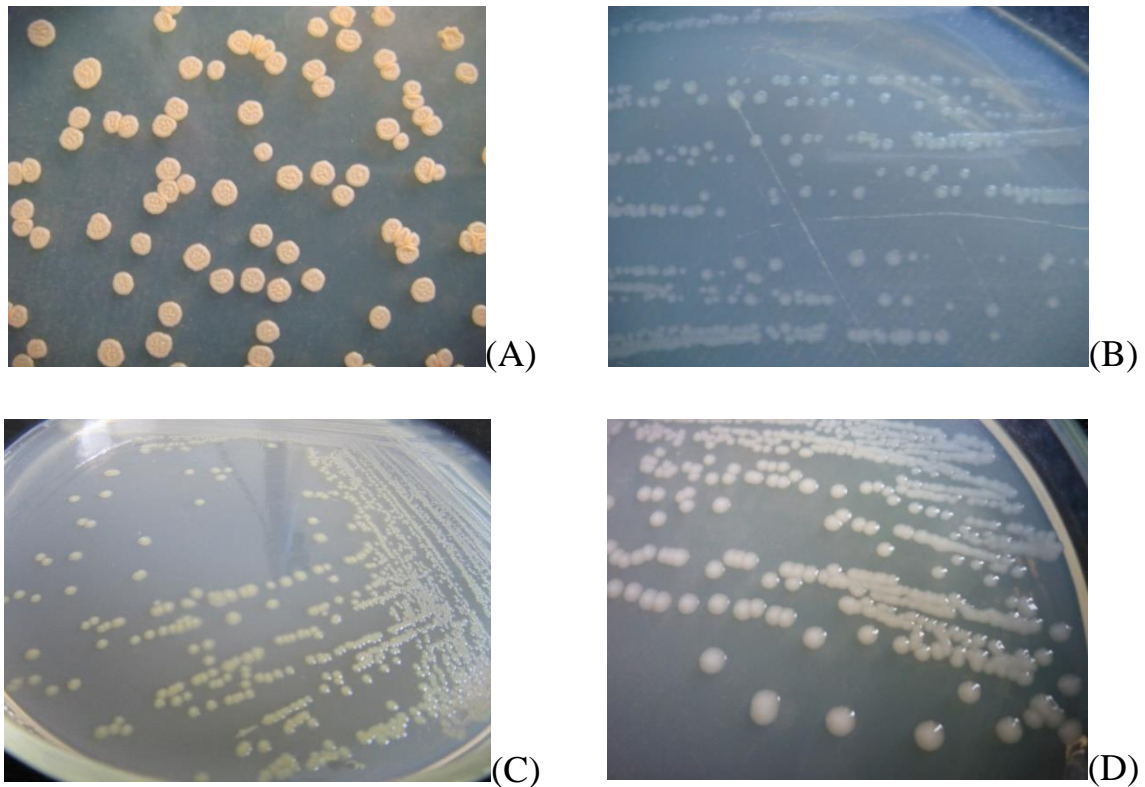
Bảng 3.2. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn

	BN5	BQN21	QNG02	VTD8	QN01	DGP2	DG2
BN5		+	+	+	+	+	+
BQN21	+		-	+	-	+	+
QNG02	+	-		-	+	-	+
VTD8	+	+	-		-	+	+
QN01	+	-	+	-		-	+
DGP2	+	+	-	+	-		+
DG2	+	+	+	+	+	+	

(+), Các chủng không đối kháng nhau; (-), Các chủng đối kháng nhau.

Kết quả cho thấy, các chủng VTD8, BQN21 và DGP2 đối kháng với cả hai chủng QN01 và QNG02; các chủng còn lại không có sự đối kháng lẫn nhau. Do đó, 4 chủng QN01, QNG02, BN5 và DG2 được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

Theo các kết quả kế thừa từ các đề tài trước đó, 4 chủng này đã được định tên là: *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02. Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng được thể hiện ở Hình 3.3.

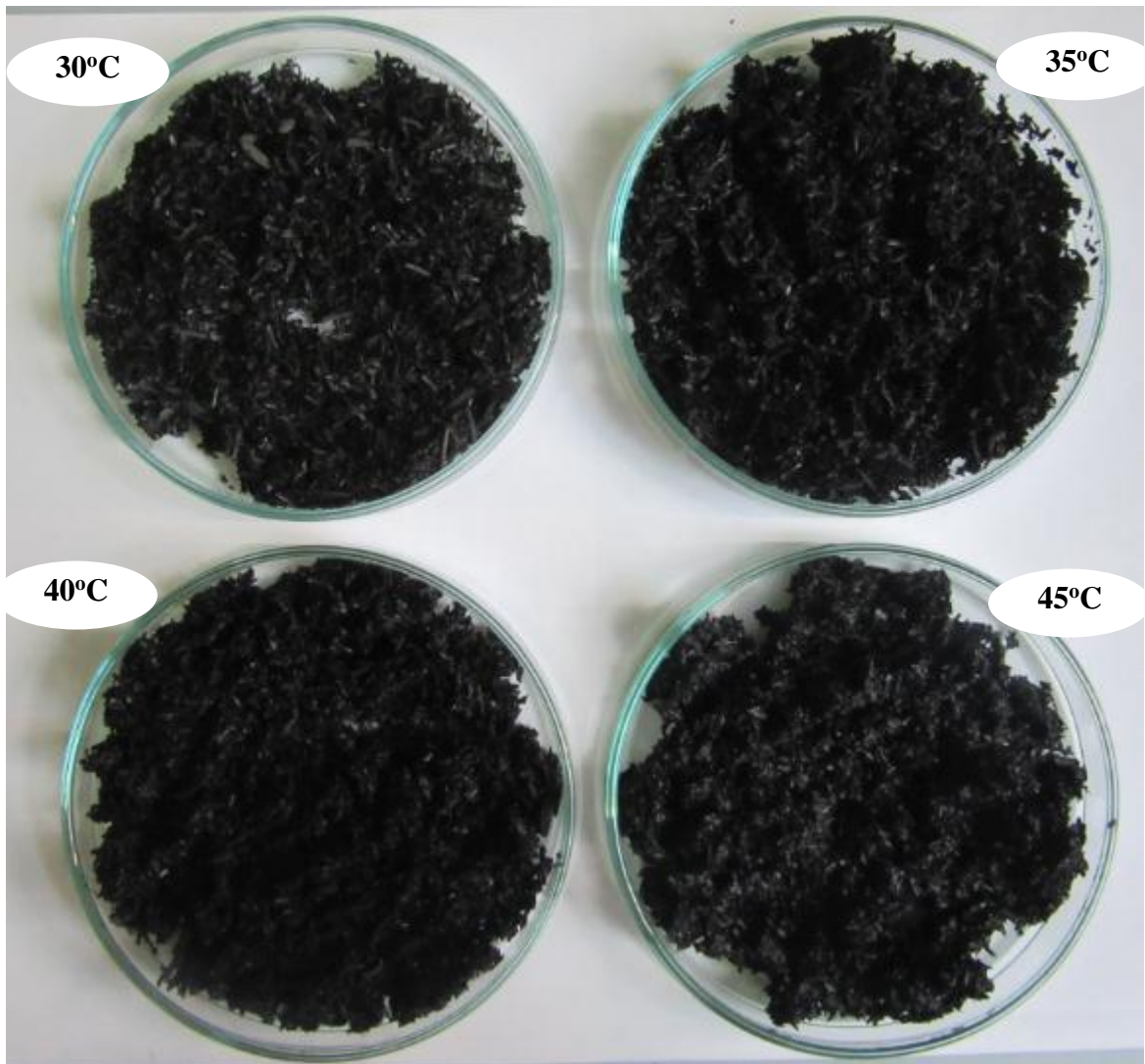


Hình 3.3. Hình thái khuẩn lạc của 4 chủng vi khuẩn: (A) *Acinetobacter baumannii* QN01, (B) *Rhizobium* sp. DG2, (C) *Rhodococcus* sp. BN5 và (D) *Stenotrophomonas* sp. QNG02

3.3. XÁC ĐỊNH NHIỆT ĐỘ LÊN MEN TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU

3.3.1. Lên men ở các nhiệt độ khác nhau

Các chủng vi khuẩn lựa chọn đã được sử dụng để nhân nuôi qua đêm trong môi trường LB, nhằm làm tươi mới sinh khối; sau đó được nuôi lắc trong bình tam giác (có thể tích 500 ml) chứa môi trường LB để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24 giờ nuôi, bổ sung 100 g biochar vào 100 ml môi trường LB và 10 ml hỗn hợp giống (tỉ lệ 1:1:1:1). Cho hỗn hợp vào các tủ nuôi cấy có nhiệt độ khác nhau như 30, 35, 40 và 45°C (Hình 3.4).



Hình 3.4. Các mẫu chế phẩm được lên men ở các nhiệt độ khác nhau

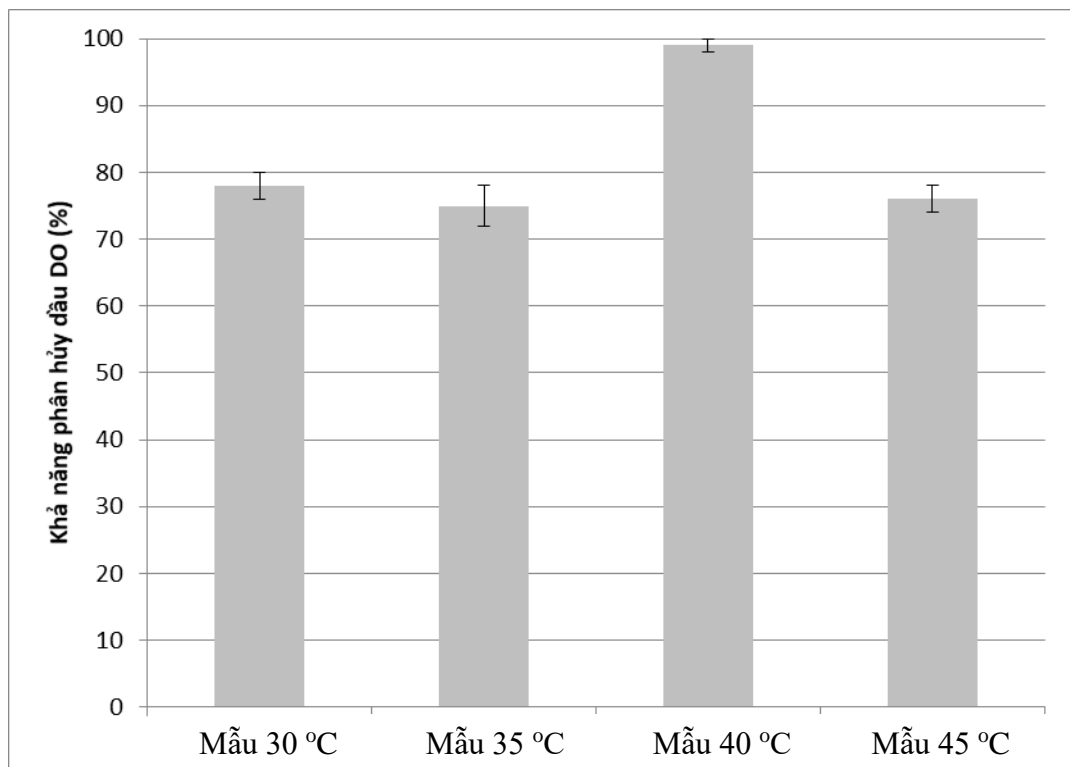
Sau quá trình lên men ở các nhiệt độ khác nhau, mật độ tế bào của các chủng trong chế phẩm đã được xác định sau mỗi 24, 48 và 72 giờ (Bảng 3.3). Kết quả cho thấy, sau 72 giờ lên men, mật độ tế bào trung bình của chế phẩm đạt cao nhất lần lượt là $2,5 \times 10^{10}$; $4,1 \times 10^{10}$; $5,5 \times 10^{11}$ và $3,5 \times 10^{10}$ (CFU/g), tương ứng với các nhiệt độ lên men là 30, 35, 40 và 45°C. Như vậy, có thể thấy, mật độ tế bào của các mẫu đều đạt trên 10^9 (CFU/g). Tuy nhiên, ở nhiệt độ lên men 40°C mật độ tế bào đạt được là cao nhất. Để xác định nhiệt độ lên men nào phù hợp nhất, cần đánh giá hiệu quả phân huỷ dầu của các mẫu chế phẩm này.

Bảng 3.3. Mật độ tế bào của chế phẩm (CFU/g)

Mẫu \ Thời gian	Mẫu 30°C (CFU/g)	Mẫu 35°C (CFU/g)	Mẫu 40°C (CFU/g)	Mẫu 45°C (CFU/g)
24 giờ	$3,1 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$
48 giờ	$1,1 \times 10^{10}$	$7,8 \times 10^9$	$1,7 \times 10^{10}$	$5,6 \times 10^9$
72 giờ	$2,5 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^{10}$

3.3.2. Đánh giá khả năng loại bỏ dầu diesel của các chế phẩm tạo thành ở các nhiệt độ khác nhau

Sau 24, 48 và 72 giờ lấy các mẫu đã được lên men ở các nhiệt độ khác nhau ra để đánh giá khả năng phân hủy dầu diesel (DO) bằng phương pháp phân tích chiết - khối lượng theo tiêu chuẩn SMEWW 5520B&F:2017. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.5 và Bảng 3.4.



Hình 3.5. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm lên men ở các nhiệt độ khác nhau sau 72 h với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10%

Bảng 3.4. Hiệu suất phân hủy dầu DO của chế phẩm (%)

Mẫu Thời gian	Mẫu 30°C (%)	Mẫu 35°C (%)	Mẫu 40°C (%)	Mẫu 45°C (%)
24 giờ	75±3,5	72±2,1	91±1,5	71±3,8
48 giờ	75±2,1	73±1,9	93±2,3	72±2,4
72 giờ	78±2,9	76±4,0	99±1,0	75±2,7

Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu chế phẩm được lên men ở 40°C, 72 giờ có hiệu quả phân hủy dầu DO cao nhất, đạt 99%. Các mẫu được lên men ở các nhiệt độ còn lại cho thấy khả năng phân hủy dầu tổng số thấp hơn đạt từ 74 – 78%. Do đó, kết quả cho thấy đã xác định được nhiệt độ lên men tối ưu để tạo chế phẩm là 40°C.

Hiện nay, trên thế giới đã có một số công bố về nhiệt độ tối ưu để cho các vi sinh vật phân hủy dầu đạt hiệu suất phân hủy hydrocarbon [50, 51]. Forhad Hossain và cộng sự (2022) đã chứng minh điều kiện tốt nhất để cho 3 chủng vi sinh vật *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., và *Enterobacter* sp. sinh trưởng tối ưu tại 37°C, pH 7,0 sau 48 giờ và có khả năng phân hủy cả dầu DO 4% và dầu máy 8% [50]. Vào năm 2017, nhóm nghiên cứu của Parach đã chỉ ra rằng chủng *Rhodococcus ruber* KE1 đạt hiệu suất phân hủy hydrocarbon tổng số có trong dầu của cao nhất là 90%, sau 7 ngày khi được sinh trưởng trong điều kiện môi trường tối ưu ở nhiệt độ 40°C, pH 8,5 và 1% dầu thô [52].

Như vậy có thể thấy rằng, các chủng vi khuẩn phân hủy dầu có khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ tương đối rộng. Do đó, chế phẩm tạo thành tại 40°C rất thuận lợi khi xử lý ngoài hiện trường tại những vùng có điều kiện khắc nghiệt, nhất là vào thời điểm mùa hè khi nhiệt độ ngoài trời thường cao trên 30°C.

3.4. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM LÊN MEN TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU

3.4.1. Lên men ở các độ ẩm khác nhau

Các chủng vi khuẩn lựa chọn đã được sử dụng để nhân nuôi qua đêm, nhằm làm mới chủng; sau đó được nuôi lắc trên bình tam giác có thể tích 500 ml để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24 h, bổ sung 100 g biochar vào 0, 100, 150 và 200 ml môi trường LB và 10 ml hỗn hợp giống (tỉ lệ 1:1:1:1). Bảng 3.5 thể hiện độ ẩm của hỗn hợp sau khi phối trộn. Hỗn hợp được lên men xộp trong 72 giờ để đạt các độ ẩm khác nhau. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.6.

Các chế phẩm tạo thành được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy/chuyển hóa dầu DO. Chế phẩm có độ ẩm phù hợp nhất sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.5. Các độ ẩm khác nhau của chế phẩm thu được

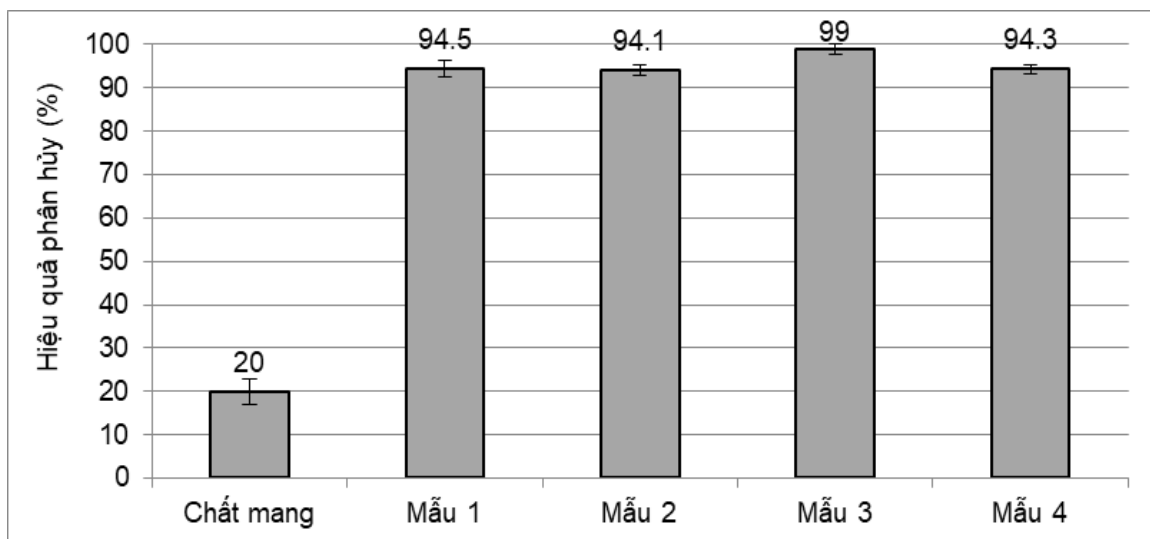
	Độ ẩm (%)	Mật độ vi sinh tổng số (CFU/g)
Mẫu 1 (10 ml giống (tỉ lệ 1:1:1:1))	28,09	$2,1 \times 10^9$
Mẫu 2 (100 ml môi trường và 10 ml giống)	35,13	$5,3 \times 10^9$
Mẫu 3 (150 ml môi trường và 10 ml giống)	40,00	$1,6 \times 10^{10}$
Mẫu 4 (200 ml môi trường và 10 ml giống)	52,95	$2,4 \times 10^9$



Hình 3.6. Chế phẩm thu được sau quá trình lên men xốp. Trong đó: (1), mẫu 1 - Đối chứng không có môi trường; (2), mẫu 2 - bổ sung 100 ml môi trường và 10 ml giống; (3), mẫu 3 - bổ sung 150 ml môi trường và 10 ml giống; và (4), mẫu 4 - bổ sung 200 ml môi trường và 10 ml giống.

3.4.2. Đánh giá khả năng loại bỏ dầu diesel của các chế phẩm than sinh học tạo thành ở các độ ẩm khác nhau

Cân 1 g chế phẩm mỗi loại vào 100 g đất có bổ sung 10 g/kg dầu DO vào bình tam giác 1000 ml. Đảo nhẹ rồi để tĩnh ở 30°C. Sau 7 ngày, tiến hành đánh giá hàm lượng dầu còn lại bằng phương pháp phân tích chiết - khối lượng theo tiêu chuẩn SMEWW 5520B&F:2017. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.7.



Ghi chú: Mẫu 1, 2, 3 và 4 tương ứng với các độ ẩm là 28,09; 35,13; 40 và 52,95%.

Hình 3.7. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10%

Kết quả trên Hình 3.7 cho thấy, chế phẩm mẫu số 3, có độ ẩm 40% cho hiệu quả phân hủy dầu cao nhất (99%). Các mẫu 2 và 4 đều đạt hiệu quả phân hủy hơn 94%. Mẫu đối chứng thể hiện khả năng hấp phụ dầu của biochar lựa chọn (20%).

Kết quả trên cho thấy khi bổ sung lượng môi trường thích hợp để chế phẩm đạt độ ẩm khoảng 40% thì hiệu quả phân hủy dầu tăng lên đáng kể và phân hủy gần như hoàn toàn lượng dầu DO bổ sung ban đầu sau 7 ngày nuôi cấy. Như vậy, việc sử dụng biochar làm chất mang cho vi sinh vật đã làm tăng hiệu quả phân hủy dầu DO và phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đó.

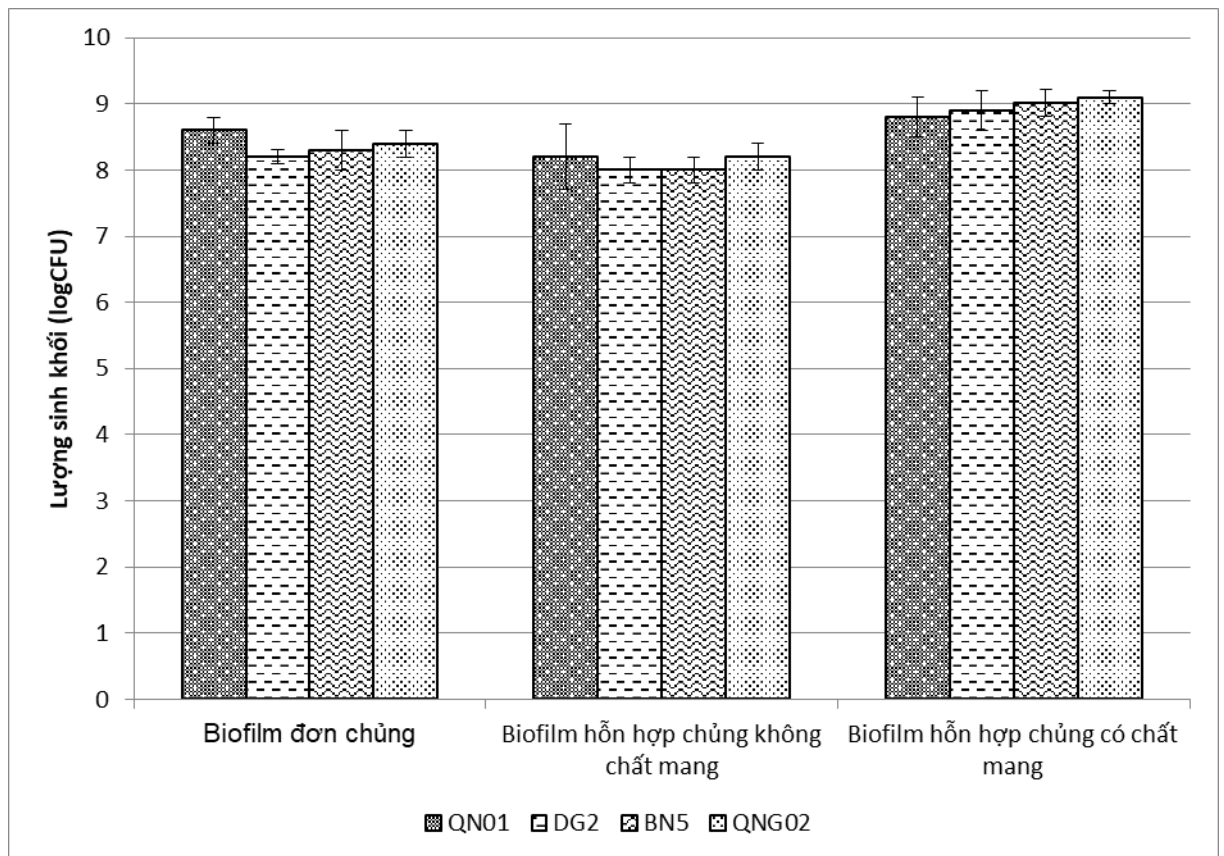
Liang và cộng sự (2009) đã chứng minh khi sử dụng carbon hoạt tính và zeolite làm chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm thì hiệu quả phân hủy dầu thô ở đất nhiễm dầu tăng lên đáng kể. Cụ thể, ở dạng có chất mang, hiệu suất phân hủy đạt 48,89%, trong khi để tự phân hủy trong tự nhiên là 13%, còn thí nghiệm có bổ sung dinh dưỡng và để tự phân hủy đạt 26,3% và ở dạng tế bào tự do thì hiệu suất phân hủy là 37,4% sau 3 ngày nuôi cấy với 800 g đất nhiễm dầu (hàm lượng dầu trong đất là 49,81 mg/g) [75].

Tuy nhiên, hiện nay tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về việc sử dụng biochar từ trấu, một loại phế phụ phẩm nông nghiệp rất phổ biến ở nước

ta làm chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm nhằm tăng cường khả năng loại bỏ dầu DO nói riêng và các thành phần hydrocarbon dầu mỏ nói chung. Do vậy, mẫu chế phẩm số 3, có độ ẩm 40% đã được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.5. ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ TẾ BÀO TRONG MẪU CHẾ PHẨM TẠO THÀNH VÀ KHẢ NĂNG GẮN CỦA VI KHUẨN LÊN THAN SINH HỌC

Sau khi đã xác định được nhiệt độ và độ ẩm lên men tối ưu để tạo chế phẩm. Chế phẩm tạo thành được đánh giá mật độ tế bào trước, trong và sau quá trình thử nghiệm với dầu DO. Các mẫu đơn chủng gồm QN01, DG2, QNG02, BN5 và hỗn hợp 4 chủng này không có chất mang biochar cũng được tiến hành thử nghiệm đồng thời. Tất cả các mẫu đều được kiểm tra mật độ vi sinh tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm và sau 7 ngày. Kết quả được thể hiện trên Hình 3.8.

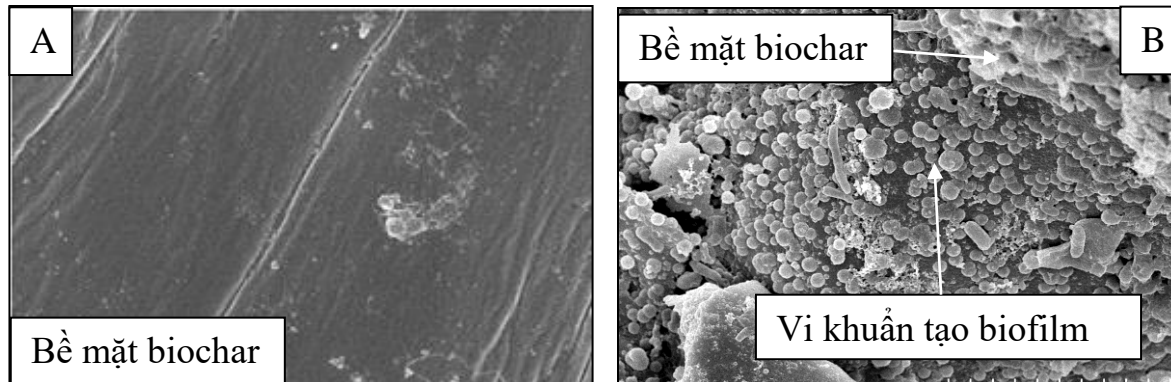


Hình 3.8. Mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn trong màng sinh học sau 7 ngày nuôi trên dầu DO ($n=3$).

Mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn được đưa vào ở thời điểm ban đầu để tạo chế phẩm là 8×10^2 (CFU m/L) (SD = 13) tương đương \log_{10} là 2,9. Sau 7 ngày sử dụng chế phẩm để xử lý dầu DO với hàm lượng dầu ban đầu là 10%, mật độ tế bào của các chủng trong chế phẩm đã được xác định. Kết quả thể hiện trên Hình 3.8 cho thấy, ở biofilm hỗn chủng có chất mang mật độ tế bào của các chủng là cao nhất đạt khoảng $8,9 \log_{10}$ tương đương 8×10^8 (CFU/mL) (SD = 10). Trong khi đó, mật độ tế bào ở biofilm đơn chủng trung bình đạt $8,4 \log_{10}$ tương đương $2,5 \times 10^8$ (CFU/ml).

Như vậy, mật độ trung bình của các mẫu tại thời điểm 0 ngày đều đạt $10^8 - 10^9$ CFU/ml hoặc $10^8 - 10^9$ CFU/g (đối với biochar) và sau 7 ngày là $10^9 \pm 10$ CFU/ml hoặc CFU/g (đối với biochar). Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn trong chế phẩm có khả năng duy trì sinh trưởng tốt trong quá trình xử lý dầu DO.

Hình ảnh chụp chế phẩm tạo thành dưới kính hiển vi điện tử quét cho thấy, các chủng vi khuẩn đã được gắn thành công lên bề mặt vật liệu mang biochar (Hình 3.9)



Hình 3.9. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 5000 lần của (A). biochar; (B). Chế phẩm

3.6. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ XỬ LÝ MỘT SỐ THÀNH PHẦN HYDROCARBON NO VÀ THƠM CỦA CHẾ PHẨM TẠO THÀNH

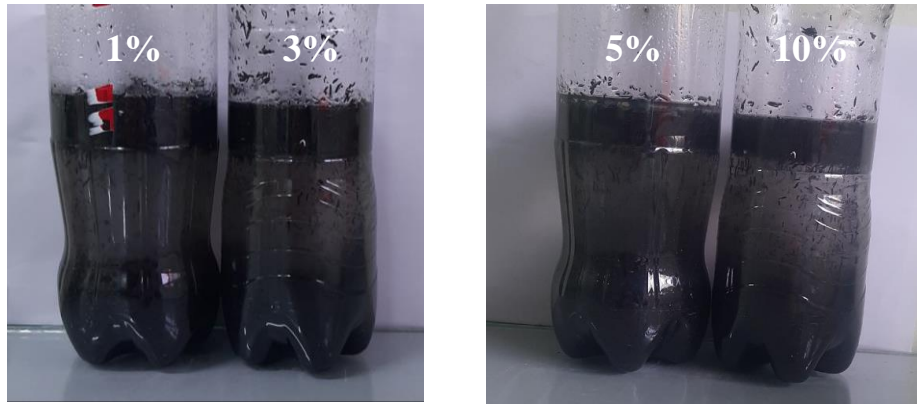
3.6.1. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon no có trong dầu diesel của chế phẩm tạo thành

Mật độ vi sinh vật ở tất cả các mẫu được cân bằng và tính toán sao cho đạt từ $10^8 - 10^9$ CFU/ml hoặc $10^8 - 10^9$ CFU/g (đối với biochar).

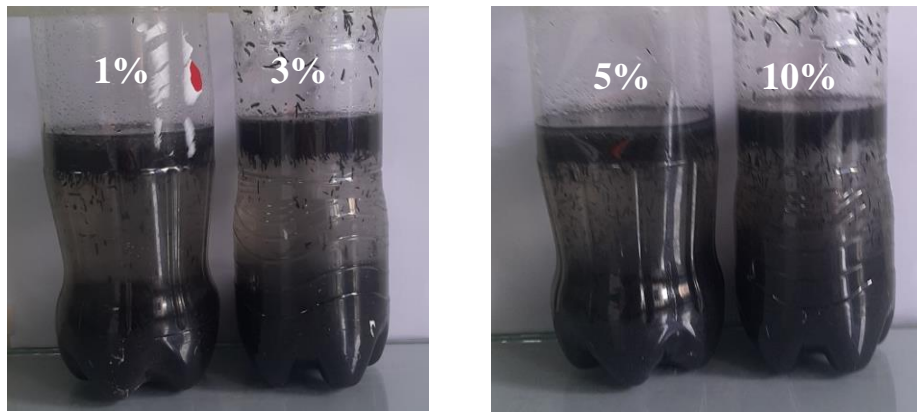
- Mẫu số 1: chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BN5 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml nước có bổ sung 1, 3, 5 và 10% dầu DO (gọi là mẫu ô nhiễm).
- Mẫu số 2: chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 tạo biofilm không có chất mang biochar trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 3: chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas* sp. QNG02 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 4: chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. DG2 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 5: hỗn hợp bốn chủng vi khuẩn tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 6: 1 g chế phẩm trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 7: 1 g biochar không có chứa vi khuẩn trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 8: 100 ml mẫu ô nhiễm không bổ sung vi khuẩn hay biochar.

Đặt 8 khay chứa các mẫu như trên vào tủ ẩm nhiệt độ từ 28 - 30°C, sau mỗi 6 giờ đảo trộn một lần. Sau 7 ngày, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào của biofilm tạo thành trên biochar và đánh giá hàm lượng hydrocarbon còn lại bằng phương pháp phân tích chiết - khối lượng SMEWW 5520 B&F:2017.

Các mẫu được thử nghiệm với nồng độ dầu DO bổ sung ban đầu là 1, 3, 5 và 10% (10% tương ứng theo trọng lượng là 4,786 g/l dầu DO). Sau 7 ngày thử nghiệm, dựa vào cảm quan của hàm lượng dầu còn lại, ở các nồng độ dầu thử nghiệm khác nhau, hàm lượng và mùi dầu DO giảm đi đáng kể so với ban đầu (Hình 3.10(A), Hình 3.10(B)). Với mục tiêu là tìm ra chế phẩm sinh học dạng rắn để xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo biofilm trên biochar có nguồn gốc từ trấu để có thể ứng dụng xử lý các nguồn đất và nước ô nhiễm ở các những vùng ô nhiễm cao, mẫu xử lý tại nồng độ dầu DO 10% được lựa chọn và mang đi phân tích để đánh giá hàm lượng dầu đã được phân huỷ, kết quả thu được ở Hình 3.11.

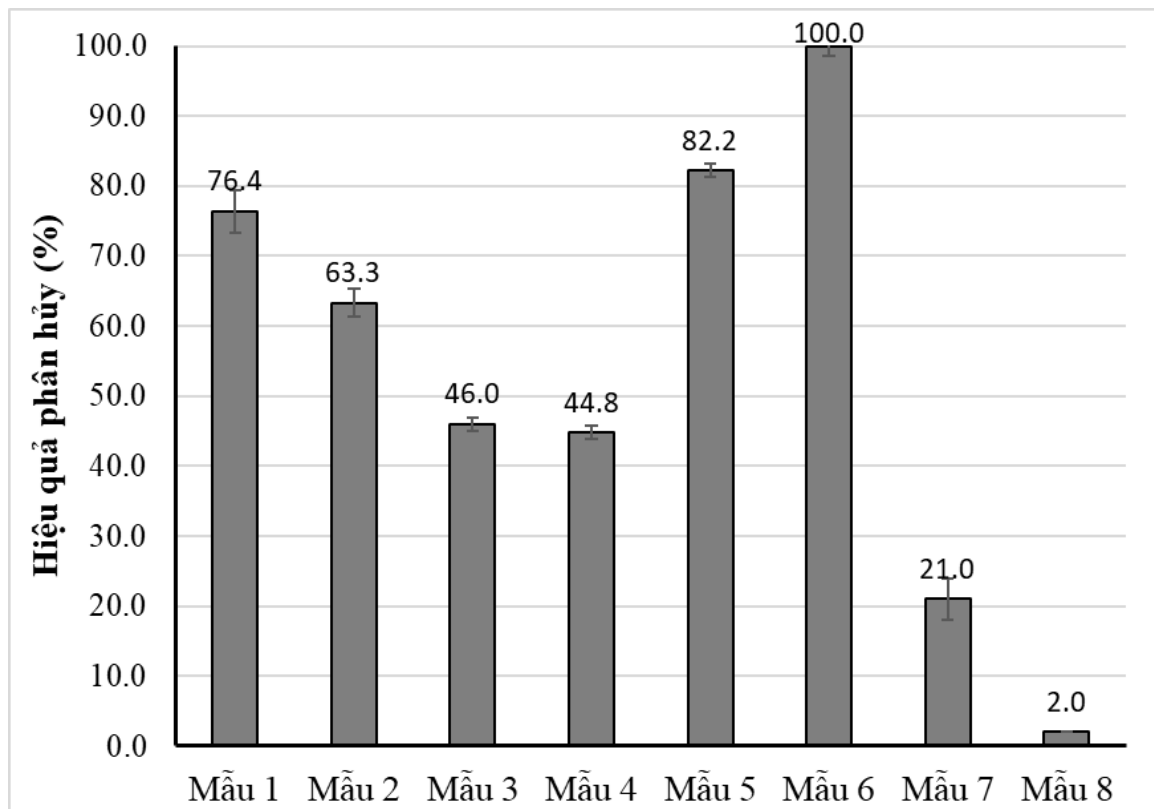


Hình 3.10(A). Mẫu nước ô nhiễm dầu DO 1, 3, 5 và 10% tại thời điểm bắt đầu bổ sung chế phẩm (mẫu số 6)



Hình 3.10(B). Mẫu nước ô nhiễm dầu DO 1, 3, 5 và 10% sau 7 ngày bổ sung chế phẩm (mẫu số 6)

Kết quả trên Hình 3.11 cho thấy sau 7 ngày xử lý, với nồng độ dầu DO bổ sung ban đầu là 10% (tương đương với 4,786 g/l) thì chế phẩm có khả năng loại bỏ hoàn toàn lượng hydrocarbon (100%) - hiệu suất rất cao so với các nghiên cứu đã công bố trước đó. Trong khi đó, ở dạng đơn chủng và không có chất mang thì hiệu quả phân hủy cao nhất chỉ đạt khoảng 76% và ở dạng hỗn hợp 4 chủng nhưng không có chất mang thì hiệu quả phân hủy đạt khoảng 82%.



Hình 3.11. Khả năng phân hủy hydrocarbon no tổng số của các mẫu sau 7 ngày thử nghiệm với nồng độ dầu DO ban đầu 10%

Các chủng vi sinh vật tạo biofilm có khả năng phân hủy hầu hết các thành phần alkanes, cycloalkanes, alkenes trong dầu thành các sản phẩm đơn giản là CO_2 và nước nên không chỉ đem lại hiệu quả xử lý mà còn thân thiện với môi trường và hệ sinh thái [76]. Michaud và cộng sự (2014) đã nghiên cứu biofilm của hai chủng vi khuẩn chịu lạnh phân lập từ nước biển được ứng dụng trong xử lý các thành phần dầu DO cho hiệu suất đạt trên 85% sau 60 ngày xử lý ở 20°C [44]. Nghiên cứu của Chavan & Mukherji (2008) đã cho thấy biofilm của chủng vi khuẩn *Burkholderia cepacia* có khả năng loại bỏ hơn 95% các thành phần n-alkanes từ $\text{C}_9\text{-C}_{20}$ có trong nước nhiễm dầu DO sau 15 ngày xử lý [77].

Năm 2017, Alessandrello và cộng sự đã chứng minh hai chủng *Pseudomonas monteilii* P26 và *Gordonia* sp. H19 tạo biofilm trên vật liệu mang mút xốp có khả năng loại bỏ 75% hàm lượng dầu thô (0,1 g/g) sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C [78].

Năm 2016, Chen và cs đã sử dụng biochar từ tre để làm chất mang cho vi khuẩn *Acinetobacter venetianus* tạo biofilm và sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học dầu DO. Kết quả cho thấy, sau 3 ngày nuôi cấy, với

hàm lượng ban đầu là 200 mg/l, 94% lượng dầu đã được loại bỏ. Trong khi đó, ở dạng tế bào tự do, chủng vi khuẩn này chỉ loại bỏ được 82% [53].

Như vậy, chế phẩm sử dụng hỗn hợp 4 chủng có khả năng tạo màng sinh học trên chất mang là biochar có nguồn gốc từ trấu cho thấy khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon no có trong dầu DO đạt hiệu quả cao (100%). Vì vậy, có thể thấy được tiềm năng trong việc sử dụng hỗn hợp các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học trên chất mang là các phế phụ phẩm nông nghiệp (trấu) nhằm giải quyết được vấn đề gây ô nhiễm môi trường bởi các phế phụ phẩm này, đồng thời tăng cường khả năng hấp thụ và loại bỏ các chất gây ô nhiễm khác trong môi trường.

3.6.2. Đánh giá hiệu quả xử lý hydrocarbon thơm của chế phẩm tạo thành

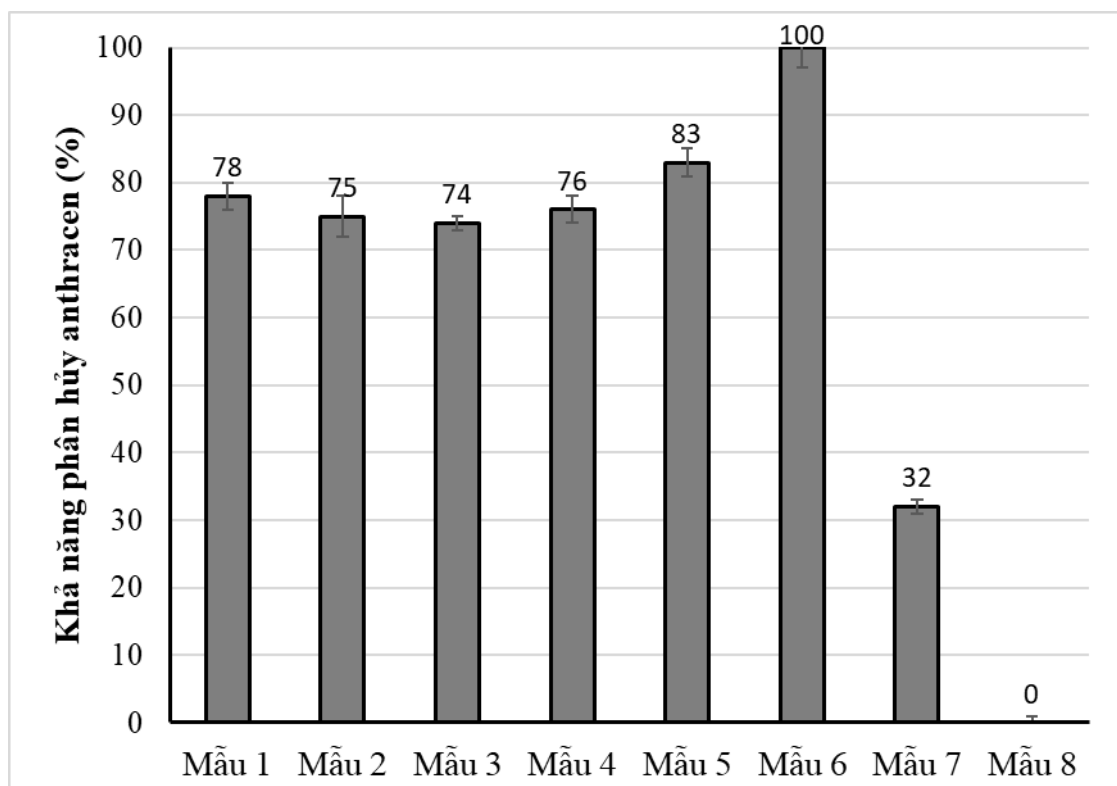
Mật độ vi sinh vật ở tất cả các mẫu được cân bằng và tính toán sao cho đạt từ $10^8 - 10^9$ CFU/ml hoặc $10^8 - 10^9$ CFU/g (đối với biochar).

- Mẫu số 1: chủng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. BN5 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml nước có bổ sung 200 mg/l từng loại hydrocarbon thơm (anthracene, naphthalene, phenanthrene, pyrene) (gọi là mẫu ô nhiễm).
- Mẫu số 2: chủng vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* QN01 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 3: chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas* sp. QNG02 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 4: chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. DG2 tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 5: hỗn hợp bốn chủng vi khuẩn tạo biofilm (không có chất mang biochar) trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 6: 1 g chế phẩm trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 7: 1 g chất mang biochar không có chứa vi khuẩn phối trộn với 100 ml mẫu ô nhiễm.
- Mẫu số 8: 100 ml mẫu ô nhiễm không bổ sung vi khuẩn hay biochar.

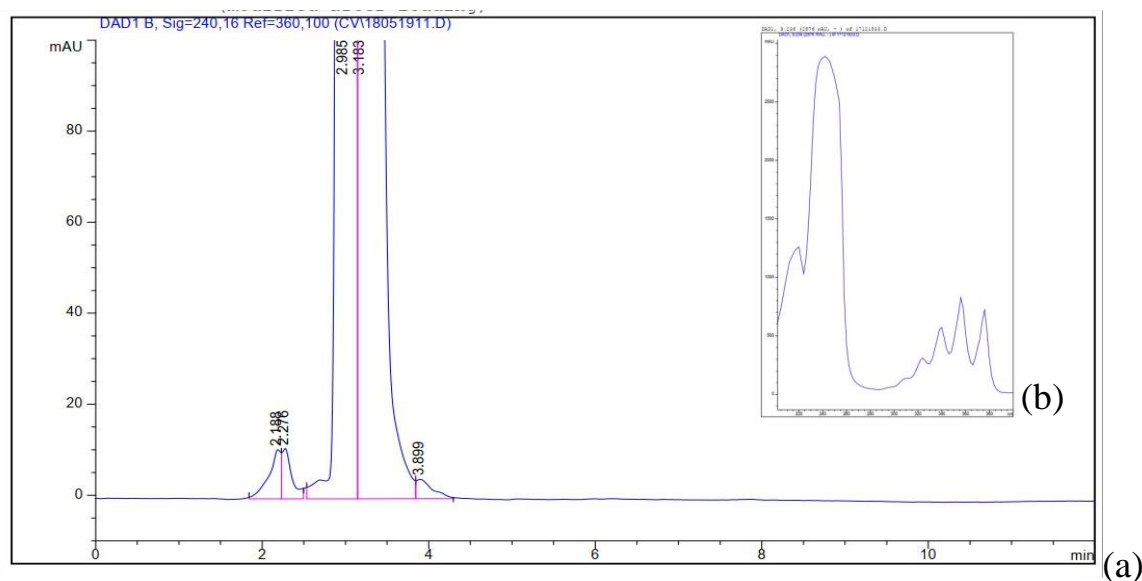
Đặt 8 khay chứa các mẫu như trên vào tủ ẩm nhiệt độ từ 28 - 30°C, sau mỗi 6 giờ đảo trộn một lần. Sau 7 ngày xử lý, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào của biofilm tạo thành trên biochar, mật độ vi sinh vật tổng số đạt $>10^9$ (CFU/g) và đánh giá hàm lượng hydrocarbon còn lại bằng phương pháp HPLC.

3.6.2.1. Đánh giá hiệu quả xử lý anthracene của chế phẩm tạo thành

Để đánh giá hiệu quả xử lý anthracene của các mẫu, phương pháp HPLC đã được sử dụng. Sau 7 ngày xử lý, kết quả phân hủy anthracene được thể hiện trong Hình 3.12.



Hình 3.12. Khả năng phân hủy anthracene của các mẫu sau 7 ngày xử lý với hàm lượng anthracene bổ sung ban đầu 200 mg/l



Hình 3.13. Sắc ký đồ (a) của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với anthracene; (b) UVis của cơ chất anthracene với thời gian lưu (Rt) là 9,179 phút

Từ kết quả trên Hình 3.12 và 3.13 cho thấy, ở mẫu số 6 gồm 1 g chế phẩm với 100 ml nước ô nhiễm, sau 7 ngày xử lý, đã có khả năng loại bỏ hoàn toàn 200 mg/l anthracene. Trong khi đó, các mẫu khác hiệu quả cao nhất cũng chỉ đạt 83 % ở mẫu hỗn hợp các chủng tạo biofilm và không có chất mang. Do vậy, việc bổ sung cơ chất là biochar đã góp phần nâng cao hiệu quả xử lý anthracene – một loại hydrocarbon thơm, khó phân hủy.

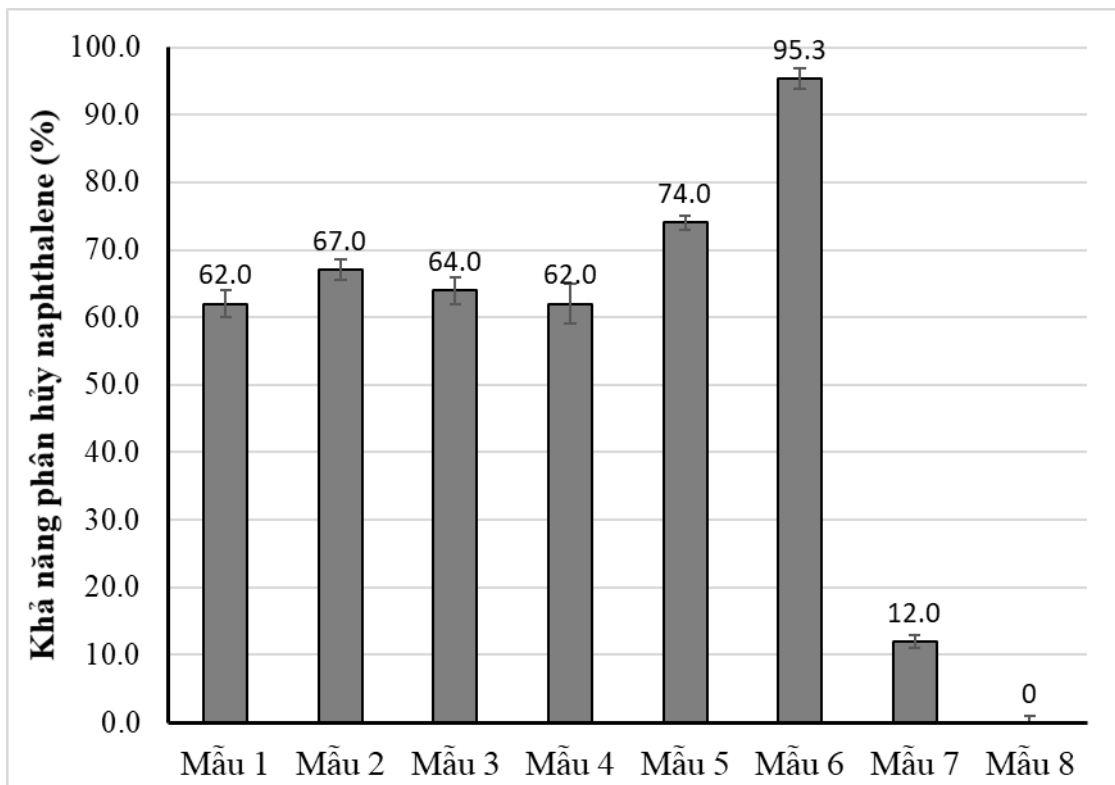
Năm 2022, Song và cộng sự đã sử dụng chủng *Bacillus* sp. KSB7 cố định trên biochar để tăng cường khả năng xử lý kim loại nặng và PAH có trong đất ô nhiễm và kết quả cho thấy rằng phương pháp xử lý này đạt được tỷ lệ phân hủy PAH cao nhất (36,4%) sau 90 ngày ủ [79]. Imam và cộng sự (2020) đã chuẩn bị laccase cố định biochar biến đổi axit có tên là L-FRSB@M để phân hủy anthracene trong nước và kết quả cho thấy tỷ lệ phân hủy của anthracene đạt 99 % dưới tác dụng của L-FRSB@M sau 24 giờ với hàm lượng anthracene bổ sung ban đầu là 50 mg/l (50 ppm) [80].

Như vậy, có thể thấy rằng, so sánh với các công bố trước đây thì chế phẩm sử dụng hỗn hợp chủng tạo biofilm cố định trên biochar được tạo ra từ nghiên cứu này có khả năng phân hủy anthracene với hiệu suất khá cao.

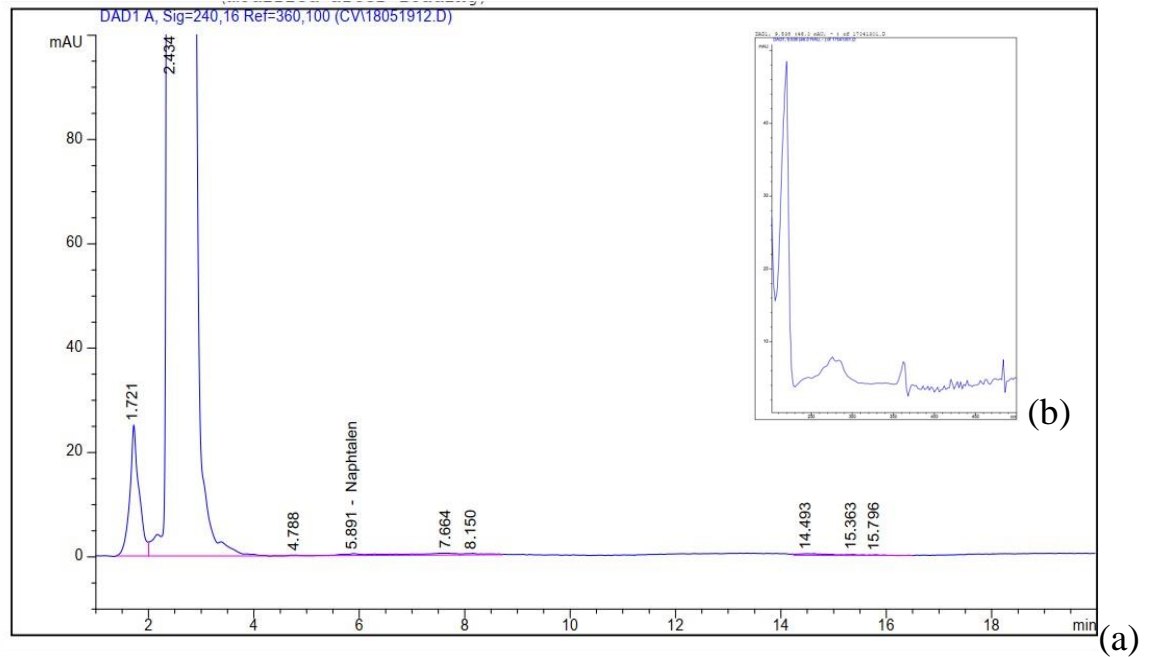
3.6.2.2. *Đánh giá hiệu quả xử lý naphthalene của chế phẩm tạo thành*

Tương tự đối với cơ chất naphthalene, sau 7 ngày, các mẫu được phân tích hiệu quả xử lý bằng phương pháp HPLC. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.14 và Hình 3.15.

Kết quả cho thấy, ở mẫu số 6 gồm 1 g chế phẩm vi sinh tạo biofilm trên chất mang biochar với 100 ml nước ô nhiễm, sau 7 ngày xử lý đã có khả năng loại bỏ 95,3% naphthalene. Trong khi đó, hiệu quả phân hủy cao nhất ở các mẫu biofilm đơn chủng đạt là 67,0%, ở hỗn hợp chủng không bổ sung biochar đạt 74,0% và ở mẫu biochar không bổ sung chủng vi khuẩn chỉ đạt 12,0%. Như vậy, có thể thấy rằng hiệu suất phân hủy naphthalene của chế phẩm tạo được từ nghiên cứu này là tương đối cao.



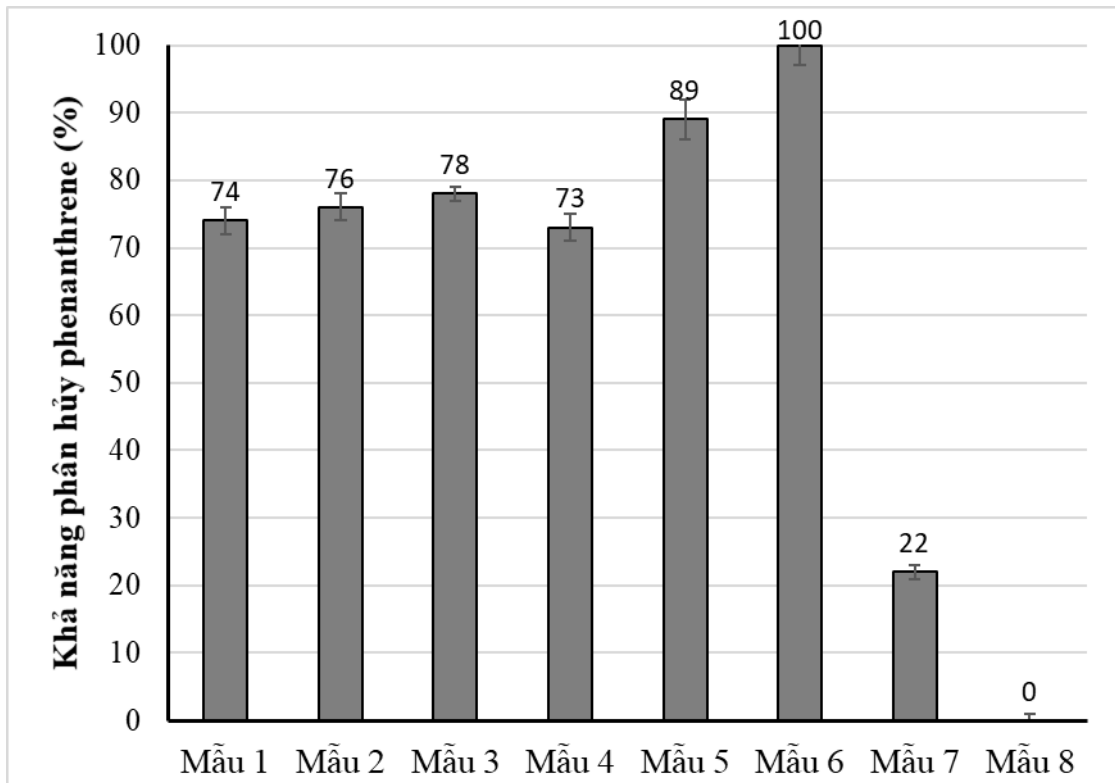
Hình 3.14. Khả năng phân hủy naphthalene của các mẫu sau 7 ngày xử lý với hàm lượng naphthalene ban đầu 200 mg/l



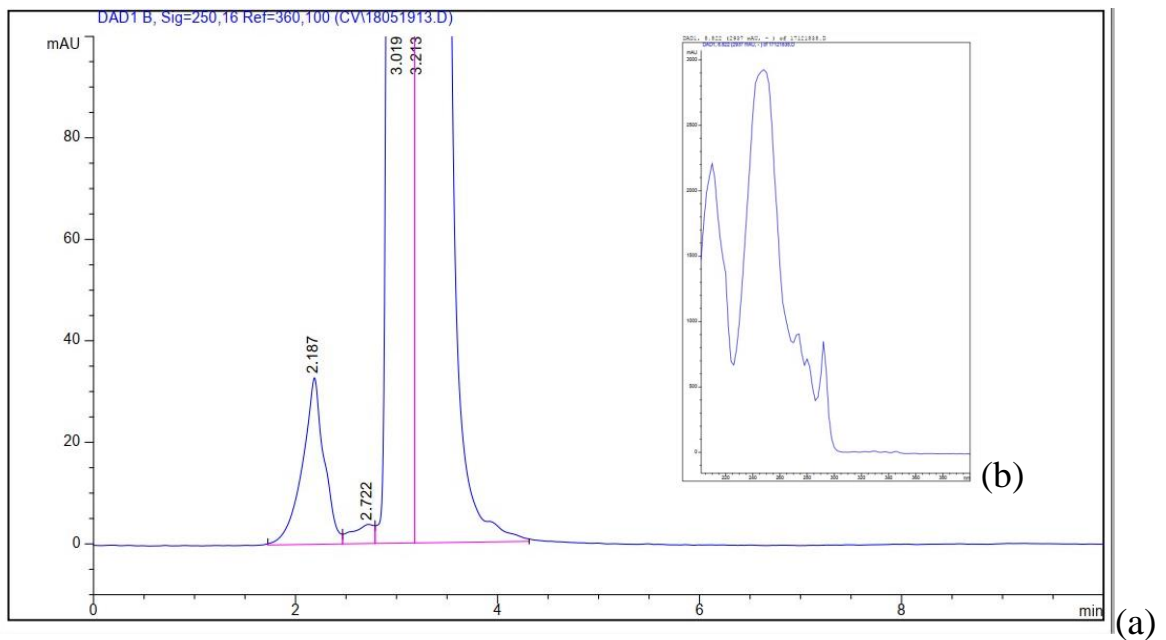
Hình 3.15. Sắc ký đồ (a) của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với naphthlene; (b) UVis của cơ chất naphthlene với thời gian lưu (Rt) là 5,891 phút

3.6.2.3. Đánh giá hiệu quả xử lý phenanthrene của chế phẩm tạo thành

Chế phẩm tạo thành tiếp tục được sử dụng để đánh giá hiệu quả loại bỏ phenanthrene. Sau 7 ngày xử lý, khả năng phân hủy phenanthrene của các mẫu được trình bày trong Hình 3.16 và Hình 3.17.



Hình 3.16. Khả năng phân hủy phenanthrene của các mẫu sau 7 ngày với hàm lượng phenanthrene ban đầu 200 mg/l



Hình 3.17. Sắc ký đồ (a) của chế phẩm sau 7 ngày xử lý với phenanthrene; (b) UVis của cơ chất phenanthrene với thời gian lưu (Rt) là 8,447 phút

Kết quả trên Hình 3.16 và Hình 3.17 cho thấy, sau 7 ngày thử nghiệm, chế phẩm đã có thể loại bỏ hoàn toàn 200 mg/l phenanthrene. Trong khi đó, các mẫu biofilm đơn chủng chỉ đạt hiệu quả phân hủy cao nhất là 78%, ở hỗn

hợp chủng không bổ sung biochar đạt 89% và ở mẫu biochar không bổ sung chủng vi khuẩn chỉ đạt 22%.

Năm 2002, công bố của Eriksson Mikael và cộng sự đã chỉ ra rằng biofilm của các chủng vi khuẩn phân lập ở bắc cực thuộc các chi *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* có khả năng phân hủy 39 $\mu\text{g/ml}$ phenanthrene sau 60 ngày xử lý ở 22°C [48].

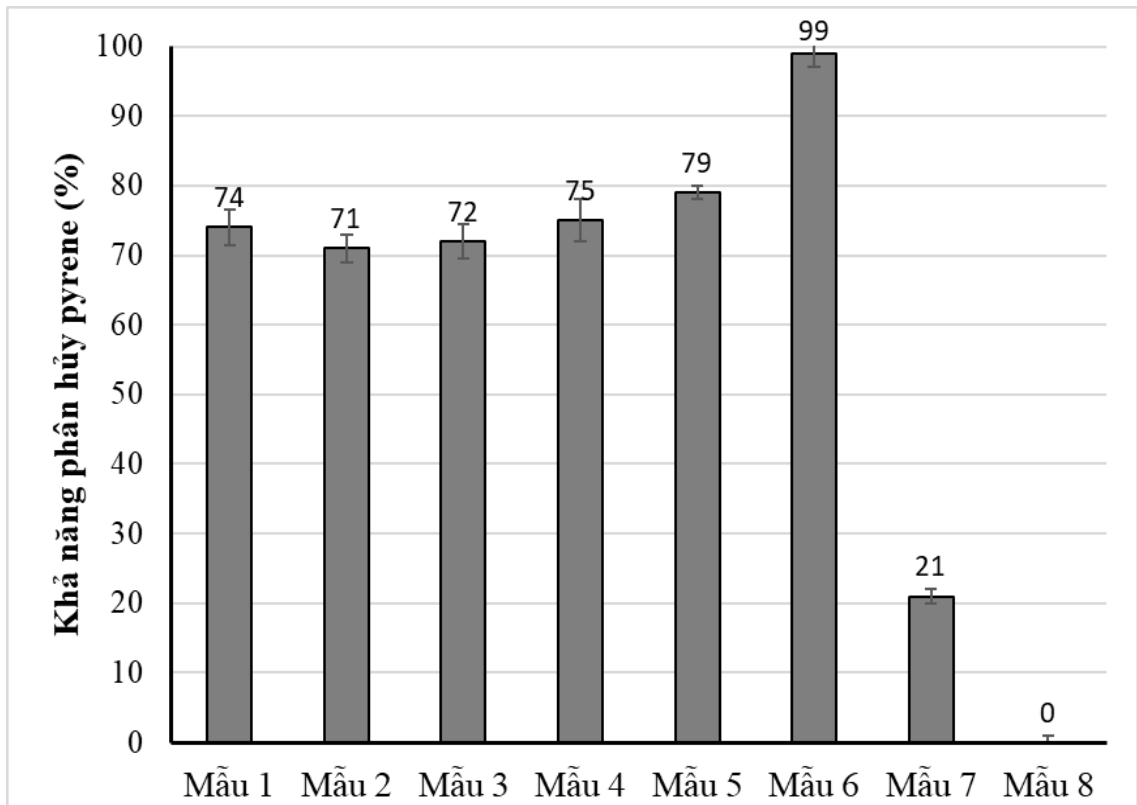
Một số nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng biochar có khả năng hấp thụ phenanthrene chủ yếu thông qua sự hấp phụ bề mặt và tương tác giữa chất cho và chất nhận điện tử π - π . Bên cạnh đó, biochar cũng có thể tăng cường quá trình phân hủy phenanthrene bằng cách cố định vi khuẩn trên bề mặt của nó và điều chỉnh hoạt động của vi khuẩn trong đất. Do đó, biochar được ứng dụng trong xử lý đất và nước bị ô nhiễm phenanthrene. Đồng thời, nghiên cứu cũng chỉ ra rằng để sử dụng biochar đạt hiệu quả nhất nhằm loại bỏ PAH là kiểm soát kích thước và nồng độ hạt để vi khuẩn có thể loại bỏ PAH tốt hơn mà không bị chết [81].

Như vậy, trong nghiên cứu này, sau 7 ngày xử lý, chế phẩm cho thấy khả năng phân hủy PAH hiệu quả, loại bỏ được 100% phenanthrene với hàm lượng phenanthrene bổ sung ban đầu là 200 mg/l.

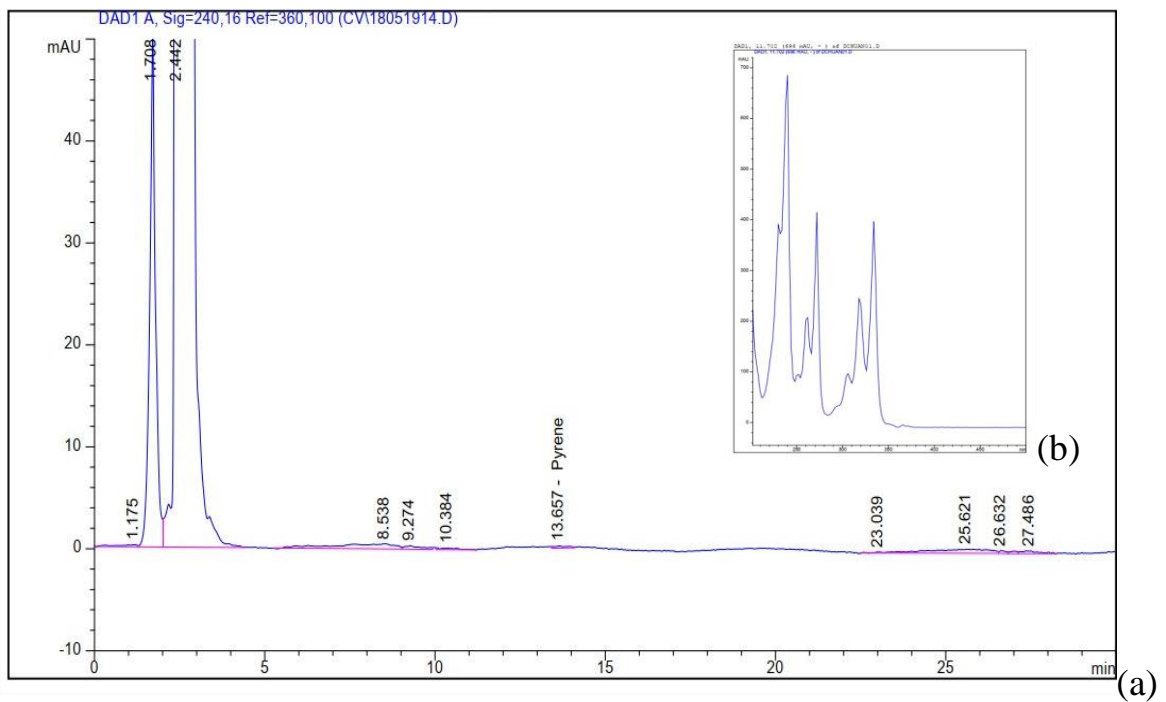
3.6.2.4. Đánh giá hiệu quả xử lý pyrene của chế phẩm tạo thành

Thí nghiệm tương tự được thực hiện với pyrene, sau 7 ngày xử lý, kết quả được trình bày ở Hình 3.18 và Hình 3.19.

Kết quả cho thấy, sau 7 ngày xử lý, chế phẩm đã loại bỏ được 99% pyrene với hàm lượng bổ sung ban đầu là 200 mg/l. Trong khi đó, hiệu quả phân hủy cao nhất ở các mẫu biofilm đơn chủng đạt là 75%, ở hỗn hợp chủng không bổ sung biochar đạt 79% và ở mẫu biochar không bổ sung chủng vi khuẩn chỉ đạt 21%.



Hình 3.18. Khả năng phân hủy pyrene của các mẫu sau 7 ngày xử lý với hàm lượng pyrene ban đầu 200 mg/l



Hình 3.19. Sắc ký đồ (a) của chế phẩm sau 7 ngày thử nghiệm với pyrene; (b) UVis của cơ chất pyrene với thời gian lưu (Rt) là 13,657 phút

Công bố của Eriksson Mikael và cộng sự (2002) đã cho thấy biofilm của các chủng vi khuẩn phân lập ở bắc cực thuộc các chi *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* được ứng dụng để xử lý các thành phần hydrocarbon thơm độc hại trong dầu. Biofilm các chủng vi sinh vật này có khả năng phân hủy lên hoàn toàn 20 µg/ml pyrene sau 60 ngày xử lý [48].

Trong nghiên cứu này, sau 7 ngày xử lý, chế phẩm đã cho thấy khả năng phân hủy pyrene hiệu quả cao, đã loại bỏ được 99% pyrene với hàm lượng pyrene bổ sung ban đầu là 200 mg/l.

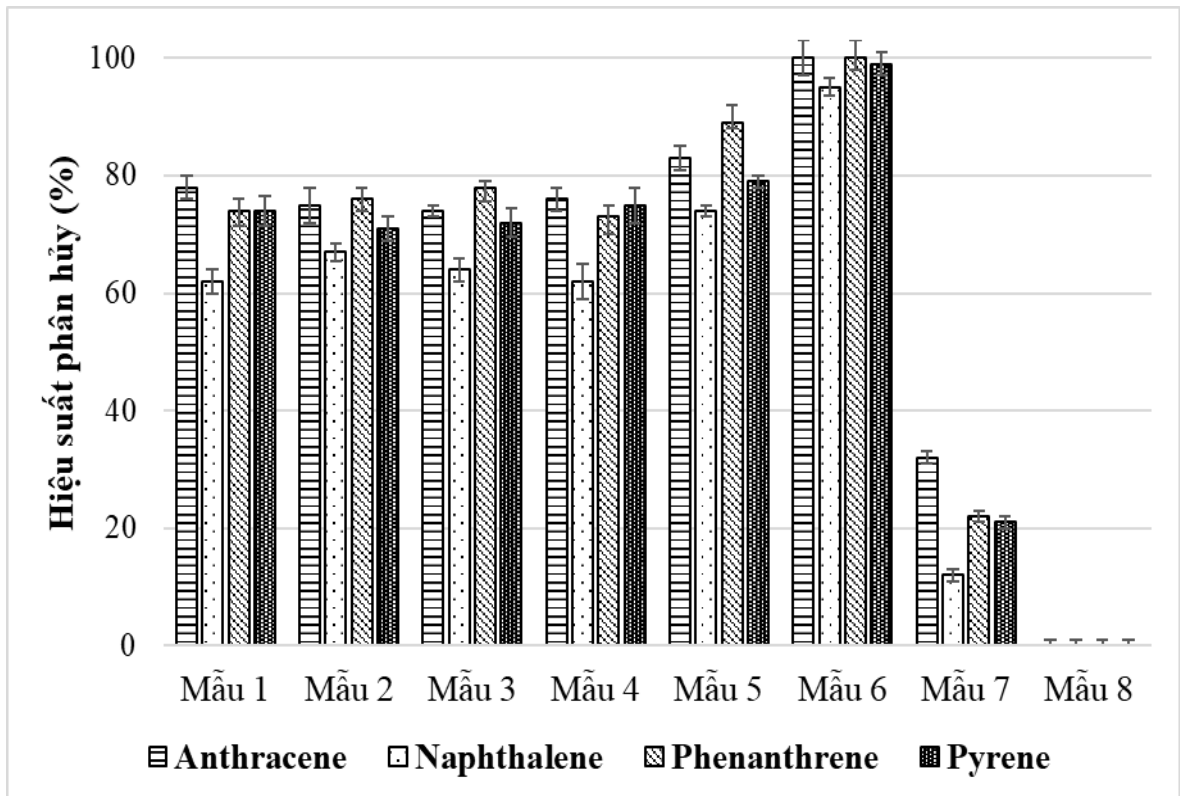
Như vậy, sau 7 ngày xử lý, mẫu số 6 gồm 1 g chế phẩm tạo thành với 100 ml nước ô nhiễm cho thấy khả năng loại bỏ trên 95% một số thành phần hydrocarbon thơm. Trong khi đó, các mẫu khác hiệu quả cao nhất cũng chỉ đạt 89% ở mẫu hỗn hợp các chủng tạo biofilm và không có chất mang (Bảng 3.6, Hình 3.20). Do đó, chế phẩm sử dụng hỗn hợp 4 chủng có khả năng tạo biofilm trên chất mang là biochar có nguồn gốc từ trấu cho thấy khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong dầu DO đạt hiệu quả cao. Trong đó, chế phẩm có khả năng phân hủy dầu DO, anthracene, naphthalene, phenanthrene và pyrene lần lượt là 100; 100; 95,3; 100 và 99% với hàm lượng ban đầu là 10% dầu DO (4,786 g/l) và 200 mg/l các hydrocarbon thơm.

Bảng 3.6. Hiệu suất phân hủy một số hydrocarbon thơm trong dầu DO của chế phẩm

Mẫu	Hiệu suất phân hủy (%)			
	anthracene	naphthalene	phenanthrene	pyrene
Mẫu 1	78±0.9	62±2	74±0.8	74±0.9
Mẫu 2	75±0.8	67±4	76±0.9	71±0.4
Mẫu 3	74±1	64±3	78±0.8	72±0.5
Mẫu 4	76±4	62±4	73±4	75±0.4
Mẫu 5	83±3	74±2	89±6	79±0.6
Mẫu 6	100±1	95±3	100±1	99±0.2
Mẫu 7	32±3	12±0.4	22±0.4	21±0.4
Mẫu 8	0	0	0	0

Trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu và công bố về các chủng vi sinh vật tạo biofilm nhằm ứng dụng trong xử lý các hydrocarbon thơm như benzen, naphthalen, phenol, toluen, xylen, v.v. [46, 47]. Bên cạnh đó, biofilm của các chủng vi khuẩn phân lập ở bắc cực tạo thành thuộc các chi *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter* và *Variovorax* được ứng dụng để loại bỏ các thành phần PAH độc hại trong dầu cho thấy khả năng loại bỏ hoàn toàn 20 µg/ml pyrene và 39 µg/ml phenanthrene sau 60 ngày xử lý [48]. Kumar và cộng sự (2008) đã ứng dụng công nghệ MBR đã loại bỏ 99% toluene sau 44 ngày xử lý với nồng độ toluene ban đầu là 4 g/m³ [49].

Năm 2017, Bijing Xiong và cộng sự đã nghiên cứu chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy PAH (*Mycobacterium gilvum*) được cố định trên biochar có nguồn gốc từ rơm rạ. Nghiên cứu đã chỉ ra hỗn hợp *Mycobacterium Gilvum* và biochar cho thấy khả năng phân hủy phenanthrene, floranthene và pyrene vượt trội so với đơn chủng, với tỷ lệ loại bỏ lần lượt là $62,6 \pm 3,2\%$, $52,1 \pm 2,3\%$ và $62,1 \pm 0,9\%$ khỏi đất bị nhiễm dầu với hàm lượng PAH ban đầu là 677 mg/kg [82].



Hình 3.20. Hiệu suất phân hủy một số hydrocarbon thơm trong dầu DO của chế phẩm.

Ngoài ra, trong những năm gần đây, việc tích trữ chất thải nông nghiệp làm gia tăng mối lo ngại về vấn đề môi trường do một lượng lớn chất thải hữu cơ được tạo ra từ các hoạt động thâm canh nông nghiệp. Các phế phụ phẩm nông nghiệp như rơm rạ và phân động vật rất giàu thành phần hữu cơ và các yếu tố khác mà thực vật cần, nên rất thuận lợi để cải tạo chúng thành đất nông nghiệp góp phần cải thiện tính chất của đất, có thể giúp tái chế chất dinh dưỡng và do đó nâng cao chất lượng của đất [83]. Trong khi đó, kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng việc sử dụng hỗn hợp 4 chủng vi khuẩn tạo màng sinh học là *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus*

sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 cố định trên biochar từ trấu có thể làm tăng đáng kể hiệu suất phân hủy DO và các thành phần PAH trong dầu.

Do vậy, có thể nhận thấy được tiềm năng lớn trong việc ứng dụng chế phẩm này trong xử lý đất hoặc nước ô nhiễm dầu. Chế phẩm sẽ giúp tận dụng được các phế phụ phẩm nông nghiệp (trấu) để tạo biochar làm chất mang cho các vi sinh vật tạo biofilm nhằm giải quyết được vấn đề gây ô nhiễm môi trường bởi các phế phụ phẩm này, đồng thời tăng cường khả năng hấp thụ và loại bỏ các thành phần ô nhiễm dầu và các chất gây ô nhiễm khác ở các nguồn ô nhiễm tương tự.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Từ bộ sưu tập của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học, VAST, đã lựa chọn được 4 chủng vi khuẩn có khả năng tạo biofilm và phân hủy các thành phần hydrocarbon tốt, đồng thời không đối kháng lẫn nhau gồm: *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02.
2. Đã xác định được một số điều kiện lên men thích hợp để tạo chế phẩm như nhiệt độ 40°C và độ ẩm 40% từ 4 chủng lựa chọn. Chế phẩm tạo thành có màu đen, dạng rắn, mật độ tế bào đạt $10^8 - 10^9$ CFU/g.
3. Khả năng loại bỏ hydrocarbon no tổng số của chế phẩm tạo thành là 100% sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ dầu DO ban đầu là 10% (4,786 g/l). Khả năng loại bỏ các thành phần hydrocarbon thơm: anthracene, naphthalene, phenanthrene và pyrene của chế phẩm tạo thành lần lượt là 100; 95,3; 100 và 99% với nồng độ ban đầu là 200 mg/l.

KIẾN NGHỊ

Thử nghiệm sản xuất chế phẩm ở các quy mô khác nhau như 20 và 50 kg/m³; và đánh giá hiệu suất của chế phẩm trong các điều kiện và thời gian bảo quản khác nhau.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Trần Thị Lương, Đỗ Thị Liên, Cung Thị Ngọc Mai, Trần Thị Đào, Trần Phương Minh, Lê Thị Nhi Công, 2023, Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 2023, 21(2), tr. 207-214.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Ivshina I.B., 2020, Advanced Bioreactor Treatments of Hydrocarbon-Containing Wastewater, *Journal of Applied Sciences*, 10(3), pp. 831.
2. Rana A.A., Mohammed F., Maysam A.H., 2018, Crude Oil Effect on the Clayey Soil Mechanical and Physical Properties, *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*, 7, pp. 453-458.
3. Ghoreishi G., Alemzadeh A., Mojarrad M., Djavaheri M., 2017, Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran, *Journal of Sustainable Environment Research*, 27, pp. 195-202.
4. Ahmad M., Anushka U.R., Jung E.L., Ming Z., Nanthi B., Dinesh M., Meththika V., 2014, Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review, *Chemosphere*, 99, pp. 19-33.
5. Lê Thị Nhi Công, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Hoàng Phương Hà, Nghiêm Ngọc Minh, Phí Quyết Tiến, Đinh Thị Thu Hằng, Đỗ Thị Tố Uyên, 2018, *Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học xử lý nước bị nhiễm dầu và chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học thu được bằng quy trình này*, QĐ số 88911/QĐ-SHTT, ngày 11/12/2018. Cục Sở hữu trí tuệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.
6. Yin H.Q., Jing J., Yan Y., Peng J.S., Hui Q., Huaming Z., Na H., Baoyan, 2009, Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater, *Process Biochemistry*, 44, pp. 302-208.
7. Arkadiusz T., Anna K.K., 2021, Five-year enhanced natural attenuation of historically coal-tar-contaminated soil: analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon and phenol contents, *International Journal of Environmental Research Public Health*, 18, pp. 2265.
8. Xue Y., Shiqiu Z., Meiting J., Le L., 2019, Preparation and modification of biochar materials and their application in soil remediation, *Journal of Applied Sciences*, 9(7), pp. 1365.

9. Hafida B., Juan D., Aparicio, Graciela P., Aminata O., El H.K., Marta A.P., 2019, Bioremediation of petroleum-contaminated soils using *Streptomyces* sp. Hlh1, *Journal of Soils and Sediments*.
10. Thống kê những vụ tràn dầu ở Việt Nam, <https://xulydau.com/thong-ke-nhung-vu-tran-dau-o-viet-nam/>.
11. <https://petrovietnam.petrotimes.vn/>.
12. Nguyễn Bá Diên, 2008, Tổng quan pháp luật Việt Nam về phòng chống ô nhiễm dầu ở các vùng biển, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Kinh tế - Luật*, 24, tr. 224-238.
13. Marchand C., St-Arnaud M., Hogland W., Bell T.H., Hijri M., 2017, Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, pp. 48-57.
14. Wu M., Li W., Dick W.A., Ye X., Chen K., Kost D., Chen L., 2017b, Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleumcontaminated soil and microbial population and activity determination, *Chemosphere*, 169, pp. 124-130.
15. Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S., 2006, Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate, *Journal of Microbiology*, 152, pp. 2801-2807.
16. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual Review Microbiology*, 54, pp. 49-79.
17. Irankhah S., Abdi A., Mallavarapu M., Soudi M.R., Subashchandrabose S., Gharavi S., 2019, Ecological role of *Acinetobacter calcoaceticus* GSN3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation., *Biofouling*, 35.
18. Musa H.M., Aisha L.I., Xiao F., Yachong G., Yiyan Y., Xu J., Junzhi Q., Xiong G., Tianpei H., 2020, Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches, *Frontiers in Microbiology*, 11, pp. 928.

19. Kokare C.R., Chakraborty S., Khopade A.N., Mahadik K.R., 2009, Biofilms: Importance and applications, *Indian Journal of Biotechnology*, 8, pp. 19-168.
20. Lê Thị Nhi Công, Đồng Văn Quyền, 2021, *Màng sinh học (biofilm) từ vi sinh vật và ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu ở Việt Nam*, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
21. Neria-Gonzalez I., Wang E.T., Jamirez F., Romero J.M., Hernandez-Rodriguez C., 2006, Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from Southeast of Mexico, *Journal of Anaerobe*, 12, pp. 122-33.
22. Asri M., Elabed S., Koraichi S.I., El G.N., 2018, Biofilms – based system for industrial wastewater treatment, *Handbook of environmental materials management*, Springer, Cham.
23. Lin H., Zhang Z.M., Wang F., Meng F., Lia B., Hong H., Gao W., 2014, A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies, *Journal of Membrane Science*, 460, pp. 110-125.
24. Karadağ D., Köroğlu O.E., Ozkaya B., Cakmakci M., 2015, A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater, *Journal of Process Biochemistry*, 50, pp. 262-271.
25. Huang H., Peng C., Peng P., Lin Y., Zhang X., Ren H., 2019, Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 103.
26. Mergesin R., Schinner F., 2001, Biodegradation of hydrocarbons in extreme environment, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, pp. 650-663.
27. Mrinalini K., Jayanthi A., 2011, Biodegradation of Diesel Oil using Yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5, pp. 369-377.
28. Le Thi Nhi Cong, Morikawa M., Le Thi Hien, 2011, Ability of hydrocarbon degradation by several biofilm – forming microorganisms

- isolated from Vietnam coastal zone, *The analytica Vietnam conference*, pp. 302-307.
29. Hoàng Phương Hà, Nguyễn Hồng Thu, Trần Trung Thành, Trần Thanh Tùng, Lê Thị Nhi Công, 2016, Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nitrate hóa hình thành màng sinh học để xử lý nước nuôi trồng thủy sản bị ô nhiễm ammonium, *Journal of Vietnamese Environment*, 8(1), tr. 2193.
 30. Đỗ Khắc Uẩn, Rajesh B., Kaliappan S., Ick-Tae Y., 2009, Ứng dụng công nghệ lọc màng trong xử lý nitơ, photpho và các chất hữu cơ trong nước thải đô thị bằng phương pháp sinh học yếm khí - thiếu khí – hiếu khí, *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, tr. 950-958.
 31. Kumar C.G., An S.K., 1998, Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 42, pp. 9-27.
 32. Cung Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thùy Linh, Nguyễn Văn Bắc, Vũ Thị Thanh, Nghiêm Ngọc Minh, 2011, Nghiên cứu khả năng phân hủy diesel của chủng vi khuẩn BTL5 phân lập từ nước thải công nghiệp, *Tạp chí Sinh học*, 33(4), tr. 86-91.
 33. Barken K.B., 2008, Roles of type IV pili, flagellum - mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Journal of Environmental Microbiology*, 10(9), pp. 233-439.
 34. Atlas R.M., 1995, Bioremediation of petroleum pollutants, *Journal of International Biodeterioration and Biodegradation*, pp. 317-327.
 35. Leahy J.G., Colwel R.R., 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the Enviroment, *Journal of Microbiology*, 182, pp. 305-315.
 36. Fu X., Wang H., Bai Y. Xue J., Gao Y., Hu S., Wu T., Sun J., 2020, Systematic degradation mechanism and pathways analysis of the immobilized bacteria: Permeability and biodegradation, kinetic and molecular simulation, *Journal of Environmental Science Ecotechnology*, 2.

37. Guieysse B., 2000, Degradation of acenaphthene, phenanthrene and pyrene in a packed- bed biofilm reactor, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, pp. 826-831.
38. Ali J., Sohail A., Wang L., Haider M., Shahi M., Pan G., 2018, Electro-microbiology as a promising approach towards renewable energy and environmental sustainability, *Journal of Energies*, 11.
39. Nawaz K., Hussain K., Choudary N., Majeed A., Ilyas U., Ghani A, Lin F., Ali K., Afghan S., Raza G., 2011, Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards, *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), pp. 177-183.
40. Teh J.S., Lee K.H., 1973, Utilization of n-alkanes by *Cladosporium resinae*, *Journal of Applied Microbiology*, 25(3), pp. 454-7.
41. Prince E.L., Morton L.H.G., 1989, Biofilms and bioemulsifiers in hydrocarbon degradation, *International Biodeterioration*, 25(6), pp. 385-391.
42. El-Masry M.H., Ebtessam E.B, Nawal I.E., 2004, Bioremediation of Vegetable Oil and Grease from Polluted Wastewater Using a Sand Biofilm System, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, pp. 551–557.
43. Yin L., Kaisong Z., Rune B., Chunming L., Haining L., 2013, Membrane installation for enhanced up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) performance, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(3), pp. 357-361.
44. Michaud L., Giudice A.L., Saitta M., De D.M., Bruni V., 2004, The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment, *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6), pp. 405-409.
45. Rojo F., 2009, Degradation of alkanes by bacteria, *Journal of Environmental Microbiology*, 11(10), pp. 2477-2490.
46. Shimada K., Itoh Y., Washio K., Morikawa M., 2012, Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102

toward bioremediation technology and its molecular mechanisms, *Chemosphere*, 87, pp. 226-233.

47. Yamaga F., Washio K., Morikawa M., 2010, Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from rhizosphere of Duckweed *Lenma aoukikusa*, *Journal of Environmental Science Technology*, 44, pp. 6470-6474.
48. Eriksson M., Dalhammar G., Mohn W.W., 2002, Bacterial growth and biofilm production on pyrene, *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1), pp. 21-27.
49. Kumar A., Dewulf J., Luvsanjamba M., Van L.H., 2008, Continuous operation of membrane bioreactor treating toluene vapors by *Burkholderia vietnamiensis* G4, *Chemical Engineering Journal*, 140(1-3), pp. 193-200.
50. Forhad H., Ambia A., Sohanur R.S., Nigar S., Abu R., Kazi F.H., 2022, Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), pp. 211-216.
51. Dasgupta D., Ghosh R., Sengupta T.K., 2013, Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated pseudomonas species, *ISRN Biotechnology*.
52. Parach A., Rezvani A., Mazaheri A., Mahnaz A.A., Behrouz, 2017, Biodegradation of Heavy Crude Oil Using Persian Gulf Autochthonous Bacterium, *International Journal of Environmental Research*, 11, pp. 1-9.
53. Chen Y., Yu B., Lin J., Naidu R., Chen Z., 2016, Simultaneous absorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material, *Chemical Engineering Journal*, 289, pp. 463-470.
54. Alessandrello M.J., Parellada E.A., Tomás M.S.J., Neske A., Vullo D.L., Ferrero M.A., 2017, Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for

- biofilm formation stimulation on polyurethane foam, *Journal of environmental chemical engineering*, 5(1), pp. 189-195.
55. Thanh Bình, *Vai trò của than sinh học (biochar) trong sản xuất nông nghiệp*, Trung tâm thông tin và ứng dụng tiến bộ khoa học Bình Thuận.
 56. Zhang L., Xu C., Champagne P., 2010, Overview of recent advances in thermochemical conversion of biomass, *Energy Conversion and Management*, 51(5), pp. 969-982.
 57. Allohverdi T., Mohanty A.K, Roy P., Misra M., 2021, A review on current status of biochar uses in agriculture, *Journal of Molecules*, 26(18), pp. 5584.
 58. Ronsse F., Van H.S., Dane D., Prins W., 2013, Production and characterization of slow pyrolysis biochar: influence of feedstock type and pyrolysis conditions, *Gcb Bioenergy*, 5(2), pp. 104-115.
 59. Uchimiya M., Liu Z., Sistani K., 2016, Field-scale fluorescence fingerprinting of biochar-borne dissolved organic carbon, *Journal of environmental management*, 169, pp. 184-190.
 60. Kong H., He J., Gao Y., Wu H., Zuezhu Z., 2011, Cosorption of Phenanthrene and Mercury (II) from Aqueous Solution by Soybean Stalk-Based Biochar, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), pp. 12116–12123.
 61. Soheil V., Sang S.L., Yong J.C., Kitae B., Jeon B.H., Andrew L., Park Y.K., 2022, Biochar application strategies for polycyclic aromatic hydrocarbons removal from soils, *Journal of Environmental Research*, 213.
 62. Beesley L., Moreno-Jiménez E., Gomez-Eyles J., 2010, Effects of Biochar and Greenwaste Compost Amendments on Mobility, Bioavailability and Toxicity of Inorganic and Organic Contaminants in a Multi-Element Polluted Soil, *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 158, pp. 2282-7.
 63. Hale S., Kelly H., Johannes L., Andrew R.Z., Gerard C., 2011, Effects of chemical, biological, and physical aging as well as soil addition on

- the sorption of pyrene to activated carbon and biochar, *Journal of Environmental Science Technology*, 45(24), pp. 10445–10453.
64. Oleszczuk P., Hale S.E., Lehmann J., Cornelissen G., 2012, Activated carbon and biochar amendments decrease pore-water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge, *Bioresource technology*, 111, pp. 84-91.
 65. Jing X., Wang Y., Liu W., Wang Y., Jiang H., 2014, Enhanced adsorption performance of tetracycline in aqueous solutions by methanol-modified biochar, *Chemical Engineering Journal*, 248, pp. 168-174.
 66. Pode R., 2016, Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, pp. 1468-1485.
 67. Bodie A.R., Micciche A.C., Atungulu G.G., Rothrock M.J., Ricke S.C., 2019, Current trends of rice milling byproducts for agricultural applications and alternative food production systems, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, pp. 47.
 68. Hossein A., Mohammad G., Mehran R., Sepideh A., Elnaz A., Chen C., Manouchehr G., 2021, Application of Rice Husk Biochar for Achieving Sustainable Agriculture and Environment, *Journal of Rice Science*, 28(4), pp. 325-343.
 69. Liu P., 2012, Modification of bio-char derived from fast pyrolysis of biomass and its application in removal of tetracycline from aqueous solution, *Journal of Bioresource technology*, 121, pp. 235-240.
 70. Bu X.L., Su J., Xue J.H., Wu Y.B., Zhao C.X., Wang L.M., 2019, Effect of RHB addition on nutrient leaching and microbial properties of Calcaric Cambisols, *Journal of Soil Water Conservations*, 74(2), pp. 172-179.
 71. Daljit S.K., Prakash N., Keeren S.R., Che F.I., Arifin A., Zamri R., Farrah M.M., Dzarifah Z., 2022, An overview on the preparation of rice husk biochar, factors affecting its properties, and its agriculture

- application, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21, 3, pp. 149-159.
72. O'Toole G.A., Kolter R., 1998, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Journal of Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 295-304.
73. Nguyễn Lâm Dũng, 1981, *Giáo trình Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
74. Gross R., Hauer B., Otto K., Schmid A., 2007, Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations, *Journal of Biotechnology Bioengineering*, 98(6), pp. 1123-1134.
75. Liang Y., Zhang X., Dai D., Li G., 2009, Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil, *Journal of International Biodeterioration Biodegradation*, 63, pp. 80-87.
76. Van B., Jan .B, Funhoff G., 2007, Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation, *Applied microbiology biotechnology bioengineering*, 74, pp. 13-21.
77. Chavan A., Mukherji S., 2008, Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: effect of N: P ratio, *Journal of hazardous materials*, 154(1-3), pp. 63-72.
78. Alessandrello M.J., Juarez Tomas M.S., Raimondo E.E, Vullo D.L., Marcela A.F., 2017, Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam under different temperature conditions, *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), pp. 156-160.
79. Song L., Niu X., Zhou B., Xiao Y., Zo H., 2022, Application of biochar-immobilized *Bacillus* sp. KSB7 to enhance the phytoremediation of PAHs and heavy metals in a coking plant, *Chemosphere*, 307, pp. 136084.
80. Imam A., Suman S.K., Singh R., Vempatapu B.P., Ray A., Kanaujia P.K., 2021, Application of laccase immobilized rice straw biochar for

anthracene degradation, *Journal of Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 268.

81. Saisai G., Xiaomei L., Lan W., Qinglong L., Chunqing X., Jingchun T., 2022, Ball-milled biochar can act as a preferable biocompatibility material to enhance phenanthrene degradation by stimulating bacterial metabolism, *Journal of Bioresource Technology*, 350.
82. Xiong B., Zhang Y., Arp H., Hou Y., Peter H., Reid B.J., Cai C., 2017, Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. agilyum* inoculated biochar, *Chemosphere*, 182, pp. 316-324.
83. Inyang M., Dickenson E., 2015, The potential role of biochar in the removal of organic and microbial contaminants from potable and reuse water: A review, *Chemosphere*, 134, pp. 232-240.

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU BẰNG VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN THAN SINH HỌC CÓ NGUỒN GỐC TỪ TRẤU

Trần Thị Lương¹, Đỗ Thị Liên², Cung Thị Ngọc Mai²,
Trần Thị Đào³, Trần Phương Minh⁴, Lê Thị Nhi Công^{1,2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

³Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

*Tác giả liên hệ: lenhicong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 01.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.03.2023

TÓM TẮT

Vấn đề ô nhiễm môi trường do dầu và các sản phẩm của nó gây ra đã và đang ở mức báo động vì dầu thường có độc tính cao và tương đối bền vững trong môi trường. Để giải quyết vấn đề trên, các biện pháp sinh học được xem là một những cách thức xử lý triệt để, thân thiện với môi trường và có chi phí thấp. Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có khả năng phân hủy/chuyển hóa các thành phần có trong dầu mỏ đã được lựa chọn để bước đầu tạo chế phẩm với chất mang là than sinh học nhằm ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu. Các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật truyền thống như sàng lọc, đánh giá khả năng tạo màng sinh học, đánh giá mật độ vi sinh và xác định hàm lượng dầu tổng số còn lại theo TCVN 4582-88 đã được sử dụng. Kết quả, đã sàng lọc được bốn chủng vi khuẩn gồm *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02. Đã xác định được nhiệt độ lên men phù hợp là 40°C và độ ẩm của chế phẩm là 40%. Chế phẩm tạo thành đã cho thấy hiệu quả loại bỏ dầu diesel lên tới 99% sau 7 ngày nuôi cấy với nồng độ dầu ban đầu là 10 g/kg đất.

Từ khóa: Lên men, màng sinh học, nước thải nhiễm dầu, phân hủy sinh học, than sinh học.

An Initial Study on oil Pollution Removal Product using Biofilm Forming Bacteria Attached on Husk Biochar

ABSTRACT

Oil contaminants create remarkably environmental pollution problems because they have high toxicity and are recalcitrant to the environment. Bioremediation is an attractive alternative of utilizing bacteria to remove oil contaminants. In the present study, bacterial strains producing biofilm capable of degrading oil contaminants/ components were screened and some fermentation conditions with rice husk biochar as carrier to produce biodegradation product to remove oil contaminants were tested. Several microbial traditional methods such as screening, biofilm formation, fermentation, microbe density and total oil removal by TCVN 4582-88 were conducted. As the results, four biofilm forming bacterial strains highly capable of degrading and metabolizing hydrocarbon compounds were selected, i.e. *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 and *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02. Fermentation on husk biochar to produce oil degrader product showed that suitable fermentation temperature was 40°C and the product moisture was 40%. The product exhibited high removal efficiency (99%) for diesel oil contaminants after 7 day-incubation at the initial concentration of 10g/kg oil polluted soil.

Keywords: Biochar, biofilm, biodegradation, fermentation, oil polluted waste water.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thế giới, ngành công nghiệp

khai thác và chế biến dầu đang là ngành mang lại lợi ích kinh tế - xã hội rất lớn. Cùng với sự phát triển không ngừng của ngành này, vấn đề

Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu

ô nhiễm môi trường do dầu và các sản phẩm của nó gây ra đang ở mức báo động. Cụ thể là, đất và nước nhiễm dầu do hai nguyên nhân: từ khu vực kho chứa bao gồm các hoạt động như súc rửa, làm mát bồn chứa, vệ sinh máy móc và thiết bị làm rơi vãi xăng dầu xuống nguồn đất và nước, nước mưa chảy tràn qua khu vực kho..., hoặc từ khu vực cảng tiếp nhận bao gồm các hoạt động như nước dằn tàu, nước vệ sinh tàu, nước ống dẫn dầu (khi kéo từ biển lên boong), rò rỉ trên đường ống dẫn dầu từ tàu về kho chứa... Dầu thường chứa hàng ngàn phân tử khác nhau, nhưng phần lớn là hydrocarbon no có số carbon từ 2 đến 26 và hydrocarbon thơm như hydrocarbon (HC) đa vòng, phenol, benzen... Hàm lượng thành phần HC thơm có trong đất nhiễm dầu thường dao động từ 100-150ppm (Inyang & Dickenson, 2015; Kong & cs., 2011). Dầu thường có độc tính cao và tương đối bền vững trong môi trường. Độc tính và tác động của dầu đến hệ sinh thái không giống nhau mà phụ thuộc vào loại dầu (Meliani & Bensoltane, 2014). Để giải quyết vấn đề trên, các quy trình xử lý đã được áp dụng như vật lý, hóa học, sinh học... Trong đó, quy trình sinh học là một trong những quy trình xử lý triệt để, thân thiện với môi trường và có chi phí thấp. Trong số các quy trình phân hủy sinh học, màng sinh học là một trong những quy trình xử lý ô nhiễm dầu hiệu quả, chi phí thấp, nên từ lâu đã được nhiều nước trên thế giới quan tâm nghiên cứu và ứng dụng.

Bên cạnh đó, để tăng cường hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu và có thể dễ dàng áp dụng trong các điều kiện địa hình khác nhau, việc sử dụng chất mang làm giá thể cho vi sinh vật tạo màng sinh học gắn lên đã và đang được ứng dụng rộng rãi. Trong số các chất mang này, than sinh học (biochar) được xem là chất mang tiềm năng trong xử lý môi trường cũng như xử lý ô nhiễm đất và nước nhiễm dầu do có chi phí thấp, đa dạng và khả năng hấp thụ tương đối tốt hơn than hoạt tính (Kearns & cs., 2014). Biochar là chất xốp có các gốc carbon và có nguồn gốc từ quá trình nhiệt phân sinh khối các loại chất thải, xác động, thực vật,... dưới điều kiện hạn chế oxy hoặc không có oxy (Ahmad & cs., 2014).

Cho tới nay, đã có nhiều công bố trên thế giới về khả năng hấp thụ hợp chất hydrocarbon dầu mỏ có trong đất và nước nhiễm dầu bởi

biochar. Chẳng hạn như biochar đã được chứng minh có khả năng ứng dụng trong xử lý một số hợp chất khó phân hủy như naphthalene (Chen & Chen, 2009), phenanthrene (Kong & cs., 2011), PAH (Beesley & cs., 2010), pyrene (Hale & cs., 2011). Đối với đất nhiễm dầu, việc sử dụng biochar đã được chứng minh có nhiều lợi thế như rút ngắn thời gian và dễ dàng thích nghi với nhiều loại hình không gian cũng như tính chất phức tạp của đất và chất ô nhiễm có trong môi trường. Hiện chưa có nhiều công bố về sử dụng biochar làm chất mang cho vi khuẩn tạo màng sinh học để tăng hiệu quả xử lý đất nhiễm dầu. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào việc sàng lọc các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có khả năng phân hủy/chuyển hóa các thành phần có trong dầu mỏ và bước đầu nghiên cứu một số điều kiện lên men cùng chất mang là than sinh học để tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có khả năng phân hủy thành phần hydrocarbon (HC) dầu mỏ lấy từ Bộ sưu tập của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học.

Biochar từ trấu có màu đen, kích thước: $1 \times 3 \times 0,5$ (mm), độ ẩm dưới 10%, được nhiệt hóa ở nhiệt độ 480-530°C, có diện tích bề mặt đặc hiệu là 1,5 m²/g, hàm lượng tro 42% và một lượng lớn các nhóm C-O, ví dụ phenolic, hydroxyl và các gốc ether.

Hóa chất: Các môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu được bán trên thị trường như LB (10g Tryptone+ 5g cao nấm men + 10g NaCl), NB (5g NaCl + 5g pepton + 1,5g cao nấm men. Các hóa chất sử dụng đều là hóa chất của các hãng Sigma, Merk (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá khả năng tạo biofilm của chủng vi khuẩn

Các chủng vi sinh vật được đánh giá khả năng tạo biofilm theo mô tả của Morikawa & cs. (2006) và O'Toole & Kolter (1998).

2.2.2. Kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lựa chọn

Chuẩn bị đĩa petri và môi trường MPA thạch, tiến hành cấy các chủng giống lên đĩa petri sao cho chúng sát nhau từng cặp một. Sau khi cấy xong, tiến hành nuôi ở 37°C đối với vi khuẩn trong vòng 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, nếu các chủng có sự đối kháng nhau thì vạch cấy sẽ bị gián đoạn tại các vị trí giao nhau của chúng (Nguyễn Lâm Dũng, 1981).

2.2.3. Nghiên cứu một số điều kiện lên men của các vi khuẩn tạo biofilm trên biochar có nguồn gốc từ trấu

Bước 1: Xử lý sơ bộ biochar: biochar trước khi sử dụng được khử trùng ướn ở 121°C trong 30 phút để loại bỏ các vi sinh vật ngoại lai, tạo biofilm trên vật liệu mang biochar.

Bước 2: Xác định nhiệt độ lên men phù hợp bằng cách nhân nuôi các chủng vi khuẩn lựa chọn qua đêm trong môi trường LB, nhằm làm tươi mới sinh khối; sau đó được nuôi lác trong bình tam giác có thể tích 500ml chứa môi trường LB. Ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 150rpm trong 10 phút và pha loãng trở lại để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24h nuôi, bổ sung 100g biochar vào 100ml môi trường LB và 10ml hỗn hợp giống (tỉ lệ 1:1:1:1). Cho hỗn hợp vào các tủ nuôi cấy có nhiệt độ khác nhau như 30, 35, 40 và 45°C. Sau 24, 48 và 72 giờ lên men, mẫu được lấy ra, đánh giá mật độ tế bào bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc (CFU/ml) và đánh giá hiệu quả phân huỷ dầu DO, từ đó tìm ra các điều kiện lên men thích hợp nhất cho việc tạo chế phẩm.

Bước 3 : Xác định độ ẩm của chế phẩm phù hợp bằng cách nhân nuôi các chủng vi khuẩn lựa chọn qua đêm trong môi trường LB, nhằm làm mới chủng, sau đó nuôi lác trên bình tam giác có thể tích 500ml chứa môi trường LB. Ly tâm thu sinh khối ở tốc độ 150rpm trong 10 phút và pha loãng trở lại để đạt tới sinh khối 10^8 CFU/ml. Sau 24h, bổ sung 100g biochar vào 0, 100, 150 và 200ml môi trường LB và 10ml hỗn hợp giống (tỉ lệ 1:1:1:1).

Độ ẩm của chế phẩm được xác định như sau:

$$V1 = C2 - C1$$

Trong đó, V1 là lượng nước có trong chế phẩm sau khi sấy; C2 là lượng chế phẩm trước khi sấy và đĩa dùng để đựng chế phẩm; C1 là lượng chế phẩm sau khi sấy và đĩa dùng để đựng chế phẩm.

$$V2 = C1 - \text{trọng lượng đĩa}$$

Trong đó, V2 là Chế phẩm khô sau khi sấy.

$$\text{Độ ẩm} = \frac{V1}{V2} \times 100\%$$

Kiểm tra mật độ và hiệu quả phân huỷ dầu DO của chế phẩm ở các độ ẩm đó.

2.2.4. Đánh giá mật độ tế bào trong chế phẩm và khả năng phân huỷ dầu của chế phẩm

a. Đánh giá mật độ tế bào vi khuẩn trong chế phẩm

Mật độ tế bào vi khuẩn trong chế phẩm ở các độ ẩm, nhiệt độ và thời gian lên men khác nhau được xác định bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc (CFU/g) (colony forming unit/g).

Cụ thể như sau:

Một gram chế phẩm được hòa trong 9ml nước muối sinh lý, lác mẫu từ 1-2 giờ ở nhiệt độ lên men tốt nhất. Hút 0,5ml mẫu hòa trong 4,5ml nước muối sinh lý. Mẫu được pha loãng tới hạn và lặp lại mỗi độ pha loãng 3 lần. Sau khi pha loãng tới hạn, hút 0,1ml từ các nồng độ pha loãng vào đĩa môi trường MPA thạch đã được chuẩn bị trước và tiến hành cấy gạt. Các đĩa sau khi được cấy chủng vi khuẩn được bao gói cẩn thận và nuôi ở tủ ấm đến khi khuẩn lạc phát triển. Tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc ở nồng độ pha loãng cao nhất cao nhất sau đó dựa vào công thức tính chỉ số khuẩn lạc (CFU/g) như sau:

$$\text{CFU/g} = X \times 10 \times 10^n \times 10 = X \times 10^{(n+2)}$$

Trong đó, X là số khuẩn lạc đếm được; 10 là độ pha loãng 10 lần; n là số lần pha loãng; 10 là 100 $\mu\text{l}/1\text{ml}$.

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

b. Phân tích hiệu suất phân huỷ dầu diesel của chế phẩm tạo thành

Chế phẩm tạo thành được đánh giá khả năng phân huỷ dầu diesel (DO) bằng phương pháp phân tích khối lượng theo tiêu chuẩn

Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu

TCVN 4582-88. Thêm 100g chế phẩm (trước và sau khi xử lý dầu diesel) vào dung môi chloroform, sau khi hòa tan trong chloroform thì lắc nhẹ (khoảng 10 phút) cho dầu tan hoàn toàn (quá trình chiết được tiến hành 3 lần). Khi đó dầu và dung môi sẽ tách làm hai lớp, dùng phễu chiết bỏ phần dung môi ở dưới đi. Phần dịch hòa tan còn lại được cô bay hơi bằng bếp cách cát cho tới cạn và cân khối lượng, ta sẽ thu được khối lượng của lượng dầu có trong lượng chế phẩm đó. Tùy vào điều kiện cụ thể, các chương trình chạy để phân tích mẫu sẽ có những thay đổi cho phù hợp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

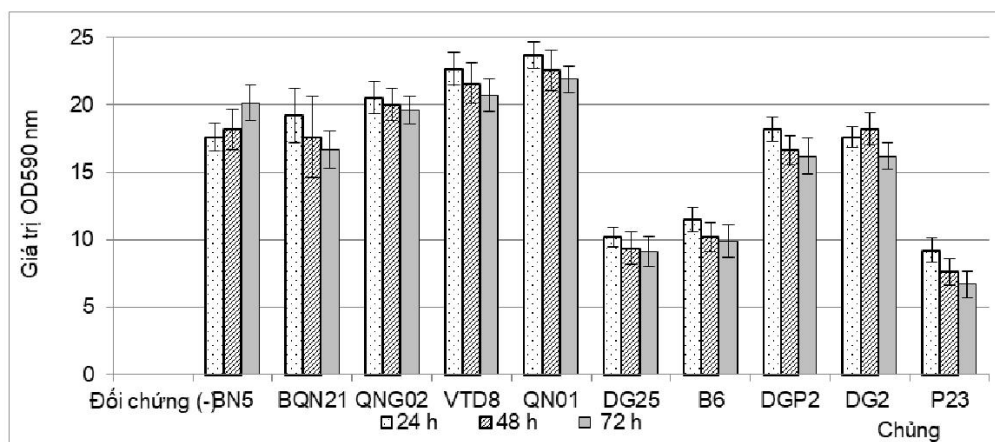
3.1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn

Chín chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có khả năng phân hủy thành phần hydrocarbon (HC) dầu mỏ lấy từ Bộ sưu tập của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ sinh học đã được sàng lọc để lựa chọn những chủng tạo màng cao nhất (Hình 1). Chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được cung cấp bởi GS. Morikawa (Trường Đại học Hokkaido, Nhật Bản) là một chủng có khả năng tạo màng sinh học tốt, đã được sử dụng làm đối chứng dương. Đối chứng âm là ống thí nghiệm không có vi sinh vật. Kết quả theo dõi khả năng tạo màng sinh học tại các thời điểm 24, 48 và 72h đã được thể hiện trên hình 1.

Kết quả trên hình 1 cho thấy, so với chủng đối chứng dương *Acinetobacter calcoaceticus* P23, cả 9 chủng lựa chọn đều có khả năng tạo màng tốt hơn. Đặc biệt, sau 72h, khả năng tạo màng sinh học của chủng *Rhodococcus* BN5 không bị giảm, trong khi màng sinh học của các chủng còn lại và chủng P23 đều giảm đi sau 72h nuôi cấy, tuy nhiên, lượng giảm đi là không đáng kể. Trong số 9 chủng này, 2 chủng DG25 và B6 có khả năng tạo màng sinh học không tốt bằng 7 chủng còn lại. Do đó, 7 chủng này sẽ được sử dụng trong những nghiên cứu tiếp theo. Nghiên cứu của Shimada & cs. (2012) cũng chỉ ra rằng các chi *Pseudomonas*, *Rhodococcus* là các chi có khả năng tạo màng sinh học tốt. Đặc biệt, chủng *P. stutzeri* T102 còn được chứng minh là có khả năng tạo màng sinh học tốt sau 120h nuôi cấy (Shimada & cs., 2012). Vì vậy, có thể nói rằng các chủng được lựa chọn là phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khả năng đối kháng lẫn nhau của các vi khuẩn lựa chọn

Hình 2 và bảng 1 cho thấy, chủng VTD8, BQN21 và DGP2 đối kháng với cả hai chủng QN01 và QNG02; các chủng còn lại không có sự đối kháng lẫn nhau. Do đó, 4 chủng QN01, QNG02, BN5 và DG2 được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo. Theo các kết quả kế thừa từ các nghiên cứu trước đó của nhóm tác giả, 4 chủng này đã được định tên là: *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02.



Hình 1. Khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn

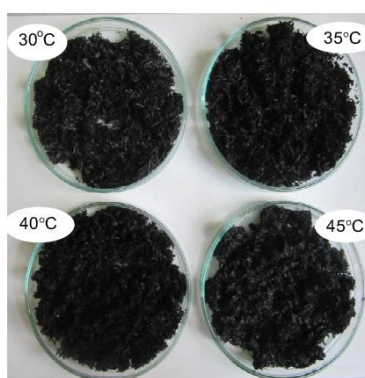


Hình 2. Sự đối kháng nhau của các chủng vi sinh vật lựa chọn

Bảng 1. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn

	BN5	BQN21	QNG02	VTD8	QN01	DGP2	DG2
BN5		+	+	+	+	+	+
BQN21	+		-	+	-	+	+
QNG02	+	-		-	+	-	+
VTD8	+	+	-		-	+	+
QN01	+	-	+	-		-	+
DGP2	+	+	-	+	-		+
DG2	+	+	+	+	+	+	

Ghi chú: +: Các chủng không đối kháng nhau; -: Các chủng đối kháng nhau.



Hình 3. Các mẫu chế phẩm được lên men ở các nhiệt độ khác nhau

3.3. Xác định nhiệt độ lên men tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu

3.3.1. Lên men ở các nhiệt độ khác nhau

Sau quá trình lên men ở các nhiệt độ khác nhau, mật độ tế bào của các chủng trong chế

phẩm đã được xác định. Mật độ tế bào trung bình đạt lần lượt là 25×10^9 ; 41×10^9 ; 55×10^{10} và 35×10^9 (CFU/g), tương ứng với các nhiệt độ lên men là 30, 35, 40 và 45°C. Như vậy, có thể thấy, mật độ tế bào của các mẫu đều đạt trên 10^9 (CFU/g) tuy nhiên, ở nhiệt độ lên men 40°C

Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu

mật độ đạt được là cao nhất. Để xác định nhiệt độ lên men nào phù hợp nhất, cần đánh giá hiệu quả phân hủy dầu của các mẫu chế phẩm này.

3.3.2. Đánh giá khả năng loại bỏ DO của các chế phẩm biochar tạo thành

Kết quả trên hình 4 cho thấy, mẫu được sấy ở 40°C cho hiệu suất phân hủy dầu DO là cao nhất (99%). Các mẫu chế phẩm sấy ở các nhiệt độ khác chỉ đạt hơn 75%. Do đó, nhiệt độ lên men ở 40°C đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4. Xác định độ ẩm lên men tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu

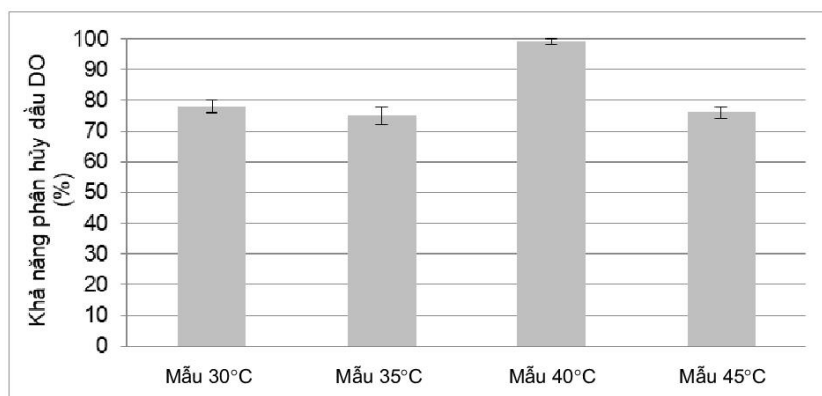
3.4.1. Lên men ở các độ ẩm khác nhau

Sau quá trình lên men với các độ ẩm khác nhau này, mật độ tế bào của các chủng trong chế phẩm đã được xác định. Mật độ tế bào trung bình đạt lần lượt là 85×10^9 ; 46×10^{10} ; 81×10^{10} và 59×10^{10} (CFU/g), tương ứng với các độ ẩm

lên men là 28,09; 35,13; 40 và 52,95%. Như vậy, có thể thấy, mật độ tế bào của các mẫu đều đạt trên 10^9 (CFU/g) tuy nhiên, độ ẩm lên men 40% mật độ đạt được là cao nhất. Để xác định độ ẩm nào phù hợp nhất, cần đánh giá hiệu quả phân hủy dầu của các mẫu chế phẩm này. Các chế phẩm tạo thành được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy, chuyển hóa dầu DO. Chế phẩm có độ ẩm phù hợp nhất sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.2. Đánh giá khả năng loại bỏ DO của các chế phẩm biochar tạo thành

Kết quả trên hình 5 cho thấy, chế phẩm mẫu số 3, có độ ẩm 40% cho hiệu quả phân hủy dầu cao nhất (99%). Các mẫu 1, 2 và 4 đều đạt hiệu suất hơn 94%. Mẫu đối chứng chất mang thể hiện khả năng hấp phụ dầu của chất mang biochar lựa chọn. Kết quả này có thể giải thích là do mật độ vi sinh vật ở mẫu có độ ẩm 40% là cao nhất, nên hiệu quả xử lý cũng sẽ cao hơn các mẫu khác.

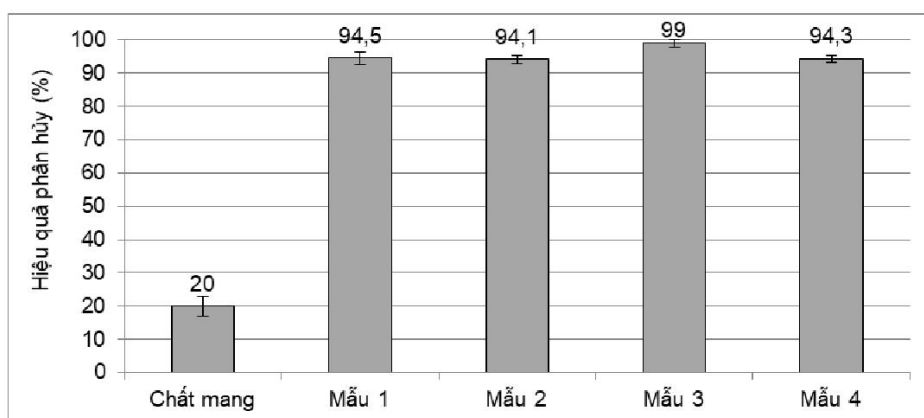


Ghi chú: Kí hiệu mẫu 30°C, 35°C, 40°C và 45°C là các mẫu đã được lên men ở các nhiệt độ tương ứng với kí hiệu đó.

Hình 4. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10 g/kg

Bảng 2. Các độ ẩm khác nhau của chế phẩm thu được sau sấy tại 40°C

	Trước sấy (cả đĩa) (g) - C2	Sau sấy (cả đĩa) (g) - C1	Trọng lượng đĩa (g) -	Khối lượng nước trong CP (g) - V1	Khối lượng CP khô (g) - V2	Độ ẩm (%)
Mẫu 1 (10% giống)	42	41	37,44	1	3,56	28,09
Mẫu 2 (bổ sung 100ml môi trường và 10% giống)	47	44	35,46	3	8,54	35,13
Mẫu 3 (bổ sung 150ml môi trường và 10% giống)	46	43,66	37,81	2,34	5,85	40,00
Mẫu 4 (bổ sung 200ml môi trường và 10% giống)	60	53	39,78	7	13,22	52,95



Ghi chú: Mẫu 1, 2, 3 và 4 tương ứng với các độ ẩm là 28,09; 35,13; 40 và 52,95%.

Hình 5. Khả năng phân hủy dầu DO của các chế phẩm sau 7 ngày nuôi cấy với hàm lượng dầu DO ban đầu là 10 g/kg

Liang & cs. (2009) đã chứng minh khi sử dụng carbon hoạt tính và zeolite làm chất mang cho các vi sinh vật tạo màng sinh học thì hiệu quả phân hủy dầu thô ở đất nhiễm dầu tăng lên đáng kể. Cụ thể, ở dạng có chất mang, hiệu suất phân hủy đạt 48,89%, trong khi để tự phân hủy trong tự nhiên là 13% (natural attention), còn thí nghiệm có bổ sung dinh dưỡng (biostimulation) và để tự phân hủy đạt 26,3%; và bổ sung vi sinh vật ở dạng tế bào tự do vào vùng bị ô nhiễm (bioaugmentation) thì hiệu suất phân hủy là 37,4% sau 3 ngày nuôi cấy với 800g đất nhiễm dầu (hàm lượng dầu trong đất là 49,81 mg/g).

Alessandrello & cs. (2017) đã chứng minh hai chủng *Pseudomonas monteilii* P26 và *Gordonia* sp. H19 tạo màng sinh học trên vật liệu mang mút xốp có khả năng loại bỏ 75% hàm lượng dầu thô (0,1 g/g) sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C. Tuy nhiên, cho tới nay chưa có nhiều công bố về việc sử dụng biochar để xử lý đất nhiễm dầu. Do vậy, mẫu chế phẩm số 3, có độ ẩm 40% sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, có thể thấy rằng, việc sử dụng các phế phụ phẩm nông nghiệp để tạo biochar làm chất mang cho các vi sinh vật tạo màng sinh học vừa giải quyết được vấn đề gây ô nhiễm môi trường bởi các phế phụ phẩm này, vừa tăng cường khả năng hấp thụ và loại bỏ các chất gây ô nhiễm khác trong môi trường. Đồng thời, đây được xem

là giải pháp có hiệu quả kinh tế và thân thiện với môi trường.

Tuy nhiên, hiện chưa có nhiều công bố ở Việt Nam về việc sử dụng biochar từ trấu, một loại phế phụ phẩm nông nghiệp rất phổ biến ở nước ta, làm chất mang cho các vi sinh vật tạo màng sinh học nhằm tăng cường khả năng loại bỏ dầu DO nói riêng và các thành phần hydrocarbon dầu mỏ nói chung. Do vậy, nghiên cứu này sẽ góp phần đưa ra giải pháp giải quyết bài toán môi trường do phế phụ phẩm nông nghiệp gây ra, đồng thời có thể xử lý ô nhiễm do dầu mỏ và các thành phần dầu mỏ.

4. KẾT LUẬN

Đã sàng lọc được 4 chủng vi khuẩn là *Acinetobacter baumannii* QN01, *Rhizobium* sp. DG2, *Rhodococcus* sp. BN5 và *Stenotrophomonas maltophilia* QNG02 tạo biofilm tốt, có khả năng phân huỷ các thành phần dầu mỏ với hiệu suất cao (lên đến 99%) và không đối kháng lẫn nhau. Từ các chủng này đã bước đầu xác định được nhiệt độ lên men tạo chế phẩm là 40°C và độ ẩm phù hợp nhất là 40%.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Nhiệm vụ Phát triển công nghệ mã số

Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu

UDPTCN 01/21-23 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học Môi trường, Viện Công nghệ sinh học, VAST.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad M., Rajapaksha A.U., Lim J.E., Zhang M., Bolan N., Mohan D., Vithanage M., Le S.S. & Ok Y.K. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*. 99: 19-33.
- Alessandrello M.J., Parellada E.A., Juárez Tomás M.S., Neske A., Vullo D.L. & Ferrero M.A. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 5: 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.11.037>
- Beesley L., Jiménez E.M. & Eyles J.L.G. (2010). Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution*. 158: 2282-2287.
- Chen B. & Chen Z. (2009). Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere*. 76: 127-133.
- Hale S. E., Hanley K., Lehmann J., Zimmerman A.R. & Cornelissen G. (2011). Effects of chemical, biological, and physical aging as well as soil addition on the sorption of pyrene to activated carbon and biochar. *Environmental of Science and Technology*. 45: 10445-10453.
- Inyang M. & Dickenson E. (2015). The potential role of biochar in the removal of organic and microbial contaminants from potable and reuse water: A review. *Chemosphere*. 134: 232-240.
- Kearns J., Wellborn L., Summers R. & Knappe D. (2014). 2,4-D adsorption to biochars: effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data. *Water Research*. 62: 20-28.
- Khan Z.A., Siddiqui M.F. & Park S. (2019). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*. 9: 49. <https://doi.org/10.3390/diagnostics90200>.
- Kong H., He J., Gao Y., Wu H. & Zhu X. (2011). Cosorption of phenanthrene and mercury (II) from aqueous solution by soybean stalk-based biochar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 12116-12123.
- Liang Y., Zhang X., Dai D. & Li G. (2009). Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International. Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.07.005>
- Meliani A. & Bensoltane A. (2014). Enhancement of hydrocarbons degradation by use of *Pseudomonas* biosurfactants and biofilms. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 5(1): 1-7.
- Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R. & Kanaya S. (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiology*. 152: 2801-7.
- Nguyễn Lâm Dũng (1981). Giáo trình Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- O'Toole G.A., Kaplan H.B. & Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology*. 54: 49-79.
- Shimada K., Itoh Y., Washio K. & Morikawa M. (2012). Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms. *Chemosphere*. 87: 226-233.