

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Kim Thanh

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU CỦA VI KHUẨN PHÂN
LẬP TRONG ĐẤT TẠI VỊNH CAM RANH, TỈNH KHÁNH HÒA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

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



Nguyễn Thị Kim Thanh

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU CỦA VI KHUẨN PHÂN
LẬP TRONG ĐẤT TẠI VỊNH CAM RANH, TỈNH KHÁNH HÒA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
PGS.TS. Phí Quyết Tiến

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Phí Quyết Tiến', is written below the name of the supervisor.

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu: “Đánh giá khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn phân lập trong đất tại vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa” 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. Đồng thời, kết quả này chưa từng được công bố trong bất cứ nghiên cứu nào khác. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2023

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Kim Thanh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập, thực hiện và hoàn thành đề tài Luận văn, tôi đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ và tạo điều kiện vô cùng quý giá từ nhiều cá nhân và tập thể.

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới thầy hướng dẫn PGS.TS. Phí Quyết Tiến, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, định hướng nghiên cứu và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian thực hiện Luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các thầy, cô giảng viên tại Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ đã nhiệt tình giảng dạy, truyền đạt kiến thức quý báu cho tôi trong suốt thời gian vừa qua.

Bên cạnh đó, tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Tổng giám đốc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, TS. Nguyễn Thu Hoài, TS. Ngô Cao Cường và tập thể các cán bộ phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga đã tạo mọi điều kiện, hỗ trợ và nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn đề tài “*Xây dựng quy trình công nghệ xử lý đất nhiễm dầu tại khu Căn cứ quân sự Cam Ranh bằng công nghệ sinh học*” thuộc Đề tài nghiên cứu KH&CN cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga đã hỗ trợ kinh phí và tạo điều kiện cho tôi trong quá trình thực hiện và sử dụng kết quả nghiên cứu của đề tài trong Luận văn.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới gia đình và bạn bè đã luôn bên tôi, ủng hộ, khích lệ, động viên, là chỗ dựa tinh thần cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2023

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Kim Thanh

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Vấn đề ô nhiễm dầu trong đất.....	3
1.1.1. Tình hình ô nhiễm dầu trong đất ven biển tại Cam Ranh, Khánh Hòa	4
1.1.2. Tác động của ô nhiễm dầu trong đất tới môi trường và sức khỏe con người	5
1.2. Xử lý ô nhiễm dầu trong đất bằng vi sinh vật.....	6
1.3. Một số nghiên cứu sử dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm dầu trong đất	7
1.3.1. Các vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu	7
1.3.2. Cơ chế phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bởi vi khuẩn	9
1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phân hủy dầu mỏ của vi khuẩn	12
1.4. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn phân hủy dầu ở Việt Nam.....	14
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	18
2.1.1. Mẫu đất nhiễm dầu trong điều kiện mặn	18
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị.....	19
2.1.3. Môi trường nuôi cấy	20
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.2.1. Phương pháp thu mẫu	21
2.2.2. Phân tích và đánh giá mức độ ô nhiễm dầu trong đất.....	21
2.2.3. Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu	22
2.2.4. Khảo sát tính đối kháng, xây dựng tổ hợp vi khuẩn phân hủy dầu	23
2.2.5. Đánh giá khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn trong điều kiện mặn	23
2.2.6. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến quá trình sinh trưởng các chủng vi khuẩn.....	24
2.2.7. Định danh chủng vi khuẩn bằng sinh học phân tử.....	25
2.2.8. Xử lý thống kê số liệu.....	26
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27

3.1.	Đặc điểm của mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh.....	27
3.1.1.	<i>Một số đặc tính đất và hàm lượng dầu trong đất</i>	27
3.1.2.	<i>Một số vi khuẩn trong đất nhiễm dầu tại Cam Ranh</i>	28
3.2.	Làm giàu và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân hủy dầu trong điều kiện mặn từ mẫu đất nhiễm dầu tại Cam Ranh	30
3.2.1.	<i>Làm giàu quần xã vi sinh vật phân hủy dầu</i>	30
3.2.2.	<i>Phân lập các chủng vi khuẩn phân hủy dầu</i>	33
3.3.	Đánh giá khả năng phân hủy dầu của các chủng vi khuẩn được phân lập	35
3.3.1.	<i>Khả năng phân hủy dầu của chủng vi khuẩn</i>	35
3.3.2.	<i>Tính đối kháng của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn</i>	38
3.3.3.	<i>Khả năng phân hủy dầu của 03 tổ hợp vi khuẩn</i>	39
3.4.	Đặc điểm phân loại các chủng vi khuẩn phân hủy dầu.....	43
3.4.1.	<i>Đặc điểm sinh hóa</i>	43
3.4.2.	<i>Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn</i>	44
3.4.3.	<i>Định danh một số chủng vi khuẩn được tuyển chọn</i>	47
	KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
	DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	53
	DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa Tiếng Anh	Giải nghĩa Tiếng Việt
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ để so sánh các trình tự gen/ protein cơ bản
CFU	Colony forming unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử mang thông tin di truyền
DO	Diesel oil	Dầu diesel
EPA	Environmental Protection Agency	Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ
GC-MS	Gas chromatography Mass spectrometry	Sắc kí khí ghép nối khối phổ
OC	Organic carbon	Cacbon hữu cơ tổng số
OD	Optical density	Mật độ quang
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon	Hydrocacbon thơm đa vòng
PCR	Polymerase chain reaction	Chuỗi phản ứng trùng hợp
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribônuclêic ribôxôm
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
TPH	Total petroleum hydrocarbons	Hydrocacbon dầu mỏ tổng số
TAE	Tris – acetate - EDTA	Dung dịch đệm chứa hỗn hợp bazơ Tris, axit axetic và EDTA
VK		Vi khuẩn
VSV		Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu về vi khuẩn phân hủy dầu tại Việt Nam	15
Bảng 2.1. Thông tin vị trí 7 mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh	18
Bảng 2.2. Các chỉ tiêu phân tích mẫu đất.....	22
Bảng 3.1. Một số chỉ tiêu phân tích các mẫu đất thu thập tại Cam Ranh	27
Bảng 3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn trong các mẫu đất thu thập tại Cam Ranh	30
Bảng 3.3. Số lượng các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất làm giàu lần 3	34
Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 7 chủng VK tuyển chọn.....	34
Bảng 3.5. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	39
Bảng 3.6. Tổ hợp vi sinh vật thử nghiệm khả năng phân hủy dầu.....	39
Bảng 3.7. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn tuyển chọn	43
Bảng 3.8. So sánh các chủng vi khuẩn phân lập với các chủng trên Genbank.....	48

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Bản đồ phân bố nguy cơ ô nhiễm dầu vùng biển Việt Nam và kế cận.....	5
Hình 1.2. Nguyên tắc chính quá trình phân hủy hydrocacbon hiếu khí của VS.....	10
Hình 1.3. Sự hấp thu dầu vào tế bào vi sinh vật nhờ vai trò của các chất hoạt động bề mặt [4].	11
Hình 2.1. Sơ đồ khu vực thu thập mẫu tại Cam Ranh, vị trí chấm đỏ chỉ điểm thu mẫu.....	18
Hình 2.2. Sơ đồ các bước thí nghiệm thực hiện trong nghiên cứu	21
Hình 3.1. Phân lập một số vi khuẩn trong mẫu đất tự nhiên 0622CR03.2 trên môi trường MPA, độ pha loãng 10^{-4}	29
Hình 3.2. Hình ảnh nuôi cấy tích lũy vi khuẩn trong mẫu đất nhiễm dầu lần 3	31
Hình 3.3. Hình ảnh phân lập vi khuẩn mẫu 0622CR03.2 trên môi trường MPA qua ba lần làm giàu	32
Hình 3.4. Biến động số lượng VK qua các lần làm giàu môi trường dịch thể.....	32
Hình 3.5. Biến động số chủng VK qua các lần làm giàu môi trường dịch thể	33
Hình 3.6. Khả năng phân hủy dầu chủng CR6 trong môi trường bổ sung 5% dầu thô trong DO và 15% NaCl tại các thời gian thử nghiệm khác nhau.....	36
Hình 3.7. Đường cong sinh trưởng 7 chủng VK môi trường muối khoáng dầu.....	37
Hình 3.8. Khả năng phân hủy dầu của chủng đơn VK sau 13 ngày thử nghiệm.....	38
Hình 3.9. Hình ảnh minh họa tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	38
Hình 3.10. Đường cong sinh trưởng của 3 tổ hợp vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu	40
Hình 3.11. Khả năng phân hủy dầu của tổ hợp vi khuẩn sau 13 ngày thử nghiệm ..	40
Hình 3.12. Phổ phân tích GC-MS của mẫu dầu tách chiết bằng n-hexan sau 13 ngày thử nghiệm (a) Mẫu đối chứng (b) Mẫu xử lý với tổ hợp vi khuẩn TH2	42
Hình 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn	45
Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn.....	46
Hình 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn	47
Hình 3.16. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn 16S rRNA của các chủng vi khuẩn và các loài gần gũi trên GenBank	49

MỞ ĐẦU

Hiện nay, cùng với sự phát triển về kinh tế xã hội, nhu cầu về năng lượng càng gia tăng. Việc khai thác, chuyên chở, sử dụng dầu mỏ và các sản phẩm từ dầu mỏ dẫn đến việc phát thải ra môi trường là điều không tránh khỏi. Đặc biệt tại các vùng ven biển, hoạt động khai thác, vận chuyển và sử dụng dầu mỏ dễ dẫn đến các sự cố rò rỉ, tràn dầu, làm phát tán dầu vào môi trường đất gây ô nhiễm nguồn đất nghiêm trọng. Vịnh Cam Ranh là khu vực quan trọng trong phát triển kinh tế - xã hội và an ninh - quốc phòng của Việt Nam. Thực tế khảo sát cho thấy một số địa điểm tại Cam Ranh có mùi dầu rõ rệt vào những ngày nắng. Đây được đánh giá là một trong những khu vực ô nhiễm dầu mỏ. Xăng dầu khi tồn tại trong đất, nếu không được xử lý triệt để sẽ gây phát tán mùi, ngấm vào nguồn nước ngầm gây nguy hại đến môi trường sinh thái, qua đó ảnh hưởng đến sự phát triển kinh tế, sức khỏe và đời sống con người. Hiện nay, bên cạnh các phương pháp xử lý ô nhiễm dầu trong đất bằng vật lý và hóa học, phân hủy sinh học ứng dụng vi sinh vật là phương pháp có tính ưu việt hơn với chi phí thấp, giá thành rẻ, thân thiện với môi trường và an toàn với sức khỏe con người.

Vi sinh vật với sự phong phú, đa dạng về thành phần loài cũng như các hoạt tính sinh học là đối tượng tiềm năng cho các nghiên cứu về khả năng phân hủy sinh học các chất hữu cơ từ dầu mỏ. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy vi khuẩn trong đất có khả năng khoáng hóa hoàn toàn các chất gây ô nhiễm hữu cơ thành cacbon dioxide, nước, các hợp chất vô cơ hoặc chuyển đổi các chất gây ô nhiễm hữu cơ phức tạp thành các hợp chất hữu cơ đơn giản. Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu ở điều kiện mặn khá phong phú với các chi phổ biến như *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*...[1, 2]. Chúng có khả năng tạo ra chất hoạt động bề mặt và hệ enzyme đa dạng liên quan đến khả năng phân hủy dầu như: dehydrogenase, catechol 2,3-dioxygenase, lipase, hydroxylase ankan [2, 3]. Ở Việt Nam, một số công bố của các tác giả Đặng Thị Cẩm Hà, Đoàn Đặng Phi Công, Lại Thuý Hiền, Lê Thị Nhi Công, Đỗ Thị Tố Uyên,... theo hướng nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm dầu đã cho thấy tiềm năng của phương pháp xử lý sinh học này. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới chủ yếu tập trung phân lập, đánh giá đặc điểm các chủng vi khuẩn cụ thể hoặc tập hợp vi khuẩn tổng hợp từ các nguồn nước thải, bùn thải trong khi các nghiên cứu ứng dụng công nghệ phân hủy sinh học bằng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm dầu các khu vực đất ven biển còn ít được nghiên cứu. Do đó, việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật bản địa có khả năng xử lý dầu, thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên, khí hậu, thổ nhưỡng để đưa ra các phương pháp xử lý

hiệu quả ô nhiễm dầu tại Cam Ranh là một trong các hướng nghiên cứu quan trọng góp phần bảo vệ môi trường gắn liền với sự phát triển kinh tế, xã hội bền vững ở vịnh Cam Ranh, Việt Nam.

Từ những cơ sở trên, đề tài “***Đánh giá khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn phân lập trong đất tại vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa***” được thực hiện nhằm nghiên cứu đặc điểm đất nhiễm dầu tại khu vực vịnh Cam Ranh và tuyển chọn các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy dầu tốt trong điều kiện nhiễm mặn, nhằm cung cấp một cái nhìn tổng quan, góp phần định hướng áp dụng cho các công nghệ xử lý dầu hiệu quả bằng phương pháp sinh học.

Mục tiêu của đề tài:

Tuyển chọn, đánh giá được đặc điểm sinh học, khả năng phân hủy dầu của các chủng vi khuẩn bản địa phân lập từ mẫu đất nhiễm dầu tại vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa.

Nội dung nghiên cứu:

- Nghiên cứu đặc điểm của mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh
- Làm giàu và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân hủy dầu trong điều kiện mặn từ mẫu đất nhiễm dầu tại Cam Ranh
- Đánh giá khả năng phân hủy dầu của các chủng đơn và tổ hợp vi khuẩn tuyển chọn
- Nghiên cứu đặc điểm phân loại các chủng vi khuẩn phân hủy dầu

Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Vấn đề ô nhiễm dầu trong đất

Đất là nguồn tài nguyên thiên nhiên quý giá đối với hoạt động sản xuất của con người. Trong những năm gần đây, tình trạng ô nhiễm dầu trong đất là mối quan tâm hàng đầu của nhiều quốc gia, đặc biệt đối với các nước có nền công nghiệp dầu khí phát triển. Ô nhiễm dầu không chỉ do công nghiệp khai thác, vận chuyển dầu khí mà còn do một loạt các nguyên nhân khác như tai nạn, sự cố tràn dầu [4]. Việc khoan thăm dò hay khoan giếng để khai thác dầu mỏ thải ra một lượng lớn nước có lẫn thành phần dầu, tuy nhiên có đến 91% lượng nước thải này được xả trực tiếp ra biển [5]. Việc xây dựng cảng biển, kéo theo sự phát triển của các khu công nghiệp liền kề, dẫn đến đất rừng bị ngập mặn, hàng ngàn hecta bãi triều, cỏ biển đang bị phá huỷ bởi chất thải và dầu loang. Các sự cố tràn dầu, rò rỉ hệ thống đường ống ngầm khiến dầu tràn ra biển, ngấm vào đất ven biển và đi vào nguồn nước ngầm. Bên cạnh đó, nhiều vụ tai nạn nghiêm trọng đã làm phát thải một lượng dầu khổng lồ ra môi trường. Do đó, ở nhiều khu vực đất ven biển của các nước trên thế giới và Việt Nam đang phải đối mặt với tình trạng ô nhiễm dầu nghiêm trọng.

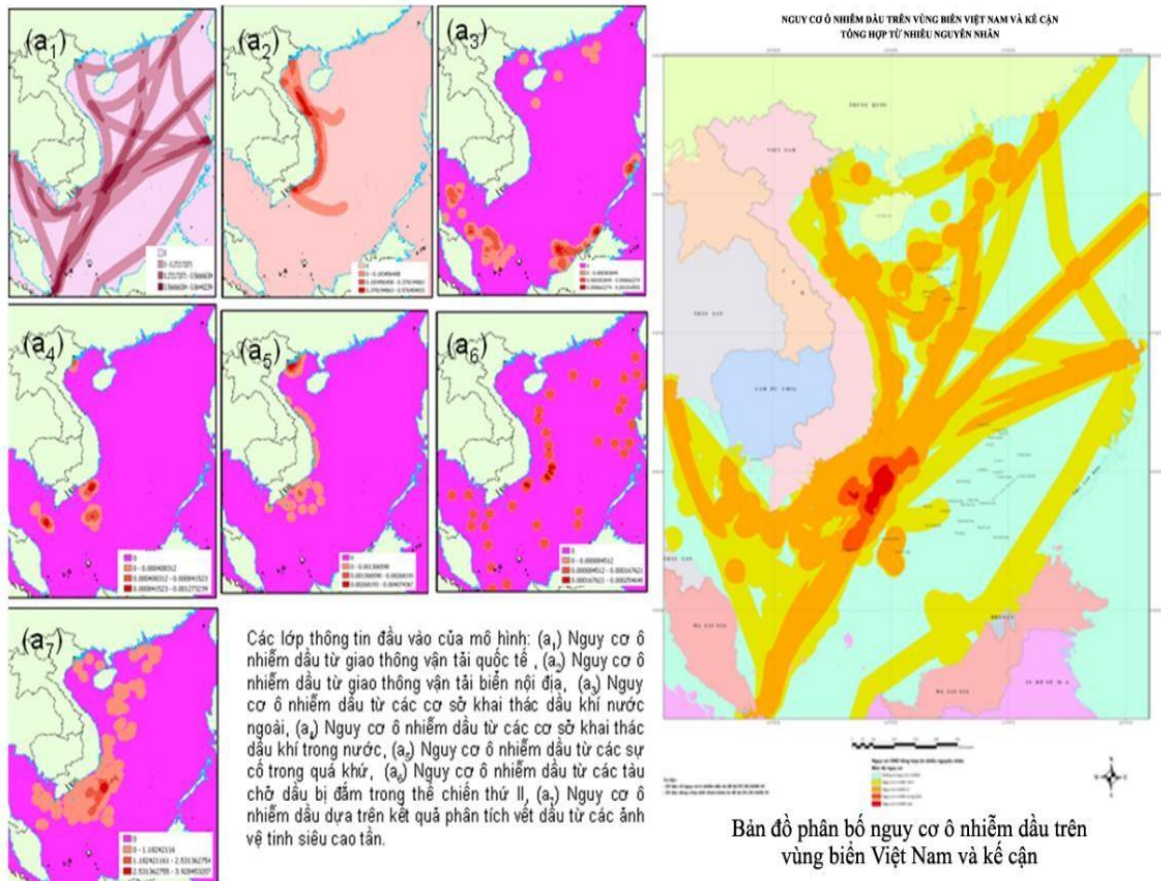
Hiện nay, mặc dù các hoạt động phát triển dầu khí trên biển có những quy định nghiêm ngặt về an toàn vận hành nhưng các vụ tai nạn vẫn thường xảy ra. Ngày 6 tháng 01 năm 2018, tàu chở dầu Sanchi của Hồng Kông rời "Changfeng Crystal" bị va chạm cách cửa sông Dương Tử khoảng 160 hải lý về phía đông, khiến toàn bộ con tàu bắt lửa. Khoảng 136.000 tấn dầu trên tàu lan rộng, cháy trong 8 ngày, gây ô nhiễm dầu lớn và thiệt hại kinh tế [6]. Hệ sinh thái vùng vịnh Mexico bị ô nhiễm nghiêm trọng do vụ nổ giàn khoan Deepwater Horizon năm 2010. Đây là vụ tràn dầu lớn nhất trên biển Hoa Kỳ cho đến nay, trong đó 4,1 triệu thùng dầu thô chảy loang trên biển khiến ít nhất 2.500 km² nước biển bị dầu bao phủ. Hai năm sau khi vụ tràn dầu bắt đầu, dầu vẫn còn tồn tại trên 687 km² và tác hại còn ảnh hưởng đến tận ngày nay [7]. Dầu tràn ra biển không chỉ gây ô nhiễm nước biển mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường hệ sinh thái đất ven biển. Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ đã phân loại dầu và các sản phẩm dầu là chất gây ô nhiễm môi trường ưu tiên, có khả năng gây ra những tình huống ô nhiễm khẩn cấp và nghiêm trọng [8].

Tại Việt Nam, các sự cố tai nạn, tràn dầu cũng là nguyên nhân chính dẫn tới ô nhiễm đất ven biển. Năm 2021, Việt Nam khai thác gần 11 triệu tấn dầu thô, trong đó 9,1 triệu tấn từ các mỏ trong nước, và gần 1,9 triệu tấn khai thác từ các mỏ nước ngoài. Theo Thống Kê Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế, trong số 39 quốc gia

được thống kê, Việt Nam là một trong 3 quốc gia (cùng với Trung Quốc và Hoa Kỳ) có số lượng sự cố tràn dầu nhiều nhất. Từ năm 1992 đến nay có 190 sự cố tràn dầu xảy ra tại Việt Nam, trong đó có 37 vụ ngoài khơi chiếm 19%, 88 vụ ven bờ chiếm 47% và 65 vụ trên đất liền chiếm 34%. Năm 2021, tàu chở dầu ĐNa 0607 của Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Hòa Khánh bị sự cố dẫn đến chìm tàu, trên tàu lúc này có khoảng 4 m³ dầu DO. Lượng dầu thoát ra ngoài loang trên bề mặt khoảng 20 m². Ngày 21/4/2022, do va chạm giữa 2 tàu biển tại cửa vịnh Phan Rang, Ninh Thuận, khoảng 2 tấn dầu DO có nguy cơ tràn ra biển. Việc giải phóng xăng dầu như vậy vào môi trường có thể gây ra thiệt hại vĩnh viễn nếu chúng không được xử lý kịp thời [9]. Mặc dù nhà nước đã ban hành nhiều thể chế, chính sách nhằm thắt chặt quản lý nguy cơ rò rỉ xăng dầu trong các hoạt động khai thác, chế biến, lưu trữ, vận chuyển, phân phối xăng dầu. Tuy nhiên, các biện pháp này chỉ góp phần ngăn chặn phát thải xăng dầu ra môi trường, còn một lượng lớn xăng dầu trong đất cần phải có biện pháp xử lý triệt để, phù hợp để bảo vệ môi trường sinh thái và sức khỏe con người.

1.1.1. Tình hình ô nhiễm dầu trong đất ven biển tại tỉnh Cam Ranh, Khánh Hòa

Cam Ranh (thành phố trực thuộc tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam) là khu vực có vị trí chiến lược quan trọng về kinh tế và quốc phòng. Với diện tích khoảng 690 km², điều kiện tự nhiên đa dạng gồm đồi núi, đồng bằng, biển, vịnh, đảo và bán đảo. Đây là vùng có nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng, có tiềm năng khai thác lớn về khoáng sản, thủy sản, phát triển du lịch, giao thông biển [10]. Bán đảo Cam Ranh và vịnh Cam Ranh ngày nay trở thành một trong những căn cứ hải quân quan trọng, chủ yếu phục vụ quốc phòng và phát triển kinh tế du lịch biển, cảng biển hiện đại tốt bậc nhất thế giới. Tuy nhiên, hiện nay, môi trường vùng vịnh Cam Ranh đang phải đối mặt với các vấn đề ô nhiễm môi trường, đặc biệt là ô nhiễm dầu trong đất. Theo bản đồ phân bố nguy cơ ô nhiễm dầu trên vùng biển Việt Nam và kế cận của nhóm tác giả Nguyễn Đình Dương, khu vực ven biển Cam Ranh là một trong những khu vực ô nhiễm dầu mức độ cao [11]. Theo kết quả khảo sát thực địa của nhóm nghiên cứu, vào những ngày nắng nóng tại đây có thể cảm nhận rõ mùi dầu từ đất phát tán vào không khí, trong mạch nước ngầm ở độ sâu 7-10 mét quan sát thấy có sự xuất hiện của váng dầu. Điều đó cho thấy khu vực vùng vịnh Cam Ranh có nguy cơ ô nhiễm dầu cao, cần có những biện pháp khảo sát nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm, mức độ ô nhiễm và đưa ra biện pháp xử lý ô nhiễm dầu hiệu quả.



Hình 1.1. Bản đồ phân bố nguy cơ ô nhiễm dầu trên vùng biển Việt Nam và kế cận [11]

1.1.2. Tác động của ô nhiễm dầu trong đất tới môi trường và sức khỏe con người

Dầu mỏ chứa nhiều hợp chất độc hại khó phân hủy trong tự nhiên đồng thời có khả năng phát tán rộng. Do đó, dầu mỏ trong đất nếu không được xử lý triệt để sẽ là mối nguy hại với môi trường sinh thái, qua đó ảnh hưởng đến phát triển kinh tế, đời sống và sức khỏe con người.

Dầu và các sản phẩm từ dầu xâm nhập vào đất sẽ làm đất bị ô nhiễm, thiếu không khí, ngăn cản quá trình quang hóa của môi trường đất. Hydrocacbon dầu mỏ kỵ nước, lấp đầy các lỗ rỗng của đất và giảm khả năng trao đổi khí và khả năng thấm nước của đất [12]. Dầu làm thay đổi thành phần lý hóa trong đất làm mất khả năng trao đổi, hấp thụ và diệt các vi sinh vật, gây mất cân bằng hệ sinh thái. Dầu có thể gây ra sự tổn thương vật lý và độc tố đối với các loài động vật, thực vật và hệ thống thủy sinh. Điều này có thể làm suy giảm số lượng và đa dạng loài trong hệ sinh thái [13, 14].

Dầu thấm qua đất xuống mạch nước ngầm và gây ô nhiễm nguồn nước ngầm. Dầu và các sản phẩm của dầu có thể xâm nhập vào cơ thể con người theo các

con đường khác nhau như qua nguồn thức ăn, hô hấp và thấm qua da vào các cơ quan phổi, gan, thận, xương tủy của cơ thể và có ở trong máu. Từ đó chúng có thể phân tán đi toàn bộ cơ thể gây ra các bệnh cấp tính và mãn tính. Khi tiếp xúc với dầu nhớt ở nồng độ cao có thể gây nên tình trạng nhiễm độc cấp tính đối với hệ thần kinh, gây nên các tổn thương nghiêm trọng như: viêm dây thần kinh ngoại vi, suy giảm trí nhớ, dị cảm, mất điều hòa và động kinh. Ở nồng độ đủ lớn (>10.000 ppm), xăng dầu có thể hoạt động như một chất gây mê, đôi khi dẫn đến mất ý thức ngay lập tức [12].

Thêm vào đó, ô nhiễm dầu trong đất có thể gây ra thiệt hại đáng kể cho ngành nông nghiệp, chăn nuôi và các ngành kinh tế khác phụ thuộc vào tài nguyên đất. Do đó, nó ảnh hưởng đến nguồn cung cấp thực phẩm và đời sống xã hội của con người.

Từ những dữ liệu trên cho thấy, việc lựa chọn phương pháp để kiểm soát và xử lý ô nhiễm dầu an toàn, hiệu quả là rất quan trọng để bảo vệ môi trường và duy trì cân bằng sinh thái. Đây cũng là vấn đề cấp thiết được các nhà khoa học trên toàn thế giới quan tâm nghiên cứu.

1.2. Xử lý ô nhiễm dầu trong đất bằng vi sinh vật

Hiện nay, để xử lý ô nhiễm dầu trong đất, nước, một số phương pháp xử lý vật lý, hóa học được ứng dụng cho thấy quả cao và được áp dụng phổ biến ở các nước trên thế giới. Phương pháp vật lý sử dụng các lực trọng trường, lực ly tâm để tách, loại phần dầu nổi trên mặt nước, các chất không hoà tan, tạp chất cơ học... ra khỏi đất ô nhiễm. Phương pháp hóa học cũng cho thấy hiệu quả cao như sử dụng các hợp chất oxi hóa mạnh ozone, hydrogen peroxide, hypochloride, clo và dioxit clo để oxi hóa dầu và các hợp chất ô nhiễm khác trong đất thành các chất ít độc hơn; sử dụng các chất hấp thụ như than hoạt tính hoặc zeolite để loại bỏ dầu và các hợp chất nhiễm khác từ đất [9, 12]. Các phương pháp này đều cho thấy hiệu quả làm sạch dầu rõ rệt, nhanh chóng, cơ động, đặc biệt với dầu thô. Tuy nhiên, các phương pháp này thường đòi hỏi chi phí cao và xử lý không được triệt để, có thể tạo ra ô nhiễm thứ cấp [4]. Trong những năm gần đây, xử lý sinh học được cho là một công cụ quan trọng để loại bỏ các chất gây ô nhiễm độc hại khỏi hệ sinh thái và nó đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học.

Xử lý sinh học (bioremediation) là một phương pháp hiệu quả và thân thiện với môi trường để cải tạo môi trường đất bị ô nhiễm dầu bằng cách sử dụng các cơ chế sinh học vốn có của vi sinh vật để loại bỏ các chất gây ô nhiễm nguy hiểm và khôi phục hệ sinh thái về tình trạng ban đầu [13]. Về bản chất, xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp sinh học thực hiện theo nguyên tắc tác động tích cực đến tập

đoàn vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy dầu có sẵn nhằm làm tăng tốc độ phân hủy tự nhiên. Có hai phương pháp phân hủy sinh học được ứng dụng phổ biến:

- Thúc đẩy sinh học (Bioaugmentation): là phương pháp bổ sung các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu tốt vào quần xã vi sinh vật tự nhiên tại khu vực ô nhiễm [15]. Cách tiếp cận này cho thấy hiệu quả đáng kể trong việc xử lý sinh học ở một số địa điểm bị ô nhiễm. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, vi khuẩn được phân lập từ các địa điểm bị ô nhiễm khác không thể tồn tại trong môi trường mới [16].

- Kích thích sinh học (Biostimulation): là phương pháp kích thích khả năng phát triển và tăng tốc độ phân hủy dầu của vi sinh vật bản địa bằng cách bổ sung chất dinh dưỡng hoặc tối ưu hóa các điều kiện môi trường tự nhiên [15].

Mỗi phương pháp có những ưu nhược điểm riêng. Việc lựa chọn phương pháp cụ thể phải dựa vào tính chất của dầu, môi trường đất và các yếu tố khác nhau. Trong đó, phương pháp sinh học sử dụng vi sinh vật được xem là cách tiếp cận xử lý triệt để, bảo đảm cân bằng sinh thái và tiết kiệm chi phí hơn so với các phương pháp hóa học và vật lý thông thường.

1.3. Một số nghiên cứu sử dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm dầu trong đất

Nhiều loài vi khuẩn trong đất có khả năng phân hủy dầu bằng cách sử dụng hydrocacbon dầu mỏ như một nguồn cacbon và năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển. Xử lý ô nhiễm dầu bằng phân hủy sinh học được nghiên cứu chủ yếu với vi khuẩn, nấm men và nấm sợi [17]. Cho đến nay, người ta đã xác định được hơn 200 loài vi khuẩn, nấm men và nấm sợi có khả năng phân hủy được các hydrocacbon có số nguyên tử cacbon thay đổi từ C_1 đến các hợp chất có số nguyên tử cacbon lớn hơn C_{40} . Trong đó, vi khuẩn là tác nhân tích cực nhất trong quá trình phân hủy hydrocacbon [4].

1.3.1. Các vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu

Vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocacbon rất phong phú và đa dạng. Các vi khuẩn phân huỷ hydrocarbon có thể dễ dàng tìm thấy với số lượng lớn gần những nơi tiếp xúc với ô nhiễm dầu, chẳng hạn như khu vực bị rò rỉ ngấm dầu thô, đường ống vận chuyển, cảng biển, mỏ dầu, trạm xăng và các cơ sở tương tự khác. Nhóm tác giả Xu và cộng sự (2018) đã báo cáo rằng hơn 79 chi vi khuẩn được xác định có khả năng phân hủy hydrocacbon. Một số chi vi khuẩn phổ biến tham gia vào quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ như *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*,

Staphylococcus, *Streptobacillus*, *Streptococcus* và *Rhodococcus* [14]. Shaopeng Yan và cộng sự (2014) đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn thuộc các chi, loài *Bacillus pumilus*, *Rhizobium* sp., *Microbacterium oxydans*, *Arthrobacter* sp., *Bacillus* spp. từ đất bị ô nhiễm dầu từ mỏ dầu Đại Khánh. Các chủng này có khả năng sinh tổng hợp enzyme liên quan khả năng phân hủy hoàn toàn hydrocacbon có mạch từ C₁₁~C₁₈ và phân hủy một phần hydrocacbon có mạch từ C₁₉~C₂₄ bao gồm dehydrogenase, catechol 2,3-dioxygenase và lipase [2]. Nghiên cứu của Daniel Garrido-Sanz và cộng sự (2019) đã phân tích trình tự metagenomics shotgun về đa dạng hệ vi sinh vật trong vùng đất nhiễm dầu diesel tại Tây Ban Nha dựa trên gen 16S rRNA cho thấy hệ vi sinh vật phân hủy dầu diesel bao gồm 76 biến thể trình tự khuếch đại và các chi chính gồm có *Pseudomonas*, *Aquabacterium*, *Chryseobacterium* và *Sphingomonadaceae*. Chúng có các enzyme mã hóa gen liên quan đến quá trình oxy hóa ban đầu của alkan (AlkB, LadA, CYP450) và nhiều loại dioxygenase hydroxyl hóa và phân cắt vòng liên quan đến sự phân hủy hydrocacbon thơm và đa nhân [18].

Các khu vực đất ven biển có nguy cơ ô nhiễm dầu từ các hoạt động khai thác dầu ngoài biển, các vụ tai nạn tàu biển,... Tính chất của đất có ảnh hưởng đến sự phân hủy tự nhiên của hydrocacbon trong các khu vực bị ô nhiễm dầu mỏ. Đối với đất bị ô nhiễm dầu, cấu trúc đất và các đặc điểm hóa lý và sinh học, ví dụ như hàm lượng chất hữu cơ của đất, mật độ khối, độ xốp, tính thấm, sự hô hấp của đất và quá trình chuyển hóa vật chất, có thể bị thay đổi bởi tính kỵ nước cao của hydrocacbon. Trong đó, độ mặn, nồng độ tổng hydrocacbon và hàm lượng C, N trong đất là yếu tố chính thay đổi thành phần vi sinh vật [19].

Số lượng và thành phần vi sinh vật không đồng đều ở những khu vực khác nhau và độ sâu khác nhau tùy theo điều kiện môi trường cụ thể. Những môi trường có chứa nhiều chất hữu cơ, số lượng và thành phần vi khuẩn phát triển mạnh. Vi khuẩn tập trung nhiều ở lớp đất bề mặt độ sâu từ 5cm đến 10cm do độ ẩm thích hợp (50% - 90%), các chất dinh dưỡng lại tích lũy nhiều, không bị tác dụng của ánh sáng nên vi sinh vật phát triển nhanh [19]. Các quá trình chuyển hoá quan trọng trong đất chủ yếu xảy ra ở độ sâu này. Số lượng và thành phần vi khuẩn sẽ giảm ở độ sâu trên 30cm (hầu như không có trừ trường hợp mạch nước ngầm) do áp suất lớn và nghèo chất hữu cơ nên vi sinh vật khó phát triển, thường là nhóm yếm khí như nhóm khử sunfat, nhóm nitrat hoá....

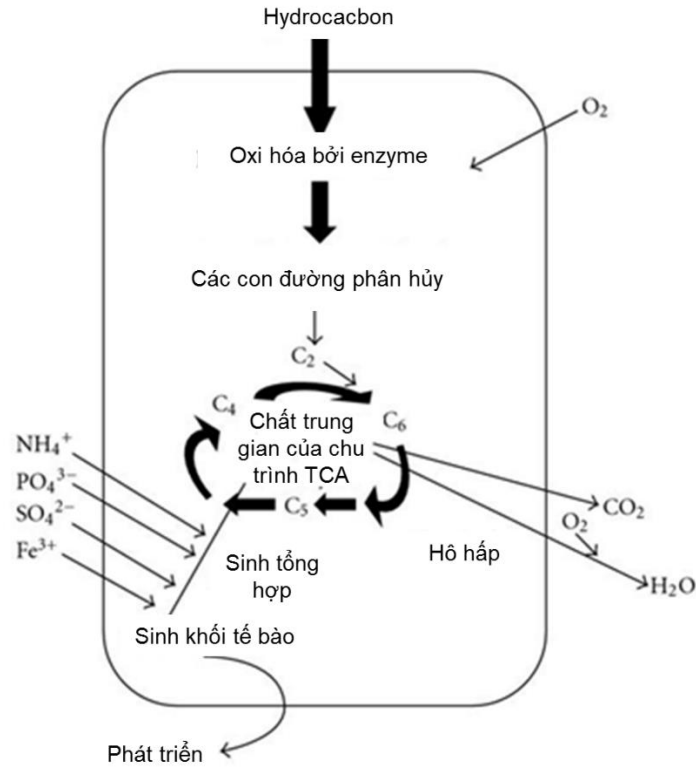
Tại các khu vực ven biển, trong điều kiện mặn, các vi khuẩn phân lập được cũng cho thấy khả năng xử lý dầu. Từ đất và nước bị ô nhiễm dầu mỏ ở mỏ dầu khu vực Thiên Tân, Trung Quốc, Yilin Liu và cộng sự đã tìm ra 50 loại vi khuẩn có khả

năng phân hủy dầu thô và có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt. Các chủng này được xác định thuộc các chi, loài *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Achromobacter* sp., *Acinetobacter venetianus*, *Lysinibacillus macroides*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Rhodococcus* sp. và *B. thuringiensis*. Tổ hợp 4 vi khuẩn từ tập hợp các loài trên được nghiên cứu có khả năng phân hủy 85,2% hàm lượng dầu thô ở nồng độ 0,8% sau 60 ngày thử nghiệm. Các chủng trên có khả năng thích nghi với các điều kiện nhiệt độ cao, môi trường kiềm và môi trường có độ mặn cao [20]. Martins và Peixoto (2012) cho rằng sinh vật quang tự dưỡng ưa mặn có thể là một yếu tố quan trọng cho sự phân hủy hydrocacbon vì hoạt động của chúng có thể bù đắp sự thiếu hụt oxy do môi trường quá mặn. Các loài vi sinh vật thuộc chi *Halomonas Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Haloferax*, *Haloarcula*, và *Halobacteria* được tìm thấy phổ biến ở môi trường có độ mặn cao với khả năng phân hủy nhiều loại hydrocacbon [21].

1.3.2. Cơ chế phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bởi vi khuẩn

Dầu mỏ là một hỗn hợp các hợp chất hữu cơ gồm hai thành phần chủ yếu: hydrocacbon và thành phần phân cực, trong đó các hợp chất hydrocacbon chiếm 60%-90%. Đã có hơn 230 hydrocacbon được tìm thấy trong dầu. Hydrocacbon chia thành 2 loại: hydrocacbon no và hydrocacbon thơm. Hydrocacbon no gồm các n-alkan mạch thẳng, n-alkan mạch nhánh và hydrocacbon no mạch vòng. Hydrocacbon thơm gồm có hydrocacbon thơm đơn nhân như toluen, benzen, ethylbenzen, xylen (TBEX) v.v. và hydrocacbon thơm đa nhân (polycyclic aromatic hydrocacbon - PAH) [17].

Sự phân hủy hydrocacbon của vi sinh vật là cơ chế chính và tất yếu để loại bỏ các chất ô nhiễm từ dầu mỏ ra khỏi môi trường. Nhiều loài vi khuẩn trong đất có khả năng phân hủy dầu bằng cách sử dụng hydrocacbon dầu mỏ như một nguồn cacbon và năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển [22, 23]. Các vi sinh vật bản địa trong môi trường đất nhiễm dầu theo thời gian sẽ thích nghi và hình thành nên quần xã sinh vật có thể sử dụng các chất gây ô nhiễm để sinh trưởng và phát triển. Chúng có khả năng chuyển đổi các chất gây ô nhiễm hữu cơ phức tạp thành các hợp chất hữu cơ đơn giản hoặc khoáng hóa các chất gây ô nhiễm hữu cơ thành cacbon dioxide, nước, các hợp chất vô cơ và một phần cấu thành protein tế bào [4, 24].



Hình 1.2. Nguyên tắc chính của quá trình phân hủy hydrocarbon hiếu khí của VSV [25]

Trong thực tế, quá trình phân hủy hydrocarbon của vi sinh vật thường diễn ra trong điều kiện hiếu khí. Hình 1.2 cho thấy nguyên lý của quá trình phân hủy hiếu khí hydrocarbon. Quá trình dị hóa hiếu khí của hydrocarbon có thể nhanh hơn, do lợi thế trao đổi chất là có sẵn O₂ làm chất nhận điện tử. Các enzyme tham gia vào quá trình oxy hóa, kích thích quá trình phân hủy, chuyển đổi từng chất ô nhiễm thành các chất trung gian của quá trình chuyển hóa trung tâm, ví dụ như chu trình axit tricarboxylic. Sản phẩm cuối cùng của quá trình oxy hóa hydrocarbon là acetyl-CoA, được dị hóa trong chu trình axit xitric, cùng với việc tạo ra các điện tử trong chuỗi vận chuyển điện tử. Chuỗi này được lặp đi lặp lại, tiếp tục phân hủy hydrocarbon và sản phẩm thường được oxy hóa hoàn toàn thành CO₂ [25].

Quá trình phân hủy dầu diễn ra theo nhiều giai đoạn và chu trình khác nhau tùy từng loại hydrocarbon và nhóm vi sinh vật phân hủy nhờ vào hệ thống các enzyme của chúng. Các gen liên quan đến việc kích hoạt hay ức chế hoạt động của những enzyme này có thể nằm trên DNA nhiễm sắc thể hoặc DNA plasmid. Trong đó, các hydrocarbon được phân hủy bởi vi sinh vật theo thứ tự ưu tiên sau: alkan mạch thẳng, alkan mạch nhánh, hợp chất vòng thơm phân tử lượng nhỏ, xycloalkan. Các ankan, đặc biệt là những ankan có độ dài trung bình (C₁₆–C₂₀) dễ bị phân hủy hơn do cấu trúc đơn giản và tính kỵ nước tương đối thấp. Một số hợp chất hydrocarbon

hoạt động bề mặt được tổng hợp hóa học vì nó có hiệu quả hòa tan cao đối với dầu diesel (71,54% ở mức 1 g/L) tốt hơn SDS và Tween 80 và cải thiện hiệu quả phân hủy dầu diesel [32].

Ngoài khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, vi khuẩn có vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy dầu nhờ vào khả năng sinh tổng hợp enzyme xúc tác phân cắt hydrocacbon. Trong quá trình phân hủy ankan, các ankan hydroxylase tham gia vào phản ứng đầu tiên bằng cách đưa các nguyên tử oxy vào [22]. Hiện nay, ankan hydroxylase bao gồm các alkane hydroxylase màng tích hợp (ví dụ, AlkB, AlkM), Cytochrom P450 alkane hydroxylase, Flavoprotein alkane hydroxylases (ví dụ, AlmA, LadA) đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy dầu [33]. Các vi khuẩn có thể sản xuất enzyme liên quan khả năng phân hủy hoàn toàn hydrocacbon như dehydrogenase, catechol 2,3-dioxygenase, lipase, hydroxylase ankan [2]. Trong đó, alkane hydroxylase (alk B) là một loại enzyme quan trọng trong con đường phân hủy alkan được xác định ở vi khuẩn phân hủy dầu xúc tác quá trình oxy hóa cuối cùng của các alkan chuỗi trung bình và chuỗi dài, đồng thời chuyển đổi alkan thành alkanol [1]. Enzyme lipase xúc tác quá trình thủy phân liên kết acyl este là bước đầu tiên cần thiết trong quá trình phân hủy sinh học dầu và là yếu tố quyết định hiệu quả phân hủy [34].

Nhiều kết quả thực nghiệm đã chứng minh, sự phân hủy dầu diễn ra trong điều kiện hiếu khí có tốc độ nhanh và triệt để hơn trong điều kiện kỵ khí. Đồng thời, mỗi loại vi khuẩn có ái lực riêng với một chất hoặc một nhóm hợp chất trong thành phần dầu. Việc cùng tồn tại của tổ hợp nhiều loại vi khuẩn trong môi trường ô nhiễm dầu thô sẽ cho hiệu quả phân hủy tốt hơn nhờ hệ thống nguồn enzyme hoạt động trên đa dạng các thành phần hợp chất trong dầu thô, cũng như khả năng hỗ trợ hình thành mạng lưới trao đổi chất cao hơn giúp tăng cường tương tác với các hợp chất khó phân hủy và thực hiện quá trình phân hủy sinh học. Hiệu quả phân hủy dầu của tập hợp chủng thường cho kết quả cao hơn rất nhiều khi sử dụng chủng đơn lẻ đối với các trường hợp ô nhiễm dầu trong cả 3 loại môi trường: đất, nước ngọt và nước mặn [17, 35]. Do đó, sử dụng tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu phù hợp với điều kiện tự nhiên khu vực ô nhiễm là phương pháp xử lý sinh học hiệu quả nhất [15].

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng phân huỷ dầu mỏ của vi khuẩn

Quá trình phân hủy hydrocacbon diễn ra bởi quần xã vi sinh vật trong môi trường tự nhiên, do đó, các yếu tố vật lý, hóa học và sinh học có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng và khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn. Thêm vào đó, sự sinh

trường của vi sinh vật phụ thuộc các thành phần dinh dưỡng trong môi trường như nguồn khoáng, nitơ, photpho,... do đó, các yếu tố này cũng quyết định đến hiệu quả phân hủy xăng dầu [19].

- Ảnh hưởng của độ mặn: Mỗi loài có khả năng chịu mặn và nhu cầu về lượng muối là khác nhau. Hàm lượng NaCl tác động lên vi sinh vật theo cơ chế thẩm thấu tế bào và ảnh hưởng bởi các ion. Đất bị nhiễm mặn có tác động ức chế lớn đối với sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phân hủy hydrocacbon dầu mỏ [17]. Trong điều kiện nhiễm mặn, sự chuyển hóa các vật chất trong đất bởi vi sinh vật thường chậm hơn đất không nhiễm mặn. Độ mặn có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Với độ mặn khoảng 10-15 ‰ trong đất nhiễm dầu ven biển, chỉ các loài vi sinh vật ưa mặn và chịu mặn có thể sinh trưởng và phát triển. Các loài vi sinh vật chịu mặn tốt có thể sống sót và sản sinh enzyme ngoại bào trong điều kiện môi trường lên tới 35‰. Do đó, các chủng vi sinh vật bản địa phân lập từ chính khu vực đất nhiễm dầu trong điều kiện mặn có khả năng chịu mặn tốt, có tiềm năng ứng dụng cao trong việc xử lý đất nhiễm dầu khu vực đất mặn. Các vi sinh vật có khoảng chịu muối rộng sẽ mang lại tính ứng dụng cao.

- Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ: Nhiệt độ ảnh hưởng lớn đến quá trình phân hủy dầu của vi sinh vật vì nó ảnh hưởng đến tính chất vật lý, hoá học của dầu cũng như khả năng sinh trưởng của vi sinh vật [13]. Ở nhiệt độ thấp, độ nhớt của dầu tăng lên làm giảm sự bay hơi của các chuỗi alkan mạch ngắn, khả năng hòa tan trong nước giảm, làm cho quá trình phân huỷ sinh học diễn ra chậm lại [28]. Ở nhiệt độ cao, quá trình phân huỷ sinh học diễn ra mạnh hơn. Ngoài ra, nhiệt độ có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật do nó có ảnh hưởng trực tiếp đến các phản ứng hoá học của tế bào. Mỗi loại vi sinh vật đều có khoảng nhiệt độ sinh trưởng nhất định, phần lớn có khoảng nhiệt độ 20- 40 °C [17]. Nhiệt độ này còn phụ thuộc vào độ ẩm và tùy vào nhóm vi sinh vật ưa nhiệt hay ưa lạnh. Khi nhiệt độ quá cao hay quá thấp, sự sinh trưởng của vi sinh vật bị hạn chế từ đó ảnh hưởng đến khả năng phân huỷ dầu của các vi sinh vật này. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy quá trình phân giải dầu diễn ra mạnh nhất ở khoảng 30- 40 °C [26, 36]. Đối với vi sinh vật ưa nhiệt, nhiệt độ tối ưu cho quá trình phân giải có thể cao hơn khoảng 45- 75 °C.

- Ảnh hưởng của độ pH: pH môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Mỗi nhóm vi sinh vật có pH tối ưu cho sinh trưởng. Điều kiện pH thích hợp của môi trường sẽ tăng cường quá trình phân giải dầu của vi sinh vật. Dải pH mà đa số các vi sinh vật có thể sinh trưởng được là 3,5 – 8, trong đó vi khuẩn thích hợp ở môi trường trung tính có pH 7 - 7,5. Sự phân huỷ

sinh học của dầu có thể xảy ra ở điều kiện pH axit hoặc kiềm nhưng trong thực tế, công nghệ xử lý ô nhiễm dầu đạt hiệu quả tốt nhất trong khoảng pH từ 7 - 7,5 [20].

Đất bị ô nhiễm hydrocarbon lâu năm được đặc trưng bởi sự hiện diện của các thành phần hydratcarbon khó phân huỷ, chẳng hạn như aliphatic phân nhánh, PAH và hydrocarbon thơm, thường liên quan đến các phần hữu cơ và đất sét, hạn chế khả năng tiếp cận của vi sinh vật và do đó làm giảm khả năng phân huỷ sinh học của chúng. Đối với các mục đích xử lý sinh học, việc sử dụng các tập đoàn vi sinh vật bản địa được phân lập từ các địa điểm bị ô nhiễm cho thấy hiệu quả xử lý cao. Sự tương tác hiệu quả của một số vi sinh vật bản địa đã thích nghi với vị trí bị ô nhiễm và thành phần các hydrocarbon thể dẫn đến quá trình khoáng hóa hỗn hợp hydrocarbon phức tạp nhanh chóng hơn. Hơn nữa, như một số nghiên cứu đã chỉ ra, cấu trúc và chức năng của vi sinh vật bị ảnh hưởng bởi tổng lượng hydrocarbon dầu mỏ [4]. Do đó, sử dụng quần thể bản địa có thể khắc phục các vấn đề về sự thay đổi thành phần vi khuẩn khi được đưa vào một môi trường mới, và giúp chúng có thể thích nghi nhanh chóng và hoạt động phân huỷ hydrocarbon diễn ra hiệu quả hơn.

1.4. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn phân huỷ dầu ở Việt Nam

Tại Việt Nam, công nghệ xử lý ô nhiễm dầu bằng vi sinh vật đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Một số công bố của các tác giả Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Bá Hữu, Lại Thuý Hiền, Lê Thị Nhi Công, Cung Thị Ngọc Mai, Đoàn Đặng Phi Công theo hướng nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm dầu đã cho thấy tiềm năng của phương pháp xử lý sinh học này. Ngay từ những năm đầu thế kỉ XXI, tác giả Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự đã tiến hành phân lập tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ dầu từ các vùng đất bị ô nhiễm. Các tập đoàn vi sinh vật đại diện phân lập từ mẫu nước biển bề mặt và trầm tích đáy tại các trạm nghiên cứu của Việt Nam có khả năng sử dụng dầu diesel ở các mức độ khác nhau trong khoảng từ 15,8% đến 94,2% lượng dầu bổ sung vào môi trường [37]. Một số chủng có khả năng phân huỷ cao được lựa chọn để sản xuất chế phẩm. Nhóm nghiên cứu của Đinh Thị Vân (2019) đã phân lập từ mẫu đất bùn nhiễm dầu trên địa bàn Quận 7 được 3 chủng vi khuẩn *Chryseobacterium defluvii*, *Chryseobacterium gleum*, *Pseudomonas* sp. và 3 chủng nấm men thuộc loài *Pichia jadinii*, *Candida tropicalis* có khả năng phân huỷ 93% hàm lượng dầu bổ sung sau 9 ngày thử nghiệm [38]. Hiện nay, nhiều nhà nghiên cứu về vi sinh vật phân huỷ dầu đang sử dụng chủng đơn hoặc tổ hợp một số chủng đơn để xử lý nước, đất nhiễm dầu. Nghiên cứu của Cung Thị Ngọc Mai (2019) đã tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn thuộc các chi *Rhodococcus*, *Paracoccus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* có khả năng tạo màng sinh học tốt ở pH 5, 30°C, có

khả năng phân hủy lên đến 99,8% phenol, 76,07% pyrene, 65,4% anthracene và 35,7% iso-pentybenzene trong điều kiện nuôi cấy phòng thí nghiệm với nồng độ ban đầu từ 100-200 ppm [39].

Ngoài ra, một số nghiên cứu về vi khuẩn phân hủy dầu tại Việt Nam của các nhóm nghiên cứu được thống kê ở bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu về vi khuẩn phân hủy dầu tại Việt Nam

Chi/loài vi khuẩn	Nguồn phân lập	Khả năng phân hủy hydrocacbon	Tài liệu tham khảo
<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Thauera</i> , <i>Veillonella</i> , ..	Nước thải khu công nghiệp Từ Liêm	Có khả năng phân hủy hợp chất hữu cơ và hợp chất vòng thơm	[40]
<i>Bacillus</i> sp.	Giếng khoan dầu khí Vũng Tàu	Hiệu quả phân hủy hydrocacbon là 90%, tốt hơn 25% so với ở trạng thái tự do không được cố định (65%) sau 14 ngày	[41]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cặn thải xăng dầu ở kho K130 thuộc Xí nghiệp xăng dầu Quảng Ninh	Phân hủy 76,25% lượng dầu tổng số, 84,04% hydrocacbon no, 77,33% hydrocacbon thơm, 51,43% nhựa, 64,86% asphaten	[42]
<i>B. megaterium</i>	Bể chứa nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Thường Tín, Hà Nội	Phân hủy 99,95% phenol với nồng độ ban đầu là 150 mg/l trong môi trường khoáng sau 7 ngày nuôi cấy ở 30°C	[43]
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp., <i>Gemella</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Ochrobactrum anthropic</i> , ...	Trầm tích và nước biển ở Côn Đảo	Phân hủy 77,0 đến 93,9% n-ankan và 22,6 đến 28,4% PAHs	[44]

Phương pháp xử lý sinh học ô nhiễm dầu sử dụng chế phẩm vi sinh vật đã được nghiên cứu và ứng dụng tại một số khu vực của Việt Nam. Nhóm tác giả Đoàn Đăng Phi Công đã nghiên cứu thành công chế phẩm sinh học từ các chủng vi sinh vật bản địa, đáp ứng tiêu chí quốc tế về khả năng phân hủy dầu thô, đặc biệt vượt trội về khả năng phân hủy các hợp chất PAHs - thành phần được quan tâm nhiều nhất trong các sản phẩm dầu mỏ về khả năng gây hại cho môi trường. Chế phẩm cho thấy mật độ vi sinh vật hoạt động cao lên đến 10^8 CFU/g sau thời gian 6 tháng bảo quản, hiệu quả xử lý gấp 1,94 lần so với lô đối chứng. Khi thử nghiệm khả năng phân hủy dầu trên một số loại đất (đất canh tác, đất rừng ngập mặn, cát ven biển) trên quy mô pilot cho thấy sau 60 ngày thử nghiệm hàm lượng dầu được phân hủy tương ứng 66%, 61% và 75% [45]. Gần đây, nhóm nghiên cứu của tác giả Lê Thị Nhi Công đã sản xuất thành công chế phẩm sinh học MicroDegrader sử dụng than sinh học (biochar) với các vi sinh vật tạo màng sinh học cho kết quả xử lý ô nhiễm dầu chỉ trong vòng 14 ngày (các phương pháp khác mất 30 ngày), giảm 30% chi phí xử lý so với các phương pháp khác. Nước thải nhiễm dầu sau khi được xử lý bằng chế phẩm sinh học đã loại bỏ hơn 95% thành phần hydrocacbon có trong nước thải [46]. Chế phẩm này có ưu điểm là dễ sử dụng, hiệu quả xử lý dầu tốt cả môi trường đất và nước, giá thành thấp, thời gian bảo quản dài và thân thiện với môi trường. Đồng thời, “Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh tạo màng sinh học trên chất mang than sinh học để xử lý đất ô nhiễm hydrocacbon thơm và chế phẩm vi sinh thu được bằng quy trình này” của nhóm tác giả đã được cấp Bằng độc quyền giải pháp hữu ích số 2558 theo Quyết định số 89w/QĐ-SHTT ngày 05/01/2021 của Cục Sở hữu trí tuệ (Bộ Khoa học Công nghệ).

Hiện nay, trên thế giới, phương pháp xử lý sinh học ô nhiễm dầu trong đất bằng vi sinh vật được áp dụng phổ biến. Các nhà khoa học tích cực nghiên cứu đưa ra các chế phẩm vi sinh vật phân hủy dầu như Entech-1 (Mỹ), LOT 11, SOT (Thụy Sĩ). Tuy nhiên, các chế phẩm này giá thành tương đối cao và khó có thể phát huy tốt trong điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm, chịu ảnh hưởng của gió biển như ở vịnh Cam Ranh, Việt Nam. Mỗi nhóm vi sinh vật trong các chế phẩm có khả năng thích nghi khác nhau với từng vùng sinh thái và có thể mất đi khả năng phân hủy dầu mạnh trong điều kiện môi trường không phù hợp. Do vậy cần có những nghiên cứu thực tế về hệ vi sinh vật bản địa để đưa ra chế phẩm vi sinh phù hợp nhất mang lại hiệu quả cao trong xử lý đất nhiễm dầu tại Cam Ranh.

Có thể thấy các chủng vi sinh vật phân lập từ mẫu đất, nước nhiễm dầu có nhiều tiềm năng ứng dụng để xử lý ô nhiễm do dầu mỏ gây ra đối với nước và đất. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có dự án được triển khai về xử lý dầu trong đất ở khu

vực ven biển như Cam Ranh. Hầu hết các nghiên cứu cho đến nay đều tập trung vào xử lý ô nhiễm môi trường nước, bùn thải, việc đánh giá khả năng phân hủy hydrocacbon trong môi trường đất còn hạn chế. Các nghiên cứu mới chủ yếu tập trung đánh giá trên các chủng vi khuẩn cụ thể hoặc tập hợp vi khuẩn tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau, chưa có báo cáo về sự phân lập và mô tả đặc điểm của một tập hợp vi khuẩn đất bản địa có thể sinh trưởng phát triển trên các nguồn dầu mỏ ở những khu vực sinh thái đặc thù như khu vực đất ven biển ở Vịnh Cam Ranh. Do đó, việc nghiên cứu đặc điểm cấu trúc của đất, phân tích, đánh giá thành phần vi sinh vật có khả năng xử lý dầu trong đất ở điều kiện mặn ven biển cung cấp một cái nhìn tổng quan, góp phần định hướng áp dụng cho các công nghệ xử lý dầu hiệu quả bằng phương pháp sinh học. Chính từ những cơ sở đã phân tích ở trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu ***“Đánh giá khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn phân lập trong đất tại vịnh Cam Ranh, tỉnh Khánh Hòa”***.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU


2.1.1. Mẫu đất nhiễm dầu trong điều kiện mặn







Tổng số 07 mẫu đất nhiễm dầu được thu thập tại các vị trí khác nhau ở độ sâu từ 0 đến 90 cm thuộc khu vực vùng vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa, Việt Nam (Hình 2.1). Các mẫu được thu vào tháng 6-7 năm 2022, bảo quản trong hộp nhựa vô trùng ở nhiệt độ 4°C và được vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân tích trong vòng 24 giờ tại Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga. Thông tin chi tiết đặc điểm vị trí của 7 mẫu đã thu thập thể hiện ở Bảng 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ khu vực thu thập mẫu tại Cam Ranh, vị trí chấm đỏ chỉ điểm thu mẫu

Bảng 2.1. Thông tin vị trí 7 mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh

STT	Ký hiệu mẫu	Vị trí	Điều kiện thu mẫu	Hình ảnh mẫu
1	0622CR02	Khuôn viên nhà S9/ Lũ 146 KĐ: 109°12,523' VĐ: 11°54,459'	Độ sâu 0-30 cm, 32-35°C	

2	0622CR03.1	Khuôn viên UBND huyện Trường Sa KĐ: 109°12,556' VĐ: 11°54,443'	Độ sâu 0-30 cm, 32-35°C	
3	0622CR03.2	Khuôn viên UBND huyện Trường Sa KĐ: 109°12,556' VĐ: 11°54,443'	Độ sâu 30-60 cm, 32-35°C	
4	0622CR03.3	Khuôn viên UBND huyện Trường Sa KĐ: 109°12,556' VĐ: 11°54,443'	Độ sâu 60-90 cm, 32-35 °C	
5	0622CR04	Kho Công binh/ Vùng 4 KĐ: 109°12,850' VĐ: 11°54,913'	Độ sâu 0-30 cm, 32-35 °C	
6	0722CR03	Trung tâm cứu nạn Lữ 189 KĐ: 109°20,667' VĐ: 11°89,301'	Độ sâu 0-30 cm, 32-35 °C	
7	CT2	Khu vực gần khu tập thể quân nhân KĐ: 109°12,758' VĐ: 11°55,088'	Độ sâu 0-30 cm, 32-35 °C	

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

Hóa chất

Một số hóa chất chính được sử dụng trong đề tài: KH_2PO_4 (Merck, Đức), cao thịt (Merck, Đức), Na_2HPO_4 (Merck, Đức), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Đức), Peptone (Trung Quốc), Glucose (Trung Quốc), NaCl (Trung Quốc), Agar (Việt Nam) và một

số hóa chất thí nghiệm khác đảm bảo độ tinh khiết trong và ngoài nước của các hãng Sigma, Merck, Aldrich,...

Hóa chất nghiên cứu sinh học phân tử: Tween 80, methanol, isoamylalcohol, glycerol, ethanol, chloroform, acrylamide, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Đức); n-hexane (Sigma, Mỹ).

Các sinh phẩm: Taq DNA polymerase (Thermo scientific, Mỹ), bộ kit tinh sạch DNA từ gel agarose, bộ kit tách DNA của vi khuẩn ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research, UK).

Dầu Diesel cho thí nghiệm từ nguồn công ty xăng dầu Petrolimex, dầu thô lấy từ tàu chứa dầu tại Vũng Tàu.

Dụng cụ

Đĩa Petri nhựa (Biologix, Mỹ), micropipettes, đầu tip (Isolab, Đức), bình tam giác (các thể tích 100ml, 500ml, 1000ml) (Đức), bình duran (Đức), ống falcon (15ml, 50ml) (Biologix, Mỹ), ống eppendorf (1,5ml; 2ml) (Biologix, Mỹ), que cấy, đĩa thủy tinh, cốc đong các loại...

Thiết bị, máy móc

- Các thiết bị sấy, khử trùng: nồi hấp khử trùng (Hirayama, Nhật Bản), lò vi sóng (Blue stone, Việt Nam), tủ sấy (Sanyo, Mov 212- Nhật)
- Các thiết bị nuôi cấy, giữ giống: Box nuôi cấy vi sinh (Box Laminar, Việt Nam), tủ ấm (Sanyo, MIR-262 Nhật Bản), tủ ẩm lắc (ES-20/60 Biosan-EU), tủ lạnh (Hitachi), tủ lạnh sâu -20°C (Sanyo, Nhật Bản)
- Các thiết bị sinh học phân tử: bộ điện di ngang (Nyx technik, Mỹ), máy PCR (Applied Biosystems Life Technologies, Singapore), máy soi gel (U:genius 3, Anh), tủ thao tác gen (UV-cabinet, Hàn Quốc).
- Các thiết bị khác: máy vortex (Velp, Italia), cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ), kính hiển vi điện tử huỳnh quang (Axio Imagez.Z2 /Carl Zeiss /Đức), máy quang phổ Nanodrop UV – Vis (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), máy đo pH Hanna (Ý, pH 211), máy ly tâm lạnh (Roto 2k15, Sigma, Đức), GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Nhật Bản)...

2.1.3. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường muối khoáng dầu (GOST 9023-74) (g/l): KNO₃ – 4; KH₂PO₄ – 0,5; Na₂HPO₄ – 1,4; MgSO₄ – 0,8; có bổ sung NaCl 15‰ và 5% hỗn hợp dầu thô pha trong DO với tỉ lệ 5:95 (v/v), pH 6,5-7 [38].

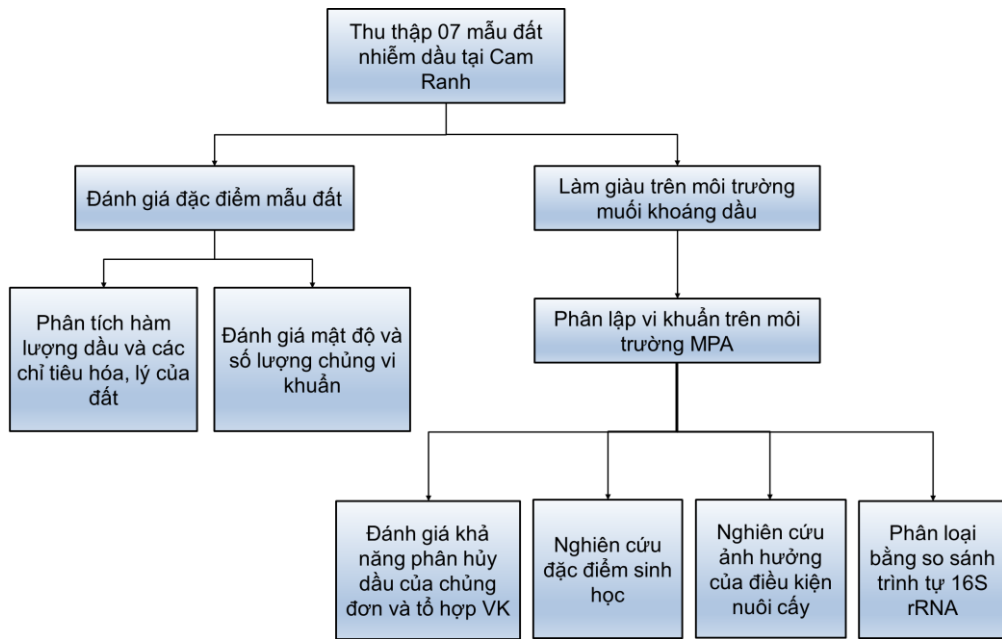
- Môi trường MP cải tiến (g/l): cao thịt - 5, pepton - 10, glucose – 2, NaCl - 15, pH 6,8-7,5 [38].

- Môi trường MPA (g/l): thành phần tương tự môi trường MP cải tiến có bổ sung 20 g/l agar.

Các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút trước khi sử dụng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm của nghiên cứu được tiến hành theo sơ đồ mô tả ở Hình 2.2



Hình 2.2. Sơ đồ các bước thí nghiệm thực hiện trong nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Phương pháp thu mẫu đất và nghiên cứu đặc điểm mẫu thực hiện theo tiêu chuẩn được quy định chi tiết trong Thông tư TT10/2021/ BTNMT. Mẫu đất được lấy ở tầng mặt theo hình thức mẫu hỗn hợp, các mẫu được lấy theo độ sâu tầng 0-30 cm; 30-60 cm; 60-90 cm sử dụng khoan tay lấy mẫu hoặc đào phẫu diện. Mỗi mẫu đất được lấy có trọng lượng từ 1 - 5 kg căn cứ vào tình hình thực tế. Mẫu sau khi thu được gắn nhãn ghi rõ ký hiệu mẫu, độ sâu, ngày lấy, đơn vị và người lấy mẫu. Bảo quản mẫu trong hộp nhựa sạch, xếp trong thùng đựng mẫu vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành nghiên cứu.

2.2.2. Phân tích và đánh giá mức độ ô nhiễm dầu trong đất

Các mẫu đất sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được xử lý và gửi phân tích tại Viện kiểm nghiệm và định chất lượng VNTEST với nhóm các chỉ tiêu phân tích và phương pháp được trình bày trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Các chỉ tiêu phân tích mẫu đất

TT	Chỉ tiêu phân tích	Phương pháp phân tích
1	pH _{H₂O}	TCVN 5979:2007
2	Hàm lượng NaCl (mg/g)	Ref.TCVN 8727:2012
3	Cacbon hữu cơ tổng số (OC) (%)	TCVN 8941:2011
4	Nitơ tổng số (mg/kg)	TCVN 6498:1999
5	Phospho tổng số (mg/kg)	TCVN 8940:2011
6	Dầu tổng số (mg/kg)	EPA method 9071B

2.2.3. Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu

Nuôi cấy làm giàu tuyển chọn trên môi trường khoáng bổ sung hỗn hợp dầu thô và DO

Các mẫu đất nhiễm dầu được nuôi cấy làm giàu bằng cách bổ sung 10% (w/v) vào môi trường muối khoáng dầu GOST 9023-74 có bổ sung 5% hỗn hợp dầu thô pha trong DO (tỷ lệ 5:95, v/v). Nuôi cấy trên máy lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 7 ngày nuôi cấy, chuyển 10% dịch nuôi cấy lần 1 sang bình tam giác chứa môi trường khoáng có thành phần tương tự, tiếp tục nuôi cấy ở điều kiện tương tự [47]. Quá trình cấy truyền thực hiện 3 lần.

Phân lập vi khuẩn phân hủy dầu

Sau khi cấy truyền làm giàu 3 lần, dịch nuôi cấy mỗi lần làm giàu được phân lập trên môi trường đĩa thạch MPA. Các mẫu được pha loãng trong nước muối sinh lý NaCl 0,9% đến nồng độ 10^{-9} . Trải đều 100 μl dịch pha loãng ở các nồng độ phù hợp trên đĩa môi trường MPA thạch. Đĩa sau khi trải ủ ở 30°C trong 24 giờ, đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa. Cấy chuyển các khuẩn lạc sang đĩa môi trường MPA nhiều lần để làm thuần. Những khuẩn lạc vi khuẩn tinh sạch được cấy vào ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường MPA và giữ lạnh ở 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo [38].

Xác định mật độ vi khuẩn

Mật độ tế bào được xác định theo phương pháp pha loãng và cấy gạt trên môi trường thạch. Mẫu được pha loãng bằng nước muối sinh lý NaCl 0,9% với dải nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-9} . Trải 100 μl dịch ở các nồng độ pha loãng thích hợp trên đĩa môi trường MPA. Đặt các đĩa thạch ở 30°C , tiến hành đếm số khuẩn lạc trên đĩa sau 24 giờ. Mật độ vi khuẩn có trong 1 g hoặc 1 ml mẫu phân lập (CFU) được tính theo công thức sau [53]:

$$\text{CFU} = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Trong đó:

ΣC : Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn (CFU/g, ml)

V: Thể tích dịch nuôi cấy trên mỗi đĩa (ml)

n1: Số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại

n2: Số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại

d: Hệ số pha loãng tương ứng của độ pha loãng thứ nhất

Nghiên cứu đặc điểm hình thái: Hình thái khuẩn lạc được mô tả sau 24 giờ nuôi cấy trên đĩa thạch môi trường MPA. Tiến hành nhuộm Gram tế bào vi khuẩn theo phương pháp của Smith và Hussey [48]. Hình thái tế bào sau khi nhuộm Gram được quan sát dưới kính hiển vi quang học Carl Zeiss với vật kính dầu 100X.

2.2.4. Khảo sát tính đối kháng, xây dựng tổ hợp vi khuẩn phân hủy dầu

Kiểm tra tính đối kháng giữa các chủng vi khuẩn tuyển chọn: Tính đối kháng của các chủng vi khuẩn được thực hiện theo mô tả của Nguyễn Lâm Dũng [49]. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy thành các hàng ngang và các hàng dọc có cắt ngang qua nhau trên cùng một đĩa thạch môi trường MPA, nuôi ở 30°C trong 24 giờ. Sự đối kháng của 2 chủng vi sinh vật thể hiện qua dấu hiệu gián đoạn tại các vị trí giao nhau của 2 vạch cấy. Quan sát hình thái vết cấy, nếu tại điểm giao cắt các chủng đều phát triển bình thường chứng tỏ chúng không ức chế nhau, nếu tại điểm giao cắt các chủng không phát triển được hoặc chỉ một trong hai chủng phát triển thì chứng tỏ các chủng này có tính đối kháng ức chế sự phát triển của nhau.

Từ việc nghiên cứu tính đối kháng của các chủng vi khuẩn, lựa chọn ra các tổ hợp 2-4 chủng có khả năng phát triển đồng thời trên cùng điều kiện nuôi cấy để nghiên cứu đánh giá khả năng phân hủy dầu của chúng.

2.2.5. Đánh giá khả năng phân hủy dầu của vi khuẩn trong điều kiện mặn

Các vi khuẩn chủng đơn hoặc tổ hợp được đánh giá khả năng phân hủy dầu theo phương pháp đo độ đục bằng máy quang phổ ở bước sóng 600 nm và phương pháp khối lượng. Các chủng đơn được nuôi lắc ở 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30±2°C, 24-48 giờ trong môi trường MP dịch thể đảm bảo mật độ 10⁶ CFU/ml. Dịch nuôi cấy vi khuẩn bổ sung tỷ lệ 3% (v/v) vào 100 ml môi trường muối khoáng dầu GOST 9023-74 với nồng độ NaCl 15‰ và có 5% dầu thô pha trong DO (tỷ lệ 5:95) là nguồn cacbon duy nhất. Cân chính xác lượng dầu bổ sung vào môi trường. Để thử nghiệm khả năng phân hủy của tổ hợp, các vi khuẩn nuôi cấy độc lập và bổ sung vào môi trường muối khoáng dầu như trên với tỷ lệ thể tích mỗi chủng như nhau. Các bình được nuôi lắc ở 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30±2°C trong 13 ngày.

Mẫu đối chứng là môi trường có thành phần tương tự không bổ sung vi sinh vật. Đánh giá sự phát triển sinh khối vi khuẩn thông qua sự thay đổi độ đục của môi trường và định kì đo OD_{600nm} 2 ngày/ lần trong 13 ngày [50].

Khả năng sử dụng dầu của các chủng vi khuẩn được xác định sau 13 ngày nuôi cấy. Lượng dầu còn lại trong các bình được chiết bằng n-hexan theo quy trình sau:

- Axit hóa 100 ml dịch nuôi cấy trong bình tam giác tới pH 3 bằng H₂SO₄
- Bổ sung vào mỗi bình tam giác 20 ml n-hexan, lắc đều
- Chiết bằng phễu chiết thu lấy phần dầu nổi
- Quy trình tách chiết được lặp lại 3 lần
- Tổng phần dầu chiết được còn lẫn thành phần protein kết tủa, lọc qua bông thủy tinh và Na₂SO₄ khan để thu được dung dịch đồng nhất
- Hỗn hợp dung môi và dầu được để bay hơi trong tủ hút để loại bỏ hoàn toàn dung môi.

Cân xác định khối lượng dầu còn lại. Tỷ lệ phân hủy dầu được xác định theo công thức [50]:

$$\% \text{ Phân hủy} = \frac{\text{Khối lượng dầu thêm vào môi trường} - \text{Khối lượng dầu còn lại}}{\text{Khối lượng dầu thêm vào môi trường}} \times 100$$

Lượng dầu sau khi được thu hồi, tách chiết được phân tích trên máy sắc kí khí GC-MS với sự hỗ trợ của Viện kỹ thuật Hóa học, ĐH Bách Khoa Hà Nội. Các dịch chiết xuất được phân tích bằng máy GCMS với chương trình chạy như sau: nhiệt độ bơm mẫu đầu vào là 150°C, nhiệt độ cổng bơm 260°C, nhiệt độ chạy mẫu là 2°C/phút, tỷ lệ tăng 5°C/phút đến 200°C, sau đó tăng 15°C/phút và tăng đến 300°C giữ trong 10 phút, trọng lượng phổ nằm trong khoảng 50-500, nhiệt độ chuyển dòng là 230°C và nhiệt độ nguồn ion là 230°C.

2.2.6. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh trưởng các chủng vi khuẩn

Xác định khả năng đồng hóa nguồn cacbon: Các vi khuẩn tuyển chọn được nghiên cứu khả năng sử dụng các nguồn cacbon bao gồm glucose, lactose, saccharose, glycerol. Các chủng được nuôi trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường khoáng có bổ sung 1% (w/v) nguồn cacbon [51]. Các ống nghiệm được nuôi cấy 180 vòng/phút ở 30°C ± 2°C trong 24 giờ. Xác định khả năng phát triển của các chủng thông qua giá trị mật độ quang OD_{600nm}.

Với $OD \leq 0,1$: không phát triển (-)

$0,1 < OD < 0,5$: phát triển (+)

$OD \geq 0,5$: phát triển tốt (++)

Xác định hoạt tính thủy phân tinh bột, cellulose, gelatine, tween 80: Để cảm ứng khả năng sinh tổng hợp các enzyme thủy phân cơ chất, các chủng vi khuẩn tuyển chọn được cấy điểm trên đĩa môi trường thạch khoáng có bổ sung tương ứng 1% cơ chất tinh bột, cellulose, gelatin, tween 80. Đĩa được ủ ở nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Nhỏ dung dịch Lugol 1% vào các đĩa, quan sát vòng phân giải cơ chất hình thành xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn [47]. Nếu có xuất hiện vòng phân giải cơ chất là phản ứng dương tính, chủng vi khuẩn có khả năng thủy phân cơ chất, ngược lại không có vòng là âm tính.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nghiên cứu ảnh hưởng của một số các yếu tố môi trường đến sinh trưởng như NaCl, pH, nhiệt độ. Sinh khối tế bào các chủng vi khuẩn ở mật độ 10^6 CFU/ml được nuôi cấy trong bình tam giác chứa môi trường MP dịch thể và biến thiên các yếu tố khảo sát gồm nồng độ NaCl (0‰, 5‰, 10‰, 20‰, 30‰, 40‰), pH ban đầu (3, 5, 6, 7, 9), nhiệt độ ủ (10°C , 20°C , 30°C , 37°C , 45°C). Sau 24 giờ nuôi cấy điều kiện lắc 180 vòng/phút, đánh giá khả năng sinh trưởng của vi sinh vật thông qua so sánh mật độ OD ở bước sóng 600nm [52].

2.2.7. Định danh chủng vi khuẩn bằng sinh học phân tử

DNA tổng số của vi khuẩn được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research, UK) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) và 1492R (5' GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Phản ứng PCR với thành phần Mastermix (Intron) $1 \times 10 \mu\text{l}$, mồi 27F và 1429R (1st Base) - $1 \mu\text{l}$, nước PCR $11 \mu\text{l}$; ADN khuôn $2 \mu\text{l}$, chạy 35 chu kỳ với chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 5 phút; 94°C trong 60 giây; 52°C trong 60 giây; 72°C trong 90 giây; 72°C trong 5 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% có bổ sung RedSafe ($6 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$) trong đệm $1 \times \text{TAE}$ với chế độ điện di 100 V trong thời gian 15 phút.

Trình tự các đoạn gene 16S rRNA được tinh sạch và gửi đến công ty First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự. Phần mềm BioEdit 7.2 được sử dụng để kiểm tra trình tự gen hai chiều, kết quả căn chỉnh được so sánh với các gen tham chiếu trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST

trên NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA X theo phương pháp Neighbor - Joining, giá trị bootstrap với số lặp lại (replicate) là 1000 lần [53].

2.2.8. Xử lý thống kê số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Mức khác biệt có ý nghĩa thống kê được đề nghị là $p < 0,05$.

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm của mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh

3.1.1. Một số đặc tính đất và hàm lượng dầu trong đất

Tổng số 7 mẫu đất được thu thập tại các vị trí khác nhau tại Cam Ranh, Khánh Hòa. Trong đó, 4 mẫu đất bề mặt thu tại các điểm khác nhau và 3 mẫu được thu tại cùng 1 điểm theo các độ sâu phần diện đất khác nhau. Các mẫu được thu thập trong điều kiện trời nắng, gió nhẹ, độ ẩm không khí khoảng 49%, nhiệt độ 32-35°C. Đây là điều kiện thời tiết thuận lợi cho việc thu mẫu đất, đảm bảo tính ổn định của các thành phần vô cơ và hữu cơ trong đất. Đa số các mẫu đất khô ráo, tơi xốp hoặc vón cục nhẹ, màu vàng nâu hoặc nâu đen, một số mẫu có lẫn sỏi đá, rễ cây. Quan sát bằng mắt thường không thấy dấu hiệu của dầu, tuy nhiên có thể nhận thấy mùi dầu rõ rệt, đặc biệt các mẫu 0622CR04, CT2.

Các mẫu đất thu thập có đặc điểm về màu sắc, độ ẩm, đặc tính, mức độ ô nhiễm dầu khác nhau phụ thuộc vào vị trí và độ sâu lấy mẫu. Do đó, nghiên cứu phân tích các chỉ tiêu, đặc điểm mẫu góp phần quan trọng trong ứng dụng xử lý ô nhiễm. Bảng 3.1 cho thấy kết quả phân tích một số chỉ tiêu tiêu biểu của đất.

Bảng 3.1. Một số chỉ tiêu phân tích các mẫu đất thu thập tại Cam Ranh

STT	Kí hiệu mẫu	pH	Chỉ tiêu phân tích				
			Hàm lượng NaCl (mg/g)	Cacbon hữu cơ tổng số (OC) (%)	Ni tơ tổng (mg/kg)	Phốt pho tổng (mg/kg)	Dầu tổng số (mg/kg)
1	0622CR02	8,07	0,22	0,48	1483,12	140,39	324
2	0622CR03.1	8,37	0,21	0,45	511,46	148,47	29,7
3	0622CR03.2	7,51	0,11	6,41	4913,23	761,73	49,9
4	0622CR03.3	7,64	0,16	0,85	686,69	183,56	59,5
5	0622CR04	5,55	0,19	0,35	463,09	167,53	707
6	0722CR03	6,69	0,27	0,49	657,99	369,19	49,7
7	CT2	7,62	0,89	4,36	2030,0	600,0	4052

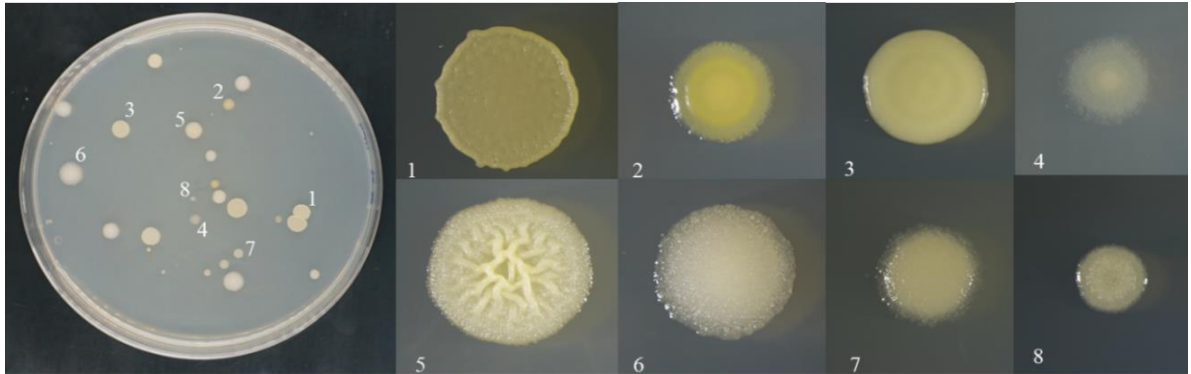
Theo các chỉ tiêu phân tích ở Bảng 3.1 có thể thấy khu vực đất tại Cam Ranh có pH từ 5,55 đến 8,37, phù hợp cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển. Hàm lượng NaCl trong các mẫu đất từ 0,11-0,89 mg/g. Đất tại khu vực thu mẫu tuy không tiếp xúc trực tiếp với nước biển nhưng có chịu ảnh hưởng của xâm nhập mặn nên độ mặn cao hơn các khu vực khác trong đất liền. Đặc biệt, mẫu CT2 thu thập ở khu vực đất sát bờ biển, chịu ảnh hưởng mạnh của nước biển nên hàm lượng NaCl cao nhất. Đáng chú ý, thành phần dầu tổng số trong các mẫu đất thu thập có sự dao động lớn, trong khoảng 29,7 đến 4052 mg/kg, hầu hết vượt ngưỡng so với quy chuẩn của Liên minh châu Âu (30 mg/kg). Mẫu CT2 cho thấy hàm lượng dầu cao nhất đạt 4052 mg/kg, cao gấp 8 lần giá trị giới hạn 500 mg/kg theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về giới hạn cho phép của một số chất ô nhiễm trong đất (QCVN 03:2023/BTNMT). Như vậy, các vị trí khác nhau của khu vực Cam Ranh có độ mặn và độ ô nhiễm khác nhau. Nhìn chung, vịnh Cam Ranh có những khu vực bị ô nhiễm dầu cao, cần có phương hướng nghiên cứu ứng dụng xử lý.

Đất thường chứa một hàm lượng đáng kể cacbon hữu cơ, nitơ và phốt pho. C, N, P và các nguyên tố khoáng rất cần cho quá trình sinh trưởng của vi sinh vật [54]. Tỷ lệ C, N, P phù hợp giúp duy trì sự hoạt động hiệu quả của các vi sinh vật phân hủy dầu. Theo TCVN 7376:2004 về chất lượng đất, giá trị tiêu chuẩn của hàm lượng cacbon hữu cơ trong đất cát ven biển dao động từ 0,44-1,55. Như vậy các mẫu đất thu thập có hàm lượng cacbon hữu cơ tổng số trong khoảng tiêu chuẩn hoặc thấp hơn không đáng kể ở mẫu 0622CR04 (0,35%), ngoại trừ giá trị OC ở mẫu 0622CR03.2 đạt 6,41% và CT2 đạt 4,36% cao hơn nhiều các mẫu khác. Đồng thời, hàm lượng nitơ tổng số và photpho tổng số của mẫu 0622CR03.2 cũng đạt giá trị cao nhất. Mẫu 0622CR03.2 thu thập tại vị trí đất sâu 30-60 cm có hàm lượng C, N, P cao hơn hẳn các mẫu đất bề mặt khác. Thông thường hàm lượng của hầu hết các chất dinh dưỡng trong đất giảm khi độ sâu của đất tăng ở cả đất trồng trọt và đất tự nhiên do được tăng cường tác động phân hủy động thực vật, phân bón [19]. Tuy nhiên đặc trưng nguồn C, N, P có thể bị ảnh hưởng bởi việc sử dụng đất, đặc biệt là ở các lớp đất bề mặt [54]. Nguồn C, N ở lớp đất bề mặt có thể dễ dàng bị mất đi do cây trồng hấp thụ, xói mòn, rửa trôi, nitrat hóa hoặc khử nitrat [54, 55].

3.1.2. Một số vi khuẩn trong đất nhiễm dầu tại Cam Ranh

Các nghiên cứu về quần xã vi sinh vật ban đầu trong môi trường đất ô nhiễm dầu mang ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá mức độ ô nhiễm và tiềm năng ứng dụng xử lý bằng phân hủy sinh học. Mật độ và số chủng vi khuẩn trong mẫu đất tự nhiên được đánh giá bằng phân lập trên môi trường dinh dưỡng MPA có bổ sung 15‰ NaCl. Các khuẩn lạc giống nhau về hình dáng, màu sắc, kích thước được nhận

diện là một chủng. Hình 3.1 mô tả quá trình phân lập mẫu 0622CR03.2 và xác định được 8 chủng khác nhau về hình thái.



Hình 3.1. Phân lập một số vi khuẩn trong mẫu đất tự nhiên 0622CR03.2 trên môi trường MPA, độ pha loãng 10^{-4}

Thực hiện tương tự với các mẫu còn lại, kết quả số lượng vi khuẩn trong các mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh chi tiết ở bảng 3.2.

Theo nghiên cứu của Li và cộng sự (2019), vi khuẩn là nhóm đa dạng nhất trong quần xã vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu [29]. Mật độ vi khuẩn trung bình trong 7 mẫu đất tự nhiên dao động trong khoảng $2,4 \times 10^5$ CFU/g đến $1,4 \times 10^6$ CFU/g. Kết quả này tương tự với mật độ vi khuẩn tại một số khu vực đất ô nhiễm khác trên thế giới. Nghiên cứu của Saadoun (2002) cho thấy số lượng vi khuẩn từ các mẫu đất bị ô nhiễm do sự cố tràn dầu thô là $9,5 \times 10^5$ CFU/g đến $237,5 \times 10^5$ CFU/g [56]. Tương tự, mật độ vi khuẩn dao động từ $0,2 \times 10^4$ CFU/g đến $62,5 \times 10^6$ CFU/g trong đất nhiễm dầu động cơ tại Ado-Ekiti, Nigeria ở các độ sâu khác nhau 5cm, 10cm, 30cm, 50cm và 60cm [57].

Hai mẫu 0622CR03.1 và 0622CR03.3 cho thấy mật độ vi khuẩn cao và đa dạng nhất về số chủng (14 chủng). Trong khi đó, mẫu 0622CR04 và CT2 bị ô nhiễm dầu cao nhất với hàm lượng dầu 707 – 4052 mg/kg chỉ phân lập được 6 chủng. Theo một số tác giả, số lượng vi sinh vật phân hủy hydrocacbon rất nhạy cảm với mức độ ô nhiễm dầu, do đó có thể sử dụng chúng như là chỉ thị sinh học cho mức độ ô nhiễm dầu trong môi trường [21]. Hàm lượng TPH có tương quan nghịch với đa dạng và số lượng vi khuẩn. Dầu là chất độc có ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Do đó, trong điều kiện ô nhiễm dầu, chỉ những chủng thích nghi tốt mới có thể sống được nên đa dạng vi khuẩn thu được không nhiều.

Tuy nhiên, ở các mẫu đất thu thập khác, không thấy có sự tuyến tính giữa nồng độ dầu tổng số và số lượng vi khuẩn. Nguyên nhân do sinh trưởng của vi

khuẩn trong đất không chỉ chịu tác động của dầu ô nhiễm mà còn của các yếu tố khác từ đặc điểm cấu trúc của môi trường đất như thành phần các chất hữu cơ, độ ẩm, mặn, độ xốp,...[19]. Các yếu tố tự nhiên khác như pH, nitơ, photpho cũng có ảnh hưởng đến mật độ vi sinh vật. Theo nghiên cứu của Feng (2020), dầu tổng số, tổng hàm lượng cacbon hữu cơ và hàm lượng nitơ tổng số có tác động lớn nhất đến cộng đồng vi khuẩn đất ở mỏ dầu Dagang, Trung Quốc [19]. Do đó, tuy mức độ ô nhiễm với dầu tổng số không cao chỉ 49,9 mg/kg, nhưng hàm lượng C, N, P cao hơn hẳn các mẫu khác nên mẫu 0622CR03.2 cho thấy mật độ vi khuẩn cao nhất. Bên cạnh đó, không có sự tuyến tính giữa mật độ và số chủng của các mẫu 0622CR03 thu thập tại 3 độ sâu khác nhau của cùng một vị trí.

Tóm lại, đa dạng về số lượng và chủng loại vi khuẩn trong mẫu đất nhiễm dầu ảnh hưởng bởi sự kết hợp nhiều yếu tố như đặc điểm của đất, thành phần dinh dưỡng, mức độ ô nhiễm dầu,... Do vậy, khó có thể thấy được mối tương quan tuyến tính giữa vi khuẩn và từng yếu tố tự nhiên trong môi trường sống của chúng.

Bảng 3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn trong các mẫu đất thu thập tại Cam Ranh

Kí hiệu mẫu	Mật độ (CFU/g)	Số chủng vi khuẩn
0622CR02	$2,4 \times 10^5$	9
0622CR03.1	$1,1 \times 10^6$	14
0622CR03.2	$1,4 \times 10^6$	8
0622CR03.3	$1,3 \times 10^6$	14
0622CR04	$5,3 \times 10^5$	6
0722CR03	$7,2 \times 10^5$	7
CT2	$2,7 \times 10^5$	6

3.2. Làm giàu và tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân hủy dầu trong điều kiện mặn từ mẫu đất nhiễm dầu tại Cam Ranh

3.2.1. Làm giàu quần xã vi sinh vật phân hủy dầu

Trên thực tế, khu vực cảng Cam Ranh có hai kho nhiên liệu lớn là kho dầu diesel và kho nhớt. Bên cạnh đó, hầu hết các hệ thống đẩy được sử dụng trong lĩnh vực vận tải biển hiện nay là động cơ diesel chạy bằng dầu nhiên liệu nặng (HFO) [58]. Do đó, nguồn phát thải vào đất chủ yếu có thể là dầu diesel, dầu nhớt, dầu thô. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường muối khoáng dầu có 5% hỗn hợp dầu thô pha trong diesel (tỷ lệ 5:95, v/v) để nghiên cứu khả năng phân

hủy dầu của các chủng vi sinh vật. Đây là môi trường làm giàu tuyển chọn đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy đa dạng các thành phần hydrocarbon khác nhau trong dầu mỏ [38, 47].

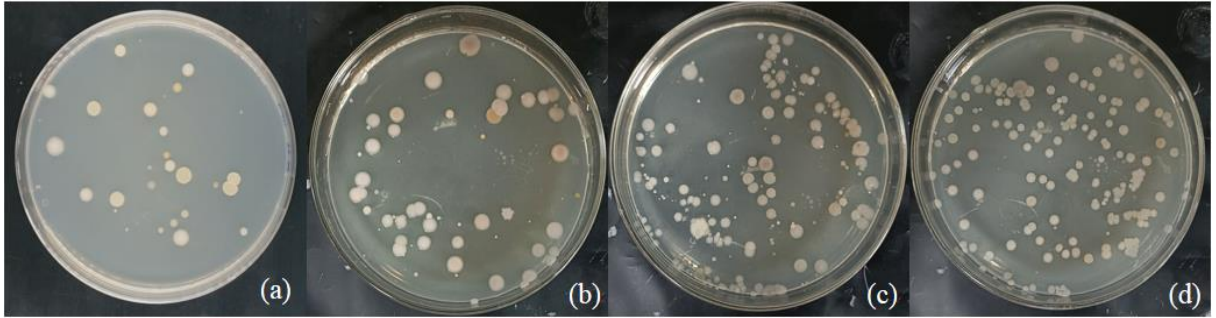
Để tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ trong điều kiện mặn, bảy mẫu đất thu thập tại Cam Ranh được làm giàu liên tiếp 3 lần trong môi trường muối khoáng dầu GOST 9023-74 15% NaCl ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau 3 lần làm giàu, màu sắc và độ đục của môi trường thay đổi rõ rệt so với mẫu ban đầu, không còn lớp dầu nổi trên bề mặt, trên thành bình có xuất hiện các vết sinh khối vi sinh vật (Hình 3.2). Riêng mẫu đối chứng không có sự thay đổi, toàn bộ lượng dầu nổi trên bề mặt dung dịch khoáng. So sánh kết quả các lần làm giàu, màu môi trường thay đổi khác biệt và sinh khối bám trên thành bình ngày càng tăng điều đó cho thấy sự sinh trưởng nhanh chóng của các chủng vi sinh vật. Đánh giá sơ bộ bằng cảm quan, qua 3 lần làm giàu cho thấy ở cả 7 mẫu đều xuất hiện vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu. Lượng dầu trong các mẫu đều được phân hủy và khoáng hóa gần như toàn bộ (Hình 3.2). Hai mẫu 0622CR03.2 và 0622CR03.3 dầu được nhũ hóa một phần, dung dịch có sự phân lớp. Ở các mẫu 0622CR02, 0622CR03.1, 0622CR04, CT2, dung dịch đồng nhất, có xuất hiện lượng lớn chất hoạt động bề mặt. Gen quy định khả năng phân hủy một số chất độc sinh thái thường nằm trên plasmid và được hình thành do sự thích nghi của vi sinh vật với môi trường sống xung quanh [17]. Quần xã vi sinh vật ở đây đã tiếp xúc với xăng dầu lâu dài nên có khả năng phân hủy dầu cao.



Hình 3.2. Hình ảnh nuôi cấy tích lũy vi khuẩn trong mẫu đất nhiễm dầu lần 3

Để đánh giá số lượng và thành phần vi khuẩn biến thiên qua mỗi lần làm giàu, các mẫu làm giàu được phân lập trên môi trường dinh dưỡng MPA. 7 mẫu được pha loãng với nồng độ khác nhau. Hình 3.3 minh họa kết quả phân lập mẫu 0622CR03.2 qua 3 lần làm giàu. Thực hiện phân lập tương tự với các chủng còn lại,

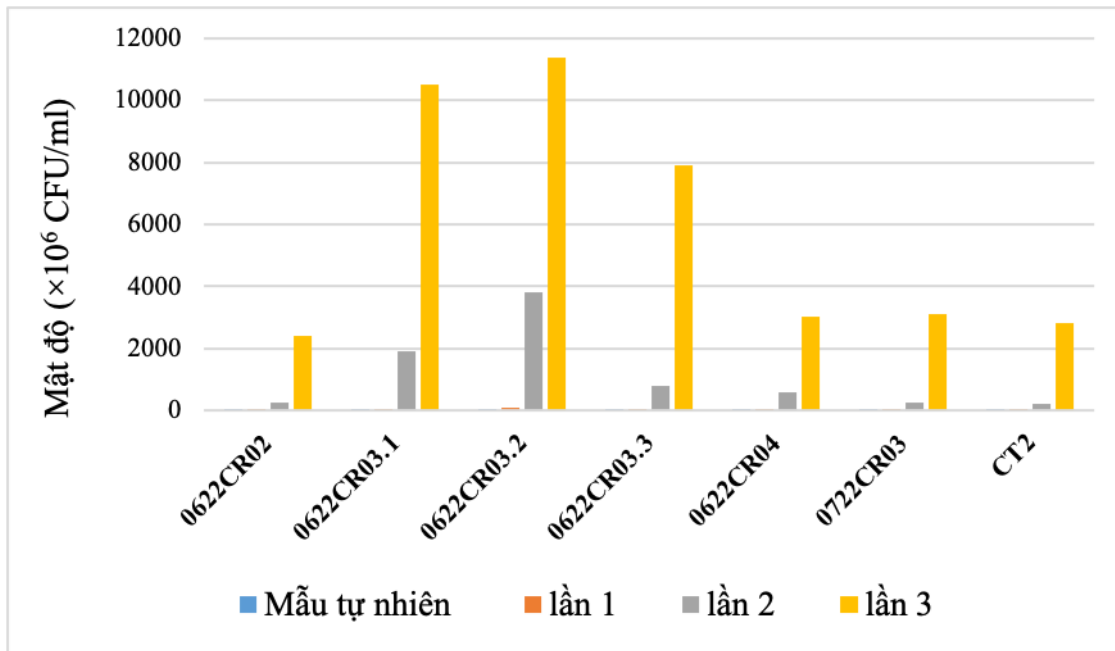
kết quả số lượng khuẩn lạc và số chủng vi khuẩn mỗi mẫu được thể hiện ở hình 3.4, 3.5.



Hình 3.3. Hình ảnh phân lập vi khuẩn mẫu 0622CR03.2 trên môi trường MPA qua ba lần làm giàu

- (a) Mẫu tự nhiên, độ pha loãng 10^{-4} (b) Làm giàu lần 1, độ pha loãng 10^{-5}
 (c) Làm giàu lần 2, độ pha loãng 10^{-7} (d) Làm giàu lần 3, độ pha loãng 10^{-8}

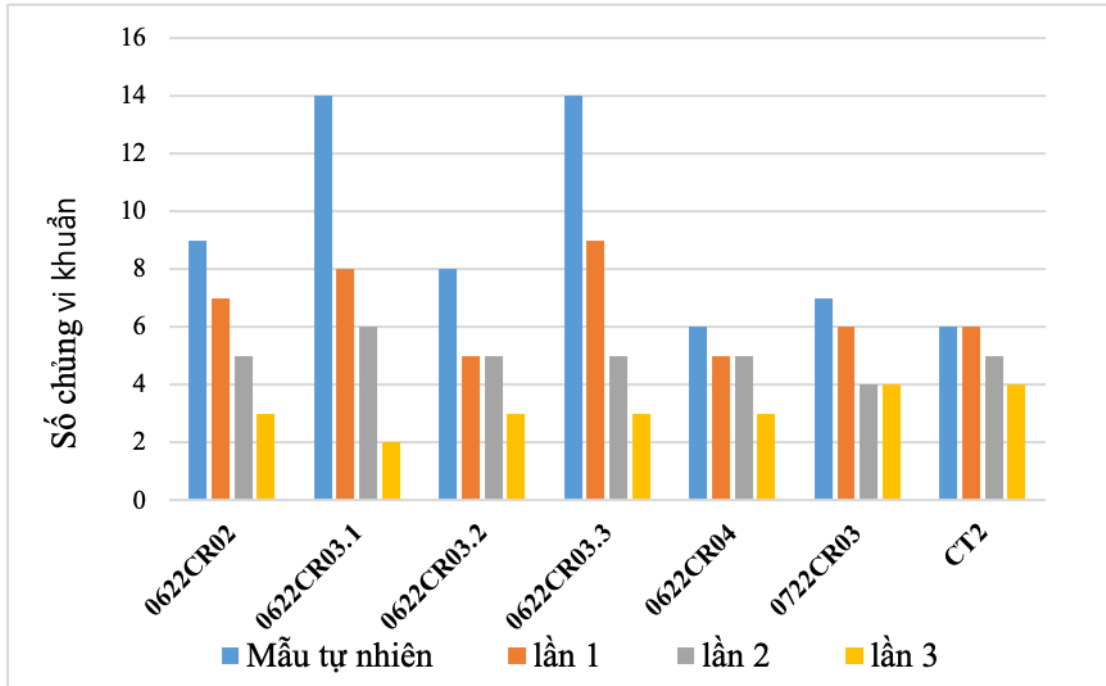
Hình 3.4 cho thấy qua mỗi lần làm giàu, mật độ vi khuẩn tăng lên đáng kể. Ở lần làm giàu thứ nhất, mật độ vi khuẩn khoảng $3,3 \times 10^6$ đến $7,8 \times 10^7$ CFU/ml. Ở lần làm giàu lần 3, mật độ vi khuẩn đạt $2,4 \times 10^9$ đến $1,1 \times 10^{10}$ CFU/ml, cao hơn 4.000 đến 10.000 lần so với mật độ vi sinh vật ghi nhận trong mẫu tự nhiên. 3 mẫu thu tại vị trí UBND huyện Trường Sa 0622CR03 mật độ nhìn chung đều cao hơn các mẫu còn lại ở mỗi lần làm giàu. Mẫu 0622CR03.2 làm giàu lần 3 có mật độ vi sinh vật cao nhất trong các chủng.



Hình 3.4. Biến động số lượng VK qua các lần làm giàu trong môi trường dịch thể

Bên cạnh đó, số chủng vi khuẩn qua mỗi lần nuôi cấy tích lũy thể hiện ở hình 3.5. Qua mỗi lần làm giàu, số lượng chủng vi khuẩn phân lập được có xu hướng

giảm dần. Điển hình là ở mẫu tự nhiên 0622CR03.1 có 14 chủng, qua 3 lần làm giàu chỉ thu được 2 chủng với mật độ cao. Lần làm giàu 2 và 3 không có sự khác biệt nhiều về đa dạng vi khuẩn ở các mẫu. Mật độ và số lượng chủng ở mẫu ô nhiễm dầu cao nhất CT2 không thấy có sự biến thiên nhiều. Nguyên nhân có thể do các chủng này đã thích nghi với điều kiện môi trường có hàm lượng dầu mỡ cao.



Hình 3.5. Biến động số chủng VK qua các lần làm giàu trong môi trường dịch thể

Nhìn chung, số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch phân lập từ mẫu làm giàu có độ đồng nhất cao hơn, số chủng thu được ít hơn hay độ đa dạng vi khuẩn giảm. Như vậy, sau quá trình nuôi cấy tích lũy trong môi trường muối khoáng bổ sung dầu, chỉ các chủng có khả năng phân hủy dầu, sử dụng dầu làm nguồn cacbon dinh dưỡng có thể sinh trưởng và phát triển. Từ các mẫu làm giàu lần 3 đã tuyển chọn được các quần xã vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu, tiến hành phân lập và làm sạch để thu được các chủng vi khuẩn thuần khiết cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Phân lập các chủng vi khuẩn phân hủy dầu

Từ 7 mẫu đất ô nhiễm dầu tại Cam Ranh qua 3 lần nuôi cấy tích lũy trong môi trường muối khoáng dầu, chúng tôi tiến hành phân lập nhằm tuyển chọn các chủng đơn vi khuẩn phù hợp cho ứng dụng xử lý dầu. Kết quả thu được tổng số 22 chủng vi khuẩn đại diện (Bảng 3.3). Dựa vào những đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào, 7 chủng vi khuẩn chiếm ưu thế trong tập đoàn vi sinh vật phân hủy dầu được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Các chủng được kí hiệu lần lượt là CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, CR6, CR7. Chủng vi khuẩn CR1, CR4, CR7 cho thấy mật độ cao trong hầu hết các mẫu phân lập. Như vậy, sau 3 lần làm giàu, độ đa dạng


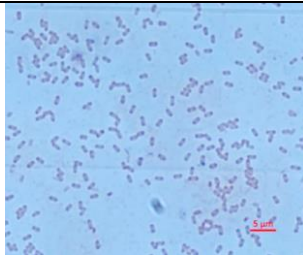

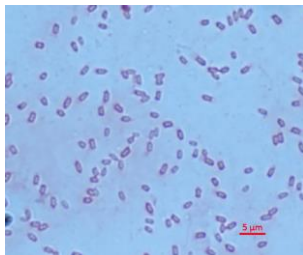
vi khuẩn trong các mẫu giảm đi đáng kể, đồng thời tần số bắt gặp các chủng vi khuẩn điển hình nhìn chung đồng đều giữa các mẫu.


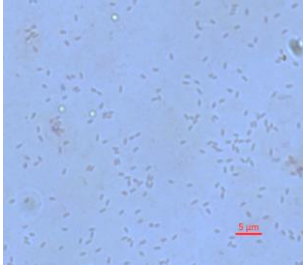
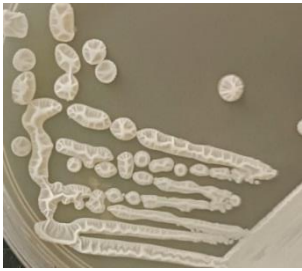
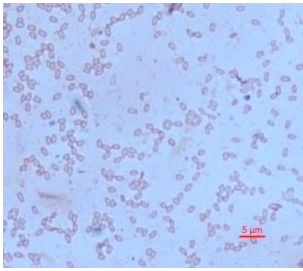

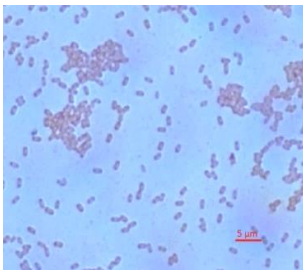

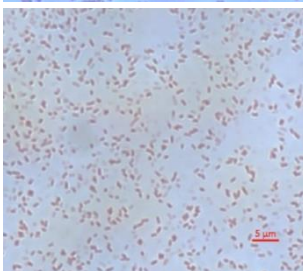

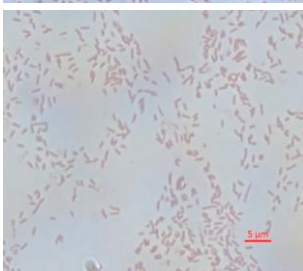
Bảng 3.3. Số lượng các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất làm giàu lần 3

STT	Kí hiệu mẫu	Số chủng đại diện
1	0622CR02	3
2	0622CR03.1	2
3	0622CR03.2	3
4	0622CR03.3	3
5	0622CR04	3
6	0722CR03	4
7	CT2	4
Tổng		22

Bảy chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi ở 30°C trên môi trường MPA với nồng độ NaCl 15 ‰. Sau 24 giờ nuôi cấy, tiến hành quan sát, mô tả hình thái khuẩn lạc. Hình dạng, kích thước tế bào được quan sát bằng kính hiển vi quang học Carl Zeiss với vật kính dầu 100X sau khi nhuộm Gram. Kết quả có 5 chủng vi khuẩn được tuyển chọn là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, tế bào hình que, sinh nội bào từ, kích thước 0,5-2 µm; 2 chủng còn lại Gram âm, tế bào hình que ngắn, đứng đơn độc, kích thước 0,5-3 µm. Chi tiết về đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào được thể hiện ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn

TT	Kí hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình ảnh tế bào	Mô tả
1	CR1			Khuẩn lạc màu trắng sữa, tròn, bề mặt bóng, lồi
2	CR2			Khuẩn lạc trắng đục, bề mặt trơn nhẵn, mép không đều

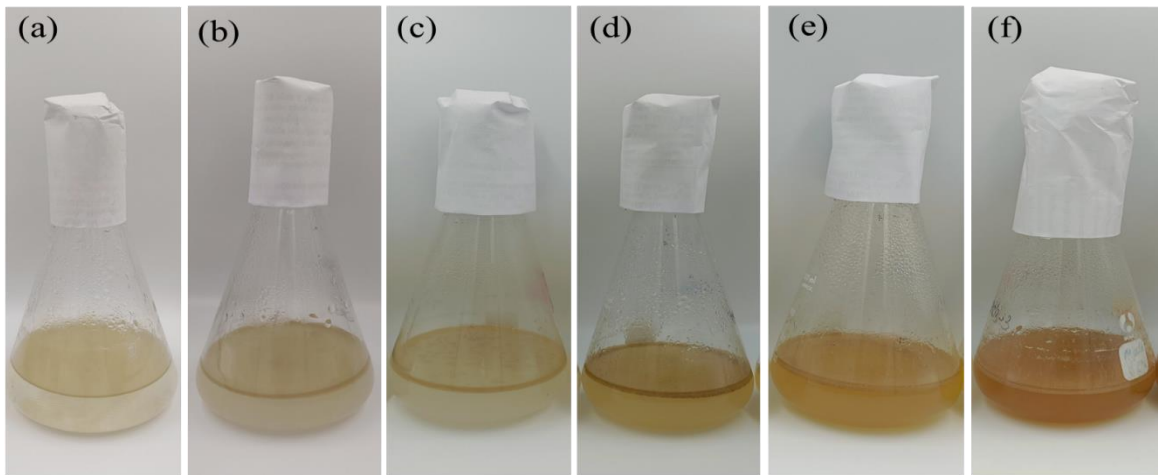
3	CR3			Khuẩn lạc trắng sữa, tròn, mép đều, bề mặt trơn, phẳng
4	CR4			Khuẩn lạc màu trắng trong, bề mặt lồi, nhăn nheo
5	CR5			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt bóng nhầy, mép nhô cao
6	CR6			Khuẩn lạc màu vàng, bề mặt hơi bóng, mép không đều
7	CR7			Khuẩn lạc màu trắng sữa, mặt trái hồng nhạt, tròn, bề mặt bóng, hơi lồi, mép đều

3.3. Đánh giá khả năng phân hủy dầu của các chủng vi khuẩn được phân lập

3.3.1. Khả năng phân hủy dầu của chủng vi khuẩn

Để đánh giá khả năng phân hủy dầu trong điều kiện mặn, 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong các bình môi trường muối khoáng chứa 15‰ NaCl và 5% dầu thô trộn trong DO là nguồn cacbon duy nhất. Bình đối chứng chứa môi trường tương tự nhưng không cấy vi sinh vật. Sau 13 ngày lắc ở 180 vòng/phút, nhiệt độ 30 ± 2 °C, kết quả cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa các bình thử nghiệm và đối chứng. Hình 3.6 minh họa quá trình phân hủy dầu của chủng CR6 trong 13 ngày thử nghiệm. Kết quả cho thấy có sự thay đổi màu sắc môi trường và lớp bóng dầu trên bề mặt giảm đi đáng kể. Sau 9 ngày thử nghiệm, hỗn hợp dầu trong bình

được nhũ hóa và phân tán thành những giọt nhỏ trong môi trường. Khi đó, dầu thô bị nhũ hóa trong môi trường và nồng độ của nó giảm xuống, cho phép các vi sinh vật tiếp xúc với chúng hiệu quả hơn và đẩy nhanh quá trình phân hủy. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận với 6 chủng còn lại, tuy nhiên sự thay đổi màu sắc và độ phân tán dầu là khác nhau ở mỗi chủng. Điều này chứng tỏ khả năng phân hủy dầu của các chủng là khác nhau. Sự biến mất của hỗn hợp dầu khỏi môi trường nuôi cấy và sự thay đổi màu sắc của môi trường cho thấy rằng các chủng vi khuẩn phân lập có thể nhũ hóa dầu hiệu quả.



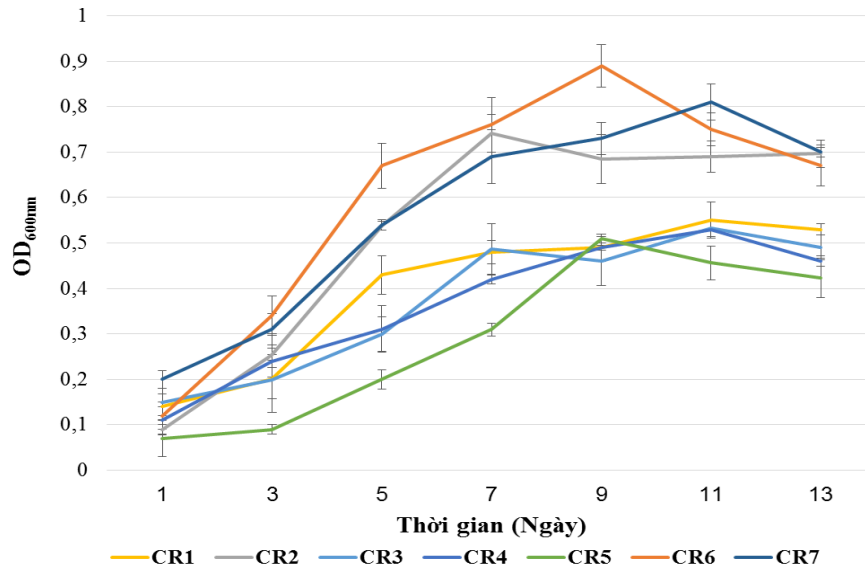
Hình 3.6. Khả năng phân hủy dầu chủng CR6 trong môi trường bổ sung 5% dầu thô trong DO và 15‰ NaCl tại các thời gian thử nghiệm khác nhau

(a) 0 ngày (b) 3 ngày (c) 5 ngày (d) 7 ngày (e) 9 ngày (f) 13 ngày

Kết quả đánh giá sự phát triển sinh khối vi khuẩn bằng phương pháp đo OD₆₀₀ và phương pháp khối lượng cũng cho thấy 7 chủng đơn vi khuẩn tuyển chọn có khả năng phân hủy dầu (Hình 3.7, 3.8).

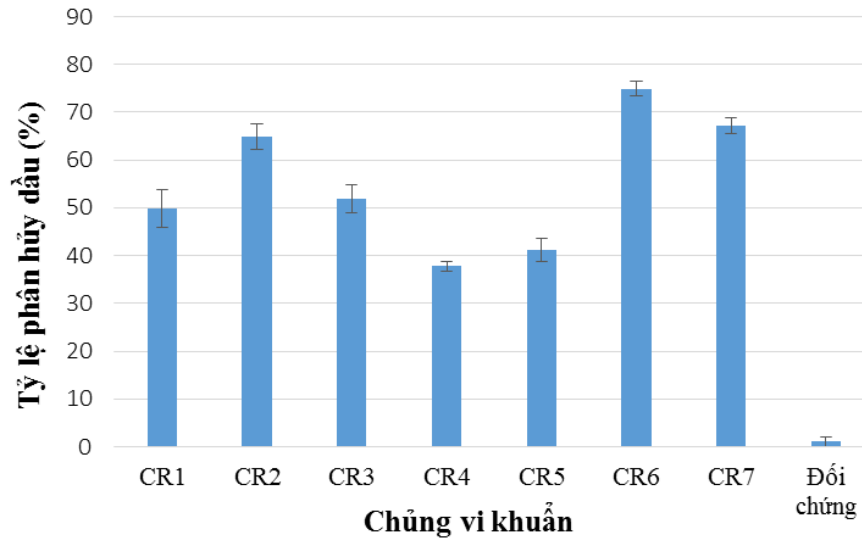
Tất cả các chủng vi khuẩn có thể phát triển trong môi trường muối khoảng với 15‰ NaCl và 5% dầu thô trộn trong DO trong 13 ngày với điều kiện lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30 ± 2 °C. Điều đó cho thấy 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn có thể sử dụng nguồn dầu cho sinh trưởng và phát triển. Sau 13 ngày, mức độ phát triển của vi sinh vật và sự phân hủy sinh học của dầu được phân tích dựa trên phép đo phổ tại bước sóng 600 nm và phương pháp trọng lượng. Kết quả hình 3.7 cho thấy sinh khối các chủng vi khuẩn tăng dần theo thời gian và đạt cực đại sau 9-11 ngày nuôi cấy, ngoại trừ chủng CR2 và CR3 đạt giá trị OD tối đa sau 7 ngày. Chủng CR6 có khả năng sinh trưởng tốt nhất với giá trị OD₆₀₀ cao nhất là $0,89 \pm 0,08$ sau 9 ngày nuôi cấy. Ngược lại, chủng CR5 sinh trưởng kém nhất tại tất cả các thời điểm thử nghiệm, đạt mật độ cực đại sau 9 ngày thử nghiệm (OD₆₀₀ = $0,51 \pm 0,02$). Sau đó, các chủng bước vào giai đoạn ổn định và suy thoái dần nên giá trị OD₆₀₀ bắt đầu

giảm nhẹ. Không ghi nhận rõ ràng sự thay đổi về cảm quan, giá trị OD_{600nm} và hiệu quả phân hủy dầu ở trong mẫu đối chứng trong thời gian theo dõi.



Hình 3.7. Đường cong sinh trưởng 7 chủng vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu

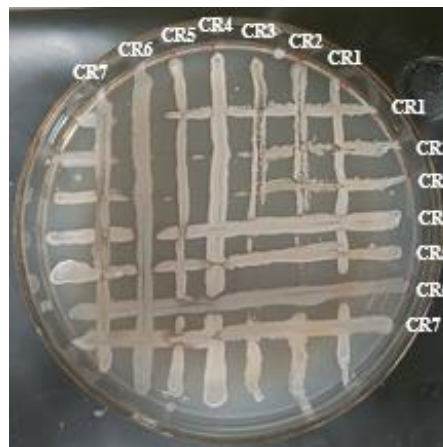
Kết quả hình 3.8 cho thấy cả 7 chủng có khả năng phân hủy dầu ở các mức độ khác nhau. Trong đó, CR6 thể hiện khả năng phân hủy dầu cao nhất với hiệu suất phân hủy dầu sau 13 ngày thử nghiệm lên tới $74,9 \pm 1,5\%$, tiếp đến là CR7 và CR2 với hiệu suất phân hủy dầu lần lượt là $67,2\%$ và $64,9\%$. Khả năng phân hủy hỗn hợp dầu thô và DO của chủng CR4 thấp nhất chỉ đạt $37,8 \pm 1\%$. Khả năng phân hủy dầu của các chủng vi khuẩn trong điều kiện nhiễm mặn đã được công bố trong nhiều nghiên cứu. Kết quả khảo sát vi sinh vật phân hủy dầu trong 97 mẫu nước biển bề mặt và trầm tích tại 58 trạm nghiên cứu biển của Việt Nam cho thấy khả năng sử dụng dầu diesel của các chủng vi khuẩn phân lập được ở các mức độ khác nhau, dao động từ $15,8\%$ đến 94% lượng dầu diesel bổ sung vào môi trường sau 7 ngày nuôi cấy [37]. Tương tự, các chủng vi khuẩn từ đất bị ô nhiễm dầu của một mỏ dầu ở Đại Khánh, Trung Quốc đã phân hủy từ $16,4\%$ đến $91,6\%$ tổng lượng hydrocarbon dầu mỏ (TPHs) và 11 chủng phân hủy hơn 70% TPHs trong MBSM với 2% dầu diesel sau 7 ngày thử nghiệm [59].



Hình 3.8. Khả năng phân hủy dầu của chủng đơn vi khuẩn sau 13 ngày thử nghiệm

3.3.2. Tính đối kháng của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Theo một số nghiên cứu, sử dụng tập hợp chủng vi sinh vật bản địa để xử lý ô nhiễm môi trường cho thấy hiệu quả hơn hẳn các chủng đơn [17, 60]. Tuy nhiên, hiệu suất xử lý của tổ hợp phụ thuộc vào sự tương tác hỗ trợ hoặc đối kháng giữa các chủng trong tổ hợp. Do đó, để nâng cao hiệu quả xử lý dầu, cần tuyển chọn tổ hợp vi sinh vật không đối kháng với nhau, phát triển tốt, phân hủy dầu nhanh. Bảy chủng vi khuẩn lựa chọn được cấy vạch ngang và dọc trên đĩa thạch MPA sao cho các chủng cắt nhau từng cặp. Sau 24 giờ nuôi cấy, các chủng vi khuẩn phát triển tốt, các đường rìa rõ nét. Kết quả Hình 3.9 cho thấy các chủng CR1, CR2, CR3, CR4, CR5 không phát triển tại đoạn cắt với chủng CR6. Do đó, chủng CR6 đối kháng với các chủng CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, đồng thời có xuất hiện tương tác đối kháng giữa CR2, CR3 và CR4, CR5. Như vậy, giữa 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn có xảy ra hiện tượng cạnh tranh hoặc ức chế sự phát triển lẫn nhau. Kết quả chi tiết thể hiện trong Bảng 3.5.



Hình 3.9. Hình ảnh minh họa tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Bảng 3.5. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn

Kí hiệu chủng	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7
CR1	N	-	-	-	-	+	-
CR2	-	N	-	+	+	+	-
CR3	-	-	N	+	+	+	-
CR4	-	+	+	N	-	+	-
CR5	-	+	+	-	N	+	-
CR6	+	+	+	+	+	N	-
CR7	-	-	-	-	-	-	N

- Không đối kháng

Ghi chú + Có đối kháng

N Không nghiên cứu đối kháng

Từ nghiên cứu tính đối kháng giữa 7 chủng vi khuẩn đã phân lập, 3 tổ hợp vi khuẩn được xây dựng đảm bảo yếu tố các chủng trong tổ hợp không đối kháng với nhau, có thể cùng nhau phát triển tốt trong cùng một canh trường nuôi cấy (Bảng 3.6). Ba tổ hợp vi khuẩn này được sử dụng để thử nghiệm khả năng phân hủy dầu trong nghiên cứu tiếp theo.

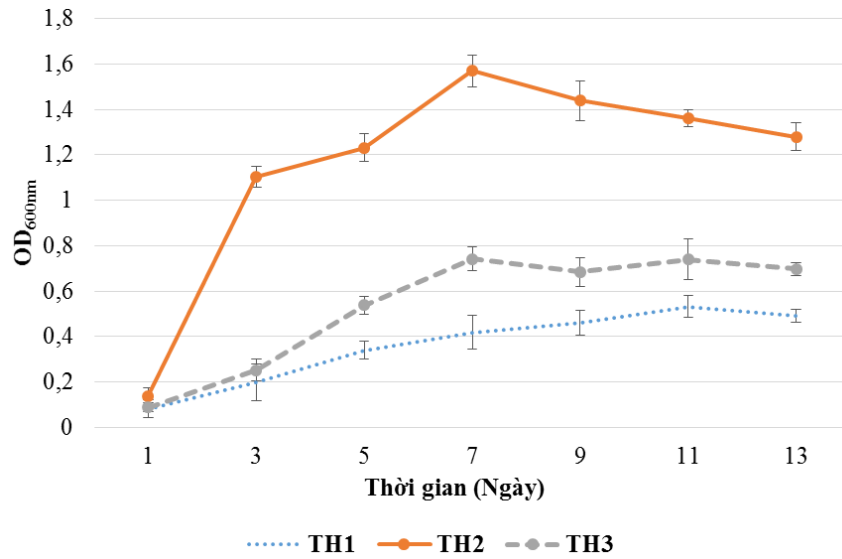
Bảng 3.6. Tổ hợp vi sinh vật thử nghiệm khả năng phân hủy dầu

STT	Kí hiệu	Tổ hợp chủng
1	TH1	CR1, CR2, CR3, CR7
2	TH2	CR1, CR4, CR5, CR7
3	TH3	CR6, CR7

3.3.3. Khả năng phân hủy dầu của 03 tổ hợp vi khuẩn

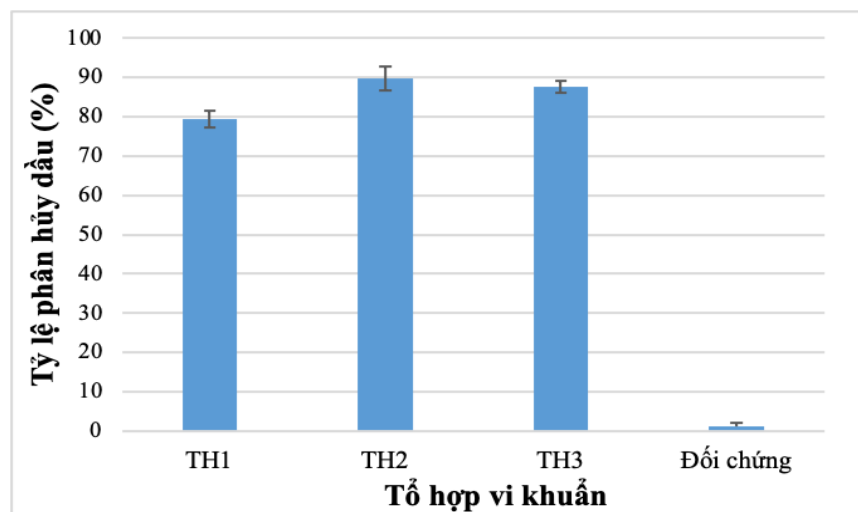
Tương tự với chủng đơn, ba tổ hợp vi khuẩn được đánh giá khả năng phân hủy dầu trong môi trường khoáng dịch thể 15‰ NaCl có bổ sung 5% dầu thô pha trong DO tỷ lệ 5:95 (v/v). Sau 13 ngày nuôi lắc ở 180 vòng/phút, ở 30°C, kết quả cho thấy giá trị OD₆₀₀ của tất cả các nhóm tăng nhẹ và đạt cực đại sau 7-9 ngày ủ (Hình 3.10). Tổ hợp vi khuẩn mẫu TH2 phát triển tốt nhất chỉ sau 7 ngày thử nghiệm. TH2 đạt giá trị OD₆₀₀ tối đa là $1,67 \pm 0,03$, tiếp theo là TH3 với OD₆₀₀ là $0,76 \pm 0,02$. Vi khuẩn ở TH1 phát triển kém nhất tại tất cả các thời điểm thử nghiệm. Sau 9 ngày, đường cong không có xu hướng biến động nhiều, điều này cho thấy sự phát triển và chết của tế bào vi khuẩn đã ổn định. Sự gia tăng khối lượng tế

bào về độ đục trực tiếp cho thấy việc các chủng vi khuẩn có thể sử dụng dầu thô làm nguồn cacbon duy nhất.



Hình 3.10. Đường cong sinh trưởng của 3 tổ hợp vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu

Ở mẫu đối chứng không xuất hiện sinh khối vi sinh vật và sự phân hủy đáng kể của dầu thô. Phân tích bằng phương pháp khối lượng (Hình 3.11) cho thấy tổ hợp 2 có khả năng phân hủy dầu cao nhất ($90 \pm 3,1\%$) so với TH1 ($79,4 \pm 2,1\%$) và TH3 ($87,7 \pm 1,5\%$). Giá trị này không quá khác biệt so với một số nghiên cứu khác trên thế giới. Zhang (2010) đã chỉ ra kết quả rằng trong thời gian 7 ngày, khoảng 95,8% TPHs của dầu diesel đã bị phân hủy bởi một nhóm vi khuẩn chứa bảy chủng từ đất bị nhiễm dầu [59]. Tổ hợp gồm hai chủng *P. aeruginosa* và một chủng *Rhodococcus erythropolis* phân lập từ đất bị ô nhiễm có thể phân hủy 90% hydrocarbon trong 6 tuần trong môi trường nuôi cấy lỏng [60].



Hình 3.11. Khả năng phân hủy dầu của tổ hợp vi khuẩn sau 13 ngày thử nghiệm

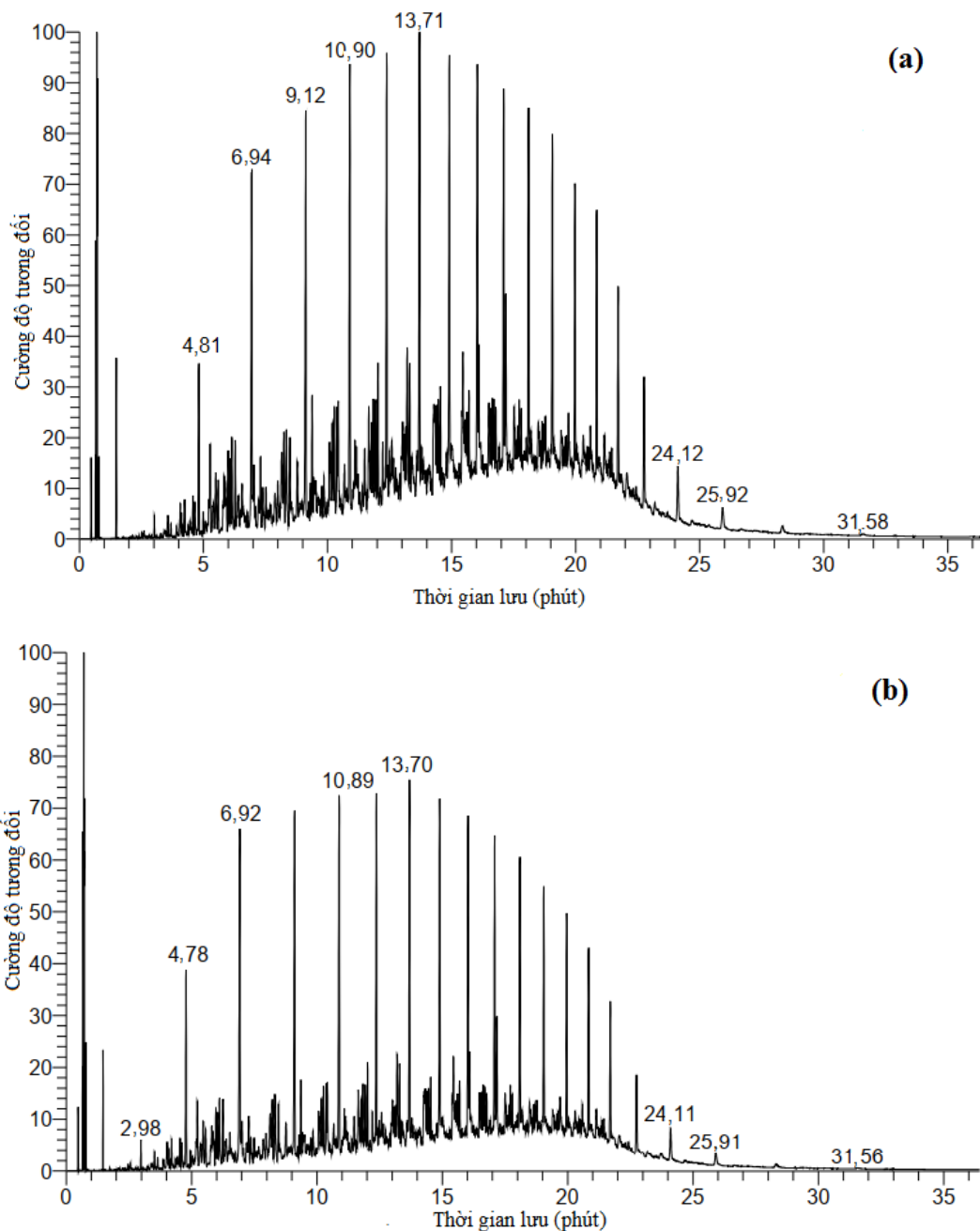
Các kết quả nghiên cứu khác cũng đã chứng minh tổ hợp vi sinh vật cho hiệu quả phân hủy dầu cao hơn hẳn việc sử dụng chủng đơn riêng lẻ. Sathishkumar M. (2008) đã nghiên cứu khả năng phân hủy dầu bởi các chủng vi khuẩn riêng lẻ và tổ hợp chủng phân lập từ vùng ô nhiễm dầu. *Bacillus* sp. IOS 1-7, *Corynebacterium* sp. BPS 2-6, *Pseudomonas* sp. HPS 2-5 và *Pseudomonas* sp. BPS 1-8 được chọn để nghiên cứu về khả năng sinh trưởng của chủng đơn trong dầu. Tổ hợp gồm các vi khuẩn trên cho hiệu quả phân hủy tối đa 77% dầu thô, cao hơn so với các chủng đơn chỉ phân hủy từ 41-69% [26].

Tập hợp chủng vi khuẩn cho khả năng phân hủy dầu mỏ và các sản phẩm dầu mỏ tốt hơn từng chủng đơn lẻ chủ yếu do sự phức tạp của các sản phẩm dầu. Mỗi chủng vi khuẩn có thể phân hủy một phân đoạn trong hỗn hợp dầu mỏ, hoặc sản phẩm phân hủy của chủng này là cơ chất cho các chủng tiếp theo [35]. Để khẳng định giả thiết này cần có các nghiên cứu sâu hơn ở cấp độ phân tử như các gen tồn tại trong từng vi sinh vật. Leahy và Colwell báo cáo rằng quần xã vi sinh vật với khả năng sinh enzyme rộng tổng thể là cần thiết để phân hủy các thành phần phức tạp của hydrocacbon trong dầu thô hoặc nhiên liệu diesel [17]. Vi sinh vật có thể không tham gia trực tiếp vào quá trình phân hủy nhưng có thể đóng vai trò sản xuất enzyme hoặc chất hoạt động bề mặt để phân hủy hydrocacbon [4].

Mức độ phân hủy của dầu được đánh giá bằng GC-MS. Tổ hợp vi khuẩn TH2 cho thấy khả năng phân hủy tốt nhất nên lượng dầu còn lại trong bình này sau 13 ngày xử lý được tách chiết bằng n-hexan để phân tích GC-MS. Sự thay đổi của các thành phần dầu được thể hiện ở hình 3.12. Các hợp chất cực đại chính vào thời điểm lưu giữ 4,81; 6,94; 9,12; 10,90; 13,71; 24,12; 25,93; 31,58 phút được xác định dựa trên thư viện hợp chất tiêu chuẩn là Decane, Undecane, Dodecane, Tridecane, Tetradecane, Hexadecane.

Kết quả cho thấy sau 13 ngày thử nghiệm, cường độ tương đối của các pic trên sắc ký đồ GC-MS tương ứng với từng hợp chất được xác định trong hỗn hợp dầu thô và diesel của TH2 đã giảm đáng kể so với mẫu đối chứng không có tác động của vi sinh vật. Tổ hợp vi khuẩn TH2 có thể phân hủy nhiều loại hydrocacbon bao gồm cả ankan mạch thẳng, các ankan phân nhánh và các hợp chất thơm như Methylcyclopentane, Ethylcyclobutane, Toluene, 2-Methyl-3-ethylheptane, Benzene, Decane, Octane, Heptane, Tetradecane, Hexadecane, Tridecane,... Dựa trên phân tích sắc ký khí, xác định được dầu thô đã được sử dụng làm nguồn cacbon chính ở dải hydrocacbon giữa C_{10} – C_{25} . Các vi khuẩn đã phân cắt một số hợp chất mạch dài thành hydrocacbon mạch ngắn hơn. Điều này cho thấy tổ hợp TH2 có khả năng phân hủy đối với các dãy hợp chất ankan khác nhau có trong dầu thô. Theo

ngiên cứu của Parthipan P. (2017) khi thử nghiệm phân hủy dầu thô với chủng vi khuẩn *Bacillus*, các hợp chất có trọng lượng phân tử thấp, C_{10} – C_{14} bị phân hủy hoàn toàn, trong khi C_{15} – C_{19} bị phân hủy tới 97% trong tổng số các nhóm hydrocarbon, các hợp chất cao phân tử khác bị phân hủy khoảng 78% [61]. Như vậy, so với các nghiên cứu khác, kết quả phân tích GC-MS của chúng tôi cho thấy khả năng phân hủy hydrocarbon của TH2 chưa thực sự rõ rệt. Có thể khi thay đổi một số yếu tố về dinh dưỡng cũng như điều kiện nuôi cấy hoặc tối ưu hóa điều kiện tách chiết sẽ cho thấy hiệu quả phân hủy cao hơn.



Hình 3.12. Phổ phân tích GC-MS của mẫu dầu tách chiết bằng n-hexan sau 13 ngày thử nghiệm (a) Mẫu đối chứng (b) Mẫu xử lý với tổ hợp vi khuẩn TH2

3.4. Đặc điểm phân loại các chủng vi khuẩn phân hủy dầu

Bảy chủng vi khuẩn đã phân lập được có khả năng phân hủy hydrocacbon, mở ra tiềm năng ứng dụng cao trong xử lý ô nhiễm thực tế. Tuy nhiên, để quá trình ứng dụng mang lại hiệu suất cao thì việc hiểu các đặc điểm, điều kiện tối ưu cho sinh trưởng của vi sinh vật là rất quan trọng. Do đó, chúng tôi nghiên cứu các đặc điểm sinh học cũng như định danh 7 chủng vi khuẩn để có dữ liệu đầy đủ, thuận lợi cho mục tiêu ứng dụng.

3.4.1. Đặc điểm sinh hóa

Nguồn cacbon khác nhau có ảnh hưởng lớn đến khả năng phát triển, tạo chất hoạt động bề mặt và sản xuất enzyme có khả năng phân hủy dầu. Với mục tiêu ứng dụng các chủng vi khuẩn trong xử lý ô nhiễm dầu trong đất, các chủng được nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa như Bảng 3.7. Kết quả cho thấy cả 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có thể đồng hóa các nguồn cacbon phổ biến như glucose, lactose, saccharose, glycerol. Trong môi trường chứa nguồn cacbon là glucose, hầu hết các chủng đều có khả năng sinh trưởng mạnh. Bên cạnh đó các chủng CR1, CR2, CR4, CR5 có khả năng phân giải các nguồn cacbon gồm tween 80, tinh bột, gelatin và cellulose. Như vậy, 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng thích nghi tốt trong các môi trường điều kiện nguồn dinh dưỡng khác nhau, thích hợp cho ứng dụng xử lý ngoài thực tế.

Bảng 3.7. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Nguồn cacbon	Chủng vi khuẩn						
	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7
Glucose	++	++	+	++	++	++	++
Lactose	+	+	+	+	+	++	+
Saccharose	+	++	++	++	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	-	+	+	-	-
Tinh bột	+	+	-	+	+	-	-
Gelatin	+	+	-	+	+	-	-
Cellulose	+	+	-	+	+	-	-

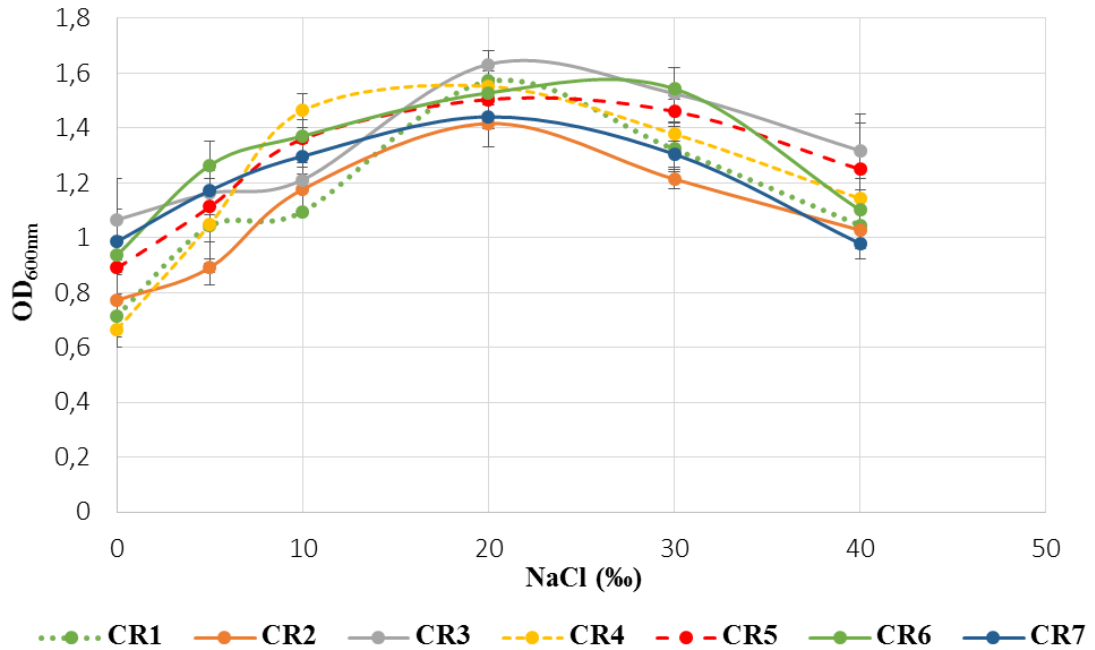
Ghi chú: (++) phát triển tốt; (+) phát triển; (-) không phát triển

3.4.2. *Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn*

Các yếu tố môi trường có liên quan mật thiết đến sinh trưởng và cơ chế trao đổi chất của vi sinh vật, qua đó ảnh hưởng đến khả năng phân hủy dầu mỏ của chúng. Vi sinh vật sinh trưởng và phát triển tốt nhất ở điều kiện tối ưu. Quá trình sinh trưởng của vi sinh vật sẽ giảm, thậm chí sẽ ngừng khi ở các giới hạn cao hơn hoặc thấp hơn điều kiện tối ưu. Bên cạnh đó, quá trình phân hủy sinh các hợp chất hydrocacbon dầu mỏ bởi các vi sinh vật thường xảy ra với tốc độ chậm. Vì vậy, việc tạo điều kiện thích hợp cho tập đoàn vi sinh vật phát triển tốt nhất, có hiệu quả phân hủy sinh học cao có thể coi là chìa khóa của công nghệ phân hủy sinh học. Trong nghiên cứu này, 3 yếu tố điều kiện môi trường đất gồm hàm lượng NaCl, pH, nhiệt độ được đánh giá tác động đến sự sinh trưởng của 7 chủng vi khuẩn phân lập.

- *Ảnh hưởng của nồng độ NaCl*

Nồng độ muối có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của các chủng vi khuẩn do nó có liên quan đến áp suất thẩm thấu của tế bào, tác động đến trao đổi chất của vi khuẩn. Các kết quả nghiên cứu về khả năng phát triển của 7 chủng vi khuẩn ở các nồng độ muối khác nhau được thể hiện ở hình 3.13. Kết quả cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn đều có khả năng phát triển tốt ở nồng độ NaCl 0-40‰. Sinh khối tế bào thu được cao nhất ở điều kiện môi trường chứa 20 g/l NaCl. Riêng chủng CR6 có giá trị OD₆₀₀ cao nhất là $1,54 \pm 0,03$ ở môi trường 30‰ NaCl. Điều này cho thấy các chủng có biên độ mặn rộng phù hợp để ứng dụng trong điều kiện thường và mặn. Theo nghiên cứu về đặc điểm mẫu ở trên, đất ở Cam Ranh có độ mặn trải rộng với hàm lượng NaCl khoảng 0,11-0,89 g/mg. Vì vậy 7 chủng vi khuẩn bản địa đã phân lập cho thấy khả năng thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên tại đây để ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu. Kết quả này cũng mở ra tiềm năng ứng dụng những chủng vi khuẩn này ở cả môi trường nước ngọt, nước lợ và nước mặn.

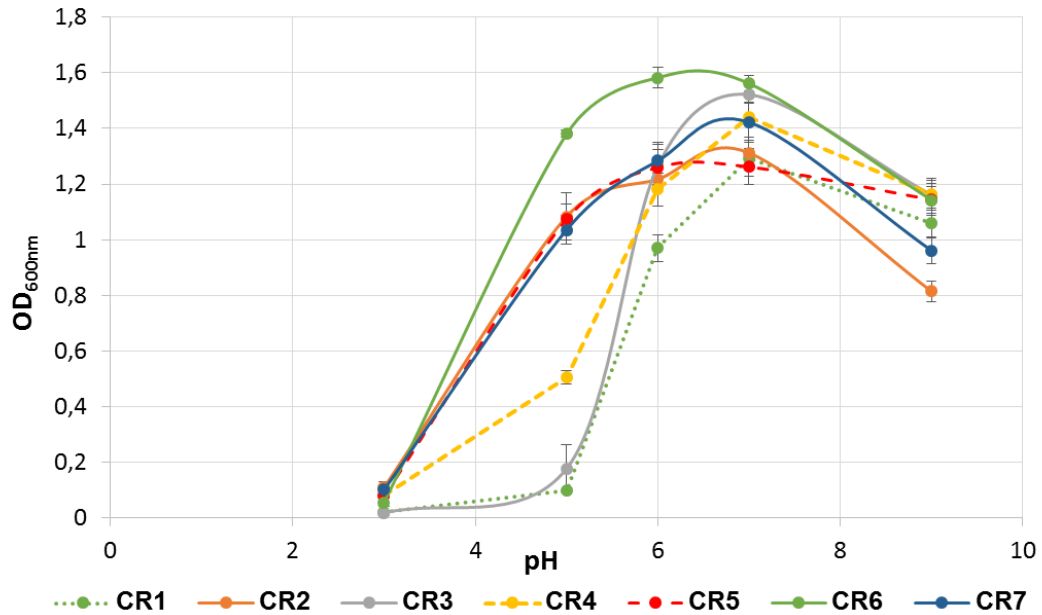


Hình 3.13. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn

- Ảnh hưởng của pH

Giá trị pH ban đầu là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật. Khảo sát mức độ ảnh hưởng của pH ban đầu với các giá trị 3, 5, 6, 7, 9 đến sinh khối của 7 chủng vi khuẩn cho thấy pH khoảng 6-7 thuận lợi cho hầu hết các chủng (Hình 3.14). Chủng CR6 phát triển tốt hơn nhiều so với các chủng khác ở cùng giá trị pH, ngay cả trong điều kiện kiềm nhất. Tại pH thấp khoảng 3, không thấy có sự xuất hiện sinh khối vi sinh vật. Hai chủng CR1 và CR3 phát triển kém ở pH 3-5 và chỉ tăng nhanh khi pH tăng đến 6. Giá trị OD₆₀₀ của các chủng tăng dần ở pH 5-6 và đạt cực đại tại pH =7, ngoại trừ chủng CR6 phát triển tốt nhất ở pH 6 (OD₆₀₀ = 1,58 ± 0,03). Khi pH nâng lên 9 thì khả năng sinh trưởng của cả 7 chủng đều giảm. Nhưng nhìn chung, ở môi trường kiềm nhẹ vi khuẩn vẫn sinh trưởng phát triển tốt hơn trong môi trường axit.

Các nghiên cứu trước đây cũng cho rằng pH =7 thuận lợi cho sự phát triển và phân hủy dầu của vi khuẩn. Nghiên cứu của Sathishkumar cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu thô tối đa trong điều kiện nhiệt độ 35°C và pH 7 [26]. Tương tự, pH trung tính, nhiệt độ 30°C tối ưu cho sự phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất bị ô nhiễm xăng dầu tại Quận 7 [38]. Những kết quả này cho thấy ở các giá trị pH trung tính, các tế bào vi khuẩn có thể tạo ra sự cảm ứng để sinh ra nguồn năng lượng dồi dào, tạo điều kiện cho sự hấp thụ cơ chất khi nuôi cấy.



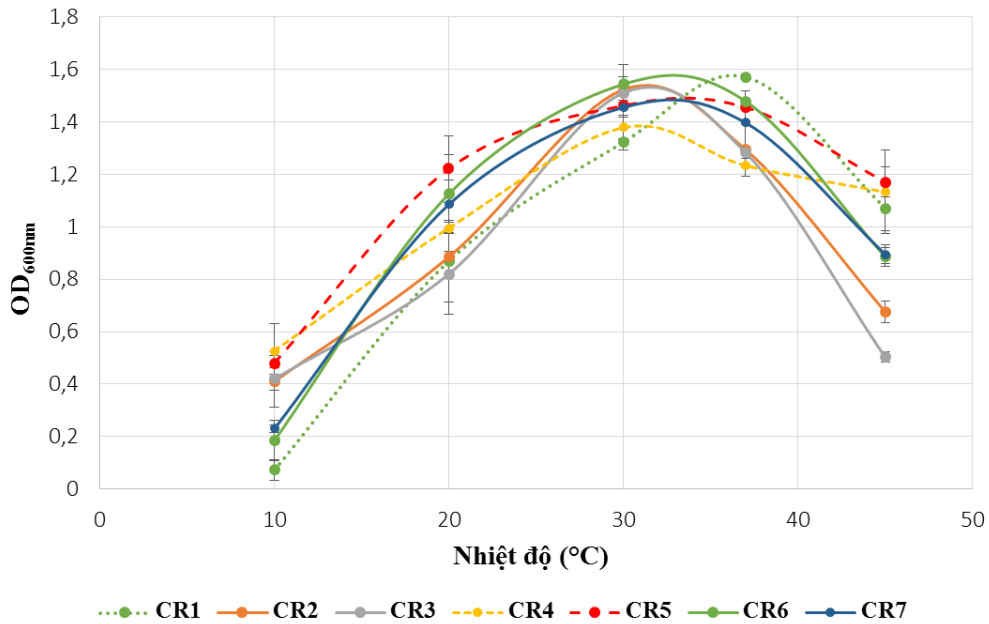
Hình 3.14. Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn

- Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ có ảnh hưởng đến sự phát triển cũng như hiệu quả phân hủy sinh học của vi sinh vật, vì nó ảnh hưởng đến tất cả các quá trình hóa học và sinh hóa trong tế bào, tốc độ hô hấp và sự đồng hóa các loại cacbon hữu cơ. Đồng thời, nhiệt độ liên quan trực tiếp đến sự có mặt và tốc độ phản ứng của các enzyme. Nhiệt độ quá thấp hay quá cao sẽ làm giảm hoạt tính của các enzyme vi sinh vật. Khi nhiệt độ giảm, tốc độ phân hủy sinh học giảm vì các chuỗi ankan mạch ngắn sẽ khó bay hơi, gây độc cho tế bào vi khuẩn. Khi nhiệt độ cao khoảng 30°C đến 40°C trao đổi chất sẽ đạt mức tối đa làm tăng quá trình phân hủy sinh học [36].

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng nhiệt độ đến sinh trưởng của 7 chủng vi khuẩn Hình 3.15 cho thấy 30°C là nhiệt độ tối ưu cho hầu hết các chủng phát triển, ngoại trừ chủng CR1 sinh trưởng tốt nhất ở 37°C ($OD_{600} = 1,57 \pm 0,02$). Khi nhiệt độ thấp hơn 30°C và cao hơn 40°C, sinh trưởng của các chủng giảm rõ rệt. Dưới 10°C, gần như không có sự sinh trưởng của cả 7 chủng vi khuẩn.

Các chủng trong nghiên cứu này được phân lập trong mẫu đất ven biển vịnh Cam Ranh, nơi có có nền nhiệt-ẩm cao quanh năm và ít biến động, nhiệt độ trung bình năm 25,3 - 27,1°C [62]. Do đó các chủng phân lập được thuộc loại ưa ẩm, có khả năng sinh trưởng từ 25 – 45°C và sinh trưởng tốt nhất ở 30 – 37°C [36]



Hình 3.15. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển 7 chủng vi khuẩn

Độ mặn, giá trị pH và nhiệt độ ảnh hưởng đến tính chất vật lý, thành phần hóa học của dầu. Do đó, nó đã ảnh hưởng đến tốc độ vi sinh vật phân hủy hydrocarbon và thành phần của quần xã vi sinh vật [36]. Nghiên cứu của Liu và cộng sự (2016) cho thấy độ mặn 30 g/L, pH 7,5 và nhiệt độ 30°C được coi là tối ưu cho sự phát triển và phân hủy sinh học tối đa của vi sinh vật [52]. Việc sử dụng tập đoàn vi khuẩn ở trên trong điều kiện tối ưu sẽ là một công nghệ hiệu quả và thân thiện với môi trường để phân hủy hydrocarbon dầu mỏ xử lý đất ô nhiễm. Có thể thấy điều kiện tối ưu cho phát triển của các chủng vi khuẩn gồm độ mặn 20-30‰, pH khoảng 7, nhiệt độ khoảng 30°C là hoàn toàn phù hợp với đặc điểm các mẫu đất phân lập. Do đó, đây là các chủng bản địa có khả năng thích nghi cao với điều kiện khí hậu tự nhiên tại vùng vịnh Cam Ranh.

3.4.3. Định danh một số chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Bảy chủng vi khuẩn tuyển chọn được tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1492R. Trình tự gen 16S rRNA của 7 chủng vi khuẩn được trình bày trong Phụ lục.

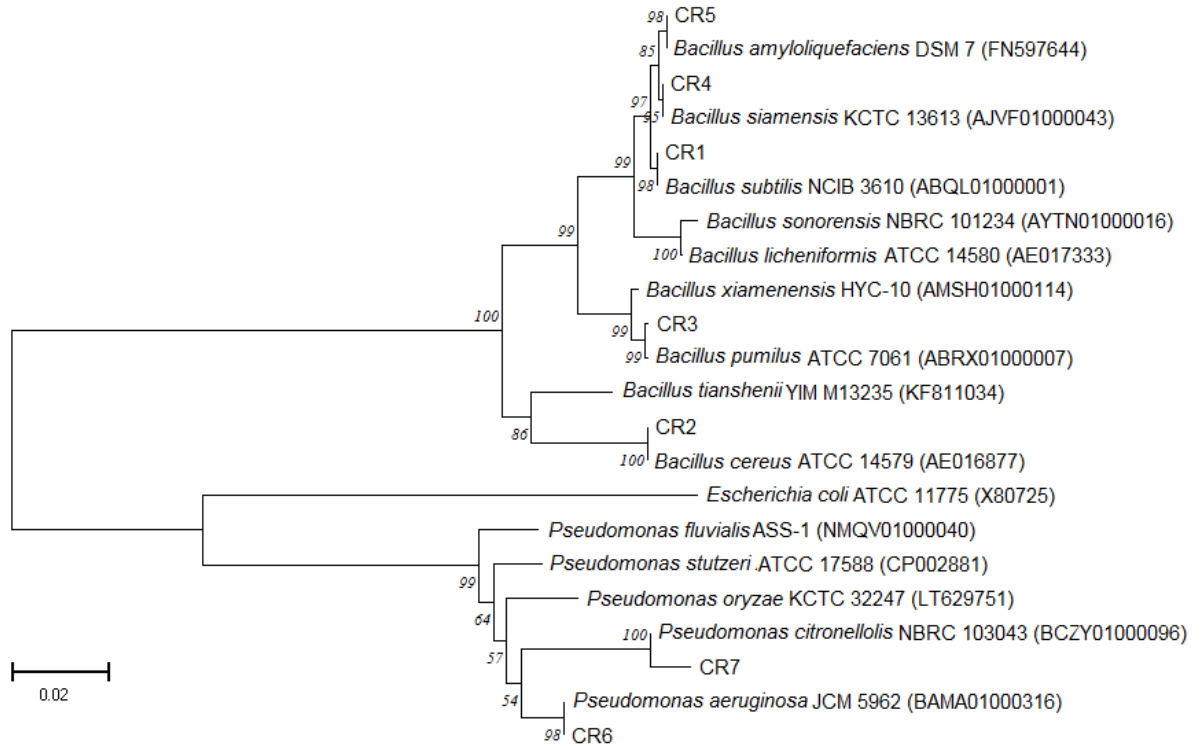
Kết quả so sánh độ tương đồng các trình tự gen được phân tích với ngân hàng cơ sở dữ liệu trên GenBank cho thấy 7 chủng tuyển chọn có độ tương đồng cao với các trình tự có trên GenBank. Các chủng có độ tương đồng cao nhất được liệt kê trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. So sánh các chủng vi khuẩn phân lập với các chủng trên Genbank

Kí hiệu chủng	Mã số trên GenBank	Tên loài tương đồng	Độ tương đồng (%)	Đặc tính	Tài liệu tham khảo
CR1	OQ940649	<i>Bacillus subtilis</i>	99,69	Có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, phân hủy n-ankan, phân hủy nhựa đường	[4]
CR2	OQ940650	<i>Bacillus cereus</i>	99,51	Có khả năng phân hủy dầu thô	[63]
CR3	OQ940651	<i>Bacillus pumilus</i>	99,86	Có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, phân hủy PAHs	[64]
CR4	OQ940652	<i>Bacillus siamensis</i>	99,79	Có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, phân hủy dầu nặng	[65]
CR5	OQ940653	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	Có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, phân hủy paraffins, resins và asphaltenes	[32]
CR6	OQ940654	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,86	Có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt, phân hủy n-ankan, PAHs	[59]
CR7	OQ940655	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	99,81	Phân hủy dầu tổng số (TPH)	[66]

Kết quả bảng 3.8 cho thấy trong tổng số 7 chủng định danh, có 5 chủng có trình tự gen mã hóa 16S rRNA tương đồng với các loài thuộc chi *Bacillus* và 2 chủng còn lại tương đồng cao với các loài thuộc chi *Pseudomonas*. Độ tương đồng được xác định đều trên 99%. Dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự của gen mã hóa 16S rRNA, 7 chủng được chọn đặt tên như kết quả bảng 3.9. Trình tự của 7 chủng vi khuẩn đã được đăng kí trong Genbank với mã số tương ứng từ OQ940649 đến OQ940655. Các chủng này đều đã được các nghiên cứu chỉ ra có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt và phân hủy một số thành phần dầu mỏ khác nhau như n-ankan, PAHs, dầu thô,...

Dựa vào việc so sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA của 7 chủng tuyển chọn với trình tự của các vi sinh vật prokaryote khác được công bố trên GeneBank, cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng công cụ MEGA X để thấy rõ hơn sự tương quan giữa các loài (Hình 3.16).



Hình 3.16. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn 16S rRNA của các chủng vi khuẩn và các loài gần gũi trên GenBank (Các số hiển thị ở các vị trí phân nhánh là kết quả phân tích bootstrap đối với 1000 phép so sánh)

Bảy chủng vi khuẩn phân lập được nhóm thành 2 cụm chính gồm các loài chi *Bacillus* là vi khuẩn Gram dương và các loài vi khuẩn Gram âm gồm nhóm các loài *Pseudomonas* và vi khuẩn ngoài *E. coli*. Hai chi này phân bố rộng rãi trên thế giới và được các nhà khoa học chứng minh có khả năng phân hủy các thành phần khác nhau của dầu mỏ trong đó có thành phần phức tạp như PAH [67].

5/7 chủng phân lập được thuộc chi *Bacillus*. Tỷ lệ cao các loài *Bacillus* phân lập được có thể là do các chủng này dễ nuôi và thích nghi với môi trường dinh dưỡng MPA. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu cho thấy vi khuẩn hình thành bào tử rất quan trọng trong quá trình phân hủy dầu. Đây là chi đã được báo cáo có khả năng tham gia vào quá trình phân hủy thành phần dầu mỡ. Các loài thuộc chi này như: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens* được biết đến có khả năng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học liên quan đến quá trình

phân hủy dầu trong môi trường đất, nước cả điều kiện thường và điều kiện mặn [32, 63-65]. Chi *Bacillus* có thể thích nghi tốt trong các môi trường nghèo dinh dưỡng và khả năng sử dụng đa dạng rất nhiều nguồn cacbon cơ chất khác nhau nên nó là đối tượng tiềm năng cho ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu. Ngoài ra, *Bacillus* được báo cáo có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt sinh học. Chất hoạt động bề mặt sinh học rất quan trọng vì chúng tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình nhũ hóa hydrocacbon dầu kỵ nước, do đó tăng cường phân hủy sinh học của cơ chất đối với vi sinh vật [30].

Hai chủng vi khuẩn còn lại là *P. aeruginosa* và *P. citronellolis*. Chi *Pseudomonas* được cho là có khả năng sử dụng hydrocacbon bằng các enzyme ngoại bào [68]. Theo nghiên cứu của Nwanyanwu và cs (2016), hai chi *Pseudomonas* phân lập được ở rừng ngập mặn của Nigeria có khả năng sử dụng dầu thô, dầu diesel, xăng, dầu hỏa và dầu nhớt làm nguồn cacbon cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Hai chi *Pseudomonas* có khả năng phân hủy 55,51% và 58,4% dầu thô thêm vào môi trường sau 7 ngày nuôi cấy [69]. Nghiên cứu do Kumar chỉ ra, *P. aeruginosa* có thể tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học liên quan đến khả năng phân hủy hydrocacbon và chủng này đã được phân lập từ đất bị ô nhiễm hydrocacbon [70]. Chủng *P. citronellolis* chiếm ưu thế trong số các chủng phân lập từ mẫu đất bị nhiễm dầu ở các vùng địa lý khác nhau của Ấn Độ, được nghiên cứu có khả năng phân hủy nhiều loại chất ô nhiễm hữu cơ, bao gồm hydrocacbon thơm đa vòng, dẫn xuất halogen hóa và dư lượng chất hữu cơ [66].

Các nhà nghiên cứu cho thấy tổ hợp vi khuẩn kết hợp từ 2 chi *Bacillus* và *Pseudomonas* mang đến hiệu quả phân hủy dầu tốt hơn chủng đơn. Nghiên cứu của Xiumei Tian cho rằng tập đoàn vi khuẩn được tạo ra từ *Bacillus* sp. và *Pseudomonas* sp. phân lập từ đất nhiễm dầu nặng ở vịnh Bột Hải, Trung Quốc có thể phân hủy 80,64% dầu thô, 76,30% ankan dầu thô [71]. Kết quả của Rahman, 2002 cho thấy tổ hợp vi khuẩn hỗn hợp có thể thực hiện tới 78% quá trình phân hủy sau 20 ngày ủ, hiệu quả hơn so với quá trình phân hủy dầu thô của từng mẫu nuôi cấy, tỷ lệ bị phân hủy bởi *Pseudomonas* sp. và *Bacillus* sp. lần lượt là 66%, 59% [36].

Kết quả nghiên cứu này một lần nữa khẳng định sự phân bố rộng rãi của hai chi vi khuẩn *Bacillus* và *Pseudomonas* trong các môi trường liên quan đến ô nhiễm dầu mỏ tại Việt Nam. Theo tác giả Đoàn Đăng Phi Công, khi nghiên cứu và sử dụng các chủng vi khuẩn phân hủy dầu bản địa ở Côn Đảo đã phân lập được 41 chủng trong đó có 10 chủng thuộc chi *Pseudomonas*. Khả năng phân hủy dầu thô của 10 chủng này cũng cao hơn các chủng vi khuẩn khác, phân hủy từ 30-70%

lượng dầu thêm vào (500 mg/ 100ml môi trường khoáng) sau 30 ngày thử nghiệm [44]. Kết quả thử nghiệm của Kiều Thị Quỳnh Hoa và cộng sự cho thấy, chủng *Bacillus* sp. VTVK15 phân hủy được 65% hàm lượng dầu trong nước sau 14 ngày [41].

Các kết quả trên cho thấy tổ hợp vi khuẩn TH2 có thể là một mục tiêu đầy hứa hẹn cho các nghiên cứu sâu hơn như thử nghiệm thực địa hoặc tạo ra vi khuẩn biến đổi gen mới cho phân hủy sinh học dầu thô.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã nghiên cứu đặc điểm 07 mẫu đất nhiễm dầu thu thập tại Cam Ranh như hàm lượng NaCl 0,11-0,89 mg/g; dầu tổng số 29,7 - 4052 mg/kg; trong đó, 02 mẫu 0622CR04 và CT2 ô nhiễm dầu cao nhất. Mật độ vi khuẩn tổng số trong đất từ 10^5 đến 10^6 CFU/g.
2. Đã làm giàu và phân lập được 22 chủng vi khuẩn và lựa chọn 7 chủng vi khuẩn có hình thái đại diện, chiếm ưu thế cho các nghiên cứu tiếp theo.
3. Đã đánh giá khả năng phân hủy 5% dầu thô pha trong DO trên nền môi trường muối khoáng bổ sung NaCl 15‰ của 7 chủng vi khuẩn cho thấy: hiệu suất phân hủy 37,8-74,9% sau 13 ngày. Nghiên cứu tính đối kháng giữa các chủng và lựa chọn được 3 tổ hợp vi khuẩn để xử lý dầu đạt hiệu suất 79,4-90%, trong đó tổ hợp TH2 (gồm các chủng CR1, CR4, CR5, CR7) đạt hiệu suất phân hủy cao nhất.
4. Đã đánh giá đặc điểm sinh học và định danh 7 chủng gồm: *B. subtilis* CR1, *B. cereus* CR2, *B. pumilus* CR3, *B. siamensis* CR4, *B. amyloliquefaciens* CR5, *P. aeruginosa* CR6, *P. citronellolis* CR7. Tất cả 07 chủng có thể sử dụng các nguồn cacbon như glucose, lactose, saccharose, glycerol và sinh trưởng tối ưu ở nồng độ muối 20‰ NaCl, nhiệt độ 30 °C và pH trung tính.

KIẾN NGHỊ

Thử nghiệm và đánh giá khả năng phân hủy dầu của tổ hợp vi khuẩn trong môi trường đất ở các quy mô thực nghiệm hiện trường.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Nguyen Thi Kim Thanh**, Do Thi Tuyen, Nguyen Thi Thanh Loi, Ngo Cao Cuong, Phi Quyet Tien, 2023, Characterization of indigenous oil-degrading bacteria from oil-polluted soil in Cam Ranh, Khanh Hoa, *TNU Journal of Science and Technology*, 228(10): 420 – 427.
2. Do Thi Tuyen*, **Nguyen Thi Kim Thanh***, Nguyen Thi Hieu Thu, Nguyen Thi Thanh Loi, Phi Quyet Tien, Ngo Cao Cuong, 2023, Characterization of crude oil-degrading bacteria isolated from oil-contaminated saline soils in Cam Lam, Khanh Hoa, *Proceedings of 2023 Vietnam conference on biotechnology*, pp. 774-779.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim H.S., Dong K., Kim J. and Lee S.S., 2019, Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia iterans* isolated from marine coastal in Taean sediment, *MicrobiologyOpen*, 8(6), pp. e00754.
2. Yan S., Wang Q., Qu L. and Li C., 2013, Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(4), pp. 3932-3938.
3. Hasanuzzaman M., Umadhay-Briones K.M., Zsiros S.M., Morita N., et al., 2004, Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1, *Current microbiology*, 49, pp. 108-114.
4. Das N. and Chandran P., 2011, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnology research international*.
5. Fakhru'l-Razi A., Pendashteh A., Abdullah L.C., Biak D.R.A., et al., 2009, Review of technologies for oil and gas produced water treatment, *Journal of hazardous materials*, 170(2-3), pp. 530-551.
6. Li K., Yu H., Yan J. and Liao J. *Analysis of offshore oil spill pollution treatment technology*, in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, IOP Publishing.
7. Atlas R.M. and Hazen T.C., *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history*. 2011, ACS Publications.
8. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M. and Naidu R., 2015, A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria, *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, pp. 670-699.
9. Riser-Roberts E., 2020, *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. 2020: CRC press.
10. Mai Trọng Nhuận, Đào Mạnh Tiến, Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Thị Hồng Huế, Trần Đăng Quy, 2008, *Tài nguyên môi trường hệ thống Vịnh Cam Ranh và định hướng sử dụng bền vững*.
11. Nguyễn Đình Dương, Hồ Lê Thu, Lê Vân Anh, Nguyễn Kim Anh, 2013, Ô nhiễm dầu trên vùng biển Việt Nam và kế cận, *Tạp chí các Khoa học về Trái đất*, 35(4), tr. 424-432.

12. Ndimele P.E., Saba A.O., Ojo D.O., Ndimele C.C., et al., Remediation of crude oil spillage, in *The political ecology of oil and gas activities in the Nigerian aquatic ecosystem*, 2018, Elsevier, pp. 369-384.
13. Chandra S., Sharma R., Singh K. and Sharma A., 2013, Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon, *Annals of microbiology*, 63(2), pp. 417-431.
14. Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., et al., 2018, Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis, *Frontiers in microbiology*, 9, pp. 2885.
15. Wu M., Dick W.A., Li W., Wang X., et al., 2016, Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, pp. 158-164.
16. Al Mujaini M., Joshi S., Sivakumar N. and Al-Bahry S. *Potential application of crude oil degrading bacteria in oil spill and waste management*, in SPE International Conference and Exhibition on Health, Safety, Security, Environment, and Social Responsibility, 2018, OnePetro.
17. Leahy J.G. and Colwell R.R., 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological reviews*, 54(3), pp. 305-315.
18. Garrido-Sanz D., Redondo-Nieto M., Guirado M., Pindado Jiménez O., et al., 2019, Metagenomic insights into the bacterial functions of a diesel-degrading consortium for the rhizoremediation of diesel-polluted soil, *Genes*, 10(6), pp. 456.
19. Feng X., Liu Z., Jia X. and Lu W., 2020, Distribution of bacterial communities in petroleum-contaminated soils from the Dagang oilfield, China, *Transactions of Tianjin University*, 26, pp. 22-32.
20. Liu Y., Li C., Huang L., He Y., et al., 2017, Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test, *Chinese journal of chemical engineering*, 25(12), pp. 1838-1846.
21. Fathepure B.Z., 2014, Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments, *Frontiers in microbiology*, 5, pp. 173.
22. Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C., et al., 2003, Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and

- pristine alpine soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), pp. 3085-3092.
23. Head I.M., Jones D.M. and Röling W.F., 2006, Marine microorganisms make a meal of oil, *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), pp. 173-182.
 24. Gao Y., Guo S., Wang J., Li D., et al., 2014, Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil, *Chemosphere*, 117, pp. 486-493.
 25. Olajire A. and Essien J., 2014, Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia, *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5(5), pp. 1.
 26. Sathishkumar M., Binupriya A.R., Baik S.H. and Yun S.E., 2008, Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas, *CLEAN–Soil, Air, Water*, 36(1), pp. 92-96.
 27. Marchand C., St-Arnaud M., Hogland W., Bell T.H., et al., 2017, Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, pp. 48-57.
 28. Varjani S.J. and Upasani V.N., 2017, A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, pp. 71-83.
 29. Li X., Li H. and Qu C. *A review of the mechanism of microbial degradation of petroleum pollution* in IOP conference series: materials science and engineering, 2019, IOP Publishing.
 30. Wei Z., Wang J.J., Meng Y., Li J., et al., 2020, Potential use of biochar and rhamnolipid biosurfactant for remediation of crude oil-contaminated coastal wetland soil: Ecotoxicity assessment, *Chemosphere*, 253, pp. 126617.
 31. Cameotra S.S., Makkar R.S., Kaur J. and Mehta S.K., 2010, Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind, *Biosurfactants*, pp. 261-280.
 32. Ayed H.B., Jemil N., Maalej H., Bayouhd A., et al., 2015, Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, pp. 8-14.

33. Wang M., Ding M. and Yuan Y., 2023, Bioengineering for the Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants, *Bioengineering*, 10(3), pp. 347.
34. Barriuso J., Vaquero M.E., Prieto A. and Martínez M.J., 2016, Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review, *Biotechnology advances*, 34(5), pp. 874-885.
35. Varjani S.J., 2017, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresource technology*, 223, pp. 277-286.
36. Rahman K., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P. and Banat I.M., 2002, Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium, *Bioresource technology*, 85(3), pp. 257-261.
37. Đặng Thị Cẩm Hà, Nguyễn Thanh Phương, Nguyễn Bá Hữu, Nguyễn Quang Huy, 2000, Đánh giá vi sinh vật có khả năng sử dụng dầu ở biển Việt Nam, *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học*, tr. 58-61.
38. Đinh Thị Vân, Ngô Cao Cường, 2019, Phân lập, định danh và nghiên cứu đặc điểm sinh học một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu mỏ trong mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại Quân khu 7, *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61(6).
39. Cung Thị Ngọc Mai, 2019, *Nghiên cứu sự phân hủy sinh học hợp chất vòng thơm của các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học phân lập tại một số địa điểm ô nhiễm dầu ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
40. Cung Thị Ngọc Mai, Nghiêm Ngọc Minh, 2011, Sự đa dạng của vi khuẩn trong nước thải khu công nghiệp Từ Liêm qua hệ thống xử lý Aeroten, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9(2), tr. 259-264.
41. Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Vũ Giang, Nguyễn Thị Yên, Huỳnh Mai Đức, Nguyễn Hữu Đạt, Vương Thị Nga, Nguyễn Thị Thu Hà, Phạm Thị Phương 2020, Nâng cao hiệu quả xử lý nước ô nhiễm dầu bằng chủng bacillus cố định lên xốp polyurethane (puf), *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 18(3), tr. 581-588.
42. Nguyễn Bá Hữu, Vũ Hồng Nga, Đặng Thị Cẩm Hà, 2003, Khả năng sử dụng hydrocacbon dầu mỏ của ba chủng vi khuẩn phân lập từ cặn thải xăng dầu ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, 25(4), tr. 62-68.
43. Vũ Thị Thanh, Lê Thị Nhi Công, Nghiêm Ngọc Minh, 2014, Nghiên cứu khả năng phân hủy phenol của chủng vi khuẩn DX3 phân lập từ nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Hà Nội, *Tạp chí Sinh học*, 36(1), tr. 28-33.





44. Doan C.D.P., Sano A., Tamaki H., Pham H.N.D., et al., 2016, Identification and biodegradation characteristics of oil-degrading bacteria from subtropical Iriomote Island, Japan, and tropical Con Dao Island, Vietnam, *Tropics*, 25(4), pp. 147-159.
45. Đoàn Đăng Phi Công, Hoàng Thái Lộc, 2020, Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học phân hủy dầu từ các vi sinh vật bản địa phù hợp với môi trường Việt Nam.
46. Cong L.T.N., Mai C.T.N., Thanh V.T., Nga L.P., et al., 2014, Application of a biofilm formed by a mixture of yeasts isolated in Vietnam to degrade aromatic hydrocarbon polluted wastewater collected from petroleum storage, *Water science and technology*, 70(2), pp. 329-336.
47. Tuyen D.T, Thanh N.T.K., Khoa N.X.B, Cuong N.C., 2022, Identification of hydrocarbon-degrading bacterial consortium isolated from the oil-contaminated muddy soil in Hanoi, Vietnam, *Povolzhskiy Journal of Ecology*,(2), pp. 206-215.
48. Smith A.C. and Hussey M.A., 2005, Gram stain protocols, *American Society for Microbiology*, 1(14), pp. 113-144.
49. Nguyễn Lâm Dũng, 1981, *Giáo trình vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
50. Aqeel A., Hussain Z., Aqeel Q., Zafar J., et al., 2021, Enrichment and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Various Oil-Contaminated Sites in Pakistan, *Geomicrobiology Journal*, 38(7), pp. 577-587.
51. Wang X., Wang X., Liu M., Zhou L., et al., 2016, Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients, *Desalination and Water Treatment*, 57(42), pp. 19768-19775.
52. Liu B., Ju M., Liu J., Wu W., et al., 2016, Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain, *Marine pollution bulletin*, 106(1-2), pp. 301-307.
53. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., et al., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Molecular biology and evolution*, 35(6), pp. 1547.
54. Liu X., Ma J., Ma Z.W. and Li L.H., 2017, Soil nutrient contents and stoichiometry as affected by land-use in an agro-pastoral region of northwest China, *Catena*, 150, pp. 146-153.




55. McLauchlan K., 2006, The nature and longevity of agricultural impacts on soil carbon and nutrients: a review, *Ecosystems*, 9, pp. 1364-1382.
56. Saadoun I., 2002, Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel, *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 42(6), pp. 420-428.
57. Jesubunmi C.O., 2014, Isolation of oil-degrading microorganisms in spent engine oil-contaminated soil, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(24), pp. 191-195.
58. Ni P., Wang X. and Li H., 2020, A review on regulations, current status, effects and reduction strategies of emissions for marine diesel engines, *Fuel*, 279, pp. 118477.
59. Zhang Z., Gai L., Hou Z., Yang C., et al., 2010, Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils, *Bioresource Technology*, 101(21), pp. 8452-8456.
60. Adebuseye S.A., Ilori M.O., Amund O.O., Teniola O.D., et al., 2007, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream, *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, pp. 1149-1159.
61. Parthipan P., Preetham E., Machuca L.L., Rahman P.K., et al., 2017, Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1, *Frontiers in microbiology*, 8, pp. 193.
62. Sở tài nguyên môi trường UBND tỉnh Khánh Hòa, 2021, *Báo cáo tổng kết nhiệm vụ đánh giá khí hậu tỉnh Khánh Hòa*.
63. Vinothini C., Sudhakar S. and Ravikumar R., 2015, Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), pp. 318-329.
64. Patowary K., Saikia R.R., Kalita M.C. and Deka S., 2015, Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2, *Annals of microbiology*, 65(1), pp. 225-234.
65. Zhang J., Feng W. and Xue Q., 2022, Biosurfactant production and oil degradation by *Bacillus siamensis* and its potential applications in enhanced heavy oil recovery, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 169, pp. 105388.

66. Bhattacharya D., Sarma P.M., Krishnan S., Mishra S., et al., 2003, Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), pp. 1435-1441.
67. Boyandin A., Prudnikova S., Filipenko M., Khrapov E., et al., 2012, Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, pp. 28-36.
68. Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Poliwoda A. and Piotrowska-Seget Z., 2014, Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil, *Environmental Science and Pollution Research*, 21, pp. 9385-9395.
69. Nwanyanwu C., Oporum C. and Nweke C., 2016, Crude Oil Biodegradation Potential of Bacterial Strains Isolated from Mangrove Ecosystem, *FUTO Journal Series*, 2(1), pp. 244-254.
70. Kumar A.P., Janardhan A., Radha S., Viswanath B., et al., 2015, Statistical approach to optimize production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* 2297, *3 Biotech*, 5(1), pp. 71-79.
71. Tian X., Wang X., Peng S., Wang Z., et al., 2018, Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater, *Water Science and Technology*, 78(12), pp. 2626-2638.

PHỤ LỤC

1. Kết quả phân lập 7 mẫu đất tự nhiên

STT	Kí hiệu mẫu	Hình ảnh đĩa phân lập ở độ pha loãng 10^{-3}	Mật độ (CFU/g)	Số chủng
1	0622CR02		$2,4 \times 10^5$	9
2	0622CR03.1		$1,1 \times 10^6$	14
3	0622CR03.2		$1,4 \times 10^6$	8
4	0622CR03.3		$1,3 \times 10^6$	14

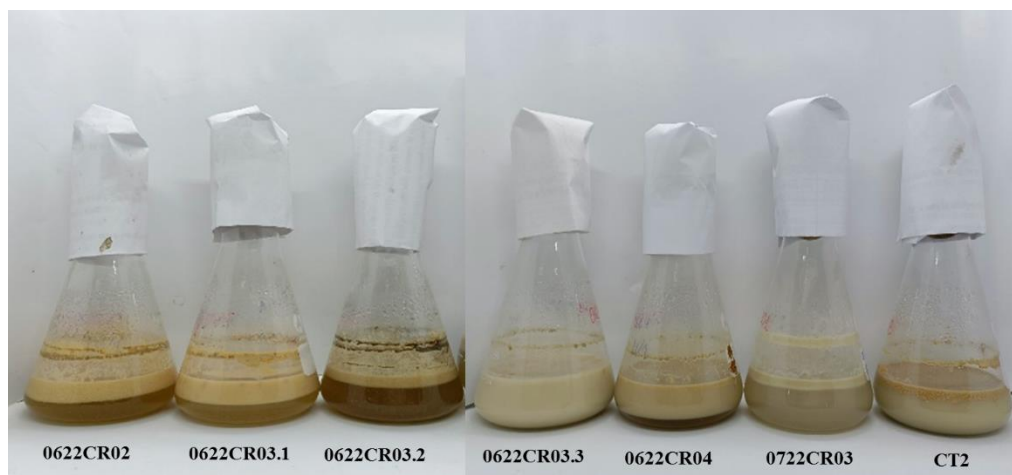
5	0622CR04		$5,3 \times 10^5$	6
6	0722CR03		$7,2 \times 10^5$	7
7	CT2		$2,7 \times 10^5$	6

2. Hình ảnh nuôi làm giàu 7 mẫu đất trong môi trường muối khoáng dầu GOST (15% NaCl và 5% dầu thô pha trong DO)

Mẫu làm giàu lần 1 sau 7 ngày nuôi lắc



Mẫu làm giàu lần 2 sau 7 ngày nuôi lắc



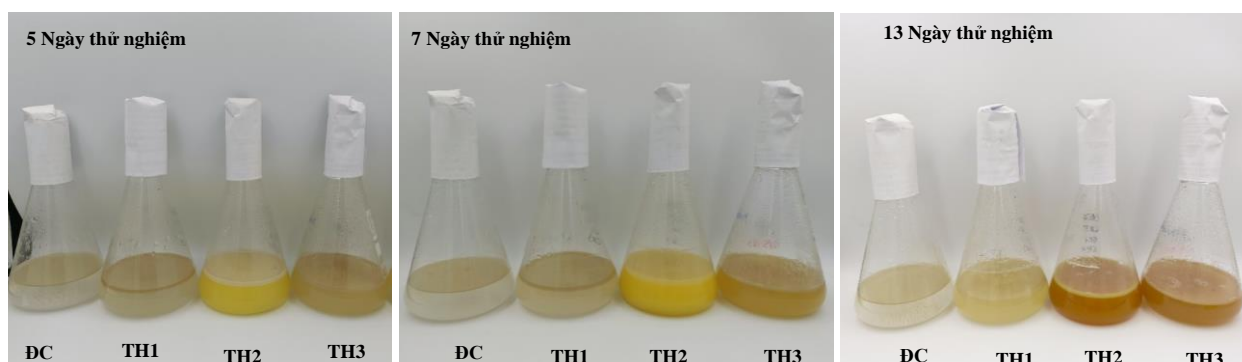
3. Giá trị OD_{600nm} thể hiện khả năng sinh trưởng của 7 chủng đơn vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu

Kí hiệu chủng	Thời gian thử nghiệm (Ngày)						
	1	3	5	7	9	11	13
CR1	0,14 ± 0,03	0,2 ± 0,07	0,43 ± 0,03	0,48 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,55 ± 0,02	0,53 ± 0,03
CR2	0,09 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,538 ± 0,05	0,7415 ± 0,01	0,684 ± 0,03	0,69 ± 0,02	0,69 ± 0,01
CR3	0,15 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,53 ± 0,04	0,49 ± 0,04
CR4	0,11 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,42 ± 0,06	0,49 ± 0,05	0,53 ± 0,04	0,46 ± 0,04
CR5	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,05	0,2 ± 0,01	0,31 ± 0,04	0,51 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,42 ± 0,03
CR6	0,12 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,67 ± 0,01	0,76 ± 0,06	0,89 ± 0,03	0,75 ± 0,04	0,67 ± 0,01
CR7	0,2 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,69 ± 0,03	0,73 ± 0,01	0,81 ± 0,04	0,71 ± 0,01







4. Giá trị OD_{600nm} thể hiện khả năng sinh trưởng của 3 tổ hợp vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu





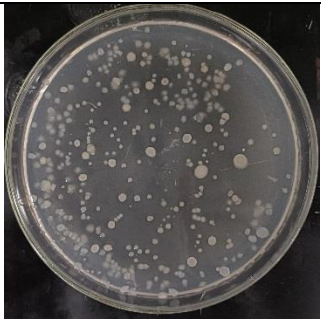




Kí hiệu tổ hợp	Thời gian thử nghiệm (Ngày)						
	1	3	5	7	9	11	13
TH1	0,082 ± 0,04	0,198 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0,418 ± 0,07	0,460 ± 0,05	0,532 ± 0,05	0,4905 ± 0,03
TH2	0,136 ± 0,04	1,103 ± 0,04	1,231 ± 0,06	1,57 ± 0,07	1,4375 ± 0,08	1,361 ± 0,04	1,2795 ± 0,06
TH3	0,089 ± 0,02	0,253 ± 0,05	0,538 ± 0,04	0,7415 ± 0,05	0,684 ± 0,06	0,739 ± 0,09	0,697 ± 0,03




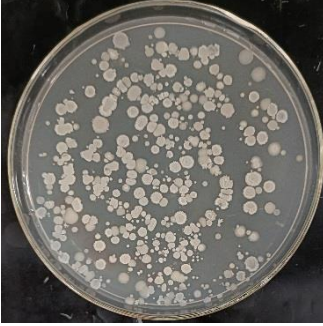
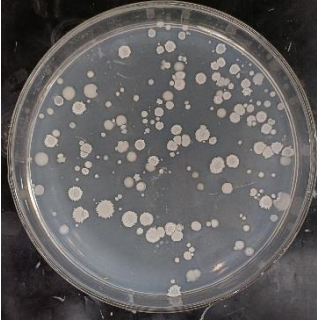

5. Hình ảnh đánh giá khả năng phân hủy dầu của tổ hợp vi khuẩn trong môi trường muối khoáng dầu GOST (15% NaCl và 5% dầu thô pha trong DO)



6. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn trên môi trường MPA từ mẫu làm giàu lần 3

STT	Kí hiệu mẫu	Hình ảnh đĩa phân lập			Mật độ	Số chủng	% Số chủng mỗi loại
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}			
1	0622CR02				$2,4 \times 10^9$	3	CR2: 10% CR6: 44% CR7: 41%
2	0622CR03.1				$1,05 \times 10^{10}$	2	CR6: 85% CR7: 15%

3	0622CR03.2				$1,13 \times 10^{10}$	3	CR2:17% CR3: 48% CR4: 35%
4	0622CR03.3				$7,9 \times 10^9$	3	CR2: 13% CR3:44% CR7:43%
5	0622CR04				$3,04 \times 10^9$	3	CR1: 36% CR2: 40% CR3: 24%

6	0722CR03				$3,13 \times 10^9$	4	CR1: 36% CR4: 13 % CR5: 10% CR7: 41%
7	CT2				$2,84 \times 10^9$	4	CR1: 27% CR2: 32% CR3: 17% CR7: 24%

7. Trình tự gen 16S rRNA của 7 chủng vi khuẩn phân lập

>OQ940649.1 *Bacillus subtilis* strain CR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTNCCTTGAC
GGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAA
CCGGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGTAAAGT
GTTAGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAAC
GCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAA
AGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCTTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCA
GCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGG
```

>OQ940650.1 *Bacillus cereus* strain CR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
GCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATG
GTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATA
AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA
ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCG
ATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTTC
CTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTTTAAGGTGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATTTTCATAAAACCGTTTTTCAGTTCCGATT
GTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAAC
CTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGG
```

>OQ940651.1 *Bacillus pumilus* strain CR3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCATGGTT
CAAGGATGAAAGACGGTTTTCCGGCTGTCACTTNCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTA
ATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGGTAAGTCTG
CGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGT
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATG
AGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
```

TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTT
CGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA
GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
TATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGGAAGT

>OQ940652.1 *Bacillus siamensis* strain CR4 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence

CGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTNTGAACCGCATGGTTCAGA
CATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTG
AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGTGACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACA
GAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT
GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAT
GGAGCCTAGCCGCCGAAGGTGGGACTAGATGATTGGGG

>OQ940653.1 *Bacillus amyloliquefaciens* strain CR5 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

TGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
CCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC
TCTGGTCTTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCAC
TCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
AGGACGTCCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTC
AGTTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCG
GTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATG

>OQ940654.1 *Pseudomonas aeruginosa* strain CR6 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

TGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATC
TGCCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGG
GGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCC

TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGA
CGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTGCGACTAGCCG
TTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAACCTCAAATGAATTGCGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTACAGAC
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACC
CTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAAAAG
GGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCCGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGT
TACCTCGGAGTGATTCATGACTGGGG

>OQ940655.1 *Pseudomonas citronellolis* strain CR7 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

GATTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGA
GCGCTAATACCGCATAACGCTCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCT
AGGTCCGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG
GGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
TGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGA
GTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAA
CGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAA
TNCATGAGAGATGCGGNAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTA



ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
THAINGUYEN UNIVERSITY

ISSN 1859 - 2171
2734 - 9098

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ

TNU JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

CHUYÊN SAN KHOA HỌC TỰ NHIÊN - KỸ THUẬT - CÔNG NGHỆ
NATURAL SCIENCE - ENGINEERING - TECHNOLOGY

228(10)
2023

Content	Page
Nguyen Quang Nha - Research and design the control system for 2 diesel generators applied in the factory	381
Nguyen Tuan Anh, Dam Minh Quang, Pham Nang Van - Mixed-integer linear programming-based transmission network expansion planning considering power loss	389
Do Dinh Trung - Adhesion of epoxy paint and polyurethane paint by the pull-off method	398
Tran Viet Hung, Bui Quy Thang, Hoang Minh Thien, Pham Viet Anh, Trinh Dinh Linh - Improved the quality of the transmitter internal calibration of digital phased array antenna system	404
Nguyen Manh Tien - Determination of coefficient of friction during cold ring upsetting process with different lubricants	411
Nguyen Thi Kim Thanh, Do Thi Tuyen, Nguyen Thi Thanh Loi, Ngo Cao Cuong, Phi Quyet Tien - Characterization of indigenous oil-degrading bacteria from oil-polluted soil in Cam Ranh, Khanh Hoa	420
Nguyen Thi Thu Thuy, Phi Thi Huong - Characteristics, distribution, correlation and formation trends of chlorobenzenes compositions in industrial combination and industrial production furnace	428
Dao Duc Tung, Tran Duc Dong, Le Duc, Vu Thi Thao, Nguyen Ngoc An, Bui Dinh Tu - Research and synthesis of conductive PPY/CNC polymer for flexible electronics applications	436
Ha Thi Thinh, Nguyen Thi Kha - Simulation of low voltage power supply system for industrial factory with matlab software	443
Ngo Tri Nam Cuong - Adaptive sliding mode control for the longitudinal of fixed- wing UAV	450
Ha Viet Truong, Tran Thanh Quynh, Do Thi Hue - Green synthesis silver nanoparticles using salix semi-solid extract for photocatalytic effect	457
Hoang Le Phuong - Removal of phosphate (PO_4^{3-}) from aqueous solution using magnetic material derived from snail shell	465
Trinh Trung Hieu, Nguyen Tho Hoang, Tran Ngoc Thien Nam, Van Trong Nhan, Duong Minh Quan - Reduce harmonic for photovoltaic inverters by SPWM control methods via simulation and experiment assessment of photovoltaic systems	473
Nguyen Thi Thanh Hai, Nguyen Phuong Nhung, Le Tuan Vinh, Hoang Minh Thang, Nguyen Thi Ngoc Anh, Nguyen Thi Anh, Pham Hai Long, Vu Van Tu, Phan Quang Thang - An assessment of water quality, capacity of pollutions, and solutions to reduce pollution of urban rivers in Thai Binh province	482
Chu Thi Ngan, Nguyen Tat Thang - A self-adaptive iterative algorithm for solving a class of bilevel split variational inequality problem in Hilbert spaces	491

CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS OIL-DEGRADING BACTERIA FROM OIL-POLLUTED SOIL IN CAM RANH, KHANH HOA

Nguyen Thi Kim Thanh^{#1,3}, Do Thi Tuyen^{#1,3}, Nguyen Thi Thanh Loi^{2,3}, Ngo Cao Cuong¹, Phi Quyet Tien^{2,3*}

¹Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center

²Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

³Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	28/6/2023	Bioremediation of oil-contaminated soils using biodegradative activities of microorganisms is a promising approach that is of interest to researchers. The study aimed to isolate oil-degrading bacterial strains from the contaminated soil of Cam Ranh, Khanh Hoa, and develop a robust indigenous bacterial consortium for bioremediation of crude oil pollution. From a total of seven oil-polluted soil samples collected in Cam Ranh, after 3-fold enrichment in liquid mineral salt medium containing 5% crude oil mixed in diesel DO (w/v), 7 bacterial isolates were achieved. Based on the antagonism of 7 strains, 3 microbial consortia were formed and developed well in the condition of liquid mineral salts with 5% crude oil added mixed in DO. In particular, the TH2 consortium revealed the best ability to develop and oil-decomposition of 90% after 13 days of incubation. By analysis of 16S rRNA sequences, four oil-degrading bacteria of TH2 were identified as <i>Bacillus subtilis</i> CR1 (OQ940649), <i>Bacillus siamensis</i> CR4 (OQ940652), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CR5 (OQ940653), and <i>Pseudomonas citronellolis</i> CR7 (OQ940655), respectively. The optimal conditions for four bacterial isolates were determined at salinity 20‰, pH 7 and temperature 30-37°C. They are suitable for application in the bioremediation of oil-contaminated environments.
Revised:	25/7/2023	
Published:	25/7/2023	
KEYWORDS		
Bacterial consortium		
Biodegradation		
Indigenous bacteria		
Oil-degrading bacteria		
Oil-contaminated soil		

ĐẶC ĐIỂM VI KHUẨN BẢN ĐỊA PHÂN HỦY DẦU TRONG ĐẤT NHIỄM DẦU TẠI CAM RANH, KHÁNH HÒA

Nguyễn Thị Kim Thanh^{#1,3}, Đỗ Thị Tuyền^{#1,3}, Nguyễn Thị Thanh Lợi^{2,3}, Ngô Cao Cường¹, Phí Quyết Tiến^{2,3*}

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga, ²Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO		TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	28/6/2023	Ứng dụng khả năng phân hủy sinh học của vi sinh vật để xử lý đất ô nhiễm dầu là một hướng tiếp cận đầy hứa hẹn đang được các nhà nghiên cứu quan tâm. Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập các chủng vi khuẩn phân hủy dầu từ đất bị ô nhiễm ở Cam Ranh, Khánh Hòa và phát triển một tổ hợp vi khuẩn bản địa có khả năng xử lý ô nhiễm dầu tại đây. Từ tổng số 7 mẫu đất nhiễm dầu được lấy tại Cam Ranh, sau khi làm giàu 3 lần trong môi trường muối khoáng lỏng chứa 5% dầu thô hòa trong diesel (DO) (w/v), đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn. Dựa vào kết quả nghiên cứu tính đối kháng của 7 chủng, 3 tổ hợp vi sinh vật được hình thành phát triển tốt trong môi trường muối khoáng lỏng có bổ sung 5% dầu thô pha trong DO. Trong đó, tổ hợp TH2 cho thấy khả năng phát triển và hiệu quả phân hủy tốt nhất đạt 90% sau 13 ngày ủ. Bằng kỹ thuật phân tích trình tự 16S rRNA, 4 chủng vi khuẩn phân hủy dầu của tổ hợp TH2 được khảo sát và định danh lần lượt là <i>Bacillus subtilis</i> CR1 (OQ940649), <i>Bacillus siamensis</i> CR4 (OQ940652), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CR5 (OQ940653) và <i>Pseudomonas citronellolis</i> CR7 (OQ940655). Chúng phát triển tối ưu ở độ mặn 20‰, pH 7 và nhiệt độ 30-37°C. Giá trị này phù hợp với điều kiện tự nhiên tại Cam Ranh, cho thấy tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn để xử lý sinh học môi trường đất nhiễm dầu.
Ngày hoàn thiện:	25/7/2023	
Ngày đăng:	25/7/2023	
TỪ KHÓA		
Tổ hợp vi khuẩn		
Phân hủy sinh học		
Vi khuẩn bản địa		
Vi khuẩn phân hủy dầu		
Đất nhiễm dầu		

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8235>

* Corresponding author. Email: tienpq@ibt.ac.vn

These authors contributed equally to this work as first authors.

1. Introduction

Currently, crude oil and petroleum products are being exploited and used increasingly, leading to release into the environment and harming surrounding ecosystems. Especially in coastal areas, oil extraction and transportation activities easily cause oil leakage and spill incidents, dispersing oil into the soil environment, which is a severe reason for soil pollution.

Cam Ranh bay is an important strategic area in the socio-economic development and security - defense of Vietnam. According to the actual assessment, this area is seriously polluted with diesel (DO), total petroleum hydrocarbons (TPHs) concentrations up to 4052 mg/kg of soil, higher than the standard value of QCVN 03:2023/BTNMT, 500 mg/kg. Oil seeps into groundwater, negatively affects soil quality, loses soil's ability to metabolize, kills microorganisms, and damages ecosystems. Petroleum may damage plants, animals, and people's health since it includes dangerous and persistent compounds such as benzene, toluene, ethyl benzene, xylene, and naphthalene [1].

Bioremediation is recognized as an efficient, economical, and versatile alternative to physicochemical treatment of oil-contaminants. In recent years, using hydrocarbon degrading bacteria to clean petroleum contaminated soils has become a prevalent, efficient, and economical technique that converts toxic wastes to non-toxic end products [2]. Stimulating the growth of indigenous microorganisms, and the addition of oil-degrading bacteria to the contaminated soil, is a promising method to accelerate decomposition activities in contaminated sites without impacting ecosystems [3], [4]. Previous studies have shown that bacteria in soil could completely mineralize organic pollutants into carbon dioxide, water, inorganic compounds or simple organic compounds [4], [5]. Some studies show that indigenous bacteria from contaminated sites, such as *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*,... can degrade petroleum compounds to satisfy their cell growth and energy needs [6]. Using indigenous microbial consortium for bioremediation is more effective than individual bacterial cultures. The research of Rahman (2002) showed that the mixed bacterial consortium degraded up to 78% of crude oil while this number was only 41-66% with the individual strain [2]. The diversity of oil-degrading bacteria in the soil and their ability to degrade oil are at different rates [7]. At the same time, some components of crude oil are difficult to degrade, such as shorter and longer chain alkanes (<C₁₀ and C₂₀-C₄₀) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [8]. Therefore, it is necessary to isolate and evaluate the biodegradation capability of indigenous bacteria in the soil under saline conditions in Cam Ranh to propose effective methods of treating oil pollution. Research on bacteria capable of decomposing oil in Cam Ranh is scanty. In this paper, bacterial strains capable of degrading crude oil mixed in diesel were isolated from oil-contaminated soil samples collected at Cam Ranh. The present study aimed to identify the bioremediation indigenous microbial consortium in oil-polluted soils and evaluate the ability to degrade DO and crude oil from the enriched samples.

2. Methodology

2.1. Materials

Oil-contaminated soil samples: seven oil-contaminated soil samples collected from the depth of 0 to 120 cm surface in Cam Ranh Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam in June 2022. The NaCl salt content in the collected soil samples was between 1.5 - 1.6%, pH 5.5 - 8.4, and TPHs concentrations from 58.1-4052 mg/kg. Entire experiments were carried out in the laboratory of the Department of Biotechnology, Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center laboratory.

2.2. Methods

2.2.1. Enrichments and isolation of oil-degrading bacterial strains

Soil samples were incubated on a rotary shaker at 30 °C and 150 rpm for 7 days in mineral salt medium (GOST 9023-74) containing: KNO₃ - 4 g; KH₂PO₄ - 0.5 g; Na₂HPO₄ - 1.4 g; MgSO₄ - 0.8 g, distilled water 1L, addition 15‰ NaCl and 5% crude oil mixed in DO (at a ratio of 5:95) as the only energy and carbon source [9].

After 7 days of incubation, the enriched culture was extracted and transferred to the same fresh medium at a ratio of 10% (w/v). After three cycles of enrichment, total bacteria were isolated and numbered using the plate counting method on MPA modified medium (containing peptone 10 g/L, meat extract 5 g/L, NaCl 15 g/L, agar 20 g/L) and incubated at 30°C for 24h. The pure colonies with phenotypic differences (colony shapes, sizes, colors, margins, texture, etc. and cell shapes and sizes) were sub-cultured, purified and maintained for further study [10].

2.2.2. Morphological observation of isolated strains

The isolated colonies were incubated on MPA modified for 24h and examined for morphological properties. The cell morphology of the isolated bacteria was observed under a light microscope (Zeiss Axiocam 503 Color Camera Unit) with a magnification of 1000x after Gram staining.

2.2.3. Screening of antagonistic interactions between bacteria isolated

Selected strains of bacteria were screened for antagonistic interactions by the cross-streak method [11]. They were streaked in horizontal and vertical rows that crossed each other on the same plate of MPA agar and incubated at 30°C. The antagonistic effect was indicated by the failure of the target strain to grow in the confluence area.

2.2.4. Oil degradation ability of the bacterial consortium

Bacterial consortia were grown in liquid mineral salt medium containing 5% crude oil mixed in DO (w/v) on a rotator shaker at 180 rpm, 30°C for 13 days. Non-inocula was used as the control. The estimation of bacterial growth was carried out by measuring OD_{600 nm} in a UV-visible spectrophotometer.

Crude oil remaining from the culture broth after 13 days of testing was extracted using solvent extraction method with n-hexane. After the evaporation of the solvent, the amount of residual oil was determined by gravimetric methods. Uninoculated flasks served as control. The percentage of oil degradation was determined by the following formula [12]: Percentage of degradation = $((m_{\text{control}} - m_{\text{residual}})/m_{\text{control}}) \times 100$, where m_{control} is weight of the oil in control flasks after treatment (g), m_{residual} is weight of the residual oil in testing flasks after treatment (g).

2.2.5. Effect of environmental conditions on growth of bacteria isolated

The bacterial species were cultured in MPA broth with different conditions including: Incubation temperatures of 10, 20, 30, 37 and 45°C; autoclaved medium initial pH of 3, 5, 6, 7, 9 using 1M HCl or 1M NaOH; the salinity with NaCl, concentrations of 5, 10, 20, 30 and 40‰. After incubation on a rotary shaker at 150 rpm for 24 hours, the cell density was measured the optical density (OD) at 600 nm in a UV-visible spectrophotometer.

2.2.6. Molecular identification of isolates by 16S rRNA sequencing

Extraction of genomic DNA from the bacterial isolates was done using Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, UK) according to the manufacturer's instructions. 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal primer pairs 27F and 1492R. The product of PCR was sequenced by 1st Base Laboratories Sdn. Bhd., Malaysia. The

16S rRNA sequencing data were compared with the corresponding sequences of the strains registered on GenBank using the BLAST tool on NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed using MEGA X software based on 16S rRNA sequences.

2.2.7. Data analysis

All experiments were performed in triplicate. The mean and standard deviations of the three experiments were calculated using Microsoft Excel 2010.

3. Results and discussions

3.1. Isolation and morphology of oil-degrading bacteria

After three times of enrichment in a mineral salt medium with 15‰ NaCl and 5% crude oil mixed in DO at a ratio of 5:95 (w/v) used as the sole source of carbon, the bacterial populations reached a density of 1.4×10^{10} to 1.05×10^{11} CFU/mL. This demonstrated that the oil-degrading bacterial populations grew rapidly. The isolated colonies with different morphologies were selected to form a microbial consortium capable of degrading oil and for further study. A total of 7 bacterial strains were isolated on the MPA agar from seven oil-contaminated soil samples in Cam Ranh (Table 1). 5/7 strains were found to be Gram-positive spore-forming rods labeled as CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, and the remaining isolates CR6, and CR7 were Gram-negative rods. The number of isolates is not much, indicating that the enrichment process has initially screened bacterial strains that are able to adapt to the carbon source in crude oil.

Table 1. Morphological characteristics of seven oil-degrading bacterial isolates cultured on MPA medium

Isolates	Morphology of colony				Gram stain	Shape of cell
	Form	Color	Elevation	Margin		
CR1	Irregular	White creamy	Umbonate	Smooth	+	Rods
CR2	Irregular	White creamy	Convex	Undulated	+	Rods
CR3	Circular	White creamy	Flat	Smooth	+	Rods
CR4	Irregular	White creamy	Raised	Smooth	+	Rods
CR5	Irregular	White	Raised	Smooth	+	Rods
CR6	Irregular	Yellow green	Raised	Undulated	-	Rods
CR7	Circular	White creamy	Convex	Smooth	-	Rods

3.2. Antagonistic interactions between bacteria isolated

According to some studies, using a consortium of indigenous microorganisms to treat environmental pollution showed that it is more effective than single strains [5]. Therefore, in order to improve the oil degradation efficiency, it is necessary to select a consortium of microorganisms that do not have antagonistic interactions, grow stably, and decompose oil quickly [7].

Table 2. Antagonistic interactions among bacteria isolated from oil-contaminated soil

Strains	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6	CR7
CR1	N	-	-	-	-	+	-
CR2	-	N	-	+	+	+	-
CR3	-	-	N	+	+	+	-
CR4	-	+	+	N	-	+	-
CR5	-	+	+	-	N	+	-
CR6	+	+	+	+	+	N	-
CR7	-	-	-	-	-	-	N

Notes: - no antagonistic interactions; + antagonistic interactions; N no test for antagonism

From seven isolated bacterial strains, the antagonism among them was investigated to build the consortia of strains applied to decompose oil. The results were shown in Table 2. CR6 strain had antagonistic interactions with almost all strains CR1 to CR5. In contrast, CR7 strain did not show antagonism against all other strains. Screening for biological antagonists among seven isolated strains was a simplistic approach but it should yield useful information for conducting oil-degrading bacterial consortia.

Bacterial isolates that did not inhibit each other in pairs and simultaneously grown under the same conditions of nutrient medium were grouped into a consortium to study the oil degrading efficiency. Three bacterial consortia were formed from 7 isolated strains and designated as Consortium TH1 (CR1, CR2, CR3, CR7), TH2 (CR1, CR4, CR5, CR7), TH3 (CR6, CR7).

3.3. Biodegradation of crude oil by a bacterial consortium

Three bacterial consortia TH1, TH2, TH3 were studied for their ability to decompose oil. The disappearance of DO and crude oil from the culture medium and the change in color of the medium showed that the consortia were able to emulsify oil effectively. After 13 days, the levels of microbial growth and oil biodegradation were analyzed using spectrometry-based and gravimetric methods (Figure 1). The results in Figure 1a showed that the OD₆₀₀ values of all the consortia increased slightly and peaked at 7-9 days of incubation. The maximum OD₆₀₀ was 1.67 ± 0.03 at TH2, followed by TH3 and TH1 with 0.76 ± 0.02 and 0.48 ± 0.01 , respectively, suggesting that the strains could degrade crude oil. After 9 days, the curve stayed stable, which indicated that the growth and death of the bacterial cells had stabilized. The increase in cell mass in terms of turbidity directly indicates the utilization of DO and crude oil as the sole source of carbon.

The OD₆₀₀ value and gravimetric analysis in figure 1b showed that Consortium TH2 produced the highest crude oil degradation of $90 \pm 3.1\%$ compared to Consortium TH1 and TH3 with $79.4 \pm 2.1\%$ and $87.7 \pm 1.5\%$, respectively. This value is not too different from some other studies in the world. Zhang (2010) showed the result that during a 7-day incubation, about 95.8% of TPHs of diesel oil were degraded by a bacterial consortium containing seven strains from oil-contaminated soils [12]. The consortium consisting of two isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and one isolate *Rhodococcus erythropolis* from oil-polluted soil was able to degrade hydrocarbons by 90% in 6 weeks in liquid culture [4]. There was no biomass and significant degradation of diesel oil and crude oil in the microbial-free control. The biomass of the bacterial consortium isolated was proportional to the degradation of oil. TH2 showed the best oil degradation ability, therefore four 4 strains CR1, CR4, CR5, CR7 were further studied for treatment applications.

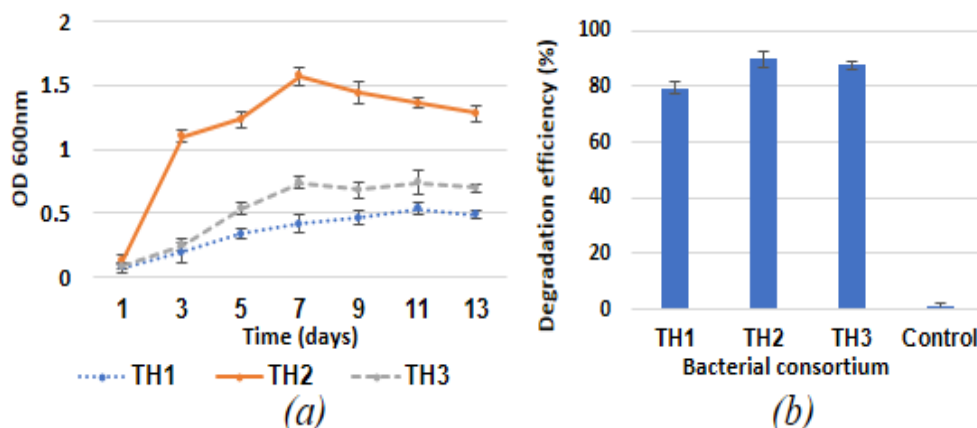


Figure 1. The oil biodegrading ability of bacterial consortium (a) Bacterial growth curve in liquid mineral salt medium with crude oil mixed in DO as a sole carbon source (b) Percentage of crude oil removal measured by gravimetric after a 13-day incubation period.

3.4. Effect of environmental conditions on the growth of bacteria isolated

Environmental conditions such as salinities, initial pH values and temperature affect the growth and decomposition of oil by microorganisms.

Four strains CR1, CR4, CR5, CR7 of TH2 were studied for optimal growth conditions. As shown in Figure 2a, the highest cell concentration of isolated strains was achieved with 20 g/L of NaCl. Isolated strains had a wide salinity range of 5 – 40‰ NaCl, suitable for application in normal and saline conditions. The soil in Cam Ranh Bay is moderately salty, NaCl content is about 15-20 g/L. Therefore, the indigenous microbial strains isolated here had shown good adaptability to the soil conditions for oil-polluted treatment.

Studies on the effect of the pH showed that the initial pH significantly affected the growth of the bacteria (Figure 2b). When the initial pH was 3, there was no sign of microbial growth. Bacterial density increased rapidly with increasing pH and reached its highest OD value in the range of 1.26 -1.43 at neutral pH 6-7. Then, with an increase in the initial pH of the medium, the cell concentration decreased slightly but bacteria could still grow at a pH of 9. The strain showed weaker resistance to acid environments but exhibited superior tolerance to alkaline environments. Overall, neutral media was favorable for all the bacterial isolates. A neutral pH of 7 has been reported to be optimal for growth and oil degradation rate and extremes in pH were shown to have a negative influence on the ability of microbial populations to degrade hydrocarbons [13].

As shown in Figure 2c, 30°C was the optimal growth temperature for most strains, except for strain CR1 showed maximum growth at 37°C ($OD_{600} = 1.57 \pm 0.02$). When the temperature was lower than 30°C or higher than 40°C, the number of bacteria significantly decreased. This indicates that isolated strains were less active at temperatures outside the optimal region. This result was consistent with studies on suitable temperature conditions for bacterial growth [13].

Salinities, pH values and temperature affected the physical properties, chemical composition of the oil. Thus, it was affecting the rate at which microorganisms degrade hydrocarbons and the composition of the microbial community [2]. The study of B. Liu (2016) showed that the salinity of 30 g/L, pH of 7.5 and temperatures of 30°C was considered optimal for maximum microbial growth and biodegradation [13].

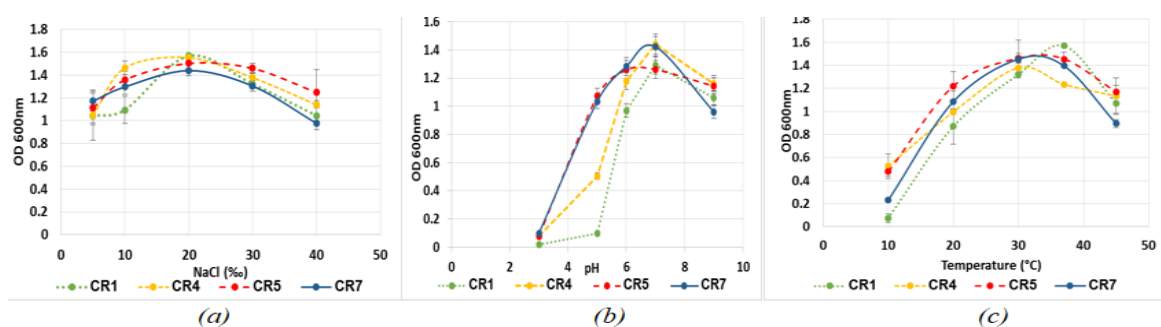


Figure 2. Optimization of different growth conditions of the bacterial isolates
(a) NaCl, (b) pH, (c) Temperature

3.5. Identification of the bacterial isolates

The 16S rRNA gene sequences of seven strains were identified and submitted into NCBI databases under the GenBank accession numbers shown in Table 3. The isolates were grouped into two main clusters related to the genera of *Bacillus* and *Pseudomonas* with the identity of more than 99% homology. This result was in line with studies suggesting spore-forming bacteria were crucial in oil biodegradation. Species belonging to this genus such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus siamensis*, and *Bacillus amyloliquefaciens* were known to be able to produce biosurfactants regarding hydrocarbon degradation capacity and degrade oil in soil and water both

under normal and saline conditions [14]-[16]. The strain *Pseudomonas citronellolis* was the predominant strain among the isolates from oil-contaminated soil samples in different geoclimatic sites in India. They could degrade a wide range of organic pollutants including polycyclic aromatic hydrocarbons, halogenated derivatives, and recalcitrant organic residues [17]. The previous study by Xiumei Tian suggested that bacterial consortium made from *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. isolated from heavy oil-contaminated soil in Bohai Bay, China could degrade 80.64% of crude oil, 76.30% of crude oil alkanes [18]. The results of Rahman showed that the mixed bacterial consortium could carry out up to 78% of the degradation after 20 days of incubation, which was more efficient than the crude oil degradation of the individual cultures, the ratio degraded by *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. was 66%, 59%, respectively [2].

Table 3. Identification of bacterial isolates using 16S rRNA gene sequences

Isolates	Accession number (NCBI)	Identification	Identity (%)
CR1	OQ940649	<i>Bacillus subtilis</i> CR1	99.69
CR4	OQ940652	<i>Bacillus siamensis</i> CR4	99.79
CR5	OQ940653	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CR5	100
CR7	OQ940655	<i>Pseudomonas citronellolis</i> CR7	99.81

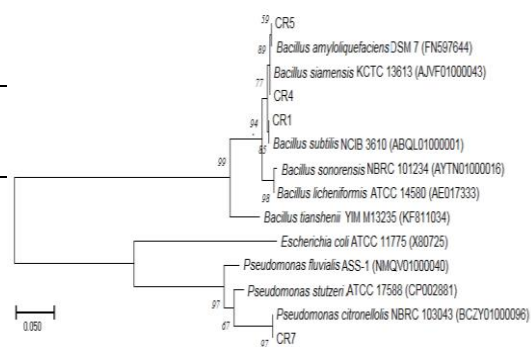


Figure 3. Phylogenetic tree (1000 bootstrap replications) of the isolated strains based on 16S rRNA sequences using neighbour-joining method by MEGA X

This high rate of crude oil degradation may be caused by the strains' complementing impacts on metabolic pathways, resulting in better degradation of petroleum hydrocarbons and a higher capacity to adapt to mineral salt media with crude oil mixed in DO. Through symbiosis and constructive collaboration between several strains, the complex microbial consortium was produced and showed significant efficiency in oil degradation. Besides, a combination of bacterial consortia containing various enzymes with strong abilities to degrade complex hydrocarbons is necessary for the effective remediation of oil-polluted soil [7].

Based on 16S rRNA sequences of seven isolates, a phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method. In the phylogenetic tree, CR1, CR4, and CR5 strains of the genus *Bacillus* form a separate branch different from strains of the genus *Pseudomonas* CR7 (Figure 3).

4. Conclusions

In the present study, seven bacterial strains were isolated from the oil-contaminated soil in Cam Ranh, Khanh Hoa. In this study, 3 microbial consortia formed from 7 bacterial strains isolated showed the ability to degrade oil from 79.4-90%, in which, bacterial strains in consortium TH2 showed the highest survival and oil-degrading activity. Four bacterial strains of consortium TH2 developed an ideal pH value of neutral. The optimum growth temperature was 30 °C in a culture medium with a salinity of 20‰. The 16S rRNA gene sequences were submitted in the NCBI-GenBank databases under the accession numbers: *Bacillus subtilis* CR1 (OQ940649), *Bacillus siamensis* CR4 (OQ940652), *Bacillus amyloliquefaciens* CR5 (OQ940653), *Pseudomonas citronellolis* CR7 (OQ940655). In summary, the isolated indigenous bacterial strains have potential applications in the remediation of oil-contaminated soil in Cam Ranh, Khanh Hoa.

Acknowledgments

This work is studied in the biotechnology laboratory and financially supported by *Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center*.

REFERENCES

- [1] G. Ghoreishi, A. Alemzadeh, M. Mojarrad, and M. Djavaheeri, "Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran," *Sustainable Environment Research*, vol. 27, no. 4, pp. 195-202, 2017.
- [2] K. Rahman, J. Thahira-Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, and I. M. Banat, "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium," *Bioresource Technology*, vol. 85, no. 3, pp. 257-261, 2002.
- [3] S. Cappello, R. Denaro, M. Genovese, L. Giuliano, and M. M. Yakimov, "Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms," *Microbiological Research*, vol. 162, no. 2, pp. 185-190, 2007.
- [4] N. Das and P. Chandran, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview," *Biotechnology Research International*, vol. 2011, 2010, doi: 10.4061/2011/941810.
- [5] S. A. Adebuseye, M. O. Ilori, O. O. Amund, O. D. Teniola, and S. Olatope, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, pp. 1149-1159, 2007.
- [6] H. S. Kim, K. Dong, J. Kim, and S. S. Lee, "Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia* iterans isolated from marine coastal in Taean sediment," *MicrobiologyOpen*, vol. 8, no. 6, 2019, Art. no. e00754.
- [7] F. M. Ghazali, Z. A. Rahman, A. B. Salleh, and M. Basri, "Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 54, no. 1, pp. 61-67, 2004.
- [8] L. Yuste, M. E. Corbella, M. J. Turiégano, U. Karlson, A. Puyet, and F. Rojo, "Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 32, no. 1, pp. 69-75, 2000.
- [9] T. T. Do, T. K. T. Nguyen, X. B. K. Nghiem, and C. C. Ngo, "Identification of hydrocarbon-degrading bacterial consortium isolated from the oil-contaminated muddy soil in Hanoi, Vietnam," *Povolzhskiy Journal of Ecology*, no. 2, pp. 206-215, 2022.
- [10] A. P. Rajan, "Isolation and characterization of oil degrading bacteria from oil contaminated soils of Vellore district, Tamil Nadu, India," *Journal of Environmental Science & Engineering*, vol. 52, no. 2, pp. 113-116, 2010.
- [11] A. Lo Giudice, M. Brilli, V. Bruni, M. De Domenico, R. Fani, and L. Michaud, "Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea)," *FEMS microbiology ecology*, vol. 60, no. 3, pp. 383-396, 2007.
- [12] Z. Zhang, L. Gai, Z. Hou, C. Yang, C. Ma, Z. Wang, B. Sun, X. He, H. Tang, and P. Xu, "Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 21, pp. 8452-8456, 2010.
- [13] B. Liu, M. Ju, J. Liu, W. Wu, and X. Li, "Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 106, no. 1-2, pp. 301-307, 2016.
- [14] K. Das and A. K. Mukherjee, "Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India," *Bioresource Technology*, vol. 98, no. 7, pp. 1339-1345, 2007.
- [15] J. Zhang, W. Feng, and Q. Xue, "Biosurfactant production and oil degradation by *Bacillus siamensis* and its potential applications in enhanced heavy oil recovery," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 169, 2022, Art. no. 105388.
- [16] H. B. Ayed, N. Jemil, H. Maalej, A. Bayouhd, N. Hmidet, and M. Nasri, "Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 99, pp. 8-14, 2015.
- [17] D. Bhattacharya, P. M. Sarma, S. Krishnan, S. Mishra, and B. Lal, "Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 3, pp. 1435-1441, 2003.
- [18] X. Tian, X. Wang, S. Peng, Z. Wang, R. Zhou, and H. Tian, "Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater," *Water Science and Technology*, vol. 78, no. 12, pp. 2626-2638, 2018.

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ

Nhà A16 - Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: Phòng Phát hành: **024.22149040**;

Phòng Biên tập: **024.37917148**;

Phòng Quản lý Tổng hợp: **024.22149041**;

Fax: **024.37910147**; Email: **nxb@vap.ac.vn**; Website: **www.vap.ac.vn**

**BÁO CÁO KHOA HỌC
PROCEEDINGS**

HỘI NGHỊ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ SINH HỌC TOÀN QUỐC 2023

NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2023

Công nghệ Gen, Công nghệ Enzyme và Hóa sinh,

Công nghệ sinh học Y - Dược, Công nghệ sinh học Vi sinh môi trường,

Công nghệ sinh học Thực vật, Công nghệ sinh học Động vật

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chịu trách nhiệm xuất bản

Giám đốc, Tổng biên tập

PHẠM THỊ HIẾU

Biên tập:

Lê Phi Loan, Nguyễn Văn Vĩnh

Nguyễn Thị Chiên, Hà Thị Thu Trang

Trình bày kỹ thuật:

Đỗ Hồng Ngân

Trình bày bìa:

Đỗ Hồng Ngân

ISBN: 978-604-357-176-9

In 260 cuốn, khổ 19×27 cm, tại Công ty Cổ phần Khoa học & Công nghệ Hoàng Quốc Việt.

Địa chỉ: Số 11 ngách 1, ngõ 1 Võ Chí Công, P. Nghĩa Đô, Q. Cầu Giấy, TP. Hà Nội.

Số xác nhận đăng ký xuất bản: 3018-2023/CXBIPH/02-30/KHTNVN.

Số quyết định xuất bản: 40/QĐ-KHTNCN, cấp ngày 27 tháng 9 năm 2023.

In xong và nộp lưu chiểu quý III năm 2023.

111. PHÂN LẬP CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) TỪ ĐẤT VÙNG RỄ CÂY DÂU TÂY (*Fragaria vesca* L.) TRỒNG TẠI XÃ CỎ NÒI, HUYỆN MAI SƠN, TỈNH SƠN LA. **Vũ Thái Sơn, Phan Thị Hồng Thảo, Nguyễn Thị Hồng Liên, Trần Thị Hương, Đặng Thị Nhung, Lê Thị Trà, Nguyễn Văn Hiếu**..... 709
112. ĐẶC TÍNH CÁC LOÀI *Lactobacillus* TIỀM NĂNG PHÂN LẬP TỪ ĐƯỜNG TIÊU HÓA CỦA GÀ ĐỒNG TẢO. **Hoà Thị Minh Tú, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Kim Thoa, Phan Thị Tuyết Minh, Trần Thanh Thủy, Lại Thị Hồng Nhung** 715
113. TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MEN BIẾN SINH TỔNG HỢP CAROTENOID VÀ ACID BÉO CAO TỪ NƯỚC VÀ TRÂM TÍCH BIỂN KHU VỰC HUẾ - ĐÀ NẴNG CỦA VIỆT NAM. **Trần Thanh Thủy, Nguyễn Kim Thoa, Phan Thị Tuyết Minh, Hoà Thị Minh Tú, Nguyễn Thế Trang, Lại Thị Hồng Nhung** 722
114. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỘI SINH Ở CÂY CỎ SỮA LÁ LỚN (*Euphorbia hirta* L.) CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus*. **Lê Thanh Khang, Nguyễn Thị Thu Hương, Phùng Thị Hằng** 729
115. PHÂN TÍCH CẤU TRÚC QUẦN XÃ VI KHUẨN TRONG ĐẤT Ô NHIỄM DIOXIN TẠI SÂN BAY BIÊN HÒA SỬ DỤNG TRÌNH TỰ 16S-rRNA AMPLICON VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DIOXIN CỦA CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP. **Nguyễn Thị Tâm Thư, Phạm Kiên Cường, Nguyễn Văn Hoàng, Bùi Thị Khánh Ly, Vi Thị Kim Chi, Đào Thị Ngọc Ánh** 736
116. ANTIBACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF MARINE FUNGI ISOLATED FROM SEaweEDS IN NHA TRANG BAY. **Ngô Thị Duy Ngọc, Phan Thị Hoài Trinh, Ekaterina A. Yurchenko, Anton N. Yurchenko, Võ Thị Diệu Trang, Lê Thị Hoa, Dinh Thanh Trung, Lê Dinh Hưng, Huỳnh Hoàng Nhu Khanh, Phạm Đức Thịnh, Bùi Thị Nam Phương** 744
117. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐỐI VỚI KHẢ NĂNG SINH CELLULOSE CỦA VI KHUẨN *Komagataeibacter intermedius*. **Đỗ Thị Hoàng Tuyền, Dương Võ Gia Hân**..... 750
118. ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC VÀ ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP PETRIFILM-SALX PHÁT HIỆN *Salmonella* TRONG THỦY SẢN TẠI TIỀN GIANG. **Đoàn Thị Ngọc Thanh, Trần Thị Minh Tú** 755
119. ẢNH HƯỞNG CỦA TỪ TRƯỜNG TÍNH LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN *Lactobacillus acidophilus*. **Hà Thị Quyên, Chu Đức Hà, Trần Đăng Khoa** 761
120. SPENT BREWER'S YEAST HYDROLYSATE FOR BIOTECHNOLOGY USE OF MICROBIAL-INDUCED CARBONATE PRECIPITATION. **Nguyen Pham Huong Huyen, Nguyen Ngọc Tri Huynh, Nguyen Khanh Son**..... 768
121. CHARACTERIZATION OF CRUDE OIL-DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM OIL-CONTAMINATED SALINE SOILS IN CAM LAM, KHANH HOA. **Do Thi Tuyen, Nguyen Thi Kim Thanh, Nguyen Thi Hieu Thu, Nguyen Thi Thanh Loi, Phi Quyet Tien, Ngo Cao Cuong**..... 774
122. ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CHỦNG NẤM GÂY HẠI KÍNH *Aspergillus aculeatus* MADE1-2 VÀ HIỆU QUẢ CỦA CHẾ PHẨM KHÁNG NẤM A11. **Ngô Cao Cường, Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Phí Quyết Tiên**..... 780
123. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ ĐẾN KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN DSVK1 TRÊN NGUỒN CƠ CHẤT DẦU THÔ. **Kiều Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Yên, Nguyễn Thị Diễm Quỳnh, Lưu Ngọc Hưng, Trần Hương Ly, Nguyễn Văn Thọ, Nguyễn Thị Ngọc Quỳnh** 786
124. KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CÁC HYDROCARBON CÓ TRONG NƯỚC THẢI KHO XĂNG DẦU CỦA CHẾ PHẨM TỪ VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN THAN SINH HỌC CÓ NGUỒN GỐC TỪ TRÁU. **Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Phan Ngọc Minh, Nguyễn Trang Anh, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Trần Thị Mai, Lê Thị Nhi Công**..... 793
125. TUYỂN CHỌN VÀ PHÂN LOẠI CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH XYLANASE ỨNG DỤNG VÀO QUY TRÌNH BÓC VỎ GỖ KEO DẠNG TRỰC. **Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Thị**

CHARACTERIZATION OF CRUDE OIL-DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM OIL-CONTAMINATED SALINE SOILS IN CAM LAM, KHANH HOA

Do Thi Tuyen^{1, 3, #}, Nguyen Thi Kim Thanh^{1, 3, #}, Nguyen Thi Hieu Thu¹, Nguyen Thi Thanh Loi^{2, 3}, Phi Quyet Tien^{2, 3, *}, Ngo Cao Cuong^{1, *}

¹Department of Biotechnology, Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Oil-degrading indigenous bacteria have been widely applied in stimulating in situ bioremediation of oil-contaminated saline soil. The study aimed to evaluate the ability to degrade crude oil and diesel oil (DO) and identify three crude oil-degrading bacterial isolates CR2, CR3, and CR6 originated from oil-contaminated saline soil samples at Cam Lam, Khanh Hoa. The isolates were preliminarily identified based on 16S rDNA sequence analysis, morphological observation, and physiological and biochemical tests. All three bacterial isolates exhibited the ability to grow in the mineral salt medium supplemented with 15 % NaCl concentration and 5 % crude oil mixed in DO (5:95), revealing the capability to degrade oil of 51.7 % up to 74.9 % after 13-day treatment. The optimal growth conditions of all isolates were at 25-35 °C, pH 7, 15-20 % NaCl. All three bacteria could assimilate carbon sources such as glucose, lactose, saccharose, glycerol, especially crude oil and DO. By analysis of 16S rRNA gene sequences associated with morphological profiling, three isolates CR2, CR3 and CR6 were identified as *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. Physiological and biochemical characteristics showed that three bacterial strains were well adapted to decompose oil in saline soil in the coastal area of Cam Lam, Khanh Hoa province.

Keywords: Biodegradation, indigenous bacteria, oil-contaminated soil, oil-degrading bacteria, salt-affected soils.

INTRODUCTION

Transport activity of ships or accidental spillages can easily lead to the risk of oil pollution in the adjacent coastal sandy areas, including the Cam Ranh Bay area in the Cam Lam district of Khanh Hoa province. Soil salinity has significantly threatened soil degradation in oil-contaminated areas (Ha *et al.*, 2000). In a preliminary survey in June 2022, the NaCl salt content in the soil samples collected in Cam Ranh Bay fluctuated between 1.5-1.6 %, and pH 5.55-8.37. Oil concentrations in soil samples at a 0-120 cm depth ranged from 58.1-4052 mg/kg (beyond the threshold compared with QCVN 03:2023/BTNMT of 500 mg/kg). Many environmental stresses such as climatic conditions and coastal salinity increase the bioremediation difficulty of oil-contaminated soils. Furthermore, information on different bioremediation methods for oil-contaminated saline soils needs to be included. Thus, remediation of oil-contaminated soil in saline conditions, such as the coastal area of Cam Ranh Bay, is challenging for researchers. The stimulation of biological activities for oil pollution treatment and soil reclamation in saline areas is an environmentally friendly strategy of interest to researchers.

Recently, researchers focused on oil bioremediation and degradation have been carried out with bacteria isolated from oil-contaminated soils. So far, a large array of bacteria consisting of species *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*,... have already utilized petroleum hydrocarbons as the sole carbon and energy sources (Dindar *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2023). The essence of bioremediation approaches is biostimulation the growth of indigenous oil degraders or bioaugmentation of oil-degrading bacteria to supplement the existing microbial communities. Therefore, natural environmental and nutritional factors or competition with indigenous microorganisms influence the diversity and activity of soil bacteria as well as oil degradation rates in the soil. In particular, soil salinization greatly inhibits the biodegradation of petroleum hydrocarbons (Huang *et al.*, 2022). Several studies have reported the feasibility of treating petroleum pollution by the method of biodegradation of mangroves, demonstrating that under different ecological conditions, microorganisms can still degrade various oil components (Lang *et al.*, 2016; Awari *et al.*, 2018). Thus, the selection of microbial strains with high oil degradation ability to treat oil pollution in specific ecological regions such as coastal saline soils should be directed to the indigenous microbial community in this area.

The present study aimed to investigate the ability to degrade crude oil and DO of some indigenous bacterial strains capable of degrading oil at high salt concentration conditions. The results obtained from this study provide a preliminary evidence base for applications in oil-contaminated soil remediation at Cam Ranh Bay, Cam Lam, Khanh Hoa.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Seven bacteria isolated from oil-contaminated soil samples were collected from the 0 to 120 cm surface depth in Cam Ranh bay, Khanh Hoa province, Vietnam in June 2022. Three isolates were preserved in 20 % glycerol at -80 °C at the Department of Biotechnology, Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center.

Methods

Evaluation of the oil degradation ability of bacterial isolates

Mineral salts medium (MSM) containing (per liter of distilled water): KNO₃ 4 g; KH₂PO₄ 0.5 g; Na₂HPO₄ 1.4 g; MgSO₄ 0.8 g, NaCl 15g, and 5 % crude oil mixed in DO (at a ratio of 5:95) was used as a culture medium. Bacterial isolates were shaken on a rotary shaker at 180 rpm, 30 °C. The growth of bacteria was evaluated by measuring optical density periodically after 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13 days at 600 nm in a UV-visible spectrophotometer. Oil degradation was determined by the gravimetric method (Ha *et al.*, 2000; Van *et al.*, 2018).

Morphological observation of bacteria isolates

Colony shapes, sizes, and colors of bacteria were observed, described, and dimensioned directly on culture plates using a TSA medium (per liter of distilled water): peptone from casein 15 g; peptone from soymeal 5 g; NaCl 15 g; agar 20 g). Cell morphology of bacterial isolates was observed under Axio Image 2 electron microscope (Imager.Z2) after Gram staining at 1000x magnification (Tuyen *et al.*, 2022).

The physiological and biochemical characteristics of bacterial isolates

Survey on the growth and development ability of 3 bacterial isolates under the conditions of incubation temperatures of 10, 20, 30, 37 and 45 °C; autoclaved medium with initial pH of 3, 5, 6, 7, 9 using 1 M HCl or 1M NaOH; the salinity with NaCl, concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 ‰ (Tuyen *et al.*, 2022).

To evaluate the ability to assimilate carbon sources of bacteria, each of the carbon sources (glucose, lactose, saccharose, glycerol, diesel oil, crude oil, tween 80, soluble starch, and cellulose) was aseptically added to mineral salt medium MSM and the cultivation conditions were the same as above (Wang *et al.*, 2016; Goveas *et al.*, 2020).

Identification of bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequence

Bacterial total genomic DNA was extracted using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research, UK). 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal primer pairs 27F and 1492R. PCR products were purified, sequenced, and identified bacterial isolates as described (Van *et al.*, 2018). The Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed using MEGA X software based on 16S rRNA sequences (Kumar *et al.*, 2016).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. The mean and standard deviations of the three experiments were calculated using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Oil degradation ability of investigated bacterial isolates

According to our preliminary survey results in June 2022, oil concentrations in soil samples at a 0-120 cm depth collected in Cam Ranh bay ranged from 58.1-4052 mg/kg, the NaCl salt content fluctuated between 15-16 ‰, and pH 5.55-8.37 (Unpublished data). From oil-polluted soil samples collected, after 3-fold enrichment in liquid MSM medium containing 5 % crude oil mixed in diesel DO (w/v), 7 bacterial isolates were achieved. A total of 7 bacterial strains were evaluated for growth under conditions of concentrations of NaCl. In particular, three bacterial isolates CR2, CR3, and CR6 can tolerate high salinities of up to 35 ‰ were selected for further research.

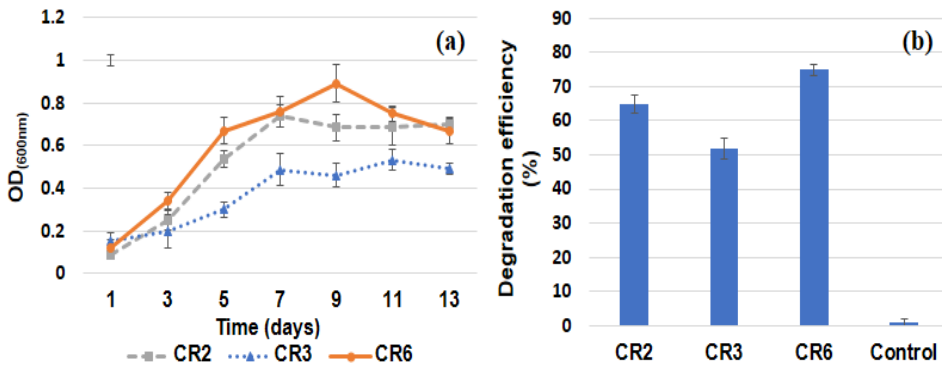


Figure 1. Growth ability (a) and yield of oil decomposition (b) of 3 isolates of CR2, CR3, and CR6 in the mineral salt medium supplemented with 15‰ NaCl concentration and 5 % crude oil mixed in DO (5:95) after 13 days of culture

The oil degrading capability of three isolates was evaluated by the growth ability and oil decomposition efficiency in the MSM medium. The results of Figure 1a showed that isolate CR6 had the best growth ability with the highest OD₆₀₀ value of 0.89 ± 0.08 after 9 days of culture. In contrast, CR3 grew the worst, reaching its maximum density after 11 days of testing (OD₆₀₀ = 0.53 ± 0.05). At the same time, the results of Figure 1b also showed that all three bacteria selected for the study could use oil but at different levels. Among them, CR6 exhibited the highest oil-degrading ability, with a degradation efficiency up to 74.9 ± 1.5 % of the oil after 13 days of testing, followed by CR2 and CR3, with the ability to degrade the oil at 64.9 % and 51.7 %, respectively. Thus, these bacterial isolates were able to grow in an environment with 1.5 % NaCl salt concentration and used hydrocarbon components in oil as the sole carbon source for growth and development activities. The ability to degrade the oil of bacterial strains under saline conditions has been announced. The survey of oil-degrading microorganisms in 97 surface seawater and sediment samples at 58 marine research stations in Vietnam has shown that the ability to use diesel oil of isolated bacterial strains is at different levels, ranging from 15.8 % to 94 % of diesel added to the medium after 7 days of culture (Ha *et al.*, 2000). Similarly, the bacterial strains from oil-contaminated soils of an oil field in Daqing, China degraded between 16.4 % and 91.6 % of total petroleum hydrocarbons (TPHs), and 11 strains degraded more than 70 % of TPHs in MBSM with 2 % diesel oil after 7 days of testing (Zhang *et al.*, 2010).

Morphological characteristics of bacterial isolates

Three bacterial isolates exhibited colony and cell morphology diversity after 24 h of culture at 30 °C onto TSA agar. In general, oil-degrading bacteria isolates were found to have Gram-positive or Gram-negative, rod-shaped cells, and usually petite sizes. The details of colony characteristics and cell morphology were shown in Table 1.

Table 1. Morphological characteristics of three isolates of CR2, CR3 and CR6 onto TSA agar plates

Isolates	Morphology of colony	Morphology of cell	Morphological characteristics
CR2			Colonies are milky white, with smooth surfaces, irregular edges, and colony diameter of 2-4 mm. Rod cells, Gram-positive, cell size 1×2 μm
CR3			Colonies are round, milky white, with even edges, flat or wrinkled, with colony diameter of 1-3 mm. Rod cells, Gram-positive, cell size 0.5×1 μm.
CR6			Colonies are round, and opalescent, with slightly glossy surfaces, irregular edges, and colony diameter of 1-3 mm. Rod cells, Gram-negative, cell size 0.5×2 μm.

Physiological, and biochemical characteristics of three bacterial isolates

Three bacteria grew optimally in the temperature range from 25-35 °C, pH 7, NaCl concentration of 15-20 ‰. This was in agreement with the fact that the oil-polluted soil of Cam Ranh Bay is normally with pH 5.55-8.37 and around 15 ‰ salinity. The isolated bacteria could assimilate carbon sources such as glucose, lactose, saccharose and glycerol, especially diesel and crude oil (Table 2). Particularly, CR2 could assimilate carbon sources such as starch, cellulose, and tween 80. The characteristics of three bacteria showed the potential for wide-range adaptation to natural factors of the environment affecting the growth and development of bacteria when applied in actual conditions.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of three bacteria isolated from oil-contaminated soil

Characteristics	Isolates		
	CR2	CR3	CR6
Growth temperature (°C)	20-45	15-45	15-40
Growth pH	4-9	4-9	4-9
Resistance to NaCl (‰)	0-35	0-35	5-35
Ability to assimilate carbon source:			
Glucose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Saccharose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Diesel oil (DO)	+	+	+
Crude oil	+	+	+
Tween 80	+	-	-
Starch	+	-	-
Cellulose	+	-	-

Note: (+) Positive; (-) Negative.

Identification of bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequences

Based on comparing 16S rRNA gene sequences of 3 bacterial isolates with sequences of homologous microbial strains on GenBank (NCBI), a phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method (Figure 2). The results showed that CR2 and CR3 were closely related to strains belonging to *B. cereus* (similarity 99,51 %) and *B. pumilus* (similarity 99,86 %), respectively. CR6 was 99,86 % similar to *P. aeruginosa* species. The 16S rRNA gene sequences of these isolates were submitted into NCBI databases under the following GenBank accession numbers: *B. cereus* CR2 (OQ940650), *B. pumilus* CR3 (OQ940651) và *P. aeruginosa* CR6 (OQ940654).

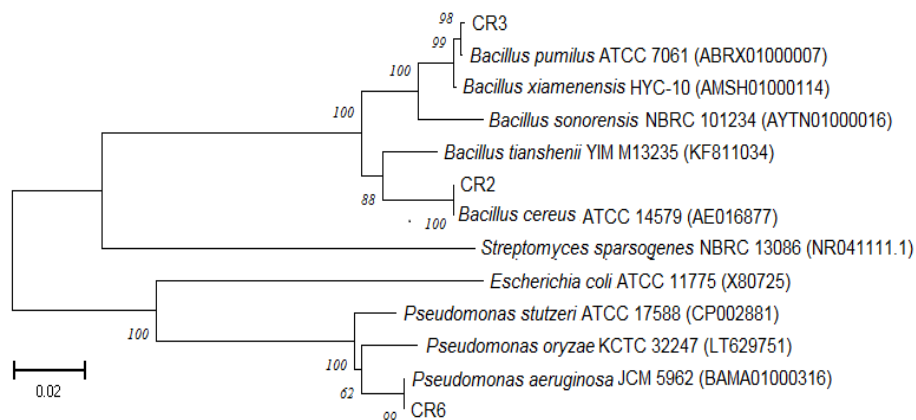


Figure 2. Phylogenetic tree of 3 bacterial isolates with closely related species

Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium has been announced worldwide and in Vietnam (Dao *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023). Also, in the oily sludge environment collected from the car repair area in Hanoi, a combination of 5 bacterial strains *P. mendocina* MD1, *P. hydrolytica* MD2, *Brucella intermedia* MD3, *P. stutzeri* MD4, *Stenotrophomonas nitritireducens* MD5 was isolated and used to produce microbial plates to treat petroleum-contaminated wastewater at some units in Hanoi (Tuyen *et al.*, 2022). Recently, Wu (2023) showed that the degradation efficiency of crude oil was enhanced from 32.61 % in the

individual culture medium to 63.05 % by co-culturing the combination of strains of *B. subtilis* SL and *P. aeruginosa* WJ-1 after 7 days of incubation (Wu *et al.*, 2023). This suggests that three strains could be a promising target for further research, such as field tests in Cam Lam, Khanh Hoa. However, prior to applying environmental pollution remediation, further experiments are required to determine the biosafety of these strains.

CONCLUSION

Three strains of bacteria were studied, with the ability to degrade oil from 51.7 % to 74.9 %, identified with scientific names *B. cereus* CR2 (OQ940650), *B. pumilus* CR3 (OQ940651) and *P. aeruginosa* (OQ940654). All three strains were able to grow in the temperature range of 20–40 °C, pH 4–9, NaCl concentration of 5–30 ‰ and assimilate carbon sources such as glucose, lactose, saccharose and glycerol, especially diesel and crude oil. According to the above results, three strains of CR2, CR3, and CR6 have enriched the number of bacterial strains belonging to the genus *Bacillus* and *Pseudomonas* capable of decomposing oil under saline conditions.

Acknowledgments: *The work was carried out with financial support and equipment from the Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center.*

REFERENCES

- Awari V, Ibiene A, Ariole C, & Ezebiuro V (2018). Broad-range pH/Temperature-stable cellulase from a novel hydrocarbon contaminated mangrove soil bacterium, *Bacillus licheniformis* VVA21. *Microbiol. Res. J. Int.*, **24**(2), 1-14.
- Dao TT, Phuong NTT, Trung NT, Thuan NH, Hanh DT & Canh NX (2021). Isolation and characterization of biofilm-forming bacteria for application potential in wastewater treatment. *VJAS* **3**: 389-398.
- Dindar E, Şağban FOT & Başkaya HS (2015). Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Int. biodeterior. biodegrad* **105**: 268-275.
- Goveas L C, Krishna A, Salian A, Menezes J, Alva M, Basavapattan B, & Sajankila S P (2020). Isolation and characterization of bacteria from refinery effluent for degradation of petroleum crude oil in seawater. *JPAM* **14**(1), 473-484.
- Ha DTC, Phuong NT, Huu NB, & Huy NQ (2000). The oil-degradative capacity of microorganisms isolated from sea of Vietnam, *Scientific report of the National Biology Conference: Basic Research Issues in Biology*, 58-61.
- Huang, X., He, J., Wei, H. F., Zhao, X. Y., Liu, Y., & Ji, Z. X. (2022). Influence of Suaeda heteroptera–microorganisms–Nereis succinea on soil enzyme activities in oil-contaminated soil. *Int J Environ Anal Chem* **102**(6), 1229-1244.
- Lang FS, Destain J, Delvigne F, Druart P, Ongena M, & Thonart P (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. *Water Air Soil Pollut* **227**: 1-15.
- Tuyen DT, Thanh NTK, Khoa NXB, Cuong NC (2022). Identification of hydrocarbon-degrading bacterial consortium isolated from the oil-contaminated muddy soil in Hanoi, Vietnam. *Povolzhskiy J. of Ecology* **2**: 206-215.
- Van DT, Cuong NC (2018). Isolation and identification of biological characteristics of microorganism strains that have the ability to degrade oil in oil-contaminated muddy soil samples at the 7th Military Region. *Vietnam J Sci Technol* **61**(6): 24-28
- Wu B, Xiu J, Yu L, Huang L, Yi L, & Ma Y (2023). Degradation of crude oil in a co-culture system of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol* **14**: 1132831.
- Wang X, Wang X, Liu M, Zhou L, Gu Z, & Zhao J (2016). Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients. *Desalination Water Treat* **57**(42), 19768-19775.
- Zhang Z, Gai L, Hou Z, Yang C, Ma C, Wang Z, .. & Xu P (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresour. Technol* **101**(21), 8452-8456.

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CÁC CHỦNG VI KHUẨN PHÂN HỦY DẦU PHÂN LẬP TỪ ĐẤT MẶN NHIỄM DẦU TẠI CAM LÂM, KHÁNH HÒA

Đỗ Thị Tuyền^{1, 3, #}, Nguyễn Thị Kim Thanh^{1, 3, #}, Nguyễn Thị Hiếu Thu¹, Nguyễn Thị Thanh Lợi^{2, 3},
Phí Quyết Tiến^{2, 3, *}, Ngô Cao Cường^{1*}

¹ Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

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

³ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Vi khuẩn bản địa phân hủy dầu cho thấy tiềm năng ứng dụng kích thích quá trình xử lý sinh học tại chỗ đối với đất mặn nhiễm dầu. Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng phân hủy hỗn hợp dầu thô và dầu diesel (DO) và định danh 3 chủng vi khuẩn phân hủy dầu thô CR2, CR3, CR6 có nguồn gốc từ các mẫu đất mặn nhiễm dầu tại Cam Lâm, Khánh Hòa. Các chủng được định danh dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA, quan sát hình thái và các thử nghiệm sinh lý, sinh hoá. Cả ba chủng vi khuẩn sinh trưởng tốt trên môi trường muối khoáng bổ sung NaCl 15 % và 5 % dầu thô pha trong DO, hiệu suất phân hủy dầu đạt từ 51,7 % đến 74,9 % sau 13 ngày nuôi cấy. Dựa trên kết quả phân tích các trình tự 16S rRNA, các chủng vi khuẩn phân hủy dầu được định danh là *Bacillus cereus* CR2, *Bacillus pumilus* CR3 và *Pseudomonas aeruginosa* CR6. Các chủng đều có khả năng sinh trưởng tối ưu ở điều kiện 25-35 °C, pH 7, nồng độ NaCl 15-20 ‰ và có khả năng đồng hóa các nguồn carbon glucose, lactose, saccharose, glycerol, đặc biệt là dầu thô và dầu diesel. Các kết quả khảo sát đặc điểm sinh lý, sinh hóa cho thấy 3 chủng vi khuẩn thích nghi tốt với điều kiện thực tế và có khả năng để xử lý ô nhiễm dầu trong đất ở môi trường mặn vùng ven biển Cam Lâm, tỉnh Khánh Hòa.

Từ khóa: Phân hủy sinh học, vi khuẩn bản địa, đất nhiễm dầu, vi khuẩn phân hủy dầu, đất nhiễm mặn.

* Author for correspondence: Tel: +84-0976860676; Email: ngocaocuong2011@gmail.com, qtien.ph@gmail.com

These authors contributed equally to this work as first authors.