

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Minh Hiền

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÍNH CHẤT
CỦA CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC
TỔNG HỢP BỞI VI KHUẨN NHẪM ỨNG DỤNG XỬ LÝ Ô NHIỄM
HYDROCACBON DẦU MỎ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Minh Hiền

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÍNH CHẤT
CỦA CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC
TỔNG HỢP BỞI VI KHUẨN NHẪM ỨNG DỤNG XỬ LÝ Ô NHIỄM
HYDROCACBON DẦU MỎ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa phân tích

Mã số: 8 44 01 18

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. KIỀU THỊ QUỲNH HOA

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này là công trình nghiên cứu dotôi thực hiện dưới sự hướng dẫn trực tiếp của TS. Kiều Thị Quỳnh Hoa và các cán bộ phòng Vi sinh vật dầu mỏ. Tất cả các số liệu và các kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào khác. Các tài liệu tham khảo, các số liệu thống kê phục vụ mục đích nghiên cứu trong đề án này được sử dụng đúng quy định và được trích dẫn đầy đủ trong phần tài liệu tham khảo.

Tác giả



Bùi Minh Hiền

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, em xin được gửi lời cảm ơn đến toàn thể các thầy cô giáo, ban lãnh đạo và các phòng ban của Học viện Khoa học và Công nghệ, những người đã dạy dỗ và truyền đạt những kiến thức quý báu và giúp đỡ em trong suốt thời gian em học tập và rèn luyện tại Học Viện.

Đặc biệt, em xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến TS. Kiều Thị Quỳnh Hoa đã tạo điều kiện cho em được thực tập và hoàn thành luận văn tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cô đã dành thời gian, tâm sức để trực tiếp hướng dẫn, dìu dắt, cho em nhiều ý kiến đóng góp, nhận xét quý báu, chỉnh sửa cho em từng chi tiết nhỏ để luận văn của em được hoàn thiện hơn về mặt nội dung và hình thức. Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ công tác tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong suốt quá trình thực tập và làm luận văn tại phòng.

Cuối cùng, em xin gửi lời cảm ơn đến bố mẹ, người thân trong gia đình, bạn bè, các anh/chị cùng lớp cao học khóa 2022A, những người luôn động viên, quan tâm giúp đỡ em trong quá trình học tập và thực hiện luận văn.

Hà Nội, ngày 25 tháng 11 năm 2024

Học viên



Bùi Minh Hiền

MỤC LỤC

Mở đầu	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ	3
1.1.1. Tình hình ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ trên thế giới	3
1.1.2. Tình hình ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ tại Việt Nam	4
1.2. Thành phần hóa học của dầu mỏ	6
1.3. Ảnh hưởng của ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ đến môi trường và con người	7
1.4. Các phương pháp xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm	9
1.4.1. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp vật lý/cơ học	9
1.4.2. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp hóa học	10
1.4.3. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp sinh học	11
1.5. Chất hoạt động bề mặt sinh học trong quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bằng vi sinh vật	11
1.5.1. Chất hoạt động bề mặt sinh học	11
1.5.2. Vai trò của chất hoạt động bề mặt trong quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ	12
1.5.3. Ứng dụng của chất hoạt động bề mặt sinh học trong đời sống	13
1.5.4. Phân loại chất hoạt động bề mặt sinh học	14
1.5.5. Tính chất của chất hoạt động bề mặt sinh học	16
1.5.6. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp CHĐBMSH từ VSV	17
1.5.7. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trong xử lý hydrocacbon dầu mỏ trên thế giới và ở Việt Nam	19
1.6. Phương pháp xác định thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học	20
1.6.1. Phương pháp sắc ký bản mỏng	20
1.6.2. Phương pháp sắc ký quang phổ hồng ngoại FT-IR	20

1.6.3. Phương pháp phổ cộng hưởng từ NMR	21
1.6.4. Phương pháp sắc ký lỏng	21
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.1. Vật liệu	23
2.1.1. Các mẫu nước nhiễm hydrocarbon dầu mỏ.....	23
2.1.2. Dầu thô.....	23
2.1.3. Môi trường nuôi cấy	23
2.1.4. Thiết bị sử dụng cho nghiên cứu	23
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	24
2.2.1. Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng hydrocarbon dầu mỏ như nguồn cacbon duy nhất.....	24
2.2.2. Phân loại chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng xác định hình thái khuẩn lạc và phân tích trình tự gen 16S rRNA	25
2.2.3. Đánh giá khả năng tổng hợp CHĐBMSH bằng chỉ số nhũ hóa E ₂₄	25
2.2.4. Xác định sức căng bề mặt của CHĐBMSH được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	25
2.2.5. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu	26
2.2.6. Lên men, tách chiết CHĐBMSH thô.....	27
2.2.7. Phương pháp tinh sạch CHĐBMSH thô tổng hợp bởi G303-KL2.....	27
2.2.8. Phân tích CHHBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng sắc ký bản mỏng (TLC)	27
2.2.9. Phân tích CHHBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng phổ hồng ngoại (FTIR).....	28
2.2.10. Phân tích chất hoạt động bề mặt sinh học được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng phương pháp HPLC/MS.....	28
2.2.11. Phân tích chất hoạt động bề mặt sinh học bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).....	28
2.2.12. Xác định hàm lượng dầu thô tổng số	28
2.2.13. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu.....	29
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất là dầu thô	30
3.2. Sức căng bề mặt của chất hoạt động bề mặt sinh học được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nghiên cứu	31
3.3. Khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất dầu thô của chủng vi khuẩn G303-KL2 theo thời gian	33
3.4. Ảnh hưởng của các yếu tố tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu	34
3.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2	34
3.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2	35
3.4.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2	37
3.4.4. Ảnh hưởng của giá trị pH đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2	38
3.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	40
3.4.6. Ảnh hưởng của hàm lượng muối (NaCl) đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	41
3.4.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	42
3.5. Lên men tổng hợp CHĐBMSH từ chủng G303-KL2 ở điều kiện phù hợp	43
3.6. Phân loại chủng vi khuẩn nghiên cứu dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc và trình tự gen 16S RNA	44
3.7. Khả năng phân huỷ dầu thô của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 và vai trò của chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn này	45
3.8. Phân tích thành phần hóa học của chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2	46
3.8.1. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 bằng sắc ký bản mỏng (TLC)	47

3.8.2. Tinh sạch chất hoạt động bề mặt sinh học thô của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2	49
3.8.3. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 bằng quang phổ hồng ngoại (FT-IR)	49
3.8.4. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 bằng HPLC/MS	50
3.8.5. Xác định hàm lượng Rhamnolipid có trong chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2	51
3.8.6. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 bằng cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$)	53
Tài liệu tham khảo	58

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Ý nghĩa
VSV	Vi sinh vật
CHĐBMSH	Chất hoạt động bề mặt sinh học
CMC	Nồng độ micelle tới hạn
HKTS	Hiệu khí tổng số
MSM	Môi trường khoáng tối thiểu
mN/m	Đơn vị đo sức căng bề mặt
DO	Dầu diesel
GC-MS	Phương pháp sắc ký khí khối phổ
E ₂₄	Chỉ số nhũ hóa sau 24 giờ ở 4°C
BTEX	BTEX là tên viết tắt của 5 loại hợp chất hữu cơ dễ bay hơi gồm: Benzen, Toluene, Ethylbenzene và Xylene
TLC	Sắc ký bản mỏng
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
FT-IR	Quang phổ hồng ngoại Fourier
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân
ITOPF	Hiệp hội của chủ tàu chở dầu trên thế giới
R _f	Tỷ lệ khoảng cách di chuyển của hợp chất so với khoảng cách di chuyển của dung môi
TPH	Hydrocarbon dầu mỏ tổng số

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Người dân tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu thu gom dầu vón cục.....	4
Hình 1.2. Sự cố tràn dầu tại khu vực bờ biển từ Bến phà Gót đến Bến cảng số 3, Cảng quốc tế Lạch Huyện [12].....	4
Hình 1.3. Mẫu dầu mỏ (dầu thô) ở dạng nguyên thể [22]	6
Hình 1.4. Các thành phần chính trong dầu mỏ	6
Hình 1.5. Dầu tràn bám vào rễ cây ở rừng ngập mặn Nhật Bản [30].....	8
Hình 1.6. Chim biển bị ảnh hưởng bởi sự cố tràn dầu [34].....	9
Hình 1.7. Dầu tràn được thu gom bằng phao quây dầu.....	10
Hình 1.8: Dầu tràn sau khi được xử lý với chất rắn hóa [37].....	10
Hình 1.9. CHĐBMSH trên bề mặt nước.....	12
Hình 1.10: Cấu trúc hóa học của các hợp chất hoạt động bề mặt VSV được nghiên cứu nhiều nhất. (a) Rhamnolipid; (b) Sophorolipid; (c) Surfactin và (d) Emulsan.	15
Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường thạch HKTS của 4 chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô.	30
Hình 3.2. CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng G303-KL2 theo thời gian.....	33
Hình 3.3. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 trên môi trường khoáng sử dụng dầu thô như nguồn cacbon duy nhất theo thời gian....	33
Hình 3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	35
Hình 3.5. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303- KL2 với hàm lượng dầu thô khác nhau sau 12 ngày	35
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	36
Hình 3.7. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với nguồn nitơ khác nhau sau 12 ngày	37
Hình 3.8. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	37
Hình 3.9. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303 với hàm lượng nitơ khác nhau sau 12 ngày.....	38

Hình 3.10. Ảnh hưởng của giá trị pH khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	39
Hình 3.11. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 ở các giá trị pH khác nhau sau 12 ngày	39
Hình 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	40
Hình 3.13. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với nhiệt độ khác nhau sau 12 ngày	40
Hình 3.14. Ảnh hưởng của hàm lượng NaCl đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	41
Hình 3.15. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với hàm lượng NaCl khác nhau sau 12 ngày	42
Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày	42
Hình 3.17. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với tỷ lệ giống khác nhau sau 12 ngày	43
Hình 3.18. Hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2 sau 12 ngày	45
Hình 3.19. Kết quả TLC sản phẩm CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2	48
Hình 3.20. Phổ FT-IR của CHĐBMSH tách ra từ chủng vi khuẩn G303-KL2.	50
Hình 3.21. Mô phỏng cấu trúc Rhamnolipid	50
Hình 3.22. Đường chuẩn của hợp chất Rhamnolipid	52
Hình 3.23. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2.....	54
Hình 3.24. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2	55

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các sự cố tràn dầu lớn theo thống kê của Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế (ITOPF)	3
Bảng 1.2. Thống kê các vụ tràn dầu lớn ở Việt Nam	5
Bảng 1.3. Ứng dụng của CHĐBMSH trong một số ngành công nghiệp.....	13
Bảng 1.4. Phân loại CHĐBMSH theo nguồn gốc VSV [66].....	15
Bảng 2.1. Môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu	23
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái, Gram và khả năng tổng hợp CHĐBMSH của 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	31
Bảng 3.2. Sức căng bề mặt của CHĐBMSH tổng hợp bởi 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu.....	32
Bảng 3.3. Kết quả xây dựng đường chuẩn của Rhamnolipid Rham-Rham-C ₁₀ -C ₁₀	52
Bảng 3.4. Hàm lượng Rhamnolipid Rham-Rham-C ₁₀ -C ₁₀ trong mẫu CHĐBMSH của chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2	53
Bảng 3.5. Các nhóm chức đặc trưng trong phổ ¹ H-NMR của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn <i>Acinetobacter</i> sp. G303-KL2.....	54

MỞ ĐẦU

Dầu mỏ là nguồn nhiên liệu quý góp phần quan trọng vào sự tăng trưởng kinh tế của nước ta. Từ khi được phát hiện đến nay, dầu mỏ đã được ứng dụng rộng rãi trong đời sống cũng như hoạt động sản xuất công nghiệp. Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích mà dầu mỏ đem lại, hiện tượng tràn dầu do va chạm tàu chở dầu và sự cố cháy nổ, rò rỉ giàn khoan là nguyên nhân chính khiến cho tình trạng ô nhiễm dầu ngày càng nghiêm trọng. Ô nhiễm dầu đã và đang là vấn đề mang tính toàn cầu, gây ảnh hưởng không nhỏ tới môi trường sinh thái và sức khỏe con người. Do đó, song song với việc khai thác sử dụng nguồn tài nguyên dầu mỏ một cách hợp lý thì việc xử lý môi trường ô nhiễm dầu nhằm duy trì một hệ sinh thái bền vững hiện là vấn đề cấp thiết không chỉ riêng đối với Việt Nam mà còn ở các quốc gia có trữ lượng dầu mỏ lớn trên thế giới.

Hiện nay, có nhiều phương pháp được ứng dụng nhằm khắc phục tình trạng ô nhiễm dầu như phương pháp vật lý/cơ học (chôn lấp, ...), hóa học (sử dụng chất phân tán, chất keo tụ, đóng rắn) và sinh học (phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bởi vi sinh vật). Mặc dù phương pháp vật lý/cơ học và hóa học mang lại những hiệu quả nhất định nhưng các phương pháp này có chi phí xử lý cao do sử dụng hóa chất, vật liệu đắt tiền đồng thời gây ra ô nhiễm thứ cấp cho môi trường. Do đó, việc ứng dụng các phương pháp sinh học, đặc biệt là phương pháp xử lý ô nhiễm dầu bằng vi sinh vật (VSV) phân hủy dầu có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) ngày càng thu hút được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước bởi những ưu điểm như giá thành phù hợp, xử lý triệt để, không gây ô nhiễm thứ cấp, an toàn và thân thiện với môi trường.

Chất hoạt động bề mặt sinh học có nguồn gốc từ VSV (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn), trong khi chất hoạt động bề mặt tổng hợp được tạo ra thông qua các phản ứng hóa học hữu cơ. Với đặc tính ưu việt như hoạt động bề mặt, tính nhũ hóa, ổn định, có thể chịu được môi trường khắc nghiệt, không độc hại và khả năng phân hủy sinh học, CHĐBMSH tổng hợp bởi VSV an toàn và thân thiện với môi trường. Bên cạnh việc tìm kiếm các chủng VSV nói chung và vi khuẩn nói riêng có khả năng tổng hợp CHĐBMSH thì việc xác định thành phần hóa học và tính chất của các CHĐBMSH có vai trò hết sức quan trọng.

Bởi trên cơ sở đó có thể dự đoán cơ chế tác động của các chất này, từ đó đưa ra giải pháp sử dụng chúng hiệu quả.

Mục tiêu của nghiên cứu này là (1) phân lập và lựa chọn chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH và làm giảm sức căng bề mặt trên nguồn cơ chất hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô); (2) Lên men, tách chiết CHĐBMSH từ chủng vi khuẩn lựa chọn; (3) Nghiên cứu phân tích thành phần hóa học và tính chất của CHĐBMSH tách chiết được; (4) Đánh giá khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ của chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH được lựa chọn.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Ô NHIỄM HYDROCACBON DẦU MỎ

1.1.1. Tình hình ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ trên thế giới

Các vụ tràn dầu gây ô nhiễm do cháy nổ, rò rỉ giàn khoan, các nhà máy lọc hóa dầu và chạm tàu chở dầu đang ngày càng trở nên phổ biến trên toàn cầu. Những sự cố lớn như thảm họa dầu trên biển Exxon Valdez (1989) [1] hay Deepwater Horizon (2010) [2] không chỉ gây tổn thất nặng nề về kinh tế mà còn ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe con người, động thực vật và môi trường biển. Năm 2018, sự cố va chạm nghiêm trọng của tàu chở dầu Sanchi của Iran ở gần cảng Thượng Hải đã làm tràn hơn 100 000 tấn dầu ra biển để lại phần xác tàu bốc cháy dữ dội trong khoảng thời gian một tuần. Theo báo cáo ghi lại, hệ quả của sự cố này gây ảnh hưởng trực tiếp đến đời sống của không ít cư dân trong khu vực nơi bị ô nhiễm dầu tràn, đặc biệt là một vài hòn đảo ở phía nam Nhật Bản [3]. Các sự cố tràn dầu lớn trên thế giới được liệt kê ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Các sự cố tràn dầu lớn theo thống kê của Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế (ITOPF)

STT	Tàu chở dầu	Năm	Địa điểm xảy ra tai nạn	Lượng dầu (tấn)	TLTK
1	Amoco Cadiz	1978	Ngoài khơi Bretagne, Pháp	223 000	[4]
2	Atlantic Empress	1979	Ngoài Tobago, Tây Ấn	287 000	[5]
3	Castillo De Bellver	1983	Ngoài khơi Vịnh Saldanha, Nam Phi	252 000	[6]
4	Exon Valdez	1989	Vịnh Alaska	38 000	[1]
5	ABT Summer	1991	700 hải lý ngoài khơi Angola	260 000	[7]

6	Nỗ giàn khoan khai thác dầu Deepwater Horizon	2010	Vịnh Mexico	500 000	[8]
7	Sanchi	2018	Ngoài khơi Thượng Hải, Trung Quốc	113 000	[9]
8	China	2018	Biển phía đông Trung Quốc	142 857	[10]
9	Mauritius	2020	Bờ biển phía đông nam của Mauritius	3 392	[11]

1.1.2. Tình hình ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ tại Việt Nam

Việt Nam là quốc gia có nền công nghiệp dầu khí phát triển. Việc khai thác, vận chuyển và lọc hóa dầu mỏ đặt ra những thách thức về an toàn môi trường. Năm 2012, theo thống kê của hãng dầu khí BP, Việt Nam là một trong những quốc gia có trữ lượng dầu mỏ đứng thứ 2 khu vực Đông Á. Với trữ lượng dầu mỏ lớn, ngành công nghiệp khai thác và chế biến dầu mỏ của nước ta đã đóng góp 18,3% tổng thu ngân sách quốc gia. Tuy nhiên, những hoạt động khai thác, lọc hóa dầu đã và đang tác động tiêu cực đến môi trường sinh thái. Hiện tượng tràn dầu do va chạm tàu chở dầu và sự cố cháy nổ, rò rỉ giàn khoan là nguyên nhân chính khiến cho tình trạng ô nhiễm dầu ngày càng nghiêm trọng.



Hình 1.1. Người dân tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu thu gom dầu vón cục



Hình 1.2. Sự cố tràn dầu tại khu vực bờ biển từ Bến phà Gót đến Bến cảng số 3, Cảng quốc tế Lạch Huyện [12]

Năm 2017, Theo thống kê của Cục Kiểm soát tài nguyên và Bảo vệ môi trường biển, hải đảo, khoảng 200 triệu tấn dầu được vận chuyển hàng năm qua các vùng biển ngoài khơi Việt Nam từ Trung Đông tới Nhật Bản và Triều Tiên

[13]. Các hoạt động thăm dò, khai thác và vận chuyển dầu gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người, động thực vật và hệ sinh thái biển. Dầu tràn trên biển theo sóng gió, thủy triều trôi dạt vào bờ gây ô nhiễm môi trường đất/cát/trầm tích, nước, nước ngầm, ảnh hưởng trực tiếp đến sinh vật biển, các ngành kinh tế biển như du lịch, thủy hải sản ở các địa phương chịu ảnh hưởng trực tiếp của tai nạn tràn dầu. Số liệu các vụ tràn dầu đã được Cục Môi trường thống kê được thể hiện ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Thống kê các vụ tràn dầu lớn ở Việt Nam

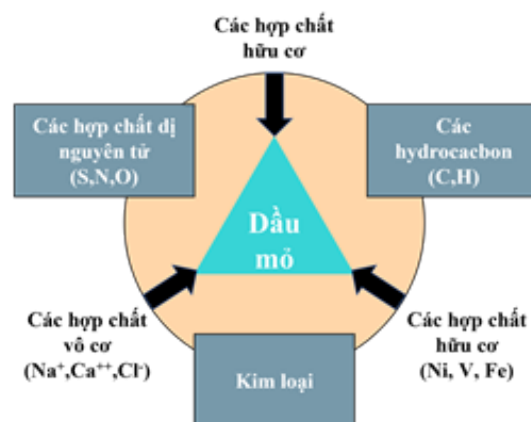
Sự cố tràn dầu	Thời gian	Địa điểm xảy ra sự cố	Lượng dầu tràn (tấn)	TLTK
Tàu vận tải Neptune Aries	10/1994	Cát Lái	1500	[14]
Tàu vận tải Formosa One và Petrolimex- 01	09/2001	Vịnh Gành Rái, Bà Rịa – Vũng Tàu	750	[15]
Tàu vận tải Hồng Anh	03/2003	Vũng Tàu	600	[16]
Tàu vận tải Hà Lộc 08	12/2007	Quảng Ngãi	173	[17]
Tàu vận tải Hoàng Sơn South	12/2010	Lý Sơn	180	[15]
Tàu vận tải Đức Cường 06	08/2017	Thanh Hóa	18	[18]
Tàu vận tải Nordana Sophie	11/2019	Hà Tĩnh	(Chưa xác định)	[19]
Tàu vận tải ĐNa 0607	01/2021	Đà Nẵng	4	[20]
Dầu tràn trôi dạt	02/2023	Bến phà Gót – Hải Phòng	(Chưa xác định)	[12]

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA DẦU MỎ

Dầu mỏ hay dầu thô là chất hữu cơ lỏng, đậm đặc, sánh, màu nâu hoặc ngả lục tồn tại trong các lớp đất đá trong vỏ Trái Đất. Dầu mỏ là một hỗn hợp rất phức tạp của hàng trăm cấu tử khác nhau. Mỗi một loại dầu mỏ được đặc trưng bởi các thành phần riêng, song về bản chất, chúng đều có các hydrocacbon là thành phần chính, chiếm 60 đến 90% trọng lượng trong dầu. Tất cả các loại hydrocacbon đều có mặt trong dầu mỏ, trừ olefin Theo tài liệu của Viện hóa dầu Liên bang Nga (1986), thành phần cơ bản của dầu mỏ gồm có: Hydrocacbon mạch thẳng (30-35%), hydrocacbon mạch vòng (25-75%) và hydrocacbon thơm (10-20%). Bên cạnh đó còn có những hợp chất phi hydrocacbon như các hợp chất chứa lưu huỳnh, oxy, nitơ, cơ kim, nhựa và asphanten. Các hợp chất chứa oxy (các axit, keton, rượu), các hợp chất chứa nitơ (furol, indol, carbazol), các hợp chất chứa lưu huỳnh, hợp chất cao phân tử (hắc ín, bitum) và các nguyên tố vi lượng. Các nguồn dầu mỏ khác nhau, tuy khác nhau về thành phần hóa học, nhưng thành phần nguyên tố lại gần giống nhau. Trong đó thành phần chính là cacbon chiếm 83-87% và hydro chiếm 11-14%. Ngoài ra còn có một số nguyên tố khác như oxy chiếm 0,05-1,0%, nitơ chiếm 0,001-1,8%, lưu huỳnh chiếm 0,1-7% và một số nguyên tố khác với hàm lượng rất nhỏ như halôgen, niken, vanadi, wolfram [21].



Hình 1.3. Mẫu dầu mỏ (dầu thô) ở dạng nguyên thể [22]



Hình 1.4. Các thành phần chính trong dầu mỏ

Tại các nhà máy lọc dầu, các công đoạn chính được thực hiện: (1) sử dụng quá trình chưng cất để phân tách dầu thô thành các phân đoạn khác nhau, như

khí, xăng, dầu diesel, và dầu nặng dựa trên sự khác biệt về nhiệt độ sôi; (2) chuyển đổi hóa học các hydrocacbon đã tách thành các sản phẩm mong muốn và (3) làm sạch các sản phẩm làm sạch để loại bỏ tạp chất và các hợp chất không mong muốn như sulfur, nitơ và kim loại nặng. Trong quá trình chưng cất phân đoạn, dầu thô được đun sôi dưới áp suất không khí và tăng dần nhiệt độ để thu được các sản phẩm khác nhau.

- Ở mức 40 - 70°C: thu được xăng ete (được sử dụng như là dung môi).
- Ở mức 60 - 100°C: thu được xăng nhẹ (nhiên liệu cho ô tô).
- Ở mức 100 - 150°C: thu được xăng nặng (nhiên liệu cho ô tô).
- Ở mức 120 - 150°C: thu được dầu hỏa nhẹ (nhiên liệu và dung môi)
- Ở mức 150 - 300°C: thu được dầu hỏa (nhiên liệu).
- Ở mức 250 - 350°C: thu được dầu diesel (nhiên liệu cho động cơ diesel hoặc làm dầu sưởi).
- Ở mức trên 300°C: thu được dầu bôi trơn (dùng để bôi trơn động cơ)
- Các sản phẩm khác như nhựa đường, sáp parafin...

1.3. ẢNH HƯỞNG CỦA Ô NHIỄM HYDROCACBON DẦU MỎ ĐẾN MÔI TRƯỜNG VÀ CON NGƯỜI

Sự cố tràn dầu thường xảy ra ở trên biển gây ra tổn hại to lớn cho người, động thực vật, hệ sinh thái và kinh tế-xã hội. Sự cố tràn dầu có thể xảy ra trong suốt quá trình thăm dò, khai thác và vận chuyển hydrocacbon dầu mỏ do quá trình khai thác, vận chuyển, lọc hóa dầu... [23]. Theo số liệu thống kê, nguyên nhân chính gây ra ô nhiễm dầu mỏ ở các đại dương trên thế giới (45%) là từ các vụ tai nạn tàu chở dầu [24].

Con người sống ở ven biển thường phải chịu các tác động tiêu cực do tiếp xúc trực tiếp, hoặc gián tiếp chịu tác động của ô nhiễm dầu thông qua chuỗi thức ăn do sử dụng nguồn nước, thức ăn từ thực vật, động thực vật biển nhiễm dầu. Hydrocacbon dầu mỏ là chất hữu cơ độc hại gây đột biến và ung thư đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe của con người và môi trường sống. Trong nhóm này, có thể kể đến benzen, toluene, ethylbenzen, styren, xylen, cumen và tetralene được gọi chung là các hợp chất BTEX. Các hợp chất hydrocacbon thơm BTEX có khả năng gây tổn hại đến hệ thần kinh trung ương, ức chế tủy xương và gây dị tật cơ xương [25]. Những hợp chất này có thể gây hại cho sức khỏe con

người thông qua việc tiêu thụ thực phẩm hoặc nước bị ô nhiễm, hít thở không khí chứa BTEX hoặc qua hấp thụ qua da [26]. Tiếp xúc lâu dài với BTEX có thể dẫn đến các hậu quả nghiêm trọng như tăng nguy cơ mắc bệnh bạch cầu gây tử vong, rối loạn chức năng hệ thần kinh trung ương (gây đau đầu, chóng mặt, mất thăng bằng và khó kiểm soát cơ), cũng như các tổn thương về máu, gan và thận do tích tụ độc chất từ BTEX trong cơ thể [27].

Các vùng đất ngập mặn được coi là một trong những môi trường biển dễ bị tổn thương nhất trước các vụ tràn dầu quy mô lớn. Đã có ít nhất 238 vụ tràn dầu lớn xảy ra ở gần các bờ biển có rừng ngập mặn trên toàn thế giới trong 60 năm qua. Những vụ tràn dầu này liên quan đến hơn 5,5 triệu tấn dầu được thải trực tiếp, ảnh hưởng tới khoảng 1,94 triệu ha môi trường sống rừng ngập mặn và đã giết chết ít nhất 126.000 ha hệ sinh thái rừng ngập mặn kể từ năm 1958 [28]. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng thực vật và động vật dễ bị chết ngạt do tiếp xúc với hydrocarbon dầu mỏ độc hại do dầu tràn ô nhiễm bám, hấp phụ vào bề mặt lông, da động vật hay bề mặt thân, lá, rễ của thực vật. [29].



Hình 1.5. Dầu tràn bám vào rễ cây ở rừng ngập mặn Nhật Bản [30]

Chim biển rất dễ bị tổn thương do khi tiếp xúc với dầu, khả năng bay và khả năng cách nhiệt của chúng sẽ bị hạn chế. Việc hấp thụ dầu qua chuỗi thức ăn ảnh hưởng tới đường hô hấp làm chim bị ngộ độc nghiêm trọng và dẫn tới tử vong cao [31]. Ô nhiễm dầu còn ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp tới kinh tế và xã hội. Ngoài việc mất đi lượng dầu không thu gom được, chi phí thu gom, xử lý, khắc phục sự cố tràn dầu là không nhỏ. Dưới ảnh hưởng của sóng gió thủy triều, dầu càng ngày càng lan rộng, chi phí thu hồi, xử lý càng tăng cao do mức độ ảnh hưởng đến nhiều khu vực khác nhau. Vì vậy, cần có các giải pháp ứng

phó khắc phục sự cố dầu tràn phù hợp và nhanh chóng [23]. Ví dụ, trong vụ tràn dầu Exxon Valdez năm 1989, Exxon đã bị dính vào một vụ kiện đắt đỏ với tổng số tiền lên tới 145 tỷ USD. Chi phí thu gom, xử lý mỗi thùng dầu thô tràn ra biển trong vụ tràn dầu này ước tính trung bình là 2730 USD [32]. Theo báo cáo thống kê, chi phí cho việc thu gom, xử lý sự cố tràn dầu ở bờ biển ước tính cao gấp 4-5 lần chi phí ở vùng biển khơi xa [33].



Hình 1.6. Chim biển bị ảnh hưởng bởi sự cố tràn dầu [34]

1.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ HYDROCABON DẦU MỎ Ô NHIỄM

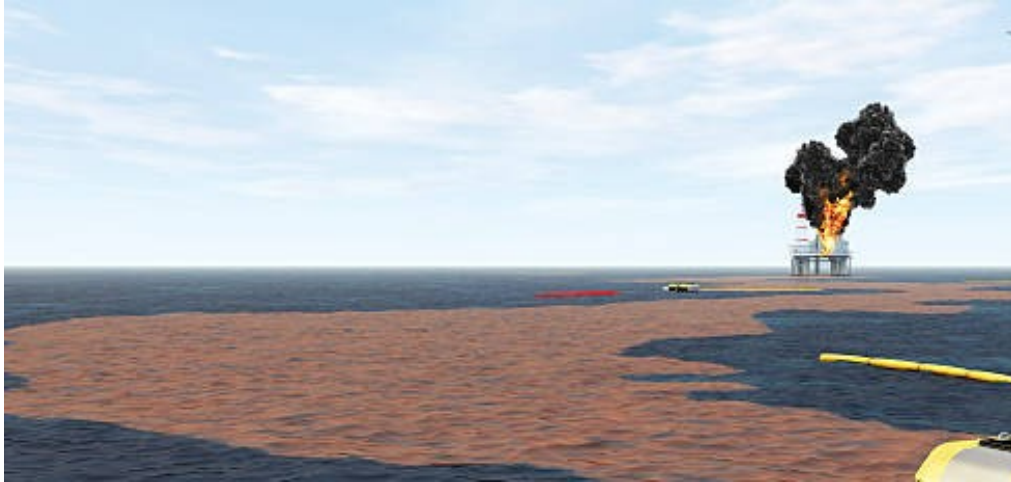
1.4.1. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp vật lý/cơ học

Dầu thường nhẹ hơn và dễ dàng lan rộng trên bề mặt nước. Để ngăn chặn sự lan rộng của dầu, trước khi sử dụng các phương pháp khác để khắc phục triệt để dầu tràn ô nhiễm, phao vây dầu và máy hút dầu thường được sử dụng. Phao vây dầu không chỉ ngăn chặn sự lan rộng của dầu tràn mà còn có thể làm chệch hướng dầu tràn loang rộng ra bờ biển hay những khu vực nhạy cảm, khó xử lý.

Sau khi được khoanh bằng phao, dầu tràn sẽ được thu gom, làm sạch bằng các thiết bị hút dầu kết hợp sử dụng chất hấp phụ hoặc có thể được xử lý bằng các kỹ thuật khác như VSV phân hủy dầu hoặc chất phân tán, đóng rắn.

Tuy nhiên, kỹ thuật dùng phao vây hay thiết bị hút dầu này còn nhiều hạn chế như phụ thuộc vào điều kiện thời tiết hay tính chất của các dòng chảy trên biển. Trong các điều kiện khắc nghiệt như gió lớn, sóng cao hay dòng chảy

manh khả năng kiểm soát dầu của phương pháp phao quây bị hạn chế. Đặc biệt, phương pháp này không đem lại hiệu quả khi dầu tràn loang rộng tạo thành lớp mỏng trên bề mặt nước [35, 36].



Hình 1.7. Dầu tràn được thu gom bằng phao quây dầu

1.4.2. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp hóa học

Các phương pháp hóa học sử dụng các loại hóa chất như chất phân tán (dispersant)/ chất hoạt động bề mặt hóa học và chất hóa rắn (solidifier) để kiểm soát sự cố tràn dầu. Các phương pháp này có thể xử lý dầu nhanh chóng trong mọi điều kiện thời tiết với hiệu quả cao trên nhiều loại dầu. Tuy nhiên, chất đóng rắn hay chất hoạt động bề mặt hóa học được làm từ hóa chất nên gây ảnh hưởng không nhỏ tới sức khỏe của người, động thực vật và môi trường biển, đặc biệt là ở các vùng ven biển nơi tập trung nhiều dân cư, nơi cứ ngụ của sinh vật biển hay ở những khu du lịch, nuôi trồng thủy hải sản.



Dầu tràn được rắn hóa

Hình 1.8: Dầu tràn sau khi được xử lý với chất rắn hóa [37]

1.4.3. Xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp sinh học

Bản chất của việc xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng phương pháp sinh học là sử dụng vi sinh vật (VSV) phân hủy hydrocacbon dầu mỏ. Để nâng cao hiệu quả xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm, các nghiên cứu tìm kiếm các VSV phân hủy hydrocacbon mỏ, sử dụng dầu mỏ như nguồn cơ chất để bổ sung vào khu vực ô nhiễm nhằm thúc đẩy nhanh quá trình phân hủy là cần thiết. Nhiều VSV có khả năng tổng hợp enzym phân hủy hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô, dầu DO,..) [38]. Các VSV này có khả năng phân hủy nhiều thành phần hydrocacbon trong dầu mỏ như hydrocacbon mạch ngắn, hydrocacbon mạch dài và nhiều hợp chất hydrocacbon thơm [39]. Do đó, xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm bằng VSV hiện đang thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới do ưu điểm là giá thành phù hợp, xử lý triệt để, không gây ô nhiễm thứ cấp, an toàn và thân thiện với môi trường.

1.5. CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN HỦY HYDROCACBON DẦU MỎ BẰNG VI SINH VẬT

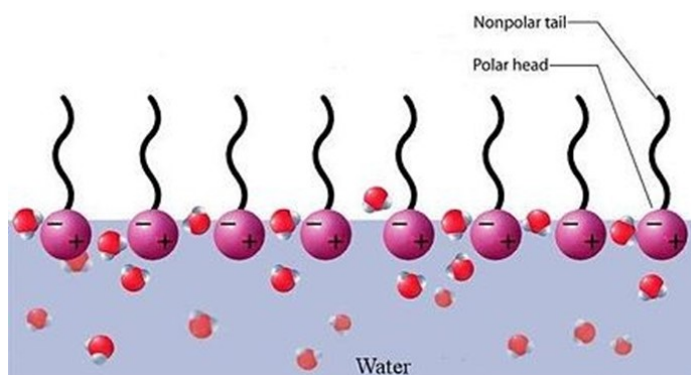
Việc phân hủy hydrocacbon dầu mỏ của VSV có thể xảy ra theo hai hướng: (1) Vi sinh vật hấp thụ hydrocacbon dầu mỏ bằng cách tương tác trực tiếp giữa tế bào và hydrocacbon dầu mỏ; (2) VSV tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) để đưa hydrocacbon dầu mỏ không tan về dạng nhũ tương giúp VSV dễ dàng tiếp xúc, sau đó sử dụng các enzyme tổng hợp để phân hủy. Do đó, CHĐBMSH đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bằng VSV [21].

1.5.1. Chất hoạt động bề mặt sinh học

*** Khái niệm**

Chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) là những hợp chất lưỡng cực có hoạt tính bề mặt do VSV tạo ra. Chúng có cấu tạo gồm hai phần: phần ưa nước và kỵ nước (Hình 1.9). Phần kỵ nước là các axit béo chuỗi dài hoặc dẫn xuất của axit béo; phần cực ưa nước có thể là mono-oligo-hoặc polysaccharide, peptide hoặc protein. Do cấu tạo lưỡng cực, CHĐBMSH có xu hướng tập trung tại bề mặt phân cách giữa dầu và nước, làm giảm sức căng bề mặt. Chất hoạt động bề mặt không chỉ có khả năng làm tăng diện tích bề mặt hydrocacbon dầu mỏ mà còn có khả năng làm thay đổi tính chất tế bào của VSV. Chính nhờ đặc

điểm này mà hydrocarbon dầu mỏ có thể tạo nhũ tương trong môi trường nước, từ đó làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa VSV và phân tử dầu, làm dầu dễ bị phân hủy [40, 41]. Chất hoạt động bề mặt sinh học có thể nằm bên trong tế bào (nội bào) hoặc được tiết ra bên ngoài tế bào (ngoại bào) [42].



Hình 1.9. CHĐBMSH trên bề mặt nước

1.5.2. Vai trò của chất hoạt động bề mặt trong quá trình phân hủy hydrocarbon dầu mỏ

Chất hoạt động bề mặt hoạt động như một chất tạo bọt, chất nhũ hóa và chất phân tán. Các chất này được ứng dụng để làm tăng tính khả dụng sinh học của hydrocarbon dầu mỏ nhằm nâng cao hiệu quả phân hủy dầu của VSV. Một số VSV có khả năng sử dụng hydrocarbon dầu mỏ như nguồn năng lượng và cacbon duy nhất. Các VSV này có thể phân hủy nhiều thành phần hydrocarbon trong dầu mỏ như hydrocarbon mạch ngắn, mạch dài và nhiều hợp phần hydrocarbon thơm. Tuy nhiên, do hydrocarbon dầu mỏ có độ hòa tan thấp (<1 ppm) nên cản trở VSV tiếp xúc với chúng trong quá trình phân hủy dẫn đến rất khó phân hủy. Vì vậy, chất hoạt động bề mặt (hóa học hay sinh học) có hoạt tính nhũ hóa, làm giảm sức căng bề mặt, giúp dầu phân tán, hòa tan vào pha nước, tăng diện tích tiếp xúc giữa VSV và phân tử dầu, tăng tính linh động cũng như tính khả dụng sinh học của chúng, giúp VSV dễ dàng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ và thúc đẩy tốc độ phân hủy sinh học của chúng. Vì vậy, CHĐBMSH đóng vai trò vô cùng quan trọng trong quá trình phân hủy dầu [43, 44].

Với những đặc tính như hoạt động bề mặt, nhũ tương hóa, tạo bọt, CHĐBMSH được tổng hợp từ VSV có thể tập trung lại, tác động tương hỗ lẫn nhau làm giảm sức căng bề mặt giữa pha dầu và nước, giúp VSV dễ dàng tiếp

xúc với các phân tử dầu để thực hiện quá trình phân hủy. Hơn nữa, CHĐBMSH ổn định trong các điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ, áp suất, độ mặn, pH.... do đó CHĐBMSH được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp (dầu khí, khai thác mỏ, thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm...)

1.5.3. Ứng dụng của chất hoạt động bề mặt sinh học trong đời sống

Chất hoạt động bề mặt sinh học tổng hợp từ VSV không chỉ được ứng dụng trong ngành công nghiệp dầu khí để tăng cường thu hồi dầu trong khai thác thứ cấp, hay thu hồi cặn dầu từ bể chứa hay trong xử lý làm sạch dầu tràn trong các vụ tràn dầu và xử lý đất và nước ô nhiễm dầu [45] mà còn được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm [46], y sinh học [47] và xử lý ô nhiễm môi trường như xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm [48]. Bảng 1.5 đề cập tới ứng dụng của CHĐBMSH trong các ngành công nghiệp khác nhau.

Bảng 1.3. Ứng dụng của CHĐBMSH trong một số ngành công nghiệp

Ngành	Ứng dụng	Vai trò của CHĐBMSH	TLTK
Môi trường	Phân hủy sinh học Xử lý sự cố tràn dầu	Nhũ hóa dầu/các hợp chất hữu cơ độc hại, giảm sức căng bề mặt, phân tán dầu, hòa tan dầu, làm ướt, tạo bọt, ức chế ăn mòn trong dầu nhiên liệu và thiết bị.	[49, 50]
Dầu khí	Tăng cường thu hồi dầu, Khử nhũ tương	Nhũ hóa dầu, giảm sức căng bề mặt, khử nhũ tương dầu, hòa tan dầu, giảm độ nhớt, phân tán dầu, làm ướt bề mặt rắn, lan rộng, tẩy rửa, tạo bọt, ức chế ăn mòn trong dầu nhiên liệu và thiết bị.	[50, 51]
Khai mỏ	Hoạt động làm sạch kim loại nặng Phục hồi đất Tuyển nổi	Làm ướt, thu gom và tạo bọt, loại bỏ các ion kim loại khỏi dung dịch nước, đất và trầm tích, cô kim loại nặng, phân tán, ức chế ăn mòn trong dầu.	[52]
Thực phẩm	Nhũ hóa và khử nhũ tương Thành phần chức năng	Hòa tan các loại dầu có hương vị, kiểm soát độ đặc, nhũ hóa, chất làm ướt, chất tẩy rửa, tạo bọt, chất làm đặc.	[53]

Dược phẩm	Vi sinh Dược phẩm và trị liệu	Chất chống dính, chất chống nấm, chất kháng khuẩn, chất chống vi rút, vắc xin, liệu pháp gen, phân tử điều hòa miễn dịch.	[54-56]
Mỹ phẩm	Sản phẩm sức khỏe và sắc đẹp	Nhũ hóa, chất tạo bọt, chất hòa tan, chất làm ướt, chất tẩy rửa, chất kháng khuẩn.	[57]
Công nghệ nano	Tổng hợp hạt nano	Quá trình nhũ hóa, ổn định.	[57, 58]

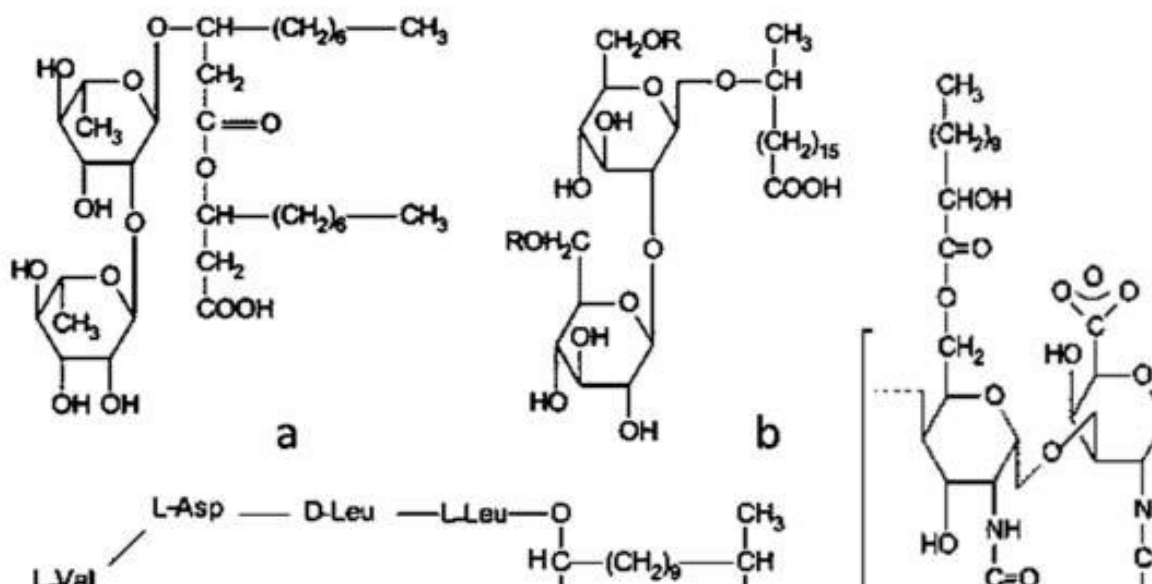
1.5.4. Phân loại chất hoạt động bề mặt sinh học

Chất hoạt động bề mặt sinh học là những hợp chất rất đa dạng về cấu trúc hóa học và hoạt tính bề mặt. Chúng có thể được phân loại dựa vào: (1) thành phần hóa học và (2) nguồn gốc của VSV tổng hợp CHĐBMSH.

Hợp chất hoạt động bề mặt tổng hợp từ VSV (microbial surface active compound) được phân loại dựa vào thành phần hóa học được chia thành hai nhóm: các CHĐBMSH có trọng lượng phân tử thấp và CHĐBMSH có trọng lượng phân tử cao. Nhóm có trọng lượng phân tử thấp là chất hoạt động bề mặt bao gồm hai nhóm Glycolipid (Rhamnolipids, Sophorolipids, Mannosylerythritol lipid, và trehalose lipids) và Lipopeptides (surfactin, fengycin). Nhóm có trọng lượng phân tử cao là các chất nhũ hóa tạo bọt gồm các nhóm Lipoproteins, Lypopolyscharides, Heteropolysacharides, Protein. CHĐBMSH là chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử thấp bao gồm các phân tử có cấu trúc đơn giản như Phospholipid, Glycolipid, Lipopeptid và Lipoprotein, mono-hoặc oligosaccharides, các rượu béo bão hòa, axit béo hoặc axit béo có chứa nhóm hydroxyl. Các CHĐBMSH trọng lượng phân tử cao như các chất nhũ hóa thực phẩm, lipopolysaccharides, biodispersan... [59, 60].

- **Glycolipids:** Glycolipids là CHĐBMSH là CHĐBMSH có trọng lượng phân tử thấp thường gồm nhóm carbohydrate kết hợp với axit béo chuỗi dài hoặc axit béo hydroxyl liên kết với este hoặc nhóm ether [61]. Ví dụ: Rhamnolipids được tổng hợp bởi vi khuẩn *Acinetobacter*, *Pseudomonas* hay Sophorolipids được tổng hợp từ các loài nấm men *Candida* [62].
- **Chất hoạt động bề mặt polymer:** Emulsan, lipomanan, alasan, liposan và các phức hợp protein polysaccharide khác là những chất hoạt động bề mặt

polyme được nghiên cứu tốt nhất (CHĐBMSH có trọng lượng phân tử cao). Emulsan là chất nhũ hóa cho hydrocacbon trong nước ở nồng độ thấp từ 0,001% đến 0,01% [63, 64]. Liposan là chất nhũ hóa hòa tan trong nước ngoài bào được tổng hợp bởi *C. lipolytica* và được tạo thành từ 83% carbohydrate và 17% protein, chất này có thể ứng dụng làm chất nhũ hóa trong ngành thực phẩm và mỹ phẩm [65].



Hình 1.10: Cấu trúc hóa học của các hợp chất hoạt động bề mặt VSV được nghiên cứu nhiều nhất. (a) Rhamnolipid; (b) Sophorolipid; (c) Surfactin và (d) Emulsan.

Ngoài cách phân loại nói trên, CHĐBMSH còn được phân loại dựa vào nguồn gốc VSV. Chất hoạt động bề mặt sinh học tổng hợp từ VSV được chia thành các nhóm nhỏ như trình bày ở Bảng 1.4.

Bảng 1.4. Phân loại CHĐBMSH theo nguồn gốc VSV [66].

CHĐBMSH	Vi sinh vật
Trehalose lipids	<i>Arthronbacter paraffineus</i>
	<i>Corynebacterium</i> sp
	<i>Mycobacterium</i> sp
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Norcardia</i> sp.
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

	<i>Acinetobacter, Rhodococcus</i>
Sophorolipids	<i>Candida apicola, Candida bombicola</i>
	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Candida bogoriensis</i>
Cellobiose lipids	<i>Ustilago maydis</i>
Polyol lipids	<i>Rhodotorula glutinus</i>
	<i>Rhodotorula graminus</i>
Diglycosyl diglycerides	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolysaccharides	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Pseudomonas sp</i>
Arthrofactin	<i>Arthrobacter sp, Corynebacterium sp</i>
Lichenysin A, B	<i>Bacillus licheniformis</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

1.5.5. Tính chất của chất hoạt động bề mặt sinh học

- **Hoạt tính bề mặt**

Ưu điểm của CHĐBMSH so với chất hoạt động bề mặt hóa học: Xét về hoạt động bề mặt và giao diện, CHĐBMSH được minh chứng có hiệu quả cao hơn chất hoạt động bề mặt hóa học. Hơn nữa, người ta nhận thấy rằng giá trị CMC của chúng thấp hơn đáng kể so với chất hoạt động bề mặt hóa học (10 đến 40 lần) [67]. Do những đặc tính này, sức căng bề mặt ở pha tiếp giáp giữa dầu và nước có thể giảm đáng kể khi sử dụng một lượng nhỏ CHĐBMSH. Theo Luna và cộng sự (2013) [68], CHĐBMSH được tạo ra bởi chủng nấm men *Candida sphaerica* UCP 0995 có khả năng giảm sức căng bề mặt của nước từ 72 xuống 35 mN/m.

- **Khả năng chịu nhiệt, pH và chịu lực ion**

Hầu hết các chất hoạt động bề mặt sinh học không bị thay đổi bởi điều kiện môi trường, chúng có thể được tổng hợp và duy trì ở môi trường có điều

kiện khắc nghiệt. Theo Jenaman và cộng sự [69] thì chủng *Bacillus licheniformis* JF-2 trong giếng khoan dầu khí ở Cater, Oklahoma có khả năng tổng hợp ở môi trường kỵ khí có nồng độ NaCl lên tới 10%. Chủng này không bị tác động bởi nhiệt độ trên 50°C và sống được trong môi trường pH dao động từ 4,6-9,9. Singh và cs báo cáo rằng CHĐBMSH được tổng hợp từ *Arthrobacter protophormiae* có khả năng chịu nhiệt độ cũng như độ pH tương ứng trong phạm vi 30°C – 100°C và pH từ 2–12 [70].

- ***Khả năng bị phân hủy sinh học và tính độc thấp***

Không giống các chất hoạt động bề mặt hóa học, hầu hết các CHĐBMSH không độc và có thể phân hủy trong tự nhiên. Do đó, CHĐBMSH đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng không những chỉ trong các ngành công nghiệp dầu khí và xử lý môi trường mà còn được ứng dụng trong các ngành công nghiệp đòi hỏi sản phẩm có độ an toàn cao như thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Bên cạnh đó, các nghiên cứu so sánh độc tính của chất hoạt động bề mặt hóa học và sinh học đã được thực hiện bởi Poremba et al. Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả này cho thấy CHĐBMSH rhamnolipid được tổng hợp từ vi khuẩn ít độc hơn 10 lần so với chất hoạt động bề mặt hóa học (Corexit) được sử dụng trong nghiên cứu [71].

- ***Đa dạng về cấu trúc hóa học***

Chất hoạt động bề mặt sinh học là nhóm đa cấu trúc, mỗi loài VSV khác nhau có thể tổng hợp các loại CHĐBMSH không giống nhau có bản chất và trọng lượng phân tử khác nhau. Với sự đa dạng này mà chúng có những đặc tính như tạo bọt, giữ ẩm, hòa tan, khả năng hoạt động bề mặt và khả năng nhũ hóa... được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp.

1.5.6. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp CHĐBMSH từ VSV

Sinh tổng hợp CHĐBMSH từ VSV phụ thuộc vào các điều kiện nuôi cấy và môi trường. Trong đó, phải kể đến các yếu tố như nguồn cacbon, nitơ, pH, nhiệt độ, NaCl, tỷ lệ giống, độ thoáng khí và tốc độ khuấy trộn,... Ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau là không giống nhau trong quá trình tổng hợp CHĐBMSH của VSV và thay đổi tùy theo loài.

*** Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ**

Các chất dinh dưỡng như cacbon và nitơ rất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của VSV nói chung và vi khuẩn phân hủy hydrocacbon dầu mỏ và tổng hợp CHĐBMSH nói riêng. Các chất dinh dưỡng này có vai trò quan trọng trong việc xây dựng cấu trúc tế bào VSV và tạo năng lượng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Tuy nhiên, mỗi VSV khác nhau lại sử dụng nguồn cacbon và nitơ không giống nhau. Sarrubo và cs đã chứng minh rằng, khi dầu hạt cải và glucose được sử dụng làm nguồn cacbon ở nồng độ 10% mỗi loại, hiệu suất sophorolipids thu được từ *C. lipolytica* tối đa là 8 g/L [72]. Hơn nữa, khi chất thải công nghiệp được sử dụng để tổng hợp CHĐBMSH bởi *C. lipolytica*, hiệu suất tạo phức hợp protein-lipid-carbohydrate là 4,5 g/L, đồng thời sức căng bề mặt của nước cất giảm từ 71 xuống 32 mN/m đã được thông báo bởi Rufino và cs [73]. Vấn đề chính trong quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ bằng VSV chính là sự mất cân bằng về thành phần dinh dưỡng do tỷ lệ C:N:P không phù hợp. Đặc biệt trong các vụ tràn dầu, nguồn cacbon chính là hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm gia tăng trong khi các thành phần dinh dưỡng khác như N, K, P lại rất thấp dẫn đến tỷ lệ C:N:P không phù hợp. Chính vì vậy, việc nghiên cứu bổ sung chất dinh dưỡng phù hợp là cần thiết trong quá trình phân hủy hydrocacbon dầu mỏ.

*** Ảnh hưởng của pH, hàm lượng NaCl, nhiệt độ, tỷ lệ tiếp giống**

Giá trị pH, nhiệt độ, hàm lượng NaCl và tỷ lệ tiếp giống cũng đóng vai trò quan trọng tới sinh trưởng và phát triển của VSV phân hủy hydrocacbon dầu mỏ có khả năng tổng hợp CHĐBMSH. Patel và cộng sự (2012) đã chỉ ra rằng tập hợp chủng vi khuẩn phân hủy naphthalene có khả năng phân hủy 100% naphthalene ô nhiễm trong môi trường pH từ 8-10 và khả năng phân hủy giảm xuống 88% trong môi trường pH 7 [74]. Minai-Tehrani và cộng sự (2009) báo cáo rằng khả năng phân hủy PAH tối ưu của VSV trong môi trường có hàm lượng NaCl là 30g/l và chúng khả năng sinh trưởng cũng như phân hủy dầu sinh học của chúng này cũng giảm mạnh khi hàm lượng NaCl tăng lên 50g/l [75]. Techtmann và cộng sự (2017) phát hiện ra rằng các tập hợp chủng VSV phân hủy hydrocacbon phân lập từ bề mặt nước biển phân hủy dầu thô nhanh hơn các

VSV ở sâu do sự chênh lệch nhiệt độ [76]. Tuy nhiên, ở nhiệt độ quá cao sẽ làm biến tính và vô hiệu hóa axit nucleic, protein và enzyme của VSV, từ đó ức chế sự phát triển của chúng [77].

1.5.7. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trong xử lý hydrocacbon dầu mỏ trên thế giới và ở Việt Nam

Một số tác giả đã minh chứng CHĐBMSH tổng hợp từ VSV có thể nâng cao hiệu quả xử lý hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm qua các công bố sau: Patel và cs (2015) đã chứng minh được CHĐBMSH Rhamnolipid được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng phân hủy hexadecane [9]. Nghiên cứu so sánh khả năng phân hủy hydrocacbon phenanthren giữa các chất hoạt động bề mặt hóa học khác nhau và CHĐBMSH tổng hợp từ vi khuẩn bởi Itrich và cộng sự (2015) đã chứng minh được khả năng phân hủy phenanthrene tăng lên khi bổ sung CHĐBMSH [78]. Chakrabarti (2012) đã minh chứng PAH đã được loại bỏ hoàn toàn trong vòng chưa đầy một tháng trong đất ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ bởi vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH Glycolipid và Sophorolipid [65].

Chủng vi khuẩn biển *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng tổng hợp CHĐBMSH được phân lập từ nước biển ô nhiễm dầu đã được chứng minh là có khả năng phân hủy hexadecane, octadecane, heptadecane cũng như nonadecane sau 28 ngày [79]. Tian và Yun (2016) đã nghiên cứu phân hủy đất bị ô nhiễm hydrocacbon bởi 02 loại vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH là *Acinetobacter haemolyticus* và *Pseudomonas* ML2. Kết quả sau 2 tháng xử lý, hàm lượng hydrocacbon đã giảm đáng kể là (39-71%) và (11-71%) lần lượt khi phân hủy bằng *Acinetobacter haemolyticus* và *Pseudomonas* ML2 [80].

Lại Thúy Hiền và cs (2013) đã phân lập được chủng vi khuẩn *Rhodococcus* có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu oliu với chỉ số nhũ hóa đạt 65% [81]. Kết quả của Nguyễn Thị Sánh và cộng sự đã cho thấy chủng *Shigella flexneri* BT1 sử dụng 40,6 % dầu DO sau 10 ngày.

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có nhiều công bố về khả năng tổng hợp CHĐBMSH của VSV nói chung và vi khuẩn nói riêng với nguồn cơ chất dễ phân hủy như glucose, saccharose, ri đường, dầu oliu... Tuy nhiên,

những nghiên cứu đánh giá VSV có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) vẫn còn hạn chế. Vì vậy, việc tìm kiếm chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu thô như nguồn cacbon duy nhất và tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất này rất có ý nghĩa về mặt khoa học cũng như ứng dụng trong phân huỷ dầu.

1.6. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC

1.6.1. Phương pháp sắc ký bản mỏng

Phương pháp sắc ký bản mỏng (Thin-Layer Chromatography - TLC) là một kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả để phân tích và xác định thành phần CHĐBMSH. Trong phương pháp này, mẫu được chấm lên bản mỏng và được đặt trong buồng sắc ký chứa dung môi. Khi dung môi di chuyển dọc theo bề mặt bản mỏng, các thành phần trong mẫu được phân tách dựa trên tương tác khác nhau giữa chất phân tích và pha tĩnh. Một nghiên cứu của Moro và cộng sự đã phân lập được một surfactin mới từ đất bị ô nhiễm dầu bằng cách sử dụng thử nghiệm định tính về độ rơi, thử nghiệm lan truyền dầu và nhũ tương hóa. Chất hoạt động bề mặt sinh học thu được cùng với các phân lập khác của *B. subtilis* được định tính toán bằng cách sử dụng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC) và kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu suất siêu cao kết hợp phổ khối phân giải cao (UHPLC-HRMS) [82].

1.6.2. Phương pháp sắc ký quang phổ hồng ngoại FT-IR

Phương pháp quang phổ hồng ngoại là một kỹ thuật phân tích mạnh mẽ trong việc xác định thành phần hóa học của CHĐBMSH. Quang phổ hồng ngoại đo sự hấp thụ ánh sáng ở các bước sóng hồng ngoại, cung cấp thông tin về các nhóm chức năng trong phân tử thông qua các dao động đặc trưng của liên kết hóa học. Đây là phương pháp không phá hủy, giúp nhận diện cấu trúc hóa học của các thành phần trong mẫu. Kỹ thuật này có thể giúp xác định các nhóm chức năng quan trọng như C-H, O-H, C=O và NH thường xuất hiện trong cấu trúc của CHĐBMSH như glycolipid, lipopeptide và các hợp chất có nguồn gốc từ vi sinh vật. Ví dụ, trong một nghiên cứu về đặc điểm sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng *Bacillus subtilis* để ứng dụng thu hồi dầu tăng

cường vi khuẩn [83], các dải IR đặc trưng của peptide đã được quan sát thấy ở 3305 cm^{-1} (điển hình cho dao động kéo dài N-H), 1643 cm^{-1} (liên kết CO-N); và ở 1543 cm^{-1} (dao động biến dạng của liên kết N-H với C-N) [84].

1.6.3. Phương pháp phổ cộng hưởng từ NMR

Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân là một kỹ thuật tiên tiến và chính xác để phân tích cấu trúc và thành phần của các CHĐBMSH. Trong quá trình đo NMR, các nguyên tử trong phân tử (đặc biệt là hydro và carbon) sẽ hấp thụ năng lượng khi được đặt trong từ trường mạnh, sau đó phát ra tín hiệu cộng hưởng có thể đo được. Các tín hiệu này cho thấy môi trường hóa học của từng nguyên tử, từ đó giúp xác định cấu trúc phân tử và vị trí của các nhóm chức năng trong chất hoạt động bề mặt.

Trong nghiên cứu của Sharma và cộng sự, phương pháp NMR đã được sử dụng để xác định thành phần của CHĐBMSH tổng hợp bởi vi khuẩn phân lập từ mẫu đất ô nhiễm dầu [85]. Trong một nghiên cứu khác của Pereira và cộng sự [86], phương pháp NMR cũng được sử dụng để xác định cấu trúc của CHĐBMSH tổng hợp bởi ba chủng *Bacillus subtilis* được phân lập từ dầu thô của Brazil.

1.6.4. Phương pháp sắc ký lỏng

Phương pháp sắc ký lỏng (LC) cho phép phân tách và định lượng chính xác các thành phần trong hỗn hợp dựa trên sự tương tác giữa các chất phân tích và pha tĩnh của cột sắc ký. Quá trình phân tích LC thường bao gồm bơm mẫu qua cột với áp lực cao, nhờ đó các hợp chất di chuyển với tốc độ khác nhau và được phát hiện thông qua đầu dò, thường là đầu dò UV-Vis hoặc khối phổ. Khi kết hợp với khối phổ (MS), HPLC giúp cung cấp thông tin về khối lượng phân tử và cấu trúc hóa học, từ đó hỗ trợ trong việc xác định các cấu trúc phức tạp và đặc trưng của các thành phần có hoạt tính sinh học trong CHĐBMSH.

Nghiên cứu của Kruijt và cộng sự đã thực hiện tinh chế và phân tích hóa học các chất hoạt động bề mặt sinh học được phát triển từ chủng *Pseudomonas putida* 267 bằng cách sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu suất cao pha đảo ngược (RP-HPLC) và kỹ thuật sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS) [87]. Tương tự như vậy, Janek và cộng sự đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất siêu cao kết hợp phổ khối (UPLC-MS) để xác định cấu trúc của các chất hoạt động bề mặt

sinh học mới được sản xuất từ chủng vi khuẩn Arctic *Pseudomonas putida* BD2 [88].

Trong một nghiên cứu gần đây, Yang và cộng sự mô tả việc sử dụng chất hoạt động bề mặt sinh học được sản xuất từ *B. subtilis* Y9 làm chất chuyển hóa diệt côn trùng. Tính chất của chất hoạt động bề mặt sinh học được xác định bằng cách thực hiện sắc ký cột và phân tích sắc ký lỏng hiệu suất cao (HPLC) [89].

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

2.1.1. Các mẫu nước nhiễm hydrocarbon dầu mỏ

Các mẫu nước nhiễm hydrocarbon dầu mỏ được lấy tại các giếng khai thác dầu thuộc mỏ Rồng, Vũng Tàu.

2.1.2. Dầu thô

Dầu thô được sử dụng trong nghiên cứu lấy từ mỏ Rồng, Vũng Tàu.

2.1.3. Môi trường nuôi cấy

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu là hóa chất tinh khiết của Merck (Đức), Sigma (Mỹ), Himedia (Ấn Độ) và Trung Quốc.

Bảng 2.1. Môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu

Môi trường hiếu khí tổng số (HKTS)		Môi trường khoáng (MSM)	
Hóa chất	Hàm lượng (g/L)	Hóa chất	Hàm lượng (g/L)
NH ₄ NO ₃	2	MgSO ₄	0,2
NaCl	20	CaCl ₂	0,02
KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1
Glucoso	1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,5
KCl	0,25	KNO ₃	1,5
MgCl ₂	1,2	FeCl ₃	0,05
Cao men	0,2	NaCl	20
Cao thịt	3		
Pepton	5		
pH = 7±0,2		pH = 7±0,2	

2.1.4. Thiết bị sử dụng cho nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ và Phòng thí nghiệm trọng điểm, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bảng 2.2. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Thiết bị	Xuất xứ
1	Cân phân tích	Sartorius - Đức
2	Nồi khử trùng áp suất cao	Đài Loan
3	Máy đo pH	Hanna - Ý
4	Bể ổn nhiệt	Memmert - Đức
5	Kính hiển vi quang học	Carl Zeiss - Nhật
6	Máy ly tâm	Microcentrifuge - Mỹ
7	Máy đo quang phổ	Đức
8	Máy vortex	IKA, Đức
9	Tủ cấy vô trùng	Việt Nam
10	Máy lắc ổn nhiệt	Đài Loan
11	Tủ lạnh 4°C	Việt Nam
12	Tủ lạnh (-30°C)	Đan Mạch

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng hydrocacbon dầu mỏ như nguồn carbon duy nhất

Mẫu nước nhiễm hydrocacbon dầu mỏ được làm giàu trong môi trường khoáng bổ sung 2% (w/v) dầu thô và nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C. Sau 2 tuần, 3 ml dịch làm giàu tiếp tục được cấy chuyển 2 lần trong môi trường khoáng (MSM) mới có bổ sung dầu thô. Sau 3 lần làm giàu, dịch nuôi cấy được pha loãng rồi gọt trên môi trường thạch hiệu khí tổng số (HKTS) [90].

Mẫu được pha loãng bằng dung dịch muối sinh lý vô trùng (0,85%) ở các nồng độ khác nhau. Để thu được được độ pha loãng 10^{-1} tiến hành hút 0,5 ml mẫu vào 4,5 ml nước muối sinh lý. Tiếp tục tiến hành pha loãng đến các mức 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ... tùy theo mật độ VSV trong mẫu. Gọt mẫu lên đĩa HKTS bằng que gọt thủy tinh. Gói bằng giấy vô trùng và nuôi các chủng vi khuẩn ở 30°C trong 48 giờ.

2.2.2. Phân loại chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng xác định hình thái khuẩn lạc và phân tích trình tự gen 16S rRNA

Môi trường thạch HKTS sau khi khử trùng 121°C trong 20 phút được đổ vào các đĩa petri trong tủ cấy vô trùng. Chủng vi khuẩn nghiên cứu sau đó được ria lên các đĩa thạch không bị nhiễm khuẩn sau 24 giờ. Các đĩa sau khi ria được gói bằng giấy vô trùng và nuôi cấy ở 30°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, tiến hành quan sát hình thái, màu sắc, đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn trên môi trường thạch HKTS. Sản phẩm PCR được phân tích trình tự theo phương pháp Sanger DNA sequencing by using Capillary Electrophoresis bởi công ty Apical Scientetic Sdn.Bhd, Malaysia.

2.2.3. Đánh giá khả năng tổng hợp CHĐBMSH bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄

Chỉ số nhũ hóa E₂₄ là giá trị đặc trưng cho khả năng nhũ hóa của CHĐBMSH được tạo ra bởi vi khuẩn với dung môi xylen sau 24 giờ ở 4°C. Hút chính xác 1 ml dịch nuôi cấy và 1 ml xylen vào ống nghiệm. Vortex hỗn hợp bằng máy vortex ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 2 phút. Tiến hành đo chiều cao của cột nhũ hóa và chiều cao tổng số của cột dung dịch [81].

Chỉ số nhũ hóa E₂₄ được tính theo công thức:

$$E_{24} = \frac{\text{Chiều cao cột nhũ hóa}}{\text{Chiều cao tổng số}} \times 100\%$$

2.2.4. Xác định sức căng bề mặt của CHĐBMSH được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nghiên cứu

Hút chính xác 1 thể tích mẫu đưa vào dụng cụ đo sức căng bề mặt (stalagmometer). Đếm số giọt chất lỏng của mẫu chảy qua đầu tiết diện của thiết bị stalagmometer ứng với lượng thể tích đã cho. Sử dụng nước cất làm mẫu đối chứng. Cân khối lượng mẫu thí nghiệm và đối chứng (nước cất) đã chảy qua thiết bị stalagmometer. Các phép đo được lặp lại 3 lần, sai số của phép đo giữa các lần không quá 5%. Sức căng bề mặt được tính toán kết quả theo công thức:

$$\gamma = \gamma_{\text{water}} \frac{m}{m_{\text{water}}} \quad (\text{N m}^{-1})$$

2.2.5. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu

- ***Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô***

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá với các hàm lượng dầu thô khác nhau (1, 2, 3, 4, 5 và 6% (w/v)). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- ***Ảnh hưởng của nguồn nitơ***

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá với các nguồn nitơ khác nhau: KNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, NH₄Cl và (NH₄)₂HPO₄. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- ***Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ***

Sau khi lựa chọn được nguồn nitơ phù hợp, chủng vi khuẩn nghiên cứu được nuôi cấy trong MSM có bổ sung nguồn nitơ lựa chọn với hàm lượng khác nhau (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và 0,6% (w/v)). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- ***Ảnh hưởng của giá trị pH***

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá với các giá trị pH khác nhau (4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- ***Ảnh hưởng của nhiệt độ (°C)***

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá ở các nhiệt độ khác nhau (4, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 và 55°C). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- ***Ảnh hưởng của hàm lượng muối (NaCl)***

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá ở các nồng độ muối khác nhau (0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6% (w/v)). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

- **Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống**

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn nghiên cứu được đánh giá với tỷ lệ tiếp giống khác nhau (1, 2, 3, 4, 5 và 6% (v/v)). Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH được đánh giá bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ [91].

2.2.6. Lên men, tách chiết CHĐBMSH thô

Chủng vi khuẩn nghiên cứu được lên men trên môi trường khoáng ở điều kiện phù hợp sau 12 ngày, CHĐBMSH được tách chiết từ dịch lên men theo phương pháp sau [92]:

Dịch lên men với mật độ tế bào 10⁹ CFU/ml được ly tâm để loại bỏ tế bào. Sau khi loại bỏ hết tế bào, dịch còn lại được chỉnh xuống pH 2,0 bằng HCl đặc rồi giữ ở 4°C trong 24 giờ đến khi CHĐBMSH kết tủa hoàn toàn. Sau đó, CHĐBMSH kết tủa được ly tâm thu hồi. CHĐBMSH thô tiếp tục được chiết bằng dung dịch ethyl acetate: dịch CHĐBMSH với tỷ lệ 1:1 (v/v). Lắc mạnh đảo đều dịch chiết trong 10 phút, thu dịch pha trên bằng phễu chiết. Lặp lại bước chiết 03 lần. Làm khô sản phẩm bằng thiết bị cô quay chân không thu được CHĐBMSH thô.

2.2.7. Phương pháp tinh sạch CHĐBMSH thô tổng hợp bởi G303-KL2

Hòa tan 5g CHĐBMSH thô thu được từ dịch lên men của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* G303-KL2 trong điều kiện phù hợp (Mục 2.2.6) trong 10 ml nước deion. Sau đó chiết bằng ether, tiếp theo bằng 20ml dichloromethane (CH₂Cl₂) để loại bỏ các tạp chất. Bổ sung 50 ml ethanol vào dung dịch nước còn lại. Làm bay hơi dung dịch ethanol-nước ở nhiệt độ 0-5°C trong bình chứa ether trong 24h. Loại bỏ lớp chất lỏng, thu chất rắn, hòa tan chất rắn thu được bằng 10ml dung dịch ethanol-nước 90%. Làm bay hơi dung dịch ethanol-nước ở nhiệt độ 0-5°C trong bình chứa ether trong 24 giờ. Lọc thu chất rắn, làm khô trong chân không, thu được CHĐBMSH tinh khiết từ CHĐBMSH thô ban đầu.

2.2.8. Phân tích CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng sắc ký bản mỏng (TLC)

Hỗn hợp chloroform:methanol:acetic acid (65:15:20 v/v/v) được sử dụng để phân tách CHĐBMSH được tổng hợp từ chủng vi khuẩn G303-KL2 trên bản TLC. Để nhận biết các điểm có gốc carbohydrate, sử dụng dung dịch hiện màu ethanol : H₂SO₄ đặc tỷ lệ 1:4 (v/v) phun lên bản sắc ký. Tiếp tục làm khô trên ngọn lửa cho đến khi bản sắc ký khô và hiện màu [93].

2.2.9. Phân tích CHHBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng phổ hồng ngoại (FTIR)

Phổ hồng ngoại (FT-IR) được phân tích bằng máy hồng ngoại biến đổi Fourier NEXUS 670 (Mỹ) với các điều kiện sau: độ phân giải 4cm^{-1} , mỗi mẫu được quét 32 lần trong dải bước sóng từ 4000 cm^{-1} đến 400 cm^{-1} , các mẫu được đo bằng phương pháp truyền qua mẫu ép viên KBr.

2.2.10. Phân tích chất hoạt động bề mặt sinh học được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nghiên cứu bằng phương pháp HPLC/MS

* **Hóa chất:** Acetonitril (Merck); Acid formic (Merck); Methanol (Merck); Acid axetic; PSA; Nước deion

* **Thiết bị phân tích:**

+ Hệ thống sắc ký lỏng Q Exactive Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo, USA)

+ Cột pha đảo RP C18 ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 3\text{ }\mu\text{m}$)

+ Chương trình gradien dung môi nước-acetonitrile (từ 30:70 đến 0:100)

+ Detector UV 265nm và 320 nm

+ Nhiệt độ cột: 30°C .

+ Thể tích tiêm mẫu tối ưu là $5\text{ }\mu\text{L}$ với dung môi acetonitrile/nước khử ion (1/1, v/v).

+ Tốc độ dòng 0.2 mL/phút .

+ Thông số khối phổ như sau: phương pháp ion hóa điện tử; ghi nhận ở chế độ AIF (all fragmentation ions); tốc độ khí hỗ trợ: 0.5; tốc độ phun sương (sheath gas): 20; tốc độ khí bay hơi dung môi: 5; nhiệt độ hóa hơi dung môi: 320°C ; nhiệt độ ống mao quản: 150°C ; điện thế ống mao quản: 3.0 kV; chất chuẩn có nồng độ 1 mg/L được sử dụng để tối ưu hóa điều kiện phân mảnh.

2.2.11. Phân tích chất hoạt động bề mặt sinh học bằng cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ được ghi lại trên máy quang phổ Bruker AVANCE III 500 MHz (Đức) và sử dụng dung môi DMSO làm dung môi.

2.2.12. Xác định hàm lượng dầu thô tổng số

Lọc mẫu nước chứa dầu. Dầu chiết sau khi lọc được thu hồi bằng dung môi dichloromethane. Phần dung môi chứa dầu chiết được cô quay ở 42°C bằng máy cô quay chân không (Buchi, Thụy Sĩ) cho đến khi trọng lượng không đổi.

Hàm lượng dầu thô tổng số còn lại trong bình cô quay được cần để xác định khối lượng [94].

2.2.13. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

Các số liệu phân tích được tính toán, xử lý, biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn (SD: Standard Deviation) trên đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

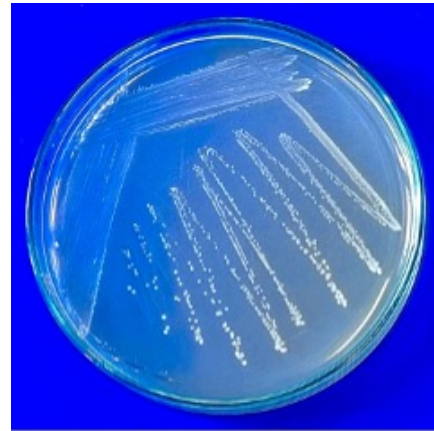
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC TRÊN NGUỒN CƠ CHẤT LÀ DẦU THÔ

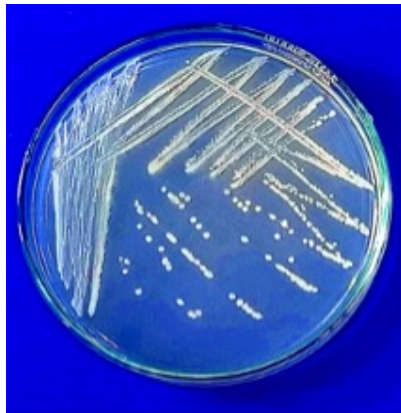
Từ 20 mẫu nước nhiễm dầu thu được tại các giếng khai thác dầu ở mỏ Rồng, Vũng Tàu, chúng tôi đã phân lập được 35 chủng vi khuẩn. Trong đó, đã tuyển chọn được 04 chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất là dầu thô. Cả 04 chủng đều là vi khuẩn đều là vi khuẩn Gram (-). Hình thái khuẩn lạc được thể hiện ở Hình 3.1 và Bảng 3.1.



A. Chủng G303-KL1



B. Chủng G303-KL2



C. Chủng C2-KL3



D. Chủng G312-KL2

Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường thạch HKTS của 4 chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái, Gram và khả năng tổng hợp CHĐBMSH của 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu

STT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Chỉ số E ₂₄ (%)	Gram
1	G303-KL1	Vàng nhạt, tròn, mép gọn, bề mặt hơi lồi, bóng ướt, d = 3 mm	21,2	-
2	G303-KL2	Trắng đục, li ti, tròn, mép gọn, bề mặt nhẵn, bóng, d ≈ 1 mm	55	-
3	C2-KL3	Trắng đục, tròn, mép gọn, bề mặt lồi, bóng ướt, d ≈ 2,5 mm	35,6	-
4	G312-KL2	Trắng đục, mép không gọn, có răng cưa, bề mặt dẹt, hơi bóng, có vòng đồng tâm, d ≈ 6 mm	33	-

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 04 chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên môi trường dinh dưỡng HKTS sau 48 giờ nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3.1. Kết quả cho thấy, chủng G303-KL2 có chỉ số nhũ hóa cao nhất trong 04 chủng với chỉ số nhũ hóa E₂₄ đạt 55%. Chỉ số nhũ hóa E₂₄ của 03 chủng còn lại thấp hơn chỉ đạt từ 21,2 đến 35,6%.

3.2. SỨC CĂNG BỀ MẶT CỦA CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC ĐƯỢC TỔNG HỢP BỞI CÁC CHỦNG VI KHUẨN NGHIÊN CỨU

Tiềm năng thực sự của CHĐBMSH tổng hợp từ VSV được xác định bởi khả năng làm giảm sức căng bề mặt của môi trường nuôi cấy. Kết quả đo sức căng bề mặt của 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu (G303-KL2; G312-KL2; C2-KL3; và G303-KL1) được thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Sức căng bề mặt của CHĐBMSH tổng hợp bởi 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu

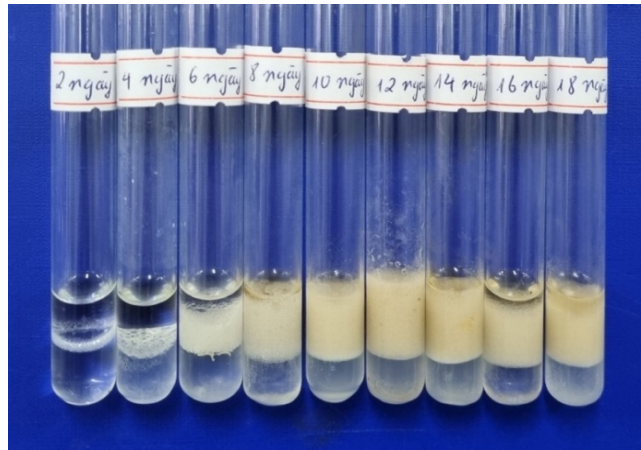
STT	Ký hiệu chủng	Chỉ số nhũ hóa E ₂₄ (%)	Sức căng bề mặt (mN/m); (29-30°C)
1	G303-KL1	21,2	67,78
2	G303-KL2	55	49,21
3	C2-KL3	35,6	59,12
4	G312-KL2	33	61,53
5	Nước cất	0	71
6	Môi trường MSM	0	69,88

Kết quả (Bảng 3.2) cho thấy, cả 04 chủng vi khuẩn đều có khả năng làm giảm sức căng bề mặt của môi trường nuôi cấy từ 69,88 mN/m tại thời điểm ban đầu (0h) xuống 49,21; 61,53; 59,12; 61,53, và 67,78 mN/m lần lượt với các chủng G303-KL2; G312-KL2; C2-KL3; và G303-KL1 sau 12-14 ngày. Trong đó, CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2 có sức căng bề mặt trong môi trường giảm mạnh nhất xuống chỉ còn 49,21 mN/m.

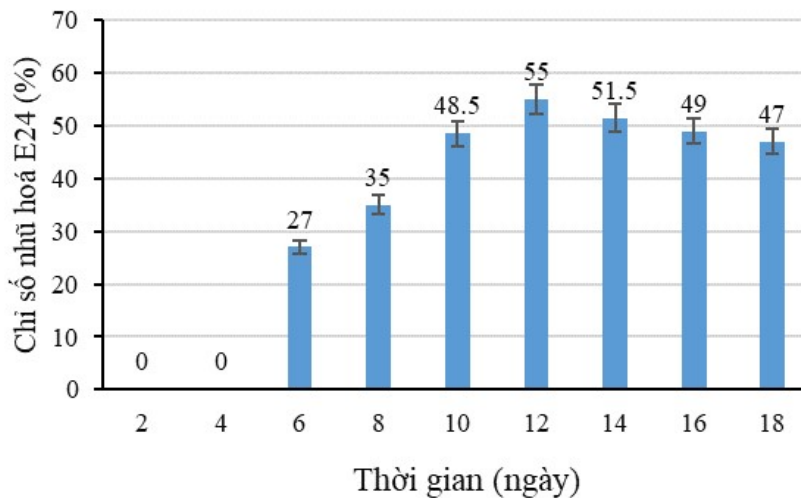
Từ kết quả xác định hình thái khuẩn lạc, Gram, chỉ số nhũ hóa E₂₄ và sức căng bề mặt (Bảng 3.1 và 3.2), nhận thấy chủng G303-KL2 có hình thái khuẩn lạc trên môi trường HKTS có màu trắng đục, li ti, tròn, mép gọn, bề mặt nhẵn, bóng, đường kính 1 mm (Hình 3.1-B). Đây là chủng vi khuẩn Gram (-). Sau 12 ngày nuôi cấy, dịch nuôi cấy có chỉ số nhũ hóa E₂₄ cao nhất (55%) và sức căng bề mặt giảm mạnh nhất (49,21 mN/m) trong số 04 chủng vi khuẩn nghiên cứu. Do đó, chủng vi khuẩn G303-KL2 được lựa chọn cho các nghiên cứu thí nghiệm tiếp theo.

3.3. KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC TRÊN NGUỒN CƠ CHẤT DẦU THÔ CỦA CHỦNG VI KHUẨN G303-KL2 THEO THỜI GIAN

Để đánh giá khả năng tổng hợp CHĐBMSH, chủng vi khuẩn G303-KL2 được nuôi lắc (180 vòng/phút) trong môi trường khoáng bổ sung 2% (w/v) dầu thô như nguồn cacbon duy nhất ở 30°C, pH = 7, 2% (w/v) NaCl tỷ lệ tiếp giống là 3% (v/v), 30°C. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 được đánh giá thông qua chỉ số nhũ hóa E₂₄ trong suốt 18 ngày nuôi cấy.



Hình 3.2. CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng G303-KL2 theo thời gian



Hình 3.3. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 trên môi trường khoáng sử dụng dầu thô như nguồn cacbon duy nhất theo thời gian

Kết quả (Hình 3.2 và 3.3) cho thấy, chủng G303-KL2 bắt đầu tổng hợp CHĐBMSH sau 6 ngày nuôi cấy với chỉ số E₂₄ là 27%. Khả năng tổng hợp

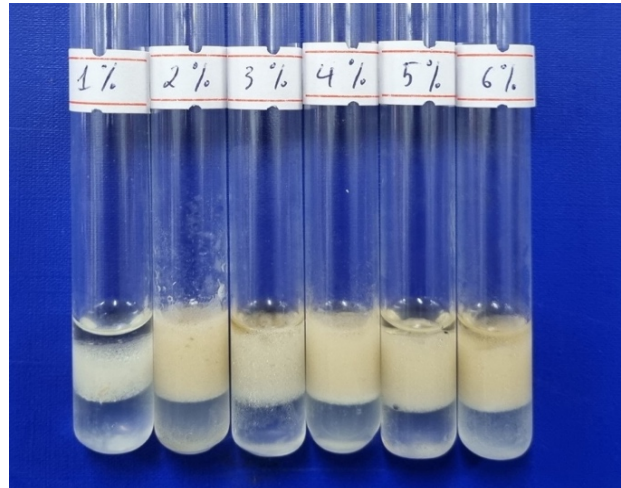
CHĐBMSH của chủng này liên tục tăng và đạt cao nhất ở ngày thứ 12 với E_{24} là 55%. Từ ngày 16, CHĐBMSH giảm dần, đến ngày 18 thì chỉ số E_{24} giảm còn 47%. Như vậy, chủng vi khuẩn G303-KL2 có khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cacbon duy nhất là dầu thô, đạt giá trị cao nhất với chỉ số nhũ hóa E_{24} là 55% sau 12 ngày nuôi cấy.

3.4. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ TỚI KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHĐBMSH CỦA CHỦNG VI KHUẨN NGHIÊN CỨU

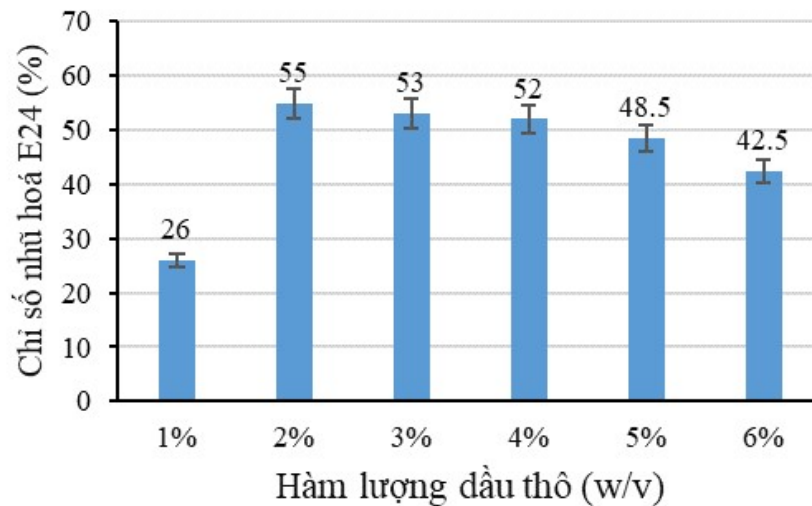
3.4.1. Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2

Hàm lượng cacbon đóng vai trò quan trọng không chỉ trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật mà còn trong quá trình tổng hợp CHĐBMSH. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm kiếm các chủng vi khuẩn vừa có khả năng sử dụng dầu thô như nguồn cacbon duy nhất, vừa có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất này nhằm mục đích nâng cao hiệu quả phân hủy hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) của VSV nghiên cứu. Vì vậy, sau khi lựa chọn được chủng G303-KL2 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô, chúng tôi tiếp tục tiến hành nghiên cứu khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với hàm lượng dầu thô khác nhau (1, 2, 3, 4, 5, và 6% (w/v)).

Kết quả (Hình 3.4 và 3.5) cho thấy, chủng G303-KL2 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH với dải hàm lượng dầu thô rộng từ 1% đến 6% (w/v) sau 12 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, ở hàm lượng dầu thô là 2% thì chủng này sinh tổng hợp CHĐBMSH cao nhất với chỉ số E_{24} đạt 55%. Chỉ số E_{24} giảm dần từ 53% xuống 42,5% khi hàm lượng dầu thô tăng từ 3% đến 6%. Do đó, hàm lượng dầu thô 2% (w/v) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày



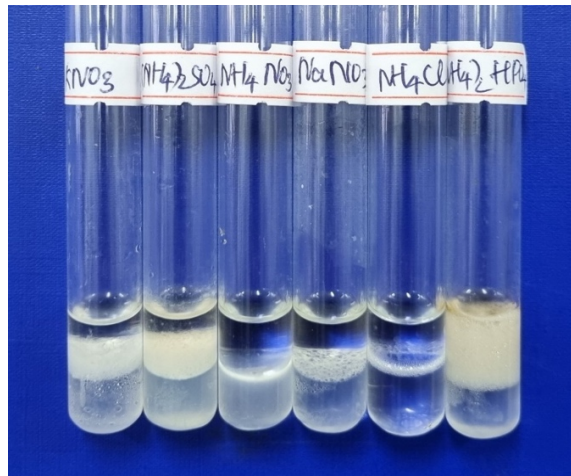
Hình 3.5. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303- KL2 với hàm lượng dầu thô khác nhau sau 12 ngày

3.4.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2

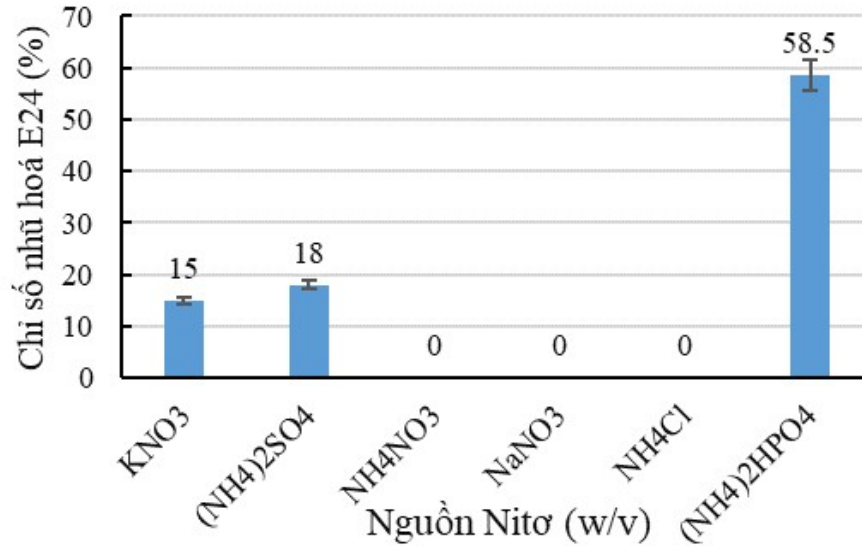
Nguồn nitơ cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của VSV nói chung và quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH nói riêng. Để tìm nguồn nitơ thích hợp nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp CHĐBMSH, chủng G303-KL2 được nuôi cấy trên môi trường khoáng bổ sung các nguồn nitơ khác nhau (0,3% (w/v) KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl và

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) với các điều kiện nuôi cấy (2% (w/v) dầu thô, 30°C , $\text{pH} = 7$, 2% (w/v) NaCl , tỷ lệ giống 3% (v/v)).

Kết quả (Hình 3.6 và 3.7) cho thấy, chủng G303-KL2 tổng hợp CHĐBMSH cao nhất với nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, chỉ số nhũ hóa E_{24} đạt 58,5%. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với hai nguồn nitơ KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là tương đối thấp với chỉ số nhũ hóa E_{24} lần lượt là 15% và 18%. Chủng G303-KL2 không tổng hợp được CHĐBMSH trong môi trường khoáng có bổ sung 3 nguồn nitơ là NH_4NO_3 , NaNO_3 và NH_4Cl . Do đó, nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



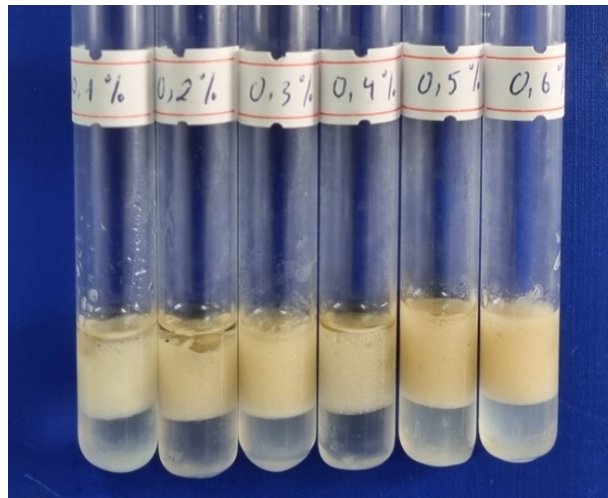
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày



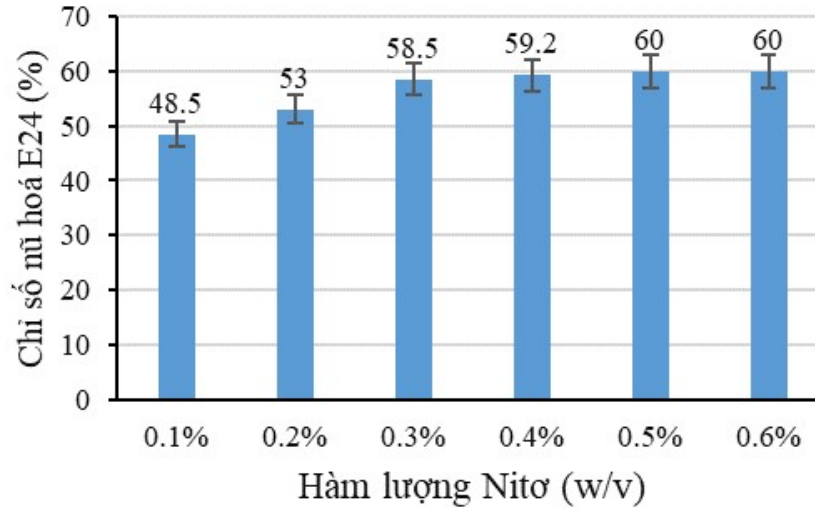
Hình 3.7. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với nguồn nitơ khác nhau sau 12 ngày

3.4.3. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2

Để xác định hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ phù hợp cho quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH, chủng G303-KL2 được nuôi lắc trên môi trường khoáng bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ với hàm lượng khác nhau (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6% (w/v)) với điều kiện nuôi cấy (2% (w/v) dầu thô, 30°C, pH = 7, 2% (w/v) NaCl, tỷ lệ giống 3% (v/v)).



Hình 3.8. Ảnh hưởng của hàm lượng nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày

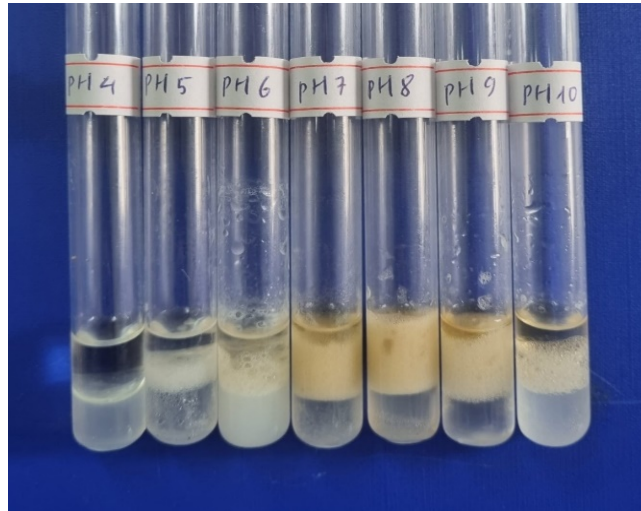


Hình 3.9. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303 với hàm lượng nitơ khác nhau sau 12 ngày

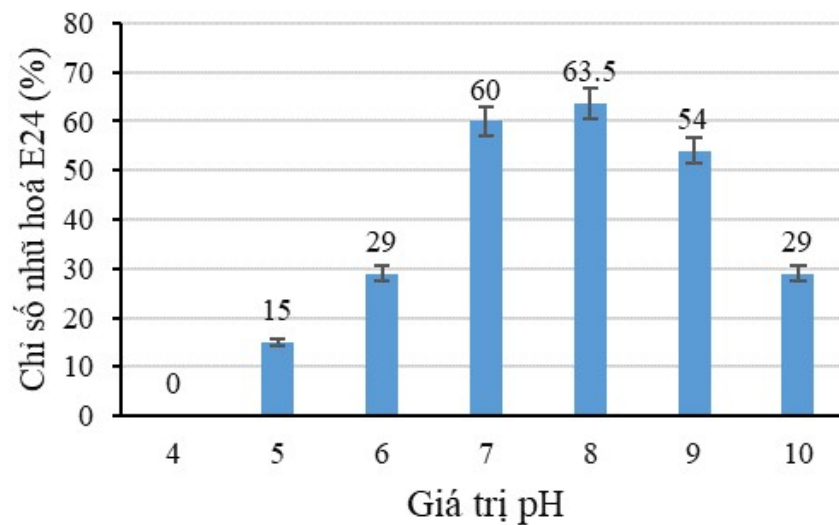
Kết quả (Hình 3.8 và 3.9) cho thấy, chủng G303-KL2 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH với dải hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ rộng từ 0,1% đến 0,6% với chỉ số E_{24} từ 48,5 đến 60%. Khả năng tạo CHĐBMSH tăng dần từ 48,5% đến 60% với nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ tăng dần từ 0,1% đến 0,4% (w/v), và đạt cao nhất ở hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,5% và 0,6% với chỉ số nhũ hóa E_{24} đạt 60%. Do đó, hàm lượng 0,5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4.4. Ảnh hưởng của giá trị pH đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2

Để nghiên cứu ảnh hưởng của giá trị pH đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2, tiến hành thí nghiệm với các giá trị pH khác nhau (4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10) trong 12 ngày nuôi cấy trên môi trường khoáng có bổ sung 2% (w/v) dầu thô, NaCl 2% (w/v), 30°C và 0,5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, tỷ lệ phần trăm giống là 3% (v/v).



Hình 3.10. Ảnh hưởng của giá trị pH khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày

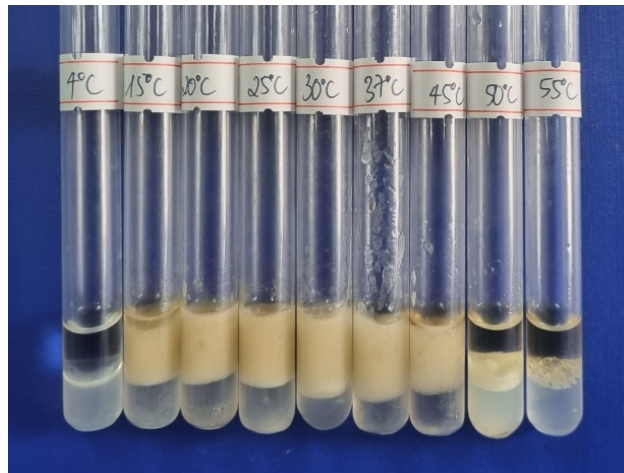


Hình 3.11. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 ở các giá trị pH khác nhau sau 12 ngày

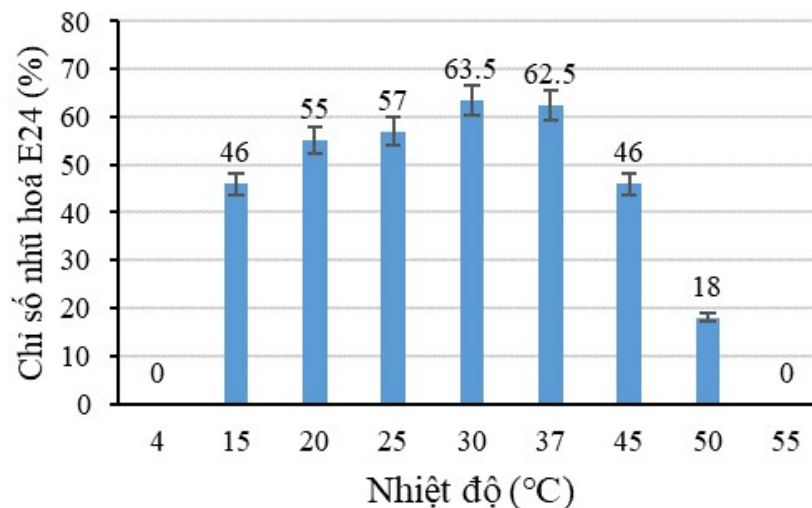
Kết quả (Hình 3.10 và 3.11) cho thấy, chủng G303-KL2 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH tốt và ổn định với dải pH từ 7 đến 9, với chỉ số nhũ hóa E₂₄ từ 54 đến 63,5%. Ở giá trị pH = 8, chỉ số nhũ hóa E₂₄ là cao nhất đạt 63,5%. Ở giá trị pH = 5, chủng G303-KL2 tổng hợp CHĐBMSH tương đối thấp chỉ đạt 15%, ở giá trị pH = 6 và pH = 10, CHĐBMSH đạt bằng nhau với chỉ số nhũ hóa E₂₄ là 29%. Từ kết quả trên, giá trị pH = 8 được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp CHĐBMSH của VSV. Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2, chủng G303-KL2 được tiến hành nuôi cấy trên môi trường khoáng với các nhiệt độ khác nhau: 4, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 và 55°C và ở các điều kiện nuôi cấy đã lựa chọn ((2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaCl 2% (w/v), pH = 8, tỷ lệ giống 3% (v/v)).



Hình 3.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày



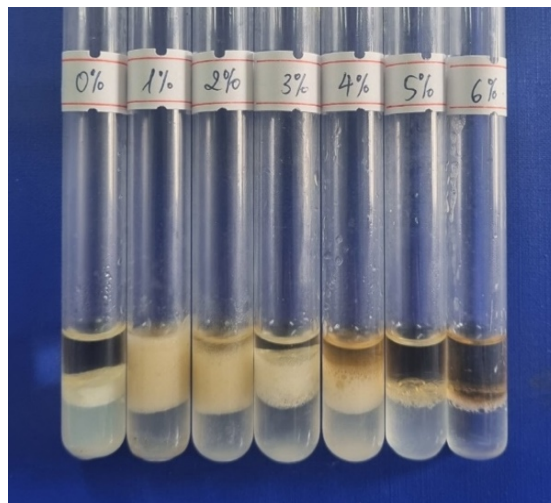
Hình 3.13. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với nhiệt độ khác nhau sau 12 ngày

Kết quả (Hình 3.12 và 3.13) cho thấy, chủng G303-KL2 có khả năng tạo CHĐBMSH cao ở cả hai nhiệt độ 30°C và 37°C, với chỉ số nhũ hóa E₂₄ lần lượt là 63,5% và 62,5% sau 12 ngày nuôi cấy. Chủng G303-KL2 tạo CHĐBMSH yếu ở 50°C (với E₂₄ là 18%), và trung bình ở các nhiệt độ 15, 20, 25 và 40°C với chỉ số nhũ hóa E₂₄ lần lượt là 46, 55, 57 và 46%. Chủng này không tổng hợp được CHĐBMSH ở 4°C và 55°C. Do đó, 30°C được lựa chọn là nhiệt độ thích hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.

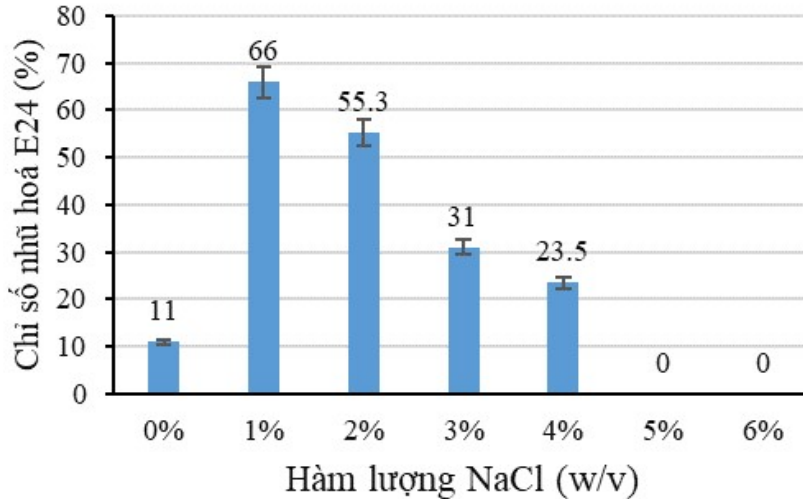
3.4.6. Ảnh hưởng của hàm lượng muối (NaCl) đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày

Để xác định ảnh hưởng của hàm lượng NaCl tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2, tiến hành nuôi cấy chủng trên môi trường khoáng bổ sung các nồng độ NaCl khác nhau (0, 1, 2, 3, 4, 5% và 6% (w/v) với các điều kiện nuôi cấy lựa chọn (2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) (NH₄)₂HPO₄, pH = 8, nhiệt độ 30°C, tỷ lệ giống 3% (v/v)).

Kết quả (Hình 3.14 và 3.15) cho thấy, chủng G303-KL2 sinh tổng hợp CHĐBMSH cao với hàm lượng NaCl là 1 và 2% (w/v), với chỉ số E₂₄ lần lượt là 66% và 55,3%. Với hàm lượng NaCl 3 và 4%, chủng này tổng hợp CHĐBMSH lần lượt là 31% và 23,5%. Chủng G303-KL2 không tổng hợp CHĐBMSH ở hàm lượng NaCl 5 và 6%. Do đó, hàm lượng NaCl phù hợp cho chủng G303-KL2 tạo CHĐBMSH là 1% (w/v) được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



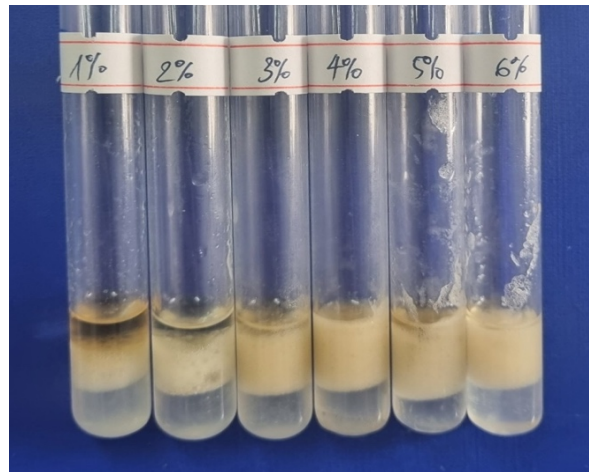
Hình 3.14. Ảnh hưởng của hàm lượng NaCl đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày



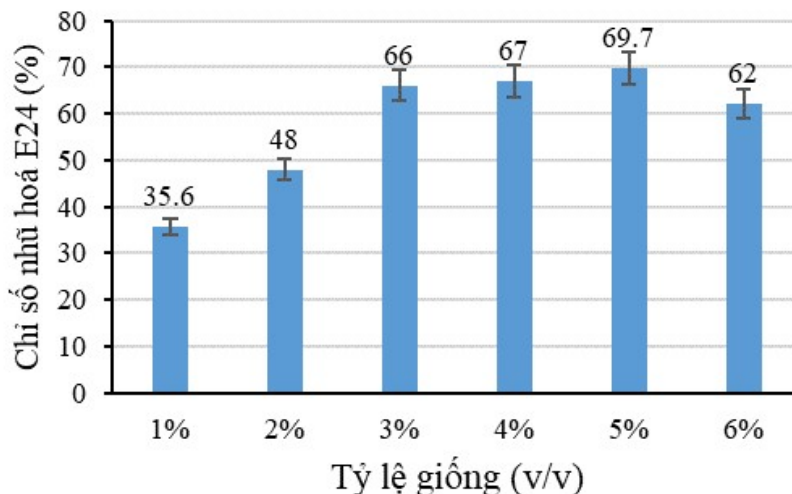
Hình 3.15. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với hàm lượng NaCl khác nhau sau 12 ngày

3.4.7. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày

Để xác định ảnh hưởng của tỷ lệ giống ban đầu tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH, chủng G303-KL2 được nuôi lắc trong môi trường khoáng bổ sung tỷ lệ giống khác nhau (1, 2, 3, 4, 5 và 6% (v/v)) với các điều kiện nuôi cấy lựa chọn (2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH = 8, 30°C và NaCl 1% (w/v)).



Hình 3.16. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 sau 12 ngày



Hình 3.17. Hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng G303-KL2 với tỷ lệ giống khác nhau sau 12 ngày

Kết quả (Hình 3.16 và 3.17) cho thấy, chủng G303-KL2 tổng hợp CHĐBMSH tốt với tỷ lệ giống ban đầu được bổ sung là 3, 4, 5 và 6% (v/v) với chỉ số nhũ hóa E₂₄ đạt lần lượt là 66; 67; 69,7 và 62%, đạt cao nhất khi bổ sung tỷ lệ giống là 5% (v/v). Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng này giảm với tỷ lệ giống bổ sung ban đầu là 1 và 2% (v/v) với chỉ số nhũ hóa E₂₄ chỉ đạt 35,6 và 48%. Như vậy, tỷ lệ giống 5% (v/v) là phù hợp cho quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH ở chủng G303-KL2. Nghiên cứu của Lại Thúy Hiền và cộng sự (2013) cho thấy chủng vi khuẩn *Rhodococcus* được chứng minh là có khả năng tổng hợp CHĐBMSH từ các mẫu nước ô nhiễm dầu ven biển Vũng Tàu. Ở điều kiện thí nghiệm, khả năng nhũ hóa với xylen của CHĐBMSH do chủng vi khuẩn này đạt được là 65% gần như tương đương với chủng G303-KL2 (69,7%) trong nghiên cứu này [81].

3.5. LÊN MEN TỔNG HỢP CHĐBMSH TỪ CHỦNG G303-KL2 Ở ĐIỀU KIỆN PHÙ HỢP

Chủng vi khuẩn lựa chọn G303-KL2 được lên men ở các điều kiện phù hợp trên môi trường khoáng bổ sung 2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) (NH₄)₂HPO₄, pH = 8, 30°C, 1% (w/v) NaCl, và tỷ lệ giống 5% (v/v). Sau 12 ngày nuôi lác ở điều kiện phù hợp, chỉ số nhũ hóa E₂₄ của chủng này đạt được là 69,7% (tăng 14,7%) và sức căng bề mặt giảm từ 69,88 mN/m (trong MSM)

xuống chỉ còn 34,51 mN/m (giảm hơn 14,7 mN/m) so với trước khi lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng phù hợp.

Mulligan (2005) đã chứng minh được CHĐBMSH do chủng *Acinetobacter* ACMS25 tổng hợp có thể làm giảm sức căng bề mặt của nước cất từ 72,0 xuống 35,0 mN m⁻¹ [66]. Trong môi trường muối khoáng được bổ sung glycerol (2%), vào cuối giai đoạn lên men 72 giờ, chỉ số nhũ hóa (E₂₄%) của chủng này đạt được là 64,6 %. Kết quả từ nghiên cứu của Mulligan cũng tương đồng với kết quả đạt được trong nghiên cứu này khi chủng G303-KL2 tổng hợp được CHĐBMSH có độ nhũ hóa E₂₄ là 69,7% và sức căng bề mặt giảm xuống 34,11 mN/m sau 12 ngày. Hàm lượng CHĐBMSH thô của chủng G303-KL2 đạt được trong nghiên cứu này là 1,1 g/l, tương đương với chủng nấm men *Candida lipolytica* trong nghiên cứu của [95].

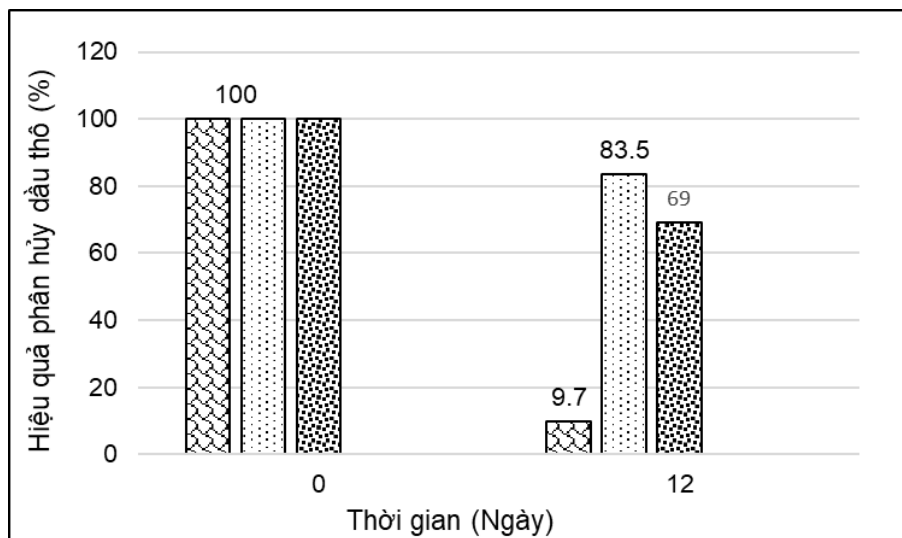
3.6. PHÂN LOẠI CHỦNG VI KHUẨN NGHIÊN CỨU DỰA TRÊN ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI KHUẨN LẠC VÀ TRÌNH TỰ GEN 16S RNA

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng G303-KL2 được quan sát trên môi trường thạch HKTS sau 48 giờ nuôi cấy. Khuẩn lạc có màu trắng đục, li ti, tròn, mép gọn, bề mặt nhẵn, bóng, đường kính ≈ 1 mm (Hình 3.1-B).

Bên cạnh việc xác định hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn G303-KL2, chủng này đã được tiến hành phân tích trình tự gen 16S rRNA và so sánh trình tự thu được với GenBank để tìm những loài có trình tự tương đồng. Kết quả cho thấy, trình tự gen 16S rRNA của chủng G303-KL2 tương đồng 99% với loài *Acinetobacter* sp. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chủng G303-KL2 được ký hiệu là *Acinetobacter* sp. G303-KL2.

3.7. KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU THÔ CỦA CHỦNG VI KHUẨN *ACINETOBACTER* SP. G303-KL2 VÀ VAI TRÒ CỦA CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN NÀY

Kết quả nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng cho thấy, hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 trên môi trường khoáng với các yếu tố phù hợp 2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaCl 1% (w/v), tỷ lệ giống 5% (v/v), pH = 8 và 30°C đạt tương đối cao với chỉ số nhũ hóa E_{24} là 69,7% (cao hơn 14,7% so với hàm lượng CHĐBMSH đạt được trước khi nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng, điều kiện ở Mục 3.3).



Hình 3.18. Hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 sau 12 ngày

Cột trái: (Đ/c) đối chứng **không bổ sung** chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2

Cột giữa: (TN): thí nghiệm với chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 ở điều kiện **lựa chọn** các yếu tố phù hợp;

Cột phải: (TN) thí nghiệm với chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 ở điều kiện **không lựa chọn** các yếu tố phù hợp

Khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô) của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 được đánh giá trong môi trường (1) với các yếu tố phù hợp được lựa chọn và (2) với các yếu tố chưa được lựa chọn phù hợp. Hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 được đánh giá

thông qua hàm lượng dầu thô tổng số được xác định bằng phương pháp cân trọng lượng [94].

Kết quả phân hủy dầu thô của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 được thể hiện ở Hình 3.24 cho thấy, với các yếu tố đã được lựa chọn phù hợp, hàm lượng dầu thô giảm từ 20,13 g/L (100%) ở cả 02 mẫu thí nghiệm và 01 mẫu đối chứng tại thời điểm 0 giờ xuống còn 18,18 g/L ở mẫu đối chứng (hiệu suất phân hủy đạt 9,7%) và 3,33 g/L (hiệu suất phân hủy đạt 83,5%) ở mẫu thí nghiệm với các yếu tố đã được lựa chọn phù hợp. Ở điều kiện trước khi được lựa chọn phù hợp, hàm lượng dầu giảm xuống là 6,29 g/L với hiệu suất phân hủy chỉ đạt 69% sau 12 ngày.

Sau 12 ngày nuôi lắ ở điều kiện phù hợp, hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng *Acinetobacter* G303-KL2 ở điều kiện được lựa chọn phù hợp là 83,5% cao hơn hiệu quả phân hủy dầu thô cũng của chủng này ở điều kiện chưa được lựa chọn (69%) là 14,5 %. Chỉ số nhũ hóa E_{24} của chủng này đạt được là 69,7% (tăng 14,7%) và sức căng bề mặt giảm từ 69,88 mN/m (trong MSM) xuống chỉ còn 34,11 mN/m (giảm hơn 15,1 mN/m) so với trước khi lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng phù hợp.

Zhang và cộng sự (2021) đã minh chứng hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng *Acinetobacter baumannii* đạt 80% sau 14 ngày ở điều kiện phù hợp [96]. Điều này cho thấy, chủng *Acinetobacter baumannii* trong nghiên cứu của Zhang và cs có hiệu quả phân hủy tương đương so với hiệu quả phân hủy dầu thô của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 trong nghiên cứu này sau 12 ngày ở điều kiện phù hợp là 83,5%. Điều này cho thấy, CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Acinetobacter* trong nghiên cứu này có khả năng nâng cao hiệu quả phân hủy hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô).

3.8. PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN *ACINETOBACTER* SP. G303-KL2

Việc xác định thành phần hóa học của các CHĐBMSH đóng vai trò hết sức quan trọng, bởi trên cơ sở đó có thể dự đoán được cơ chế tác động của các chất này, từ đó đưa ra giải pháp ứng dụng hiệu quả. Theo các nghiên cứu đã được

công bố, CHĐBMSH được tổng hợp từ VSV thuộc nhóm các hợp chất hoạt động bề mặt có trọng lượng phân tử thấp gồm hai nhóm Glycolipids (Rhamnolipids, Sophorolipids, Mannosylerythritol lipid, và Trehalose lipds) và Lipopeptides (surfactin, fengycin),.... Glycolipids là carbohydrate kết hợp với axit béo chuỗi dài hoặc axit béo hydroxyl liên kết với ester hoặc nhóm ether [61]. Các nghiên cứu trước đó cho rằng, CHĐBMSH Rhamnolipids thuộc nhóm Glycolipids có trọng lượng phân tử thấp chủ yếu được tổng hợp bởi các loài vi khuẩn như *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, và *Rhodococcus* [97]. Để xác định CHĐBMSH tổng hợp từ chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 trong nghiên cứu này có phải là Rhamnolipid thuộc nhóm Glycolipids hay không, chúng tôi tiến hành tinh sạch và phân tích thành phần, tính chất và hàm lượng của CHĐBMSH này. Các phương pháp phân tích được sử dụng trong nghiên cứu này là: Sắc ký bản mỏng (TLC), quang phổ hồng ngoại (FT-IR), sắc ký lỏng ghép khối phổ (HPLC/MS), và cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$).

3.8.1. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 bằng sắc ký bản mỏng (TLC)

Như đã đề cập ở trên, Banat và cộng sự (2010) đã chỉ ra rằng, CHĐBMSH được tổng hợp từ chi *Acinetobacter* thường thuộc nhóm Glycolipid [97]. Chính vì vậy, ban đầu để xác định sơ bộ CHĐBMSH do chủng vi khuẩn G303-KL2 tổng hợp, chúng tôi tiến hành phân tích các chất này bằng sắc ký bản mỏng (TLC). Trong nghiên cứu này, hỗn hợp chloroform:methanol:acetic acid (65:15:20 v/v/v) được sử dụng để làm dung môi động phân tách các CHĐBMSH được tổng hợp từ chủng vi khuẩn G303-KL2 trên bản TLC. Tiến hành chạy song song với chất chuẩn L-Ramnose và D-Glucose. Glycolipid cho vi khuẩn *Acinetobacter* tạo ra thường có hai gốc gắn kèm là axit béo và carbohydrat. Để nhận biết gốc carbohydrate, sử dụng dung dịch hiện màu ethanol: H_2SO_4 đặc tỷ lệ 1:4 (v/v) phun lên bản sắc ký. Tiếp tục làm khô trên ngọn lửa cho đến khi bản sắc ký hiện màu. Nếu mẫu chứa Carbohydrat sẽ xuất hiện điểm màu hồng tím. Giá trị R_f của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng G303-KL2 được so sánh với chất chuẩn L-Ramnose và D-Glucose [93].



A B C

A. CHĐBMSH của G303-KL2; B. D-Glucose chuẩn;
C. L-Rhamnose chuẩn

Hình 3.19. Kết quả TLC sản phẩm CHHBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2

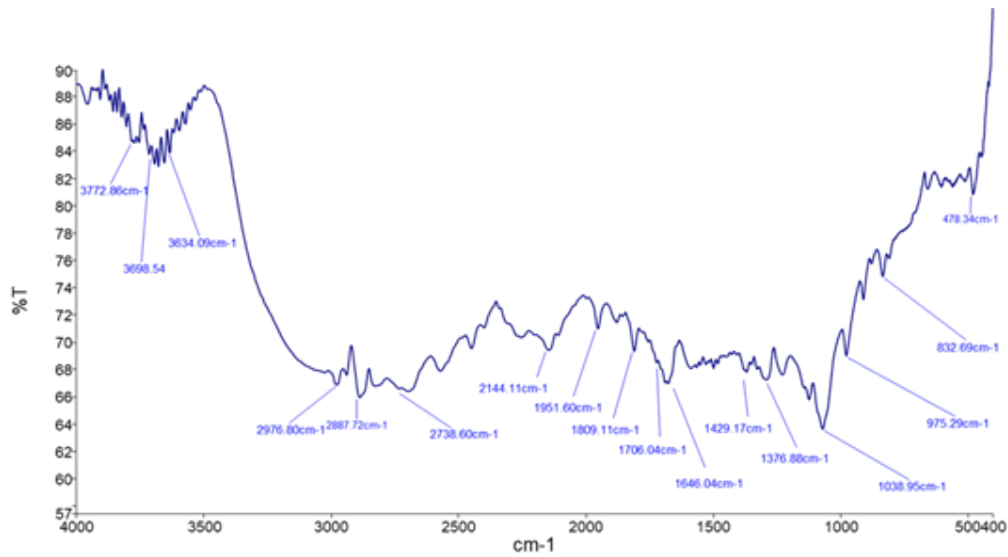
Kết quả phân tích TLC (Hình 3.18) cho thấy cả 3 mẫu đều xuất hiện phản ứng màu đặc trưng của nhóm Carbohydrate đồng thời hệ số Rf do chủng vi khuẩn G303-KL2 tạo ra (Hình 3.18-A) gần tương đồng so với hệ số Rf của chất chuẩn L-Rhamnose (Hình 3.18-C). Như vậy, thành phần hóa học của CHĐBMSH do chủng vi khuẩn G303-KL2 tổng hợp gần giống chất chuẩn L-Rhamnose. Tuy nhiên, để khẳng định CHĐBMSH do chủng này tạo ra có thuộc nhóm Glycolipid hay không thì cần tiến hành tinh sạch Rhamonolipids từ CHĐBMSH thô sau đó tiếp tục phân tích thành phần của CHĐBMSH này bằng các phương pháp khác.

3.8.2. Tinh sạch chất hoạt động bề mặt sinh học thô của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2

Quy trình tinh sạch CHĐBMSH thô tổng hợp bởi G303-KL2 được tiến hành ở Mục 2.2.7. CHĐBMSH tinh khiết thu được tiếp tục được phân tích FT-IR, HPLC/MS và NMR.

3.8.3. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 bằng quang phổ hồng ngoại (FT-IR)

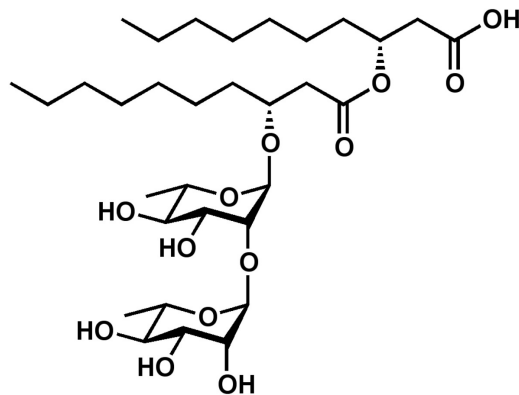
Sản phẩm CHĐBMSH được tổng hợp từ chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 được phân tích thành phần cấu trúc bằng phương pháp FT-IR. Kết quả FT-IR trên hình 3.19 xuất hiện các pic đặc trưng tại 2976 và 2887 cm^{-1} do các dao động kéo dài của nhóm CH_2 và CH_3 của chuỗi acyl [98]. Các dải tại 2738 và 1376 cm^{-1} đặc trưng của cấu trúc glycolipid và pic 1429 là do rung động biến dạng δ (CH) và 1376 cm^{-1} của nhóm COO^- kéo dài không đối xứng và uốn cong CH_2 và CH_3 chứng minh cho sự tồn tại của liên kết giữa nguyên tử cacbon và nhóm hydroxyl trong cấu trúc hóa học của thành phần glycoside [99, 100]. Đặc biệt sự xuất hiện của dải hấp thụ tại vùng 1038 cm^{-1} tương ứng với nhóm $-\text{COC}-$ trong các cấu trúc tuần hoàn của carbohydrate, cùng với sự xuất hiện của liên kết giữa nguyên tử cacbon với nhóm hydroxyl tại các đỉnh 1429-1376 cm^{-1} cho thấy cấu trúc của sản phẩm chiết tách này là của vòng rhamnose, đây là các pic đặc trưng trên phổ FT-IR của glycolipid nói chung và rhamnolipid nói riêng [100].



Hình 3.20. Phổ FT-IR của CHĐBMSH tách ra từ chủng vi khuẩn G303-KL2.

3.8.4. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn *Acinetobacter sp. G303-KL2* bằng HPLC/MS

Rhamnolipid là CHĐBMSH có cấu trúc phức tạp bao gồm một đến hai phân tử Rhamnose liên kết với một số phân tử axit béo hydroxyl (ảnh mô phỏng như Hình 3.20). Để xác định xem Rhamnolipid có hiện diện trong CHĐBMSH do chủng vi khuẩn G303-KL2 tổng hợp không và hàm lượng Rhamnolipid trong CHĐBMSH này là bao nhiêu, chúng tôi sử dụng phương pháp phân tích HPLC/MS. Hóa chất và thiết bị sử dụng phân tích được nêu chi tiết trong Mục 2.2.10.



Hình 3.21. Mô phỏng cấu trúc Rhamnolipid

Kết quả phân tích HPLC/MS của CHĐBMSH tạo ra bởi chủng vi khuẩn G303-KL2 cho thấy, tại thời gian lưu RT 17,4 phút xuất hiện các phân đoạn có tỷ lệ m/z tương ứng là: 650,3793; 649,3793; và 479,2490. Các nghiên cứu trước

đây chỉ ra rằng, tỷ lệ m/z 650,3793 đặc trưng cho số khối của di-rhamnolipid, còn phân đoạn với tỷ lệ m/z 649,3793 đặc trưng cho số khối của Rha-Rha-C10-C10, là hợp chất di-rhamnolipid, mất đi 1 proton. Tỷ lệ m/z 479,2490 đặc trưng cho số khối của mảnh di-rhamnolipid, Rha-Rha-C10-C10, mất đi một nhánh ester $C_{10}H_{18}O_3$ [42, 101]. Như vậy, CHĐBMSH tạo ra bởi chủng vi khuẩn có thể là di-rhamnolipid, Rha-Rha-C10-C10. Để làm rõ thêm thành phần cấu trúc của CHHBMSH được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2, chúng tôi tiếp tục xác định hàm lượng Rhamnolipid có trong CHĐBMSH và cấu trúc của chất này thông qua phương pháp NMR.

3.8.5. Xác định hàm lượng Rhamnolipid có trong chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn *Acinetobacter sp. G303-KL2*

Kết quả phân tích thành phần CHHBMSH của chủng vi khuẩn G303-KL2 bằng phương pháp HPLC/MS (Mục 3.7.4) cho thấy, CHĐBMSH tạo ra bởi chủng vi khuẩn G303-KL2 có thể là di-rhamnolipid, Rha-Rha-C10-C10. Hàm lượng Rhamnolipid Rham-Rham- C_{10} - C_{10} trong mẫu CHĐBMSH của chủng G303-KL2 tiếp tục được tiến hành xác định theo các bước sau:

**** Xây dựng đường chuẩn để xác định hàm lượng Rhamnolipid có trong CHĐBMSH của chủng vi khuẩn *Acinetobacter sp. G303-KL2****

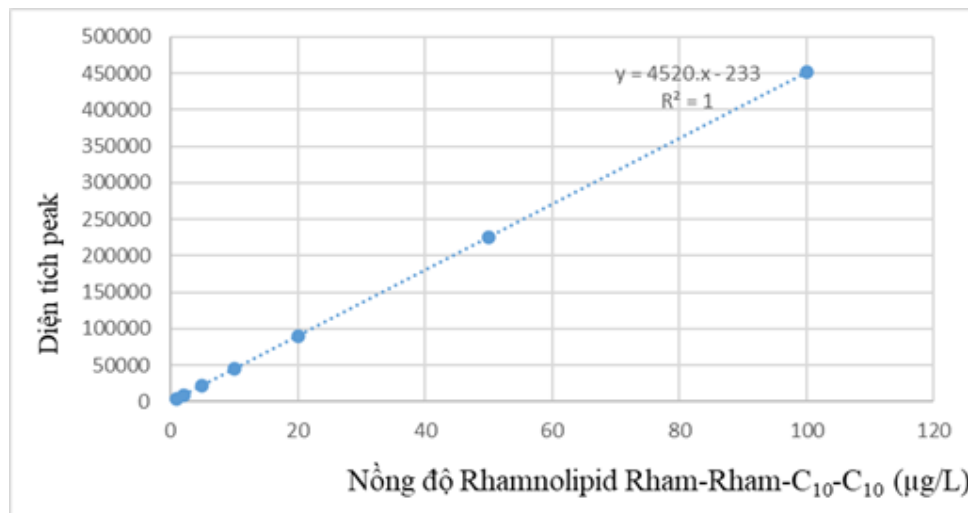
Chất chuẩn Rhamnolipid Rham-Rham- C_{10} - C_{10} với độ tinh khiết 98% của hãng Sigma-Aldrich. Cân 10,00mg Rhamnolipid Rham-Rham- C_{10} - C_{10} chuẩn vào bình định mức 10,00ml; định mức bằng dung môi methanol và acetonitril thu được dung dịch có nồng độ 1000 (mg/l). Hút 1,0ml dung dịch này vào bình 1000ml, định mức đến vạch được dung dịch có nồng độ 1(mg/l) (dung dịch chuẩn gốc).

Pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc để được các dung dịch có nồng độ là 1, 2, 5, 10, 20, 50 và 100 $\mu\text{g/L}$. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , tiêm vào hệ thống sắc kí khối phổ. Kết quả xây dựng đường chuẩn được trình bày trong Bảng 3.3 và Hình 3.21. Kết quả phân tích sự tương quan hàm lượng Rhamnolipids được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Kết quả xây dựng đường chuẩn của Rhamnolipid Rham-Rham-C₁₀-C₁₀

Thể tích dung dịch chuẩn gốc V	Bình định mức (ml)	Nồng độ (µg/l)	Diện tích pic
100 (µl)	100	1	4287
200 (µl)	100	2	8808
500 (µl)	100	5	22370
1000 (µl)	100	10	44974
2 (ml)	100	20	90181
5 (ml)	100	50	225801
10 (ml)	100	100	451836
Phương trình hồi qui: $y = 4520.7x - 233.32$			
Hệ số tương quan: $R^2 = 1$ ($\rightarrow r = 1$)			

Kết quả khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ); bằng phương pháp bình phương cực tiểu, kết quả cho thấy hệ số $r^2 = 1$ ($\rightarrow r = 1$) chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic của Rhamnolipid Rham-Rham-C₁₀-C₁₀ trong khoảng nồng độ 1 – 100 µg/L.



Hình 3.22. Đường chuẩn của hợp chất Rhamnolipid

* Quy trình xử lý mẫu CHĐBMSH của chủng vi khuẩn *Acinetobacter sp. G303-KL2*

Cân 1.00 gam mẫu CHĐBMSH vào ống li tâm 50 mL. Sau đó, thêm vào mẫu phân tích 10.00 mL dung môi acetonitrile, trộn đều mẫu bằng máy vortex với tốc độ 2000 vòng/phút, trong 1 phút. Mẫu phân tích được li tâm với tốc độ 9000 vòng/phút, trong 5 phút. Hút chính xác 5 mL mẫu dịch chiết vào bình định mức 100 mL, sau đó định mức bằng nước khử ion. Cột chiết pha rắn bao gồm C18 (150 mg) và PSA (50 mg) được trộn đều và nhồi vào cột, cột được hoạt hóa bằng 3 mL methanol và 3 mL nước khử. Mẫu sau khi định mức được chảy qua cột chiết pha rắn với tốc độ 2 mL/phút. Rửa tạp bằng 5 mL nước khử ion và làm khô cột bằng bơm áp suất giảm. Dùng 2 mL dung môi methanol chứa 0.1% acid formic làm dung môi rửa giải chất phân tích. Mẫu sau khi rửa giải được lọc qua màng lọc PTFE 0.22 μm và được sử dụng để phân tích. Thể tích tiêm mẫu tối ưu là 5 μL với dung môi acetonitrile/nước khử ion.

Bảng 3.4. Hàm lượng Rhamnolipid Rham-Rham-C₁₀-C₁₀ trong mẫu CHĐBMSH của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2

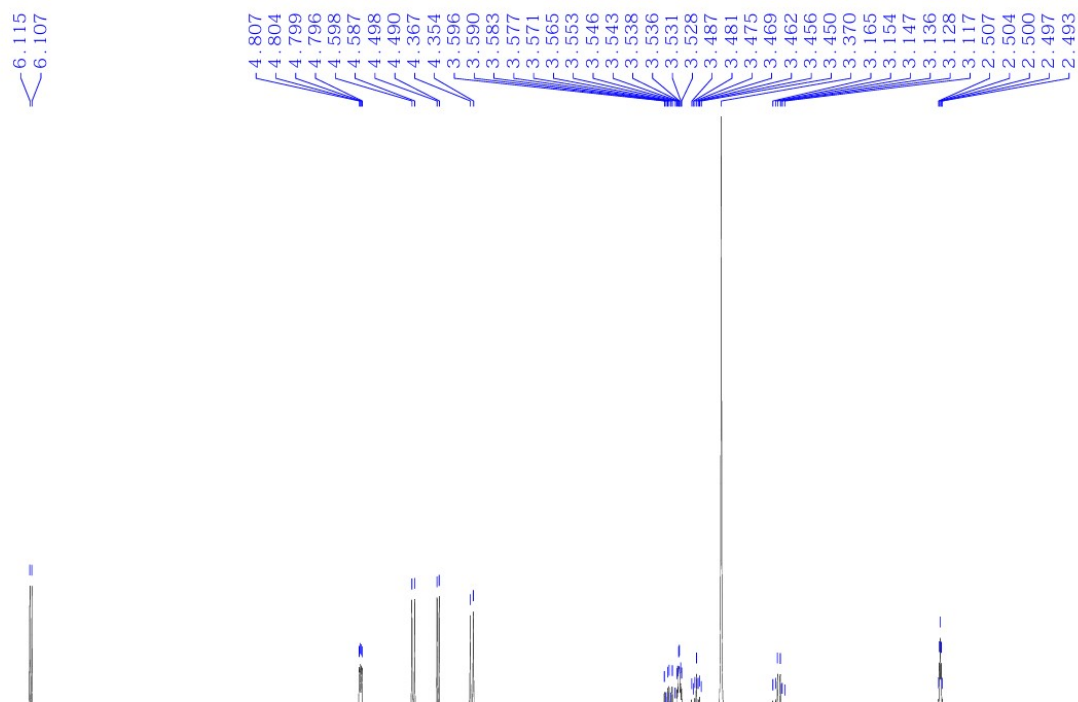
Số lần phân tích	Diện tích peak	Hàm lượng trong mẫu
1	113769	25.2mg/g
2	111539	24.7mg/g
3	112490	24.9mg/g
Trung bình		24.9mg/g

Kết quả (Bảng 3.4) cho thấy, hàm lượng Rhamnolipid Rham-Rham-C₁₀-C₁₀ trong mẫu lên men ≈ 25 mg/gam.

3.8.6. Phân tích thành phần chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 bằng cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR)

Kết quả phân tích TLC, FT-IR và HPLC/MS cho thấy, CHĐBMSH do chủng G303-KL2 tổng hợp có thể là di-rhamnolipid, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. Để làm rõ hơn cấu trúc của CHĐBMSH này, phổ NMR ¹H được thực hiện. Kết quả phân tích của phổ NMR ¹H được biểu diễn trên Hình 3.22. Phân tích phổ ¹³C-NMR cũng củng cố kết luận này. Các pic đặc trưng tại 1.106-1.094 ppm và 4.796-4.807 ppm thể hiện nhóm -CH₃ và -CH-OH của Rhamnose. Các pic tại 2.493-2.507 ppm và 3.37 ppm cho thấy sự hiện diện của nhóm -CH(O)-

CH_2COO và $-(\text{CH}_2)-\text{CH}(\text{O-Rha})-\text{CH}_2\text{COO}$, đặc trưng cho axit béo β -hydroxyl. Từ cả hai phổ phân tích, có thể kết luận rằng CHĐBMSH của chủng G303-KL2 có cấu trúc của rhamnolipid, một loại glycolipid sinh học chứa Rhamnose liên kết với chuỗi axit béo [102].

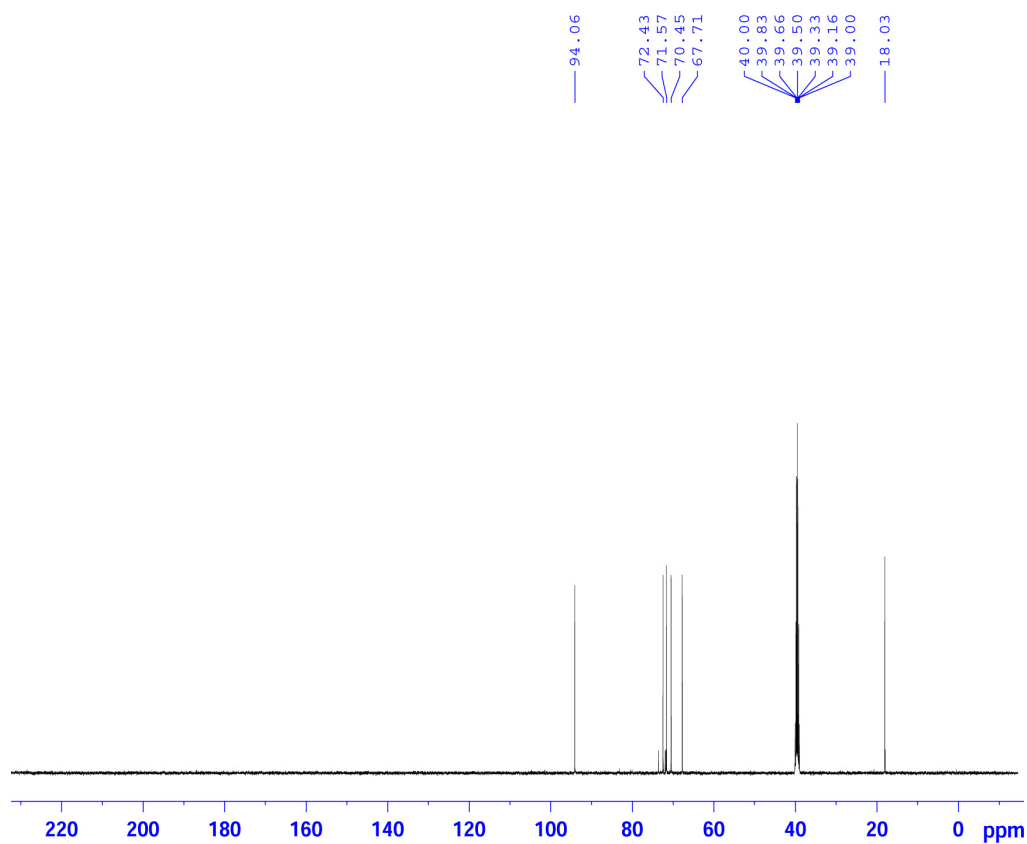


Hình 3.23. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2

Bảng 3.5. Các nhóm chức đặc trưng trong phổ $^1\text{H-NMR}$ của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2

Píc (ppm)	Nhóm đặc trưng
1.106-1.094	$-\text{CH}_3$ đặc trưng trên rhamnose
2.493-2.507	$-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2\text{COO}$ (trên axit béo β -hydroxy)
3.117-3.165	$-\text{CH}-\text{OH}$ (trên nhóm rhamnose)
3.37	$-(\text{CH}_2)-\text{CH}(\text{O-Rha})-\text{CH}_2\text{COO}$ (trên axit béo β -hydroxy)
4.796-4.807	$-\text{CH}-\text{OH}$ (trên nhóm rhamnose)

Kết quả (Hình 3.23) cho thấy các nhóm chức đặc trưng có trong CHĐBMSH của chủng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. G303-KL2 được phân tích bằng phương pháp ^{13}C -NMR. Sự xuất hiện các pic đặc trưng của CH_3 của nhóm Rhanolipid tại 18.03 ppm và các tín hiệu tương ứng của các cacbon anomeric của vòng rhamnose là ở 94,06 ppm. Đồng thời, tín hiệu tại 72.43-70.45 và 67.71 là đặc trưng của của C- β và C- β' trong chuỗi axit béo (lipid) [103].



Hình 3.24. Phổ ^{13}C -NMR của CHĐBMSH tổng hợp bởi chủng vi khuẩn G303-KL2

KẾT LUẬN

1. Từ các mẫu nước nhiễm dầu lấy tại giếng khai thác dầu, mỏ Rồng, Vũng Tàu, Việt Nam, đã phân lập được chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 tương đồng 99% với loài *Acinetobacter* sp. và được kí hiệu là *Acinetobacter* sp. G303-KL2 đồng thời chủng này có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất khó phân hủy là dầu thô với chỉ số E₂₄ là 69,7% sau 12 ngày nuôi cấy.
2. Điều kiện nuôi cấy phù hợp cho quá trình tổng hợp CHĐBMSH của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 là 2% (w/v) dầu thô, 0,5% (w/v) (NH₄)₂HPO₄, NaCl 1% (w/v), tỷ lệ giống 5% (v/v), pH = 8, 30°C. Ở điều kiện phù hợp này, chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 tổng hợp được CHĐBMSH là tốt nhất với chỉ số nhũ hóa (E₂₄) đạt 69,7%, tăng ~ 14,7% so với ban đầu (E₂₄ là 55%). Đồng thời, sức căng bề mặt giảm từ 69,88 mM/m (trong MSM) xuống chỉ còn 34,11 mM/m (giảm hơn 15,1 mM/m) so với sức căng bề mặt của CHĐBMSH tổng hợp trước khi lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng.
3. Hiệu suất phân hủy dầu thô của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 đạt được là 83,5% sau 12 ngày với các yếu tố ảnh hưởng được lựa chọn, cao hơn 14,5% so với thí nghiệm ở điều kiện trước khi lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng (69%).
4. Kết quả phân tích sắc ký bản mỏng (TLC), quang phổ hồng ngoại (FT-IR), sắc ký lỏng ghép khối phổ (HPLC/MS) cho thấy, CHĐBMSH do chủng G303-KL2 tổng hợp có thể là di-rhamnolipid, Rha-Rha-C10-C10. Kết luận này cũng được củng cố thêm dựa vào kết quả phân tích của phổ NMR ¹H và phổ ¹³C-NMR là CHĐBMSH của chủng G303-KL2 có cấu trúc của Rhamnolipid, một loại Glycolipid sinh học chứa Rhamnose liên kết với chuỗi axit béo.

KIẾN NGHỊ

- Chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 có khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH và phân hủy dầu thô tương đối cao (83,5%) vì vậy cần lưu giữ chủng và tiến hành nghiên cứu cố định lên các vật liệu phù hợp làm giá thể nhằm nâng cao khả năng chống chịu và duy trì hoạt tính sinh tổng hợp CHĐBMSH của chủng vi khuẩn này.

- Tiến hành nghiên cứu đánh giá các yếu tố ảnh hưởng của chủng *Acinetobacter* sp. G303-KL2 trên quy mô lớn hơn để có thể sản xuất CHĐBMSH ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu ngoài thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. History.com Editors. *Exxon Valdez Oil Spill*. March 9, 2018 March 23, 2021 September 6, 2024]; Available from: <https://www.history.com/topics/1980s/exxon-valdez-oil-spill>.
2. History.com Editors. *Massive oil spill begins in Gulf of Mexico*. 2012 April 20, 2024 September 6, 2024]; Available from: <https://www.history.com/this-day-in-history/massive-oil-spill-begins-in-gulf-of-mexico>.
3. National Oceanography Centre. *Sanchi oil spill contamination could reach Japan within a month*. 2018; Available from: <https://noc.ac.uk/news/sanchi-oil-spill-contamination-could-reach-japan-within-month-update>.
4. ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. *AMOCO CADIZ*. Available from: <https://www.itopf.org/in-action/case-studies/amoco-cadiz-france-1978/>.
5. ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. *ATLANTIC EMPRESS*. Available from: <https://www.itopf.org/in-action/case-studies/atlantic-empress-west-indies-1979/>.
6. ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation, *CASTILLO DE BELLVER*.
7. ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation, *ABT SUMMER*.
8. ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. *SEA EMPRESS*. Available from: <https://www.itopf.org/in-action/case-studies/sea-empress-wales-uk-1996/>.
9. Safety4Sea. *Sanchi: The world's worst oil tanker disaster in decades*. Available from: <https://safety4sea.com/cm-sanchi-the-worlds-worst-oil-tanker-disaster-in-decades/>.
10. Shaojie Sun, Yingcheng Lu, et al., 2018, *Tracking an oil tanker collision and spilled oils in the East China Sea using multisensor day and night satellite imagery*. *Geophysical Research Letters*. **45**(7): p. 3212-3220.
11. Oxford Analytica, 2020, *Mauritius oil spill will have wide-ranging effects*. Emerald Expert Briefings. (oxan-db).
12. Bảg Tâm, 2023, *Hải Phòng: Khắc phục cơ bản sự cố tràn dầu tại khu vực bến phà Gót*, in *Báo Lao động*.[^]
13. Phạm Hà Anh; Đào Văn Hiền, 2017, *Sự cố tràn dầu và khả năng ứng dụng công nghệ viễn thám, GIS trong giám sát tại Việt Nam*. Tạp chí Môi trường.

14. Tạ Đăng Minh, 1997, *Sự cố tràn dầu xảy ra ở vùng biển nước ta trong những năm gần đây và những bài học rút ra*. Tạp chí khí tượng thủy văn.
15. Phạm Cường, 2019, *Ứng phó và xử lý tốt sự cố tràn dầu, chất độc hại trên biển*, in *Thông tin đối ngoại*.[^]
16. 2003, *Tàu chở 600 tấn dầu bị chìm ở biển Vũng Tàu*, in *VN Express*.[^]
17. Minh Trí, 2007, *Quảng Ngãi: Tàu đâm nhau, 173 m³ dầu tràn ra biển*, in *Báo Nhân dân*.[^]
18. Hoàng Lam, 2017, *Vụ tàu chở gần 5.000 tấn hàng bị chìm ở Thanh Hóa: Ứng phó sự cố tràn dầu*, in *Báo Tiền phong*.[^]
19. 2019, *Tập trung xử lý sự cố tràn dầu từ tàu hàng bị chìm ở vùng biển Hà Tĩnh*, in *Vietnam+*.[^]
20. 2021, *Ứng phó sự cố tràn dầu tại Việt Nam*, in *Tạp chí Công nghiệp môi trường*.[^]
21. Lại Thúy Hiền, *Vi sinh vật dầu mỏ*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
22. Gregory C Ezeokpube, George U Alaneme, et al., 2022, *Experimental investigation of crude oil contaminated soil for sustainable concrete production*. Architecture, Structures and Construction. **2**(3): p. 349-364.
23. Kenneth Lee, Bing Chen, et al., 2016, *Behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments*.
24. Pu Li, Qinhong Cai, et al., 2016, *Offshore oil spill response practices and emerging challenges*. Marine pollution bulletin. **110**(1): p. 6-27.
25. Joth G Singh, Ivan Chang-Yen, Valerie A Stoute, and Lutchminarine Chatergoon, 1992, *Hydrocarbon levels in edible fish, crabs and mussels from the marine environment of Trinidad*. Marine pollution bulletin. **24**(5): p. 270-272.
26. Theerapong Sairat, Sahalaph Homwuttiwong, Kritsana Homwuttiwong, and Maneerat Ongwandee, 2015, *Investigation of gasoline distributions within petrol stations: spatial and seasonal concentrations, sources, mitigation measures, and occupationally exposed symptoms*. Environmental Science and Pollution Research. **22**: p. 13870-13880.
27. P Shaughnessy, 2004, *Population assessment of New Zealand fur seals and Australian sea lions in some South Australian breeding colonies and haul-out sites, 2003–2004*. Report to Department for Environment and Heritage, South Australia.
28. Charles RC Sheppard, 2000, *Seas at the millennium: an environmental evaluation: 3. Global issues and processes*.
29. Jacqueline Michel and Nicolle Rutherford, 2014, *Impacts, recovery rates, and treatment options for spilled oil in marshes*. Marine Pollution Bulletin. **82**(1-2): p. 19-25.
30. Thùy Anh, 2020, *Hàng ngàn tấn dầu tràn có thể gây chết rừng ngập mặn*, in *Báo phụ nữ*.[^]

31. Charles H Peterson, Stanley D Rice, et al., 2003, *Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill*. *Science*. **302**(5653): p. 2082-2086.
32. D Davis and RJ Guidry, 1996, *Oil, oil spills and the state's responsibilities*. *Basin Res. Inst. Bull.* **6**: p. 60-68.
33. Stephanie E Chang, Jeremy Stone, Kyle Demes, and Marina Piscitelli, 2014, *Consequences of oil spills: a review and framework for informing planning*. *Ecology and Society*. **19**(2).
34. Joanna Walters. *Exxon Valdez - 25 years after the Alaska oil spill, the court battle continues*. 2014; Available from: <https://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/northamerica/usa/10717219/Exxon-Valdez-25-years-after-the-Alaska-oil-spill-the-court-battle-continues.html>.
35. ITOPF. *TIP 03: Use of Booms in Oil Pollution Response*. 2018; Available from: www.itopf.org/fileadmin/data/Documents/TIPS%20TAPS/TIP_3_Use_of_Booms_in_Oil_Pollution_Response.pdf.
36. Francesca Mapelli, Alberto Scoma, et al., 2017, *Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms*. *Trends in biotechnology*. **35**(9): p. 860-870.
37. A Tuan Hoang, V Viet Pham, and D Nam Nguyen, 2018, *A report of oil spill recovery technologies*. *Int. J. Appl. Eng. Res.* **13**(7): p. 4915-4928.
38. Nikolaos P Ventikos, Emmanouil Vergetis, Harilaos N Psaraftis, and George Triantafyllou, 2004, *A high-level synthesis of oil spill response equipment and countermeasures*. *Journal of hazardous materials*. **107**(1-2): p. 51-58.
39. E Vergetis, 2002, *Oil pollution in Greek seas and spill confrontation means-methods*. National Technical University of Athens, Greece.
40. Nilanjan Pal, Sudhir Kumar, Achinta Bera, and Ajay Mandal, 2019, *Phase behaviour and characterization of microemulsion stabilized by a novel synthesized surfactant: Implications for enhanced oil recovery*. *Fuel*. **235**: p. 995-1009.
41. Sandeep Verma and VV Kumar, 1998, *Relationship between oil-water interfacial tension and oily soil removal in mixed surfactant systems*. *Journal of colloid and interface science*. **207**(1): p. 1-10.
42. Eleftheria Antoniou, Stilianos Fodelianakis, Emmanouela Korkakaki, and Nicolas Kalogerakis, 2015, *Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source*. *Frontiers in microbiology*. **6**: p. 274.
43. Alden C Adrion, Jun Nakamura, Damian Shea, and Michael D Aitken, 2016, *Screening nonionic surfactants for enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons remaining in soil after conventional biological treatment*. *Environmental science & technology*. **50**(7): p. 3838-3845.

44. Joris J-H Haftka, Jort Hammer, and Joop LM Hermens, 2015, *Mechanisms of neutral and anionic surfactant sorption to solid-phase microextraction fibers*. Environmental science & technology. **49**(18): p. 11053-11061.
45. PL Fernandes, EM Rodrigues, et al., 2016, *Biosurfactant, solvents and polymer production by Bacillus subtilis RI4914 and their application for enhanced oil recovery*. Fuel. **180**: p. 551-557.
46. Farhan Anjum, Gunjan Gautam, Gnansounou Edgard, and Sangeeta Negi, 2016, *Biosurfactant production through Bacillus sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry*. Bioresource technology. **213**: p. 262-269.
47. Mnif Inès and Ghribi Dhouha, 2015, *Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications*. Carbohydrate Research. **416**: p. 59-69.
48. Asia Fadhile Almansoori, Hassimi Abu Hasan, et al., 2015, *Potential application of a biosurfactant in phytoremediation technology for treatment of gasoline-contaminated soil*. Ecological Engineering. **84**: p. 113-120.
49. Rita De Cássia FS Silva, Darne G Almeida, et al., 2014, *Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills*. International journal of molecular sciences. **15**(7): p. 12523-12542.
50. Magdalena Pacwa-Płociniczak, Grażyna A Płaza, Zofia Piotrowska-Seget, and Swaranjit Singh Cameotra, 2011, *Environmental applications of biosurfactants: recent advances*. International journal of molecular sciences. **12**(1): p. 633-654.
51. Ellen Cristina Souza, Thereza Christina Vessoni-Penna, and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, 2014, *Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview*. International biodeterioration & biodegradation. **89**: p. 88-94.
52. LA Sarubbo, RB Rocha Jr, et al., 2015, *Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants*. Chemistry and Ecology. **31**(8): p. 707-723.
53. Jenyffer Medeiros Campos, Tania Lucia Montenegro Stamford, et al., 2013, *Microbial biosurfactants as additives for food industries*. Biotechnology progress. **29**(5): p. 1097-1108.
54. Łukasz Ławniczak, Roman Marecik, and Łukasz Chrzanowski, 2013, *Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation*. Applied microbiology and biotechnology. **97**: p. 2327-2339.
55. Inès Mnif and Dhouha Ghribi, 2015, *Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **31**(7): p. 1001-1020.

56. Ibrahim M Banat, Mayri A Díaz De Rienzo, and Gerry A Quinn, 2014, *Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents*. Applied microbiology and biotechnology. **98**: p. 9915-9929.
57. S Vijayakumar and V Saravanan, 2015, *Biosurfactants-types, sources and applications*. Res J Microbiol. **10**(5): p. 181-192.
58. Catherine N Mulligan, 2009, *Recent advances in the environmental applications of biosurfactants*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. **14**(5): p. 372-378.
59. Hua Yin, Jing Qiang, et al., 2009, *Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater*. Process Biochemistry. **44**(3): p. 302-308.
60. Marius Henkel, Markus M Müller, et al., 2012, *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production*. Process Biochemistry. **47**(8): p. 1207-1219.
61. Erum Shoeb, Faiza Akhlaq, et al., 2013, *Classification and industrial applications of biosurfactants*. Academic Research International. **4**(3): p. 243.
62. Humberto Bezerra Sobrinho, JULIANA M Luna, et al., 2013, *Biosurfactants: classification, properties and environmental applications*. Recent developments in biotechnology. **11**(14): p. 1-29.
63. Siegmund Lang, 2002, *Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. **7**(1-2): p. 12-20.
64. AAM Hatha, Gakpe Edward, and KSM Pattanathu Rahman, 2007, *Microbial biosurfactants—review*.
65. Sneha Chakrabarti, 2012, *Bacterial biosurfactant: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties.*[^]
66. Catherine N Mulligan, 2005, *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental pollution. **133**(2): p. 183-198.
67. Elisa Corazza, Angela Abruzzo, et al., 2022, *Human Lactobacillus biosurfactants as natural excipients for nasal drug delivery of hydrocortisone*. Pharmaceutics. **14**(3): p. 524.
68. Juliana M Luna, Raquel D Rufino, Leonie A Sarubbo, and Galba Maria Campos-Takaki, 2013, *Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by Candida sphaerica UCP0995 for application in the petroleum industry*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. **102**: p. 202-209.
69. GE Jenneman, MJ McInerney, et al., 1983, *Halotolerant, biosurfactant-producing Bacillus species potentially useful for enhanced oil recovery*. Dev. Ind. Microbiol.:(United States). **24**(CONF-8208164-).
70. Pooja Singh and Swaranjit Singh Cameotra, 2004, *Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences*. TRENDS in Biotechnology. **22**(3): p. 142-146.

71. K Poremba, W Gunkel, S Lang, and F Wagner, 1991, *Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms*. Environmental Toxicology and Water Quality. **6**(2): p. 157-163.
72. Leonie A Sarubbo, Charles BB Farias, and Galba Maria Campos-Takaki, 2007, *Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by Candida lipolytica*. Current Microbiology. **54**: p. 68-73.
73. RD Rufino, LA Sarubbo, and GM Campos-Takaki, 2007, *Enhancement of stability of biosurfactant produced by Candida lipolytica using industrial residue as substrate*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. **23**: p. 729-734.
74. Vilas Patel, Siddharth Jain, and Datta Madamwar, 2012, *Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India*. Bioresource technology. **107**: p. 122-130.
75. Dariush Minai-Tehrani, Saeed Minoui, and Ali Herfatmanesh, 2009, *Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. **82**: p. 179-184.
76. Stephen M Techtmann, Mobing Zhuang, et al., 2017, *Corexit 9500 enhances oil biodegradation and changes active bacterial community structure of oil-enriched microcosms*. Applied and environmental microbiology. **83**(10): p. e03462-16.
77. Mohammad Daher Hazaimh and Enas S Ahmed, 2021, *Bioremediation perspectives and progress in petroleum pollution in the marine environment: a review*. Environmental Science and Pollution Research. **28**(39): p. 54238-54259.
78. Nina R Itrich, Kathleen M McDonough, et al., 2015, *Widespread microbial adaptation to l-glutamate-N, N-diacetate (L-GLDA) following its market introduction in a consumer cleaning product*. Environmental science & technology. **49**(22): p. 13314-13321.
79. LM Santa Anna, GV Sebastian, et al., 2001, *Production of biosurfactant from a new and promising strain of Pseudomonas aeruginosa PA1*. Applied biochemistry and biotechnology. **91**: p. 459-467.
80. Lishen Shan, Yunling Gao, et al., 2016, *Fabrication and use of alginate-based cryogel delivery beads loaded with urea and phosphates as potential carriers for bioremediation*. Industrial & Engineering Chemistry Research. **55**(28): p. 7655-7660.
81. Lại Thúy Hiền, Nguyễn Thị Yên, and Vương Thị Nga, 2013, *Vi khuẩn tạo chất hoạt hóa bề mặt sinh học Rhodococcus ruber TD2 phân lập từ nước ô nhiễm dầu ven biển Vũng Tàu*. Tạp chí Sinh học. **35**(4): p. 454-460.
82. Glaci V Moro, Rafaela TR Almeida, et al., 2018, *Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with*

- high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments.* Microbial Biotechnology. **11**(4): p. 759-769.
83. Christina Nikolova and Tony Gutierrez, 2020, *Use of microorganisms in the recovery of oil from recalcitrant oil reservoirs: Current state of knowledge, technological advances and future perspectives.* Frontiers in microbiology. **10**: p. 2996.
 84. Antonio GB Pereira, Edvani C Muniz, and You-Lo Hsieh, 2015, *1H NMR and 1H–13C HSQC surface characterization of chitosan–chitin sheath-core nanowhiskers.* Carbohydrate polymers. **123**: p. 46-52.
 85. Deepak Sharma, Mohammad Javed Ansari, et al., 2015, *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa DSV20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization.* Environmental Science and Pollution Research. **22**: p. 17636-17643.
 86. Jorge FB Pereira, Eduardo J Gudiña, et al., 2013, *Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications.* Fuel. **111**: p. 259-268.
 87. Marco Kruijt, Ha Tran, and Jos M Raaijmakers, 2009, *Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting Pseudomonas putida 267.* Journal of applied microbiology. **107**(2): p. 546-556.
 88. Tomasz Janek, Marcin Łukaszewicz, and Anna Krasowska, 2013, *Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium Pseudomonas putida BD2.* Colloids and surfaces B: Biointerfaces. **110**: p. 379-386.
 89. Si Young Yang, Da Jung Lim, et al., 2017, *Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by Bacillus subtilis Y9.* Entomological research. **47**(1): p. 55-59.
 90. Xiumei Tian, Xiaoli Wang, 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): p. 2626-2638.
 91. Marcos J Chaprão, Isabela NS Ferreira, et al., 2015, *Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand.* Electronic Journal of Biotechnology. **18**(6): p. 471-479.
 92. Alejandro P Rooney, Neil PJ Price, Karen J Ray, and Tsung-Min Kuo, 2009, *Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility.* FEMS microbiology letters. **295**(1): p. 82-87.

93. Gloria Soberón-Chávez and Raina M Maier, 2011, *Biosurfactants: a general overview*. Biosurfactants: from genes to applications. p. 1-11.
94. R Latha and R Kalaivani, 2012, *Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis*. Advances in Applied Science Research. **3**(5): p. 2789-2795.
95. Danyelle KF Santos, Raquel D Rufino, et al., 2013, *Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by Candida lipolytica using animal fat and corn steep liquor*. Journal of Petroleum Science and Engineering. **105**: p. 43-50.
96. Xinying Zhang, Dewen Kong, et al., 2021, *Combined microbial degradation of crude oil under alkaline conditions by Acinetobacter baumannii and Talaromyces sp.* Chemosphere. **273**: p. 129666.
97. Ibrahim M Banat, Andrea Franzetti, et al., 2010, *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Applied microbiology and biotechnology. **87**: p. 427-444.
98. E Haba, A Pinazo, et al., 2003, *Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044*. Biotechnology and bioengineering. **81**(3): p. 316-322.
99. KV Deepika, M Raghuram, and PV Bramhachari, 2017, *Rhamnolipid biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa strain KVD-HR42 isolated from oil contaminated mangrove sediments*. African Journal of Microbiology Research. **11**(6): p. 218-231.
100. Samira Ferhat, Sami Mnif, et al., 2011, *Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils*. International Biodeterioration & Biodegradation. **65**(8): p. 1182-1188.
101. E Déziel, François Lépine, Sylvain Milot, and Richard Villemur, 2000, *Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of Pseudomonas aeruginosa strain 57RP*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. **1485**(2-3): p. 145-152.
102. TAA Moussa, MS Mohamed, and N Samak, 2014, *Production and characterization of di-rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa TMN*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. **31**: p. 867-880.
103. Neli Christova, Boryana Tuleva, et al., 2013, *Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa BNI0*. Applied biochemistry and biotechnology. **170**: p. 676-689.