

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Diễm Quỳnh

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NITƠ BỔ SUNG
ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
HYDROCACBON DẦU MỎ CỦA NẤM MEN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

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



Nguyễn Thị Diễm Quỳnh

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA NITƠ BỔ SUNG
ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY
HYDROCACBON DẦU MỎ CỦA NẤM MEN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Kiều Thị Quỳnh Hoa

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "KH", is written over the name of the supervisor.

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận văn này là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn trực tiếp của TS. Kiều Thị Quỳnh Hoa và sự giúp đỡ của các đồng nghiệp Phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học. Tất cả các số liệu và các kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa từng được nhóm nghiên cứu khác công bố. Các tài liệu tham khảo, các số liệu thống kê phục vụ mục đích nghiên cứu trong luận văn này được sử dụng đúng quy định và được trích dẫn đầy đủ trong phần tài liệu tham khảo.

Tác giả luận văn



Nguyễn Thị Diễm Quỳnh

LỜI CẢM ƠN

Sau một thời học tập và nghiên cứu, em cũng đã hoàn thành luận văn “*Nghiên cứu ảnh hưởng của nitor bổ sung đến sinh trưởng và khả năng phân hủy hydrocacbon dầu mỏ của nấm men*”. Luận văn được hoàn thành không chỉ là công sức của bản thân em mà còn có sự giúp đỡ, hỗ trợ tích cực của nhiều cá nhân và tập thể.

Trước hết, em xin chân thành cảm ơn đến các thầy cô, Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã dạy dỗ, hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi để em hoàn thành luận văn.

Đặc biệt, em xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến TS. Kiều Thị Quỳnh Hoa – Phòng Vi sinh vật dầu mỏ - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam người trực tiếp hướng dẫn luận văn cho em. Cô đã dành cho em nhiều thời gian, tâm sức, cho em nhiều ý kiến, nhận xét quý báu, chỉnh sửa cho em những chi tiết nhỏ trong luận văn, giúp luận văn của em được hoàn thiện hơn về mặt nội dung và hình thức. Cô cũng đã luôn quan tâm, động viên, nhắc nhở kịp thời để em có thể hoàn thành luận văn đúng tiến độ.

Em cũng gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ – Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ em trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, em cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất tới ba mẹ, người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn bên cạnh, động viên và tiếp thêm niềm tin, động lực cho em trên con đường học tập và rèn luyện bản thân.

Em xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 14 tháng 11 năm 2024

Học viên


Nguyễn Thị Diễm Quỳnh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan tình hình ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ	3
1.1.1. Tình hình ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ trên thế giới	3
1.1.2. Tình hình ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ ở Việt Nam.....	5
1.1.3. Ảnh hưởng của ô nhiễm dầu đến con người và môi trường	6
1.2. Các phương pháp xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm dầu	8
1.2.1. Phương pháp cơ học (vật lý)	8
1.2.2. Phương pháp hóa học	8
1.2.3. Xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation)	9
1.3. Chất hoạt động bề mặt sinh học	14
1.3.1. Khái niệm chất hoạt động bề mặt sinh học	14
1.3.2. Tính chất và ứng dụng chung của CHĐBMSH	15
1.3.3. Vai trò của chất hoạt động bề mặt sinh học trong quá trình phân hủy hydrocarbon dầu mỏ bằng VSV	15
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.....	16
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	16
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	17
2.2.1. Định danh chủng nấm men có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học	17
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô và nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men lựa chọn	18
2.2.3. Thiết lập mô hình thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men lựa chọn	19

2.2.4. Phương pháp pha loãng tới hạn MPN (most probable number) ...	20
2.2.5. Phương pháp xác định dầu thô tổng số (TPH).....	21
2.2.6. Xử lý số liệu	21
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	22
3.1. Định danh các chủng nấm men có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất dầu chất hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô). 22	
3.1.1. Khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô	22
3.1.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng DSNM1, VTNM1, NTN16.....	25
3.1.3. Phân loại các chủng nấm men nghiên cứu bằng phân tích trình tự gen.....	27
3.2. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của tập hợp chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô	31
3.3. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ bổ sung đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men	35
3.3.1. Thiết lập thí nghiệm nghiên cứu	35
3.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của chủng nấm men nghiên cứu	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	41
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
CHĐBMSH		Chất hoạt động bề mặt sinh học
VSV		Vi sinh vật
TPH	Total Petroleum Hydrocarbons	Hàm lượng dầu tổng số
HS		Môi trường Hansen
MSM	Minimal salt medium	Môi trường khoáng
MPN	Most probable number	Phương pháp số có xác suất lớn nhất
INT	Iodonitrotozolium violet	

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1 Một số sự cố tràn dầu nghiêm trọng trên thế giới	3
Bảng 1.2. Một số sự cố tràn dầu nghiêm trọng ở Việt Nam	5
Bảng 2.1. Máy móc và thiết bị sử dụng cho nghiên cứu	16
Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc 3 chủng nấm men trên môi trường Hansen	27
Bảng 3.2 CHĐBMSH được tổng hợp bởi 3 chủng nấm men được xác định bằng chỉ số nhũ hóa E ₂₄ (%)	36
Bảng 3.3. Hàm lượng chất dinh dưỡng (C, N, P, K) trong cát sử dụng cho thí nghiệm	37
Bảng 3.4. Mật độ tập hợp chủng nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỡ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau	37

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Sự cố tràn dầu Deepwater Horizon năm 2010 (trái) Vụ tràn dầu Amoco Cadiz năm 1978 (phải)	5
Hình 1.2. Sự cố đắm tàu Đức Cường tại biển Nghi Sơn – Thanh Hóa	6
Hình 3.1. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 trong 18 ngày	23
Hình 3.2. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 trong 18 ngày	23
Hình 3.3. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 trong 18 ngày	24
Hình 3.4. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 trong 18 ngày	24
Hình 3.5. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTN16 trong 18 ngày	25
Hình 3.6. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 trong 18 ngày	25
Hình 3.7. Hình thái khuẩn lạc của 3 chủng nấm men trên môi trường thạch HS	26
Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loại của chủng nấm men DSNM1	27
Hình 3.9. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	29
Hình 3.10. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	29
Hình 3.11. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	30
Hình 3.12. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	31
Hình 3.13. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTN16 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	32

Hình 3.14. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 với các hàm lượng dầu thô khác nhau	32
Hình 3.15. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 với các nguồn nitơ khác nhau	33
Hình 3.16. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 với các nguồn nitơ khác nhau	33
Hình 3.17. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 với các nguồn nitơ khác nhau	34
Hình 3.18. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 với các nguồn nitơ khác nhau	34
Hình 3.19. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTNM16 với các nguồn nitơ khác nhau	35
Hình 3.20. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 với các nguồn nitơ khác nhau	35
Hình 3.21. Thí nghiệm xử lý cát ô nhiễm dầu với các hàm lượng nitơ khác nhau	36
Hình 3.22. Sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau	38
Hình 3.23. Hàm lượng dầu thô tổng số trong thí nghiệm với các hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần	39
Hình 3.24. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men sau 8 tuần	39

MỞ ĐẦU

❖ Tính cấp thiết

Hoạt động thăm dò, khai thác và vận chuyển dầu mỏ đã mang lại nhiều lợi ích cho nền kinh tế và xã hội nhưng cũng chứa đựng những tiềm ẩn về nguy cơ gây ô nhiễm môi trường do các sự cố tràn dầu. Ô nhiễm dầu làm thay đổi môi trường sống của nhiều loài động thực vật, axit hoá nước biển, dầu tràn trên biển làm cản trở sự quang hợp của các thực vật phù du, phá hủy hệ sinh thái biển. Do đó, xử lý ô nhiễm dầu tràn trên biển đang là vấn đề được các quốc gia trên toàn thế giới quan tâm.

Hiện có nhiều phương pháp được ứng dụng nhằm khắc phục tình trạng ô nhiễm dầu như phương pháp vật lý, cơ học (ngăn chặn, thu gom, làm đất, đốt tại chỗ, hấp phụ...), hóa học (sử dụng chất phân tán, chất keo tụ, chất làm đông...) và sinh học (phân hủy hydrocarbon dầu mỏ bởi VSV, thực 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. Vì vậy, việc ứng dụng các phương pháp sinh học, đặc biệt là phương pháp phân hủy hydrocarbon dầu mỏ bằng vi sinh vật (VSV) ngày càng được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học 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.

Khi sự cố tràn dầu xảy ra, dưới tác động của sóng gió, thủy triều, dầu tràn ô nhiễm thường trôi dạt vào ở các vùng triều ven biển. Tại đây, quá trình phân hủy các hydrocarbon dầu mỏ bởi các VSV bản địa diễn ra chậm do mật độ VSV thấp và khu vực ô nhiễm nghèo dinh dưỡng. Do đó, việc bổ sung chất dinh dưỡng phù hợp là cần thiết để nâng cao hiệu quả phân hủy hydrocarbon dầu mỏ sinh học. Ở Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng công nghệ phân hủy sinh học (Bioremediation) để xử lý ô nhiễm dầu tràn tại các khu vực ven biển còn rất hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng dinh dưỡng (nitơ, photpho, kali...) tới khả năng sinh trưởng và phát triển của VSV trong xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm dầu.

Xuất phát từ tình hình ô nhiễm dầu tràn ven biển ngày càng gia tăng ở các quốc gia trên thế giới cũng như ở Việt Nam, cùng với sự cần thiết tìm kiếm

các giải pháp thay thế an toàn và hiệu quả với môi trường, đề tài luận văn: **“Nghiên cứu ảnh hưởng của nitơ bổ sung đến sinh trưởng và khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ của nấm men”** được tiến hành nghiên cứu. Kết quả thu được từ nghiên cứu này sẽ góp phần nâng cao khả năng xử lý đất/cát/trầm tích ven biển ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ bằng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation).

❖ **Mục đích nghiên cứu**

Đánh giá được ảnh hưởng của hàm lượng nitơ tới sinh trưởng và hiệu quả phân hủy cát ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô) của tập hợp chủng nấm men nhằm nâng cao hiệu quả xử lý dầu tràn ô nhiễm ở vùng triều ven biển.

❖ **Nội dung nghiên cứu**

Nội dung 1: Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô).

Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men nghiên cứu trên nguồn cơ chất hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô).

Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ bổ sung đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ (dầu thô) của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu.

NỘI DUNG

Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan tình hình ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ

Dầu mỏ là nguồn năng lượng được sử dụng rộng rãi trong đời sống do đó ô nhiễm dầu mỏ đã trở thành một mối đe dọa lớn tới môi trường sinh thái và con người. Sự gia tăng nồng độ hydrocarbon dầu mỏ trong môi trường biển có tác động tiêu cực không chỉ đối với đời sống thủy sinh mà còn có thể ảnh hưởng đến sức khỏe con người [1]. Các hydrocarbon dầu mỏ trong nước có thể ngăn chặn sự xâm nhập của oxy, làm chết các sinh vật dưới nước [2].

Dầu mỏ và các sản phẩm của dầu mỏ đang ngày càng gây ô nhiễm nghiêm trọng đến biển và đại dương. Theo số liệu thống kê, hàng năm có tới 3,2 triệu tấn dầu tràn gây ô nhiễm trong đó nguồn lớn nhất là từ lục địa (37%) chủ yếu là chất thải từ các ngành công nghiệp, các thành phố.... Dầu tràn ô nhiễm do va chạm, rò rỉ bởi hoạt động của tàu thuyền trên biển chiếm 33%. Dầu tràn do các tàu chở dầu gặp nạn vào khoảng 12%, từ khí quyển xâm nhập xuống là 9%, từ các nguồn tự nhiên khác 7%, còn dầu thất thoát từ quá trình khai thác chỉ chiếm 2% tổng số dầu đổ vào biển và đại dương [1].

Dầu tích tụ dưới đáy biển thấm qua các vết nứt của các đứt gãy địa chất. Mức độ thấm dầu có liên quan đến cường độ và tần suất của các hoạt động kiến tạo của lớp vỏ Trái Đất. Theo thống kê, lượng dầu hàng năm thấm thấu vào đại dương được ước tính vào khoảng $(0,025 \sim 2,5) \times 10^6$ tấn [3].

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

Kể từ khi ngành khai thác dầu mỏ hình thành và phát triển đã xảy ra hàng loạt các sự cố liên quan đến rò rỉ, tràn dầu nghiêm trọng từ các giếng khai thác, các nhà máy lọc dầu và nhiều nhất là từ các vụ va chạm, đắm tàu chở dầu xảy ra thường xuyên trên các tuyến đường hàng hải trên biển, sông, Một số sự cố tràn dầu nghiêm trọng trên thế giới được trình bày ở Bảng 1.1

Bảng 1.1 Một số sự cố tràn dầu nghiêm trọng trên thế giới [4,5]

Tên sự cố	Năm	Địa điểm	Lượng dầu tràn (tấn)
Sự cố tàu Amoco Cadiz	1978	Pháp	257.407

Tàu Atlantic Empress	1979	Bờ biển Tobago, Đông Ấn	287.000
Tàu Castillo de Bellver	1983	Vịnh Saldanha, Nam Phi	252.000
Chiến tranh vùng vịnh	1991	Kuwait	800.000
Sự cố tràn dầu tại quần đảo Shatlanl	1993	Scotland	93.000
Tàu chở dầu Prestige gặp tai nạn	2002	Hi Lạp	60.000
Tai nạn tàu chở dầu	2007	Hồng Kông	105.000
Nổ giàn khoan khai thác dầu Deepwater Horizon	2010	Vịnh Mexico	500.000
Dầu tràn Magnolia	2013	Biên giới bang Louisiana	7000
Vỡ giếng khai thác dầu Colombia	2018	Santander	168.000
Sự cố tràn dầu diesel Norilsk	2020	Nga	17.500
Tràn dầu ở khu vực bờ biển Peru do đường ống gặp sự cố	2022	Peru	1700
Tai nạn tàu MT Princess Empress	2023	Philippines	900

Có thể thấy đa phần các sự cố gây tràn dầu đều xuất phát từ việc vận chuyển dầu đây là nguyên nhân quan trọng nhất gây ô nhiễm biển và đại dương bởi vì trên 60% tổng sản lượng dầu mỏ khai thác được trên thế giới được vận chuyển bằng đường biển. Các nhà khoa học đã ước tính tổng lượng dầu tràn vào đại dương do hoạt động kinh tế - xã hội của con người từ 0,7 đến 1,7 triệu tấn. Theo tài liệu của Viện Tài Nguyên Thế Giới (WRI) chỉ trong giai đoạn 1973- 1986 trên biển đã xảy ra 434 tai nạn trong tổng số 53581 tàu chở dầu và làm tràn 2,4 triệu tấn dầu [5].



Hình 1.1: Sự cố tràn dầu Deepwater Horizon năm 2010 (trái)
 Vụ tràn dầu Amoco Cadiz năm 1978 (phải). Nguồn: VOV.vn

1.1.2. Tình hình ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ ở Việt Nam

Việt Nam với vị trí địa lý chiến lược quan trọng, khi có biển Đông là một phần của nhiều tuyến đường vận tải chính trên biển của toàn thế giới. Vì thế các vụ tai nạn tàu chở dầu ở trong và ngoài nước khi lưu thông trong vùng lãnh hải của Việt Nam là nguyên nhân chủ yếu gây ra ô nhiễm dầu ở nước ta (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Một số sự cố tràn dầu nghiêm trọng ở Việt Nam [1,2,6,7]

Sự cố	Năm	Địa điểm	Lượng dầu tràn
Tàu chở dầu Malaysia	1994	Biển Cần Giờ và Nhà Bè	1.890 tấn dầu diesel 100 tấn dầu mazut
Hoạt động khai thác	2001	Biển Vũng Tàu	900 tấn dầu thô
Sự cố tàu chở dầu	2005	Biển Cát Lái, Đồng Nai	100 tấn dầu thô
Sự cố hỏng van dầu	2009	Kho chứa dầu Quân đội (Đà Nẵng)	1.500 tấn dầu thô
Tàu chở dầu biển Đông 50	2010	Biển Vũng Tàu	382 tấn dầu thô
Sự cố đắm tàu Đức Cường	2017	Biển Nghi Sơn (Thanh Hóa)	18 tấn dầu thô
Sự cố hạ thủy tàu	2021	Biển Đà Nẵng	4 tấn dầu thô
Chìm tàu Hà An	2022	Biển Thái Bình	1000 tấn dầu DO

Dầu thải của các tàu lớn	2023	Biển Phú yên	Dầu thải (cặn dầu FO) trôi vào ven bờ biển dài khoảng 5km
Chưa xác định	2024	Biển Hải Phòng	Vệt dầu rộng 1-3m dài 300m

Hiện trạng ô nhiễm dầu trong và ngoài nước đã cho thấy vấn đề xử lý ô nhiễm dầu ở Việt Nam nói riêng và trên thế giới nói chung đang trở nên cấp thiết.



Hình 1.2. Sự cố đắm tàu Đức Cường tại biển Nghi Sơn – Thanh Hóa. Nguồn: Báo Tiền phong

1.1.3. Ảnh hưởng của ô nhiễm dầu đến con người và môi trường

Ô nhiễm hydrocacbon (HC) dầu mỏ gây ảnh hưởng tiêu cực tới động vật biển, môi trường sinh thái và sức khỏe con người [8]. Dưới tác động của sóng, gió, thủy triều, dầu tràn xâm nhập vào đất liền cản trở việc cung cấp chất dinh dưỡng, oxy, ánh sáng và các nhân tố thiết yếu khác cho sinh trưởng và phát triển của động thực vật. Điều này có thể ảnh hưởng đến độ phì nhiêu của đất (sự phát triển của cây và sự nảy mầm của hạt) và do đó làm giảm năng suất nông nghiệp [9,10]. Các chất ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ gây ra các tác động tiềm ẩn hoặc tức thời như đột biến gen, gây quái thai, sinh ung thư, làm suy giảm hệ miễn dịch của sinh vật sống [11,12]. Dạng hydrocacbon độc hại khó phân hủy cũng có thể hấp thụ vào đất và trầm tích, tích tụ trong các sinh vật (cá, thực vật và các sinh vật sống dưới nước khác), và có thể được chuyển đến chuỗi thức ăn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến các sinh vật sống [9]. Sự tích tụ hydrocarbon sinh học cũng gây ra các khuyết tật trong các giai đoạn sinh sản, hệ miễn dịch, thần kinh và phát triển (gây quái thai) và cũng gây ung thư da, phổi, bàng quang, gan và dạ dày ruột [13, 14]. Do đó, việc tiếp xúc với hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm gây ra tác động nguy hiểm đến sức khỏe của con

người. Ngoài ra, độc tính của hydrocacbon dầu mỏ làm giảm sự đa dạng ở mức độ loài của quần thể, quần xã sinh vật trong môi trường đất bị ô nhiễm [15].

Dầu tràn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến kinh tế của người dân ở các vùng ven biển, làm ảnh hưởng trực tiếp tới hoạt động du lịch, nuôi trồng thủy hải sản ven biển. Ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ trong thời gian dài sẽ phá hủy hệ sinh thái [1, 16].

Sinh vật biển bị ảnh hưởng nặng nề bởi hydrocarbon dầu mỏ độc hại. Hàng năm, có khoảng 250.000 con chim biển ở nước Anh bị chết do dầu tràn ô nhiễm. Chỉ tính riêng vụ đắm tàu chở dầu Torrey Canyon đã giết chết 25000 con chim thuộc 17 loài khác nhau [17]. Dầu loang khiến cá biển phải tránh xa những khu vực sinh sống tự nhiên của chúng, và đã làm biến mất loài cá Trích tại vùng đảo Hokaido (Nhật Bản). Các loài cá và nhuyễn thể có sức đề kháng kém đối với dầu, dầu xâm nhập vào cơ thể chúng, tích tụ trong các mô mỡ, có khả năng gây ung thư. Sinh vật phù du ở biển cũng bị chết do lớp váng dầu ngăn cản oxy xâm nhập vào nước biển. Trong vụ tràn dầu tàu Tampico Marry (3/1975) ở vùng biển California, Mỹ, 1/3 trong tổng số loài rong biển ở đây đã biến mất vì không thể quang hợp được do các vết dầu loang [18]. Dầu có thể làm chết các rạn san hô, dẫn tới sự suy thoái về đa dạng sinh học tại các đảo và các vùng ven bờ. Dầu làm ảnh hưởng đến các rừng ngập mặn, làm mất nơi trú ngụ, phá hủy nguồn cung cấp thức ăn cho sinh vật biển. Khi dầu xâm nhập vào các bờ biển đã tạo thành các váng dầu lưu động trên các bãi biển nếu không thu gom và xử lý sớm, các váng dầu này sẽ loang rộng. Ô nhiễm dầu tại các bãi tắm và các khu giải trí ven biển cũng gây cản trở các hoạt động nghỉ dưỡng của khách du lịch [16]. Các khách sạn, nhà hàng và những người sống nhờ vào du lịch sẽ bị giảm thu nhập. Ngay cả khi đã nỗ lực làm sạch thì các khu vực ô nhiễm này cũng sẽ mất rất nhiều thời gian để khôi phục lại các hoạt động du lịch như trước khi xảy ra sự cố. Các nhà máy sử dụng nước biển để làm mát các thiết bị cũng có thể bị dầu làm ảnh hưởng, gây tắc nghẽn, làm giảm năng suất máy [19]. Dầu có thể trực tiếp làm tổn hại các tàu thuyền, ghe lưới đánh cá và dụng cụ nuôi trồng thủy sản cũng như gián tiếp làm suy giảm năng suất đánh bắt và nuôi trồng do lo lắng không tiêu thụ được những sản phẩm bị sản xuất trong khu vực bị ô nhiễm [16]. Ngoài ra, ảnh hưởng của các chất phân tán hóa học được sử dụng để làm sạch khu vực ô nhiễm dầu cũng gây ảnh hưởng

độc hại đối với các loài động thực vật và các hoạt động của con người trong vùng bị ô nhiễm [20].

1.2. Các phương pháp xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm dầu

1.2.1. Phương pháp cơ học (vật lý)

Các phương pháp cơ học (vật lý) khác nhau được sử dụng để xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ phải kể đến là thiêu hủy, giải hấp nhiệt và đóng rắn đất/cát ô nhiễm tại các vùng ô nhiễm [3].

Mặc dù được coi là hiệu quả, nhưng các phương pháp thiêu hủy và giải hấp sẽ gây ra những thiệt hại nghiêm trọng, làm mất phần lớn giá trị dinh dưỡng của đất [21]. Các phương pháp này cũng tạo ra các khí độc hại như carbon dioxide, carbon monoxide, sulfur dioxide và nitơ oxit, là những khí gây hiệu ứng nhà kính. Phương pháp đóng rắn bao gồm việc chuyển đất/cát, trầm tích bị ô nhiễm tới một khu vực tập kết hoặc phủ lên chúng một lớp phủ không thấm nước.

1.2.2. Phương pháp hóa học

Các phương pháp hóa học thường được áp dụng để xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm dầu như sử dụng chất phân tán, chất nhũ hóa [3].

Về cơ bản, chất phân tán là chất xúc tác bề mặt có cấu trúc phân tử phân cực, một bên hấp phụ dầu (gốc oleophil) và một bên hấp phụ nước (gốc hydrophil). Khi được phun vào váng dầu, chất phân tán sẽ làm giảm sức căng bề mặt của mặt tiếp xúc dầu – nước, làm cho dầu loang hình thành các giọt nhỏ ($\leq 0,2$ mm). Do đó tăng diện tích tiếp xúc bề mặt của vệt dầu ban đầu [22]. Các giọt dầu này sẽ bị phân hủy nhanh (dầu nhẹ), hay lắng chìm dần (dầu nặng). Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp hóa học là do sử dụng các hóa chất độc hại sẽ ảnh hưởng tới sức khỏe của người, động thực vật hay hệ sinh thái biển đặc biệt là ở các vùng triều ven biển nơi tập trung nhiều dân cư có ngành du lịch và nuôi trồng thủy hải sản phát triển.

Để giải quyết các nhược điểm của hai phương pháp này, các nhà nghiên cứu trên thế giới hiện đặc biệt quan tâm tới phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation). Ưu điểm của phương pháp này là xử lý hiệu quả, triệt để, an toàn và thân thiện với môi trường. Phương pháp này có thể tận dụng được nguồn vi sinh vật sẵn có tại vùng xử lý, và chi phí thấp [3].

1.2.3. Xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation)

Phương pháp phân hủy sinh học là phương pháp xử lý hiệu quả, an toàn thân thiện với môi trường và con người. Phương pháp này có thể được sử dụng ngay sau khi các biện pháp ứng cứu nhanh sự cố tràn dầu như sử dụng phao quay dầu và máy hút dầu được tiến hành. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, một số loài VSV có khả năng sử dụng hydrocacbon dầu mỏ như nguồn carbon duy nhất, hoặc những sản phẩm phân hủy hydrocarbon của các VSV này lại là nguồn cơ chất sinh trưởng và phát triển cho những VSV khác [23]. Hydrocacbon dầu mỏ có thể được oxy hóa triệt để, sản phẩm cuối cùng là các axit hữu cơ đơn giản, CO₂, nước và sinh khối VSV, các sản phẩm này không gây ô nhiễm cho môi trường.

* Phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) gồm hai phương thức:

Phương thức kích thích sinh học (Biostimulation): Bổ sung các chất dinh dưỡng cần thiết: nguồn nitơ (N), photpho (P), các khoáng chất khác như Kali (K), vi lượng (Fe, Mg...) cho hệ VSV bản địa có khả năng phân hủy dầu. VSV cần nguồn dinh dưỡng carbon, nitơ, photpho hợp lý để sinh trưởng và phát triển. Phương pháp kích thích sinh học được ứng dụng nhiều và đem lại hiệu quả cao trong môi trường ô nhiễm nơi có sẵn VSV phân hủy dầu bản địa.

Phương thức thúc đẩy sinh học (Bioaugmentation): Khác với phương pháp kích thích sinh học, phương pháp thúc đẩy sinh học bổ sung chế phẩm sinh học có chứa VSV vật phân hủy dầu vào môi trường bị ô nhiễm. Phương pháp này có hiệu quả khi ứng dụng ở môi trường mới bị ô nhiễm dầu, mật độ VSV phân hủy dầu không có hay thấp [24].

Ưu điểm của phương pháp phân hủy sinh học là xử lý dầu hiệu quả, triệt để, chi phí xử lý phù hợp và hầu như không gây ảnh hưởng đến môi trường và hệ sinh thái. Các phương pháp vật lý và hóa học được sử dụng tuy có những hiệu quả nhất định nhưng thường tốn kém và gây ô nhiễm thứ cấp. Với các ưu điểm vượt trội như xử lý triệt để, an toàn và thân thiện với môi trường, phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) được xem là phù hợp để làm sạch ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ. Với các phương thức kích thích và thúc đẩy sinh học, phương pháp phân hủy sinh học ngày càng được ứng dụng rộng rãi để xử lý dầu ô nhiễm đặc biệt là ở các vùng ô nhiễm dầu ven biển, nơi mà xử lý bằng

phương pháp hóa học và vật lý ảnh hưởng tiêu cực tới người và sinh vật sống [25].

1.2.4. Vi sinh vật phân hủy hydrocarbon dầu mỏ

Các VSV được sử dụng phổ biến trong quá trình xử lý đất/cát và trầm tích ô nhiễm dầu phải kể đến là:

* Nấm men: Nấm men cũng có thể được sử dụng trong quá trình phân hủy sinh học các hydrocarbon dầu mỏ, trong số đó, có *Debayomyces*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* và một số loài *Candida* được sử dụng phổ biến [26]. Nấm men *Candida viswanathii* đã được chứng minh có thể phân hủy phenanthrene (khối lượng phân tử thấp) với hiệu quả đạt 77,21 - 89,76% và benzopyrene (khối lượng phân tử cao) đạt 55,53 - 60,77%. Nấm men có khả năng thích nghi cao, chẳng hạn như chủng nấm *Candida digboiensis* được phân lập từ đất axit pH thấp ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ [27].

* Nấm mốc: Nấm mốc được biết đến với sự đa dạng và khả năng phân hủy các chất khó phân hủy và độc hại như các hợp chất hydrocarbon dầu mỏ [26]. *Stropharia coronilla* oxy hóa benzopyrene thông qua MnP và *Pleurotus ostreatus* phân hủy benzantracene, chrysene, benzofluoranthene, benzopyrene, dibenzanthracene và benzoperylene qua laccase và MnP [26,27].

* Vi khuẩn: Các vi khuẩn như *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* và *Mycobacterium* có khả năng sử dụng các hydrocarbon thơm làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất [3]. Quá trình phân hủy hiếu khí được thực hiện bởi các enzym dioxygenases sử dụng oxy trong quá trình phân hủy. Đầu tiên, chúng oxy hóa phân tử carbon thông qua một phức hợp đa enzym (enzym loại oxygenase) tạo ra một hydrocarbon có phân tử nhóm rượu. Các enzym khác oxy hóa nhóm rượu thành nhóm aldehyde và cuối cùng thành axit cacboxylic. Do đó, một phân tử tương tự như một axit béo, được tạo ra và nó có thể dễ dàng phân hủy thành acetyl bằng quá trình oxy hóa [26]. Sự phân hủy sinh học cũng có thể xảy ra trong điều kiện không có oxy, vì nó xảy ra trong các trầm tích hoặc bể xử lý hydrocarbon tại vị trí sâu, mà ở đó đa phần chỉ tồn tại vi khuẩn kỵ khí. Vi khuẩn sử dụng nitrat, sunfat và sắt làm chất nhận điện tử cho quá trình trao đổi chất của chúng. Một số vi khuẩn kỵ khí đã được xác nhận có khả năng phân hủy sinh học hydrocarbon là

Dechloromonas aromatica và một số loài từ chi *Azoarcus*, *Thauera sp.* [28, 21].

* Hỗn hợp các VSV: Thực tế, các VSV có thể cùng kết hợp với nhau để phân hủy hiệu quả hydrocarbon dầu mỏ trong môi trường ô nhiễm [26, 29]. Một số VSV đã được kết hợp thử nghiệm trong điều kiện khắc nghiệt để kiểm tra khả năng thích nghi của chúng. Đó là trường hợp cùng sử dụng *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Ralstonia sp.* và *Microbacterium sp.*, để xử lý hydrocarbon thơm có trọng lượng phân tử cao [26, 30]

1.2.5. Các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu bằng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation)

Các yếu tố môi trường và dinh dưỡng như nguồn carbon, nitơ, phốt pho, oxy, nhiệt độ, độ muối, pH... ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ và hiệu quả phân hủy hydrocarbon dầu mỏ của VSV. Oxy và chất dinh dưỡng như hàm lượng nitơ, phốt pho, kali, các yếu tố vi lượng. (Fe, Mg, ...) thường được bổ sung tại các khu vực ô nhiễm dầu tràn để tăng cường quá trình phân hủy sinh học của VSV nội tại (phương thức kích thích sinh học). Đây là các yếu tố có thể kiểm soát bằng việc bổ sung vào môi trường ô nhiễm dầu. Một số yếu tố ảnh hưởng khác như độ mặn, hàm lượng dầu thường khó có thể thể kiểm soát ở các khu vực bị ô nhiễm [13, 31].

1.2.5.1. Oxy

Trong hầu hết các trường hợp, phân hủy sinh học là một quá trình oxy hóa. Vì vậy oxy là một trong những nhân tố quan trọng đối với quá trình phân hủy hydrocarbon của VSV hiếu khí. Nồng độ oxy trong quá trình phân hủy chất hữu cơ trong đất sẽ giảm xuống theo thời gian vì thế oxy, hoặc các nguồn oxy khác (hydrogen peroxid, ozon) có thể được thêm để thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học hiếu khí [32].

1.2.5.2. Nhiệt độ

Sự trao đổi chất của VSV bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. Hầu hết các VSV phát triển tốt trong khoảng 10 đến 38°C [29]. Việc kiểm soát nhiệt độ của các quá trình xử lý tại chỗ (*in situ*) là cực kỳ khó khăn và nhiệt độ của các quá trình xử lý trực tiếp ngoài hiện trường chỉ có thể tác động ở một mức độ nhất định. Nghiên cứu cho thấy, khi giảm nhiệt độ thí nghiệm từ 25°C xuống 5°C, tốc độ

phân hủy dầu có thể giảm tới 10 lần [33]. Nhiệt độ càng thấp, tốc độ phân hủy hydrocarbon của VSV càng chậm, thời gian phân hủy sẽ bị kéo dài.

1.2.5.3. pH

Giá trị pH hiệu quả cho hầu hết các quá trình xử lý sinh học là từ 5,5 đến 8 [30]. Đây cũng là khoảng pH thích hợp cho nhiều VSV dị dưỡng chiếm ưu thế trong hầu hết các công nghệ xử lý sinh học. Tuy nhiên, giá trị pH thích hợp cho các quá trình phân hủy sinh học khác nhau là không giống nhau. Giá trị pH bị ảnh hưởng bởi mối quan hệ phức tạp giữa các sinh vật, chất gây ô nhiễm, và các đặc tính hóa lý sẵn có tại khu vực bị ô nhiễm [32].

1.2.5.4. Độ ẩm

Độ ẩm là một biến số rất quan trọng liên quan đến quá trình xử lý sinh học. Độ ẩm của đất/cát/trầm tích làm thay đổi đặc tính sinh học của chất gây ô nhiễm, sự luân chuyển dòng khí, mức độ độc hại của chất gây ô nhiễm, tác động đến khả năng di chuyển, phát triển của VSV, và sự phân bố của chúng [26]. Trong quá trình phân hủy sinh học, nếu hàm lượng nước quá cao, oxy trong khí quyển sẽ khó xâm nhập vào đất và đây có thể là yếu tố hạn chế hiệu quả sinh trưởng và khả năng phân hủy hydrocarbon dầu ô nhiễm trong đất của VSV.

1.2.5.5. Nhu cầu dinh dưỡng cần thiết cho sinh trưởng và phát triển của VSV phân hủy dầu

Hiện nay, hầu hết các phương pháp sinh học xử lý tại chỗ các chất ô nhiễm đều được thực hiện dựa vào phương thức kích thích sinh học (biostimulation), kích thích sự phát triển các quần thể VSV bản địa ngay tại nơi xảy ra ô nhiễm. Bằng cách bổ sung các chất dinh dưỡng (carbon, nitơ và photpho) thích hợp, đồng thời duy trì các điều kiện tối ưu về pH, độ ẩm và các yếu tố ảnh hưởng khác giúp thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của các VSV phân hủy sinh học bản địa nhằm nâng cao hiệu quả xử lý các chất ô nhiễm [32]. Hỗn hợp dầu mỏ vốn rất giàu carbon (C) nhưng nghèo (N) và (P) dẫn đến việc mất cân bằng về hàm lượng chất dinh dưỡng và đây là yếu tố hạn chế sự phát triển của VSV phân hủy hydrocarbon dầu mỏ tại khu vực xử lý. Vì vậy, việc làm cân bằng tỷ lệ giữa C: N: P là cần thiết để VSV phân hủy hydrocarbon dầu mỏ có thể phát triển ổn định. Tỷ lệ dinh dưỡng (C: N: P) - đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển tối ưu của VSV trong môi trường ô nhiễm [32]. Việc bổ sung các nguồn nitơ vô cơ như KNO_3 đã được chứng minh giúp làm tăng quá

trình phân hủy sinh học phenanthrene, sử dụng $10\text{NO}_3\text{-P}$ làm chất dinh dưỡng đã giảm thời gian xử lý xuống còn 14 ngày so với 78 ngày khi không bổ sung $10\text{NO}_3\text{-P}$ [28].

1.2.5.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng và phát triển của VSV phân hủy dầu trong quá trình phân hủy Bioremediation

Trong quá trình sinh trưởng, phát triển hình thành tế bào mới, VSV nói chung và VSV phân hủy dầu nói riêng cần các chất dinh dưỡng thiết yếu như N, P, K và các nguyên tố vi lượng [28]. Trong đó, N và P được xem như yếu tố không thể thiếu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của VSV phân hủy dầu vì đây là yếu tố tiên quyết, ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy dầu sinh học [14, 34].

Tuy nhiên, đất/cát/trầm tích ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ thường bị hạn chế dinh dưỡng do nguồn carbon chủ yếu là hydrocarbon dầu mỏ khó phân hủy và đặc biệt là nguồn chất dinh dưỡng cần thiết khác như N, P, K và các nguyên tố vi lượng khác bị hạn chế. Do đó, phương pháp xử lý này phụ thuộc vào một số yếu tố như hàm lượng N, P, K, nhiệt độ, hàm lượng oxy, các nguyên tố vi lượng... [35]. Trong số các yếu tố kể trên, N được cho là chất dinh dưỡng quan trọng nhất ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy hydrocarbon dầu mỏ khi sử dụng phương pháp Bioremediation để xử lý đất, cát và trầm tích ô nhiễm dầu. Hàm lượng nitơ bị hạn chế là do nitơ trong đất có thể bị rửa trôi khi ở dạng nitrate và bay hơi khi ở dạng NH_3 hay nitơ bị khử thành khí N_2O và N_2 [36]. Để giải quyết vấn đề này, các nhà nghiên cứu khuyến nghị cần bổ sung thêm N, P với tỷ lệ nitơ / photpho (N / P) phù hợp từ 2,9:1 đến 80:1 giúp nâng cao khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ. Điều này có thể được thực hiện bằng cách bổ sung urê, photphat, phân N-P-K, các muối amoni, và muối photphat [37,38,39].

Walecka-Hutchison and Walworth (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ N khác nhau (0, 250, 500 và 1000 mgN/kg đất) tới khả năng phân hủy đất ô nhiễm dầu diesel với nồng độ ban đầu không giống nhau (5.000, 10.000 và 20.000 mg TPH/kg đất). Kết quả cho thấy, hàm lượng N tối ưu để phân hủy cả ba nồng độ dầu diesel ban đầu là 250 mgN/kg. Aspraty *et al.* (2008) đã xác định được hàm lượng N tối ưu khác nhau từ 47 đến 373 mgN/kg đất khô - tùy thuộc vào nồng độ dầu tổng số (TPH) ban đầu và loại đất. Walworth *et al.* (2007) đã chứng minh rằng ở hàm lượng 2500 mgN/kg đất khô, sự ức chế hoạt

động của VSV bắt đầu xuất hiện. Các tác giả đã chỉ rõ mối quan hệ giữa nước trong đất và sự tiêu thụ oxy trong đất ô nhiễm dầu mỏ. Các nhà khoa học khác cũng cho thấy VSV bị ức chế bởi áp suất thẩm thấu. Nước trong đất bị giảm khi bổ sung muối chứa nitơ (NH_4NO_3) hoặc không chứa nitơ (NaCl). Chính vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ khác nhau tới quá trình sinh trưởng của VSV phân hủy dầu và hiệu quả phân hủy dầu sinh học là quan trọng để lựa chọn ra hàm lượng nitơ phù hợp giúp tối ưu khả năng phân hủy.

Nitơ được bổ sung vào đất ô nhiễm dầu thường ở dạng vô cơ, hầu hết là muối amoni. Tuy nhiên, các nguồn N khác đã được sử dụng, như ure và nitrate [39]. Theo Jin and Fallgren (2007), NH_4Cl không những nâng cao khả năng phân hủy TPH sinh học hơn so với ure khi bổ sung với hàm lượng tương đương, mà các tác giả này còn chứng minh được ure ức chế sự phân hủy dầu sinh học. Nói chung, so với các dạng nitơ khác ($\text{NO}_3\text{-N}$), $\text{NH}_4\text{-N}$ là dạng nitơ được VSV sử dụng dễ dàng nhất. Nitơ trong amoni ở dạng khử, cũng như trong amino acids. Chính vì vậy, N trong muối amoni dễ dàng thúc đẩy thành axit amin và các quá trình trao đổi chất khác của VSV hơn so với nitrate [40]. Theo Shewfelt *et al.* (2005), $\text{NH}_4\text{-N}$ làm tăng tốc độ và giảm thời gian phân hủy TPH so với nitrate.

Ngoài ra, ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ với nồng độ cao cũng có thể làm thay đổi tỷ lệ N, P, K và dẫn đến thiếu oxy. Nói chung, khi hàm lượng chất dinh dưỡng (N, P...) được bổ sung không phù hợp (quá nhiều hoặc quá ít) vào đất/cát/trầm tích ô nhiễm dầu sẽ hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của VSV phân hủy [41,42,43]. Do đó, hiệu quả phân hủy hydrocarbon dầu mỏ sinh học phụ thuộc vào sự thay đổi của môi trường đất, tốc độ phân hủy dầu có thể được tăng cường khi bổ sung loại và hàm lượng tối ưu các chất dinh dưỡng.

1.3. Chất hoạt động bề mặt sinh học

1.3.1. Khái niệm chất hoạt động bề mặt sinh học

Chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) thường do VSV như vi khuẩn, nấm men, xạ khuẩn và nấm mốc tạo ra. Ưu điểm của CHĐBMSH so với chất hoạt động bề mặt hóa học có nguồn gốc từ các chất hóa học là có tính chọn lọc và đặc hiệu cao tại nhiệt độ, pH và độ mặn khắc nghiệt; độc tính thấp hơn; khả năng phân hủy sinh học cao hơn; và khả năng được tổng hợp từ nguồn nguyên liệu tái tạo [44].

CHĐBMSH được phân loại dựa trên cấu trúc hóa học như glycolipids, phospholipids, lipopeptides (surfactants), polymeric biosurfactants, và fatty acids hoặc dựa trên loại VSV sản xuất chúng bao gồm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men và nấm mốc [45, 46].

1.3.2. Tính chất và ứng dụng chung của chất hoạt động bề mặt sinh học.

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. Phần ưa nước thường bao gồm một trong các cấu trúc sau: axit amin, peptide anion hoặc cation và carbohydrate. Phần kỵ nước thường bao gồm các peptide, protein hoặc axit béo có thể bão hòa hoặc không bão hòa. Khả năng giảm sức căng bề mặt của CHĐBMSH thay đổi tùy theo cấu trúc hóa học của nó. Các chất hoạt động bề mặt sinh học là những ứng cử viên tiềm năng cho quá trình phân hủy sinh học vì chúng làm tăng khả năng hòa tan và khả dụng sinh học của các chất ô nhiễm kỵ nước như hydrocarbon dầu mỏ [47].

Do CHĐBMSH còn có nhiều đặc tính ưu việt hơn so với chất hoạt động bề mặt hóa học như: khả năng phân hủy sinh học bởi VSV, độc tính thấp nên đảm bảo an toàn khi ứng dụng trong dược – mỹ phẩm, xử lý môi trường. CHĐBMSH có thể được sản xuất số lượng lớn từ nguồn nguyên liệu thô hoặc rác thải công nghiệp, vừa mang lại hiệu quả kinh tế, vừa thân thiện với môi trường.

1.3.3. Vai trò của chất hoạt động bề mặt sinh học trong quá trình phân hủy hydrocarbon dầu mỏ bằng VSV

Sự phân hủy sinh học các chất ô nhiễm hữu cơ độc hại kỵ nước nói chung và hydrocarbon dầu mỏ nói riêng thường bị hạn chế bởi khả năng hòa tan của chúng. Do cấu tạo lưỡng cực, CHĐBMSH có khả năng nhũ hóa, tạo nhũ, tạo bọt làm giảm sức căng bề mặt giúp tăng cường sự tương tác giữa nước và hydrocarbon dầu mỏ, đồng thời làm giảm lực mao dẫn ngăn cản sự di chuyển của chất ô nhiễm [47]. Các hydrocarbon dầu mỏ có thể tạo nhũ trong môi trường nước, từ đó làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa VSV và phân tử dầu giúp nâng cao khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ ô nhiễm trong đất/cát/trầm tích hay nước [47]

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Tập hợp gồm 03 chủng nấm men biển (DSNM1, VTNM1, và NTN16) được sử dụng trong nghiên cứu này phân lập từ các mẫu nước, cát hay trầm tích nhiễm dầu lần lượt tại biển Hải Phòng (DSNM1), Vũng Tàu (VTNM1) và Nha Trang (NTNM16).

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

Dầu thô: Cung cấp bởi Xí nghiệp Khai thác dầu khí, Liên doanh Việt Nga, Vietsovpetro

Cát thí nghiệm: Cát ở vùng triều cao, bãi biển (Khu 1) Đồ Sơn, Hải Phòng được sử dụng cho thí nghiệm.

Môi trường nuôi cấy: Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu hầu hết là hóa chất của Merck (Đức), Sigma (Mỹ) và Trung Quốc

Môi trường Hansen		Môi trường khoáng (MSM)	
Hóa chất	Hàm lượng (g/L)	Hóa chất	Hàm lượng (g/L)
KH ₂ PO ₄	3	MgSO ₄	0,5
NaCl	20	NaCl	20
MgCl ₂	1	KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	2	MgCl ₂	1
Glucose	30	FeCl ₃	0,05
Pepton	10	Hàm lượng N theo tỷ lệ	Tỷ lệ phụ thuộc hàm lượng N bổ sung trong thí nghiệm
pH 6± 2		pH 6± 2	

Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bảng 2.1. Máy móc và thiết bị sử dụng cho nghiên cứu

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất
-----	--------------	---------------

1	Bể ổn nhiệt	Memmert (Đức)
2	Cân phân tích	Sartorius (Đức)
3	Kính hiển vi quang học	Carl Zeiss (Đức)
4	Máy đo quang phổ	Đức
5	Máy li tâm	Eppendorf (Mỹ)
6	Máy vortex	Ika (Đức)
7	Nồi khử trùng áp suất cao	Đài Loan
8	Tủ cấy vô trùng	Việt Nam
9	Máy đo pH	Hanna (Ý)
10	Máy lắc ổn nhiệt	Đài Loan
11	Máy PCR	Biorad (Mỹ)
12	Pipetman	Gilson (Pháp)
13	Đĩa petri	Đức
14	Các vật tư tiêu hao khác	Bình tam giác, đầu tip, ống eppendorf, ống fancol.....

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh chủng nấm men có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học

2.2.1.1. Phương pháp đánh giá khả năng sinh tổng CHĐBMSH của tập hợp nấm men

Ba chủng nấm men DSNM1, VTNM1, và NTN16 được nuôi lắc (180 vòng/ phút) trên môi trường khoáng (0.35% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) bổ sung 2% (w/v) dầu thô, 2% (w/v) NaCl, 2% (v/v) giống, pH6 và 30°C. Sau đó đánh giá khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của 3 chủng thông qua chỉ số nhũ hóa E_{24} .

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của các chủng nấm men nghiên cứu được đánh giá dựa trên chỉ số nhũ hóa E_{24} . Chỉ số nhũ hóa E_{24} là giá trị đặc trưng cho khả năng nhũ hóa của CHĐBMSH được tạo ra bởi nấm men với dung môi xylen sau 24 giờ ở 4°C. Hút chính xác 1 ml dịch nuôi cấy nấm men 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 [49].

Chỉ số nhũ hóa E_{24} được tính theo công thức:

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

2.2.1.2. Xác định đặc điểm hình thái của các chủng nấm men nghiên cứu

** Quan sát hình thái khuẩn lạc của tập hợp chủng nấm men (DSNMI, VTNMI, NTNMI6) nghiên cứu trên môi trường thạch đĩa*

Môi trường thạch HS sau khi khử trùng 121°C trong 20 phút được đổ vào các đĩa petri trong tủ cấy vô trùng. Các chủng nấm men 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 2-3 ngày nuôi cấy, tiến hành quan sát hình thái, màu sắc, đặc điểm khuẩn lạc của các chủng nấm men trên môi trường thạch HS.

2.2.1.3. Phương pháp phân loại chủng nấm men nghiên cứu bằng phân tích trình tự gen

DNA tổng số của các chủng nấm men lựa chọn được tiến hành bằng kit của Thermo scientific, Mỹ. Sau đó, tiến hành khuếch đại vùng gen ITS (Internal Transcript Spacer) của chủng nấm men nghiên cứu bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số bằng cặp mồi ITS1 và ITS4 theo chu trình nhiệt: 95°C trong 3 phút, 35 chu trình (95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C [50]. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trình tự theo phương pháp Sanger DNA Sequencing by using Capillary Electrophoresis bởi công ty Apical Sciencetific Sdn.Bhd, Malaysia.

Trình tự nucleotide được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ĐH Bắc Carolina, Mỹ). Độ tương đồng gen rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen trong Genbank bằng công cụ BLAST trên NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Cây phân loại di truyền các chủng nấm men được dựng bằng phần mềm MEGA X.

2.2.2 Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô và nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men lựa chọn

2.2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô đến khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men

Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của 03 chủng nấm men nghiên cứu được tiến hành trên môi trường khoáng bổ sung dầu thô với các hàm lượng khác nhau (1, 2, 3, 4, 5, 6% w/v), điều kiện nuôi cấy là 2% (w/v) NaCl, 2% (v/v) giống, pH6, 30°C, nuôi lắc 180 vòng/phút. Khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của các chủng nấm men được xác định thông qua chỉ số nhũ hóa E₂₄.

2.2.2.2 Đánh giá ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men

Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của 03 chủng nấm men nghiên cứu được tiến hành trên môi trường khoáng bổ sung 0,3% (w/v) một loại nguồn nitơ: KNO₃; (NH₄)₂SO₄; NH₄NO₃; NaNO₃; NH₄Cl; (NH₄)₂HPO₄. Các điều kiện nuôi cấy kèm theo: 3% (w/v) dầu thô, 2% (w/v) NaCl, 2% (v/v) giống, pH6, lắc 180 vòng/phút ở 30°C. Khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của các chủng nấm men được xác định thông qua chỉ số nhũ hóa E₂₄.

2.2.3. Thiết lập mô hình thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men lựa chọn

❖ Chuẩn bị cát thí nghiệm

Cát được sàng qua sàng 3 mm để loại bỏ các hạt lớn, sau đó khử trùng và làm khô trong tủ cấy vô trùng 7 ngày trước khi sử dụng. Cát đã làm khô sau đó được làm ô nhiễm dầu nhân tạo với hàm lượng dầu thô là 1% (w/w) tương đương với 10.000 mg/kg cát khô. Cát sau khi nhiễm dầu nhân tạo tiếp tục được làm khô sau 7 ngày để loại bỏ các hợp chất dễ bay hơi trong dầu thô. Sau đó, cát được chia đều (500 g cát/hộp) vào các hộp nhựa (khử trùng bằng cồn) có kích thước 10 x 15 x 8 cm cho các phương thức thí nghiệm sau:

- (1) **Đối chứng:** Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung nước khử ion vô trùng để duy trì hàm lượng nước 20% wt, các hộp đối chứng không bổ sung nấm men và chất dinh dưỡng N, P.
- (2) **Thí nghiệm theo phương thức thúc đẩy sinh học (Bioaugmentation):** Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung tập hợp gồm 3 chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) với tỷ lệ (1:1:1) sao cho mật độ ban đầu (0) $\approx 10^7$ MPN/g cát. Phương thức thúc đẩy sinh học chỉ bổ

sung nấm men, không bổ sung chất dinh dưỡng N, P. Nước khử ion vô trùng cũng được bổ sung vào cát để hàm lượng nước đạt 20% wt.

(3) **Thí nghiệm theo phương thức kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học (*Biostimulation*)**: Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung tập hợp chủng nấm men phân hủy dầu (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) dưới dạng chế phẩm với tỷ lệ DSNM1, VTNM1, và NTNM16 là 1:1:1 sao cho mật độ tập hợp chủng nấm men ban đầu trong mẫu cát (0) $\approx 10^7$ MPN/g cát. Phương thức kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học bổ sung tập hợp chủng nấm men và nguồn chất dinh dưỡng gồm N và P, trong đó N được bổ sung với các hàm lượng khác nhau (500, 1000 và 1500 mg/kg, P bổ sung với hàm lượng không đổi là 100 mg/kg cát khô, tương đương với các tỷ lệ cacbon (C): N: P (C:N:P) là 100:5:1; 100:10:1 và 100:15:1. Nước khử ion vô trùng được thêm vào cát để duy trì hàm lượng nước đạt 20% wt.

Nitơ được bổ sung dưới dạng NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, P được bổ sung dưới dạng KH_2PO_4 . Chất dinh dưỡng N và P được bổ sung một lần duy nhất khi bắt đầu thí nghiệm (hàm lượng N là 0 mg/kg cát khô chính là thí nghiệm theo phương thức thúc đẩy sinh học).

Đối với mỗi phương thức xử lý, các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 02 lần. Mỗi hộp nhựa chứa 500g cát và 100g nước khử ion vô trùng (để hàm lượng nước đạt 20% wt). Các hộp nhựa được nuôi cấy tĩnh trong 8 tuần ở nhiệt độ phòng. Độ ẩm của cát được theo dõi định kỳ bằng máy đo độ ẩm và nước trong các hộp được cung cấp định kỳ để giữ hàm lượng nước ổn định. Cát bên trong các hộp thí nghiệm được đảo trộn 2 lần/tuần để đảm bảo cung cấp đầy đủ không khí và O_2 . Các mẫu cát được lấy lần lượt ở các thời điểm 0, 2, 4, 6, và 8 tuần thí nghiệm. Mẫu cát được bảo quản ở 4°C để phân tích vi sinh và -20°C để phân tích hàm lượng dầu thô

Hàm lượng C, N, P, K trong mẫu cát tự nhiên được phân tích theo TCVN 11069-1:2015 (\approx ISO/TS 14256-1:2003).

2.2.4. Phương pháp pha loãng tới hạn MPN (most probable number)

Khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được đánh giá thông qua số lượng nấm men thu được từ các mẫu cát ô nhiễm dầu sau 0, 2, 4, 6, và 8 tuần nuôi cấy [51]: 2 g

cát được đồng nhất trong 18mL dung dịch muối sinh lý (0,85%, w/v) vô trùng trên máy lắc với tốc độ 180vòng/ phút, với thời gian 1 giờ. Dịch cát sau khi đồng nhất được pha loãng hệ số bậc 10 tùy theo mật độ của nấm men có trong mẫu phân tích. Sau đó, 0,5mL dịch cát ở các nồng độ pha loãng sau khi đồng nhất được cấy chuyển vào các ống nuôi cấy đậy nắp kín (12mL) chứa 4,5 mL môi trường khoáng. 45 μ L dầu thô được bổ sung vào mỗi ống môi trường nuôi cấy như nguồn cacbon duy nhất. Các mẫu cấy phân hủy dầu thô được nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 tuần. Sau đó, sử dụng INT (iodonitrotozolium violet) để xác định các mẫu dương tính. Sau 2 tuần nuôi cấy, INT được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy. Nếu xuất hiện màu đỏ khi bổ sung INT thì ống nuôi cấy dương tính, không màu là âm tính. Xác định mật độ nấm men phân hủy dầu bằng phương pháp MPN thích hợp và được biểu thị bằng log₁₀ MPN/g cát khô [52].

2.2.5. Phương pháp xác định dầu thô tổng số (TPH)

Hàm lượng dầu thô tổng số được xác định bằng phương pháp cân khối lượng bao gồm các bước sau: (1) Dầu trong cát ô nhiễm được chiết bằng dung môi dichloromethane cho đến khi dung môi chiết không màu; (2) Dầu chiết được lọc hết cát và làm bay hơi hết dung môi bằng máy cô quay chân không (Buchi, Thụy Sĩ) cho tới khi khối lượng không đổi; (3) Hàm lượng dầu tổng số còn lại được cân để xác định khối lượng [53].

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu xử lý thống kê (theo Excel 2016) được dạng log để so sánh thống kê bằng phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố với mức ý nghĩa được chọn $\alpha \leq 0,05$, và đánh giá hệ số tương quan (Correlation).

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Định danh các chủng nấm men có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất dầu chất hydrocarbon dầu mỡ (dầu thô)

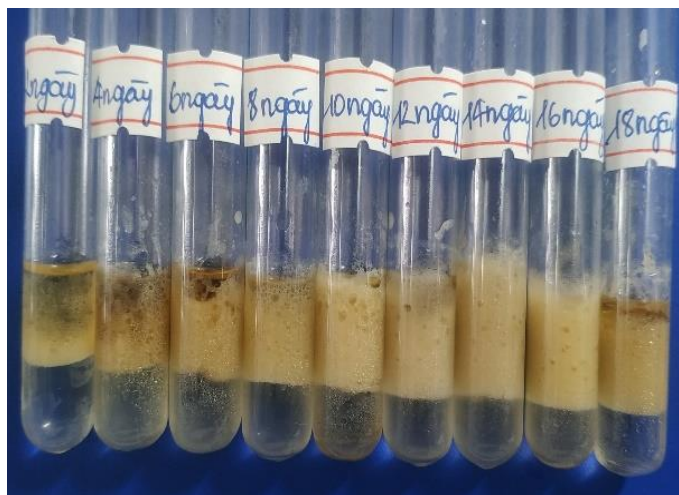
Sau khi sàng lọc các chủng nấm men 03 lần liên tiếp trên môi trường MSM bổ sung dầu thô như nguồn carbon và năng lượng duy nhất. Các chủng nấm men thu được từ môi trường thạch đĩa HS lại tiếp tục được sàng lọc thông qua khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô.

Kết quả cho thấy, 03 chủng nấm men biển (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được phân lập lần lượt tại Hải Phòng (DSNM1), Vũng Tàu (VTNM1) và Nha Trang (NTNM16) vừa có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất dầu thô, vừa có khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH tốt.

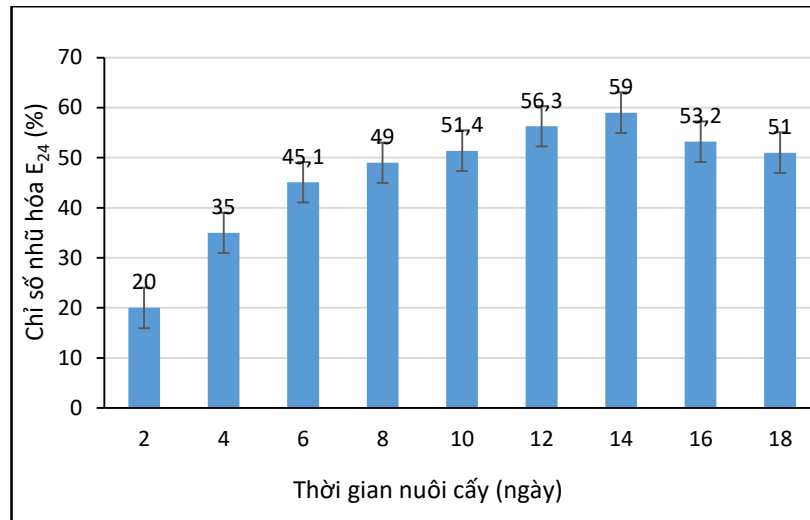
3.1.1. Khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô

❖ Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1

Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 được xác định trong 18 ngày thể hiện ở hình 3.1 và hình 3.2. Chủng DSNM1 bắt đầu sinh tổng hợp CHĐBMSH từ ngày thứ 2 (chỉ số E_{24} là 20%), tiếp tục tăng lên ở những ngày tiếp theo, đến ngày thứ 10 thì E_{24} là đã đạt 51,4% và đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 14 (E_{24} là 59%). Sau 16 ngày chỉ số E_{24} giảm dần và chỉ còn 51% vào ngày thứ 18. Như vậy chủng nấm men DSNM1 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô và đạt giá trị cao nhất sau 14 ngày (E_{24} là 59%)



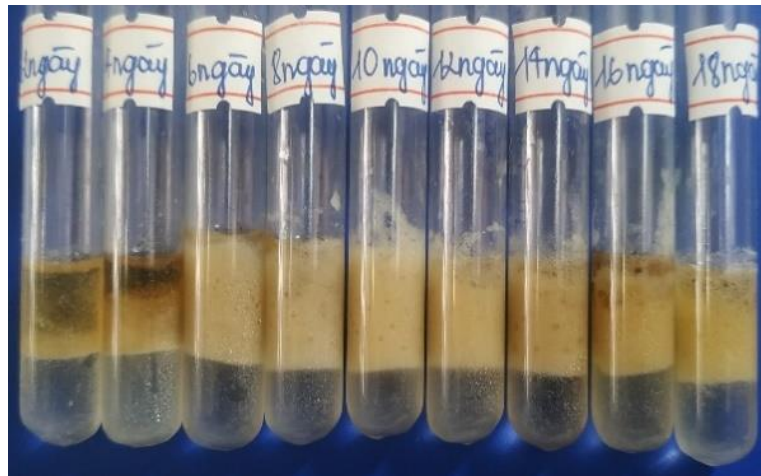
Hình 3.1. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 trong 18 ngày



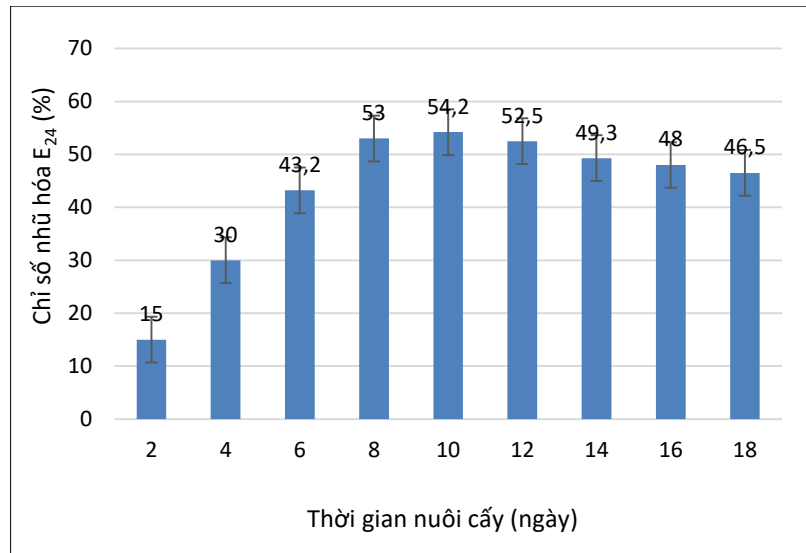
Hình 3.2. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 trong 18 ngày

❖ **Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1**

Hình 3.3 và 3.4 cho thấy chủng VTNM1 bắt đầu tổng hợp CHĐBMSH từ ngày thứ 2 (E_{24} là 15%) và duy trì khả năng tổng hợp yếu cho đến ngày thứ 6. Từ ngày thứ 8 trở đi, khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 đã mạnh hơn (E_{24} là 53%) và đạt hiệu quả cao nhất ngày thứ 10 (E_{24} đạt 54,2%). Từ ngày nuôi cấy thứ 12 đến 18, khả năng tổng hợp giảm dần, thấp nhất là ngày 18 (E_{24} chỉ đạt 46,5%). Như vậy chủng VTNM1 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH cao nhất trên nguồn cơ chất dầu thô sau 10 ngày (E_{24} là 54,2%)



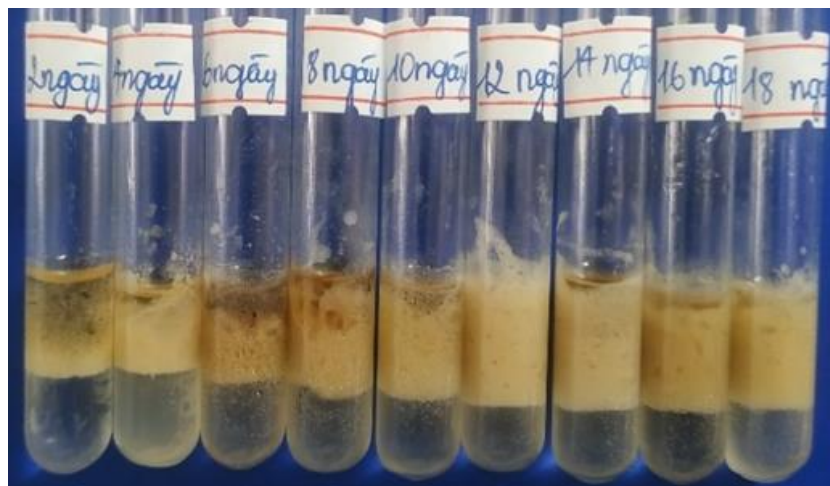
Hình 3.3. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 trong 18 ngày



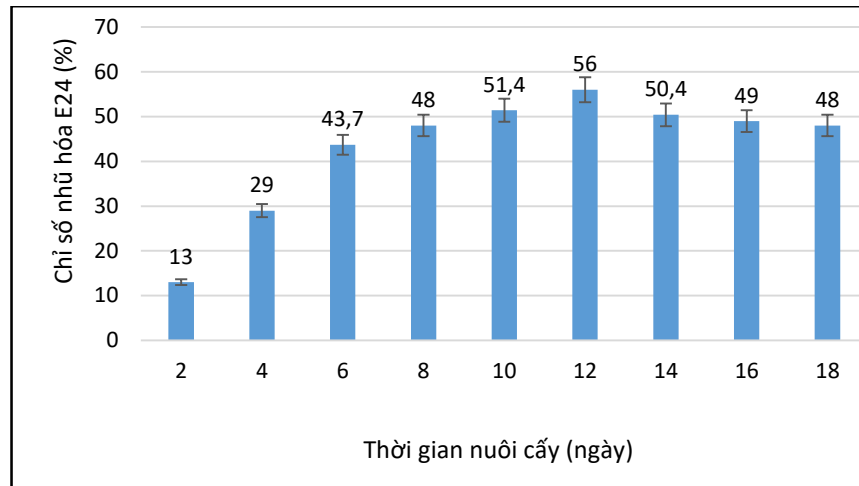
Hình 3.4. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 trong 18 ngày

❖ Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTN16

Kết quả hình 3.5 và 3.6 cho thấy sau 2 ngày nuôi cấy chủng NTN16 đã bắt đầu tổng hợp CHĐBMSH (chỉ số E₂₄ thấp chỉ là 13%). Những ngày tiếp theo mức độ tổng hợp CHĐBMSH của chủng này tăng lên nhanh với E₂₄ là 43,7% sau 6 ngày và đạt hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH cao nhất ở ngày thứ 12 (E₂₄ đạt 56%). Như vậy chủng nấm men NTN16 có khả năng tổng hợp CHĐBMSH trên nguồn cơ chất dầu thô, đạt giá trị cao nhất sau 12 ngày (E₂₄ là 56%).



Hình 3.5. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTN16 trong 18 ngày



Hình 3.6. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 trong 18 ngày

Kết quả (Hình 3.1 đến 3.6) cho thấy, chủng nấm men DSNM1, VTNM1, NTNM16 có khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH trong môi trường sử dụng dầu thô như nguồn carbon duy nhất với chỉ số nhũ hóa E24 đạt được lần lượt là 59%; 54,2% và 56% sau 14, 10, và 12 ngày nuôi cấy trong môi trường khoáng (MSM). Do đó, 03 chủng nấm men DSNM1, VTNM1 và NTNM16 được lựa chọn cho nghiên cứu này do hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH cao hơn các chủng khác với chỉ số nhũ hóa E24 đạt trên 50%).

3.1.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng DSNM1, VTNM1, NTNM16

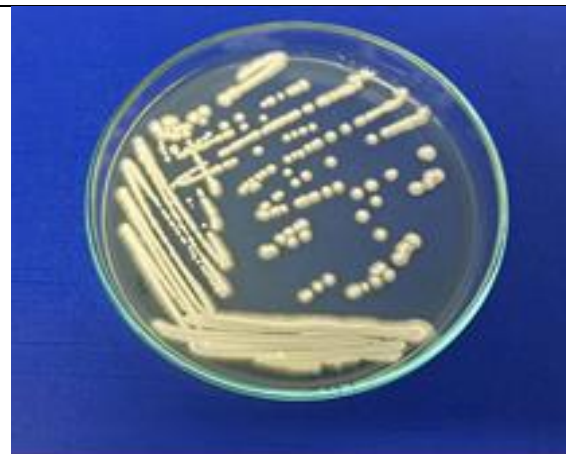
Tập hợp gồm 3 chủng nấm men biển (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được phân lập lần lượt tại biển Hải Phòng (DSNM1), Vũng Tàu (VTNM1) và Nha Trang (NTNM16) vừa có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất dầu thô, vừa và có khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH tốt.



Hình thái khuẩn lạc chủng nấm men
DSNM1



Hình thái khuẩn lạc chủng nấm men
VTNM1



Hình thái khuẩn lạc chủng nấm men
NTNM16

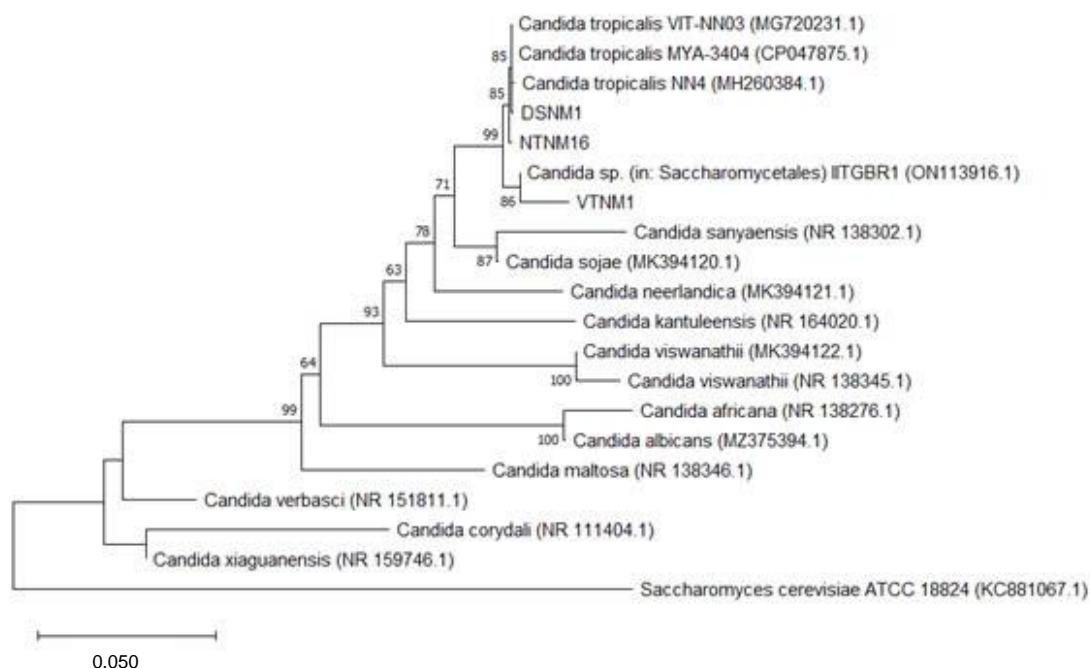
Hình 3.7. Hình thái khuẩn lạc của 3 chủng nấm men trên môi trường thạch HS

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc 3 chủng nấm men trên môi trường thạch HS

TT	Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc		
		Màu sắc	Hình dạng	Đường kính (mm)
1	DSNM1	Trắng	Tròn đều, mặt nhẵn bóng, viền mép có lông	3,5
2	VTNM1	Trắng sữa	mép gọn, bề mặt nhẵn	2
3	NTNM16	Trắng	Tròn đều, mép không gọn, bề mặt nhẵn	2,5

3.1.3. Phân loại các chủng nấm men nghiên cứu bằng phân tích trình tự gen

Ba chủng nấm men DSNM1, VTNM1, NTNM16 đã được phân tích trình tự vùng gen ITS (Internal Transcript Spacer) bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số bằng cặp mồi ITS1 và ITS4 sau đó so sánh trình tự thu được với GenBank để tìm những loài có trình tự tương đồng với chủng nghiên cứu.



Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loại của 3 chủng nấm men

Kết quả phân tích trình tự vùng gen ITS cho thấy, chủng DSNM1 tương đồng 99,95% với loài *Candida tropicalis* strain MYA 3408_CP040875.1. Vì vậy, chủng này được ký hiệu là *Candida* sp. DSNM1.

Chủng VTNM1 tương đồng 99,24% với loài *Candida* sp. (in *Sacharomycetales*_ON113916.1). Vì vậy, chủng này được ký hiệu là *Candida* sp. VTNM1.

Chủng NTN16 tương đồng 99,01% với loài *Candida tropicalis* strain VIT-NN03_MG720231.1. Vì vậy, chủng này được ký hiệu là *Cadida* sp. NTN16.

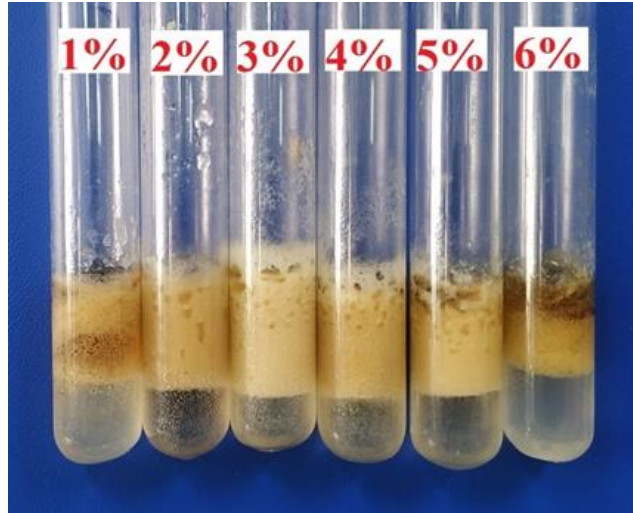
Có thể thấy 3 chủng nấm men trên đều thuộc chi *Candida* trong đó DSNM1 và NTN16 cùng thuộc loài *Candida tropicalis*.

Sau khi phân lập và lựa chọn được 03 chủng nấm men với khả năng tổng hợp CHĐBMSH tốt trong số các chủng được sàng lọc, tiếp tục đánh giá ảnh hưởng hàm lượng dầu thô để lựa chọn hàm lượng dầu thô tốt nhất cho khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của 03 chủng nấm men nghiên cứu.

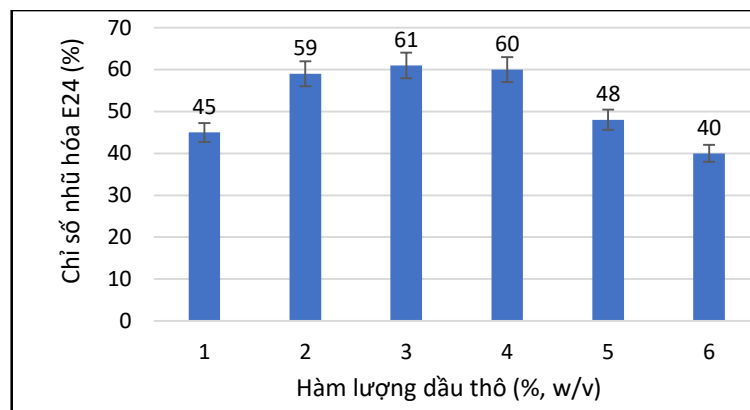
❖ Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1

Kết quả hình 3.11 và 3.12 cho thấy chủng DSNM1 tổng hợp được CHĐBMSH ở dải hàm lượng dầu thô từ 1-6 % (w/v) (E_{24} đạt từ 40 – 61%),

thấp nhất khi hàm lượng dầu thô 6% (E_{24} là 40%) và cao nhất khi hàm lượng dầu thô 3% (E_{24} bằng 61%). Như vậy CHĐBMSH được tổng hợp tốt nhất bởi chủng DSNM1 khi hàm lượng dầu thô là 3% và đây là hàm lượng dầu thô được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.9. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau

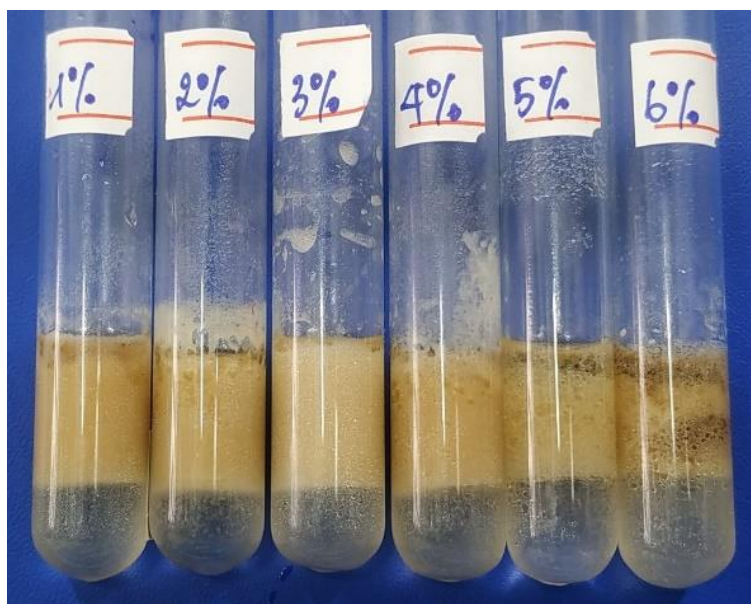


Hình 3.10. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau

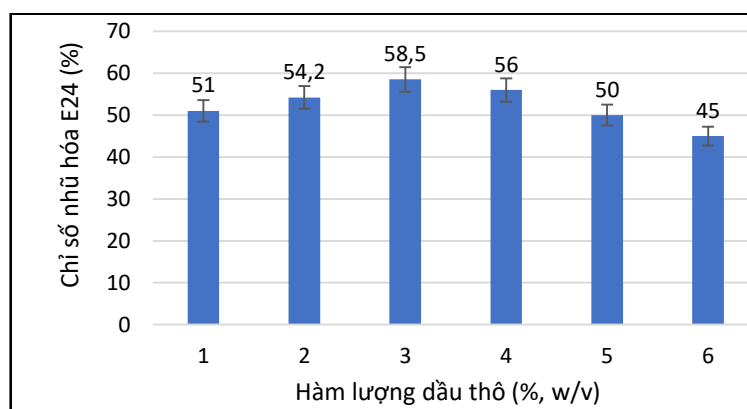
❖ Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1

Kết quả 3.13 và 3.14 cho thấy với hàm lượng dầu thô 6% thì chủng VTNM1 tổng hợp CHĐBMSH kém nhất (E_{24} bằng 45%), trong khi với hàm lượng dầu thô dao động từ 1-5% thì mức độ tổng hợp CHĐBMSH tốt hơn ($E_{24} \geq 50\%$). Đặc biệt, khả năng sinh tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 thể hiện tốt nhất khi bổ sung hàm lượng dầu thô bằng 3% (E_{24} đạt 58,5%). Do vậy,

hàm lượng dầu thô 3% là phù hợp nhất chủng VTNM1 sinh trưởng và tổng hợp CHĐBMSH và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.11. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau

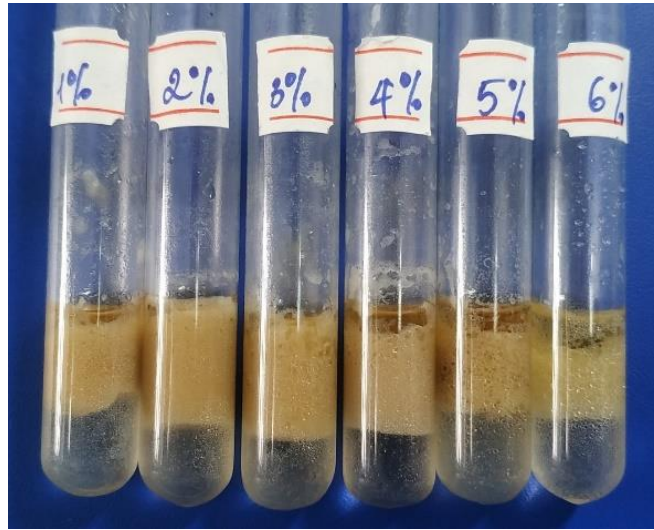


Hình 3.12. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 với các hàm lượng dầu thô khác nhau

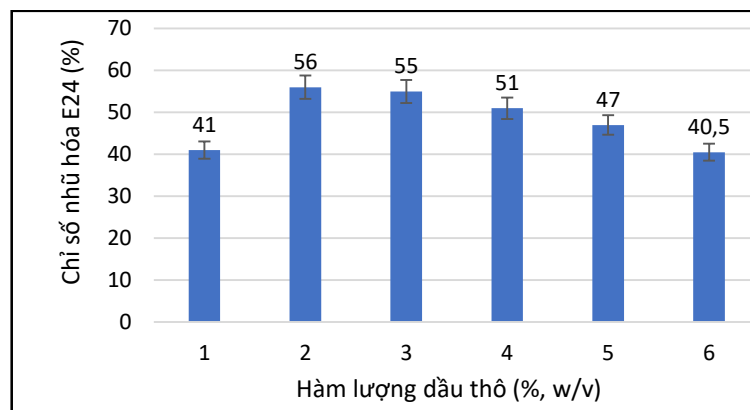
❖ Ảnh hưởng của hàm lượng dầu thô tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16

Kết quả hình 3.15 và 3.16 cho thấy với các hàm lượng dầu thô từ 1-6% thì chủng NTNM16 đều có thể tổng hợp được CHĐBMSH, chỉ số $E_{24} \geq 40,5\%$. Với hàm lượng dầu thô quá cao ≥ 5 hay $\leq 1\%$ thì khả năng tổng hợp CHĐBMSH không tốt (E_{24} chỉ từ 40,5 đến 47%). Trong khi đó, khi được bổ sung hàm lượng dầu thô từ 2 – 4% thì mức độ tổng hợp CHĐBMSH của chủng này tốt hơn ($E_{24} \geq 51\%$), chỉ số E_{24} cao nhất đạt 56% với hàm lượng dầu thô

bằng 2%. Do vậy, hàm lượng dầu thô 2% là phù hợp nhất để nuôi cấy chủng NTNM16 và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.13. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTNM16 với các hàm lượng dầu thô khác nhau



Hình 3.14. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 với các hàm lượng dầu thô khác nhau

Từ các kết quả trên cho thấy, hàm lượng dầu thô phù hợp của chủng nấm men DSNM1 và VTNM1 là 3% (w/v), chủng nấm men NTNM16 là 2% (w/v).

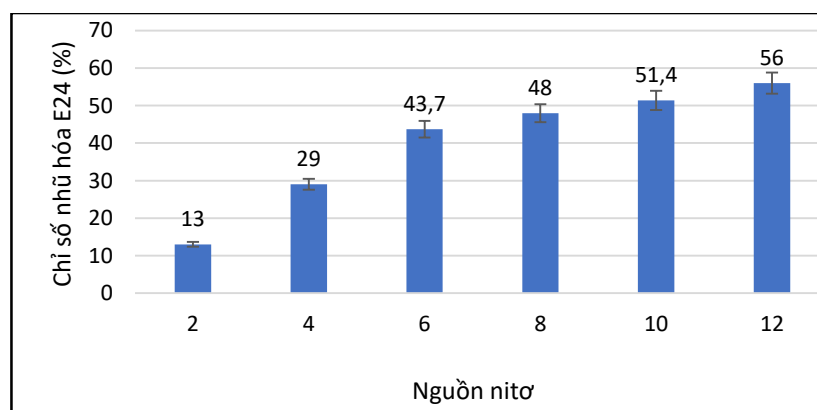
3.2. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau đến khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của tập hợp chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô

- ❖ Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1

Kết quả hình 3.17 và 3.18 cho thấy chủng DSNM1 không tổng hợp được CHĐBMSH khi bổ sung nguồn nitơ KNO_3 , tổng hợp kém với nguồn nitơ là NaNO_3 (E_{24} chỉ đạt 14%). Với các nguồn nitơ còn lại là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ thì chủng này có thể tổng hợp CHĐBMSH tương đối tốt (E_{24} đạt từ 50 đến 64%), trong đó CHĐBMSH được tạo ra nhiều nhất trên nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với chỉ số E_{24} đạt 64%. Như vậy $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được lựa chọn là nguồn nitơ thích hợp cho chủng DSNM1 sinh trưởng và tổng hợp CHĐBMSH.



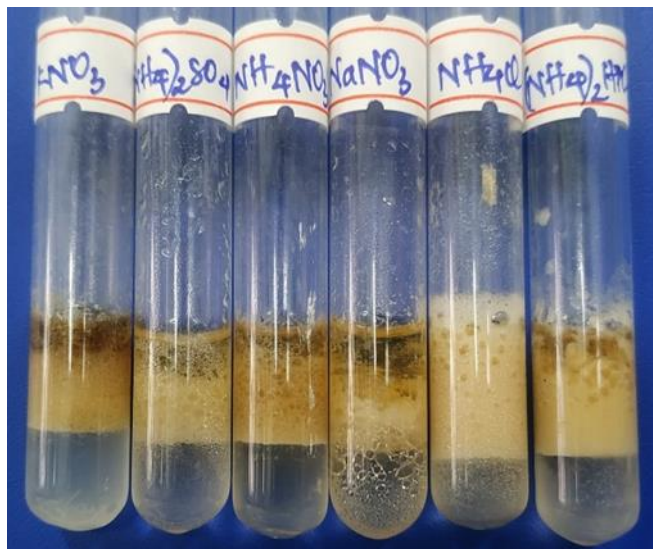
Hình 3.15. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng DSNM1 với các nguồn nitơ khác nhau



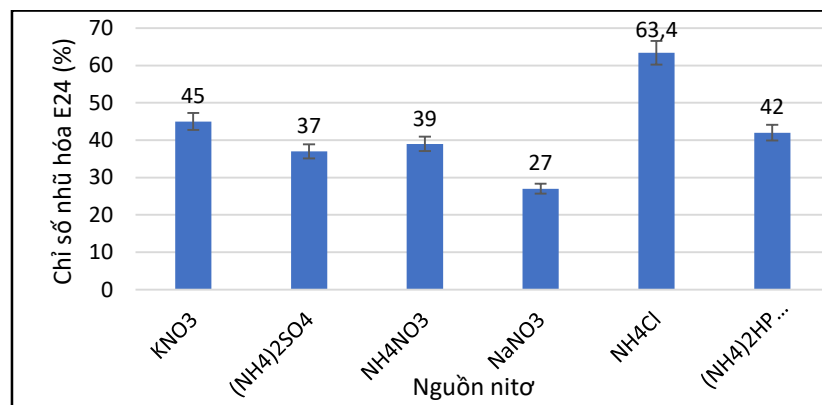
Hình 3.16. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng DSNM1 với các nguồn nitơ khác nhau

❖ **Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1**

Hình 3.19 và 3.20 cho thấy hiệu quả tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 có sự phân hóa rõ rệt với các nguồn nitơ khác nhau, trong đó chủng VTNM1 tổng hợp CHĐBMSH tốt nhất với NH_4Cl (E_{24} đạt 63,4%). Với hai nguồn nitơ là KNO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ thì E_{24} khá thấp chỉ dao động từ 42-45%, trong khi đó chủng này thể hiện khả năng tổng hợp CHĐBMSH kém với 3 nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 (E_{24} dao động từ 27% đến 39%). Như vậy NH_4Cl được lựa chọn là nguồn nitơ thích hợp cho chủng VTNM1 sinh trưởng và tổng hợp CHĐBMSH và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



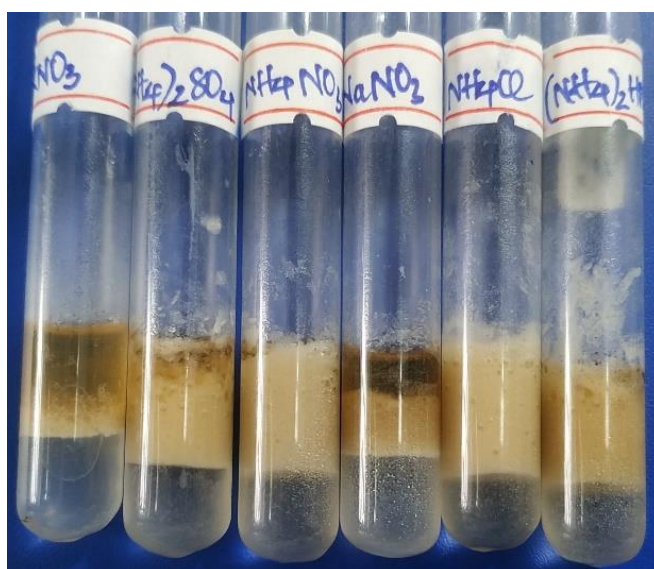
Hình 3.17. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng VTNM1 với các nguồn nitơ khác nhau



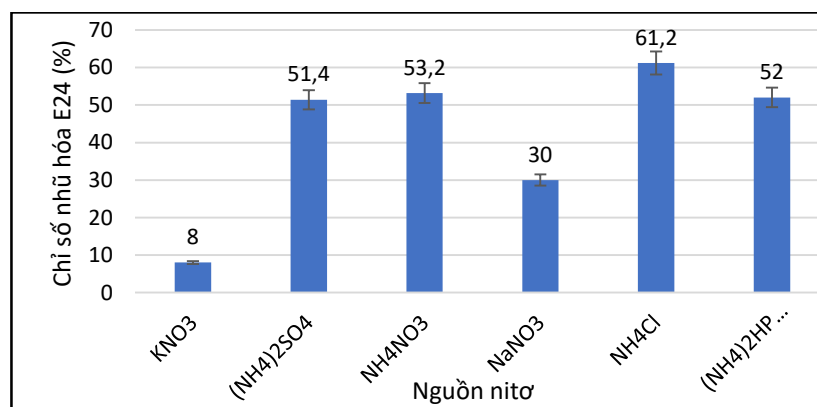
Hình 3.18. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng VTNM1 với các nguồn nitơ khác nhau

❖ **Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16**

Kết quả hình 3.21 và 3.22 cho thấy chủng NTNM16 tổng hợp CHĐBMSH kém với hai nguồn nitơ là KNO_3 và NaNO_3 (E_{24} lần lượt là 8% và 30%). Ngược lại, khi bổ sung các nguồn N là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ thì CHĐBM được tổng hợp bởi chủng nấm men này tương đối tốt ($E_{24} \geq 51,4\%$), cao nhất với nguồn nitơ là NH_4Cl (E_{24} đạt 61,2%). Như vậy NH_4Cl được lựa chọn là nguồn nitơ thích hợp cho tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16.



Hình 3.19. CHĐBMSH được tổng hợp bởi chủng NTNM16 với các nguồn nitơ khác nhau



Hình 3.20. Khả năng tổng hợp CHĐBMSH của chủng NTNM16 với các nguồn nitơ khác nhau

Kết quả cho thấy, 3 chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16)

có khả năng tổng hợp CHĐBMSH cao và ổn định nhất trên nguồn N là NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Bảng 3.2). Do đó, NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ được lựa chọn là nguồn N cho nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm hydrocarbon dầu mỡ (dầu thô) của tập hợp chủng nấm men lựa chọn.

Bảng 3.2 CHĐBMSH được tổng hợp bởi 3 chủng nấm men với các nguồn N khác nhau được xác định bằng chỉ số nhũ hóa E_{24} (%)

Chủng nấm men	CHĐBMSH được tổng hợp bởi 03 chủng nấm men với các nguồn N khác nhau (% E_{24})					
	KNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NH_4NO_3	NaNO_3	NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
DS-NM1	0,0	64,0	63,0	14,0	58,5	50,0
VTNM1	45,0	37,0	39,0	27,0	63,4	42,0
NTNM16	8,0	51,4	53,2	30,0	61,2	52,0

3.3. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nitơ bổ sung đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men

3.3.1. Thiết lập thí nghiệm nghiên cứu

Thí nghiệm được thiết lập như đã mô tả ở phần vật liệu và phương pháp (Hình 3.23)



Hình 3.21. Thí nghiệm xử lý cát ô nhiễm dầu với các hàm lượng nitơ khác nhau

Bảng 3.3. Hàm lượng chất dinh dưỡng (C, N, P, K) trong cát sử

dụng cho thí nghiệm

STT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả phân tích
1	TOC	%	0,058
2	PO ₄ ³⁻	mg/kg	79,9
3	NO ₃ ⁻	mg/kg	10,02
4	Kali	mg/kg	61,25
5	NH ₄ ⁺ -N	mg/kg	16,36

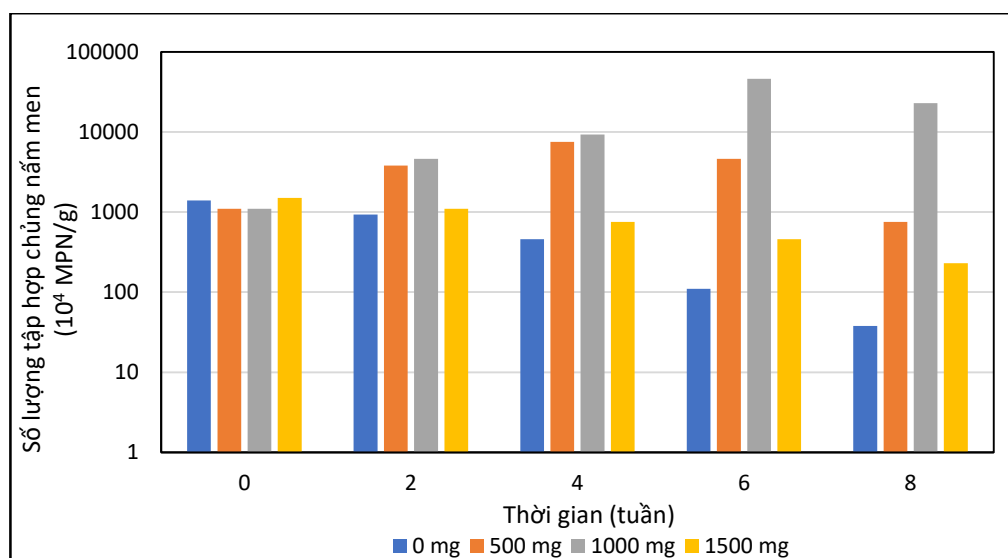
Kết quả cho thấy hàm lượng N, P trong cát sử dụng cho phân tích ban đầu thấp vì vậy cần thiết bổ sung thêm N và P vô cơ để nâng cao khả năng phân hủy dầu thô của các chủng nấm men nghiên cứu.

3.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng nitơ đến sinh trưởng và khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của chủng nấm men nghiên cứu

3.3.2.1. Đánh giá sinh trưởng của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu trong cát ô nhiễm dầu được bổ sung N với hàm lượng khác nhau bằng phương pháp số có xác suất lớn nhất (MPN - most probable number)

Bảng 3.4. Mật độ nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau

Thời gian (tuần)	Hàm lượng N (mg/kg cát)			
	0 mg	500 mg	1000 mg	1500 mg
0	1.4x10 ⁷	1.1x10 ⁷	1.1x10 ⁷	1.5x10 ⁷
2	9.3x10 ⁶	3.8x10 ⁷	4.6x10 ⁷	1.1x10 ⁷
4	4.6x10 ⁶	7.5x10 ⁷	9.3x10 ⁷	7.5x10 ⁶
6	1.1x10 ⁶	4.6x10 ⁷	4.6x10 ⁸	4.6x10 ⁶
8	3.8x10 ⁵	7.5x10 ⁶	2.3x10 ⁸	2.3x10 ⁶



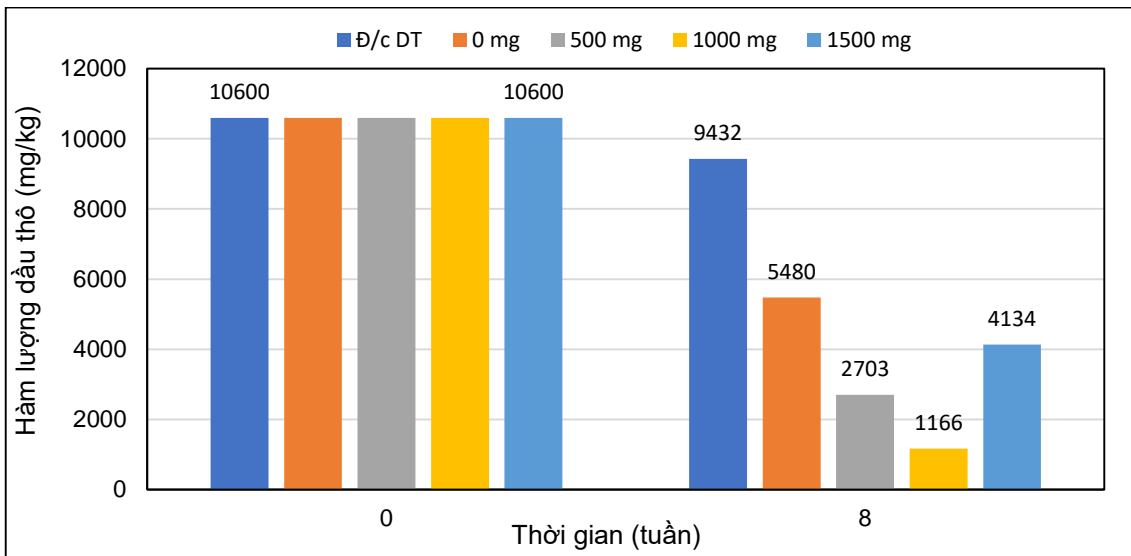
Hình 3.22. Sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men trong mô hình thí nghiệm xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau

Khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTN16) trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với các hàm lượng N khác nhau trong môi trường cũng được xác định bằng phương pháp số có xác suất lớn nhất (MPN). Kết quả phân tích mật độ nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) trong thí nghiệm với các hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần trong môi trường dinh dưỡng thể hiện trong Hình 3.24 và Bảng 3.4.

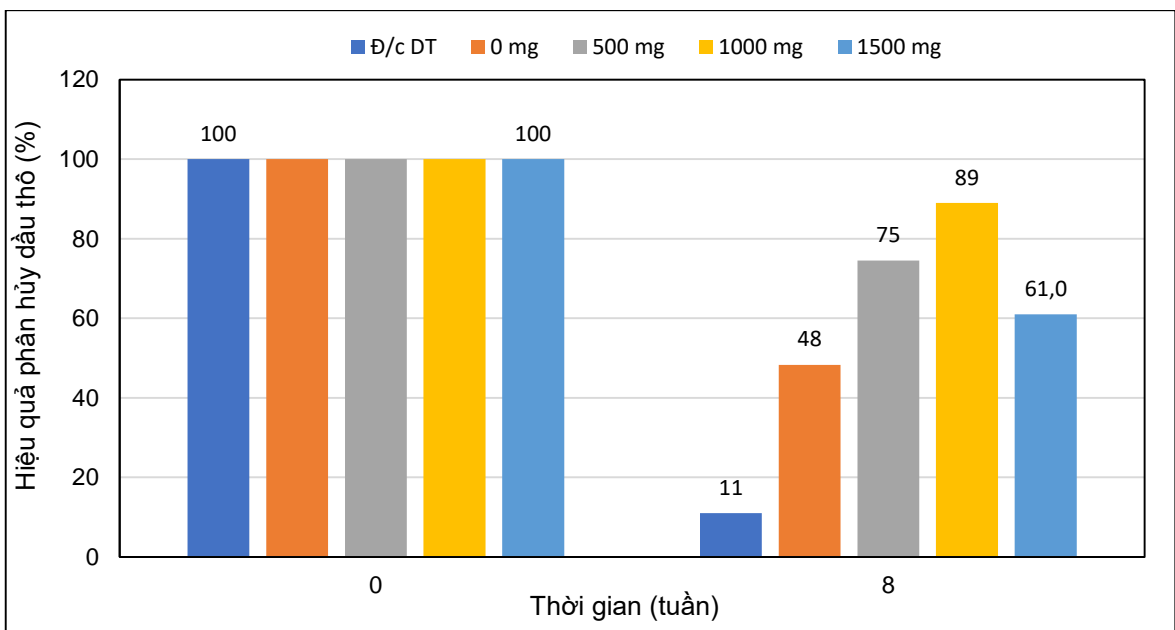
Các kết quả thu được cho thấy, tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phát triển tốt trong cát ô nhiễm dầu thô có bổ sung hàm lượng N là 500-1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mg N/kg ở thời điểm ban đầu (0h) là $1,1 \times 10^7$ (MPN/g). Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ $7,5 \times 10^6 - 7,5 \times 10^7$ (MPN/g) trong cát bổ sung 500 mg N/kg và $4,6 \times 10^7 - 4,6 \times 10^8$ (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Tập hợp chủng nấm men đạt số lượng cao nhất từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 6 trong cát ô nhiễm dầu có bổ sung hàm lượng N là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men ở hai nghiệm thức không bổ sung N và bổ sung N với hàm lượng là 1500 mg/kg đều giảm theo thời gian từ $1,1 \times 10^7$ (MPN/g) ở thời điểm ban đầu (0) xuống chỉ còn lần lượt là $3,8 \times 10^5$ MPN/g (0 mg/kg) và $2,3 \times 10^6$ MPN/g (1500 mg/kg) sau 8 tuần thử nghiệm. Kết quả này cho thấy vai trò của N trong quá trình phân hủy cát ô

nh nhiễm dầu bằng phương pháp Bioremediation. Tuy nhiên, hàm lượng N phù hợp với tập hợp chủng nấm men trong nghiên cứu này từ 500 đến 1000 mg/kg. Nếu thấp dưới 500 mg N/kg số lượng nấm men sẽ suy giảm do thiếu chất dinh dưỡng. Còn lớn hơn 1000 mgN/kg, nấm men có thể bị ức chế do hàm lượng N dư thừa.

3.2.2.2. Đánh giá khả năng phân hủy dầu thô trong cát ô nhiễm được bổ sung N với hàm lượng khác nhau của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu bằng phương pháp phân tích dầu tổng số



Hình 3.23. Hàm lượng dầu thô tổng số của tập hợp chủng nấm men với hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần



Hình 3.24. Hiệu quả phân hủy dầu thô tổng số của tập hợp chủng nấm men với hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần

Khả năng phân hủy dầu của tập hợp các chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) với các hàm lượng N khác nhau trong môi trường cũng được xác định bằng phương pháp cân trọng lượng. Kết quả phân tích hàm lượng dầu thô tổng số trong thí nghiệm với các hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần thể hiện trong Hình 3.25 và 3.26.

Sau 8 tuần thí nghiệm, hàm lượng dầu thô tổng số (TPH) giảm từ 10.600 mg/kg cát xuống còn 9432, 5480, 2703, 1166 và 4134 mg/kg lần lượt với thí nghiệm đối chứng (không bổ sung N) và bổ sung N với hàm lượng lần lượt là 0, 500, 1000 và 1500 mg N/kg cát. Hiệu quả phân hủy dầu tương ứng là 11; 48,3; 74,5; 89; 61%. Cả hai phương thức thúc đẩy sinh học (BA) (chỉ bổ sung tập hợp chủng nấm men không bổ sung N) và kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học (BA + BS) (bổ sung tập hợp chủng nấm men và N với hàm lượng khác nhau) đều có khả năng phân hủy TPH sinh học so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên, kết hợp BA+BS cho hiệu quả cao hơn. Điều này một lần nữa khẳng định việc bổ sung chất dinh dưỡng (N, P) là phương pháp hiệu quả giúp tăng cường khả năng phân hủy dầu của VSV nói chung và nấm men nói riêng. Trong nghiên cứu này, hàm lượng N phù hợp cho quá trình phân hủy sinh học Bioremediation của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) là 500 - 1000 mg N/kg cát tương đương với tỷ lệ C:N:P là 100:5:1 và 100:10:1. Điều này phù hợp với các nghiên cứu của cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (US, EPA, 2002) thông báo rằng tỷ lệ C:N:P thích hợp để xử lý đất, cát/trầm tích ô nhiễm dầu là 100:10:1, tỷ lệ này giúp quần thể VSV phân hủy dầu hoạt động tối ưu. Cát nhiễm dầu được xử lý bằng phương pháp kết hợp BA+BS cho thấy, số lượng nấm men cao hơn so với cát không được xử lý (mẫu đối chứng) hoặc cát được xử lý bằng phương pháp BA (Hình 1). Điều này cũng được minh chứng bằng hiệu quả phân hủy dầu. Nguyên nhân là do khi tỷ lệ C: N: P được cung cấp phù hợp dẫn tới kích thích sự sinh trưởng và phát triển khả năng phân hủy dầu của các chủng VSV (Atlas and Bragg, 2009). Hiệu quả phân hủy TPH của tập hợp chủng nấm men lần lượt đạt 48,3% (BA); 74,5% (BA+BS; 500 mg N/kg); 89% (BA+BS; 1000 mg N/kg) và 61% (BA+BS; 1500 mg N/kg). Phương thức phân hủy BA (chỉ bổ sung VSV) được cho là hữu ích cho việc thúc đẩy sự phân hủy ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý đặc biệt là ở các khu

vực mới ô nhiễm, khi VSV phân hủy dầu có mật độ thấp hoặc không có VSV phân hủy dầu do chưa thích nghi được với môi trường ô nhiễm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, sự kết hợp giữa hai phương thức BA và BS đem lại hiệu quả xử lý dầu tốt nhất (Suja et al., 2014). Trong nghiên cứu này, sau 8 tuần thí nghiệm, số lượng của tập hợp chủng nấm men giảm (Hình 1), nguyên nhân có thể là do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, do đặc tính của đất/cát/trầm tích ô nhiễm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Phân lập được tập hợp gồm 03 chủng nấm men DSNM1(Hải Phòng), VTNM1(Vũng Tàu) và NTNM16 (Nha Trang). Kết quả phân tích trình tự gene cho thấy chủng DSNM1 tương đồng 99,95% với loài *Candida tropicalis* strain MYA 3408_CP040875.1, chủng VTNM1 tương đồng 99,24% với loài *Candida* sp. (in Sacharomycetales_ON113916.1) và chủng NTNM16 tương đồng 99,01% với loài *Candida tropicalis* strain VIT-NN03_MG720231.1 và được ký hiệu lần lượt là *Candida* sp. DSNM1, *Candida* sp. VTNM1, *Candida* sp. NTNM16
- Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nguồn N cho thấy N thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp CHĐBMSH của tập hợp 03 chủng *Candida* sp. DSNM1, *Candida* sp. VTNM1 và *Candida* sp. NTNM16 là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl
- Tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong thí nghiệm bổ sung 1000mgN/kg từ $1,1 \times 10^7$ MPN/g (0h) đến $4,6 \times 10^8$ MPN/g sau 6 tuần thí nghiệm.
- Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men tốt nhất trong thí nghiệm bổ sung 1000mgN/kg cát đạt 89%.
- Việc bổ sung chất dinh dưỡng đặc biệt là N với hàm lượng phù hợp (từ 500-1000mgN/kg cát) định kỳ sẽ thúc đẩy quá trình sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men giúp nâng cao hiệu quả phân hủy dầu sinh học trong cát nhiễm dầu.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu, đánh giá hiệu quả xử lý đất/cát/trầm tích ô nhiễm dầu của tập hợp các chủng nấm men phân lập được từ nghiên cứu này trong các mô hình xử lý ô nhiễm ngoài thực tế.
- Nghiên cứu ứng dụng tập hợp chủng nấm men phân hủy dầu thu được từ nghiên cứu này để sản xuất chế phẩm sinh học và ứng dụng vào thực tế.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Công Thung, Trần Đức Thạnh, Nguyễn Thị Minh Huyền (2007). *Đánh giá tác động của ô nhiễm dầu đối với các hệ sinh thái biển Việt Nam*. Viện Tài nguyên và môi trường biển, Viện khoa học và công nghệ Việt Nam.
2. Đặng Thị Yên, Nguyễn Thành Bình, Nguyễn Thị Yên, Vương Thị Nga, Kiều Thị Quỳnh Hoa* (2018). *Nghiên cứu chủng vi khuẩn sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trên nguồn cơ chất dầu thô nhằm ứng dụng trong công nghiệp dầu khí và xử lý ô nhiễm dầu*. Hội nghị Khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2018; 1198-1202.
3. Ramadan, B. S., Effendi, A. J., & Helmy, Q. (2018). Integrating electrokinetic and bioremediation process for treating oil contaminated low permeability soil. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 31, p. 03005). EDP Sciences.
4. S. Othumpangat and V. Castranova (2014). *Oil Spills*. National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV, USA.
5. World Resources Institute. <https://www.wri.org>
6. Nguyễn Đình Dương (2010). *Báo cáo tổng kết đề tài nhiễm dầu ven vùng biển Việt Nam và Biển Đông*. Viện Địa lý-Viện khoa học và công nghệ Việt Nam.
7. Cổng thông tin điện tử Hải Phòng
8. Essabri, A. M., Aydinlik, N. P., & Williams, N. E. (2019). Bioaugmentation and biostimulation of total petroleum hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil with fungi isolated from olive oil effluent. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1-16.
9. Sakshi, Singh, S. K., & Haritash, A. K. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 6489-6512.
10. Varjani, S., & Upasani, V. N. (2019). Influence of abiotic factors, natural attenuation, bioaugmentation and nutrient supplementation on bioremediation of petroleum crude contaminated agricultural soil. *Journal of environmental management*, 245, 358-366.
11. Prathyusha, K., Jagan Mohan, Y. S. Y. V., Sridevi, S., & Sandeep, B. V. (2016). Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading

indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam. *International Journal of Advanced Research*, 4(3), 357-362.

12. Ehis-Eriakha, C. B., Chikere, C. B., & Akaranta, O. (2020). Functional Gene Diversity of Selected Indigenous Hydrocarbon-Degrading Bacteria in Aged Crude Oil. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 2141209.

13. Pattabhiramaiah, M., Shanthala, M., Rajashekara, S., Sheikh, F., & Naik, S. (2018). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbes isolated from the marine sponge *Biemna fortis* (topsent 1897). *Microbial Action on Hydrocarbons*, 199-222.

14. Liu, J., Bacosa, H. P., & Liu, Z. (2017). Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the northern Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 7, 2131.

15. Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., ... & Yu, H. (2018). Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2885.

16. Anyanwu, J. O., & Okoroji, L. *The economic effect of oil spill on fisheries and tourism*.

17. M. Sonia Zaide (2019). Aftermath of the Torrey Canyon Disaster.

18. Cossey, S. P., Bitter, M. R., Dickens, G. R., Van Nieuwenhuise, D., Pindell, J., Rosenfeld, J. H., ... & Agnini, C. (2019). Paleo-canyon formation and contemporaneous oil seepage near the Paleocene/Eocene boundary, Tampico-Misantla Basin, eastern Mexico.

19. Y. Shasha, X. Kuanhong and Y. Yong (2021). Offshore Oil Pollution and Prevention Measures. *International Biodeterioration & Biodegradation*

20. Taşkin, E., & Akçali, B. (2018). The effects of oil spill on the macrophytobenthic communities. *Oil Spill along the Turkish Straits*, 244.

21. Abalos, A., Maximo, F., Manresa, M. A., & Bastida, J. (2002). Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(7), 777-784.

22. Adesipo, A. A., Freese, D., & Nwadinigwe, A. O. (2020). Prospects of in-situ remediation of crude oil contaminated lands in Nigeria. *Scientific African*, 8, e00403.
23. Ventikos, N. P., Vergetis, E., Psaraftis, H. N., & Triantafyllou, G. (2004). A high-level synthesis of oil spill response equipment and countermeasures. *Journal of hazardous materials*, 107(1-2), 51-58.
24. Bhairavi, A. S., & Mallikarjuna, R. (2018). Effect of used cooking oil on mechanical properties of self-compacting concrete in M20 grade. *International Journal of Research in Advent Technology (IJRAT) special*, E-ISSN: 2321, 9637, 143-147.
25. Ahmed, F., & Fakhruddin, A. N. M. (2018). A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 11(3), 1-7.
26. Xenia, M. E., & Refugio, R. V. (2016). Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 7(2), 20-25.
27. Romero, M. C., Salvioli, M. L., Cazau, M. C., & Arambarri, A. M. (2002). Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution*, 117(1), 159-163.
28. Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., & Naidu, R. (2016). Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in soils contaminated long-term with PAHs and heavy metals: implications to bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 317, 169-179.
29. Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., ... & Kazy, S. K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresourcetechnology*, 253, 22-32.
30. Latha, R., & Kalaivani, R. (2012). Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3(5), 2789-2795.
31. Sawadogo, A., Otoïdobi, H. C., Nitiema, L. W., Traoré, A. S., & Dianou, D. (2016). Optimization of hydrocarbons biodegradation by bacterial strains isolated from wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: case study of SAE 40/50 used oils and diesel. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 5(1), 1-11.

32. U. Ali, S. Mudasir, S. Farooq and R. Nazir (2021). Factors Affecting Bioremediation.
33. So, C. M., Phelps, C. D., & Young, L. Y. (2003). Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3892-3900.
34. Hamzah, A., Manikan, V., & Abd Aziz, N. A. F. (2017). Biodegradation of tapis crude oil using consortium of bacteria and fungi: Optimization of crude oil concentration and duration of incubation by response surface methodology. *Sains Malaysiana*, 46(1), 43-50.
35. Okolo, J. C., Amadi, E. N., & Odu, C. T. I. (2005). Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil.
36. Adams, R. H., Kanga-Leyva, K., Guzmán-Osorio, F. J., & Escalante-Espinosa, E. (2011). Comparison of moisture management methods for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 394-404.
37. Kuc, V., Vázquez, S., Hernández, E., Martínez-Alvarez, L., Villalba Primitz, J., Mac Cormack, W. P., & Ruberto, L. (2019). Hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: changes in bacterial community structure during the progress of enrichment cultures with different n-alkanes as substrate. *Polar Biology*, 42, 1157-1166.
38. Teng Ying, T. Y., & Chen Wei, C. W. (2019). Soil microbiomes-a promising strategy for contaminated soil remediation: a review.
39. Sihag, S., Pathak, H., & Jaroli, D. P. (2014). International journal of pure & applied bioscience. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(3), 185-202.
40. Shewfelt, K., Lee, H., & Zytner, R. G. (2005). Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 4(1), 29-42.
41. Varjani, S., Upasani, V. N., & Pandey, A. (2020). Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination. *Science of the Total Environment*, 737, 139766.
42. Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., ... & Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and

the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.

43.V.M. Ibeanusi (2012). *Putting microbes to work on subsurface contamination. Journal of Bioremediation and Biodegradation*, vol. 3, no. 5.

44.Hussein, H. A., Khan, K. M., & Abdullah, M. A. (2021). Mass production and factors affecting biosurfactant productivity using bioreactors. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 379-398.

45.Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.

46.Rahman, P. K., & Gakpe, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology*.

47.Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963.

48.Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science and Technology*, 78(12), 2626-2638.

49.Cooper, DG and Paddock, DA239631 (1984), " Applied and environmental microbiology. 47(1), pp. 173-176.

50.Brown, T. A. (2001). Gene cloning and DNA analysis: an introduction.

51.Veendrick, H. J. (1984). Short-circuit dissipation of static CMOS circuitry and its impact on the design of buffer circuits. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 19(4), 468-473.

52.Alexander, M. (1982). Most probable number method for microbial populations. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 815-820.

53.Latha, R., & Kalaivani, R. (2012). Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3(5), 2789-2795.