

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Kiều Hương

**NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU TỪ
VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN MÀN CỬA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Kiều Hương

**NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU TỪ
VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN MÀN CỬA**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the supervisor, PGS. TS. Lê Thị Nhi Công. The signature is stylized and written in a cursive script.

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi khẳng định luận văn này là sản phẩm nghiên cứu do chính tôi thực hiện, dựa trên nguồn tài liệu và dữ liệu tự thu thập, phân tích. Vì vậy, các kết quả đạt được bảo đảm tính chính xác và khách quan, chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào trước đó. Mọi số liệu và kết luận trình bày đều trung thực; nếu có sai sót, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 15 tháng 06 năm 2026

Tác giả



Nguyễn Kiều Hương

LỜI CẢM ƠN

Sau quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện Khoa học và Công nghệ thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tôi đã hoàn tất luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm. Tôi xin chân thành tri ân **PGS.TS. Lê Thị Nhi Công** cùng đội ngũ cán bộ Phòng Công nghệ Sinh học Môi trường – Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, hỗ trợ và khích lệ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Tôi trân trọng gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo, Phòng Đào tạo, Khoa Sinh học cùng các đơn vị chức năng và toàn thể giảng viên của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tận tình giảng dạy, cung cấp kiến thức và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như hoàn thành luận văn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Ban lãnh đạo cùng các đồng nghiệp tại Bệnh viện Phụ sản An Thịnh đã hỗ trợ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi học tập, nghiên cứu và hoàn tất đề tài.

Sau cùng, tôi bày tỏ lòng biết ơn tới gia đình đã luôn đồng hành, ủng hộ và là chỗ dựa tinh thần to lớn, sẵn sàng hy sinh để tôi đạt được kết quả hiện tại.

Tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc!

Tác giả



Nguyễn Kiều Hương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT	v
DANH MỤC BẢNG	vi
DANH MỤC HÌNH VẼ	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	3
1.1. HIỆN TRẠNG Ô NHIỄM DẦU TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM ...	3
1.1.1. Hiện trạng ô nhiễm dầu trên thế giới	3
1.1.2. Hiện trạng ô nhiễm dầu tại Việt Nam.....	6
1.2. MỘT SỐ ẢNH HƯỞNG DO Ô NHIỄM DẦU GÂY RA	7
1.3. MỘT SỐ BIỆN PHÁP XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU	8
1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG MÀNG SINH HỌC ...	9
1.4.1. Ứng dụng màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu trên thế giới và Việt Nam.....	9
1.4.2. Đặc điểm của mùn cưa trong ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu	11
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	13
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ	13
2.2.1. Nguyên vật liệu	13
2.2.2. Trang thiết bị chính	14
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng phân hủy các thành phần dầu mỏ	16
2.3.2. Đánh giá sự hình thành màng sinh học và ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ và NaCl.....	17
2.3.3. Phân loại định tên và đánh giá mức độ đối kháng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	17
2.3.4. Phương pháp tạo chế phẩm	17

2.3.5. Xác định mật độ vi khuẩn trong chế phẩm	18
2.3.6. Thành phần các nguyên tố trên vật liệu mùn cưa được phân tích bằng kỹ thuật tán xạ năng lượng tia X (EDX - Energy – Dispersive X-ray Analysis).....	18
2.3.7. Xác định diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết (BET – Brunauer – Emmett – Teller).....	19
2.3.8. Phân tích cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD - X-ray Diffraction).....	19
2.3.9. Chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM - scanning electron microscopy).....	19
2.3.10. Xác định hiệu quả phân hủy dầu DO	19
2.3.11. Xác định hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon thơm .	19
2.3.12. Phương pháp xử lý số liệu.....	19
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	21
3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn trên môi trường DO hoặc PAH	21
3.2. Đánh giá sự hình thành màng sinh học và ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ và NaCl	24
3.3. Định danh vi khuẩn.....	28
3.4. Đánh giá một số đặc điểm hóa lý của mùn cưa	30
3.4.1. Xác định các thành phần nguyên tố có trên vật liệu mang mùn cưa	30
3.4.2. Xác định diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa (BET)	333
3.4.3. Xác định cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD)..	344
3.5. Đánh giá hiệu quả phân hủy dầu	366
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	444
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	455
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	466

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
OD	Optical Density	Mật độ quang
DO	Diesel oil	Dầu diesel
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon	Hydrocarbon thơm đa vòng
CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
EPS	Extracellular Polymeric Substances	Chất nền polymer ngoại bào
XRD	X-ray Diffraction	Nhiễu xạ tia X
EDX	Energy-Dispersive X-ray spectroscopy	Phổ tán sắc năng lượng tia X
BET	Brunauer - Emmett - Teller	Phương pháp Brunauer - Emmett - Teller / phương pháp xác định diện tích bề mặt riêng
SEM	Scanning Electron Microscopy	Hiển vi điện tử quét
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc kí lỏng hiệu năng cao
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Các môi trường dùng nuôi cấy vi sinh vật.....	133
Bảng 2.2 Các thiết bị được dùng trong nghiên cứu	144

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Xu thế số vụ tràn dầu từ tàu chở dầu trên toàn cầu theo thống kê ITOPF (1970 - 2024/2025)	4
Hình 2.1 Hình ảnh vật liệu mùn cưa dạng thô (a) và dạng mịn (b)	133
Hình 2.2 Sơ đồ các bước nghiên cứu	166
Hình 3.1 Hình thái khuẩn lạc của chủng B1 (a) và B3 (b).....	21
Hình 3.2 Mức độ phát triển của hai chủng vi khuẩn B1 và B3 khi sử dụng dầu diesel (DO) và các hợp chất PAH làm nguồn cơ chất.....	232
Hình 3.3 Tác động của các điều kiện môi trường gồm nhiệt độ (a), pH (b) và hàm lượng NaCl (c) đối với khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi sinh	265
Hình 3.4 Cây phát sinh chủng loại của chủng B1 (a) và B3 (b)	298
Hình 3.5 Kết quả đánh giá khả năng đối kháng giữa hai chủng vi sinh vật B1 và B3	29
Hình 3.6 Thành phần các nguyên tố và trọng lượng của chúng trong các loại mùn cưa.....	31
Hình 3.7 Ảnh EDX của mẫu mùn cưa dạng mịn, gồm (a) hình SEM và (b) phổ phát xạ biểu thị các nguyên tố hiện diện.....	322
Hình 3.8 Ảnh EDX của mẫu mùn cưa dạng thô, gồm (a) hình SEM và (b) phổ phát xạ biểu thị các nguyên tố hiện diện.....	333
Hình 3.9 Hình ảnh XRD của mùn cưa dạng mịn (a) và dạng thô (b).....	355
Hình 3.10 Chế phẩm ở dạng mịn tạo thành dưới kính hiển vi điện tử quét (a) và mùn cưa dạng mịn (b); chế phẩm với mùn cưa dạng thô (c) và mùn cưa dạng thô (d)	377
Hình 3.11 Hiệu quả phân hủy các hợp chất có trong dầu thô của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau	388
Hình 3.12 Hiệu quả phân hủy các hợp chất hydrocarbon no của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau	399
Hình 3.13 Hiệu quả phân hủy các hợp chất PAH của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau.....	41

MỞ ĐẦU

Ô nhiễm dầu là vấn đề nghiêm trọng ảnh hưởng đến tài nguyên nước toàn cầu, bắt nguồn từ nhiều nguyên nhân, trong đó có các hoạt động sinh hoạt và công nghiệp. Tình hình ô nhiễm này ngày càng trầm trọng hơn do các sự cố gần đây trong các khâu khai thác, vận chuyển, tồn trữ và sử dụng có thể phát lan rộng ra không gian xung quanh, gây ô nhiễm nghiêm trọng, đặc biệt trong môi trường biển. Vấn đề này thường xảy ra tại tuyến hàng hải, cảng biển, kho - trạm xăng dầu và vùng ven biển - cửa sông. Do tính kỵ nước, bền tương đối và thành phần hydrocarbon phức tạp, dầu khi xâm nhập môi trường có thể tạo màng phủ làm giảm trao đổi oxy, gây độc cho sinh vật, làm ô nhiễm nước và đất, đồng thời kéo theo các tổn thất liên quan đến khía cạnh kinh tế - xã hội. Những giải pháp quản lý và công nghệ hiệu quả là thiết yếu nhằm giảm thiểu ô nhiễm dầu. Hiệu suất tách dầu - nước bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, chẳng hạn như thông số vận hành, chất phụ gia hóa học, thiết kế thiết bị cùng những tác động từ môi trường. Tuy nhiên, các phương pháp tách hiện hành thường gặp hạn chế về thời gian xử lý kéo dài, chi phí vận hành cao và diện tích hệ thống lớn, từ đó cản trở ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp.

Ở Việt Nam, nguy cơ ô nhiễm dầu gia tăng do hoạt động dầu khí và mạng lưới vận chuyển - phân phối xăng dầu phát triển; ô nhiễm không chỉ đến từ sự cố lớn mà còn từ rò rỉ nhỏ và phát thải mạn tính kéo dài. Các biện pháp cơ học và hoá học giúp xử lý nhanh nhưng phụ thuộc điều kiện triển khai và có nguy cơ gây ra ô nhiễm thứ phát. Vì vậy, xử lý sinh học được quan tâm như hướng bền vững, dựa trên khả năng phân giải hydrocarbon của vi sinh vật.

Trong số các kỹ thuật sinh học, gần đây, hướng khai thác vi khuẩn tạo màng sinh học (biofilm) được chú ý vì giúp tăng bám dính, duy trì sinh khối và nâng cao khả năng chống chịu, nhờ vậy có tiềm năng nâng cao hiệu suất xử lý dầu. Để ứng dụng thực tế, tạo chế phẩm ổn định; trong đó, cố định vi khuẩn tạo biofilm trên vật liệu mang là giải pháp triển vọng. Nhiều loại giá thể gồm biochar, sỏi nhẹ keramzit, mút xốp, ... đã được áp dụng. Dầu vậy, hiện vẫn ít công trình đề cập đến mùn cưa nhằm cố định hệ vi sinh và hình thành chế phẩm phục vụ xử lý dầu ô nhiễm. Mùn cưa là loại vật liệu mang có bản chất phụ phẩm, sẵn có, giá rẻ, cấu trúc xốp phù hợp cho hình thành biofilm và có thể hỗ trợ hấp phụ hydrocarbon, nên có tiềm năng làm giá thể tạo chế phẩm.

Từ những lý do nêu trên, đề tài “**Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa**” đã được thực hiện.

Mục đích nghiên cứu

Xây dựng chế phẩm sinh học bằng cách cố định vi khuẩn có khả năng phân giải dầu cũng như hình thành biofilm trên mùn cưa; đánh giá chất lượng chế phẩm và hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu trong môi trường thí nghiệm, qua đó kiến nghị hướng ứng dụng thực tiễn.

Nội dung nghiên cứu

- Nội dung 1. Phân lập thêm các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các hợp chất hydrocarbon có trong dầu mỏ thu từ mẫu bùn và nguồn nước nhiễm dầu
- Nội dung 2. Đánh giá sự hình thành màng sinh học và ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ và NaCl
- Nội dung 3. Phân loại định tên và đánh giá tính đối kháng của các chủng vi khuẩn được lựa chọn
- Nội dung 4. Thử nghiệm 02 loại vật liệu mang mùn cưa để tạo chế phẩm phục vụ xử lý dầu ô nhiễm. Đánh giá chất lượng chế phẩm thông qua mật độ vi sinh vật tổng số và hiệu quả xử lý dầu tổng số

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

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

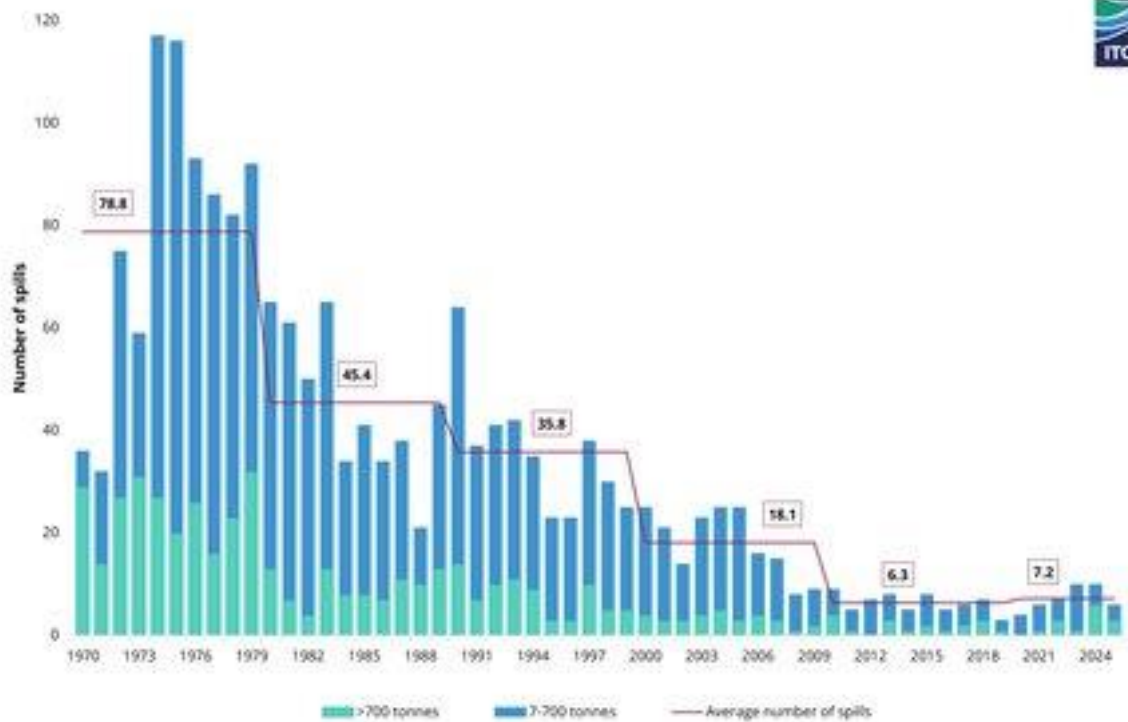
1.1.1. Hiện trạng ô nhiễm dầu trên thế giới

Ô nhiễm dầu từ rất sớm đã được nhận định là một trong các hình thái ô nhiễm hóa học nghiêm trọng đối với môi trường biển trên phạm vi toàn cầu. Dầu mỏ không phải một chất riêng biệt mà là hỗn hợp rất phức tạp, bao gồm chủ yếu hydrocarbon no, hydrocarbon thơm, nhựa và asphalten; ngoài ra còn chứa các hợp chất có lưu huỳnh, nito, oxy và một số kim loại vi lượng [1], [2]. Sự khác biệt về thành phần hóa học khiến dầu có sự đa dạng lớn về đặc tính vật lý, khả năng lan truyền, độ bền trong môi trường và mức độ gây độc sinh học. Trong số các cấu tử của dầu, hydrocarbon thơm, đặc biệt là hydrocarbon thơm đa vòng, thường được chú ý nhiều hơn do có độc tính sinh học cao, khả năng tích lũy và nguy cơ gây tác động lâu dài đối với sinh vật. Ngược lại, nhựa cùng asphalten là các thành phần nặng hơn, ít bị phân hủy hơn, làm gia tăng thời gian tồn lưu của dầu trong đất, trầm tích và môi trường nước [1, 2]. Chính đặc điểm này làm cho ô nhiễm dầu không chỉ là vấn đề xảy ra trong thời gian ngắn sau sự cố mà còn có thể để lại hậu quả môi trường kéo dài.

Ở những thập niên gần đây, dù các sự cố tràn dầu lớn từ tàu vận chuyển dầu đã giảm đáng kể, ô nhiễm dầu vẫn là vấn đề môi trường nổi bật do tồn tại đồng thời nhiều nguồn phát thải khác nhau. Dầu có thể xâm nhập môi trường biển từ các tai nạn tàu chở dầu, hoạt động khai thác dầu khí ngoài khơi, xả thải trong quá trình vận hành tàu, rò rỉ đường ống, nước thải từ đất liền và nhiều nguồn phát thải mạn tính khác [3]. Điều đó cho thấy hiện trạng ô nhiễm dầu ngày nay không chỉ gắn với các sự cố lớn, dễ nhận biết, mà còn liên quan đến những dòng thải nhỏ nhưng lặp lại thường xuyên, phân tán trên phạm vi rộng và khó kiểm soát hơn. Sau khi đi vào môi trường, dầu tiếp tục trải qua hàng loạt quá trình biến đổi như bay hơi, quang oxy hóa, hòa tan, phân tán, nhũ hóa, lắng đọng và phân hủy sinh học. Các quá trình này diễn ra đồng thời với tốc độ khác nhau tùy thuộc vào đặc tính dầu và điều kiện môi trường, từ đó quyết định phạm vi phát tán, khả năng tồn lưu và mức độ tác động sinh học của dầu đối với hệ sinh thái [3].

Xét riêng đối với các sự cố từ tàu chở dầu, những thống kê trên phạm vi toàn cầu chỉ ra xu hướng giảm rõ rệt trong thời gian dài. Nếu như trong thập niên 1970, trung bình mỗi năm thế giới ghi nhận khoảng 79 vụ tràn dầu từ tàu

chở dầu có quy mô từ 7 tấn trở lên, thì đến thập niên 2010 con số này chỉ còn khoảng 6,3 vụ mỗi năm. Giai đoạn từ năm 2020 đến nay, số vụ trung bình vào khoảng 7,2 vụ/năm [4]. Riêng trong năm 2025, có 6 vụ tràn dầu từ tàu chở dầu được ghi nhận, bao gồm 3 vụ lớn trên 700 tấn, với tổng lượng dầu thất thoát ước tính khoảng 4.000 tấn [4]. Những số liệu này phản ánh tác dụng của những giải pháp bảo đảm an toàn hàng hải, cải tiến công nghệ tàu và tăng cường năng lực ứng phó sự cố trong thời gian qua. Tuy nhiên, các vụ tràn dầu lớn chỉ phản ánh một phần của hiện trạng ô nhiễm dầu trên thế giới, bởi trên thực tế còn tồn tại rất nhiều nguồn phát thải nhỏ hơn nhưng xảy ra lặp lại và kéo dài, làm cho tổng áp lực ô nhiễm đối với môi trường biển vẫn ở mức đáng lo ngại.



Hình 1.1. Xu thế số vụ tràn dầu từ tàu chở dầu trên toàn cầu theo thống kê ITOPF (1970 - 2024/2025)

Nguồn: ITOPF - “ITOPF publishes 2025 Oil tanker spill statistics” [4]

Một trong những nguồn phát thải mạn tính đáng chú ý hiện nay là nước thải phát sinh trong hoạt khai thác dầu khí ngoài khơi. Đây là loại dòng thải đi kèm với quá trình khai thác dầu, thường chứa dầu phân tán, hydrocarbon thơm đa vòng, kim loại và một số hợp chất hữu cơ khác, do đó có khả năng gây ảnh hưởng lâu dài tới môi trường biển khi không được kiểm soát chặt chẽ [5]. Ở các khu vực biển có tần suất giao thông hàng hải dày đặc, các vệt dầu nhỏ thường xuyên xuất hiện dọc theo các tuyến vận tải do xả thải vận hành, rò rỉ

nhỏ hoặc các hoạt động hàng hải liên quan. Nghiên cứu viễn thám thực hiện tại khu vực Đông Địa Trung Hải trong giai đoạn 2014-2023 đã ghi nhận 355 sự kiện ô nhiễm dầu với tổng diện tích ảnh hưởng vượt quá 6.000 km², cho thấy mức độ phổ biến của dạng ô nhiễm dầu phân tán tại các khu vực biển có hoạt động hàng hải mạnh [6]. Ở quy mô toàn cầu, việc xây dựng bộ dữ liệu chuẩn hóa gồm 3.550 sự cố tràn dầu trong giai đoạn 1967-2023 đã tạo nền tảng quan trọng cho phân tích xu hướng phát thải, nhận diện khu vực rủi ro và đánh giá toàn diện hơn về hiện trạng ô nhiễm dầu trên thế giới [7].

Ô nhiễm dầu gây ra nhiều tác động sâu rộng lên các hệ sinh thái ở cả môi trường đất liền lẫn thủy vực, từ những biến đổi ở cấp độ tế bào đến những thay đổi ở mức quần xã và toàn bộ hệ sinh thái. Trong môi trường nước, vi tảo là một trong những nhóm sinh vật nhạy cảm với các thành phần của dầu mỏ. Sự hiện diện của dầu có thể ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng, hoạt động quang hợp, cơ cấu thành phần loài cùng cấu trúc của quần xã vi tảo, từ đó tác động đến bậc dinh dưỡng nền của hệ sinh thái thủy vực [8]. Đối với cá và nhiều nhóm động vật thủy sinh khác, việc tiếp xúc với các chất ô nhiễm có nguồn gốc từ dầu có thể gây tổn thương mô, bất thường phát triển, rối loạn nội tiết, làm suy yếu hệ miễn dịch và gia tăng tỷ lệ chết [3]. Những tác động này không chỉ xuất hiện ở mức phơi nhiễm cấp tính mà còn có thể tích lũy và biểu hiện trong giai đoạn kéo dài do ảnh hưởng của các cấu tử bền vững của dầu.

Nhiều nghiên cứu còn cho thấy các sự cố tràn dầu lớn có thể để lại hậu quả sinh thái kéo dài trong nhiều năm sau khi sự cố kết thúc. Những tác động lâu dài này đã được ghi nhận đối với san hô biển sâu, đất ngập nước ven biển, quần thể chim biển, rùa biển, động vật có vú ở biển và nhiều nhóm sinh vật khác [9]. Khả năng phục hồi của hệ sinh thái chịu tác động từ nhiều nhân tố, chẳng hạn kiểu dầu, lượng dầu tràn, đặc điểm sinh cảnh, điều kiện thủy động lực học cũng như tác dụng của các giải pháp ứng phó sớm. Điều này cho thấy đánh giá ô nhiễm dầu không thể chỉ giới hạn ở khâu xác định lượng dầu bị thất thoát, mà cần xem xét cả độc tính còn lại, sự tồn lưu trong trầm tích và các biến đổi lâu dài về cấu trúc và chức năng của hệ sinh thái.

Nhìn chung, tình hình ô nhiễm dầu toàn cầu hiện nay cho thấy một xu thế kép. Một mặt, các vụ tràn dầu lớn từ tàu chở dầu đã giảm rõ rệt so với trước đây; mặt khác, ô nhiễm dầu vẫn tồn tại dai dẳng dưới dạng phát thải mạn tính, phân tán và khó kiểm soát hơn [3-5]. Vì vậy, nghiên cứu hiện nay không chỉ

tập trung vào ứng phó sự cố cấp tính mà còn mở rộng sang giám sát bằng viễn thám, đánh giá độc tính sinh thái, nhận diện nguồn ô nhiễm và phát triển các giải pháp phục hồi hệ sinh thái. Trong số đó, xử lý sinh học đang được xem như một hướng tiếp cận có triển vọng nhờ khả năng giảm hydrocarbon dầu mỏ theo cách ít gây tác động hơn đến môi trường và có tiềm năng hỗ trợ phục hồi sinh thái sau ô nhiễm [10]. Có thể thấy rằng, dù hình thức biểu hiện đã thay đổi theo thời gian, ô nhiễm dầu vẫn là vấn đề môi trường biển nghiêm trọng ở quy mô toàn cầu và đòi hỏi sự kết hợp giữa phòng ngừa, giám sát, phân tích rủi ro và áp dụng các biện pháp ứng phó thích hợp.

1.1.2. Hiện trạng ô nhiễm dầu tại Việt Nam

Việt Nam có đường bờ biển dài, nhiều cảng biển, khu công nghiệp ven biển, kho xăng dầu, nhà máy lọc dầu và hoạt động khai thác dầu khí ngoài khơi. Vì vậy, ô nhiễm dầu là một trong những nguy cơ môi trường đáng quan tâm, đặc biệt tại các khu vực có mật độ tàu thuyền cao như Hải Phòng, Quảng Ninh, Đà Nẵng, Dung Quất, Cái Mép - Thị Vải và TP. Hồ Chí Minh [11], [12]. Nguồn phát sinh ô nhiễm dầu chủ yếu gồm sự cố trong khai thác, vận chuyển, bốc dỡ, lưu chứa xăng dầu; nước thải nhiễm dầu từ cảng biển, cơ sở sửa chữa tàu, khu công nghiệp; dầu thải từ phương tiện giao thông thủy và dòng chảy mặt cuốn theo dầu mỡ từ khu vực đô thị ra sông, biển [11], [12].

Trong những năm gần đây, hoạt động hàng hải và dầu khí ở Việt Nam tiếp tục phát triển, làm tăng áp lực lên môi trường nước và trầm tích ven biển. Năm 2024, tổng lượng hàng hóa thông qua hệ thống cảng biển Việt Nam đạt khoảng 864,4 triệu tấn, tăng khoảng 14% so với năm 2023; sản lượng container đạt khoảng 29,9 triệu TEU, tăng khoảng 21% [14]. Bên cạnh đó, hai nhà máy lọc dầu Dung Quất và Nghi Sơn hiện đáp ứng khoảng 70% nhu cầu xăng dầu trong nước, cho thấy quy mô lớn của hoạt động nhập khẩu, vận chuyển, lưu chứa, chế biến và phân phối xăng dầu [15].

Ô nhiễm dầu ở Việt Nam không chỉ xuất hiện dưới dạng sự cố tràn dầu mà còn tồn tại âm thầm dưới dạng ô nhiễm mạn tính với hàm lượng thấp trong nước, bùn đáy và trầm tích. Các hydrocarbon dầu mỏ, đặc biệt là nhóm hydrocarbon thơm đa vòng - PAH như anthracen, phenanthren, pyren - có tính kỵ nước, khó phân hủy và dễ tích lũy trong trầm tích [17]. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy PAH trong trầm tích tại Việt Nam dao động từ 33 đến 6400

ng/g, phản ánh sự hiện diện phổ biến của nhóm chất này trong môi trường chịu tác động của đô thị hóa, giao thông, công nghiệp và hoạt động dầu khí [17].

Dầu và các sản phẩm dầu mỏ có thể tạo màng trên mặt nước, làm giảm trao đổi oxy, cản trở ánh sáng, gây độc cho sinh vật thủy sinh và ảnh hưởng đến hệ sinh thái ven biển [12], [18]. Khi đi vào trầm tích, các hợp chất khó phân hủy có thể tồn lưu lâu dài, làm thay đổi cấu trúc quần xã sinh vật và tiềm ẩn nguy cơ tích lũy sinh học trong chuỗi thức ăn [17], [18]. Vì vậy, bên cạnh các biện pháp cơ học và hóa học, việc nghiên cứu các giải pháp sinh học sử dụng vi sinh vật phân hủy hydrocarbon, đặc biệt là vi sinh vật tạo màng sinh học trên vật liệu mang, có ý nghĩa thực tiễn trong xử lý ô nhiễm dầu tại Việt Nam [16], [17].

1.2. MỘT SỐ ẢNH HƯỞNG DO Ô NHIỄM DẦU GÂY RA

Nước bị ô nhiễm không chỉ làm gián đoạn đời sống thủy sinh mà còn gây thiệt hại cho ngành thủy sản, du lịch và cơ sở hạ tầng ven biển [19]. Sự hiện diện của dầu trong nước thải làm giảm nồng độ oxy, làm xấu đi chất lượng nguồn nước và gây ra các nguy cơ đối với sức khỏe đáng kể, gây ra các rối loạn tiêu hóa, tổn thương cơ quan nội tạng và làm gia tăng nguy cơ ung thư [20]. Sự phát triển mạnh mẽ của công nghiệp trong những thập niên gần đây đã làm gia tăng lượng nước thải nhiễm dầu phát sinh từ nhiều nguồn khác nhau, khiến công tác quản lý và xử lý loại nước thải này trở nên phức tạp hơn, ví dụ như các giếng dầu, cơ sở lọc dầu, cơ sở hóa dầu, đồng thời thậm chí cả các nguồn trong nước như nhà hàng [21]. Thành phần dầu trong nước bị ô nhiễm rất đa dạng, ở nồng độ dao động từ 1 tới 40.000 mg/l. Năm 2022, sản lượng dầu thô toàn cầu được dự báo sẽ đạt khoảng 4.500 triệu tấn [22]. Sự tăng trưởng này đã dẫn đến việc tạo ra 9-14 tỷ m³ nước thải nhiễm dầu trên toàn cầu, gây ra những tác động nghiêm trọng đối với hệ sinh thái do các vết dầu loang trên bề mặt làm ngạt thở đời sống không chỉ các sinh vật dưới nước mà cả sinh vật trên cạn, đồng thời cản trở sự thâm nhập của oxy và ánh sáng mặt trời [23].

Mặc dù ở các mức độ phức tạp khác nhau, các sinh vật được trang bị các công cụ phòng vệ chống lại các chất ngoại lai giúp chuyển hóa và đào thải những tác nhân ô nhiễm. Sự biến đổi các chất gây ô nhiễm bên trong cơ thể động vật được gọi là quá trình chuyển hóa sinh thể, và thường gồm hai giai đoạn: Pha I (giai đoạn gắn nhóm chức), gắn một nhóm chức năng vào chất

ngoại lai, sau đó một hợp chất hòa tan trong nước sẽ được gắn vào ở giai đoạn II (giai đoạn liên hợp) [24]. Sự tăng độ hòa tan trong nước giúp thúc đẩy việc bài tiết thông qua thận (ở động vật có xương sống) hoặc tuyến gan tụy (ở động vật hai mảnh vỏ, ốc sên, giáp xác [25]; và các cơ quan chuyên biệt khác liên quan đến tiêu hóa (động vật không xương sống nói chung). Tuy nhiên, các hợp chất ban đầu không hoạt động sinh học trên thực tế có thể được hoạt hóa trong quá trình chuyển hóa sinh học này. Đặc biệt trong giai đoạn biến đổi chức năng, các hợp chất có thể trở nên độc hại, gây đột biến hoặc gây ung thư hơn so với hợp chất ban đầu [24]. Các hệ enzyme tham gia vào tiến trình chuyển hóa sinh học thường nằm ở gan ở động vật có xương sống hoặc ở các cơ quan gắn với hoạt động tiêu hóa thức ăn ở động vật không xương sống. Hiệu quả của quá trình giải độc chất ngoại lai cũng phụ thuộc vào vị trí tác động của chất gây ô nhiễm: các loại biến đổi hóa học khác nhau có thể ảnh hưởng đáng kể đến độc tính, khả năng gây đột biến và khả năng gây ung thư đối với sản phẩm thu được [26].

Từ đó có thể nhận thấy ô nhiễm dầu gây ảnh hưởng rất lớn đến hệ sinh thái, chính vì thế, nhiều giải pháp xử lý đã được triển khai nhằm cải thiện tình trạng này.

1.3. MỘT SỐ BIỆN PHÁP XỬ LÝ Ô NHIỄM DẦU

Nước thải từ hoạt động công nghiệp có dầu cũng như các vùng đất bị ô nhiễm dầu tạo ra rủi ro môi trường và sức khỏe đáng kể, với những thách thức đa dạng giữa các quốc gia phát triển, đang phát triển và thu nhập thấp. Trong khi các quốc gia phát triển tiếp cận được công nghệ tiên tiến, các chất ô nhiễm mới đặt ra những thách thức mới. Các quốc gia đang phát triển và thu nhập thấp gặp khó khăn với cơ sở hạ tầng lạc hậu và thiếu khung quy định. Xử lý những vấn đề đó đòi hỏi cách tiếp cận tích hợp trong xử lý nước thải, kết hợp những giải pháp sinh học, hóa học và vật lý nhằm nâng cao đồng thời hiệu quả và độ bền vững. Phương pháp vật lý chủ yếu dùng để thu gom, tách và loại bỏ dầu nhanh trong giai đoạn đầu, nhưng khó xử lý triệt để phần dầu đã bám dính hoặc thấm sâu vào đất, trầm tích [20-32]. Các giải pháp hóa học được sử dụng để phân tán, hòa tan hoặc tách chiết các thành phần dầu, trong đó rửa đất bằng chất hoạt động bề mặt và sử dụng chất phân tán là những hướng phổ biến, song cần kiểm soát nguy cơ ô nhiễm thứ cấp và tác động sinh thái [33], [34].

Trong những phương án nêu trên, xử lý sinh học được đánh giá cao về tính bền vững vì dựa trên khả năng của vi sinh vật hoặc thực vật trong việc phân hủy, chuyển hóa hoặc làm giảm độc tính của hydrocarbon dầu mỏ. Các hướng áp dụng chính gồm kích thích sinh học, tăng cường sinh học và xử lý bằng thực vật, trong đó chất hoạt hóa bề mặt sinh học có hiệu quả đáng kể [31], [32], [35], [36]. Vi khuẩn, nấm và các loài vi sinh cổ đại có khả năng phân giải hydrocarbon phân bố trên toàn cầu trong đại dương và là các tác nhân giữ vai trò đáng kể trong sự phân hủy tự nhiên của dầu bị rò rỉ [28]. Hệ vi sinh cho phép phân hủy các chất gây ô nhiễm này thông qua việc tiết ra một số enzyme để phân hủy những hóa chất hữu cơ phức tạp, tức là hydrocarbon, thành ra các hợp chất đơn giản hơn và dễ phân hủy hơn hoặc phân giải tiếp thành các hóa chất ít độc hại hơn [29]. Các enzyme do hệ vi sinh tiết ra là tác nhân phân hủy chất gây ô nhiễm, thể hiện hoạt động sinh học trong đất và tác động của ô nhiễm đến sinh học của đất. Nghiên cứu các enzyme tham gia phân hủy hydrocarbon có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá mức độ ảnh hưởng của ô nhiễm dầu đến hoạt tính sinh học của đất. Đất bị ô nhiễm hydrocarbon từ các hoạt động công nghiệp, sự cố tràn dầu hoặc việc sử dụng các sản phẩm dầu mỏ trải qua quá trình phân hủy sinh học mạnh mẽ [29].

Ngoài ra, việc sử dụng các chất mang như than hoạt tính, than hoạt tính biến tính, ... được quan tâm nhờ khả năng hấp phụ hydrocarbon dầu mỏ, làm giảm tính di động của chất ô nhiễm đồng thời thúc đẩy hoạt động của hệ vi sinh [37-38].

Nhìn chung, xu thế hiện nay là kết hợp nhiều phương pháp trong cùng một hệ xử lý nhằm vừa giảm hàm lượng hydrocarbon dầu mỏ, vừa giảm độc tính còn lại và phục hồi hệ sinh thái sau ô nhiễm [19], [32], [37], [38].

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

1.4.1. Ứng dụng màng sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu trên thế giới và Việt Nam

Biofilm là quần thể các tế bào vi sinh vật cư trú trên bề mặt vật mang hoặc ở ranh giới phân cách dầu - nước, được bao bọc bởi lớp chất nền ngoại bào do chính chúng tiết ra [31], [32], [39]. Cấu trúc đó giúp vi sinh vật duy trì sự liên kết với nhau và với bề mặt bám dính, đồng thời tạo nên một vi môi trường tương đối ổn định cho hoạt động sống và trao đổi chất. Trong quá trình

xử lý dầu ô nhiễm, màng biofilm được chú ý nhiều vì có thể làm tăng mật độ tế bào trong hệ xử lý, hạn chế hiện tượng rửa trôi sinh khối và nâng cao khả năng thích nghi của vi sinh vật trước độc tính của dầu cũng như những thay đổi của các yếu tố môi trường [31], [32], [39]. Bên cạnh đó, sự bám dính của tế bào lên bề mặt giá thể hoặc bề mặt dầu - nước còn giúp vi sinh vật tiếp cận tiếp hơn với hydrocarbon dầu mỡ, từ đó góp phần cải thiện khả năng phân hủy các chất ô nhiễm..

Trên thế giới, việc ứng dụng màng sinh học vào xử lý ô nhiễm dầu chủ yếu phát triển theo hai hướng chính. Hướng thứ nhất là khai thác khả năng tạo thành màng sinh học của các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocarbon trong môi trường ô nhiễm. Hướng thứ hai là cố định các vi sinh vật này lên vật liệu mang nhằm tạo ra hệ xử lý ổn định hơn, có thể tái sử dụng và thuận lợi hơn cho triển khai ở quy mô thực tế [31], [39], [40]. Nhiều công trình đã chỉ ra hệ biofilm không chỉ nâng cao hiệu quả loại bỏ dầu mà còn hỗ trợ mở rộng phổ phân hủy đối với các nhóm hydrocarbon khác nhau, đồng thời cải thiện mức độ thích ứng của vi sinh vật với các điều kiện bất lợi như biến động pH, độ mặn, nhiệt độ hoặc nồng độ chất ô nhiễm cao [39]-[43]. So với hệ sử dụng tế bào tự do, hệ màng sinh học thường có độ ổn định sinh học tốt hơn, giúp duy trì hoạt tính phân hủy trong thời gian dài hơn và giảm tổn thất sinh khối trong quá trình vận hành.

Hiệu quả mà màng sinh học mang lại trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu còn liên quan đến khả năng hình thành các tương tác cộng đồng giữa nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau trong cùng một cấu trúc bám dính. Trong hệ biofilm, các vi sinh vật có thể hỗ trợ lẫn nhau về mặt trao đổi chất, qua đó thúc đẩy quá trình phân hủy liên tiếp hoặc đồng thời nhiều thành phần của dầu mỡ [31], [32], [39]. Ngoài ra, ma trận ngoại bào còn giúp bảo vệ tế bào trước tác động bất lợi của môi trường và làm tăng khả năng lưu giữ cơ chất gần bề mặt màng, từ đó tạo thuận lợi để quá trình phân hủy hydrocarbon diễn ra hiệu quả hơn. Chính vì vậy, màng sinh học ngày càng được xem là một nền tảng quan trọng trong phát triển các công nghệ sinh học xử lý ô nhiễm dầu theo hướng bền vững.

Tại Việt Nam, việc triển khai màng sinh học trong xử lý nguồn nước nhiễm dầu đã bước đầu được khảo sát trên nhiều loại vật liệu mang khác nhau như hạt xi, xơ dừa, bọt polyurethane, xenlulo và than sinh học [35], [44-48].

Các vật liệu này được quan tâm vì vừa có khả năng tạo bề mặt cho vi sinh vật bám dính, vừa có tiềm năng hỗ trợ giữ dầu hoặc hấp phụ một phần hydrocarbon, qua đó giúp vi sinh vật tiếp cận và phân hủy chất ô nhiễm hiệu quả hơn. Một số nghiên cứu trong nước cho thấy việc sử dụng vật liệu mang thích hợp có thể hỗ trợ cải thiện hiệu quả xử lý dầu trong nước, đồng thời mở ra khả năng tạo chế phẩm sinh học có tính ứng dụng cao trong thực tế [44-48]. Việc tận dụng các nguồn vật liệu sẵn có, giá thành thấp hoặc có nguồn gốc từ phụ phẩm nông nghiệp cũng phù hợp với điều kiện nghiên cứu và ứng dụng tại nước ta, nhất là trong bối cảnh cần xây dựng các giải pháp xử lý theo hướng thân thiện với môi trường và có thể triển khai ở quy mô lớn hơn.

Nhìn chung, màng sinh học được xem là hướng tiếp cận rất triển vọng trong xử lý dầu ô nhiễm nhờ khả năng ổn định sinh khối, tăng hiệu quả phân hủy hydrocarbon và nâng cao tính chịu đựng của vi sinh vật trong môi trường ô nhiễm [31], [32], [39]. Trên thế giới, hướng nghiên cứu này đã được phát triển theo cả chiều sâu cơ chế lẫn ứng dụng vật liệu mang, trong khi tại Việt Nam các kết quả bước đầu cũng cho thấy triển vọng rõ rệt của việc tạo chế phẩm xử lý dầu dựa trên biofilm [35], [44-48]. Đây là cơ sở quan trọng để tiếp tục nghiên cứu, tối ưu hóa vật liệu mang, lựa chọn chủng vi sinh vật phù hợp và xây dựng các hệ xử lý sinh học hiệu quả hơn trong điều kiện thực tiễn.

1.4.2. Đặc điểm của mùn cưa trong ứng dụng xử lý ô nhiễm dầu

Mùn cưa là phụ phẩm lignocellulose phổ biến của ngành chế biến gỗ, có ưu thế về tính sẵn có, giá thành thấp, khả năng tự phân giải sinh học cùng độ an toàn với môi trường, vì thế có thể được dùng làm vật liệu hấp phụ trong xử lý dầu ô nhiễm [49-50]. Cấu phần chính của mùn cưa gồm cellulose, hemicellulose và lignin; cùng với cấu trúc xốp, hệ mao quản tự nhiên và diện tích bề mặt nhất định, các đặc điểm này tạo điều kiện cho dầu bám dính, thấm hút và lưu giữ trong mạng lưới sợi gỗ [49], [51]. Dẫu vậy, do chứa nhiều nhóm hydroxyl, mùn cưa nguyên bản vẫn thiên về tính ưa nước, nên hiệu quả giữ dầu còn phụ thuộc mạnh vào loại dầu, độ ẩm và điều kiện môi trường [50-51].

Ở dạng vật liệu ban đầu, mùn cưa có thể loại bỏ dầu nhờ các cơ chế hấp phụ bề mặt, thấm hút vào mao quản và giữ cơ học trong cấu trúc xốp [49-55]. Trong hệ nhũ tương dầu/nước, mùn cưa còn có thể tham gia vào quá trình kết tụ giọt dầu và hỗ trợ tách dầu khỏi nước [55]. Dù vậy, hạn chế lớn của mùn cưa thô là độ chọn lọc dầu/nước chưa cao, dễ hút ẩm và trương nở khi tiếp xúc với

nước [49-50]. Vì vậy, nhiều công trình tập trung vào cải tính bề mặt theo hướng tăng tính kỵ nước - ưa dầu, chẳng hạn ghép acid béo hoặc tổ hợp với vật liệu mang từ tính, để nâng cao khả năng hấp phụ và thuận lợi cho thu hồi vật liệu sau xử lý [50], [54], [56], [57].

Ngoài ra, biochar và các vật liệu carbon hóa từ mùn cưa cũng đang được quan tâm vì có thể làm giảm nhóm ưa nước, tăng độ xốp và cải thiện khả năng hấp phụ hydrocarbon [51], [58], [59]. Mùn cưa có thể đóng vai trò chất mang, hỗ trợ vi sinh vật phân hủy hydrocarbon sau giai đoạn hấp phụ ban đầu, mở ra khả năng tích hợp hấp phụ - phân hủy sinh học trong cùng một quy trình xử lý [60-61]. Nhìn chung, mùn cưa không chỉ là một chất hấp phụ giá rẻ mà còn là nền vật liệu sinh học linh hoạt, có thể được tối ưu hóa cho thu gom dầu nổi, xử lý nhũ tương dầu/nước, chế tạo biochar hấp phụ hoặc hỗ trợ phân hủy sinh học hydrocarbon [50], [51], [58-61]. Tuy nhiên, hiệu quả thực tế vẫn phụ thuộc đáng kể vào nguồn gốc gỗ, kích thước hạt, độ ẩm, phương pháp biến tính và điều kiện ô nhiễm cụ thể [49-51], [56-59].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

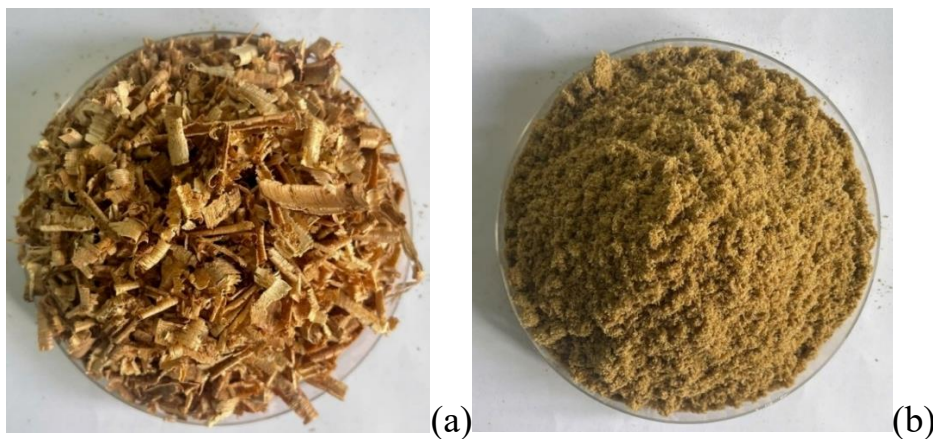
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu, được phân lập từ các mẫu đất và nước nhiễm dầu lấy tại cảng Nghi Sơn, xã Hoàng Thanh,... tỉnh Thanh Hóa.

Mẫu đất và nước nhiễm dầu chứa DO và PAH.

Giá thể: Mùn cưa có nguồn gốc từ những nhóm gỗ phổ biến ở Việt Nam (ví dụ: thông, keo, cao su...) được dùng làm vật liệu giá thể nhằm giữ cố định tế bào. Mùn cưa được mua trên thị trường. Nghiên cứu 2 dạng mùn cưa khác nhau của cùng một nguồn nguyên liệu gỗ:

- + Mùn cưa thô: các vụn to, không đồng đều, kích thước từ 3-4 mm x 6-10 mm
- + Mùn cưa mịn: hạt nhỏ, đồng đều, kích thước 0,3 – 1 mm



Hình 2.1 Hình ảnh vật liệu mùn cưa dạng thô (a) và dạng mịn (b)

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.2.1. Nguyên vật liệu

Những mẫu đất cùng nước nhiễm dầu được nêu ở phần trên.

Mùn cưa và các hóa chất thông dụng.

Bảng 2.1 Các môi trường dùng nuôi cấy vi sinh vật

Tên môi trường	Thành phần	Số lượng	Thành phần	Số lượng
		(g/l)		(g/l)
	NH ₄ NO ₃	2	Glucose	1

Môi trường HKTS thạch	KH ₂ PO ₄	1	Pepton	5
	NaCl	5	Cao men	0,2
	KCl	0,25	Cao thịt	3
	MgCl ₂	1,2	Thạch	20
	pH	7-7,2		
Môi trường khoáng Gost vi khuẩn	KNO ₃	3	NaHPO ₄	0.7
	MgSO ₄	0.4	NaCl	1
	KH ₂ PO ₄	0.3	pH	7-7.2
Môi trường MPA dùng cho vi khuẩn	Cao thịt	5	NaCl	5
	Pepton	10	pH	7
Môi trường LB dùng cho vi khuẩn	NaCl	10	Cao men	5
	Tryptone	10	pH	7-7.2

Ngoài ra còn sử dụng các cơ chất như: phenol, dầu diesel, dầu thô, anthracene, pyrene, phenanthrene,... các nguyên tố vi lượng, vitamin,... để làm giàu và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng sử dụng các hợp chất hydrocarbon trong dầu mỏ.

2.2.2. Trang thiết bị chính

Để thực hiện các nội dung của Luận văn này, các trang thiết bị hiện có tại Phòng Công nghệ Sinh học Môi trường, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam được sử dụng; ngoài ra còn được hỗ trợ thêm trang thiết bị và máy móc của Viện Công nghệ tiên tiến thuộc VAST; Ủy ban Đo lường và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, Hà Nội.

- Danh mục thiết bị được nêu ở Bảng 2.2:

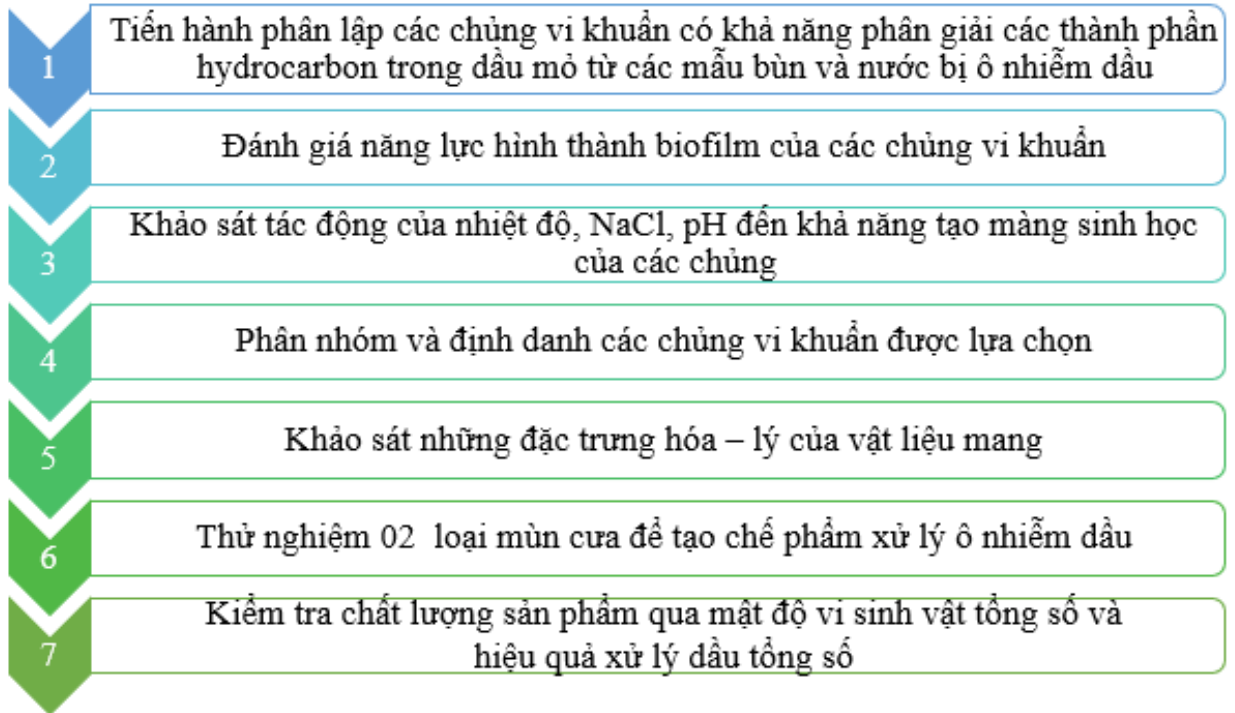
Bảng 2.2 Các thiết bị được dùng trong nghiên cứu

Tên thiết bị	Hãng/nước sản xuất	Mục đích sử dụng
Cân kỹ thuật BJ 610C	Precisa, Thụy Sĩ	Để cân các vật liệu, hóa chất
Lò vi sóng NN-S215WF	Panasonic, Trung Quốc	Đun nóng môi trường nuôi cấy

Kính hiển vi điện tử quét S-4800	Hitachi, Nhật Bản	Quan sát hình thái vi sinh vật
Máy đo quang phổ UV-1601-220V	Shimadzu, Nhật Bản	Đo mật độ quang của sinh khối vi sinh vật
Kính hiển vi Eclipse LV-UDM	Nikon, Nhật Bản	Quan sát tế bào vi sinh vật
Máy chuẩn pH-CyberScan pH 620	Eutech, Singapore	Đo pH khi pha môi trường
Máy phân tích GCMS QP2010	Shimadzu, Nhật bản	Kiểm tra hàm lượng các hoạt chất có trong lá bơ
Máy phân tích HPLC Hewlett-Packard	HP Hewlett-Packard, Đức	Kiểm tra hàm lượng các hoạt chất có trong lá bơ
Máy ly tâm eppendorf 5417R	Eppendorf, Đức	Ly tâm dịch nuôi với các thể tích nhỏ
Máy vortex BR-2000	Biorad, Mỹ	Trộn sinh khối sau khi ly tâm cho đồng nhất
Tủ sấy dụng cụ JSOF - 100	Jsr, Hàn Quốc	Sấy và khử trùng khô dụng cụ thí nghiệm
Nồi hấp tiệt trùng MC – 30L	Alp, Nhật Bản	Khử trùng môi trường, vật liệu, dụng cụ thí nghiệm
Tủ ấm và tủ lắc nuôi cấy NB205QF	N – Biotek, Hàn Quốc	Nuôi vi sinh vật
Tủ lạnh sâu -80°C MDF-192	Sanyo, Nhật Bản	Bảo quản giống
Tủ cấy vô trùng AVC-4A1	Esco, Singapore	Tiến hành các bước thí nghiệm về vi sinh vật để đảm bảo tính vô trùng
Tủ lạnh SJ-169S-DS	Sharp, Thái Lan	Cất mẫu tạm thời

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Trình tự các bước nghiên cứu được minh họa bởi sơ đồ sau:



Hình 2.2 Sơ đồ các bước nghiên cứu

2.3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng phân hủy các thành phần dầu mỏ

2.3.1.1. Lấy mẫu

Các mẫu thu gồm mẫu đất và nước tại các khu vực nhiễm dầu được lấy tại cảng Nghi Sơn, xã Hoàng Thanh,... tỉnh Thanh Hóa dựa trên TCVN 7538-6:2010 [62] và TCVN 663-1:2011 [63]. Những mẫu này được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C để phục vụ các bước xử lý tiếp theo.

2.3.1.2. Làm giàu vi sinh vật phân hủy các thành phần dầu mỏ

Sử dụng môi trường khoáng Gost với cơ chất là dầu diesel (100 ppm) hoặc phối trộn PAH (50 ppm) gồm anthracen, pyren và phenanthren để làm giàu các quần xã vi sinh vật có khả năng phân giải dầu [64].

2.3.1.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các thành phần dầu mỏ

Dựa trên hướng dẫn của Cung Thị Ngọc Mai và cộng sự (2012), các chủng có khả năng phân giải dầu diesel (DO) hoặc PAH được tiến hành phân lập và sàng lọc lựa chọn [64]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

2.3.2. Đánh giá sự hình thành màng sinh học và ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ và NaCl

Những chủng vi khuẩn đã được phân lập ở mục 2.3.1 được sử dụng để đánh giá khả năng tạo màng sinh học theo phương pháp đã được mô tả bởi Lê Thị Nhi Công và cộng sự [65]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

Khả năng tạo màng sinh học của các chủng được khảo sát dưới các điều kiện khác nhau:

- Các giá trị nhiệt độ như: 4, 25, 30, 35, 40, 45 và 50°C đã được sử dụng để thay thế ở bước nuôi trong tủ ấm 30°C.
- Nồng độ NaCl được sử dụng trong nghiên cứu là 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3% đã được bổ sung vào môi trường LCFBM để đánh giá ảnh hưởng của NaCl lên khả năng tạo biofilm.
- Các giá trị pH như 3; 4; 5; 6; 7; 8 và 9 đã được sử dụng trong nghiên cứu.

Sau khi nuôi cấy, khả năng tạo biofilm được xác định bằng phương pháp đo OD570 như trên để xác định điều kiện tối ưu cho từng chủng.

2.3.3. Phân loại định tên và đánh giá mức độ đối kháng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

- Chủng vi khuẩn được định tên bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S. So sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn mục tiêu với trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn chuẩn trên Danh sách các tên gọi sinh vật nhân sơ có vị trí trong danh pháp (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN), dựa vào phần mềm Clustal X và Treeview để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn này [60]. Qua đó xác định tên loài và vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn.

- Kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lựa chọn:

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy kết hợp trên cùng môi trường nhằm đánh giá khả năng ức chế lẫn nhau và khả năng cùng tồn tại. Những chủng

không có hiện tượng đối kháng sẽ được lựa chọn để phối hợp tạo chế phẩm sinh học.

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

2.3.4. Phương pháp tạo chế phẩm

Để tạo chế phẩm, mùn cưa được làm sạch tạp chất, sấy khô và khử trùng trước khi thực hiện quá trình cố định vi sinh vật. Chế phẩm được tạo ra theo phương pháp lên men xộp như mô tả bởi Trần Thị Lương và cộng sự (2023) [66]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

2.3.5. Xác định mật độ vi khuẩn trong chế phẩm

Nhằm định lượng mật độ vi khuẩn trong chế phẩm, áp dụng phương pháp đếm đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU đã được sử dụng [65]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

2.3.6. Thành phần các nguyên tố trên vật liệu mùn cưa được phân tích bằng kỹ thuật tán xạ năng lượng tia X (EDX - Energy – Dispersive X-ray Analysis)

Sử dụng hệ thiết bị HORIBA 7593-H kết hợp HITACHI S-4800; khoảng cách làm việc 15 mm, điện thế 20 kV nhằm nhận diện các thành phần nguyên tố hiện diện trong mùn cưa [67]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

Tiến hành chuẩn bị và nạp mẫu thử vào thiết bị: mẫu mùn cưa được cố định trên bộ mẫu đặt trong buồng chân không của máy SEM, tại đó chùm electron được hội tụ và chiếu trực tiếp lên bề mặt mẫu. Khoảng cách từ đầu tip đến mẫu là 5-6 mm, chùm điện tử có năng lượng 5 kV đã được sử dụng.

2.3.7. Xác định diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết (BET – Brunauer – Emmett – Teller)

Sử dụng máy Horiba SA 9600 (Nhật Bản) để đo bề mặt riêng của vật liệu mang; đồng thời sử dụng phần mềm Excel để xử lý số liệu và thiết lập đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết [68]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

2.3.8. Phân tích cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD - X-ray Diffraction)

Sử dụng thiết bị sử dụng đo XRD là D8-Advance, hãng Bruker, CHLB Đức; phổ nhiễu xạ được phân tích bằng phần mềm Diffrac.eva (Bruker) để phân tích cấu trúc vật liệu [69]. Chi tiết tại Phụ lục 1.

2.3.9. Chụp ảnh hiển vi điện tử quét (SEM - Scanning Electron Microscopy)

Các biofilm tạo thành cũng như mùn cưa đã được đặt nhẹ nhàng lên đĩa thủy tinh có phủ poly-L-lysine. Sau đó, màng sẽ được cố định bằng glutaraldehyde và OsO₄; sử dụng dung môi có chứa ethanol, isoamyl acetate và CO₂ để loại nước còn lại trong biofilm, mùn cưa; sau đó phủ platinum để quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét HITACHI S-4800 [44].

2.3.10. Xác định hiệu quả phân hủy dầu DO

Để xác định mức độ phân hủy DO của chế phẩm bằng kỹ thuật phân tích khối lượng theo tiêu chuẩn TCVN 4582-88 [70] đã được sử dụng.

2.3.11. Xác định hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon thơm

Cân 10 g chế phẩm phù hợp vào 100 ml nước chứa 200 ppm hỗn hợp PAH hoặc 250 ppm dầu diesel vào bình tam giác 1000 ml. Đảo nhẹ rồi để tĩnh ở 30°C. Sau 7 ngày nuôi cấy, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào của màng sinh học tạo thành trên mùn cưa, chụp ảnh hiển vi điện tử quét. Lượng dầu DO trong các mẫu nước trước và sau xử lý được xác định bằng phương pháp phân tích khối lượng theo **Error! Reference source not found.** Hàm lượng hydrocarbon thơm còn lại bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Các thí nghiệm đối chứng bao gồm thí nghiệm chỉ sử dụng hỗn hợp nuôi 2 chủng vi khuẩn mà không có chất mang và thí nghiệm chỉ sử dụng chất mang mà không có vi sinh vật.

2.3.12. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần và xử lý số liệu thống kê bằng phần mềm Excel. Từ đó, xác định trị số trung bình, độ lệch chuẩn và trình bày kết quả bằng đồ thị trên công cụ này.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn trên môi trường DO hoặc PAH

Từ những mẫu đất cùng nước nhiễm dầu, đã tiến hành phân lập và sàng lọc thu được hai chủng vi khuẩn, kí hiệu là B1 và B3; hai chủng này có sinh trưởng tốt trên nồng độ 100 ppm dầu DO và mức 50 ppm PAH (Hình 3.1).



(a)



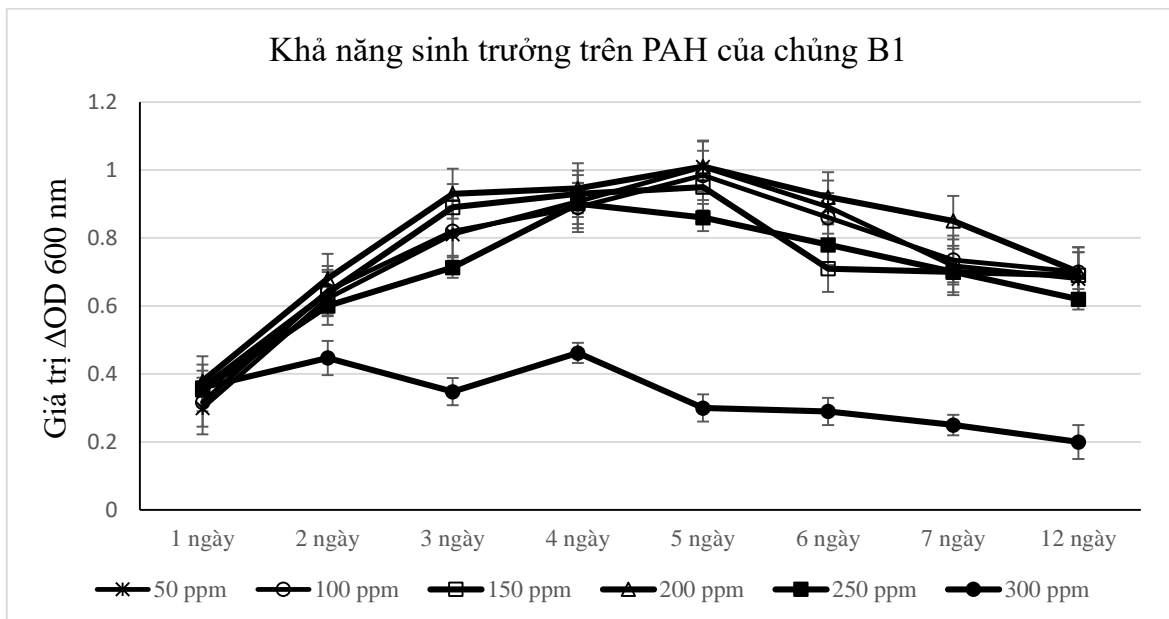
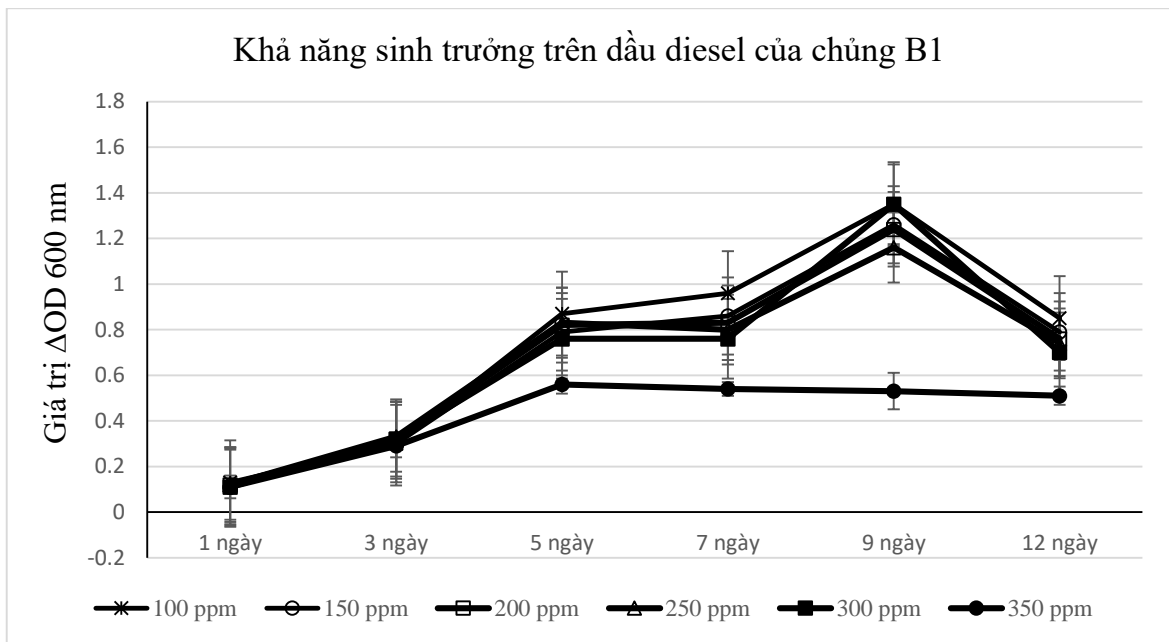
(b)

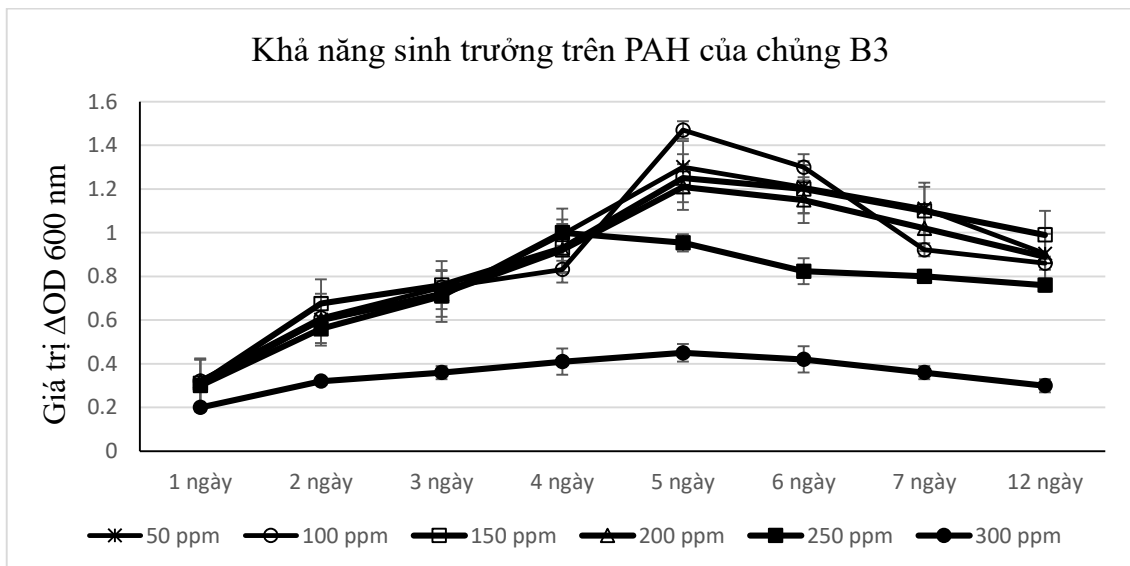
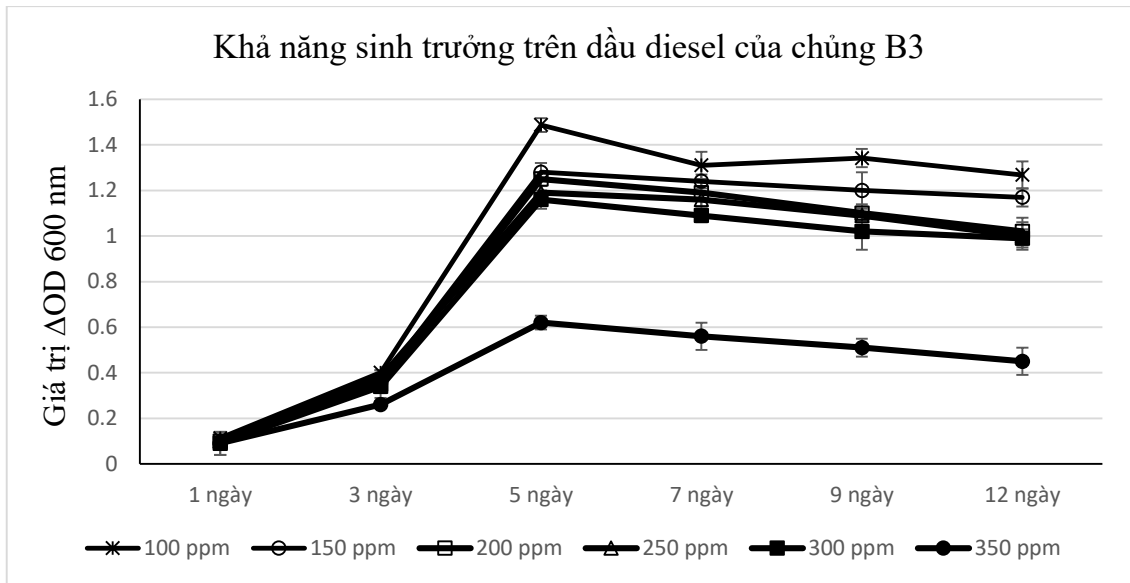
Hình 3.1 Hình thái khuẩn lạc của chủng B1 (a) và B3 (b)

Các thử nghiệm được thực hiện với dải nồng độ cơ chất cao hơn, bao gồm 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm, nhằm xem xét mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn. Kết quả cho thấy cả hai chủng đều tăng trưởng thuận

lợi tại mức 250 ppm đối với PAH và 300 ppm đối với dầu DO (Hình 3.2). Từ kết quả này, các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo đã lựa chọn nồng độ 200 ppm PAH và 250 ppm DO để đánh giá hiệu quả phân giải. Mặc dù 300 ppm cho sinh trưởng cực đại, nhưng 250 ppm vẫn cho mật độ tế bào rất cao và ổn định, đồng thời giảm nguy cơ ức chế do độc tính của dầu khi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Do đó 250 ppm được lựa chọn như mức tối ưu cân bằng giữa khả năng sinh trưởng và tính ổn định của hệ vi sinh.

Hai dòng vi sinh này vẫn được sử dụng trong các thí nghiệm kế tiếp.





Hình 3.2 Mức độ phát triển của hai chủng vi khuẩn B1 và B3 khi sử dụng dầu diesel (DO) và các hợp chất PAH làm nguồn cơ chất

Quá trình phân hủy sinh học dầu bởi vi khuẩn đóng vai trò quan trọng trong xử lý và phục hồi môi trường bị ảnh hưởng bởi sự cố tràn dầu. Vi khuẩn phân hủy hydrocarbon được biết đến với việc tạo ra màng sinh học gồm exopolymer cùng các tế bào vi khuẩn gắn kết với nhau. Công trình của Omarova và cộng sự (2019) chỉ ra rằng màng sinh học vi sinh vật hỗ trợ ổn định các giọt dầu phân tán thông qua sự hình thành màng sinh học tại giao diện dầu-nước, do đó là giải pháp thân thiện với môi trường và bền vững để hỗ trợ xử lý dầu tràn [43]. Sử dụng loài *Alcanivorax borkumensis* trong nghiên cứu phân hủy hydrocarbon, nhóm tác giả này đã phối hợp sử dụng kính hiển vi quang học cùng kính hiển vi điện tử quét ở độ phân giải cao ở nhiệt độ lạnh, và

quan sát thấy các vi sinh vật này bám dính vào màng sinh học tại giao diện dầu-nước. Nghiên cứu còn cho thấy rằng nuôi cấy vi khuẩn ở trạng thái màng sinh học trong 3 ngày thì có thể phân tán màng dầu ở mức độ trung bình (40–50%), và do đó có thể được sử dụng như phản ứng thân thiện với môi trường đối với sự cố tràn dầu. Sự phân tán xảy ra thông qua sự hấp phụ vi khuẩn tại giao diện dầu - nước cùng với vai trò hỗ trợ của các hợp chất hoạt động bề mặt sinh học do vi khuẩn tự tiết ra, làm giảm sức căng giao diện dầu - nước khoảng 2 lần, xuống còn khoảng 23 mN/m. Khi nuôi cấy vi khuẩn trong 7 ngày, sự hiện diện của màng sinh học tại giao diện có thể gây cản trở quá trình phân tán dầu do hình thành lớp màng sinh học cứng tại bề mặt phân cách dầu - nước. Các tác giả đã chứng minh rằng hiệu quả phân tán của chất phân tán thương mại Corexit 9500A giảm khoảng 25% khi có màng sinh học vi sinh vật trưởng thành tại giao diện. Đồng thời, khoảng 90% hexadecane bị phân hủy trong khoảng thời gian 5 ngày bởi màng sinh học của *Alcanivorax borkumensis*. Vì vậy, có thể thấy rằng vi khuẩn tạo màng sinh học và sinh chất hoạt động bề mặt sinh học sẽ là giải pháp thân thiện, bền vững cho môi trường và hệ tự nhiên, đồng thời có thể dùng để phân tán dầu khi xảy ra sự cố tràn dầu.

Nhằm mục tiêu tạo chế phẩm bằng cách lên men các vi khuẩn lên mùn cưa dạng thô và dạng mịn, đặc tính hình thành màng sinh học (biofilm) của hai chủng B1 và B3 đã được khảo sát. Ngoài ra, để có thể xử lý ở các điều kiện nhiệt độ (mùa đông, mùa hè), pH (acid, kiềm), cũng như ở các vùng có độ mặn khác nhau, các chủng B1 và B3 được tiến hành xem xét về khả năng tạo màng sinh học dưới những mức nhiệt độ, pH và hàm lượng NaCl khác nhau. Kết quả sẽ được trình bày ở phần tiếp theo.

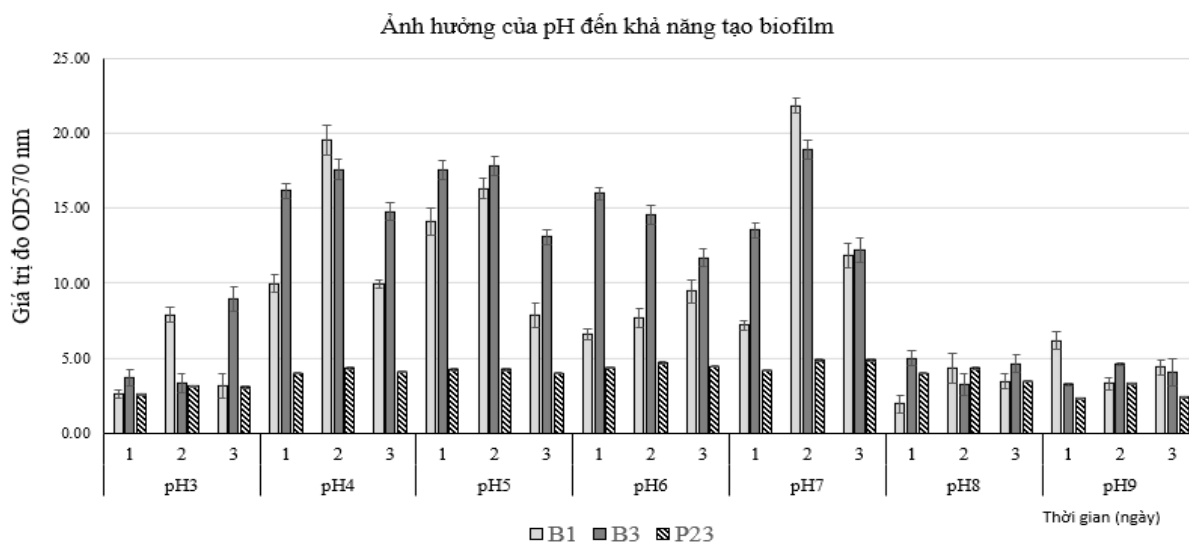
3.2. Đánh giá sự hình thành màng sinh học và ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ và NaCl

Theo nội dung đã trình bày trong phần phương pháp, các điều kiện môi trường gồm pH, nhiệt độ và hàm lượng NaCl với nhiều mức khác nhau đã được khảo sát nhằm làm rõ ảnh hưởng của chúng đến khả năng hình thành màng sinh học ở hai chủng B1 và B3. Kết quả tương ứng được thể hiện tại Hình 3.3a, b và c. Dữ liệu ở Hình 3.3a cho thấy trong khoảng pH từ 3 đến 9, chủng B1 tạo biofilm tốt và ổn định sau 3 ngày thử nghiệm, đồng thời cao hơn chủng đối chứng dương P23. Còn chủng B3 ở pH 3, sau 3 ngày mới tạo biofilm tốt. Bên

cạnh đó, chủng B3 tạo màng ổn định ở các pH 4 đến 7; tuy nhiên, ở pH 8 và 9, khả năng tạo biofilm của chủng giảm đi nhưng vẫn tương đương với đối chứng dương P23. Chủng đối chứng dương *Acinetobacter calcoaceticus* P23 là một chủng có khả năng hình thành biofilm tốt trong các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl khác nhau và do nhóm GS. TS. Morikawa, Đại học Hokkaido, Nhật Bản cung cấp.

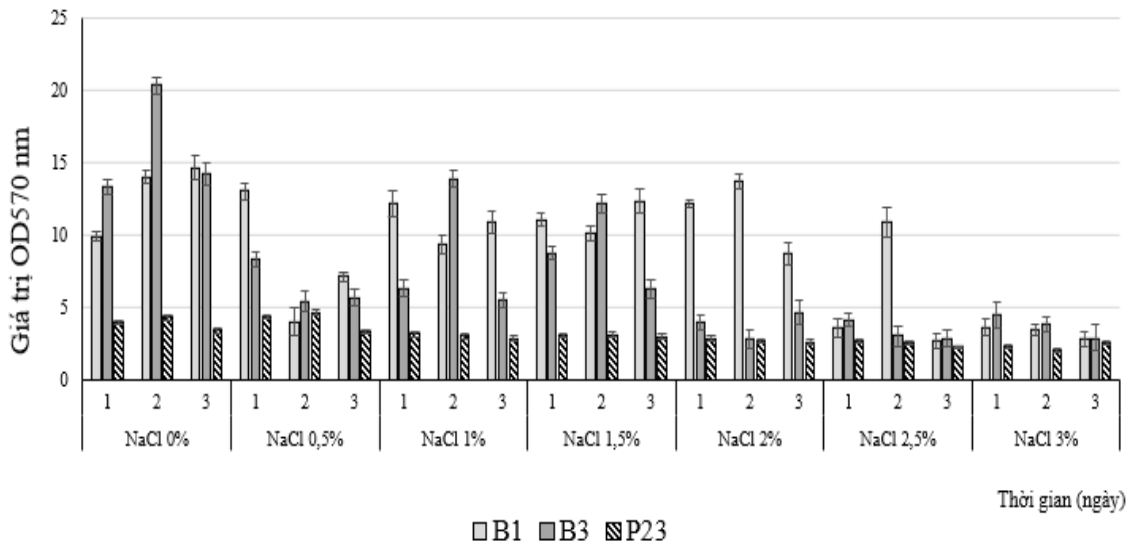
Bên cạnh đó, sự hình thành màng sinh học ở các nồng độ NaCl từ 0 – 2% diễn ra mạnh mẽ ở cả 2 chủng B1 và B3. Nhưng ở nồng độ 2,5%, chủng B1 tạo màng tốt hơn chủng B3. Còn ở nồng độ 3%, cả 2 chủng đều tạo màng không cao như ở các nồng độ NaCl thấp hơn và tương đương với chủng đối chứng dương. Điều đó cho thấy các chủng này đều tạo màng trong khoảng nồng độ NaCl dao động từ 0–3% (Hình 3b).

Ở nhiệt độ thử nghiệm từ 25 – 50°C, chủng B1 và B3 tạo màng vượt trội hơn nhiều so với chủng đối chứng P23. Tuy vậy, ở 4°C, cả 3 chủng đều tạo biofilm thấp. Các kết quả về pH, nhiệt độ và nồng độ NaCl này cho thấy hai chủng lựa chọn có năng lực hình thành biofilm tốt ở phổ pH từ 3 đến 9; nồng độ NaCl từ 0 – 2,5% và nhiệt độ từ 25 – 50°C.



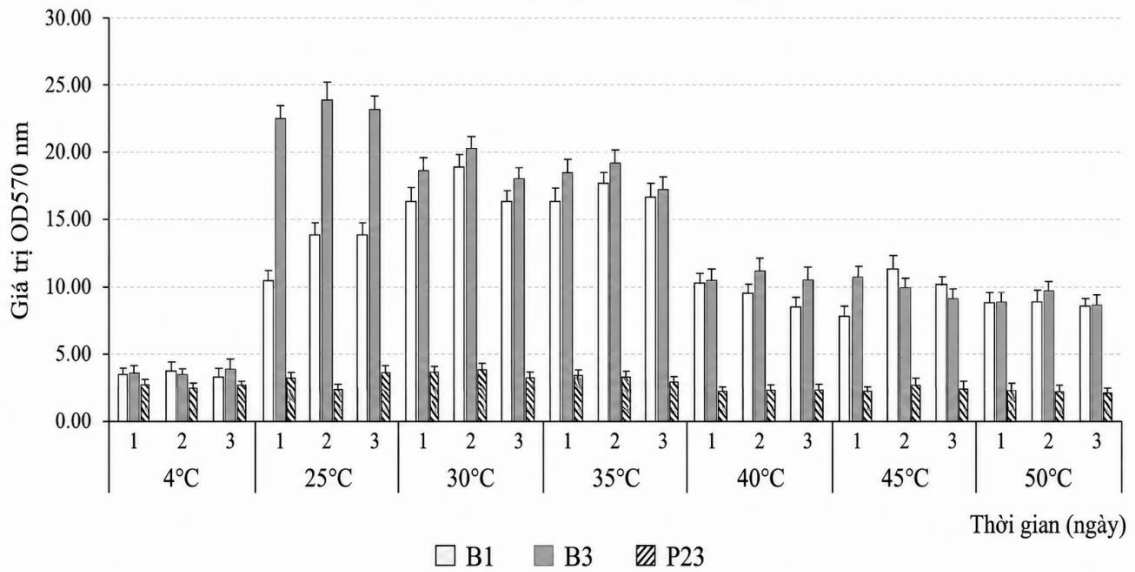
(a)

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên khả năng tạo biofilm



(b)

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo biofilm



(c)

Hình 3.3 Tác động của các điều kiện môi trường gồm nhiệt độ (a), pH (b) và hàm lượng NaCl (c) đối với khả năng hình thành màng sinh học

Công trình của Labidi và cộng sự năm 2023 [71] cũng chứng minh rằng các yếu tố như độ mặn, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng đến quá trình tạo biofilm của *L. monocytogenes*. Ở nhiệt độ 37°C, lượng biofilm của phần lớn các chủng giảm khi nồng độ NaCl tăng từ 0,05 lên 15%, tuy nhiên các chủng này vẫn có khả năng hình thành màng sinh học ngay cả ở 1°C. Sự khác nhau về mức độ tạo biofilm giữa các giá trị pH 4, 5 và 6 không đáng kể, ngoại trừ một vài trường hợp riêng lẻ.

Khi các điều kiện bất lợi được kết hợp, chẳng hạn bổ sung 15% NaCl cùng với nuôi cấy ở 1 và 4°C, sự phát triển của *L. monocytogenes* bị ức chế rõ rệt. Ngoài ra, các nghiên cứu của Bisht và cộng sự năm 2021 [72] và Giacomucci và cộng sự năm 2019 [73] cũng cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt tới đặc điểm hình thái và năng lực tạo màng sinh học của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*.

Da Silva và cộng sự (2022) đã chứng minh các yếu tố nhiệt độ, pH và thời gian ảnh hưởng đến phản ứng bám dính và hình thành màng sinh học của *Bacillus cereus*, trong đó nhiệt độ cao hơn (25 và 32°C) và giá trị pH cao hơn (6,0, 7,5 và 9,0) dẫn đến sự hình thành màng sinh học mạnh mẽ hơn so với nhiệt độ thấp hơn (5 và 15°C) và giá trị pH thấp nhất (4,5) [74]. Hơn thế nữa, sự kết hợp giữa pH 4,5 và nhiệt độ 5°C đã ngăn ngừa quá trình bám dính của vi khuẩn cùng sự hình thành biofilm trong suốt thời gian nuôi cấy.

Trong nghiên cứu của Rath và cộng sự (2022), vi khuẩn hình thành màng sinh học bám dính vào các chất mang và tham gia vào quá trình tuần hoàn chất dinh dưỡng [75]. Tuy nhiên, các điều kiện môi trường có thể làm gián đoạn quá trình tạo màng sinh học, từ đó tác động sau cùng đến nhiều các quá trình trao đổi chất khác nhau. Sự biến đổi pH và sự thay đổi tiếp theo của pCO₂ tác động tới khả năng sống sót, sự hình thành biofilm, và tổng hợp polysaccharide ngoại bào (EPS) của chủng vi khuẩn *Bacillus stercoris* GST-03 đã phân lập từ hệ sinh thái rừng ngập mặn Bhitarkanika, Odisha, Ấn Độ [75]. Việc hiểu rõ sự thay đổi phụ thuộc pH trong thành phần EPS và các nhóm chức liên quan của vi khuẩn biển sẽ cung cấp cái nhìn sâu sắc hơn về khả năng thích ứng của vi khuẩn trong các quá trình phân hủy và chuyển hóa các hợp chất có trong dầu mỏ. Chủng GST-03 có khả năng chịu đựng và hình thành màng sinh học tới pH 4, với hình thành màng sinh học tối đa tại pH 6. Sự thay đổi trong mô hình hình thành màng sinh học và các thông số khác nhau tại các điều kiện pH/pCO₂ biến thiên đã được quan sát. Mô hình chuỗi tế bào xuất hiện tại pH 4, và hình thành màng sinh học tối đa đạt được tại pH 6 với sinh khối $5,28582 \pm 0,5372 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ và độ dày $9,982 \pm 1,5288 \mu\text{m}$. Đặc trưng cấu trúc EPS cho thấy sự thay đổi trong các nhóm chức của các đại phân tử cấu thành theo pH biến thiên. Bản chất vô định hình của EPS cùng sự thay đổi trong liên kết và các nhóm chức liên quan ($-\text{R}_2/\text{CHOR}$, $-\text{CH}_3$, và $-\text{CH}_2$) theo sự biến đổi pH đã được xác nhận. EPS thể hiện sự phân hủy hai giai đoạn với mức mất khối lượng tối đa 59,147% và ổn

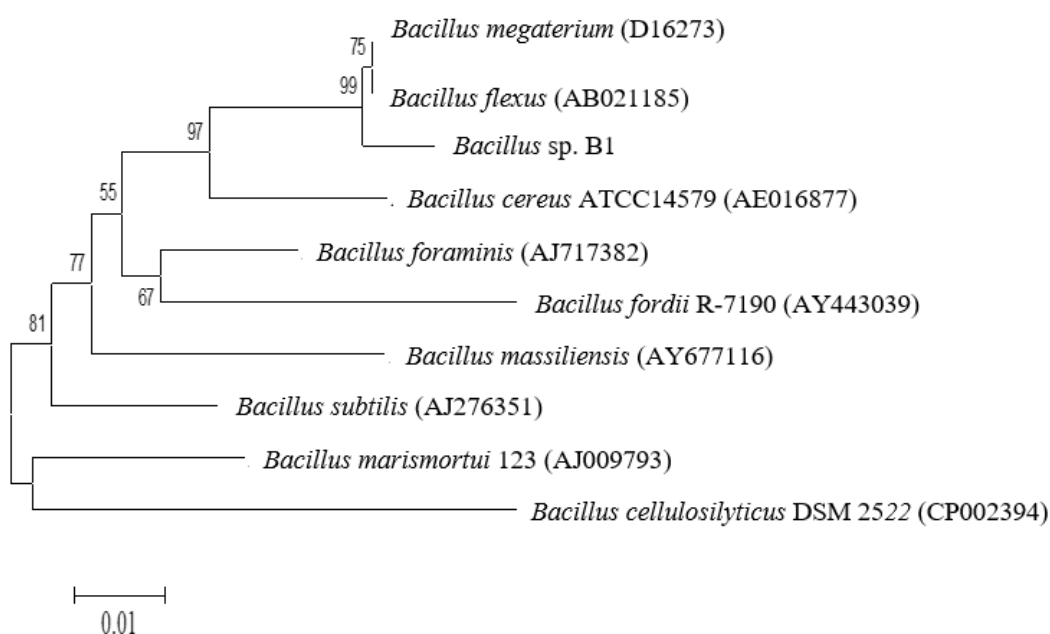
định nhiệt tới 480°C tại pH 6. Nghiên cứu của Rath cùng cộng sự (2022) chứng minh hiệu quả về vai trò của EPS trong việc cung cấp ổn định cấu trúc và chức năng cho màng sinh học khi pH thay đổi [75]. Các phát hiện sẽ mang lại nhận thức tốt hơn về khả năng thích nghi của vi khuẩn trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu.

3.3. Định danh vi khuẩn

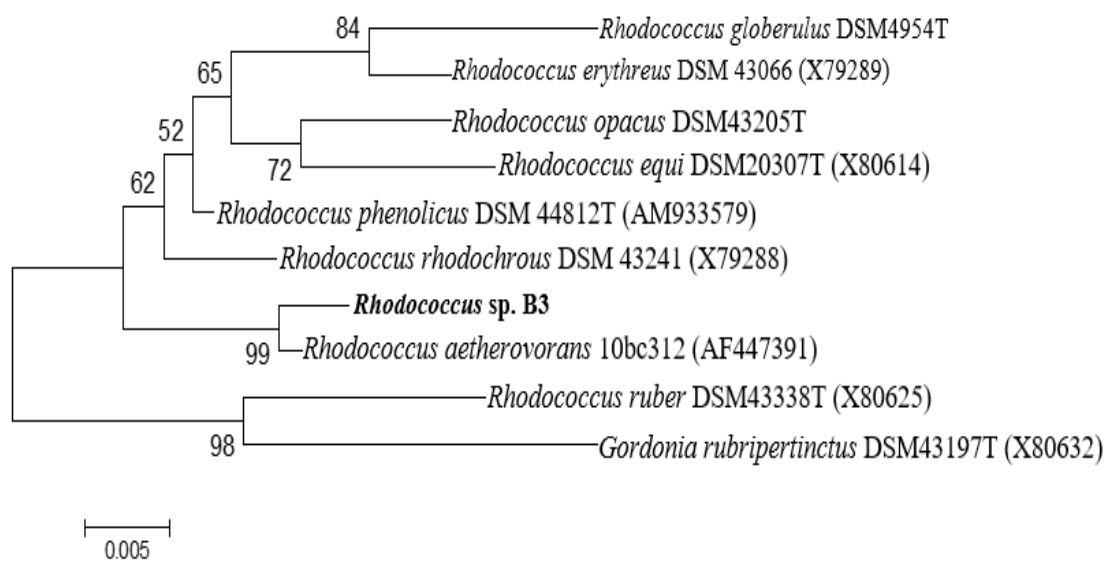
Thông qua kỹ thuật phân tích trình tự gen 16S rRNA – đoạn gen quy định cho tiểu đơn vị ribosome 16S – hai chủng vi khuẩn B1 và B3 được nhận diện lần lượt là *Bacillus sp.* B1 và *Rhodococcus sp.* B3. Sơ đồ thể hiện mối quan hệ tiến hóa giữa các chủng này được trình bày tại Hình 3.4.

Dữ liệu giải trình tự cho thấy chủng B1 có độ tương đồng lên tới 99% với *Bacillus flexus* (AB021185), trong khi chủng B3 cũng đạt mức đồng nhất 99% so với *Rhodococcus aetherovorans 10bc312* (AF447391).

Nhiều công bố trước đây đã ghi nhận *B. flexus* và *R. aetherovorans* có năng lực phân hủy và biến đổi hiệu quả những hợp chất khó bị phân hủy, chẳng hạn như polyvinyl chloride hoặc các chất chứa nhóm phenol [76-77]. Bên cạnh đó, nhiều công trình đã chỉ ra rằng định hai chi *Bacillus* và *Rhodococcus* thể hiện hiệu quả cao trong quá trình xử lý và phân hủy dầu [78].



(a)



(b)

Hình 3.4 Cây phát sinh chủng loại của chủng B1 (a) và B3 (b)

Hai chủng không có hiện tượng đối kháng khi nuôi kết hợp như hình 3.5.



Hình 3.5 Kết quả đánh giá khả năng đối kháng giữa hai chủng vi sinh vật

B1 và B3

Dựa trên công bố Nogina và cộng sự (2020), chủng *R. aetherivorans* UCM Ac-603 có thể chịu đựng và chuyển hóa 100% nồng độ phenol cũng như 56,2–94,4% các hydrocarbon khác nhau khi chúng được sử dụng làm nguồn carbon duy nhất [76]. Bên cạnh đó, không cần bổ sung chất dinh dưỡng thêm cho quá trình phân hủy, mà chủng UCM Ac-603 này có thể phát triển ở nồng độ phenol 500 mg/L mà không bị ức chế. Và lượng phenol này bị đồng hóa hoàn toàn sau 4 ngày nuôi cấy với nồng độ ban đầu là 1750 mg/L đối với tế bào

tự do lơ lửng và 2000 mg/L đối với tế bào cố định trên vật liệu vermiculite. Về tốc độ phân hủy phenol, *R. aetherivorans* UCM Ac-603 thể hiện khả năng phân hủy phenol hiệu quả ở dải nồng độ ban đầu rộng (ví dụ, 35,7 mg/L/h khi nuôi cấy với nồng độ 500 mg/L phenol, và 18,2 mg/L/h khi nuôi cấy với 1750 mg/L phenol), vượt trội đáng kể (1,2–5 lần) so với dữ liệu các công bố vi khuẩn có khả năng chuyển hóa phenol khác.

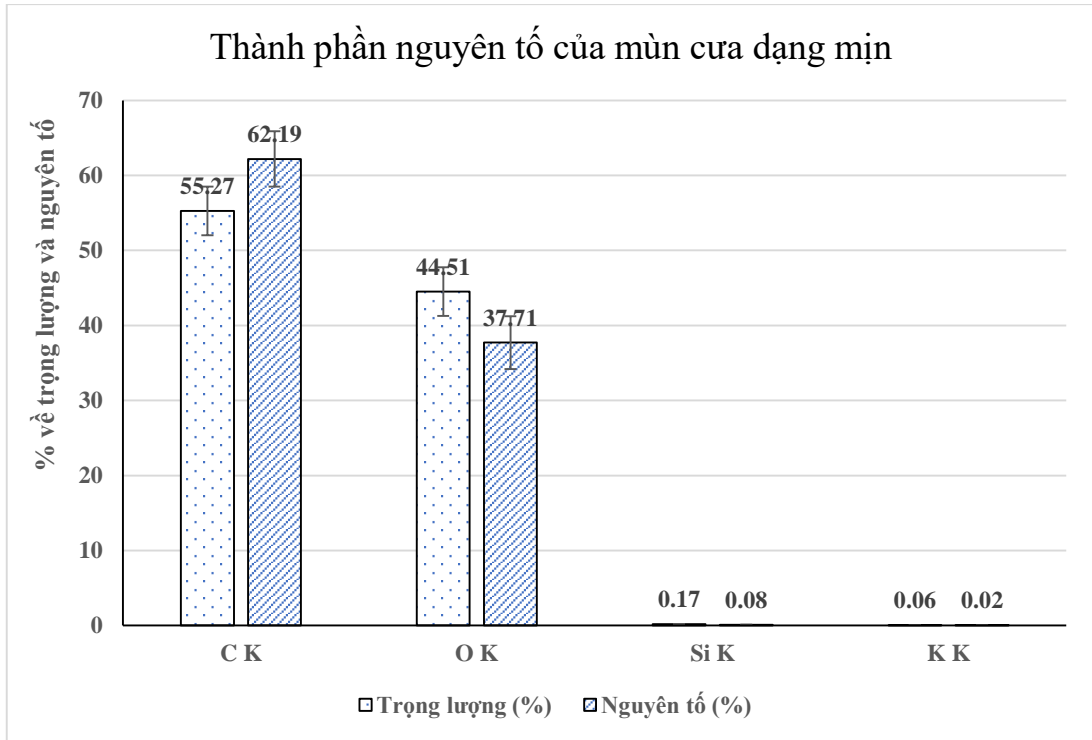
Theo công bố của Juárez và cộng sự (2023) cho thấy rằng, chủng *Rhodococcus qingshengii* GOMB7 có thể sử dụng dầu thô làm nguồn carbon duy nhất ở điều kiện vi hiếu khí [77]. Chủng này thể hiện khả năng phân hủy các alkan chuỗi dài, bao gồm eicosane, tetracosane và octacosane. Phân tích bộ gen cho thấy sự có mặt của nhiều gen liên quan đến phân hủy hợp chất thơm, chẳng hạn như *benA*, *benB*, *benC*, *catA*, *catB* và *catC*; cùng năm gen *alkB* liên quan đến phân hủy alkan. Điều này là cơ sở để giải thích khả năng phân hủy dầu thô cũng như các alkane mạch dài của chủng này.

3.4. Đánh giá một số đặc điểm hóa lý của mùn cưa

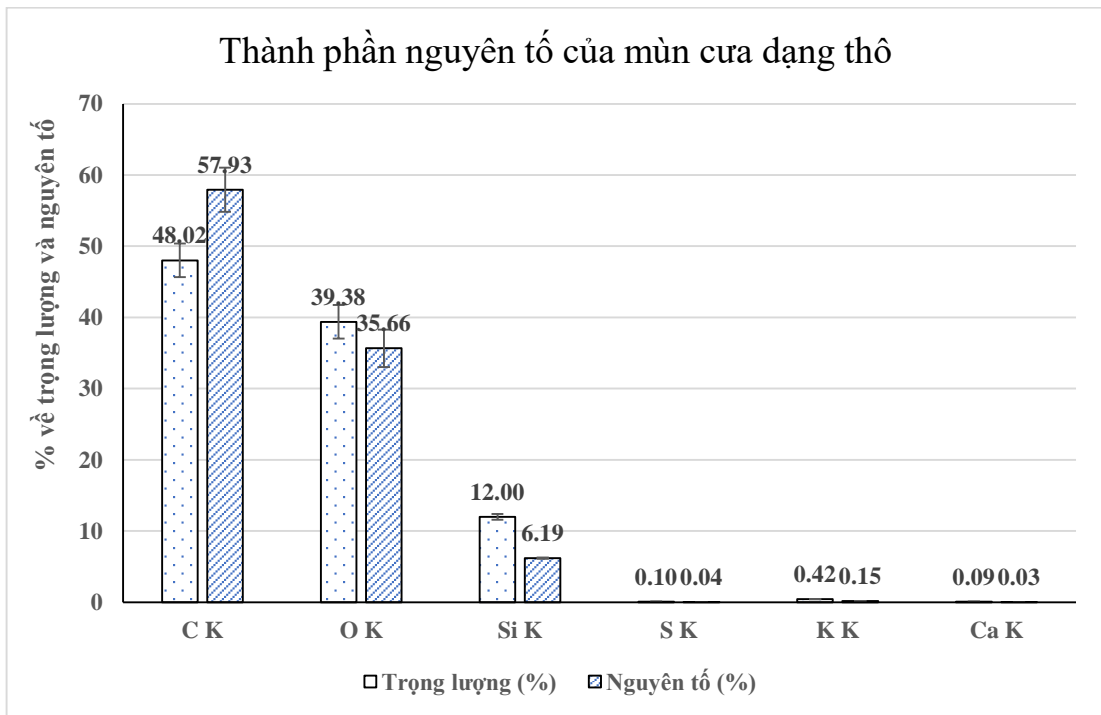
3.4.1. Xác định các thành phần nguyên tố có trên vật liệu mang mùn cưa

Mẫu mùn cưa được phân tích bằng hệ thiết bị HORIBA 7593-H/HITACHI S-4800 ở khoảng cách làm việc 15 mm và điện thế 20 kV nhằm xác định tỷ lệ các nguyên tố cấu thành; kết quả được trình bày trong Hình 3.6, Hình 3.7 và Hình 3.8. Kết quả cho thấy mùn cưa dạng mịn chủ yếu gồm ba nhóm nguyên tố là C, O và Si với hàm lượng lần lượt 52,63; 47,20 và 0,17 % theo khối lượng. Ngoài ra, nguyên tố K cũng được ghi nhận trong mẫu mịn nhưng chiếm tỷ lệ rất nhỏ (0,06 %).

Đối với mùn cưa dạng thô, bên cạnh ba thành phần nguyên tố chủ đạo gồm C, O và Si với hàm lượng lần lượt 48,02; 39,38 và 12,00 %, còn phát hiện thêm các nguyên tố S, K và Ca (Hình 3.6). Tuy vậy, hàm lượng của các nguyên tố này đều rất thấp, lần lượt là 0,10; 0,42 và 0,09 (%).

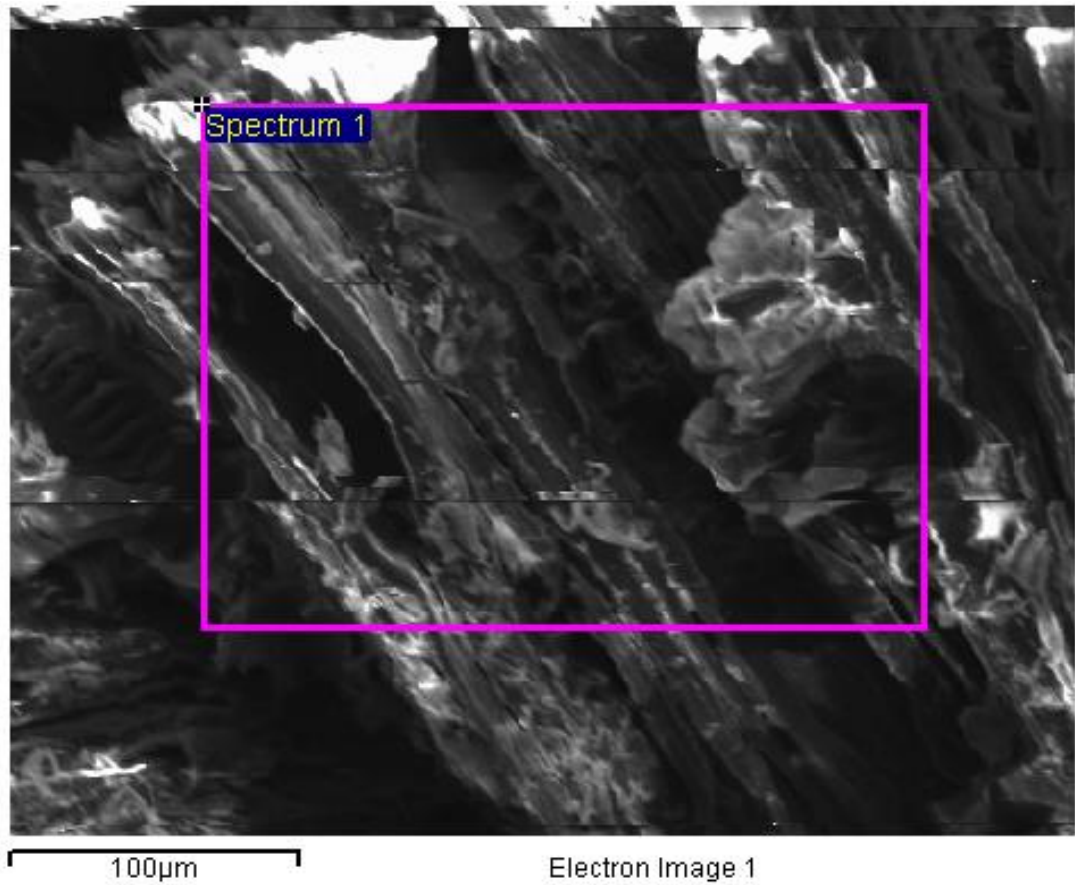


(a)

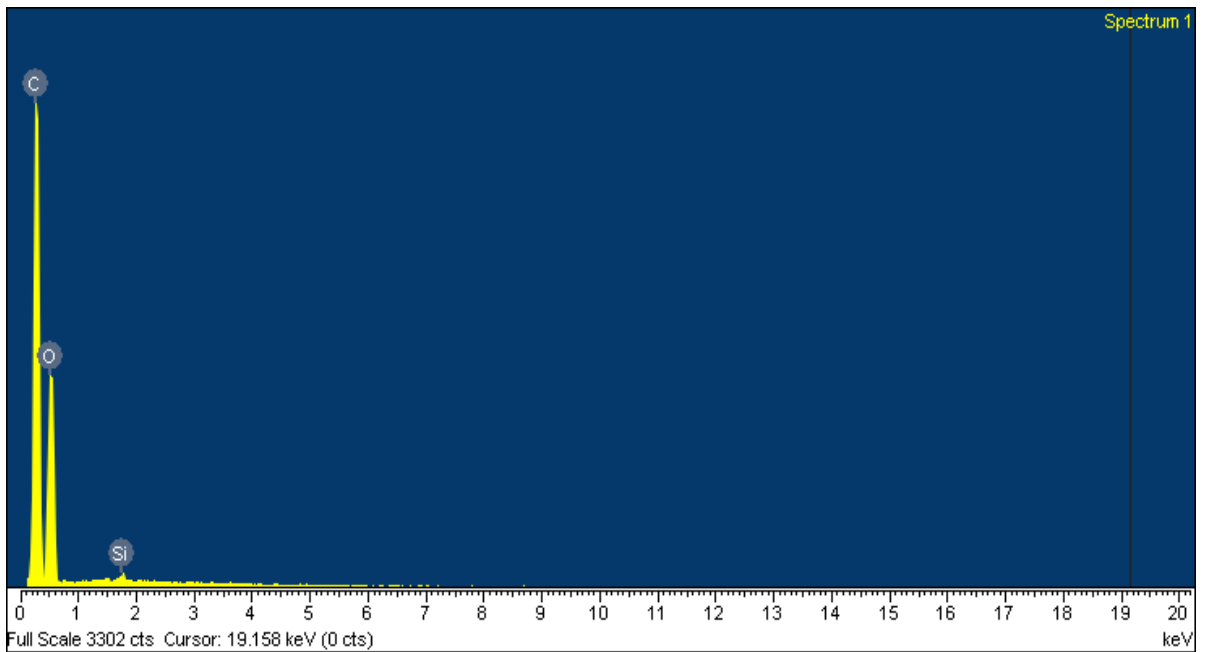


(b)

Hình 3.6 Thành phần các nguyên tố và trọng lượng của chúng trong các loại mùn cưa

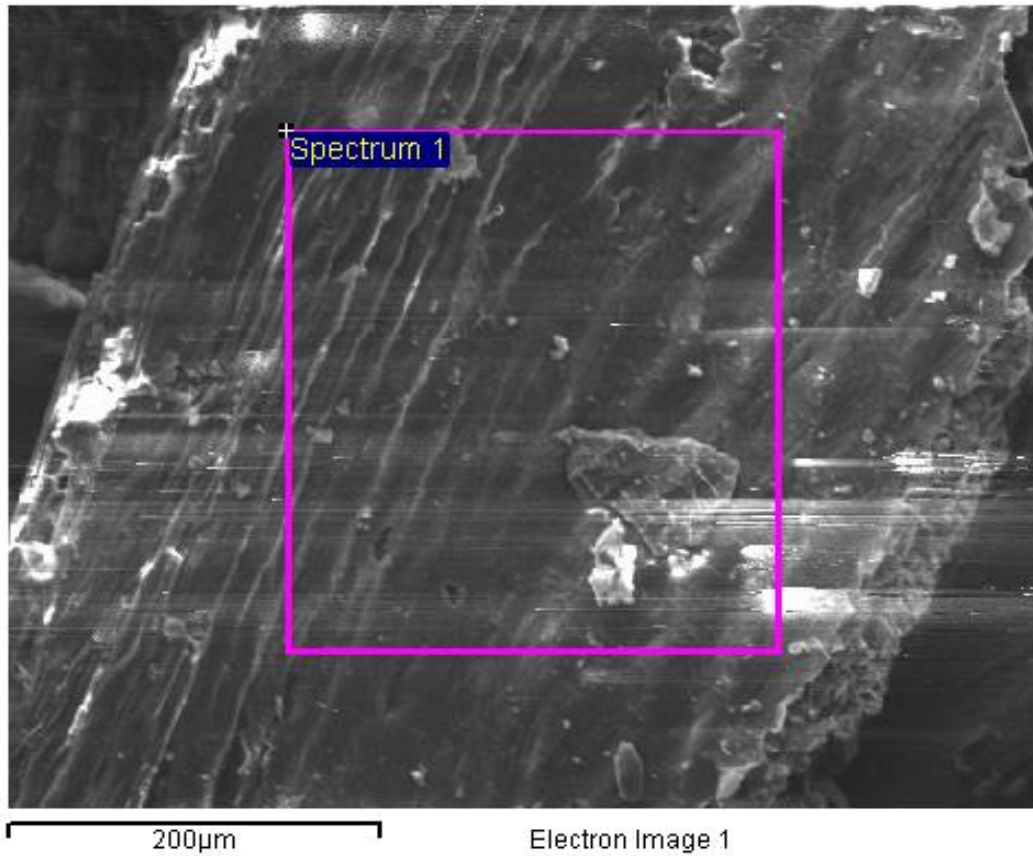


(a)

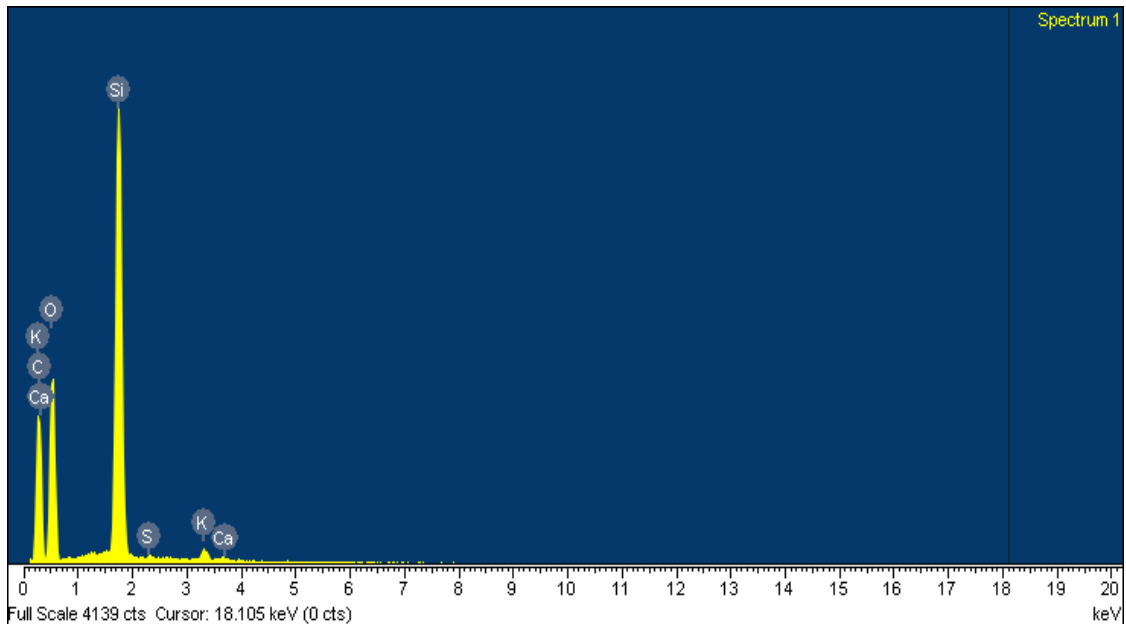


(b)

Hình 3.7 Ảnh EDX của mẫu mùn cưa dạng mịn, gồm (a) hình SEM và (b) phổ phát xạ biểu thị các nguyên tố hiện diện



(a)



(b)

Hình 3.8 Ảnh EDX của mẫu mùn cưa dạng thô, gồm (a) hình SEM và (b) phổ phát xạ biểu thị các nguyên tố hiện diện

3.4.2. Xác định diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa (BET)

Dựa trên phương thức này, đường đẳng nhiệt hấp phụ theo mô hình lý

thuyết cho phép xác định các thông số điển hình của vật liệu. Đối với mùn cưa dạng mịn, diện tích bề mặt ghi nhận $2,3237 \text{ m}^2/\text{g}$; kích thước lỗ trong quá trình hấp phụ (adsorption) là $37,6944 \text{ nm}$ và ở giai đoạn giải hấp (desorption) là $27,9072 \text{ nm}$. Trong khi đó, mùn cưa dạng thô có diện tích bề mặt $2,3250 \text{ m}^2/\text{g}$; kích thước lỗ khi hấp phụ (adsorption) là $37,6967 \text{ nm}$ và khi giải hấp (desorption) là $27,9081 \text{ nm}$. Nhìn tổng thể, các thông số giữa hai loại vật liệu này gần như tương đương.

Các chỉ số liên quan đến hấp phụ và giải hấp đóng vai trò then chốt trong đánh giá khả năng tiếp nhận và giải phóng chất ô nhiễm trên bề mặt vật liệu. Giá trị hấp phụ biểu thị mức độ tối đa mà vật liệu có thể lưu giữ các phân tử, ion hoặc hợp chất hóa học trong cấu trúc bề mặt và hệ thống lỗ rỗng, từ đó cho phép đánh giá hiệu suất loại bỏ chất ô nhiễm trong các ứng dụng như xử lý nước thải hoặc lọc khí, đồng thời xác định điểm bão hòa khi các vị trí hoạt động bị lấp đầy. Việc xác định các thông số này hỗ trợ lựa chọn vật liệu tối ưu và điều chỉnh các điều kiện vận hành, bao gồm thời gian tiếp xúc, khối lượng chất hấp phụ và nồng độ chất ô nhiễm.

Ngược lại, giá trị giải hấp thể hiện khả năng vật liệu nhả lại các chất đã giữ trước đó, góp phần vào quá trình tái sinh để dùng lại nhiều chu kỳ, qua đó gia tăng hiệu quả kinh tế và xem xét độ bền trong điều kiện thực tế. Ví dụ, những loại vật liệu có khả năng giải hấp tốt có thể được tái sinh bằng biện pháp gia nhiệt hoặc xử lý hóa học nhằm loại bỏ chất bị giữ lại mà không làm giảm đáng kể hiệu suất ban đầu [79]. Do đó, mùn cưa được xác định là vật liệu hấp phụ hiệu quả với tiềm năng tái sử dụng lâu dài trong việc ứng dụng làm chế phẩm để xử lý ô nhiễm dầu.

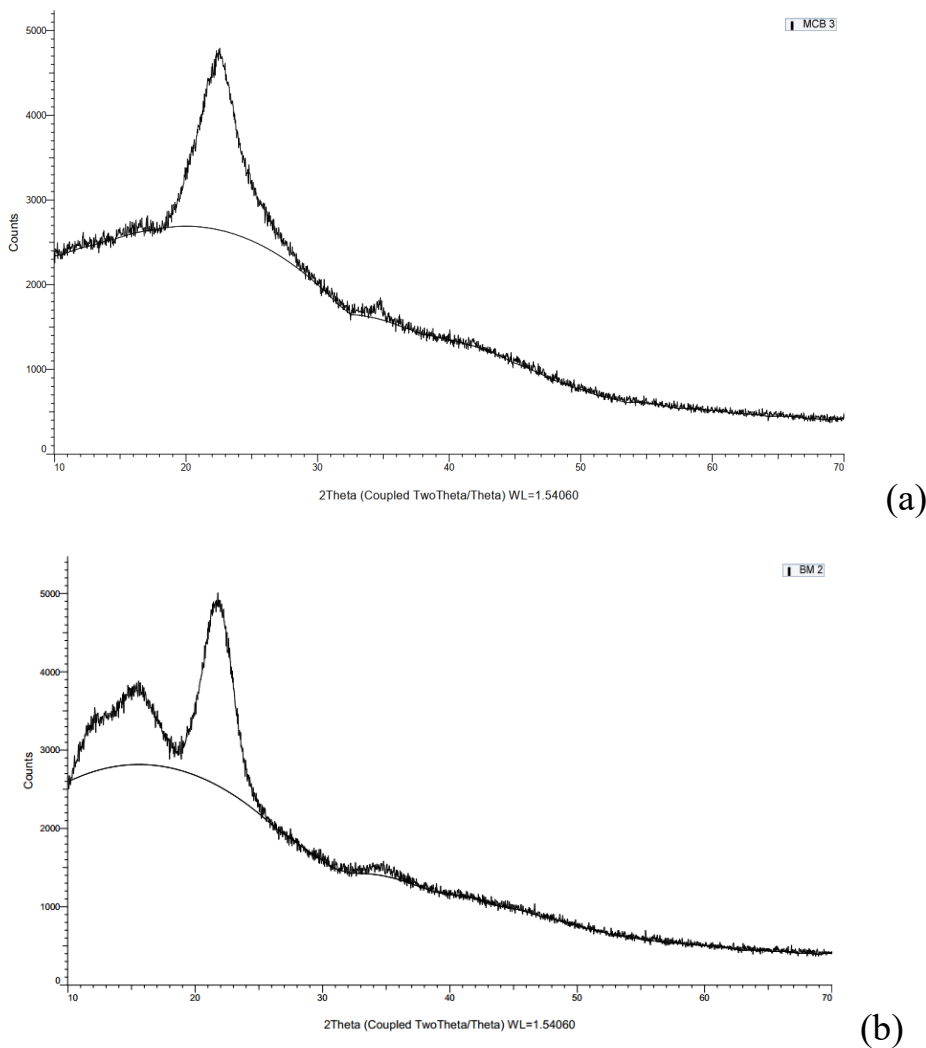
3.4.3. Xác định cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD)

Hình ảnh trình bày phổ nhiễu XRD của mẫu các mẫu mùn cưa dạng thô và dạng mịn (Hình 3.9), thu được bằng thiết bị D8- Advance, hãng Bruker, CHLB Đức; phổ nhiễu xạ được xử lý bằng phần mềm DiffraC.eva (Bruker) .

Phổ nhiễu XRD của các mẫu mùn cưa cho thấy đỉnh chính sắc nét tại khoảng 2θ (2 theta) $\approx 22-25^\circ$, tương ứng với cấu trúc vô định hình cellulose I β đặc trưng của mùn cưa sinh học (biomass-derived char), với cường độ đếm vượt 4500 cps. Đường cong vừa khít (fitting curve, đường nét đứt) khớp chặt

chẽ với dữ liệu thực nghiệm, khẳng định độ tin cậy mô hình phân tích pha. Các đỉnh phụ tại $2\theta \approx 15-17^\circ$ và 35° phản ánh pha tinh thể xen lẫn cấu trúc vô định hình, phổ biến ở vật liệu carbon hóa từ sinh khối.

Kết quả chỉ ra các mẫu mùn cưa có cấu trúc bán tinh thể cao, hỗ trợ diện tích bề mặt lớn ($\approx 2,32 \text{ m}^2/\text{g}$) và kích thước lỗ nano (27-38 nm) như đã báo cáo trước đó, tăng cường khả năng hấp phụ động học trong xử lý chất ô nhiễm. Độ lệch thấp giữa đường vừa khít và dữ liệu thực nghiệm (R^2 ngầm định cao) xác nhận tính đồng nhất pha, quan trọng cho ứng dụng tái sử dụng lâu dài trong sinh học thực nghiệm. Phân tích này củng cố tiềm năng của mùn cưa dạng mịn làm chất hấp phụ bền vững [80]. Phổ nhiễu này cung cấp cơ sở định lượng cho đánh giá về cấu trúc vô định hình của các loại mùn cưa. Đồng thời cấu trúc vật liệu của mùn cưa dạng mịn và dạng thô cũng không có sự khác biệt đáng kể (Hình 3.8).



Hình 3.9. Hình ảnh XRD của mùn cưa dạng mịn (a) và dạng thô (b)

Cổ định vi sinh vật trên các nền vật liệu có nguồn gốc tự nhiên được đánh giá là một hướng xử lý sinh học triển vọng để nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm do hydrocarbon có trong dầu gây ra. Với phương pháp này, các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocarbon được duy trì trên bề mặt hoặc bên trong các giá thể tự nhiên như than bùn, xơ dừa, trấu, bã mía hay đá núi lửa. Nhờ đặc điểm cấu trúc xốp, diện tích tiếp xúc lớn cùng sự hiện diện của nhiều nhóm chức, các vật liệu này không chỉ tạo môi trường thuận lợi cho vi sinh vật sinh trưởng và bám dính mà còn hỗ trợ hấp phụ hiệu quả các hợp chất hydrocarbon [44].

3.5. Đánh giá hiệu quả phân hủy dầu

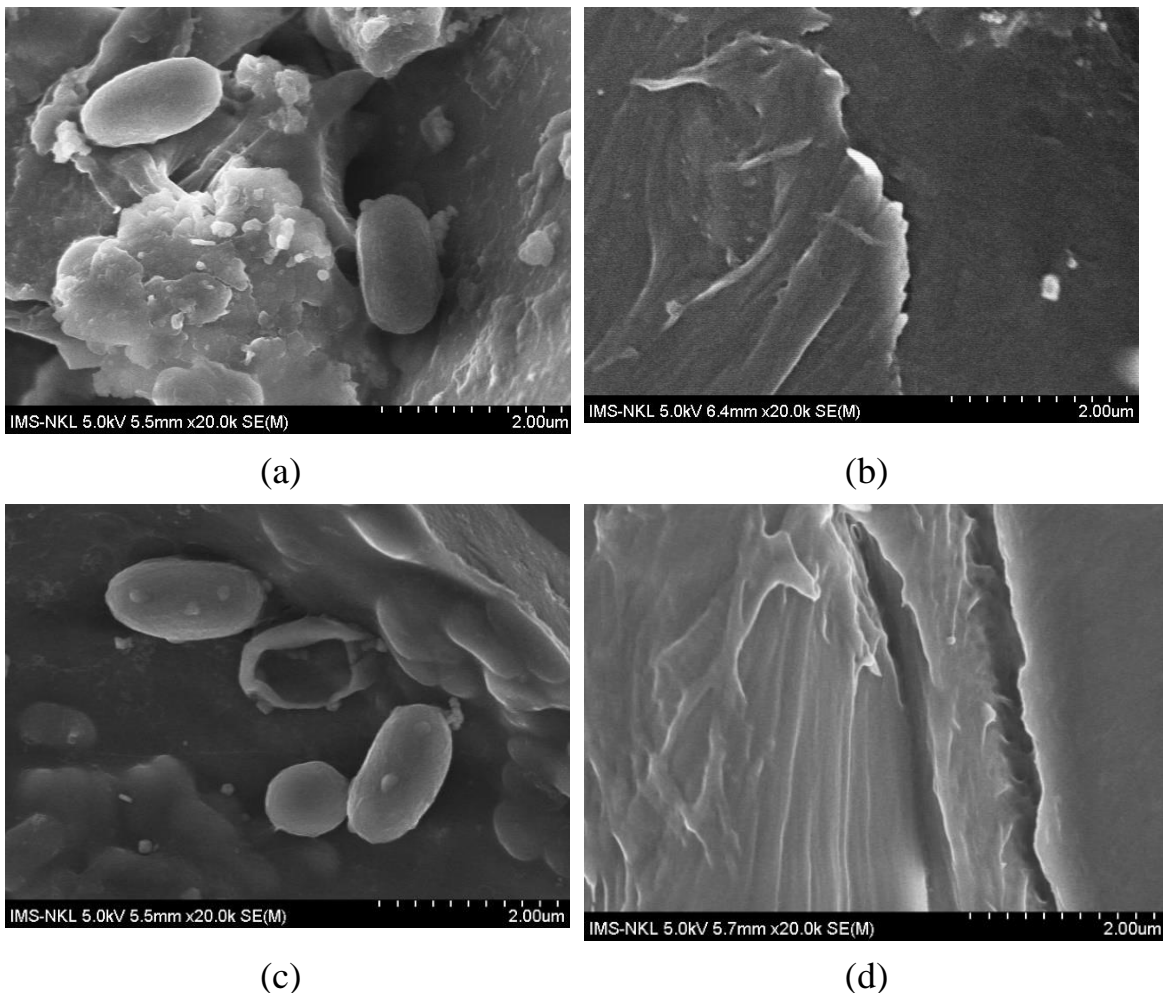
Cách tiếp cận dùng các vật liệu làm giá thể để nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm từ lâu đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Trong đó, các chủng vi sinh được nuôi trên mùn cưa ở dạng mịn để tạo thành chế phẩm sinh học. Hình 3.10 minh họa ảnh SEM của vật liệu mang và chế phẩm thu được. Kết quả quan sát cho thấy bề mặt vật liệu ban đầu không phát hiện sự hiện diện của tế bào vi khuẩn (Hình 3.10a), trái lại, ở mẫu chế phẩm có thể nhận thấy rõ ràng các tế bào với mật độ phân bố dày đặc.

Chế phẩm chứa 10% mùn cưa dạng mịn được bổ sung vào hệ có nồng độ 200 ppm hỗn hợp PAH và 250 ppm dầu DO. Sau 7 ngày thử, khả năng phân hủy đạt trên 85% đối với DO và khoảng 82% đối với PAH. Tương tự, với chế phẩm sử dụng mùn cưa dạng thô ở cùng điều kiện (200 ppm PAH và 250 ppm DO), sau 7 ngày ghi nhận phân hủy được 81,35% tổng dầu và 79,98% PAH.

Ngoài ra, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm từ mùn cưa mịn tại giai đoạn ban đầu và sau 6 tháng bảo quản lần lượt đạt 21×10^7 và 5×10^7 CFU/g. Đối với chế phẩm từ mùn cưa thô, các giá trị tương ứng là 16×10^7 và 2×10^7 CFU/g. Những dữ liệu này cho thấy sự chênh lệch không đáng kể so với chế phẩm sử dụng mùn cưa dạng mịn (Hình 3.10).

Dmitrieva cùng cộng sự công bố năm 2022 [81] ghi nhận rằng màng sinh học của loài *Alcanivorax borkumensis* có thể phân hủy khoảng 90% hexadecane chỉ sau 5 ngày thí nghiệm. Ở một công trình trước đó, nhóm nghiên cứu này cũng cho thấy biofilm của *Alcanivorax borkumensis* khi hình thành trên các hạt đất sét đạt mức chuyên hóa 90% hexadecane sau 6 ngày quan sát. Bhatt cùng

cộng sự năm 2023 [82] đã xây dựng chế phẩm dựa trên nấm men *Candida tropicalis* cố định trên sỏi, đạt hiệu quả xử lý dầu DO tới 97% trong vòng 10 ngày. Ngoài ra, chủng *Pseudomonas aeruginosa* LNR1 được chứng minh có khả năng chuyển hóa dầu DO tốt hơn khi tồn tại dưới dạng màng sinh học. Chandran và Das năm 2011 [83] chỉ ra rằng biofilm thuộc chi *Rhodococcus* có thể oxy hóa các hợp chất hydrocarbon từ dầu mỏ, đồng thời tạo ra chất hoạt động bề mặt và axit humic, qua đó nâng cao hiệu quả phân hủy dầu. Juárez và cộng sự năm 2023 [84] đã thực hiện một tổng quan về việc ứng dụng màng sinh học vi sinh trong xử lý các hóa chất độc hại, nhấn mạnh tiềm năng triển khai ở quy mô trong thực tế. Những kết quả này thống nhất khẳng định tầm quan trọng của biofilm trong xử lý các chất ô nhiễm thuộc nhóm hydrocarbon.

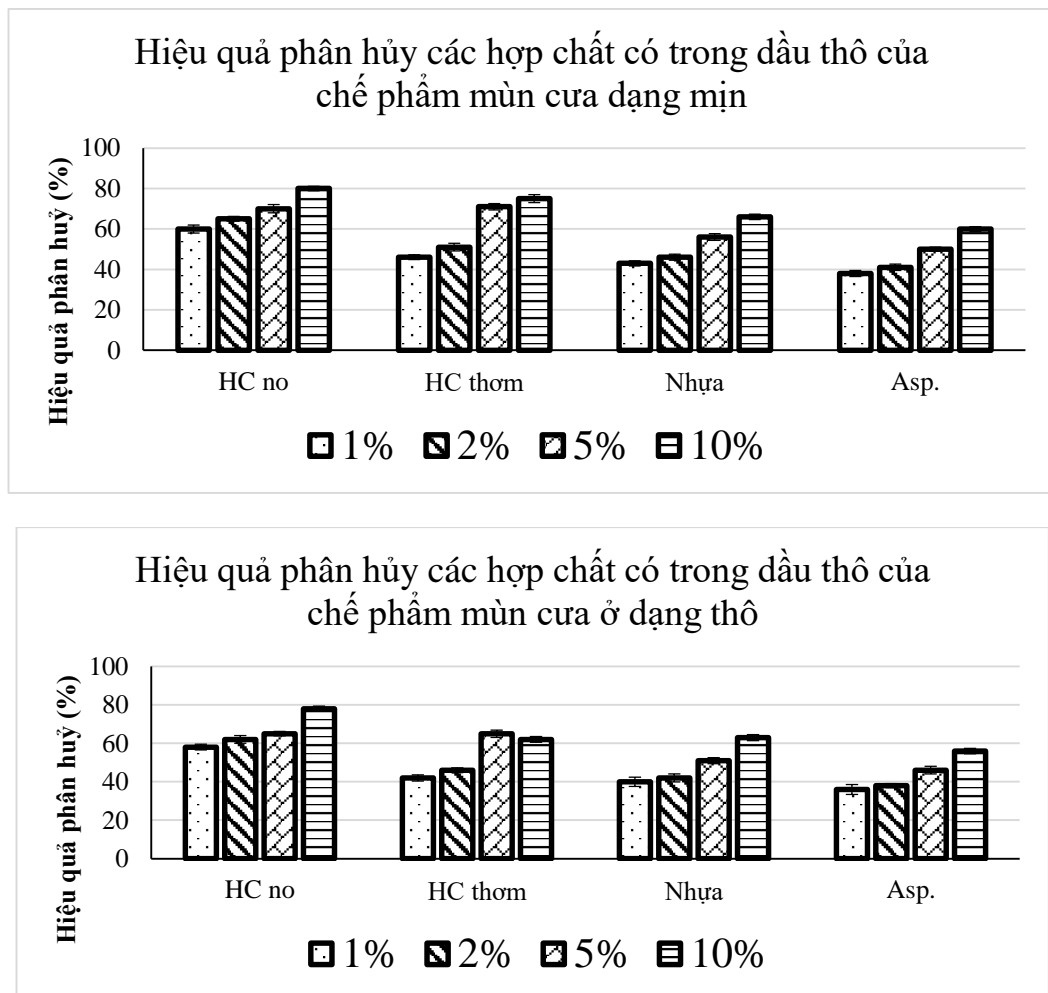


Hình 3.10 Chế phẩm ở dạng mịn tạo thành dưới kính hiển vi điện tử quét (a) và mùn cưa dạng mịn (b); chế phẩm với mùn cưa dạng thô (c) và mùn cưa dạng thô (d)

Mặt khác, ở nghiên cứu này, mùn cưa được chọn để sử dụng làm chất mang - một nguồn nguyên liệu dồi dào, có chi phí thấp và không tạo ra ô nhiễm

thứ cấp. Do đó, chế phẩm đạt được giá thành kinh tế đồng thời duy trì hiệu suất cao. Việc áp dụng mùn cưa còn đảm bảo tính linh hoạt trong triển khai tại các địa hình đa dạng, mà không ảnh hưởng đến cảnh quan môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng chế phẩm để xử lý ô nhiễm dầu mỡ tại các vùng ven biển, kho xăng dầu và những địa điểm tương tự ở Việt Nam.

Để kiểm tra hiệu quả xử lý của chế phẩm ở những mức nồng độ khác nhau, dầu nguyên liệu với hàm lượng 200 ppm đã được sử dụng như một cơ chất đại diện. Thành phần của dầu thô thường bao gồm hydrocarbon mạch thẳng, các hợp chất thơm dạng PAH, cùng với nhựa, asphalten và một số thành phần khác theo Mu và Nazina năm 2022 [85]. Sau 7 ngày, hiệu suất phân giải của từng nhóm chất được thể hiện trong Hình 3.11.

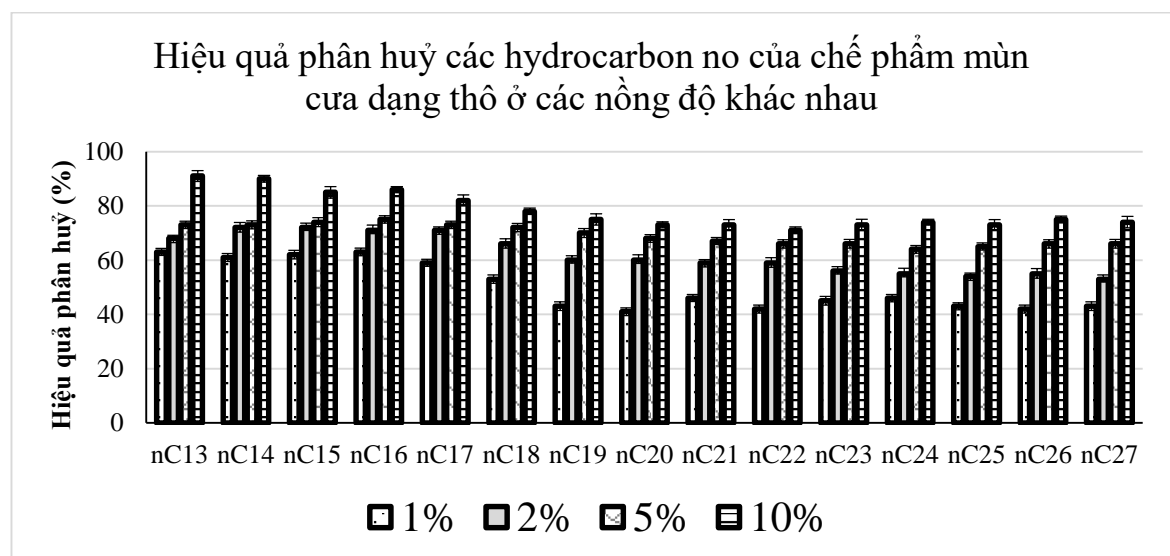
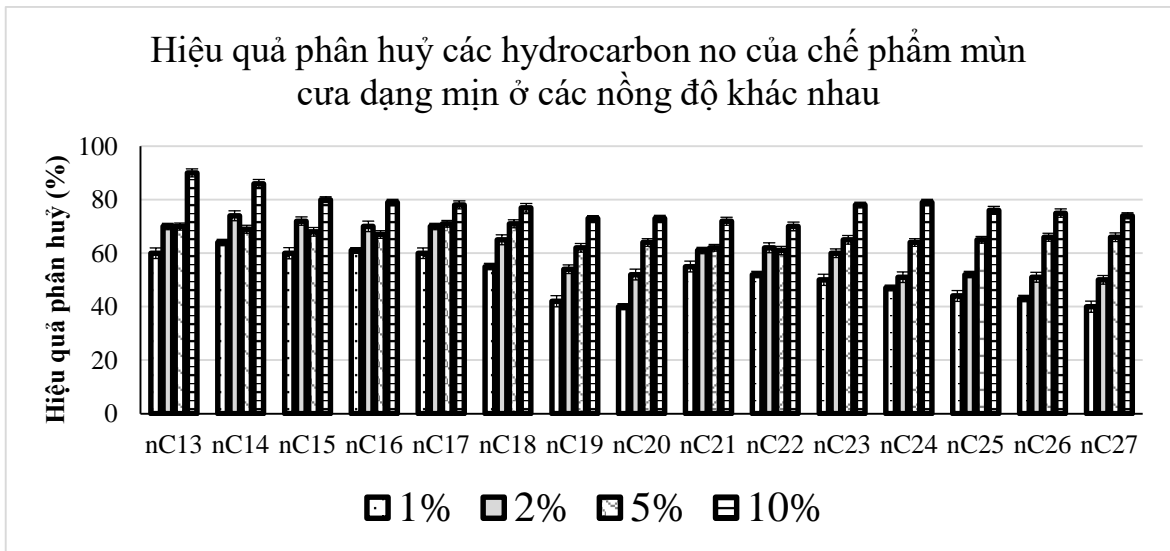


Hình 3.11 Hiệu quả phân hủy các hợp chất có trong dầu thô của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau

(HC no, hydrocarbon no; HC thơm, hydrocarbon thơm, Asp., asphalten)

Quan sát từ Hình 3.11 cho thấy khi áp dụng cả hai dạng chế phẩm ở nồng độ 10%, phần lớn các hợp chất hydrocarbon đạt mức phân hủy trên 75%, trong khi đó nhựa và asphalten vẫn có tỷ lệ xử lý thấp hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Radice năm 2023 [86], khi hai thành phần này được xem là khó bị phân hủy trong dầu mỏ. Ngoài ra, tại các mức nồng độ thấp hơn như 1%, 2% và 5%, hiệu quả thu được chưa thực sự nổi bật. Vì vậy, nồng độ 10% được xác định là điều kiện phù hợp để tiếp tục triển khai các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC) cho thấy các hợp chất *n*-alkane (nhóm hydrocarbon no) trong khoảng từ C₁₃ đến C₂₇ đã bị phân giải ở mức đáng kể (Hình 3.12).



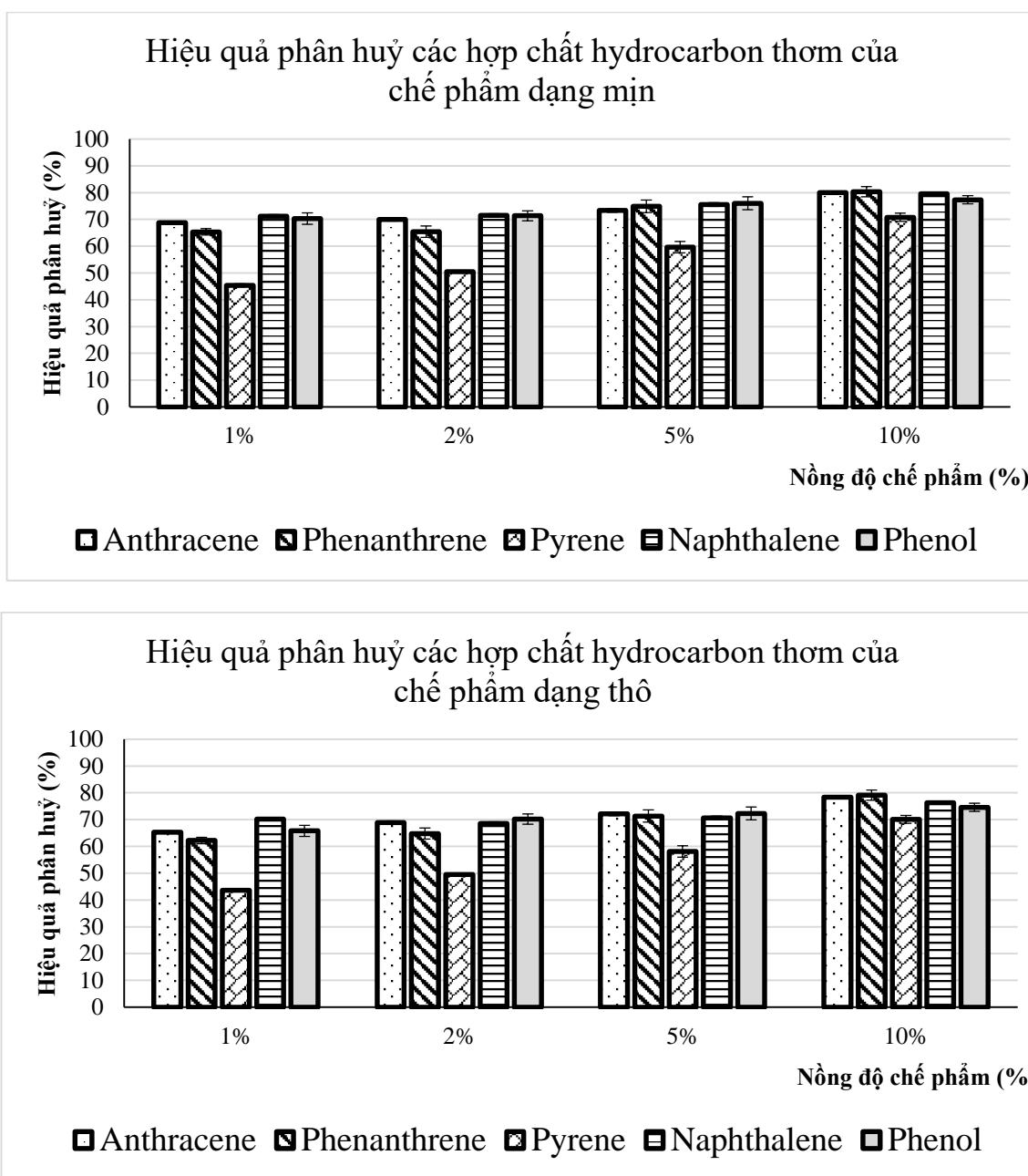
Hình 3.12 Hiệu quả phân hủy các hợp chất hydrocarbon no của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau

Kết quả ở Hình 3.12 cho thấy, các cấu tử có số nguyên tử carbon từ 13 đến 18 được xử lý tương đối hiệu quả khi áp dụng chế phẩm ở các mức nồng độ 1%, 2% và 5%. Đáng chú ý, khi tăng hàm lượng chế phẩm lên 10%, phần lớn các hợp chất này đều đạt tỷ lệ phân hủy vượt ngưỡng 70%.

Bên cạnh đó, nhóm hydrocarbon thơm đa vòng (PAH – polycyclic aromatic hydrocarbons) bao gồm anthracene, phenanthrene, pyrene, naphthalene và phenol cũng thể hiện sự suy giảm rõ rệt về hàm lượng (Hình 3.13). Khi bổ sung chế phẩm với tỉ lệ 10%, hiệu suất xử lý tương ứng đạt 79,97% đối với anthracene, 80,35% với phenanthrene, 70,79% đối với pyrene, 79,53% với naphthalene và 77,32% đối với phenol. Riêng pyrene – hợp chất mang cấu trúc gồm bốn vòng thơm – luôn cho thấy khả năng phân hủy thấp hơn trong tất cả các điều kiện thí nghiệm, điều này phù hợp với đặc tính bền vững sinh học của nó. Tổng thể, các kết quả thu được có sự tương đồng với những nghiên cứu trước đây liên quan đến quá trình phân hủy sinh học các thành phần hydrocarbon trong dầu thô [87].

Khi sử dụng 2 dạng mùn cưa loại mịn và loại thô để làm chế phẩm, các kết quả thu được không có sự khác biệt đáng kể. Tuy nhiên, mùn cưa dạng mịn thuận lợi hơn trong sử dụng và có thể dùng linh hoạt ở các địa hình khác nhau. Tùy thuộc vào nhu cầu sử dụng, có thể cân nhắc chọn mùn cưa dạng thô hoặc dạng mịn để tạo chế phẩm.

Trong nghiên cứu của Bhatt và cộng sự công bố năm 2023 [82], việc cố định các vi sinh vật có thể sử dụng chất ô nhiễm lên bề mặt vật liệu mang đã được chứng minh là làm gia tăng đáng kể hiệu quả xử lý sinh học. Quá trình hình thành và phát triển của vi khuẩn trên bề mặt này được ghi nhận rõ ràng nhờ quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Khả năng xử lý dầu thô đã được đánh giá bằng kỹ thuật sắc ký khí (GC), cho thấy phương pháp cố định giúp nâng cao hiệu suất phân hủy hydrocarbon khoảng 23% so với trường hợp vi khuẩn tồn tại ở trạng thái tự do. Cụ thể, sau 10 ngày thí nghiệm, các màng sinh học hình thành trên vật liệu mang đã loại bỏ được hơn 66% lượng dầu ban đầu. Những kết quả này cho thấy đây là một giải pháp có tính linh hoạt, chi phí hợp lý và giàu tiềm năng trong ứng dụng phục hồi sinh học cho các hệ sinh thái bị ô nhiễm.



Hình 3.53 Hiệu quả phân huỷ các hợp chất PAH của chế phẩm tại các mức nồng độ khác nhau

Các chất hấp phụ tổng hợp thông thường được dùng phổ biến nhất để loại bỏ dầu tràn, mặc dù chúng không phải là lựa chọn tối ưu từ góc độ chi phí và môi trường [50]. Việc sử dụng các vật liệu lignocellulose rẻ tiền, dồi dào, an toàn, có thể phân huỷ sinh học và tái sử dụng được xem là một giải pháp thay thế cho các chất hấp phụ thông thường, với hiệu quả tích cực đáng kể đối với tính bền vững và nền kinh tế tuần hoàn. Việc sử dụng các chất hấp phụ tự nhiên thô và đã được biến đổi như một công cụ phục hồi, khả năng hấp phụ của chúng,

cùng với các kết quả riêng lẻ trong các điều kiện đã được thực hiện, được khảo sát rất chi tiết [49-51]. Các phương pháp biến đổi để cải thiện tính kỵ nước của các chất hấp phụ tự nhiên cũng được nêu bật rộng rãi. Hơn nữa, các công bố này đã xem xét những ưu điểm và hạn chế của từng chất hấp phụ tự nhiên vì một vật liệu duy nhất khó có thể bao quát tất cả các kịch bản tràn dầu tiềm tàng. Hơn thế nữa, các nghiên cứu này đã được tiến hành để phác thảo một cách tiếp cận tích hợp dựa trên các khía cạnh vật liệu – môi trường – kinh tế [49-51].

Các nghiên cứu gần đây đã sử dụng những vật liệu như xơ dừa, sỏi keramzit và bã mía làm giá thể nhằm tạo môi trường thuận lợi cho vi sinh vật bám dính và hình thành lớp màng sinh học, từ đó tiến hành thí nghiệm phân giải dầu diesel [88]. Kết quả cho thấy, với nồng độ dầu ban đầu 250 ppm, cả hai dạng chế phẩm đều có thể loại bỏ hơn 90% các thành phần hydrocarbon sau 7 ngày xử lý. Dù vậy, phần lớn các công trình hiện nay mới dừng lại ở đối tượng là dầu diesel – loại nhiên liệu có cấu trúc tương đối đơn giản so với dầu thô. Đồng thời, số lượng nghiên cứu khai thác mùn cưa như một chất mang trong chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu vẫn còn ít và chưa được phát triển theo hướng hệ thống hóa.

Theo Catania và cộng sự [89], trong môi trường tự nhiên, màng sinh học thường hình thành từ một hoặc nhiều quần thể vi sinh vật bám lên các bề mặt hoặc vùng tiếp xúc giữa pha sinh học và phi sinh học. Sự hình thành này được hỗ trợ bởi lớp polymer ngoại bào (EPS), đóng vai trò như khung cấu trúc giúp duy trì độ ổn định của biofilm. Khi tồn tại trong trạng thái này, vi sinh vật thể hiện khả năng thích nghi và chịu đựng các điều kiện bất lợi tốt hơn so với dạng sống tự do. Chính vì vậy, nhiều nghiên cứu đã tận dụng biofilm trên các loại vật liệu mang để xử lý những hợp chất hydrocarbon khó phân hủy, hướng tới khả năng ứng dụng ở quy mô lớn. Để triển khai hiệu quả, cần lựa chọn các vật liệu có đặc tính như độ xốp cao, diện tích bề mặt lớn và chi phí hợp lý, qua đó nâng cao tính kinh tế trong xử lý ô nhiễm dầu [88-89]. Bên cạnh đó, mùn cưa còn có ưu thế khi có thể được tận dụng làm nhiên liệu sau quá trình xử lý, góp phần tối ưu hóa việc sử dụng tài nguyên trong các giải pháp môi trường.

Với sự phát triển kinh tế - xã hội nhanh chóng, dầu mỏ được sử dụng rộng rãi trong mọi khía cạnh của xã hội hiện đại. Tuy nhiên, việc khai thác, vận chuyển và chế biến dầu mỏ chắc chắn dẫn đến việc tạo ra một lượng lớn nước

thải nhiễm dầu. Các chiến lược tách dầu/nước truyền thống thường kém hiệu quả, tốn kém và phức tạp trong vận hành. Do đó, cần phải phát triển các vật liệu xanh, chi phí thấp và hiệu quả cao mới cho việc tách dầu/nước. Là các vật liệu sinh học tổng hợp tự nhiên có nguồn gốc dồi dào và có thể tái tạo, vật liệu gốc gỗ đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu nóng hổi gần đây. Các nghiên cứu tập trung vào ứng dụng của một số vật liệu gốc gỗ trong việc tách dầu/nước ngày càng được chú trọng [52-54].

Như vậy, các nghiên cứu về xốp gỗ, sợi bông, aerogel cellulose, màng cellulose và một số vật liệu gốc gỗ khác cho việc tách dầu/nước trong vài năm qua và đưa ra triển vọng về sự phát triển trong tương lai của chúng trong xử lý ô nhiễm dầu. Tuy nhiên, cho tới nay, các nghiên cứu về việc sử dụng các vật liệu này để làm chất mang cho các vi sinh vật cố định trên đó và ứng dụng tổ hợp vật liệu mang – vi sinh vật tạo màng sinh học này còn chưa có nhiều công bố. Chính vì vậy, nghiên cứu này là một ví dụ về việc sử dụng vật liệu có nguồn gốc từ gỗ, nhưng ở dạng phế phụ phẩm của quá trình sản xuất và chế biến gỗ, để tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Từ các mẫu nhiễm dầu lấy tại khu vực ven biển Thanh Hóa, đã phân lập thêm được 02 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải dầu diesel (DO) và hỗn hợp các hydrocarbon thơm như anthracen, pyren và phenanthren.
- Đã đánh giá được khả năng tạo màng sinh học của các chủng phân lập được và xác định được tác động của nhiệt độ, NaCl, pH đến khả năng tạo màng sinh học của các chủng. Các chủng hình thành biofilm hiệu quả ở khoảng pH trong khoảng 3 đến 8, nhiệt độ từ 25–50 °C và nồng độ NaCl từ 0–3%.
- Định danh được các chủng vi khuẩn lựa chọn là *Bacillus* sp. B1 và *Rhodococcus* sp. B3 bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA. Các chủng không bị đối kháng lẫn nhau và có thể sử dụng cùng nhau để tạo chế phẩm với vật liệu mang.
- Đã xác định được cấu trúc và các tính chất vật lý của mùn cưa dạng mịn và dạng thô. Sau 7 ngày thử nghiệm với nồng độ cơ chất 250 ppm (DO) và 200 ppm (PAH) hiệu quả phân hủy khi sử dụng 10% chế phẩm đạt 85% đối với dầu DO và xấp xỉ 82% đối với các hợp chất PAH.

KIẾN NGHỊ

- Thử nghiệm sản xuất ở các quy mô 50; 100 và 500 kg/m²
- Thử nghiệm xử lý ô nhiễm ở quy mô lớn hơn trong phòng thí nghiệm và ở các địa điểm bị ô nhiễm dầu

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Lê Thị Nhi Công, **Nguyễn Kiều Hương**, Phạm Thế Trinh, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Trần Thị Mai, Vương Thị Nga, Quách Thị Liên, 2025, Ứng dụng chế phẩm sinh học từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa để xử lý nước ô nhiễm dầu, Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên, 230(14), tr. 434-441.
2. Lê Thị Nhi Công, Trần Thị Huyền Nga, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, **Nguyễn Kiều Hương**, Trần Thị Mai, Hoàng Thị Phương Hồng, Vương Thị Nga, Quách Thị Liên, 2026, Ứng dụng vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa dạng mịn để tạo chế phẩm xử lý nước ô nhiễm dầu, Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên, 231(02), tr. 350-357.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2022, *Oil in the Sea IV: Inputs, Fates, and Effects*, National Academies Press, Washington, DC.
2. Koshlaf E., Ball A.S., 2017, Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments, *AIMS Microbiology*, 3(1), pp. 25-49.
3. Kumar R., Bhushan S., Maurya P., Geenita K., Sawant S.S., Barman M., ..., Nayak, B.B., 2026, Oil pollutants: A review on pathways in marine environments, bioavailability in various organisms and physiological disruptions in fish, *Marine Pollution Bulletin*, 222(Pt 3), 118867.
4. ITOPF Limited, 2026, *Oil Tanker Spill Statistics 2025*, ITOPF Limited.
5. Beyer J., Goksøyr A., Hjermand D.Ø., Klungsøyr J., 2020, Environmental effects of offshore produced water discharges: A review focused on the Norwegian continental shelf, *Marine Environmental Research*, 162, 105155.
6. Baghdady S.M., Abdelsalam A.A., 2024, Ten years of oil pollution detection in the Eastern Mediterranean shipping lanes opposite the Egyptian coast using remote sensing techniques, *Scientific Reports*, 14(1), 18057.
7. Liu Y., Yin Z., Cai H., 2025, Enhanced global oil spill dataset from 1967 to 2023 based on text-form incident information, *Scientific Data*, 12(1), 1394.
8. Yu L., Xia W., Du H., 2024, The toxic effects of petroleum pollutants to microalgae in marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 201, 116235.
9. Barron M.G., Vivian D.N., Heintz R.A., Yim U.H., 2020, Long-Term Ecological Impacts from Oil Spills: Comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon, *Environmental Science & Technology*, 54(11), pp. 6456-6467.
10. Tedesco P., Balzano S., Coppola D., Palma Esposito F., Pascale D., Denato R., 2024, Bioremediation for the recovery of oil polluted marine environment, opportunities and challenges approaching the Blue Growth, *Marine Pollution Bulletin*, 200, 116157.
11. Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2021, Báo cáo hiện trạng môi trường quốc gia giai đoạn 2016–2020, Hà Nội.
12. Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2021, Báo cáo hiện trạng môi trường biển và hải đảo quốc gia giai đoạn 2016–2020, Hà Nội.
13. Tổng cục Thống kê, 2024, Niên giám thống kê Việt Nam 2023, Nhà xuất bản Thống kê, Hà Nội.
14. Vietnam Maritime Administration, 2025, Statistics on cargo throughput through Viet Nam's seaport system in 2024, cited in Vietnam News Agency/VietnamPlus.

15. GTJASVN Research, 2024, Vietnam Oil & Gas Sector Report, Guotai Junan Securities Vietnam, August 2024.
16. Khoi D.N., Nguyen V.T., Loi P.T., Hong N.V., Thuy N.T.D., Linh D.Q., 2023, Development of an integrated tool responding to accidental oil spills in riverine and shoreline areas of Ho Chi Minh City, Vietnam, *Environmental Impact Assessment Review*, 99, 106987.
17. Nguyen D.H., Tu B.M., Hoang Q.A., 2024, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment environments in Vietnam: analytical methods and contamination status, *Science and Technology Development Journal*.
18. ITOPF, 2020, Vietnam: A Summary of Oil Spill Response Arrangements, Country & Territory Profiles.
19. Muvel H., Jindal M.K., Tewari P.K., Anand V., 2025, Minimizing oil pollution: a review of current status and its treatment options. *RSC Sustainability*, 3(9), pp. 3681-3723.
20. Bi H., Wang Z., Yue R., Sui R., Mulligan C.N., Lee K., et al., 2025, Oil spills in coastal regions of the Arctic and Subarctic: Environmental impacts, response tactics, and preparedness, *Science of the Total Environment*, 958, p. 178025.
21. Hansen H.K., Peña S.F., Guti'érrez C., Lazo A., Lazo P., Ottosen L.M., 2019, Selenium removal from petroleum refinery wastewater using an electrocoagulation technique, *Journal of Hazardous Materials*, 364, pp. 78–81
22. Zouboulis A.I., Avranas A., 2000, Treatment of oil-in-water emulsions by coagulation and dissolved-air rotation, *Colloids and Surface A*, 172, pp. 153–161.
23. Bacosa S.M., Ancla B., Arcadio C.G.L.A., Dalogdog J.R.A., Ellos D.M.C., Hayag H.D.A., et al., 2022, From surface water to the deep sea: A review on factors affecting the biodegradation of spilled oil in marine environment, *Journal of Marine Science and Engineering*, 10, p. 426
24. Livingstone D.R., 1991, Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In R. Gilles (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 7, pp. 45–185. Springer Berlin Heidelberg.
25. Röszer T., 2014, The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism, *Cell and Tissue Research*, 358(3), pp. 685–695.
26. Rewitz K.F., Styrihave B., Løbner-Olesen A., Andersen O., 2006, Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(4), pp. 363–381. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.001>

27. Wu M., Feng S., Liu Z., Tang S., 2024, Bioremediation of petroleum-contaminated soil based on both toxicity risk control and hydrocarbon removal-progress and prospect, *Environmental Science and Pollution Research*, 31(50), pp. 59795-59818.
28. Aswad O.A.K., Hasan M.J., Saeed J.J., Latif A.S., Abdulmajeed A.M., 2025, The relationship between soil oil pollution levels, microbial enzyme activity, and bioremediation strategies. *International Journal of Design and Nature and Ecodynamics*, 20(3), pp. 655-661.
29. Spinetti P.R., 2010, The ecosystem dynamics of the garden. *International Journal of Design & Nature and Ecodynamics*, 5(1), pp. 49-59.
30. Latif A.S., Magtooph M.G., Alubadi A., 2020, In silico and in vitro evaluation of some synthesized quinoline derivatives into MexB protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 10(2), pp. 195-199. <https://doi.org/10.25258/ijddt.10.2.2>.
31. Zhang M., Chen Q., Gong Z., 2024, Microbial remediation of petroleum-contaminated soil focused on the mechanism and microbial response: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 31(23), pp. 33325-33346.
32. Mekonnen B.A., Aragaw T.A., Genet M. B., 2024, Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements, *Frontiers in Environmental Science*, 12.
33. Xu J., Zhai X., Jia J., Guan H., Liu C., Zhou R., ... Chen T., 2025, Surfactant-enhanced remediation of petroleum-contaminated soils: Advances and prospects. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 25(4), pp. 9092-9110.
34. Techtmann S.M., Santo Domingo J., Conmy R., Barron M., 2023, Impacts of dispersants on microbial communities and ecological systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(4), pp. 1095-1106.
35. Sharma N., Lavania M., Lal B., 2023, Biosurfactant: an emerging tool for the petroleum industries, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1254557.
36. Ahmad J., Marsidi N., Abdullah S.R.S., Hasan H.A., Othman A.R., Ismail N. Kurniawan S.B., 2024, Integrating phytoremediation and mycoremediation with biosurfactant-producing fungi for hydrocarbon removal and the potential production of secondary resources, *Chemosphere*, 349, 140881.
37. Wei Z., Wei Y., Liu Y., Nui S., Xu Y., Park J.H., Wang J.J., 2024, Biochar-based materials as remediation strategy in petroleum hydrocarbon-contaminated soil and water: Performances, mechanisms, and environmental impact, *Journal of Environmental Sciences*, 138, pp. 350-372.

38. Vadakkan K., Sathishkumar K., Raphael R., Mapranathukaran V.O., Mathew J., Jose B., 2024, Review on biochar as a sustainable green resource for the rehabilitation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil, *Science of the Total Environment*, 941, 173679.
39. Armanu E.G., Bertoldi S., Chrzanowski L., Volf I., Heipieper H.I., Eberlein C., 2025, Benefits of immobilized bacteria in bioremediation of sites contaminated with toxic organic compounds, *Microorganisms*, 13(1).
40. Dasgupta D., Ghosh R., Sengupta T.K., 2013, Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species, *ISRN Biotechnology*, 2013, 250749.
41. Sakdapetsiri C., Kaokhum N., Pinyakong O., 2021, Biodegradation of crude oil by immobilized *Exiguobacterium* sp. AO-11 and shelf life evaluation, *Scientific Reports*, 11(1), 12990.
42. Mao N., Xue S., Zhang G., Xia S., Chen X., You W., Sun Y., Shen L., Wang S., 2022, Crude oil degradation in oilfield produced water by immobilized microbes and oil recovery improvement after its reinjection, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 173, 105452.
43. Omarova M., Swientoniewski L., Tsengam I.K.M., Blake D.A., 2019, Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7.
44. Nhi-Cong L.T., Do T.L., Gupta B.S., Cung T.N.M., Hoang P.H., Nguyen T.M.N., Tran H.D., Dong V.Q., Zaid H.F.M., Sankaran R., Shor P.L., 2020, Enhanced degradation of diesel oil by using biofilms formed by indigenous purple photosynthetic bacteria from oil-contaminated coasts of Vietnam on different carriers, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(1), pp. 313-330.
45. Nhi-Cong L.T., Do T.L., Cung T.N.M., Nguyen V.L., Nguyen Q.L., Hoang P.H., Dong V.Q., Tang D.Y.Y., Show P.L., 2021, Advanced materials for immobilization of purple phototrophic bacteria in bioremediation of oil-polluted wastewater, *Chemosphere*, 278, 130464.
46. Do T.V., Le C.T.N., Do T.L., Dong V.Q., 2017, Degradation of hydrocarbon components contaminated in oily waste-water collected in Doxa petroleum storage, Hanoi by microbial biofilm attached on coconut fiber, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 33(2S).
47. Nhi-Cong L.T., Mai C.T.N., Tuan D.V., Quyen D.V., 2018, Aromatic hydrocarbon degradation of biofilm formed by microorganisms on cellulose material at 50 litre modules, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 14(4), pp. 769-775.

48. Tran T.L., Tran T.M., Nguyen H.A., Cung T.N.M., Do T.L., Hoang T.H., Nhi-Cong L.T., 2023, Petroleum hydrocarbon degradation of husk biochar product carrying biofilm-forming bacteria, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 21(3), pp. 565-573.
49. Shukla A., Zhang Y.H., Dubey P., Margrave J.L., Shukla S.S., 2002, The role of sawdust in the removal of unwanted materials from water, *Journal of Hazardous Materials*, 95(1-2), pp. 137-152.
50. Zamparas M., Tzivras D., Dracopoulos V., Ioannides T., 2020, Application of sorbents for oil spill cleanup focusing on natural-based modified materials: A review, *Molecules*, 25(19).
51. Li X., Jin X., Wu Y., Zhang D., Sun F., Ma H., ... Xia, C., 2023, A comprehensive review of lignocellulosic biomass derived materials for water/oil separation, *Science of the Total Environment*, 876, 162549.
52. Li M., Wang F., Ouyang S., Liu Y., Hu Z., Wu Y., ... Ma, S., 2024, A comprehensive review on preparation and functional application of the wood aerogel with natural cellulose framework, *International Journal of Biological Macromolecules*, 275(Pt 1), 133340.
53. Chhajed M., Verma C., Maji P.K., 2024, Recent advances in hydrophobic nanocellulose aerogels for oil spill applications: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 199, 116024.
54. Soni N., Nayak R., 2025, Emerging advancements in ecofriendly nanosorbent technology accompanied with natural fillers: a systematic review, *Nanotechnology*, 36(23).
55. Cambiella A., Ortea E., Ríos B., Benito J.M., Pazos C., Coca J., 2006, Treatment of oil-in-water emulsions: performance of a sawdust bed filter, *Journal of Hazardous Materials*, 131(1-3), pp. 195-199.
56. Banerjee S.S., Joshi M.V., Jayaram R.V., 2006, Treatment of oil spill by sorption technique using fatty acid grafted sawdust, *Chemosphere*, 64(6), pp. 1026-1031.
57. Soliman E.M., Ahmed S.A., Fadl A.A., 2020, Adsorptive removal of oil spill from sea water surface using magnetic wood sawdust as a novel nano-composite synthesized via microwave approach, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(1), pp. 79-90.
58. Kandaneli R., Meesala L., Kumar J., Raju C.S.K., Peddy V.R., Gandham S., Kumar P., 2018, Cost effective and practically viable oil spillage mitigation: Comprehensive study with biochar, *Marine Pollution Bulletin*, 128, pp. 32-40.

59. Du M., Li J., Wang F., Li X., Yu T., Qu C., 2021, The sludge-based adsorbent from oily sludge and sawdust: preparation and optimization, *Environmental Technology*, 42(20), pp. 3164-3177.
60. Ali N., Eliyas M., Al-Sarawi H., Radwan S.S., 2011, Hydrocarbon-utilizing microorganisms naturally associated with sawdust, *Chemosphere*, 83(9), pp. 1268-1272.
61. Sáez-Navarrete C., Gelmi C.A., Reyes-Bozo L., Godoy-Faúndez, A., 2008, An exploratory study of peat and sawdust as enhancers in the (bio)degradation of n-dodecane, *Biodegradation*, 19(4), pp. 527-534.
62. Bộ Khoa học và Công nghệ, 2010, *National Standard TCVN 7538-6:2010: Sampling, collection, processing and preservation of soil sample*, Hà Nội.
63. Bộ Khoa học và Công nghệ, 2011, *TCVN 6663-1:2011 (ISO 5667-1:2006): Chất lượng nước - Lấy mẫu - Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu và kỹ thuật lấy mẫu*, Hà Nội.
64. Cung Thị Ngọc Mai, Thái Thị Thùy Dương, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn Thị Huyền, Nghiêm Ngọc Minh, 2012, Phân loại chủng vi khuẩn BTLP1 có khả năng phân hủy phenol bằng phương pháp phân tích trình tự nucleotit của đoạn gen 16S rRNA, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(1), pp. 13-19.
65. Trần Thị Mai, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Trần Thị Đào, Nguyễn Huyền Anh, Lê Thị Nhi Công, 2024, Khả năng phân hủy một số thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ của chủng *Rhizobium* sp. DG2 tạo màng sinh học và được phân lập từ kho xăng Đức Giang, Hà Nội, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 22(2), pp. 252-260.
66. Trần Thị Lương, Đỗ Thị Liên, Cung Thị Ngọc Mai, Trần Thị Đào, Trần Phương Minh, Lê Thị Nhi Công (2023). Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu bằng vi khuẩn tạo màng sinh học trên than sinh học có nguồn gốc từ trấu. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 21(2), pp. 207-214.
67. Michalak I., Chojnacka K., Marycz K., 2011, Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies, *Microchimica Acta*, 172(1), pp. 65-74.
68. Bae Y.S., Yazaydin A.O., Snurr R.Q., 2010, Evaluation of the BET method for determining surface areas of MOFs and zeolites that contain ultra-micropores, *Langmuir*, 26(8), pp. 5475-5483.
69. Epp J., 2016, 4 - X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization, in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, Woodhead Publishing, pp. 81-124.

70. Bộ Khoa học và Công nghệ, 1988, *National Standard TCVN 4582-88: Waste water. Determination of petroleum and petroleum products contents*, Hà Nội.
71. Labidi S., Jánosity A., Yakdhane A., Yakdhane E., Surányi B., Mohácsi-Farkas C., Kiskó G., 2023, Effects of pH, sodium chloride, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* biofilms, *Acta Alimentaria*, 52(2), pp. 270-280.
72. Bisht K., Moore J.L., Caprioli R.M., Skaar E.P., Wakeman, C.A., 2021, Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 22.
73. Giacomucci L., Raddadi N., Soccio M., Lotti N., Fava, F., 2019, Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnology*, 52, pp. 35-41.
74. da Silva M.P., Fernandes P.É., de Jesus Pimentel-Filho N., de Andrade N.J., Alves R.B.T., Eller M.R., Peña W.E.L., 2022, Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time, *International Dairy Journal*, 134, p. 105472.
75. Rath S., Palit K., Das S., 2022, Variable pH and subsequent change in pCO₂ modulates the biofilm formation, synthesis of extracellular polymeric substances, and survivability of a marine bacterium *Bacillus stercoris* GST-03. *Environmental Research*, 214, 114128.
76. Nogina T., Fomina M., Dumanskaya T., Zelena L., Khomenko L., Mikhalovsky S., ... Gadd G.M., 2020, A new *Rhodococcus aetherivorans* strain isolated from lubricant-contaminated soil as a prospective phenol-biodegrading agent, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), pp. 3611-3625.
77. Juárez K., Reza L., Bretón-Deval L., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández M. R., García-Guevara F., Lara P., 2023, Microaerobic degradation of crude oil and long chain alkanes by a new *Rhodococcus* strain from Gulf of Mexico, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 264.
78. Omarova M., Swientoniewski L.T., Mkam Tsengam I.K., Blake D.A., John V., McCormick A., ... Bose A., 2019, Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(17), pp. 14490-14499.
79. Mai P.T.N., 2024, Adsorption characteristics of nitrate ions on amine-grafted activated carbon using APTES, *Tropical Science and Technology Journal*, 37, pp. 120-132.

80. Rahmati F., Asgari Lajayer B., Shadfar N., van Bodegom P.M., van Hullebusch E.D., 2022, A review on biotechnological approaches applied for marine hydrocarbon spills remediation. *Microorganisms*, 10(7), p. 1289.
81. Dmitrieva E.D., Grinevich V.I., Gertsen M.M., 2022, Degradation of oil and petroleum products by biocompositions based on humic acids of peats and oil-degrading microorganisms, *Russian Journal of General Chemistry*, 92(12), pp. 2920-2930.
82. Bhatt P., Bhatt K., Huang Y., Li J., Wu S., Chen S., 2023, Biofilm formation in xenobiotic-degrading microorganisms, *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(8), pp. 1129-1149.
83. Chandran P., Das N., 2011, Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels, *Biodegradation*, 22(6), pp. 1181-1189.
84. Juárez K., Reza L., Bretón-Deval L., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández M. R., García-Guevara F., Lara P., 2023, Microaerobic degradation of crude oil and long chain alkanes by a new *Rhodococcus* strain from Gulf of Mexico, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 264.
85. Mu B.Z., Nazina T.N., 2022, Recent advances in petroleum microbiology. *Microorganisms*, 10(9), p. 1706.
86. Radice R.P., De Fabrizio V., Donadoni A., Scopa A., Martelli G., 2023, Crude oil bioremediation: From bacteria to microalgae. *Processes*, 11(2), p. 442.
87. Cerniglia C.E., Heitkamp M.A., 2024, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment, in *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, CRC Press, pp. 41-68.
88. Lê Thị Nhi Công, Cung Thị Ngọc Mai, Đỗ Thị Liên, Nguyễn Kiều Hương, Đỗ Thị Tố Uyên, Trần Thị Mai, Vương Thị Nga, Quách Thị Liên, 2025, Ứng dụng vi sinh vật tạo màng sinh học trên vật liệu mang để xử lý ô nhiễm dầu, *Tuyển tập báo cáo hội nghị - Tiểu ban ứng dụng và triển khai công nghệ*, pp. 226-231.
89. Catania V., Lopresti F., Cappello S., Scaffaro R., Quatrini P., 2020, Innovative, ecofriendly biosorbent-biodegrading biofilms for bioremediation of oil-contaminated water, *New Biotechnology*, 58, pp. 25-31.

PHỤ LỤC 1

2.3.1.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy các thành phần dầu mỡ

Sau một thời gian nuôi cấy làm giàu các mẫu, các chủng vi khuẩn có trong các mẫu đó sẽ được phân lập trên các môi trường tương ứng để chọn ra các chủng có khả năng phân hủy dầu diesel (DO) hoặc PAH [64].

Chi tiết như sau:

➤ **Làm giàu vi sinh vật**

Nguyên tắc:

Tạo môi trường thích hợp làm gia tăng số lượng vi sinh vật từ mẫu thu thập ban đầu trên nguồn cơ chất quan tâm.

Tiến hành:

Hút 5 ml mẫu nước thải vào 4 bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường muối khoáng Gost dịch, 0,1% vitamin, 1% dầu diesel hoặc 50 ppm phenol, ứng với mỗi cơ chất có một bình không và có bổ sung 0,1% glucose. Nuôi lắc các bình ở 200 vòng/phút, ở 30°C, sau 7 ngày nuôi, chuyển 10% dịch làm giàu lần 1 sang bình nuôi cấy thứ 2 chứa các thành phần giống như ở lần làm giàu thứ nhất, quá trình nuôi cấy làm giàu được tiến hành 3 lần.

➤ **Chuẩn bị đĩa thạch có chứa dầu diesel, phenol**

Môi trường muối khoáng Gost thạch sau khi khử trùng để nguội tới khoảng 50 - 60°C rồi được đổ vào các đĩa petri (đã tiệt trùng) trong box cấy vô trùng. Mỗi đĩa đổ khoảng 20 ml môi trường. Sau khi thạch đông (đĩa khô), hút dầu diesel hoặc phenol với lượng tương ứng như khi làm giàu vào đĩa. Dùng que trang thủy tinh khử trùng gạt cho tới khô.

➤ **Tìm kiếm tập đoàn vi sinh vật và phân lập, phân loại một số chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu diesel, phenol được tuyển chọn sau 3 lần làm giàu dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc**

Nguyên tắc:

Thu được quần xã vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường chứa dầu diesel, phenol; tách rời các tế bào vi sinh vật và nuôi cấy các tế bào trên môi trường dinh dưỡng để tạo khuẩn lạc riêng rẽ.

Tiến hành:

- Gạt kiểm tra các mẫu sau khi làm giàu lần 1, lần 2 và lần 3
- Sau khi pha loãng các mẫu làm giàu đến nồng độ tới hạn, hút 0,1 ml dịch mẫu đã pha loãng cho vào đĩa thạch có chứa phenol, dầu diesel đã chuẩn bị ở trên.
- Dùng que chang trái đều mẫu khắp bề mặt thạch
- Tiếp tục sử dụng que này để trải đều khắp bề mặt thạch ở đĩa thứ 2, thứ 3.v.v..ở các độ pha loãng khác nhau.
- Các đĩa sau khi cấy gạt được bao gói cẩn thận và nuôi ở tủ ấm 30°C trong 7 ngày sẽ thu được tập đoàn vsv và các khuẩn lạc riêng rẽ. Đánh dấu các khuẩn lạc khác nhau dựa vào hình thái và màu sắc khuẩn lạc.

2.3.2.1. Phương pháp xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi sinh vật

Để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập được, phương pháp [65] đã được sử dụng bằng cách đưa chủng nuôi cấy non vào môi trường MPA lỏng. Màng sinh học tạo thành sẽ được rửa bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và cố định bằng dung dịch tím tinh thể 0,1%. Màng hình thành này sẽ được rửa lại bằng DMSO và đo ở bước sóng 570 nm. Các chủng có mật độ quang học cao sẽ được lựa chọn.

Các giá trị pH, nhiệt độ, nồng độ NaCl khác nhau đã được sử dụng để xác định ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo biofilm của các chủng phân lập được.

➤ Chuẩn bị

Chất nhuộm màng là dung dịch tím tinh thể 0,1%, chất tẩy màu là dung dịch axit acetic 33%, quần giấy bạc kín lọ đựng các dung dịch trên để tránh bị oxy hóa.

➤ Nuôi preculture

Mục đích:

Tạo nguồn sinh khối để thử khả năng hình thành màng sinh học của các chủng vi khuẩn.

Tiến hành:

- Cấy các chủng vi khuẩn trên môi trường giàu dinh dưỡng (LB hoặc MPA) dạng dịch. Sau 14 – 16 h nuôi cấy, đem ly tâm loại dịch, thu sinh khối: ly tâm 3 lần ở 12.000 rpm, 4°C trong vòng 10 phút và rửa nước cất 2 lần với thể tích tương ứng. Bổ sung nước cất sau lần ly tâm cuối cùng và đánh tan sinh khối.

- Đo mật độ quang phổ (Optical Density - OD) ở bước sóng 600 nm

Sự sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường lỏng được đánh giá thông qua giá trị mật độ quang OD600 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Mẫu trắng là môi trường nuôi cấy không chứa vi khuẩn. Dịch nuôi cấy được lắc đều, đo độ hấp thụ tại bước sóng 600 nm. Trong trường hợp mẫu được pha loãng, giá trị OD600 thực được tính bằng giá trị OD đo được nhân với hệ số pha loãng. Giá trị OD600 phản ánh mức độ tăng sinh khối vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy.

- Pha loãng dịch sinh khối bằng nước cất để đạt OD là 0,3

- Pha 1% dịch này vào các eppendorf chứa 297 µl môi trường MPA. Bố trí thí nghiệm lặp lại 3 lần.

- Nuôi ở tủ ấm 30°C trong 24, 48 và 72 h.

➤ Kiểm tra khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn

Nguyên lý:

Màng sinh học có khả năng bắt giữ tím tinh thể sau khi nhuộm cố định ở nhiệt độ phòng. Bổ sung dung dịch axít acetic 33% sau nhuộm có tác dụng hòa tan màng sinh học, lúc này các tím tinh thể sẽ được giải phóng và hòa tan trong dung môi. Giá trị mật độ quang học thu được sẽ tỷ lệ với khả năng bắt giữ tím tinh thể của màng, tức khả năng tạo màng sinh học của chủng vi khuẩn tương ứng.

Tiến hành:

Cứ sau 24 h lấy các eppendorf chứa mẫu nuôi, mỗi chủng tương ứng với 3 eppendorf cho mỗi ngày và tiến hành kiểm tra khả năng tạo màng sinh học theo các bước sau:

- Dùng pipetman hút dịch nuôi cấy nhẹ nhàng ra (không làm vỡ màng)
- Rửa nhẹ nhàng màng sinh học bằng 500 μ l nước cất (5/3 lần thể tích dịch nuôi), rồi hút ra lặp lại lần nữa.
- Cho 300 μ l dung dịch tím tinh thể 0,1% vào các eppendorf
- Đợi 10 phút để cố định, ở nhiệt độ phòng
- Loại dung dịch tím tinh thể
- Rửa bằng nước cất, 2 lần với lượng gấp 5/3 lần dịch tím tinh thể
- Cho dung dịch axit axetic vào với lượng bằng thể tích dịch nuôi
- Đảo trộn hỗn hợp này rồi đo OD ở bước sóng 570 nm.

2.3.4. Phương pháp tạo chế phẩm

Các vật liệu mang được làm sạch tạp chất, sấy khô và khử trùng trước khi tiến hành cố định vi sinh vật chuyển hóa dầu. Các chủng vi sinh vật lựa chọn sẽ được nhân nuôi trong 500 ml môi trường MPA lỏng. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm loại bỏ môi trường nuôi và được rửa 2 lần bằng nước cất. Tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm và đồng thời đếm mật độ tế bào để xây dựng đường chuẩn. Pha loãng dịch sinh khối vi khuẩn sao cho đạt mật độ tế bào là 10^8 CFU/ml và bổ sung mùn cưa vào. Ủ hỗn hợp sinh khối vi sinh vật và vật liệu mang ở $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ trong 5 ngày. Chế phẩm được lên men xộp ở các nhiệt độ và độ ẩm khác nhau thích hợp cho quá trình lên men xộp. Sau 5 ngày lên men, chế phẩm được sấy ở nhiệt độ 40°C để tạo chế phẩm [66].

Mật độ tế bào vi sinh vật được xác định theo phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc CFU.

Cụ thể như sau:

Một gram chế phẩm được hòa trong 9 ml nước muối sinh lý, lắc mẫu từ 1-2 giờ ở nhiệt độ lên men tốt nhất. Hút 0,5 ml mẫu hòa trong 4,5 ml nước muối

sinh lý. Mẫu được pha loãng tới hạn và lặp lại mỗi độ pha loãng 3 lần. Sau khi pha loãng tới hạn, hút 0,1 ml từ các nồng độ pha loãng vào đĩa môi trường MPA thạch đã được chuẩn bị trước và tiến hành cấy gạt. Các đĩa sau khi gạt được bao gói cẩn thận và nuôi ở tủ ấm đến khi khuẩn lạc phát triển. Tiến hành đếm chỉ số số lượng khuẩn lạc ở số mũ cao nhất sau đó dựa vào công thức tính chỉ số khuẩn lạc (CFU/g) như sau:

$$\text{CFU /g} = \mathbf{X.10.10^n.10} = \mathbf{X.10^{(n+2)}}$$

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

n: số lần pha loãng; 10: 100 µl/1ml

Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần

2.3.6. Thành phần các nguyên tố trên vật liệu mùn cưa được phân tích bằng kỹ thuật tán xạ năng lượng tia X (EDX - Energy – Dispersive X-ray Analysis)

Các thành phần nguyên tố trên mùn cưa được đo trên thiết bị là HORIBA 7593-H/HITACHI S-4800, khoảng cách làm việc là 15 mm, điện thế là 20 kV.

Mẫu được đặt vào kính hiển vi điện tử quét HITACHI S-4800 (SEM), và phủ bằng Platin trong 40 giây, sau đó đo ở thế 5 kV, khoảng cách từ đầu tip tới mẫu là khoảng 5-6 mm. Mẫu được kích thích bằng chùm điện tử năng lượng cao (5 kV), sau đó máy dò EDX sẽ thu nhận các tia X đặc trưng phát ra từ mẫu. Năng lượng và cường độ của các tia X này được phân tích bằng phần mềm để xác định loại nguyên tố và hàm lượng tương đối của chúng trong mẫu.

Chuẩn bị mẫu:

□ Làm sạch mẫu: Loại bỏ bụi bẩn, chất gây ô nhiễm trên bề mặt vật liệu mang mùn cưa bằng các phương pháp như làm sạch bằng tia cực tím và ozone để đảm bảo độ chính xác của phép đo.

□ Đặt mẫu vào thiết bị: Mẫu mùn cưa được đặt lên giá đỡ trong phòng chân không của máy SEM, nơi chùm điện tử được tập trung và chiếu lên mẫu.

Phân tích bằng chùm điện tử:

- Tương tác với mẫu: Chùm điện tử năng lượng cao từ máy SEM tương tác với các lớp vỏ electron bên trong của nguyên tử trong mẫu.

- Phát xạ tia X đặc trưng: Sự tương tác này làm bật electron khỏi lớp vỏ, tạo ra các lỗ trống. Khi electron từ lớp vỏ cao hơn di chuyển xuống để lấp đầy lỗ trống, nó giải phóng năng lượng dư thừa dưới dạng tia X có năng lượng riêng biệt, đặc trưng cho mỗi nguyên tố.

Thu nhận và phân tích tia X:

- Máy dò EDX: Máy dò EDX thu nhận các tia X phát ra từ mẫu.
- Phổ năng lượng: Máy dò ghi lại năng lượng và cường độ của từng tia X.
- Xác định nguyên tố: Phần mềm sẽ phân tích phổ năng lượng này, so sánh với các thư viện phổ nguyên tố để xác định loại nguyên tố nào có mặt trong mẫu dựa trên năng lượng đặc trưng của chúng.
- Định lượng hàm lượng: Cường độ của các đỉnh trong phổ năng lượng được sử dụng để ước tính hàm lượng tương đối của từng nguyên tố có trong mẫu.

2.3.7. Xác định diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết (BET – Brunauer – Emmett – Teller)

Diện tích bề mặt riêng có thể được xác định bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết BET (Brunauer-Emmett-Teller). Cần thực hiện quá trình hấp phụ vật lý khí nitơ (N_2) lên mẫu vật liệu ở nhiệt độ nitơ lỏng (77,4 K) và đo thể tích hoặc khối lượng khí hấp phụ tại các áp suất khác nhau, sau đó vẽ đường cong hấp phụ đẳng nhiệt và sử dụng phương trình BET để tính toán diện tích bề mặt riêng trên phần mềm Excel.

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu mùn cưa cần được làm sạch và sấy khô trong điều kiện chân không để loại bỏ các tạp chất và hơi ẩm trên bề mặt, đảm bảo độ chính xác cho phép đo. thiết bị Horiba SA 9600 (Nhật Bản) được sử dụng để đo.

Thực hiện phân tích hấp phụ:

- Đặt mẫu vào máy phân tích hấp phụ khí.
- Dùng khí nitơ làm chất hấp phụ, vì nó có khả năng hấp phụ vật lý trên bề mặt vật liệu ở nhiệt độ rất thấp.
- Tăng dần áp suất của khí nitơ và đo lượng khí bị hấp phụ trên bề mặt mẫu.
- Thực hiện quá trình khử hấp phụ để có đường cong giải hấp phụ.

Vẽ đường cong hấp phụ đẳng nhiệt (BET plot):

Biểu đồ biểu diễn mối quan hệ giữa lượng khí bị hấp phụ và áp suất tương đối được vẽ dựa trên dữ liệu đo được.

2.3.8. Phân tích cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD - X-ray Diffraction)

Thiết bị sử dụng đo XRD là D8- Advance, hãng Bruker, CHLB Đức; Phần mềm để phân tích phổ: Diffrac.eva của Bruker.

Tạo chùm tia X: Tia X được tạo ra từ ống tia X, sau đó được chuẩn trực để hội tụ thành một chùm tia hẹp.

Chiếu mẫu: Chùm tia X được chiếu vào mẫu vật liệu đặt trong giá đỡ.

Thu thập dữ liệu nhiễu xạ: Các tia X bị nhiễu xạ ở các góc khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc tinh thể của vật liệu, sau đó được đo cường độ bằng máy dò tia X.

Quét góc: Máy dò hoặc mẫu được di chuyển để quét một phạm vi các góc 2θ (góc giữa tia tới và tia phản xạ).

Phân tích phổ nhiễu xạ: Kết quả được biểu diễn dưới dạng phổ nhiễu xạ, một biểu đồ biểu diễn cường độ nhiễu xạ theo góc 2θ .

APPLICATION OF BIO-PRODUCT FROM BIOFILM-FORMING BACTERIA ON SAWDUST TO TREAT OIL-POLLUTED WATER

Le Thi Nhi Cong^{1,2*}, Nguyen Kieu Huong², Pham The Trinh^{3,4}, Cung Thi Ngoc Mai¹,
Do Thi Lien¹, Tran Thi Mai¹, Vuong Thi Nga^{1,2}, Quach Thi Lien¹

¹Institute of Biology - Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology

³Department of Science and Technology Daklak, ⁴Tay Nguyen University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 28/8/2025</p> <p>Revised: 30/11/2025</p> <p>Published: 30/11/2025</p>	<p>Oil pollution remains a significant concern for both human health and ecosystems. Many physical, chemical and biological approaches have been proposed. The use of biofilm-forming microorganisms on carrier materials has made a significant contribution to oil pollution treatment. Therefore, sawdust has been used to analyze and evaluate the physicochemical properties to confirm the structural suitability for making a bio-product. The results showed that sawdust is porous, has a large surface area, and contains only the element groups C, O and Si, therefore, microorganisms can adhere and form biofilms in/on sawdust. Conducting different ratios of the product from 1, 2, 5 and 10% with 200 ppm crude oil, after 7 days, the saturated hydrocarbon, aromatic hydrocarbon, resin and asphaltene components were significantly reduced. Especially with 10% of the product, these components were degraded by 80, 75, 66 and 60%, respectively. The <i>n</i>-alkanes from C13 to C27 and aromatic hydrocarbons were also remarkably degraded. This result suggests the potential application of sawdust to create bio-products and applications in large-scale oil pollution treatment.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Bacteria</p> <p>Biodegradation</p> <p>Biofilm</p> <p>Oil pollution</p> <p>Sawdust</p>	

ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC TỪ VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN MÙN CƯA ĐỂ XỬ LÝ NƯỚC Ô NHIỄM DẦU

Lê Thị Nhi Công^{1,2*}, Nguyễn Kiều Hương², Phạm Thế Trinh^{3,4}, Cung Thị Ngọc Mai¹,
Đỗ Thị Liên¹, Trần Thị Mai¹, Vương Thị Nga^{1,2}, Quách Thị Liên¹

¹Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Sở Khoa học và Công nghệ Đắk Lắk, ⁴Trường Đại học Tây Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 28/8/2025</p> <p>Ngày hoàn thiện: 30/11/2025</p> <p>Ngày đăng: 30/11/2025</p>	<p>Ô nhiễm dầu vẫn là vấn đề đáng lo ngại đối với sức khỏe con người và các hệ sinh thái. Nhiều biện pháp vật lý, hóa học, sinh học đã được đưa ra. Việc sử dụng vi sinh vật tạo màng sinh học trên các vật liệu mang đã góp phần quan trọng trong xử lý ô nhiễm dầu. Vì vậy, mùn cưa đã được sử dụng để phân tích đánh giá các tính chất hóa lý để chứng minh sự phù hợp về mặt cấu trúc để làm chế phẩm. Kết quả cho thấy, mùn cưa có độ xốp, có diện tích bề mặt lớn, chỉ chứa các nhóm nguyên tố là C, O và Si, do đó vi sinh vật có thể bám dính và tạo màng sinh học trong/trên mùn cưa. Thử nghiệm các tỉ lệ chế phẩm khác nhau từ 1, 2, 5 và 10% với hàm lượng dầu thô là 200 ppm, sau 7 ngày, các thành phần hydrocarbon no, thơm, nhựa và asphalten đều giảm đi đáng kể. Đặc biệt với 10% chế phẩm, hàm lượng các chất này bị phân hủy tương ứng là 80, 75, 66 và 60%. Các <i>n</i>-alkane từ C13 đến C27 cũng như hydrocarbon thơm cũng được phân hủy một cách đáng kể. Kết quả này gợi mở tiềm năng ứng dụng mùn cưa để tạo chế phẩm và ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu ở quy mô lớn.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Vi khuẩn</p> <p>Phân hủy sinh học</p> <p>Màng sinh học</p> <p>Ô nhiễm dầu</p> <p>Mùn cưa</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.13511>

* Corresponding author. Email: lenhicong@gmail.com; lenhicong@ib.ac.vn

1. Giới thiệu

Dầu mỏ là một hợp chất hữu cơ tự nhiên, độc hại, không đồng nhất và phức tạp, và là hỗn hợp của các hydrocarbon, phép đo phổ khối của nó cho thấy hơn 17.000 hợp chất hóa học riêng biệt, bao gồm các alkane tổng quát với độ dài mạch và điểm nhánh khác nhau, cycloalkane, hydrocarbon thơm đơn vòng và đa vòng. Lưu huỳnh, oxy và nitơ có thể được tìm thấy quá mức trong cấu trúc của một số hợp chất, trong khi photpho và các kim loại nặng như vanadi và niken hiếm khi được tìm thấy [1]. Do sự khác biệt đáng kể về các đặc tính hóa học và vật lý của các hợp chất dầu (ví dụ như khả năng hòa tan, độ nhớt, khả năng hấp thụ và sự khác biệt về độc tính và sinh khả dụng), nên khả năng phân hủy sinh học và số phận môi trường của chúng cũng khác nhau.

Trong phân loại, hydrocarbon dầu mỏ được chia thành bốn nhóm chính: hydrocarbon no, hydrocarbon thơm, asphalten (porphyrin, este, ketone, axit béo, phenol) và nhựa (amide, sulfoxide, carbazole, quinolin, pyridin). Khả năng phân hủy các hydrocarbon có trong dầu thô bởi vi sinh vật như sau: *n*-alkane > alkane mạch nhánh > aromatic trọng lượng phân tử thấp > alkane vòng [2]. Và nhìn chung thì dầu thô có mức độ gây ô nhiễm cao hơn dầu diesel và các loại dầu khác, đồng thời cũng khó xử lý hơn [3]. Do đó, nhiều biện pháp đã được áp dụng để loại bỏ dầu thô khỏi môi trường biển. Chẳng hạn như các phương pháp vật lý, hóa học và cơ học [4]. Mỗi phương pháp này đều có ưu và nhược điểm trong việc loại bỏ dầu thô. Ưu điểm chính của các phương pháp này là thời gian xử lý nhanh, nhưng nhược điểm là có thể tạo ra các chất trung gian hóa học nguy hiểm và một số trong đó gây hại nhiều hơn cho ô nhiễm ban đầu [4]. Các phương pháp sinh học như phân hủy sinh học và phục hồi sinh học là những công nghệ thân thiện với môi trường và có thể xử lý triệt để các thành phần có trong dầu mỏ [5], [6].

Ứng dụng màng sinh học để xử lý ô nhiễm dầu cũng là một trong số các biện pháp sinh học và đã được quan tâm nghiên cứu từ lâu [7]. Màng sinh học (biofilm) là tập hợp các tế bào vi sinh vật gắn kết với nhau trong một lớp vật chất ngoại bào (extracellular polymeric substances - EPS). Việc hình thành biofilm giúp vi sinh vật bám dính tốt trên bề mặt dầu hoặc các hạt bùn, tăng khả năng tiếp xúc và chuyển hóa hydrocarbon tốt hơn [8]. Việc tìm kiếm các vật liệu mang phù hợp sẽ góp phần làm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu [9].

Trong nghiên cứu này, vật liệu mang là mùn cưa đã được nghiên cứu các đặc điểm hóa lý như diện tích bề mặt riêng, kích thước lỗ xốp, phân bố kích thước, thành phần nguyên tố (EDX), cấu trúc vật liệu (XRD) đã được thực hiện để chứng minh tính khả thi của các vật liệu mang cho việc tạo chế phẩm sinh học từ các vi khuẩn tạo biofilm trên vật liệu đó. Phân tích tia X tán xạ năng lượng (Energy – Dispersive X-ray Analysis - EDX), một kỹ thuật để xác định thành phần nguyên tố (loại nguyên tố và tỷ lệ phần trăm) của một mẫu vật rắn bằng cách ghi lại phổ tia X đặc trưng phát ra khi mẫu bị chùm tia X hoặc electron bắn phá [10]. Để đo cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD), bằng cách chiếu một chùm tia X vào mẫu vật liệu tinh thể, sau đó đo cường độ và góc tán xạ của các tia X bị nhiễu xạ. Các tia X tương tác với mạng tinh thể tuần hoàn, tạo ra các đỉnh nhiễu xạ khi thỏa mãn Định luật Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$). Bằng cách phân tích vị trí các đỉnh nhiễu xạ này, ta xác định được khoảng cách giữa các mặt phẳng nguyên tử (*d*), từ đó suy ra cấu trúc tinh thể, pha, thành phần và kích thước hạt của vật liệu [11].

Đồng thời hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong dầu thô cũng được đánh giá ở nghiên cứu này. Các kết quả này sẽ góp phần cung cấp các thông tin về sự phù hợp của loại vật liệu mang mùn cưa sẵn có, giá rẻ và có khả năng tự phân hủy sinh học trong việc tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu:

- Mùn cưa; dầu thô mỏ Bạch Hổ, Việt Nam
- Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B1 và *Rhodococcus* sp. B3. thu được từ các nghiên cứu trước.

2.1. Đo các thành phần nguyên tố có trên vật liệu mang mùn của bằng phương pháp phân tích tia X tán xạ năng lượng (EDX - Energy - Dispersive X-ray Analysis) [10]

Các thành phần nguyên tố trên mùn của được đo trên thiết bị là HORIBA 7593-H/HITACHI S-4800, khoảng cách làm việc là 15 mm, điện thế là 20 kV.

Mẫu được đặt vào kính hiển vi điện tử quét HITACHI S-4800 (SEM), và phủ bằng Platin trong 40 giây, sau đó đo ở thế 5 kV, khoảng cách từ đầu tip tới mẫu là khoảng 5-6 mm. Mẫu được kích thích bằng chùm điện tử năng lượng cao (5 kV), sau đó máy dò EDX sẽ thu nhận các tia X đặc trưng phát ra từ mẫu. Năng lượng và cường độ của các tia X này được phân tích bằng phần mềm để xác định loại nguyên tố và hàm lượng tương đối của chúng trong mẫu.

Chuẩn bị mẫu:

- Làm sạch mẫu: Loại bỏ bụi bẩn, chất gây ô nhiễm trên bề mặt vật liệu mang mùn của bằng các phương pháp như làm sạch bằng tia cực tím và ozone để đảm bảo độ chính xác của phép đo.
- Đặt mẫu vào thiết bị: Mẫu mùn của được đặt lên giá đỡ trong phòng chân không của máy SEM, nơi chùm điện tử được tập trung và chiếu lên mẫu.

Phân tích bằng chùm điện tử:

- Tương tác với mẫu: Chùm điện tử năng lượng cao từ máy SEM tương tác với các lớp vỏ electron bên trong của nguyên tử trong mẫu.
- Phát xạ tia X đặc trưng: Sự tương tác này làm bật electron khỏi lớp vỏ, tạo ra các lỗ trống. Khi electron từ lớp vỏ cao hơn di chuyển xuống để lấp đầy lỗ trống, nó giải phóng năng lượng dư thừa dưới dạng tia X có năng lượng riêng biệt, đặc trưng cho mỗi nguyên tố.

Thu nhận và phân tích tia X:

- Máy dò EDX: Máy dò EDX thu nhận các tia X phát ra từ mẫu.
- Phổ năng lượng: Máy dò ghi lại năng lượng và cường độ của từng tia X.
- Xác định nguyên tố: Phần mềm sẽ phân tích phổ năng lượng này, so sánh với các thư viện phổ nguyên tố để xác định loại nguyên tố nào có mặt trong mẫu dựa trên năng lượng đặc trưng của chúng.
- Định lượng hàm lượng: Cường độ của các đỉnh trong phổ năng lượng được sử dụng để ước tính hàm lượng tương đối của từng nguyên tố có trong mẫu.

2.2. Đo diện tích bề mặt vật liệu mang mùn của bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết (BET - Brunauer - Emmett - Teller) [12]

Diện tích bề mặt riêng có thể được xác định bằng đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết BET (Brunauer-Emmett-Teller). Cần thực hiện quá trình hấp phụ vật lý khí nitơ (N_2) lên mẫu vật liệu ở nhiệt độ nitơ lỏng (77,4 K) và đo thể tích hoặc khối lượng khí hấp phụ tại các áp suất khác nhau, sau đó vẽ đường cong hấp phụ đẳng nhiệt và sử dụng phương trình BET để tính toán diện tích bề mặt riêng trên phần mềm Excel.

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu mùn của cần được làm sạch và sấy khô trong điều kiện chân không để loại bỏ các tạp chất và hơi ẩm trên bề mặt, đảm bảo độ chính xác cho phép đo. Thiết bị Horiba SA 9600 (Nhật Bản) được sử dụng để đo.

Thực hiện phân tích hấp phụ:

- Đặt mẫu vào máy phân tích hấp phụ khí.
- Dùng khí nitơ làm chất hấp phụ, vì nó có khả năng hấp phụ vật lý trên bề mặt vật liệu ở nhiệt độ rất thấp.
- Tăng dần áp suất của khí nitơ và đo lượng khí bị hấp phụ trên bề mặt mẫu.
- Thực hiện quá trình khử hấp phụ để có đường cong giải hấp phụ.

Vẽ đường cong hấp phụ đẳng nhiệt (BET plot):

Biểu đồ biểu diễn mối quan hệ giữa lượng khí bị hấp phụ và áp suất tương đối được vẽ dựa trên dữ liệu đo được.

2.3. Đo cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD - X-ray Diffraction) [11]

Thiết bị sử dụng đo XRD là D8- Advance, hãng Bruker, CHLB Đức; Phần mềm để phân tích phổ: Diffrac.eva của Bruker.

Tạo chùm tia X: Tia X được tạo ra từ ống tia X, sau đó được chuẩn trực để hội tụ thành một chùm tia hẹp.

Chiếu mẫu: Chùm tia X được chiếu vào mẫu vật liệu đặt trong giá đỡ.

Thu thập dữ liệu nhiễu xạ: Các tia X bị nhiễu xạ ở các góc khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc tinh thể của vật liệu, sau đó được đo cường độ bằng máy dò tia X.

Quét góc: Máy dò hoặc mẫu được di chuyển để quét một phạm vi các góc 2θ (góc giữa tia tới và tia phản xạ).

Phân tích phổ nhiễu xạ: Kết quả được biểu diễn dưới dạng phổ nhiễu xạ, một biểu đồ biểu diễn cường độ nhiễu xạ theo góc 2θ .

2.4. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM - scanning electron microscopy) [9]

Các biofilm tạo thành cũng như mùn cưa đã được đặt nhẹ nhàng lên đĩa thủy tinh có phủ poly-L-lysine. Sau đó, màng sẽ được cố định bằng glutaraldehyde và OsO_4 ; sử dụng dung môi có chứa ethanol, isoamyl acetate và CO_2 để loại nước còn lại trong biofilm, mùn cưa; sau đó phủ platinumium để quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét HITACHI S-4800.

2.5. Đánh giá khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ

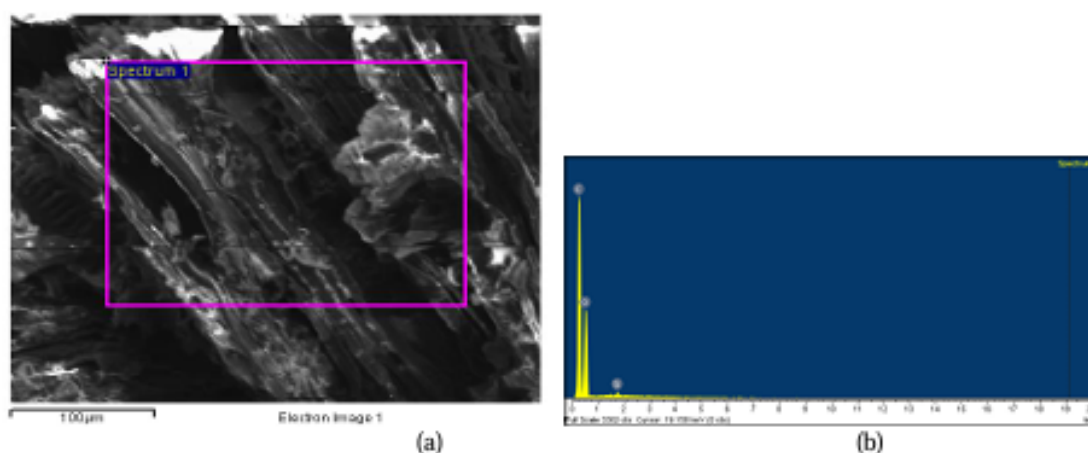
200 ppm dầu thô được bổ sung vào các mẫu thí nghiệm với các nồng độ chế phẩm khác nhau gồm 1, 2, 5 và 10%. Khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ được đánh giá bằng các phương pháp phân tích sắc ký khí (GC) như mô tả trong nghiên cứu trước đây [[9]]. Cụ thể như sau sử dụng thiết bị GC HP6890 (Agilent, Palo Alto, California, Mỹ) được trang bị cột mao quản không phân cực HP-1 với kích thước $340 \mu\text{m} \times 30 \text{ m}$ và đầu dò FID. Heli được sử dụng làm khí mang với lưu lượng 1,0 mL/phút. Chương trình nhiệt độ như sau: nhiệt độ thiết bị ban đầu được giữ ở 80°C trong 2 phút, sau đó tăng tuyến tính với tốc độ $10^\circ\text{C}/\text{phút}$ cho đến 300°C và giữ trong 10 phút. Nhiệt độ của ống tiêm và đầu dò đều được duy trì ở 300°C .

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học, dựa vào phần mềm Excel để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ đồ thị. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình mẫu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả đo các thành phần nguyên tố có trên vật liệu mang mùn cưa



Hình 1. Hình ảnh EDX của mùn cưa, trong đó (a) ảnh SEM, (b) phổ phát xạ của các nguyên tố

Bảng 1. Thành phần nguyên tố có trong mùn cưa

Nguyên tố	Trọng lượng (%)	Nguyên tố (%)
C K	55,27 ± 3,25	62,19 ± 3,68
O K	44,51 ± 3,23	37,71 ± 3,51
Si K	0,17	0,08
K K	0,06	0,02
Tổng	100,00	100,00

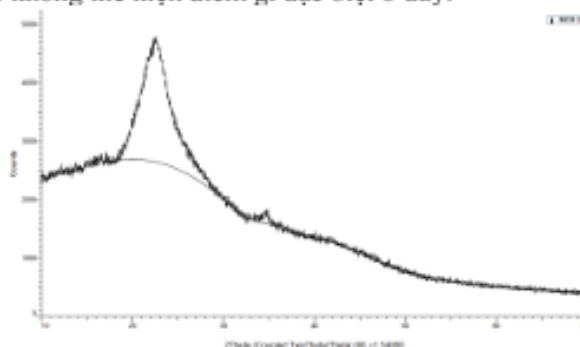
Mùn cưa đã được đo tỉ lệ các thành phần nguyên tố có trên vật liệu, kết quả được thể hiện ở Hình 1a, Hình 1b và Bảng 1. Kết quả cho thấy trong mùn cưa chỉ có 3 nhóm nguyên tố là C, O và Si. Trong đó, C, O và Si chiếm 52,63, 47,20 và 0,17 % trọng lượng. Trong nguyên tử có các lớp năng lượng electron K, L, M. Khi được kích thích thì các electron nhảy lên các mức năng lượng cao sau đó phát xạ và về năng lượng thấp (K) và chúng được ghi nhận lại.

3.2. Kết quả đo diện tích bề mặt vật liệu mang mùn cưa (BET)

Bằng phương pháp đo đường đẳng nhiệt hấp phụ theo lý thuyết, diện tích bề mặt của vật liệu mùn cưa được xác định là 2,3237 m²/g; kích thước lỗ hấp phụ (adsorption) là 37,6944 nm và kích thước lỗ giải hấp phụ (desorption) là 27,9072 nm. Các giá trị adsorption (hấp phụ) và desorption (khử hấp phụ) của vật liệu có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá khả năng của vật liệu này trong việc hấp thụ và giải phóng các chất từ bề mặt vật liệu. Giá trị adsorption biểu thị dung lượng hoặc hiệu quả mà vật liệu có thể hấp phụ (thu hút và giữ lại) các phân tử, ion hoặc chất hóa học trên bề mặt hoặc trong lỗ rỗng của vật liệu. Giá trị này cho biết khả năng hấp phụ của vật liệu với các chất cần xử lý hoặc thu giữ, như trong xử lý nước thải hoặc lọc khí. Hơn nữa, giá trị adsorption còn phản ánh mức độ bão hòa của vật liệu khi các vị trí hấp phụ trên bề mặt đã được lấp đầy. Việc xác định giá trị này giúp chọn lựa vật liệu tốt nhất và tối ưu hóa điều kiện sử dụng như thời gian, khối lượng vật liệu, nồng độ chất cần hấp phụ. Giá trị desorption biểu thị khả năng vật liệu giải phóng các phân tử hoặc ion đã hấp phụ trước đó. Quá trình desorption giúp tái sinh vật liệu, cho phép tái sử dụng nhiều lần và nâng cao hiệu quả kinh tế, đồng thời đánh giá sức bền của vật liệu trong môi trường ứng dụng. Ví dụ, một vật liệu có khả năng desorption tốt có thể được gia nhiệt hoặc xử lý hóa học để loại bỏ chất hấp phụ và tái sử dụng mà không mất nhiều dung lượng hấp phụ [13]. Như vậy, có thể thấy rằng vật liệu mùn cưa vừa có khả năng thấm hút tốt, vừa có khả năng tái sử dụng lâu dài.

3.3. Kết quả đo cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X

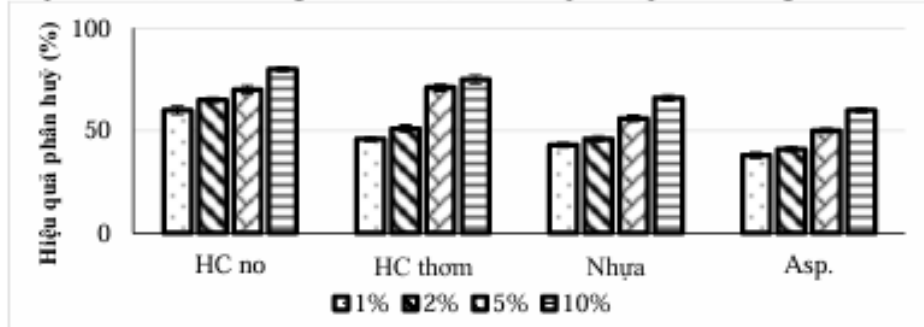
Mùn cưa được đo cấu trúc vật liệu bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X (XRD), kết quả được thể hiện ở Hình 3. Bằng cách phân tích vị trí các đỉnh nhiễu xạ này, ta xác định được khoảng cách giữa các mặt phẳng nguyên tử (d), từ đó suy ra cấu trúc tinh thể, pha, thành phần và kích thước hạt của vật liệu. Tuy nhiên, trong trường hợp này, mùn cưa không thể hiện các pha tinh thể trong mẫu. Do đó, về mặt cấu trúc không thể hiện điểm gì đặc biệt ở đây.

**Hình 3.** Hình ảnh XRD của mùn cưa

Cổ định vi sinh vật trên giá thể tự nhiên là một trong những phương pháp sinh học tiềm năng nhằm nâng cao hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu. Trong kỹ thuật này, các chủng vi sinh vật phân hủy hydrocarbon được gắn kết hoặc hấp phụ trên những vật liệu sẵn có trong tự nhiên như than bùn, xơ dừa, vỏ trấu, bã mía hoặc đá núi lửa. Các vật liệu này có cấu trúc xốp, diện tích bề mặt lớn, chứa nhiều nhóm chức bề mặt nên vừa đóng vai trò giá thể cho vi sinh vật phát triển, vừa có khả năng hấp phụ các hợp chất hydrocarbon [14].

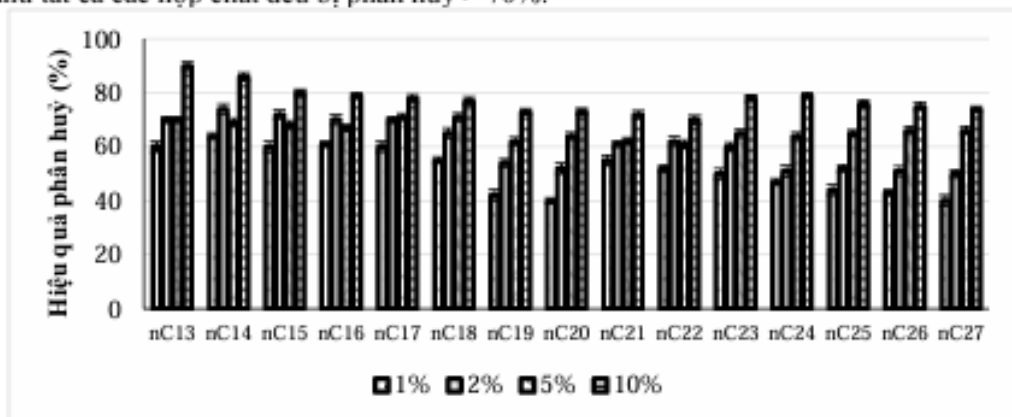
3.4. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm tạo thành

Để thử nghiệm hiệu quả phân hủy của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau, 200 ppm dầu thô đã được sử dụng. Trong dầu thô thường chứa các thành phần như hydrocarbon no, hydrocarbon thơm (PAH), nhựa, asphalten và các thành phần khác [1]. Sau 7 ngày thử nghiệm, hiệu quả phân hủy các thành phần này được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, ở nồng độ chế phẩm là 10%, các thành phần hydrocarbon được phân hủy > 75% nhưng các thành phần như nhựa hoặc asphalten phân hủy thấp hơn. Điều này cũng phù hợp với công bố của Radice [5] vì nhựa và asphalten được xem là các thành phần khó phân hủy trong dầu mỏ. Đồng thời, ở các nồng độ 1, 2 và 5% hiệu quả còn hạn chế. Nồng độ 10% được xem là phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Khả năng phân hủy các thành phần có trong dầu thô của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau (HC no, hydrocarbon no; HC thơm, hydrocarbon thơm, Asp., asphalten)

Phân tích sắc ký khí cho thấy các thành phần *n*-alkane (hydrocarbon no) từ C₁₃ đến C₂₇ cũng đã được phân hủy đáng kể (Hình 5). Các hợp chất có số lượng carbon từ 13 đến 18 đều dễ dàng bị phân hủy bởi chế phẩm ở cả những nồng độ 1, 2 và 5%. Còn với nồng độ chế phẩm là 10%, hầu như tất cả các hợp chất đều bị phân hủy > 70%.

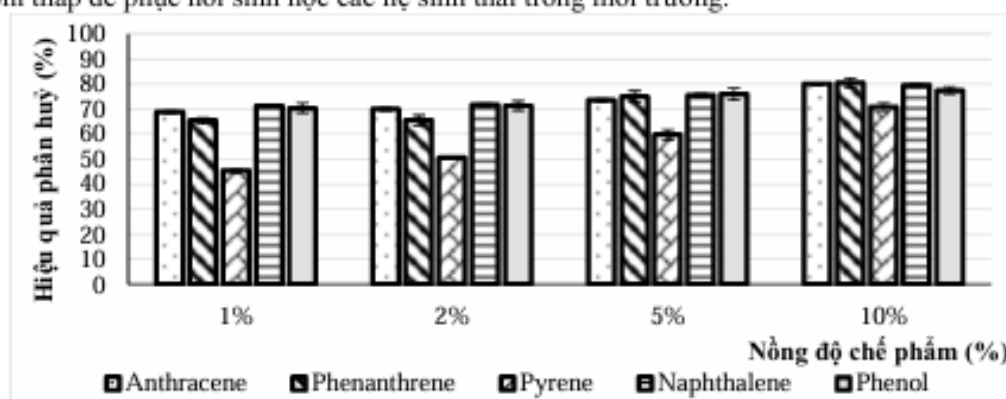


Hình 5. Khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon no của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau

Bên cạnh đó, các thành phần hydrocarbon thơm (PAH – polycyclic aromatic hydrocarbon) như anthracene, phenanthrene, pyrene, naphthalene và phenol đã được phân hủy một cách rõ ràng (Hình 6). Đặc biệt, với nồng độ chế phẩm là 10%, các PAH này được phân hủy tương ứng là 79,97, 80,35, 70,79, 79,53 và 77,32%. Với hợp chất pyren, do có cấu trúc 4 vòng thơm nên hiệu quả phân hủy ở

tất cả các thí nghiệm đều thấp. Các kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đó về khả năng phân hủy sinh học của các thành phần hydrocarbon có trong dầu thô [2].

Theo [15], việc cố định các vi sinh vật có khả năng phân hủy các chất gây ô nhiễm lên vật liệu mang thúc đẩy đáng kể các quá trình xử lý sinh học. Trong nghiên cứu này, khả năng bám dính và sinh trưởng mạnh của các tế bào vi khuẩn đã được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét. Hiệu quả xử lý sinh học của các hệ thống, được thử nghiệm trên dầu thô và định lượng bằng sắc ký khí, cho thấy việc cố định làm tăng khả năng phân hủy sinh học hydrocarbon lên đến 23% so với vi khuẩn sống tự do. Các biofilm trên các vật liệu mang đã phân hủy hơn 66% lượng dầu trong thí nghiệm sau 10 ngày. Nghiên cứu đã chỉ ra phương pháp này là một công cụ đa năng và chi phí thấp để phục hồi sinh học các hệ sinh thái trong môi trường.



Hình 6. Khả năng phân hủy PAH của chế phẩm ở các nồng độ khác nhau

Trong nghiên cứu khác, xơ dừa, sỏi keramzit và bã mía đã được dùng làm chất mang để các vi sinh vật tạo màng sinh học và thử nghiệm phân hủy dầu diesel [16]. Kết quả cho thấy cả 3 loại chế phẩm đều có thể phân hủy > 90% các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ sau 7 ngày xử lý với nồng độ dầu tổng số ban đầu là 250 ppm. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới dừng ở thử nghiệm với dầu diesel, đây là loại dầu có thành phần đơn giản hơn dầu thô rất nhiều. Các nghiên cứu sử dụng mùn cưa làm chất mang để tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu còn chưa có nhiều thông tin. Bên cạnh đó, theo [7], trong môi trường sống tự nhiên, biofilm được hình thành bởi một hoặc nhiều quần thể bám vào bề mặt và giao diện sinh học/phi sinh học. Sự bám dính của các tế bào vi sinh vật vào các bề mặt này có thể thông qua ma trận các chất polyme ngoại bào (EPS). Các vi sinh vật tồn tại trong biofilm có thể chống chịu lại với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường tốt hơn. Do đó, biofilm vi sinh vật trên vật liệu mang đã được nghiên cứu để ứng dụng trong việc xử lý các hợp chất khó phân hủy. Kỹ thuật này có thể được áp dụng ở quy mô lớn. Việc sử dụng các vật liệu mang có cấu trúc phù hợp và có giá thành rẻ có vai trò quan trọng trong xử lý ô nhiễm dầu ở quy mô lớn [7], [9]. Hơn thế nữa, ưu điểm của mùn cưa là có thể dùng làm chất đốt sau xử lý.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã cho thấy mùn cưa là loại vật liệu có cấu trúc rỗng xốp; chứa chủ yếu là các nguyên tố C, O và Si; cũng như có diện tích bề mặt là 2,3237 m²/g; kích thước lỗ hấp phụ là 37,6944 nm và kích thước lỗ giải hấp phụ là 27,9072 nm là chất mang phù hợp để tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu. Với 10% chế phẩm, sau 7 ngày thí nghiệm, các thành phần hydrocarbon có trong dầu thô cũng như nhựa và asphalten đã giảm > 60% trong đó các thành phần n-alkane từ C13 đến C27 đạt hiệu suất > 70%, còn các PAH như anthracene, phenanthrene, pyrene, naphthalene và phenol có hiệu suất phân hủy đạt tương ứng là 79,97, 80,35, 70,79, 79,53 và 77,32%. Kết quả này mở ra triển vọng sử dụng vật liệu mang là mùn cưa để tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu ở quy mô lớn.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Dự án Sản xuất thử nghiệm mã số UDSXTN.02/2025-2026 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học, VAST.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] B. Z. Mu and T. N. Nazina, "Recent advances in petroleum microbiology," *Microorganisms*, vol. 10, no. 9, 2022, Art. no. 1706.
- [2] C. E. Cerniglia and M. A. Heitkamp, "Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment," in *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*, CRC press, 2024, pp. 41-68.
- [3] M. Hassanshahian, N. Amirinejad, and M. A. Behzadi, "Crude oil pollution and biodegradation at the Persian Gulf: A comprehensive and review study," *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 1415-1435, 2020.
- [4] M. Wu, S. Feng, Z. Liu, and S. Tang, "Bioremediation of petroleum-contaminated soil based on both toxicity risk control and hydrocarbon removal—progress and prospect," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 31, no. 50, pp. 59795-59818, 2024.
- [5] R. P. Radice, V. De Fabrizio, A. Donadoni, A. Scopa, and G. Martelli, "Crude oil bioremediation: From bacteria to microalgae," *Processes*, vol. 11, no. 2, 2023, Art. no. 442.
- [6] Y. Gong, X. Zhao, Z. Cai, S. E. O'reilly, X. Hao, and D. Zhao, "A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 79, no. 1-2, pp. 16-33, 2014.
- [7] V. Catania, F. Lopresti, S. Cappello, R. Scaffaro, and P. Quatrini, "Innovative, ecofriendly biosorbent-biodegrading biofilms for bioremediation of oil-contaminated water," *New Biotechnology*, vol. 58, pp. 25-31, 2020.
- [8] M. Suzuki, Y. Tachibana, R. Takizawa, T. Morikawa, H. Takeno, and K. I. Kasuya, "A novel poly (3-hydroxybutyrate)-degrading actinobacterium that was isolated from plastisphere formed on marine plastic debris," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 183, 2021, Art. no. 109461.
- [9] T. N. C. Le, T. L. Do, B. S. Gupta, T. N. M. Cung, P. H. Hoang, T. M. N. Nguyen, *et al.*, "Enhanced degradation of diesel oil by using biofilms formed by indigenous purple photosynthetic bacteria from oil-contaminated coasts of Vietnam on different carriers," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 191, pp. 313-330, 2020.
- [10] I. Michalak, K. Chojnacka, and K. Marycz, "Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies," *Microchimica Acta*, vol. 172, no. 1, pp. 65-74, 2011.
- [11] J. Epp, "X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization," in *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*. Woodhead Publishing, 2016, pp. 81-124.
- [12] Y. S. Bac, A. O. Yazaydin, and R. Q. Snurr, "Evaluation of the BET method for determining surface areas of MOFs and zeolites that contain ultra-micropores," *Langmuir*, vol. 26, no. 8, pp. 5475-5483, 2010.
- [13] P. T. N. Mai, "Adsorption characteristics of NO₃⁻ on amine grafted activated carbon using apptes," (in Vietnamese), *Tropical Science and Technology Journal*, vol. 37, pp. 120-132, 2024, [doi: 10.58334/vrtc.jtst.n37.11](https://doi.org/10.58334/vrtc.jtst.n37.11).
- [14] F. Rahmati, B. A. Lajayer, N. Shadfar, P. M. van Bodegom, and E. D. van Hullebusch, "A review on biotechnological approaches applied for marine hydrocarbon spills remediation," *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, 2022, Art. no. 1289.
- [15] P. Bhatt, K. Bhatt, Y. Huang, J. Li, S. Wu, and S. Chen, "Biofilm formation in xenobiotic-degrading microorganisms," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 43, no. 8, pp. 1129-1149, 2023.
- [16] T. N. C. Le, T. N. M. Cung, T. L. Do, K. H. Nguyen, T. T. U. Do, T. M. Tran, T. N. Vuong, and T. L. Quach, "Application of biofilm-forming microorganisms on carriers to remove oil pollution," (in Vietnamese), *VAST Conference*, 2025, pp. 226-231.

APPLICATION OF BIOFILM FORMING BACTERIA ON FINE SAWDUST AS A BIO-PRODUCT FOR TREATING OIL – CONTAMINATED WATER

Le Thi Nhi Cong^{1,2*}, Tran Thi Huyen Nga³, Cung Thi Ngoc Mai¹, Do Thi Lien¹, Nguyen Kieu Huong², Tran Thi Mai¹, Hoang Thi Phuong Hong⁴, Vuong Thi Nga¹, Quach Thi Lien¹

¹Institute of Biology – VAST, ²Graduate University of Science and Technology - VAST

³VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, ⁴College of Economics, Technology and Fisheries

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 05/02/2026</p> <p>Revised: 28/02/2026</p> <p>Published: 28/02/2026</p>	<p>Recently, the use of biofilm-forming bacteria on carriers to remove oil pollution has drawn increasing research interest. In this study, two biofilm-forming bacterial strains identified as <i>Bacillus</i> sp. B1 and <i>Rhodococcus</i> sp. B3 were isolated from the oil-contaminated samples taken from coastal zone in Thanh Hoa province. Both strains exhibited good growth in the presence of 250 ppm of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons consisting of anthracene, pyrene and phenanthrene; as well as 300 ppm diesel oil. The strains formed stable biofilm at temperatures ranging from 25 to 45 °C, NaCl concentrations from 0 to 2% and pH values among 3 and 8. A bio-product was subsequently prepared by immobilizing the selected strains onto fine sawdust as a carrier material. The product degraded > 85 and 82% of the total diesel oil and mixture aromatic hydrocarbons in wastewater with an initial concentration of 250 and 200 ppm after 7 day-incubation, respectively. The viable cell density of the bio-product was 21×10^7 and 5×10^7 CFU/g at the beginning and after 6 months of preservation. In addition, fine sawdust is an abundant, inexpensive and biodegradable raw material. These findings may lead to the potential application of this bio-product for the oil pollution treatment in Vietnam.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Biofilm</p> <p>Biodegradation</p> <p>Fermentation</p> <p>Oil pollution</p> <p>Sawdust</p>	

ỨNG DỤNG VI KHUẨN TẠO MÀNG SINH HỌC TRÊN MÙN CƯA DẠNG MỊN ĐỂ TẠO CHẾ PHẨM XỬ LÝ NƯỚC Ô NHIỄM DẦU

Lê Thị Nhi Công^{1,2*}, Trần Thị Huyền Nga³, Cung Thị Ngọc Mai¹, Đỗ Thị Liên¹, Nguyễn Kiều Hương², Trần Thị Mai¹, Hoàng Thị Phương Hồng⁴, Vương Thị Nga¹, Quách Thị Liên¹

¹Viện Sinh học - VAST, ²Học viện Khoa học và Công nghệ - VAST

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội, ⁴Trường Cao đẳng Kinh tế, Kỹ thuật và Thủy sản

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 05/02/2026</p> <p>Ngày hoàn thiện: 28/02/2026</p> <p>Ngày đăng: 28/02/2026</p>	<p>Việc sử dụng vi khuẩn tạo màng sinh học trên vật liệu mang để xử lý ô nhiễm dầu đã và đang được quan tâm nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, hai chủng vi khuẩn tạo màng gồm <i>Bacillus</i> sp. B1 và <i>Rhodococcus</i> sp. B3 đã được phân lập từ các mẫu nhiễm dầu lấy tại biển Thanh Hóa. Các chủng này có khả năng sinh trưởng tốt ở hỗn hợp hydrocarbon thơm gồm anthracene, pyrene và phenanthrene với nồng độ là 250 ppm; và 300 ppm dầu diesel. Các chủng này tạo màng tốt ở nhiệt độ 25 đến 45 °C, nồng độ NaCl từ 0 đến 2% và pH từ 3 đến 8. Tạo chế phẩm từ các chủng này trên chất mang mùn cưa dạng mịn, chế phẩm có khả năng phân hủy hơn 85 và 82% hàm lượng dầu tổng số và hỗn hợp hydrocarbon thơm có trong nước thải với nồng độ ban đầu tương ứng là 250 và 200 ppm sau bảy ngày thử nghiệm. Mật độ vi sinh vật của chế phẩm ở thời điểm ban đầu và sau sáu tháng bảo quản là 21×10^7 CFU/g và 5×10^7 CFU/g. Hơn thế nữa, nghiên cứu này còn đồng thời tận dụng được nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền và không gây ô nhiễm thứ cấp là mùn cưa. Kết quả mở ra tiềm năng ứng dụng của chế phẩm trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ tại Việt Nam.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Màng sinh học</p> <p>Phân hủy sinh học</p> <p>Lên men</p> <p>Ô nhiễm dầu</p> <p>Mùn cưa</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.14741>

* Corresponding author. Email: lenhicong@gmail.com; lenhicong@ib.ac.vn

1. Giới thiệu

Dầu mỏ và các sản phẩm từ dầu mỏ đóng vai trò vô cùng quan trọng trong đời sống xã hội và nền kinh tế của các nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. 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 [1]. Các hoạt động thông thường kèm theo việc khai thác và vận chuyển dầu gây ra tình trạng ô nhiễm nghiêm trọng do dầu. Ví dụ các tàu chở dầu làm thoát ra biển tới 0,7% tải trọng của chúng trong quá trình vận chuyển thông thường [1]. Sóng biển và gió đều có chiều hướng đưa lượng dầu thoát ra tấp vào bờ biển Việt Nam. Theo thống kê, từ năm 1992 đến nay có 190 sự cố tràn dầu xảy ra tại Việt Nam, trong đó có 37 vụ ngoài khơi chiếm 19%, 88 vụ ven bờ chiếm 47% và 65 vụ trên đất liền chiếm 34% [1]. Đây là nguyên nhân lớn gây ô nhiễm đất và nước. Theo thống kê của Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế, trong số 39 quốc gia được thống kê, Việt Nam là một trong 3 quốc gia (cùng với Trung Quốc và Hoa Kỳ) có số lượng sự cố tràn dầu nhiều nhất với số lượng từ 10 sự cố trở lên, trong 5 năm trở lại đây [1]. Đặc biệt, do sự phát triển của đô thị hóa, công nghiệp hóa và nhu cầu năng lượng ngày càng tăng, việc khắc phục và phục hồi môi trường tại các khu vực bị ô nhiễm dầu đang là một trong những vấn đề nhận được nhiều sự quan tâm và cần phương pháp hiệu quả an toàn để bảo tồn hệ sinh thái [2].

Trong số các giải pháp xử lý ô nhiễm dầu một cách hiệu quả và bền vững, việc sử dụng vi sinh vật tạo màng sinh học trên các vật liệu mang để tạo ra các chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu đã và đang được quan tâm nghiên cứu [3], [4]. Các vật liệu mang này có các cấu trúc rỗng và xốp, có vai trò là chất hấp phụ dầu và các thành phần của dầu. Nhờ đó, các vi sinh vật tạo màng sinh học tồn tại trên bề mặt của các vật liệu mang này sẽ dễ dàng tiếp cận với các chất gây ô nhiễm và nhanh chóng sử dụng các chất như nguồn carbon và năng lượng cho quá trình sinh trưởng của chúng [5]-[8]. Đây chính là điểm khác biệt với các sản phẩm hóa học và sinh học đang có trên thị trường. Một số vật liệu mang như than sinh học, sỏi nhẹ,... đã được sử dụng làm chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu [3], [8]. Tuy nhiên, than sinh học có nhược điểm về mặt thẩm mỹ khi sử dụng tại các kho xăng dầu; còn sỏi nhẹ gây khó khăn trong vận hành tại một số khu vực tự nhiên. Đồng thời, việc tìm kiếm các vật liệu mang sinh học mới luôn được chú trọng để gia tăng hiệu quả xử lý và giảm chi phí sản xuất.

Vì vậy, trong nghiên cứu này, mùn cưa đã được lựa chọn để làm chất mang cho các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học có khả năng phân hủy dầu. Từ đó tạo ra chế phẩm sinh học và thử nghiệm hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu của chế phẩm.

2. Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất và nước bị ô nhiễm dầu lấy ở một số vùng ven biển Thanh Hóa như cảng Nghi Sơn, xã Hoàng Thanh,...

Mùn cưa được thu mua từ cơ sở chế biến gỗ ở Hà Nội. Kích thước hạt từ 0,5-4 mm. Mùn cưa có đặc tính xốp, tỷ trọng thấp, dễ giữ ẩm và kháng mốc.

Môi trường Meat-Peptone-Agar (MPA): cao thịt: 5 (g/L), peptone: 10 (g/L), NaCl: 5 (g/L), pH 7. Môi trường MPA thạch thì bổ sung 18 g/L agar.

Môi trường khoáng Gost: KNO_3 : 3 (g/L), MgSO_4 : 0,4 (g/L), KH_2PO_4 : 0,3 (g/L), NaHPO_4 : 0,7 (g/L), NaCl: 1 (g/L), pH 7-7,2.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Lấy mẫu

Sử dụng các phương pháp thông thường để lấy các mẫu đất và nước ở những điểm bị ô nhiễm dầu theo TCVN 7538-6:2010 [9] và TCVN 663-1:2011[10]. Các mẫu này sẽ được bảo quản ở 4 °C nhằm phục vụ cho các công việc sau đó.

2.2.2. Nuôi cấy bằng phương pháp làm giàu

Các mẫu thu thập về sẽ được nuôi cấy trong môi trường muối khoáng có bổ sung 100 ppm dầu diesel hoặc 50 ppm hỗn hợp hydrocarbon thơm đa vòng (PAH) gồm anthracene, pyrene và phenanthrene [11].

2.2.3. Phân lập và tuyển chọn các chủng có khả năng phân hủy các thành phần dầu mỏ

Sau một thời gian nuôi cấy làm giàu các mẫu, các chủng vi khuẩn có trong các mẫu đó sẽ được phân lập trên các môi trường tương ứng để chọn ra các chủng có khả năng phân hủy dầu diesel (DO) hoặc PAH [11].

2.2.4. Phương pháp xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi sinh vật và xác định ảnh hưởng của một số điều kiện như pH, nhiệt độ, nồng độ NaCl lên khả năng tạo biofilm

Để đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập được, phương pháp [12] đã được sử dụng bằng cách đưa chủng nuôi cấy non vào môi trường MPA lỏng. Màng sinh học tạo thành sẽ được rửa bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và cố định bằng dung dịch tím tinh thể 0,1%. Màng hình thành này sẽ được rửa lại bằng dimethyl sulfoxide (DMSO) và đo ở bước sóng 570 nm. Các chủng có mật độ quang học cao sẽ được lựa chọn. Chủng *Acinetobacter calcoaceticus* P23 được cung cấp bởi GS. Morikawa (Đại học Hokkaido, Nhật Bản) đã được dùng làm đối chứng dương.

Các giá trị pH, nhiệt độ, nồng độ NaCl khác nhau đã được sử dụng để xác định ảnh hưởng của chúng lên khả năng tạo biofilm của các chủng phân lập được.

2.2.5. Phân loại vi khuẩn

Chủng vi khuẩn được định tên bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S. So sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn mục tiêu với trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn chuẩn trên Danh sách các tên gọi sinh vật nhân sơ có vị trí trong danh pháp (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - LPSN), dựa vào phần mềm Clustal X và Treeview để xây dựng cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn này [12].

2.2.6. Phương pháp tạo chế phẩm

Các vật liệu mang được khử trùng trước khi tiến hành cố định vi sinh vật chuyển hóa dầu. Các chủng vi sinh vật lựa chọn sẽ được nhân nuôi trong 500 ml môi trường MPA lỏng. Dịch nuôi cấy sau đó được ly tâm loại bỏ môi trường nuôi và được rửa 2 lần bằng nước cất. Tiến hành đo OD ở bước sóng 600 nm và đồng thời đếm mật độ tế bào để xây dựng đường chuẩn. Pha loãng dịch sinh khối vi khuẩn sao cho đạt mật độ tế bào là 10^8 CFU/ml và bổ sung mùn cưa vào. Ủ hỗn hợp sinh khối vi sinh vật và vật liệu mang ở $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ trong 5 ngày. Chế phẩm được lên men xộp ở các nhiệt độ và độ ẩm khác nhau thích hợp cho quá trình lên men xộp. Sau 5 ngày lên men, chế phẩm được sấy ở nhiệt độ 40°C để tạo chế phẩm [3].

2.2.7. Phương pháp đánh giá mật độ vi sinh vật

Mật độ tế bào vi sinh vật được xác định theo phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc CFU [12].

2.2.8. Đánh giá khả năng phân hủy dầu DO và các thành phần hydrocarbon thơm

Cân 10 g chế phẩm phù hợp vào 100 ml nước chứa 200 ppm hỗn hợp PAH hoặc 250 ppm dầu diesel vào bình tam giác 1000 ml. Đảo nhẹ rồi để tĩnh ở 30°C . Sau 7 ngày nuôi cấy, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào của màng sinh học tạo thành trên mùn cưa, chụp ảnh hiển vi điện tử quét. Lượng dầu DO trong các mẫu nước trước và sau xử lý được xác định bằng phương pháp phân tích khối lượng theo tiêu chuẩn TCVN 4582-88 [13]. Hàm lượng hydrocarbon thơm còn lại bằng phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Các thí nghiệm đối chứng bao gồm thí nghiệm chỉ sử dụng hỗn hợp nuôi 2 chủng vi khuẩn mà

không có chất mang và thí nghiệm chỉ sử dụng chất mang mà không có vi sinh vật.

2.2.9. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Mẫu nuôi cấy sẽ được chiết xuất ba lần bằng dung môi ethylacetat với tỷ lệ 1:1. Dịch chiết xuất sẽ được phân tích HPLC trên máy Hewlett-Packard (Bad Homburg, Germany). Nhờ hệ thống LiChroCart 125-4 RP-18 end-capped (5- μ m) column (Merck, Darmstadt, Germany), các sản phẩm của quá trình chuyển hoá các thành phần dầu mỏ sẽ được phân tách. Nồng độ dung môi chạy mẫu ban đầu gồm 30% methanol-70% phosphoric acid (0,1%), sau 14 phút thì đạt 100% methanol, tốc độ chảy 1 ml/phút. Tùy vào điều kiện cụ thể, các chương trình chạy để phân tích mẫu sẽ có những thay đổi cho phù hợp.

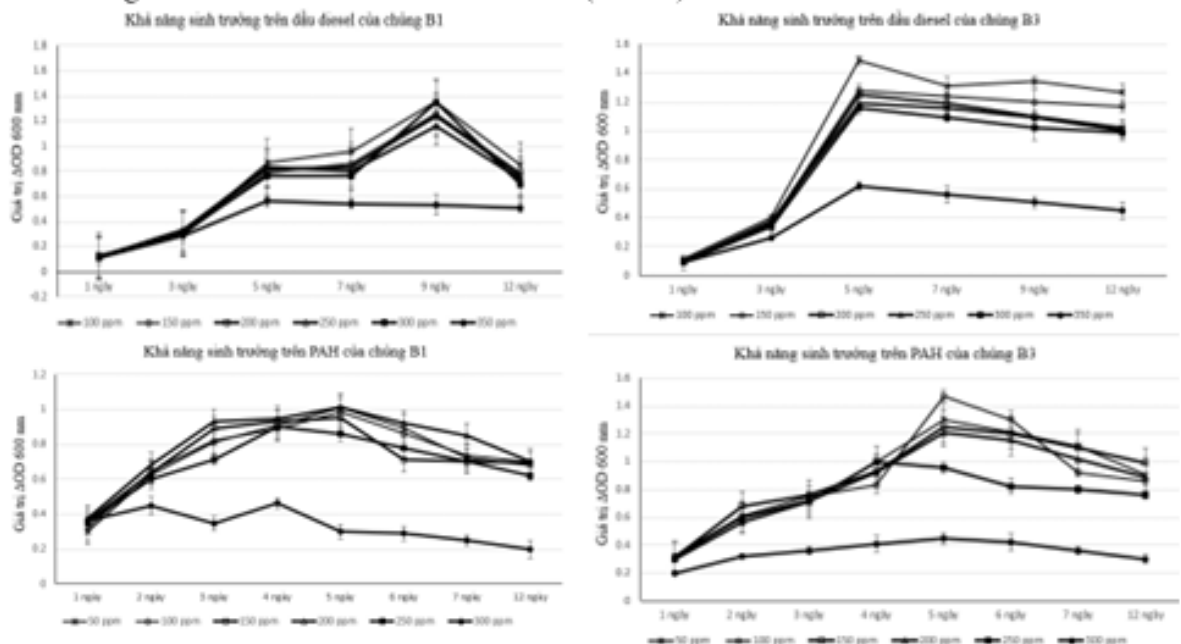
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả, số liệu thu được sẽ được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học. Dựa vào phần mềm Excel để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và vẽ đồ thị. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình mẫu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn DO hoặc PAH

Các mẫu đất và nước bị nhiễm dầu sau khi được lấy về đã được làm giàu 3 lần trên môi trường khoáng Gost có bổ sung các cơ chất khác nhau như 100 ppm DO, 50 ppm hỗn hợp PAH gồm anthracene, pyrene, phenanthrene. Kết quả, đã phân lập được chủng B1 và B3 có khả năng sinh trưởng tốt trên các cơ chất dầu DO và PAH (Hình 1).



Hình 1. Khả năng sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn B1 và B3 trên dầu diesel (DO) và PAH

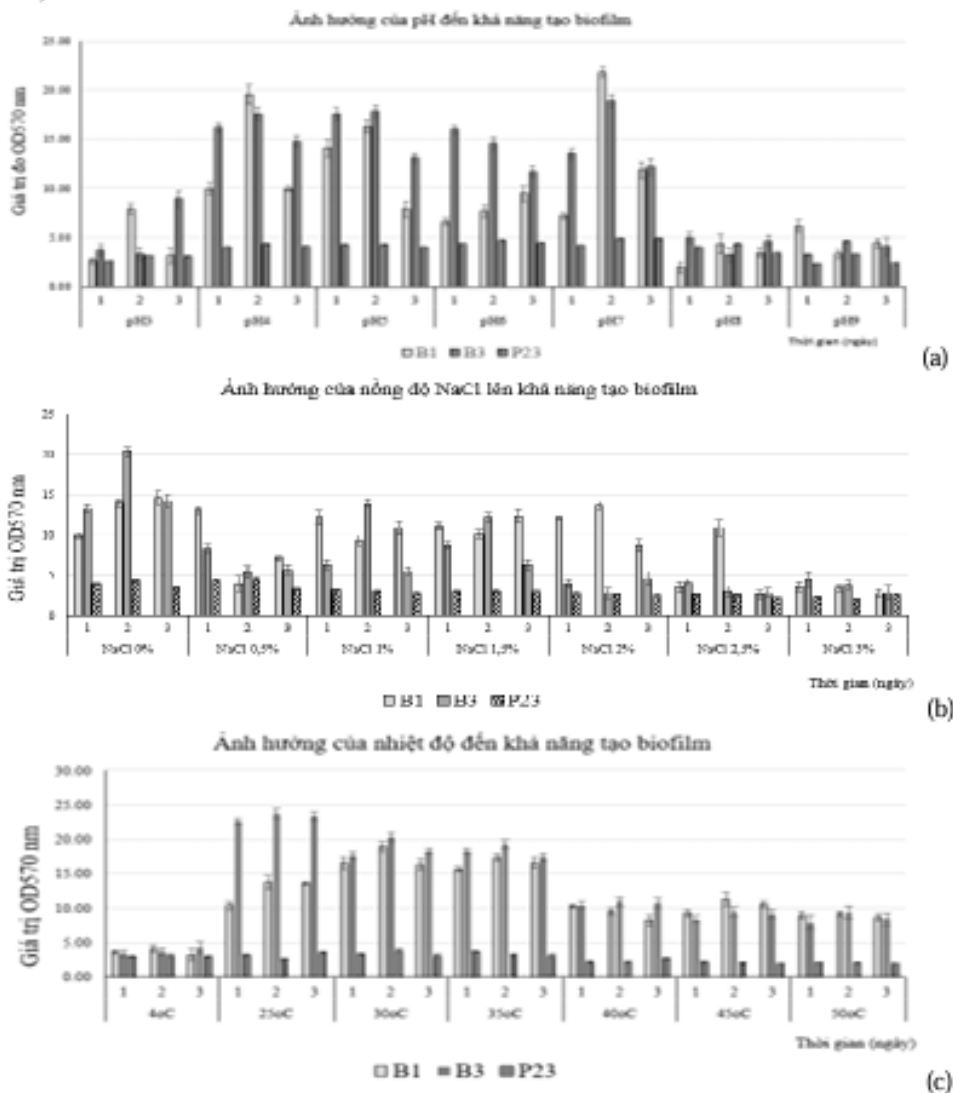
Tiếp tục thử nghiệm khả năng sinh trưởng của 2 chủng này trên DO và PAH với các nồng độ 100, 150, 200, 250, 300 và 350 ppm. Kết quả cho thấy, cả 2 chủng này có khả năng sinh trưởng tốt ở 250 ppm PAH; và 300 ppm DO (Hình 1). Do đó, để thử nghiệm các nghiên cứu tiếp theo, các nồng độ 200 ppm PAH và 250 ppm DO đã được sử dụng để đánh giá hiệu quả phân hủy. Các chủng này đã được sử dụng để nghiên cứu khả năng tạo biofilm và một số yếu tố ảnh hưởng tới khả năng này.

3.2. Khả năng tạo biofilm của các chủng vi sinh vật và xác định ảnh hưởng của một số điều kiện như pH, nhiệt độ, nồng độ NaCl lên khả năng tạo biofilm

Các giá trị pH từ 3 đến 9, nhiệt độ từ 4 đến 50 °C và nồng độ NaCl từ 0 đến 3% đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Màng sinh học tạo thành của các chủng được quan sát sau 1, 2 và 3 ngày. Kết quả được trình bày ở Hình 2 a, b và c.

Kết quả ở Hình 2a cho thấy, chủng B1 trong các thí nghiệm ở ngày thứ 2 đều có khả năng tạo màng sinh học tốt trong dải pH từ 3 đến 8. Ở giá trị pH 9 thì ngày đầu tiên biofilm tốt nhưng 2 ngày tiếp theo có sự suy giảm nhẹ. Nhìn chung, với giá trị pH từ 3 đến 8, cả 2 chủng này đều tạo biofilm tốt.

Tương tự như trên, dải nồng độ NaCl từ 0-3% đã được lựa chọn để nghiên cứu, nhằm mục đích tạo ra chế phẩm có thể ứng dụng được cả môi trường nước ngọt và nước mặn. Kết quả cho thấy, khi so sánh với đối chứng dương (chủng P23), các chủng có khả năng tạo biofilm tốt ở các giá trị NaCl từ 0-2%; và chủng B1 tạo màng tốt ở nồng độ 2,5% ở ngày thứ 2 (Hình 2b). Ngoài ra, cả 2 chủng B1 và B3 có khả năng tạo màng sinh học tốt ở phổ nhiệt độ khá rộng từ 25 đến 50 °C (Hình 2c).

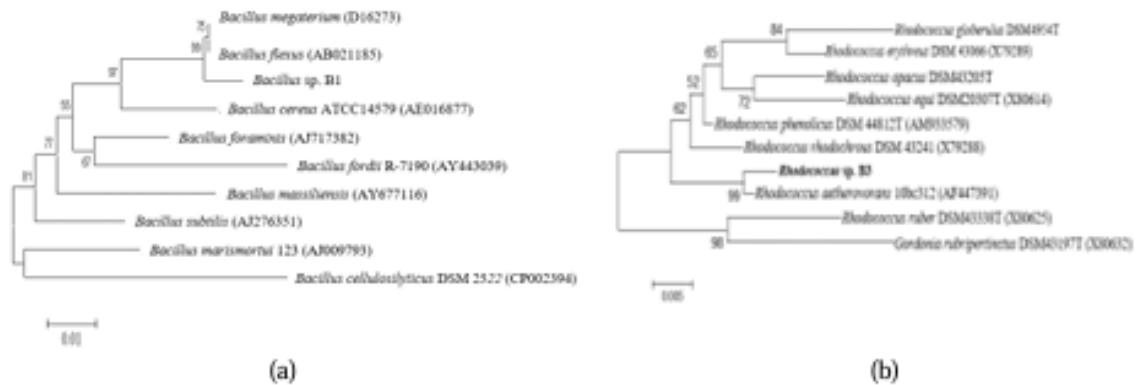


Hình 2. Ảnh hưởng của một số yếu tố như nhiệt độ (a); pH (b) và nồng độ NaCl (c) lên khả năng tạo biofilm của các chủng

Nghiên cứu [14] cũng cho thấy nồng độ muối, pH và nhiệt độ tác động lên sự hình thành màng sinh học của *L. monocytogenes*. Ở 37°C, lượng màng sinh học giảm dần ở hầu hết các chủng *L. monocytogenes* khi nồng độ NaCl tăng từ 0,05 đến 15%, nhưng tất cả các chủng đều có thể hình thành màng sinh học ngay cả ở 1°C. Không có sự khác biệt đáng kể nào về khả năng hình thành màng sinh học giữa pH 4, 5 và 6, ngoại trừ một số chủng. Khi thử nghiệm kết hợp các điều kiện stress, việc bổ sung 15% NaCl đã ức chế đáng kể sự phát triển của *L. monocytogenes* ở 1°C và 4°C, và các chủng hình thành màng sinh học yếu ít nhạy cảm hơn với nhiệt độ và xử lý NaCl so với các chủng hình thành màng sinh học mạnh. Bisht và cộng sự [15] cũng như Giacomucci và cộng sự [16] đã chứng minh nhiệt độ ảnh hưởng tới sự biểu hiện thực thể khuẩn của loài *Pseudomonas aeruginosa* tạo màng sinh học.

3.3. Phân loại định danh vi khuẩn

Hai chủng B1 và B3 đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hóa cho tiểu phần ribosome 16S. So sánh trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn mục tiêu với các chủng vi khuẩn chuẩn trên LPSN, dựa vào phần mềm Clustal X và Treeview. Kết quả 2 chủng đã được định danh là *Bacillus* sp. B1 và *Rhodococcus* sp. B3. (Hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của chủng B1 (a) và B3 (b)

Dựa trên kết quả phân loại và so sánh với các trình tự gene trên ngân hàng gene, kết quả cho thấy chủng B1 có độ tương đồng 99% so với chủng *Bacillus flexus* (AB021185), còn chủng B3 có độ tương đồng 99% so với chủng *Rhodococcus aetherovorans* 10bc312 (AF447391).

Các loài *Bacillus flexus* và *Rhodococcus aetherovorans* đã được công bố có khả năng phân hủy và chuyển hóa tốt các hợp chất khó phân hủy như polyvinyl chloride hay các hợp chất có chứa nhóm phenol [17], [18]. Bên cạnh đó, các chi *Bacillus* và *Rhodococcus* đều là những chi có khả năng phân hủy tốt các thành phần hydrocarbon có trong dầu mỏ [6].

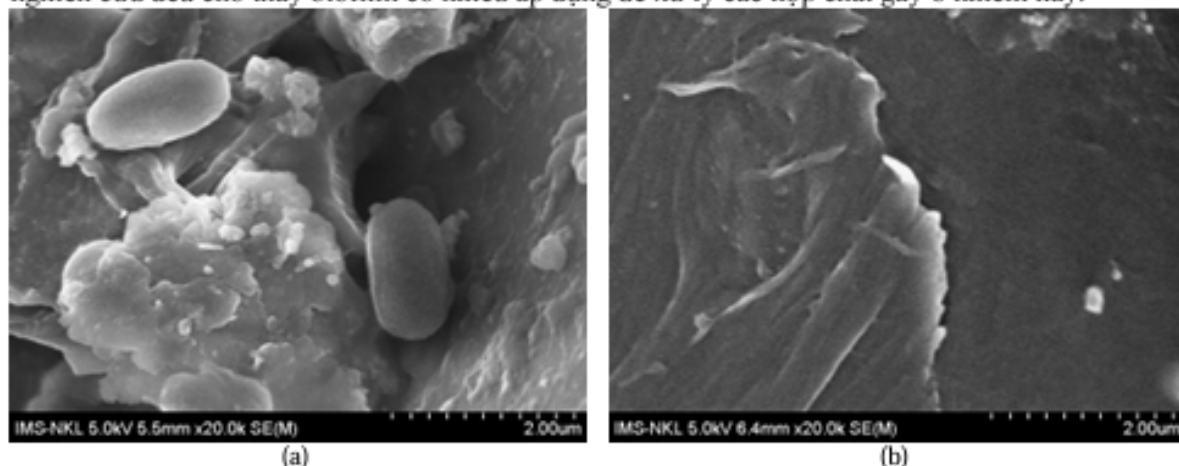
3.4. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm tạo thành

Việc sử dụng chất mang để tăng hiệu quả xử lý từ lâu đã được quan tâm ứng dụng. Các chủng này được lên men trên mùn cưa dạng mịn để tạo chế phẩm sinh học. Hình ảnh hiển vi điện tử quét của chế phẩm và của chất mang được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, trên vật liệu mang không xuất hiện hình ảnh của các chủng vi khuẩn (Hình 4a), còn trong chế phẩm, các tế bào vi khuẩn rất rõ nét và có mật độ cao.

Thử nghiệm chế phẩm với 200 ppm hỗn hợp PAH và 250 ppm DO. Sau 7 ngày, kết quả cho thấy chế phẩm có khả năng phân hủy > 85% hàm lượng dầu tổng số và 82% hỗn hợp PAH. Bên cạnh đó, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đã được ở thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản là 21×10^7 CFU/g và 5×10^7 CFU/g.

Dmitrieva và cộng sự [7] khi thử nghiệm biofilm từ loài *Alcinivorax borkumensis* để phân hủy hexadecane thì cũng thấy rằng 90% cơ chất đã bị xử lý sau 5 ngày thử nghiệm. Trong 1 nghiên cứu trước đó, nhóm tác giả này cũng chứng minh được biofilm của *Alcinivorax borkumensis* hình

thành trên hạt đất sét có khả năng phân hủy 90% hexadecane sau 6 ngày đánh giá. Bhatt và cộng sự [5] đã thử nghiệm tạo chế phẩm từ nấm men *Candida tropicalis* trên sỏi và cũng thấy hiệu quả xử lý dầu DO là 97% sau 10 ngày thí nghiệm. Chủng *Pseudomonas aeruginosa* LNRI cũng đã được chứng minh có khả năng chuyển hóa dầu DO tốt hơn khi ở dạng tạo màng sinh học. Chandran và Das [8] đã chứng minh biofilm từ chi *Rhodococcus* có khả năng oxy hóa các hợp chất hydrocarbon dầu mỏ tạo ra các chất bề mặt và acid humic do đó làm tăng cường khả năng phân hủy dầu của chúng. Juárez và cộng sự [18] đã tổng quan về ứng dụng của biofilm từ vi sinh vật trong xử lý các hóa chất độc hại và tiềm năng ứng dụng ở quy mô lớn trong thực tiễn. Các nghiên cứu đều cho thấy biofilm có nhiều áp dụng để xử lý các hợp chất gây ô nhiễm này.



Hình 4. Chế phẩm tạo thành dưới kính hiển vi điện tử quét (a) và chất mang (b)

Hơn thế nữa, trong nghiên cứu này còn sử dụng mùn cưa làm chất mang. Đây được xem là nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền và không gây ô nhiễm thứ cấp là mùn cưa. Vì vậy, chế phẩm có giá thành rẻ và hiệu quả cao. Đồng thời, việc sử dụng mùn cưa làm chất mang sẽ linh hoạt sử dụng ở các điều kiện địa hình khác nhau và không gây mất thẩm mỹ về mặt màu sắc. Kết quả mở ra tiềm năng ứng dụng của chế phẩm trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ tại các vùng ven biển, các kho xăng dầu,... ở Việt Nam.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tạo ra chế phẩm sinh học xử lý ô nhiễm dầu từ 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. B1 và *Rhodococcus* sp. B3 tạo màng sinh học trên mùn cưa. Các chủng này được phân lập từ mẫu ô nhiễm dầu lấy tại bờ biển Thanh Hóa và chúng có khả năng tạo biofilm tốt ở các điều kiện nhiệt độ, pH và nồng độ NaCl khác nhau. Chế phẩm tạo thành có mật độ vi sinh vật đạt 21×10^7 CFU/g và 5×10^7 CFU/g tại thời điểm ban đầu và sau 6 tháng bảo quản. Hiệu quả xử lý dầu DO và PAH của chế phẩm đạt tương ứng là hơn 85 và 82% sau 7 ngày thử nghiệm với các nồng độ cơ chất là 250 và 200 ppm. Trong thời gian tới, có thể thử nghiệm trên các mô hình trong và ngoài phòng thí nghiệm; cũng như có thể nghiên cứu để tăng thời gian bảo quản.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Dự án Sản xuất thử nghiệm mã số UDSXTN.02/2025-2026 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học, VAST.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. Q. Nguyen, D. T. Nguyen, and M. T. Ngo, "Assessing the impact of environmental pollution on marine biodiversity and proposing mitigation solutions," (in Vietnamese), *Environmental Journal*, vol. 4, pp. 30-33, 2022.

- [2] X. Chunyan, M. A. Qaria, X. Qi, and Z. Daochen, "The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects," *Science of the Total Environment*, vol. 865, 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.161112.
- [3] T. L. Tran, T. L. Do, T. N. M. Cung, T. D. Tran, P. M. Tran, and T. N. C. Le, "An initial study on oil pollution removal product using biofilm forming bacteria attached on husk biochar," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 21, no. 2, pp. 207-214, 2023.
- [4] R. Mahmoudkhani, A. M. Azar, A. Dehghani, and H. Ghoreishi, "Treatment of contaminated waters with petroleum by moving bed biofilm reactor (MBBR)," *Interational Conference on Life Science and Engineering*, vol. 45, pp. 12-16, 2012.
- [5] P. Bhatt, K Bhatt, Y. Huang, J. Li, S. Wu, and S. Chen, "Biofilm formation in xenobiotic-degrading microorganisms," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 43, no. 8, pp. 1129-1149, 2023.
- [6] M. Omarova, L. T. Swientoniewski, I. K. Mkam Tsengam, D. A. Blake, V. John, A. McCormick, *et al.*, "Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion," *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, vol. 7, no. 17, pp. 14490-14499, 2019.
- [7] D. Dmitrieva, V. I. Grinevich, and M. M. Gertsen, "Degradation of oil and petroleum products by biocompositions based on humic acids of peats and oil-degrading microorganisms," *Russian Journal of General Chemistry*, vol. 92, no. 12, pp. 2920-2930, 2022.
- [8] P. Chandran and N. Das, "Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels," *Biodegradation*, vol. 22, no. 6, pp. 1181-1189, 2011.
- [9] Vietnam Ministry of Science and Technology, *National Standard TCVN 7538-6:2010 – Sampling, collection, processing and preservation of soil sample*, 2010.
- [10] Vietnam Ministry of Science and Technology, *National Standard TCVN 663-1:2011 – Sampling and collection of water sample*, 2011.
- [11] T. N. M. Cung, T. T. D. Thai, V. B. Nguyen, T. T. H. Nguyen, and N. M. Nghiem, "Taxonomy of th bacterial strain BTLP1 can degrade phenol by analysing the nucleotit sequence of the 16S rRNA gene," (in Vietnamese), *Journal of Science and Technology*, vol. 50, no. 1, 2012, doi: 10.15625/0866-708X/50/1/9467.
- [12] T. M. Tran, T. N. M. Cung, T. L. Do, T. D. Tran, H. A. Nguyen, and T. N. C. Le, "Degradation of hydrocarbon components by biofilm-forming *Rhizobium* sp. DG2 isolated from petroleum storage tank in Ducgiang, Hanoi," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 252-260, 2024.
- [13] Vietnam Ministry of Science and Technology, *National Standard TCVN 4582-88 – Waste wate – Method for the determination of oil and grease content*, 1988.
- [14] S. Labidi, A. Jánosity, A. Yakdhane, E. Yakdhane, B. Surányi, C. Mohácsi-Farkas, and G. Kiskó, "Effects of pH, sodium chloride, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* biofilms," *Acta Alimentaria*, vol. 52, no. 2, pp. 270-280, 2023.
- [15] K. Bisht, J. L. Moore, R. M. Caprioli, E. P. Skaar, and C. A. Wakeman, "Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation," *npj Biofilms and Microbiomes*, vol. 7, no. 1, 2021, Art. no. 22.
- [16] L. Giacomucci, N. Raddadi, M. Soccio, N. Lotti, and F. Fava, "Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*," *New Biotechnology*, vol. 52, pp. 35-41, 2019.
- [17] T. Nogina, M. Fomina, T. Dumanskaya, L. Zelena, L. Khomenko, S. Mikhalovsky, *et al.*, "A new *Rhodococcus aetherivorans* strain isolated from lubricant-contaminated soil as a prospective phenol-biodegrading agent," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, no. 8, pp. 3611-3625, 2020.
- [18] K Juárez, L. Reza, L. Bretón-Deval, D. Morales-Guzmán, M. R. Trejo-Hernández, F. García-Guevara, and P. Lara, "Microaerobic degradation of crude oil and long chain alkanes by a new *Rhodococcus* strain from Gulf of Mexico," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 39, no. 10, 2023, Art. no. 264.

Số 256 - QĐ/HVKHCN

Hà Nội, ngày 20 tháng 5 năm 2026

QUYẾT ĐỊNH
về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

- Căn cứ Quyết định số 175-QĐ/VHLKHCNVN ngày 28/4/2026 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;
- Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
- Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;
- Căn cứ Quyết định số 724/QĐ-HVKHCN ngày 28/06/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học khóa 2024A - Đợt 1 năm 2024;
- Căn cứ Quyết định số 1013/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

- Xét đề nghị của Trưởng khoa Sinh học, Trưởng phòng Đào tạo,

GIÁM ĐỐC HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
QUYẾT ĐỊNH

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Nguyễn Kiều Hương với đề tài: “Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa”

Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký và phải đảm bảo thời hạn đào tạo theo quy định của Học viện. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng khoa Sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *Jr*

Nơi nhận:

- Như Điều 3,
- Lưu hồ sơ học viên,
- Lưu: VT, ĐT, MT.07.

GIÁM ĐỐC

Hoàng Anh Sơn
PGS.TS. Hoàng Anh Sơn

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 256 - QĐ/HVKHCN ngày 20/5/2026
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)



Cho luận văn của học viên: Nguyễn Kiều Hương

Tên đề tài: Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: PGS.TS. Lê Thị Nhi Công

- Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	PGS.TS. Phí Quyết Tiến	Công nghệ sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	PGS.TS. Lê Thanh Sơn	Hóa lý vật liệu môi trường	Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Nguyễn Quang Huy	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội	Phản biện 2
4.	TS. Đinh Thị Thu Hằng	Hóa sinh học	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh	Hóa sinh học	Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên

Hội đồng gồm 05 thành viên. *Jé*

*

Hà Nội, ngày 8 tháng 6 năm 2026

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số 256 - QĐ/HVKHCN ngày 20/5/2026 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Nguyễn Kiều Hương

Tên đề tài: Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 8/6/2026 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| 1. PGS.TS. Phí Quyết Tiến | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Đinh Thị Thu Hằng | Thư ký hội đồng |
| 3. PGS.TS. Lê Thanh Sơn | Phản biện 1 |
| 4. PGS.TS. Nguyễn Quang Huy | Phản biện 2 |
| 5. TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh | Ủy viên hội đồng |

Thành viên vắng mặt:0/5..... (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lý lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1: PGS. TS. Lê Thanh Sơn

Đã... đọc... đề... thi... chưa... phân... viết... cần... nghiên... trong... bằng...
...chuyên... báo... các... kỹ... thuật... người... khoa... học... và... viết... câu...
...chuyên... các... viết... viết... Mục... 1... 2... sử... dụng... tài... liệu... quá... cũ... cần... cập...
...nhất... thời... gian... các... chuyên... và... phân... tích... tài... liệu... là... cơ... chế...
...cần... thể... hiện... rõ... mẫu... mẫu... thực... nghiệm... người... viết... viết...
...của... học... viết... cần... chỉ... rõ... khoa... học... thực... nghiệm... viết... người... tài...
Đã... tổng... kết... luận... thông... tin... về... chế... tạo... chế... phẩm... Bài... báo... lại... lưu...
chọn... ngày... 08/06/2026

Điểm trung bình: 8,8
Điểm thưởng công trình công bố: 0,7
Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9,5

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận văn Đạt (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:

Đề tài không trùng lặp với các nghiên cứu trong và ngoài nước

.....
.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

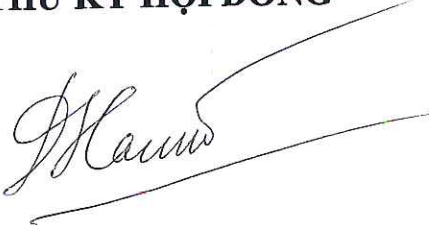
... Luận văn có chất lượng tốt, cấp xuất sắc thêm một số thông tin trong Tổng quan, hình thức bày chi tiết hơn các phương pháp thu luận kết quả nghiên cứu. Nội lược bỏ bài báo công bố tháng 08/2015 vì trùng thời điểm công bố trên tạp chí cao học nội dung về hình thức thu thập yêu cầu các luận văn thạc sĩ sinh học thực nghiệm


Buổi họp đã kết thúc vào 16 giờ 30 phút, ngày 08/06/2026

Hà Nội, ngày 08 tháng 06 năm 2026

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG




Phùng Quyết Tâm

Đinh Chi Lưu Hằng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC




Nguyễn Thị Trung

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Lê Thanh Sơn Học hàm, học vị: PGS.TS
Chức danh trong Hội đồng: Ủy viên phản biện
Cơ quan công tác: Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam
Họ và tên học viên: Nguyễn Kiều Hương
Tên đề tài: Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa.
Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Ô nhiễm dầu trong môi trường nước là một trong những vấn đề môi trường nhức nhối hiện nay ở các quốc gia ven biển, trong đó có Việt Nam bởi các sự cố tràn dầu, rò rỉ từ đường ống, giàn khoan và rơi vãi trong vận chuyển,.. diễn ra khá thường xuyên và gây ra những hậu quả nghiêm trọng về môi trường, hệ sinh thái dưới nước. Dầu tạo lớp màng trên mặt nước, ngăn cản quá trình trao đổi oxy, dẫn đến thiếu oxy nghiêm trọng, gây chết hàng loạt cá, tôm, sinh vật phù du và phá hủy hệ sinh thái thủy sinh. Các hợp chất hydrocarbon độc hại thấm sâu vào trầm tích đáy, tồn dư lâu dài, tích tụ trong chuỗi thức ăn, gây rối loạn sinh sản, ung thư và tử vong ở sinh vật biển. Tại Việt Nam, với bờ biển dài và hệ thống sông ngòi chằng chịt, ô nhiễm dầu đang đe dọa nghiêm trọng đa dạng sinh học, ngành thủy sản và du lịch biển. Vì vậy, nghiên cứu công nghệ xử lý và làm sạch dầu tràn hiệu quả bằng các công nghệ thân thiện với môi trường như sử dụng chế phẩm vi sinh vật trên nền các phụ phẩm nông nghiệp là hết sức cấp thiết.

Những phân tích trên cho thấy đề tài luận văn có tính cấp thiết, có tính thời sự cao, mang nhiều ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài luận văn không trùng lặp với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước. Việc trích dẫn tài liệu tham khảo là trung thực, rõ ràng và tương đối đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với ngành và mã số đào tạo:

Nội dung nghiên cứu phù hợp với tên đề tài và phù hợp với mã ngành sinh học thực nghiệm 8 42 01 14.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Đề tài luận văn sử dụng các phương pháp như: nuôi cấy làm giàu mật độ vi sinh vật, phân lập và sàng lọc chủng vi sinh vật, phân loại định tên các chủng vi khuẩn, phương pháp xác định mật độ vi khuẩn, các phương pháp phân tích đặc trưng hóa, lý của vật liệu như tán xạ năng lượng tia X, xác định diện tích bề mặt vật liệu BET, nhiễu xạ tia X, SEM, phân tích bằng HPLC, GC-MS, phương pháp thực nghiệm, xử lý số liệu thống kê,... Đây đều là các phương pháp nghiên cứu và kĩ thuật hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận văn, do đó kết quả đạt được có độ tin cậy, độ chính xác cao.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Đề tài luận văn đã đạt được một số kết quả quan trọng sau:

- Đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *Bacillus sp.* B1 và *Rhodococcus sp.* B3 từ môi trường bản địa tại vùng biển Thanh Hóa có khả năng phân giải dầu diesel và hỗn hợp các hydrocarbon thơm với hiệu suất cao và khả năng tạo màng sinh học trên vật liệu mùn cưa thô và mịn.

- Đã đánh giá được sự ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl đến khả năng tạo màng sinh học của 2 chủng này từ đó chế tạo thành công chế phẩm sinh học có khả năng xử lý dầu.

- Đã đánh giá được khả năng xử lý dầu trong nước của chế phẩm trên mẫu nước thải giả lập có nồng độ dầu DO 250 ppm và PAH 200 ppm. Sau 7 ngày, với tỷ lệ chế phẩm 10%, 80% dầu DO và khoảng 82% PAH đã được xử lý.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Về hình thức: bố trí lại các đồ thị, hình ảnh ở vị trí phù hợp, tránh các đồ thị bị dàn sang 2 trang hoặc để quá nhiều khoảng trắng hoặc đồ thị kết quả ở quá xa các đoạn text nhận xét về kết quả liên quan đến đồ thị. Chính xác hóa lại các công thức, đại lượng có chỉ số trên, dưới (ví dụ như m^3).

Về nội dung:

- rà soát, chỉnh sửa lỗi diễn đạt câu, thuật ngữ khoa học chưa chính xác ở một số chỗ (chi tiết xem trong luận văn).

- Bảng danh mục chữ viết tắt: bổ sung các chữ viết tắt còn thiếu. Chuẩn hóa lại thuật ngữ của chữ viết tắt HPLC.

- Chương 1- Tổng quan: số liệu về hiện trạng ô nhiễm dầu tại Việt Nam (mục 1.1.2) sử dụng số liệu quá cũ, cần cập nhật các số liệu mới hơn.

+ Bổ sung tổng quan về các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy dầu, cơ chế phân hủy dầu và tạo màng sinh học của các chủng này.

- Chương 2:

+ Tên Viện Hàn lâm viết sai, cần chỉnh sửa lại.

+ Cần thống nhất lại là các chủng vi khuẩn sử dụng trong đề tài luận văn là chủng được học viên tự phân lập từ môi trường bản địa hay các chủng được tuyển chọn từ nguồn lưu trữ vi khuẩn của Viện Sinh học ?

+ Đối tượng nghiên cứu: bổ sung thêm nước thải chưa dầu DO và PAH.; Cần chỉ rõ là mẫu nước thực hay mẫu nước mô phỏng.

+ Các hóa chất sử dụng nên có độ tinh khiết đi kèm hoặc nguồn gốc xuất xứ. Nên lược bỏ các dụng cụ thí nghiệm cơ bản như ống đong, pipette,...

+ Mục 2.3.1 lấy mẫu cần chỉ rõ khu vực lấy mẫu đất và nước để phân lập chủng vi khuẩn phân hủy được dầu.

+ Nhìn chung các phương pháp bố trí thực nghiệm và một số phương pháp nghiên cứu quan trọng như phân lập, tuyển chọn, xác định khả năng tạo biofilm, phương pháp tạo chế phẩm, phương pháp xác định mật độ vi khuẩn,... nên có mô tả chi tiết, ngắn gọn thay vì chỉ nêu là làm theo phương pháp A, B, C của tác giả X, Y, Z.

+ Bổ sung mô tả thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý dầu bằng chế phẩm chế tạo được.

+ Chỉ rõ 'giá trị ΔOD 600 nm được đo bằng phương pháp, thiết bị nào, cách tính như thế nào.

- Chương 3:

+ Không nên mô tả, phân tích lại kết quả nghiên cứu của các tác giả khác giống như phần tổng quan, mà nên lồng ghép vào để giải thích, biện luận kết quả đạt được hoặc so sánh kết quả đạt được với kết quả của các tác giả khác.

+ Một số chỗ giải thích nên có trích dẫn nguồn (chi tiết xem luận văn).

+ Bổ sung kết quả về việc tạo chế phẩm xử lý dầu, kết quả đánh giá mức độ đối kháng của các chủng B1, B3 khi sử dụng cùng lúc.

+ Luận giải lý do chọn nồng độ PAH 200 ppm và DO 250 ppm trong mẫu nước thải giả lập.

- Câu hỏi đối với học viên:

+ Trong QCVN 08:2023/BTNMT về chất lượng nước mặt hay QCVN 10:2023/BTNMT về Chất lượng nước biển, những thông số nào thể hiện mức độ ô nhiễm dầu trong nước.

+ Chế phẩm này có thể xử lý nước đạt các quy chuẩn trên hay không ?

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Kết quả của luận văn đã được công bố trong 2 bài báo đăng trên tạp chí Khoa học và Công nghệ của Đại học Thái Nguyên.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Luận án này hoàn toàn đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ và luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ của Học viện Khoa học và Công nghệ.

Hà Nội, ngày 27 tháng 05 năm 2026

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



Lê Thanh Sơn

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ tên người nhận xét: PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2

Cơ quan công tác: Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Họ tên học viên: **Nguyễn Kiều Hương**

Tên đề tài: Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa

Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số 8420114

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Ô nhiễm dầu đã, đang và sẽ luôn là vấn đề cần giải quyết khi tình hình ô nhiễm với các sự cố trong khai thác, vận chuyển, tồn trữ và sử dụng. Ô nhiễm dầu gây ra nhiều tác động sâu rộng tới các hệ sinh thái cả môi trường đất liền lẫn thuỷ vực với hậu quả có thể kéo dài trong nhiều năm. Các biện pháp cơ học và hoá học giúp xử lý nhanh việc ô nhiễm nhưng phụ thuộc vào điều kiện triển khai khi xử lý và có nguy cơ tạo ra ô nhiễm thứ phát. Xử lý sinh học được quan tâm như hướng đi bền vững dựa trên khả năng phân giải hydrocacbon của vi sinh vật.

Trong số các kĩ thuật sinh học được áp dụng trong xử lý ô nhiễm dầu, hướng nghiên cứu đối với các vi khuẩn tạo màng sinh học (biofilm) được chú ý vì giúp tăng khả năng bám dính, duy trì sinh khối và khả năng chống chịu các yếu tố môi trường. Để áp dụng thực tế ngoài việc có chủng vi khuẩn có hoạt tính mạnh việc lựa chọn vật liệu mang phù hợp sẽ góp phần nâng cao hiệu quả xử lý. Ở Việt Nam, mùn cưa là phụ phẩm sẵn có, giá rẻ và có cấu trúc xốp phù hợp cho vi sinh vật hình thành biofilm nhưng chưa được nghiên cứu ứng dụng trong xử lý ô nhiễm nói chung và ô nhiễm dầu nói riêng.

Đề tài luận văn với mục đích tạo và đánh giá hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu của chế phẩm sinh học được tạo ra bằng cách cố định vi khuẩn phân giải dầu và hình thành biofilm trên mùn cưa là đề tài không chỉ có tính khoa học mà còn có ý nghĩa ứng dụng thực tiễn cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ khi trích dẫn tài liệu tham khảo:

Đề tài nghiên cứu không trùng lặp với các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước. Các trích dẫn tài liệu trong các nội dung nghiên cứu, thảo luận kết quả đều rõ ràng, trích dẫn có trong danh mục tài liệu tham khảo đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài luận văn và mục tiêu nghiên cứu là phù hợp với chuyên ngành Sinh học thực nghiệm

Các nội dung nghiên cứu về (i) phân lập, đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật phân huỷ hydrocarbon và tạo biofilm; (ii) thử nghiệm vật liệu mang mùn cưa cho việc tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu là hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Để hoàn thành luận văn, học viên đã sử dụng các chủng vi khuẩn từ nguồn lưu trữ của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học; Các vật liệu khác như mùn cưa được mô tả khá rõ ràng về tiêu chuẩn, kích thước.

Các phương pháp nghiên cứu đánh giá chung là có tính chính xác và tin cậy cao, đảm bảo độ lặp lại và được thực hiện trên các thiết bị phù hợp. Các phương pháp nghiên cứu được trích dẫn khá đầy đủ và hoàn toàn phù hợp cho việc thực hiện các nội dung nghiên cứu đề tài. Các phương pháp được chia thành các nhóm chính: (i) Phương pháp vi sinh bao gồm phân lập sàng lọc các chủng phân huỷ hydrocarbon và xác định khả năng tạo biofilm trong các điều kiện môi trường khác nhau; (ii) Các phương pháp tạo, đánh giá và xác định thành phần có trong chế phẩm bằng các kỹ thuật vật lý; (iii) phương pháp đánh giá hiệu quả chế phẩm.

Các các kết quả được xử lý thống kê còn đảm bảo độ chính xác, tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã phân lập, tuyển chọn 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp B1 và *Rhodococcus* sp B3 có hoạt tính phân giải hydrocacbon thơm và có khả năng tạo biofilm. Các chủng đều được giải trình tự 16S RNA, đánh giá tối ưu khả năng tạo màng và thử nghiệm khả năng đối kháng.

- Đánh giá được cấu trúc, thành phần nguyên tố chính của mùn cưa để làm vật liệu mang. Chế tạo được 2 chế phẩm và thử nghiệm sau 7 ngày bổ sung với lượng 10% chế phẩm với các điều kiện cụ thể cho thấy đã xử lý được 85% đối với dầu DO và 82% với PAH với nhiều nhóm hợp chất thơm giảm đáng kể.

Các kết quả nghiên cứu đáp ứng được mục tiêu, nội dung đề ra của luận văn. Các kết quả thu nhận là phong phú được thể hiện qua các bảng, hình rõ ràng. Các kết quả cũng có bàn luận so sánh với các nghiên cứu trong và ngoài nước thể hiện được tính mới và hiệu quả xử lý ô nhiễm trong nghiên cứu.

6. Những hạn chế, thiết sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Tổng quan nên giảm bớt phần về hiện trạng ô nhiễm dầu trên thế giới và Việt Nam mà nên có thêm cơ chế phân giải và tạo màng biofilm từ các chủng vi sinh vật và ứng dụng các sản phẩm với hiệu quả.

- Phương pháp tạo chế phẩm cần làm rõ hơn. Nếu phân lập từ mẫu tự nhiên nên mô tả kỹ hơn về vị trí, địa điểm và cách thức thu nhận mẫu.

- Kết quả nghiên cứu cần làm rõ phân lập và tuyển chọn được bao nhiêu chủng trước khi chọn 2 chủng B1 và B3. Làm rõ hơn các nghiên cứu để tạo ra được chế phẩm (tỷ lệ phối trộn, cách thức...) mặc dù trong bài báo đã được mô tả. Một số hình cần bổ bớt phần tiêu đề.

- Kết luận còn dài mang tính liệt kê các kết quả.

- Học viên có nghĩ đến việc kết hợp với các chủng khác trong bộ sưu tập của Phòng để tạo ra chế phẩm tốt hơn từ việc sử dụng nhiều chủng hơn không?

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Học viên Nguyễn Kiều Hương đã có 02 công bố với nhóm nghiên cứu trên tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên (tạp chí trong danh mục của Hội đồng Giáo sư nhà nước ngành Sinh học). Các kết quả trong bài báo đều có liên quan đến kết quả luận văn.

8. Kết luận chung:

Luận văn Thạc sĩ của học viên Nguyễn Kiều Hương đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ và luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ.

Hà Nội, ngày 23 tháng 5 năm 2026

Người nhận xét



PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: NGUYỄN KIỀU HƯƠNG Lớp: BIO2024A

Tên đề tài luận văn: “Nghiên cứu tạo chế phẩm xử lý ô nhiễm dầu từ vi khuẩn tạo màng sinh học trên mùn cưa”

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Lê Thị Nhi Công

Ngày bảo vệ luận văn: 08/06/2026

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Viết lại nội dung phần 1.1.2. Hiện trạng ô nhiễm dầu tại Việt Nam bằng các số liệu cập nhật mới hơn.	Đã viết lại hoàn toàn nội dung phần bằng số liệu mới nhất.
2	Phần "Phương pháp" cần làm rõ hơn	Đã nêu chi tiết từng phương pháp ở nội dung của 2.3. Phương pháp nghiên cứu, có mô tả thêm trong Phụ lục 1
3	Chỉ rõ "giá trị ΔOD_{600nm} được đo bằng phương pháp, thiết bị nào, cách tính như thế nào?	Đã thêm vào phần "2.3.2.1. Phương pháp xác định khả năng tạo biofilm của các chủng vi sinh vật" trong Phụ lục 1



4	Về hình thức: bố trí lại các đồ thị, hình ảnh, tránh khoảng trắng. Chính xác hóa lại các công thức, chỉ số trên dưới.	Đã sửa cho hợp lý, chính xác
5	Danh mục chữ viết tắt chưa đầy đủ	Đã thêm đầy đủ Danh mục chữ viết tắt
6	Rà soát, chỉnh sửa lỗi diễn đạt câu, thuật ngữ khoa học	Đã sửa lại cách diễn đạt cho trau chuốt và khoa học hơn
7	Thống nhất lại các chủng vi khuẩn sử dụng trong luận văn là chủng được phân lập từ môi trường bản địa hay các chủng được tuyển chọn từ nguồn lưu trữ vi khuẩn của Viện Sinh học	Các chủng vi khuẩn sử dụng trong luận văn là chủng được phân lập từ môi trường bản địa. Đề xuất hướng nghiên cứu tiếp theo, có thể sử dụng các chủng từ nguồn lưu trữ vi khuẩn của Viện Sinh học, nghiên cứu sự kết hợp giữa các chủng để tạo chế phẩm đạt hiệu quả xử lý dầu cao hơn
8	Đối tượng nghiên cứu bổ sung thêm nước thải chứa dầu DO và PAH	Đã bổ sung
9	Luận giải lý do chọn nồng độ PAH 200ppm và DO 250ppm trong mẫu nước thải	Đã bổ sung lý giải
10	Kết luận còn dài, mang tính liệt kê các kết quả	Đã viết lại kết quả ngắn gọn
11	Nên đánh giá khả năng sống sót của vi khuẩn phân lập được ở các nồng độ NaCl khác nhau	Đề xuất hướng nghiên cứu tiếp theo ở các nồng độ NaCl cao hơn
12	Xem lại một số thuật ngữ khoa học cho chính xác	Chuẩn hóa lại thuật ngữ của HPLC
13	Làm rõ hơn các nghiên cứu để tạo ra được chế phẩm, mặc dù trong bài báo đã được mô tả	Đề xuất hướng nghiên cứu tiếp theo về tỉ lệ, cách thức... để phối trộn các chủng để hiệu quả xử lý của chế phẩm tốt hơn

G S Á N V
 Đ C VI Ệ
 O A H C
 T O N G N
 H O C V A

Học viên Nguyễn Kiều Hương chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ đã góp ý và tạo cơ hội cho học viên hoàn thiện luận văn của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Hà Nội, ngày 15 tháng 06 năm 2026

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN

Phụ
Quyết
Trần

Lê Thị Nhi Công

Lê Thị Nhi Công

Nguyễn Kiều Hương

Nguyễn Kiều Hương

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO
KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

