

# 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 TRÁU

Trần Thị Lương<sup>1</sup>, Đỗ Thị Liên<sup>2</sup>, Cung Thị Ngọc Mai<sup>2</sup>,  
Trần Thị Đào<sup>3</sup>, Trần Phương Minh<sup>4</sup>, Lê Thị Nhi Công<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>4</sup>Trường PTTH Chuyên Khoa học Tự nhiên, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

\*Tác giả liên hệ: lenhicong@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 01.02.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.03.2023

## TÓM TẮT

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thế giới, ngành công nghiệp

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

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

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

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

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

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

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

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

Biochar từ trấu có màu đen, kích thước:  $1 \times 3 \times 0,5$  (mm), độ ẩm dưới 10%, được nhiệt hóa ở nhiệt độ 480-530°C, có diện tích bề mặt đặc hiệu là 1,5 m<sup>2</sup>/g, hàm lượng tro 42% và một lượng lớn các nhóm C-O, ví dụ phenolic, hydroxyl và các gốc ether.

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

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

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

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

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

Chuẩn bị đĩa petri và môi trường MPA thạch, tiến hành cấy các chủng giống lên đĩa petri sao cho chúng 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 (Nguyễn Lân Dũng, 1981).

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

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

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

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

Độ ẩm của chế phẩm được xác định như sau:

$$V1 = C2 - C1$$

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

$$V2 = C1 - \text{trọng lượng đĩa}$$

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

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

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

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

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

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

Cụ thể như sau:

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

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

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

Mỗi thí nghiệm đều được lắ lại 3 lần.

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

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

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

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

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

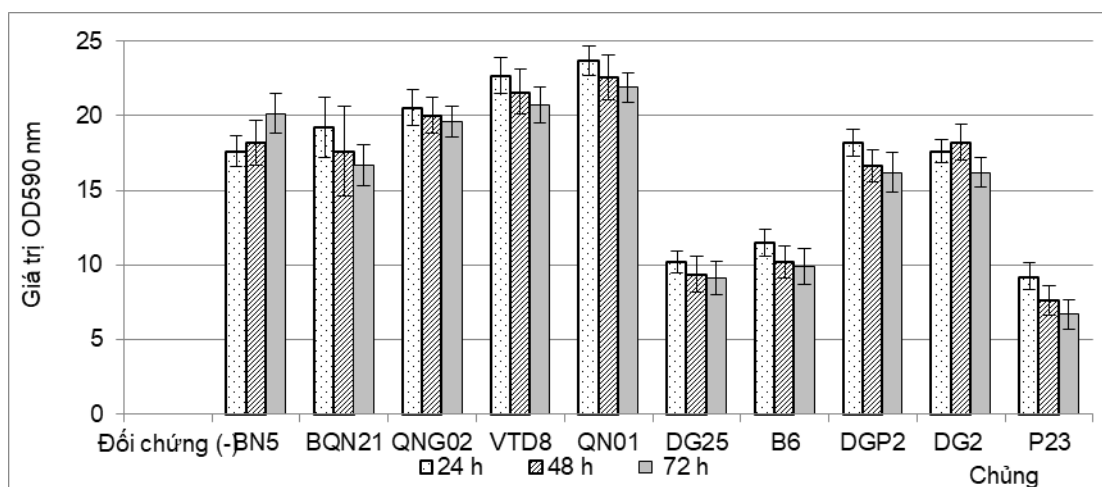
#### 3.1. Khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn

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

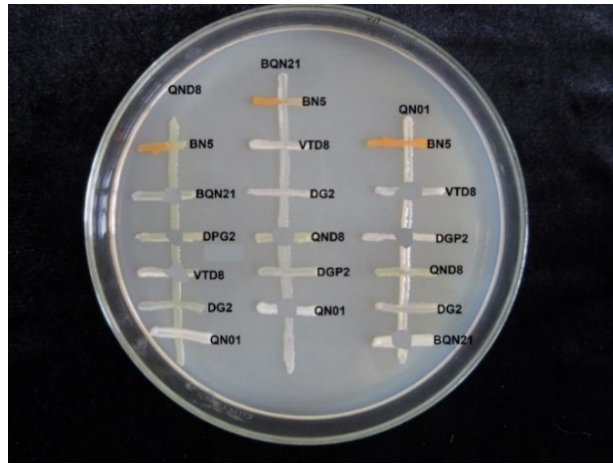
Kết quả trên hình 1 cho thấy, so với chủng đối chứng dương *Acinetobacter calcoaceticus* P23, cả 9 chủng lựa chọn đều có khả năng tạo màng tốt hơn. Đặc biệt, sau 72h, khả năng tạo màng sinh học của chủng *Rhodococcus* BN5 không bị giảm, trong khi màng sinh học của các chủng còn lại và chủng P23 đều giảm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

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

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



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

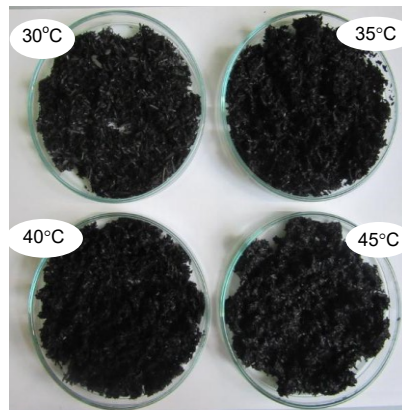


Hình 2. Sự đối kháng nhau của các chủng vi sinh vật lựa chọn

Bảng 1. Tính đối kháng của 7 chủng vi khuẩn

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

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



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

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

#### 3.3.1. Lên men ở các nhiệt độ khác nhau

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

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

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

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

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

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

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

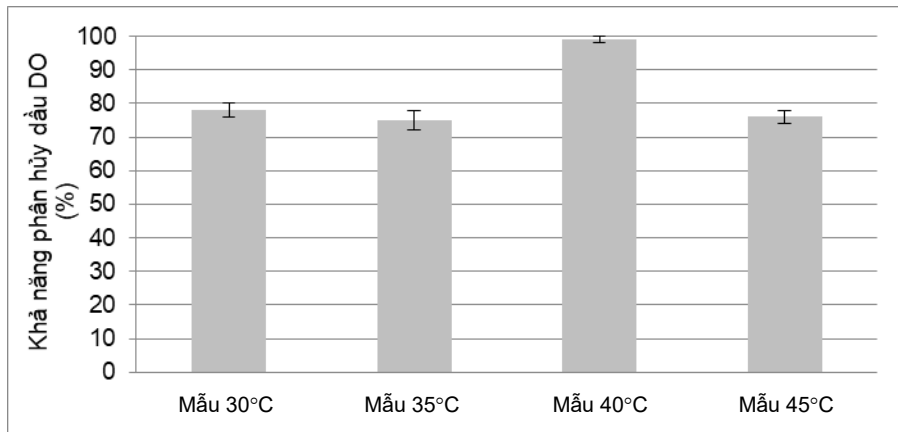
#### 3.4.1. Lên men ở các độ ẩm khác nhau

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

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

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

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

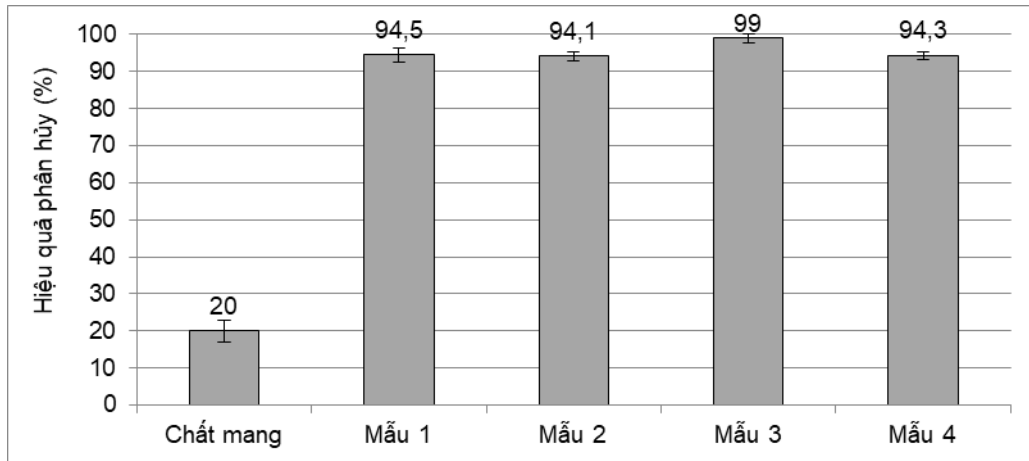


Ghi chú: Kí hiệu mẫu 30°C, 35°C, 40°C và 45°C là các mẫu đã được lên men ở các nhiệt độ tương ứng với kí hiệu đó.

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

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

	Trước sấy (cả đĩa) (g) - C2	Sau sấy (cả đĩa) (g) - C1	Trọng lượng đĩa (g) -	Khối lượng nước trong CP (g) - V1	Khối lượng CP khô (g) - V2	Độ ẩm (%)
Mẫu 1 (10% giống)	42	41	37,44	1	3.56	28,09
Mẫu 2 (bổ sung 100ml môi trường và 10% giống)	47	44	35,46	3	8.54	35,13
Mẫu 3 (bổ sung 150ml môi trường và 10% giống)	46	43,66	37,81	2.34	5,85	40,00
Mẫu 4 (bổ sung 200ml môi trường và 10% giống)	60	53	39,78	7	13,22	52,95



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

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

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

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

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

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

#### 4. KẾT LUẬN

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

#### LỜI CẢM ƠN

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

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

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

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

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