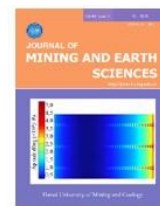




Journal of Mining and Earth Sciences

Website: <http://jmes.humg.edu.vn>



Assessment of oil degrading ability in drilling mud by biosurfactant produced by some microbial strains



Huong Thu Thi Tran ^{1,*}, Thinh Van Nguyen ²

¹ Faculty of Environment, Hanoi University of Mining and Geology, Hanoi, Vietnam

² Faculty of Petroleum and Energy, Hanoi University of Mining and Geology, Hanoi, Vietnam

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10th May 2023

Revised 05th Sept. 2023

Accepted 29th Sept. 2023

Keywords:

Biosurfactants,
Drilling mud,
E24,
Microorganism,
Petroleum industry.

ABSTRACT

*Drilling mud is generated during exploratory drilling and oilfield development, and consists of a mixture of soil, rock contaminated with oil, chemicals, and drilling fluid. It is very difficult and expensive to treat this waste source, so the biosurfactant produced by microorganisms is considered a highly effective biological treatment method. Biosurfactant is a bipolar compound that allows the dissolution of insoluble substances in water, creates an emulsion that helps microorganisms better contact the oil and easily decompose the contaminated oil. This study was carried out to evaluate the ability to degrade oil in drilling mud using biosurfactant produced by some microbial strains. The results showed that four microbial strains selected from Cat Ba, Hue and Vung Tau areas, namely *Brevibacteria celere*, *Oligella ureolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Paenibacillus mancerans* have the capacity of decomposing oil in drilling mud. The highest emulsification index (E24) of the four strains after 5 days culture with shaking at 200 rpm, pH = 7.5, temperature 30°C, 1% NaCl, carbon source of saraline and DO were recorded at 73, 71, 52 and 59%, respectively. This result shows that biosurfactants are an active compound group with potential in oil pollution treatment in the Petroleum industry in particular and environmental pollution treatment in general.*

Copyright © 2020 Hanoi University of Mining and Geology. All rights reserved.

*Corresponding author

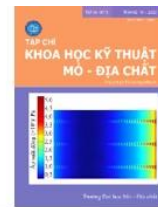
E - mail: tranthithuhoang@humg.edu.vn

DOI: 10.46326/JMES.2023.64(5).01



Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Mỏ - Địa chất

Trang điện tử: <http://tapchi.humg.edu.vn>



Đánh giá khả năng phân hủy dầu trong mùn khoan dầu khí bằng chất hoạt hoá bề mặt sinh học của một số chủng vi sinh vật

Trần Thị Thu Hương^{1,*}, Nguyễn Văn Thịnh²

¹ Khoa Môi trường, Trường Đại học Mỏ Địa chất, Hà Nội, Việt Nam

² Khoa Dầu khí và Năng lượng, Trường Đại học Mỏ Địa chất, Hà Nội, Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO

Quá trình:

Nhận bài 10/5/2023

Sửa xong 05/9/2023

Chấp nhận đăng 29/9/2023

Từ khóa:

Chất hoạt hóa bề mặt sinh học,
Công nghiệp dầu khí,
E24,
Mùn khoan,
Vi sinh vật.

TÓM TẮT

Mùn khoan được tạo ra trong quá trình khoan thăm dò và phát triển mỏ, bao gồm hỗn hợp đất, đá bị nhiễm dầu, hóa chất và dung dịch khoan. Việc xử lý nguồn rác thải này rất khó khăn và tốn kém nên chất hoạt động bề mặt sinh học do vi sinh vật tạo ra được coi là phương pháp xử lý sinh học có hiệu quả cao. Chất hoạt hóa bề mặt sinh học là hợp chất lưỡng cực cho phép hòa tan các chất không hòa tan vào nước, tạo ra dung dịch nhũ tương giúp vi sinh vật tiếp xúc tốt hơn với dầu và dễ dàng phân hủy dầu bị ô nhiễm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phân hủy dầu trong mùn khoan bằng chất hoạt hóa bề mặt sinh học (CHHBMSH) do một số chủng vi sinh vật sinh ra. Kết quả cho thấy, 4 chủng vi sinh vật được tuyển chọn từ các khu vực Cát Bà, Huế và Vũng Tàu là *Brevibacteria celere*, *Oligella ureolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Paenibacillus mancerans* đều có khả năng phân hủy dầu trong mùn khoan dầu khí. Chỉ số nhũ hóa (E24) cao nhất của bốn chủng sau 5 ngày nuôi lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở điều kiện pH = 7,5; nhiệt độ 30°C; nồng độ NaCl 1%, nguồn carbon là saraline và DO đã ghi nhận giá trị lần lượt là 71, 52, 59 và 73%. Kết quả này chỉ ra rằng chất hoạt hóa bề mặt sinh học là nhóm hoạt chất có tiềm năng trong việc xử lý ô nhiễm trong ngành dầu khí nói riêng và xử lý ô nhiễm môi trường nói chung.

© 2023 Trường Đại học Mỏ - Địa chất. Tất cả các quyền được bảo đảm.

*Tác giả liên hệ

E - mail: tranthithuhoang@humg.edu.vn

DOI: 10.46326/JMES.2023.64(5).01

1. Mở đầu

Công nghiệp dầu mỏ là một trong những ngành đóng vai trò quan trọng trong phát triển kinh tế của Việt Nam. Trữ lượng và tiềm năng dầu khí các bể trầm tích của Việt Nam dự báo khoảng 4.600 triệu tấn quy dầu, khí chiếm khoảng 50% và phân bố chủ yếu ở thềm lục địa. Chỉ tính riêng trong năm 2022, ngành dầu khí đã đạt doanh thu 931,2 nghìn tỷ đồng, tương đương 9,8% GDP cả nước, nộp ngân sách chiếm tỷ trọng 9,5% cả nước. Bên cạnh những lợi ích to lớn mà ngành dầu khí mang lại thì các hoạt động sản xuất trong ngành cũng gây ra nhiều ô nhiễm sinh thái nghiêm trọng đối với cả môi trường nước, đất và không khí. Theo thống kê của Hiệp hội các chủ hàng chở dầu quốc tế (Diem và nnk., 2022), Việt Nam là một trong 3 quốc gia (cùng với Trung Quốc và Hoa Kỳ) có số lượng sự cố tràn dầu nhiều nhất trong số 39 quốc gia được thống kê. Trong giai đoạn từ năm 2005÷2014, trung bình có từ 10 sự cố trở lên trong năm. Từ năm 1992÷2022 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% (Bui và nnk., 2022).

Tuy nhiên, quá trình khoan khai thác dầu khí lại thải ra một lượng mùn khoan rất lớn nếu không xử lý mà thải trực tiếp ra ngoài sẽ gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Mùn khoan dầu khí được tạo ra khi tiến hành khoan thăm dò và phát triển mỏ, bao gồm hỗn hợp đất đá nhiễm dầu cùng với các hoá chất trong dung dịch khoan lẫn vào (Lai, 1997). Khi sử dụng dung dịch khoan gốc dầu thì tình trạng ô nhiễm càng lớn. Về nguyên tắc thì nguồn phế thải này phải được đem vào bờ xử lý, tuy nhiên quá trình này gặp nhiều khó khăn và tốn kém nên các nhà thầu thường sao lãng. Có nhiều phương pháp hoá lý được đưa ra để xử lý ô nhiễm do quá trình thải mùn khoan nhưng hiệu quả chưa cao và tốn kém. Gần đây, trên thế giới, công nghệ sinh học đang được áp dụng nhiều do những ưu điểm vượt trội của chúng, đặc biệt là việc sử dụng chất hoạt hóa bề mặt do vi sinh vật tạo ra để phân hủy dầu trong mùn khoan dầu khí (Maneerat, 2005; Eras-Muñoz và nnk., 2022). Chất hoạt hóa bề mặt sinh học (CHHBMSH) là một hợp chất lưỡng cực cho phép hoà tan các chất không tan vào trong nước, tạo nhũ giúp vi sinh vật tiếp xúc tốt hơn với dầu và dễ dàng phân huỷ dầu ô nhiễm (Desai và Banat, 1997; Lai, 1997; Karanth và nnk., 1999). Mặt khác,

CHHBMSH dễ bị phân huỷ sinh học, không gây độc và có thể sản xuất từ các nguồn cơ chất rẻ tiền như phế thải của các ngành công nghiệp, nhờ đó có thể giải quyết triệt để tình trạng ô nhiễm do các nguồn phế thải này sinh ra (Ohadi và nnk., 2017). Vì thế việc xử lý mùn khoan bằng CHHBMSH tỏ ra rất có triển vọng. Công nghệ này đang bắt đầu được nghiên cứu và áp dụng ở Việt Nam vì dễ thực hiện, giá rẻ, lại không đòi hỏi những thiết bị, quy trình phức tạp như các công nghệ khác và đặc biệt là nó khắc phục được những hạn chế của phương pháp hoá lý đã có. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phân huỷ dầu trong mùn khoan bằng chất hoạt hoá bề mặt sinh học do một số chủng vi sinh vật sinh ra.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết kế thí nghiệm

Các mẫu nước, đất và mùn khoan trong nghiên cứu này được lấy ở vùng ven biển Thừa Thiên Huế, Cát Bà và Vũng Tàu. Mẫu nước và mẫu đất được lấy tại những khu vực ô nhiễm dầu; mùn khoan được lấy tại mỏ khoan dầu thô. Tại mỗi vị trí lấy 2 kg mẫu (đối với mẫu đất hoặc mùn khoan) hoặc 2 lít nước ô nhiễm dầu.

Mẫu mang về phòng thí nghiệm được trộn hoặc lắc đều. Mỗi mẫu lấy 1 gam hoặc 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml môi trường khoáng Gost 1%, bổ sung 5% dầu DO. Môi trường khoáng Gost 1% bao gồm các thành phần (g.l⁻¹): Na₂HPO₄ = 0.7; KH₂PO₄ = 0.3; KNO₃ = 3; MgSO₄ = 0.4 và nước máy 1 lít. Lắc dung dịch ở pH = 7,5; v = 200 vòng/phút và theo dõi liên tục trong 5 ngày.

Quan sát sự thay đổi độ đục, trạng thái dầu trong môi trường. Ghi nhận sự thay đổi về độ đục của dầu trong môi trường và chuyển sang đĩa thạch (thạch thường) để nhân giống và lưu giữ cho các thí nghiệm tiếp theo (Lai và nnk., 2004).

2.2. Phương pháp định danh chủng vi sinh vật

Hình thái khuẩn lạc của từng chủng được xác định bằng cách cấy mẫu trên môi trường hiếu khí, ủ ở 30°C sau 24 giờ và quan sát. Hình thái tế bào được quan sát bằng phương pháp nhuộm Gram sau 24 giờ và kiểm tra lại bằng KOH để tăng độ chính xác - lấy một ít sinh khối tế bào lên lam kính, nhỏ vài giọt dung dịch KOH 3% lên trên, dùng que cấy để trộn đều tế bào. Nếu chất lỏng nhớt thì vi khuẩn là Gram âm và ngược lại vi khuẩn là Gram

ương (Lai và nnk., 2004).

Xác định tên từng chủng bằng bộ kit tiêu chuẩn sinh hóa API - 20 NE của Biomerieux sử dụng 20 xét nghiệm sinh hóa để xác định vi sinh vật gram âm. Bộ test API - 50 CHB sử dụng 50 test sinh hóa để xác định các chủng vi khuẩn Gram dương. Các kit thử bao gồm phản ứng với các chất đã biết, kiểm tra phản ứng và so sánh với khóa phân loại Bergey, kết quả phân tích 16SrARN để tìm ra tên loài chưa biết (Lai và nnk., 2004).

2.3. Đánh giá khả năng sinh CHHBMSH theo phương pháp Pruthi

Sau khi phân lập được các chủng vi sinh vật, xác định khả năng phân hủy dầu bằng cách đo chiều cao cột nhũ hóa để xác định chỉ số nhũ hóa E24. Chỉ số nhũ hóa E24 đặc trưng cho khả năng nhũ hóa của các sản phẩm trao đổi chất do vi sinh vật sinh ra trong dung môi xylen sau 24 giờ, E24 càng cao thì khả năng nhũ hóa của sản phẩm càng lớn và được xác định theo công thức (1) (Bami và nnk., 2020):

$$E24 = \frac{\text{Chiều cao cột nhũ hóa}}{\text{Chiều cao tổng số}} \times 100\% \quad (1)$$

Cách tiến hành: Lấy 1ml dịch nuôi cấy đã ly tâm loại bỏ tế bào, thêm 1ml xylen vào ống nghiệm $\varnothing 11$ rồi đem vortex trong 1 phút với vận tốc 1.800 vòng/phút. Đo chiều cao cột nhũ hóa và chiều cao tổng số của mẫu trong ống nghiệm. Thay vào công thức và tính toán giá trị của chỉ số E24.

2.4. Khảo sát các yếu tố môi trường ảnh hưởng tới khả năng tạo CHHBMSH của các chủng vi sinh vật lựa chọn

Sự tạo thành CHHBMSH của vi khuẩn chịu ảnh hưởng mạnh của điều kiện môi trường và dinh dưỡng. Trong nghiên cứu này, một số yếu tố quan trọng có tác động tới quá trình phát triển và tạo CHHBMSH như pH, nhiệt độ, độ mặn và nguồn carbon đã được lựa chọn khảo sát. Kết thúc quá trình nuôi cấy sau 120 giờ (05 ngày) tiến hành đo chỉ số nhũ hóa E24 qua các thời điểm và đánh giá khả năng sinh CHHBMSH tối ưu của chủng đã lựa chọn. Điều kiện thử nghiệm cụ thể như sau:

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Thí nghiệm được tiến hành ở nồng độ NaCl 1%; pH = 7,5; nguồn carbon là dầu DO với các nhiệt độ là 22, 28, 30 và 37°C.

- Ảnh hưởng của pH: Các bình chứa môi trường được chuẩn bị với các giá trị pH là 6,5; 7; 7,5 và 8 có bổ sung 5% (v/v) dầu DO, nuôi cấy với vận tốc 200 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ là 30°C.

- Ảnh hưởng của nồng độ NaCl: Các thí nghiệm được tiến hành với dải nồng độ NaCl là 0%; 1%; 2%; 3% với nguồn carbon là DO, pH = 7,5, ở điều kiện nhiệt độ là 30°C.

- Tiến hành thí nghiệm với các nguồn carbon là DO, saraline, glycerin, oliu ở điều kiện nồng độ muối 1%; pH = 7,5; điều kiện nhiệt độ là 30°C.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu trong nghiên cứu được thống kê và xử lý bằng các phần mềm GraphPad 6; Excel 2010 với ý nghĩa xác suất thống kê $p < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật từ kết quả đánh giá khả năng phân hủy dầu

Từ 30 mẫu đất, nước và mùn khoan tại vùng ven biển thuộc khu vực nghiên cứu đã phân lập và thu nhận được 04 chủng có khả năng phân hủy dầu là CB 1C; CB Port, NVD. Chủng M150 nhận từ phòng Vi sinh vật Dầu mỏ - Viện Công nghệ Sinh học. Các chủng được nuôi cấy và xác định khả năng phân hủy dầu với nguồn carbon ban đầu là dầu DO. Đồng thời hình thái khuẩn lạc, tế bào và phân loại Gram cũng được xác định. Kết quả thể hiện trong hai Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Khả năng nhũ hoá xylen của CHHBMSH thu được từ vi khuẩn phân hủy dầu.

Chủng	Giá trị E24 (%)
M150	73
CB 1C	71
CB Port 1	52
NVD	59

Kết quả quan sát hình thái vi khuẩn và nhuộm Gram cho thấy vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất, nước và mùn khoan ở ven biển thuộc cả hai nhóm Gram dương (02 chủng) và Gram âm (02 chủng). Kết quả đánh giá sơ bộ khả năng tạo nhũ với xylen trên môi trường khoáng Gost chứa 5% (v/v) dầu DO của các chủng này cho thấy chủng M150 có khả năng phân hủy dầu cao nhất với chỉ số nhũ hóa E24 là 73% chỉ sau 3 ngày nuôi cấy.

Bảng 2. Đặc trưng hình thái của một số chủng vi sinh vật.

Mã hóa mẫu	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái tế bào	Gram
CB 1C	Ngà ngà nâu, bóng đục, ướt; tâm lõi, mép gọn, $\phi = 4 \div 5$ mm	Hình ovan, chuyển động, kết đơn, phân tán	-
CB Port 1	Trắng ngà, hơi nâu; mép gọn, bóng ướt, không rõ tâm; khuẩn lạc tròn, $\phi = 1 \div 3$ mm	Hình trụ, không chuyển động, phân tán	-
NVD	Trắng đục, tròn, bóng ướt, mép gọn, tâm lõi ở giữa, $\phi = 1 \div 2$ mm	Hình trụ, không chuyển động, phân tán.	+
M150	Vàng carrot, tròn bóng ướt, tâm lõi mép gọn, $\phi = 1 \div 3$ mm	Hình que ngắn, hơi cong, không có khả năng chuyển động	+

Các chủng còn lại là CB 1C, CB Port 1 và NVD ghi nhận giá trị E24 lần lượt là 71, 52 và 59% sau 5 ngày nuôi lắc.

3.2. Kết quả định danh chủng vi sinh vật

Kết quả sử dụng bộ xét nghiệm sinh hóa API - 20 NE đối với chủng vi khuẩn Gram âm CB 1C và CB Port 1 cho thấy trong 21 giếng xét nghiệm sinh hóa có 06 và 08 giếng lần lượt phản ứng dương tính, làm thay đổi màu dung dịch gốc trong giếng. Đó là các giếng được đánh số lần lượt là 5, 9, 10, 14, 18, 19 và 6, 7, 9, 11, 13, 14, 18, 19. Kết quả sử dụng bộ xét nghiệm sinh hóa API - 50 CHB đối với chủng vi khuẩn Gram dương hình thành bào tử NVD cho thấy trong 50 giếng xét nghiệm sinh hóa có 26 giếng phản ứng dương tính, làm đổi màu dung dịch gốc trong giếng. Đó là các giếng được đánh số: 1, 5, 10, 11, 12, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 47.

Dựa vào key phân loại của Bergey, tên các chủng vi sinh vật được xác định như sau: chủng CB 1C, CB Port 1 và NVD thuộc chủng *Oligella ureolytica*; *Stenotrophomonas maltophilia* và *Paenibacillus mancerans* với độ tương đồng lần lượt đạt 91; 99,99 và 91%. Chủng M150 nhận từ phòng Vi sinh vật Dầu mỏ - Viện Công nghệ Sinh học đã được phân tích 16S rRNA và định danh với tên loài là *Brevibacteria celere*. Kết quả phân loại được thể hiện ở Hình 1.

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường tới khả năng tạo CHHBMSH của các chủng vi sinh vật đã tuyển chọn

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh CHHBMSH của các chủng nghiên cứu

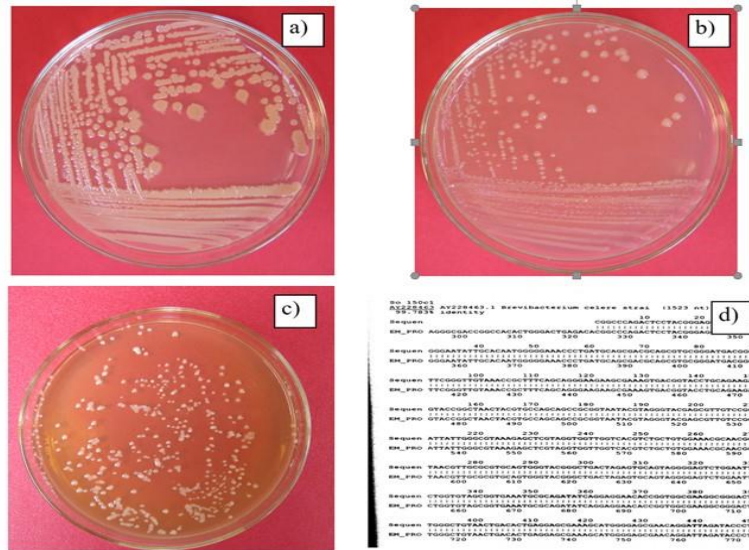
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh CHHBMSH ở Bảng 3 và Hình 2 cho thấy, các chủng sinh vật đã ghi nhận chỉ số nhũ hoá

cao ở nhiệt độ là 30°C. Dịch nuôi cấy của chủng CB 1C có chỉ số E24 cao nhất là 73 %, chủng M150 là 67%, hai chủng còn lại chỉ đạt tối đa là 50 và 37%. Tuy nhiên, chủng M150 có dải nhiệt độ sinh CHHBMSH rộng 22÷37°C chủng đều có chỉ số nhũ hoá ổn định. Như vậy, nhiệt độ 30°C là nhiệt độ thích hợp cho các chủng vi khuẩn tạo ra lượng CHHBMSH cao.

3.3.2. Ảnh hưởng của pH tới khả năng sinh CHHBMSH của các chủng nghiên cứu

pH là yếu tố quan trọng và có ảnh hưởng rất lớn tới sự sinh trưởng và phát triển của các loài vi sinh vật. Theo nhiều tác giả đã công bố thì vi khuẩn thường có khả năng sinh trưởng tốt nhất ở pH trung tính, nhưng cũng có những loài có thể sinh trưởng tốt ở pH axit (pH = 5 hoặc 6) hoặc pH kiềm (pH = 8), thêm vào đó các vi sinh vật thường có khả năng phân huỷ dầu mạnh ở pH trung tính tới kiềm yếu nên dải pH được lựa chọn trong nghiên cứu này khá rộng 6,5÷8 (Lai và nnk., 2004). Ngoài mục đích xác định giá trị pH phù hợp cho vi khuẩn phát triển và tạo CHHBMSH, giá trị pH cũng giúp đánh giá phạm vi chịu pH của chủng để tạo điều kiện thuận lợi cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH như Bảng 4.

Kết quả thu nhận cho thấy giá trị pH thích hợp cho các chủng phát triển là pH = 7,5, đặc biệt chủng M150 sau 72 giờ nuôi cấy đã đạt chỉ số nhũ hoá E24 là 72%. Chủng M150 còn thể hiện sự phát triển ở dải pH khá rộng, ở các giá trị pH 6,5; 7 và 8 chủng đều có sự phát triển nhưng không cao như ở pH = 7,5. Các chủng còn lại ở pH 6,5 và 7 có phát triển nhưng khá chậm, còn ở pH 8 thì hầu như là không phát triển. Do hầu hết chủng vi sinh vật nghiên cứu sống ở biển và pH = 7,5 cũng là pH phù hợp với môi trường nước biển nên pH = 7,5 là giá trị phù hợp cho các chủng vi khuẩn phát triển và tạo ra lượng CHHBMSH cao.



Hình 1. Kết quả phân lập ba chủng vi sinh vật NVD (a), CB Port 1 (b), CB 1C (c) và phân tích 16SrARN của chủng M150 (d).

Bảng 3. Khả năng nữ hoá của các chủng ở các nhiệt độ khác nhau.

Thời gian (giờ)	Chỉ số nữ hoá E24 (%) của chủng CB 1C				Chỉ số nữ hoá E24 (%) của chủng CB port 1			
	22°C	28°C	30°C	37°C	22°C	28°C	30°C	37°C
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	27	27	0	0	37	37
48	0	0	33	37	0	0	41	38
72	0	0	33	46	0	0	44	46
96	0	10	37	0	0	0	50	50
120	0	24	0	0	0	0	73	0
Thời gian (giờ)	Chỉ số nữ hoá E24 (%) của chủng NVD				Chỉ số nữ hoá E24 (%) của chủng M150			
	22°C	28°C	30°C	37°C	22°C	28°C	30°C	37°C
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	27	28	0	28	38	27
48	0	0	35	35	0	31	54	38
72	0	0	42	42	36	48	58	54
96	0	0	46	34	52	50	62	58
120	0	0	50	0	62	58	67	54

3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl tới khả năng sinh CHHBMSH của các chủng nghiên cứu

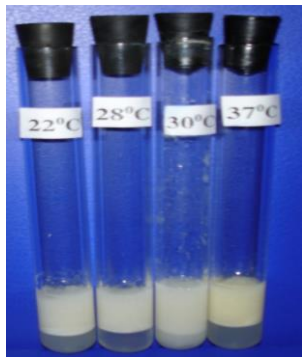
Ô nhiễm dầu thường xảy ra trên biển và các chủng vi khuẩn lựa chọn được phân lập từ vùng ven biển nên việc kiểm tra độ mặn có ảnh hưởng như thế nào tới sự phát triển của vi khuẩn là rất quan trọng cho việc ứng dụng về sau. Với dải nồng độ NaCl khảo sát thay đổi 0÷3%, kết quả ảnh hưởng của việc thay đổi nồng độ muối ghi nhận tại Bảng 5 và Hình 3 dưới đây. Kết quả nghiên cứu Bảng 5 và

Hình 3 cho thấy nồng độ muối thích hợp cho sự tạo thành CHHBMSH như sau:

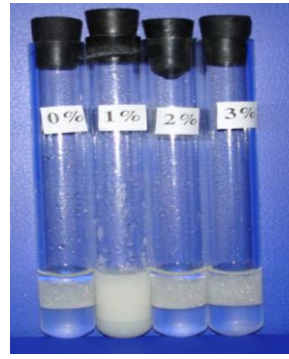
- Chủng CB Port 1 và NVD phù hợp với nồng độ muối là 1%, chỉ số nữ hoá E24 của dịch nuôi cấy đạt 46% và 50%.

- Chủng CB 1C ở nồng độ muối 0% có phát triển nhưng rất thấp, tuy nhiên ở nồng độ 1% đã ghi nhận chỉ số nữ hoá của dịch nuôi cấy đạt 68%.

- Chủng M150 phù hợp với dải nồng độ muối rộng 0÷3%, ở nồng độ 1% đạt chỉ số nữ hoá cao nhất là 67%.



Hình 2. Hình ảnh cột nhũ hóa của chủng M150 tại các nhiệt độ khác nhau.



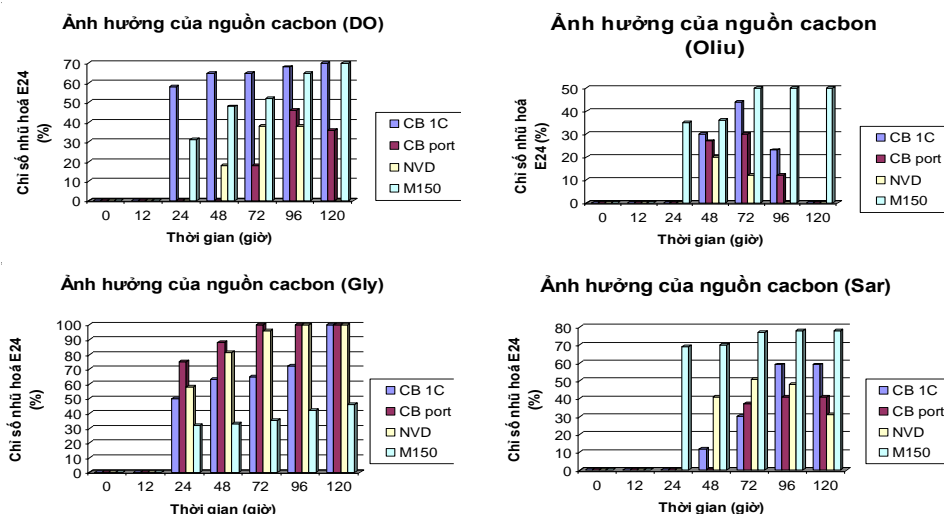
Hình 3. Hình ảnh cột nhũ hóa của chủng M150 tại các nồng độ muối khác nhau.

Bảng 4. Khả năng nhũ hoá của các chủng ở các giá trị pH khác nhau.

Thời gian (giờ)	Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng CB 1C				Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng CB port 1			
	6,5	7	7,5	8	6,5	7	7,5	8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	30	0	0	0	27	0
48	0	0	34	0	0	0	50	0
72	0	0	48	0	0	5	38	0
96	20	24	50	0	0	0	0	0
120	0	0	42	0	0	0	0	0
Thời gian (giờ)	Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng NVD				Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng M150			
	6,5	7	7,5	8	6,5	7	7,5	8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	28	0	23	21	65	16
48	0	24	42	0	48	41	69	31
72	0	31	37	0	44	43	74	55
96	0	50	0	0	42	46	59	48
120	0	0	0	0	48	40	52	46

Bảng 5. Khả năng nhũ hoá của các chủng nghiên cứu ở các nồng độ NaCl khác nhau.

Thời gian (giờ)	Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng CB 1C				Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng CB port 1			
	0%	1%	2%	3%	0%	1%	2%	3%
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	37	0	0
48	0	31	0	0	0	42	0	0
72	0	44	0	0	0	45	0	0
96	5	50	0	0	0	46	0	0
120	5	68	0	0	0	0	0	0
Thời gian (giờ)	Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng NVD				Chỉ số nhũ hoá E24 (%) của chủng M150			
	0%	1%	2%	3%	0%	1%	2%	3%
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	33	55	40	42
48	0	24	0	0	37	58	48	54
72	0	31	0	0	46	65	50	54
96	0	50	0	0	57	67	52	52
120	0	0	0	0	44	48	46	43



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn C lên sự phát triển và tạo CHHBM của các chủng vi sinh vật nghiên cứu sau 120 giờ

Như vậy, nồng độ NaCl 1% là nồng độ phù hợp cho các chủng vi sinh vật sinh trưởng và phát triển vì đây cũng là nồng độ thường gặp ở đa số môi trường nước ven biển.

3.3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon tới khả năng sinh CHHBMSH của các chủng nghiên cứu

Để thu được CHHBMSH cao nhất, nguồn carbon cũng là một yếu tố hết sức quan trọng. Hiện nay, trong những sự cố tràn dầu ngoài biển thường có chứa dầu saraline, DO và parafin, nhất là trong mùn khoan dầu khí thì dầu saraline thường chiếm một lượng không nhỏ. Với các yêu cầu kỹ thuật cần khoan sâu, khoan xiên vào lòng đất để khai thác dầu hiệu suất cao, dung dịch khoan thường sử dụng là dung dịch khoan gốc dầu (saraline). Vì thế các nguồn carbon là DO, saralin, glyxerin, dầu oliu đã được lựa chọn vì là các nguồn carbon phù hợp cho sự tạo CHHBMSH và dầu saralin là nguồn carbon trong mùn khoan cần xử lý. Kết quả được thể hiện ở Hình 4.

Kết quả này phù hợp với kết quả thu được về khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng vi sinh vật của Shah và nnk. (2016), Barakat và nnk. (2017), Joshi và Shekhawat (2014). Theo Shah và nnk. (2016), chất hoạt động bề mặt sinh học do chủng *Pseudomonas aeruginosa* sản xuất có thể phân hủy dầu thô. Kết quả cho thấy chất hoạt động bề mặt sinh học được bổ sung nguồn carbon là 1% dầu thô (TAPIS), chỉ số nhũ hóa E24 của *Rhamnolipids* so với TAPIS đạt giá trị tối đa là 42%. Barakat và nnk. (2017) đã phân lập 21 mẫu nước biển tràn dầu từ Shalateen,

Biển Đỏ, Ai Cập. Kết quả thu được hai chủng SH20 và SH24 có chỉ số nhũ hóa E24 cao nhất lần lượt là 57 và 56%. Kết quả phân loại bằng 16S rRNA được xác định là *Bacillus amyloliquefaciens* SH20 và *Bacillus thuringiensis* SH24. Thực tế là chất hoạt động bề mặt sinh học có thể làm giảm sức căng bề mặt của cả dung dịch nước và hỗn hợp hydrocarbon. Do đó, Joshi và Shekhawat (2014) chỉ ra rằng phân lập chủng vi sinh vật từ mẫu đất tại máy bơm xăng và gara ở Kalyan cũng có thể tạo ra chất hoạt động bề mặt sinh học. Để khẳng định khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng phân lập, người ta tiến hành thử nghiệm sức căng bề mặt và chỉ số nhũ hóa (E24). Kết quả phân lập cho thấy hiệu suất sinh khối và chất hoạt động bề mặt tối đa lần lượt là 1,72 và 0,68 g.l⁻¹. Kết quả định danh bằng phân tích 16S rRNA cho thấy chủng này được xác định là *Pseudomonas stutzeri*.

Các chủng vi sinh vật khác nhau có khả năng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học và khả năng phân hủy dầu khác nhau (Guo và nnk., 2022). Nguồn dầu ban đầu được sử dụng trong nhiều nghiên cứu cũng rất đa dạng nhưng chủ yếu tập trung sử dụng dầu DO, saraline để bôi trơn mũi khoan hoặc tăng áp lực đẩy dầu. Vì vậy, chủng sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học sẽ có tiềm năng lớn trong hoạt động xử lý sinh học, tăng cường thu hồi dầu bằng vi sinh vật và xử lý bùn khoan trong ngành dầu khí. Như vậy, thông qua một số thí nghiệm đánh giá ban đầu, có thể thấy chủng M150 là chủng có khả năng sinh CHHBMSH và phân hủy dầu mạnh nhất, vì vậy chủng này được lựa chọn để

nghiên cứu thêm các đặc tính tối ưu khác trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm ứng dụng xử lý ô nhiễm môi trường nhất là trong lĩnh vực dầu khí.

4. Kết luận

Chất hoạt hoá bề mặt sinh học do các chủng vi sinh vật sinh ra có thể ứng dụng trong xử lý mùn khoan trong ngành công nghiệp dầu khí. Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập mẫu tại vùng biển Cát Bà, Thừa Thiên Huế, Vũng Tàu. Kết quả định danh chủng vi sinh vật và xác định đặc tính của loài đã thu nhận được 3 chủng vi sinh vật là *Oligella ureolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus mancerans* và đều có khả năng phân hủy dầu trong mùn khoan dầu khí. Kết hợp với chủng *Brevebacterium celere* nhận từ Phòng Vi sinh vật Dầu mỏ - Viện Công nghệ sinh học đã đánh giá được khả năng tạo CHHBMSH của 4 chủng (*Brevebacterium celere*, *Oligella ureolytica*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Paenibacillus mancerans*) với chỉ số nhũ hóa E24 cao nhất sau 5 ngày nuôi lắc ghi nhận lần lượt là 73, 71, 52 và 59%. Kết quả đánh giá điều kiện tối ưu sinh CHHBMSH của các chủng cho thấy chủng *Brevebacterium celere* có thể phân hủy nguồn carbon mạnh nhất là dầu saraline và DO ở pH = 7,5; nhiệt độ 30°C; nồng độ NaCl 1%.

Đóng góp của tác giả

Trần Thị Thu Hương - lập đề cương, xây dựng và hoàn thiện bản thảo, thực địa lấy mẫu, phân tích mẫu và tổng hợp kết quả; Nguyễn Văn Thịnh - chỉnh sửa tóm tắt, viết một phần nội dung, phân tích mẫu, chỉnh sửa một số hình ảnh.

Tài liệu tham khảo

Bami, M. S., Khazaeli, P., Forootanfar, H., Dehghannoudeh, G., Ohadi, M. (2020). Isolation and Identification of Biosurfactant Producing Bacterial Strain from Saline Soil Samples in Iran; Evaluation of Factors on Biosurfactant Production. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 15 (4).

Barakat, K. M., Hassan, S. W. M., Darwesh, O. M. (2017). Biosurfactant production by haloalkaliphilic Bacillus strains isolated from Red Sea, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43(3), 205-211.

Bui, H. D., Do, T. T. P., Tran, P. H. (2022). Environment protection in oil and gas exploration and production activities, offshore Vietnam. *Journal of oil and gas* 12, 45 - 49.

Desai, J. D., Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol R* 61(1), 47-64.

Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered* 13(5), 12365-12391.

Guo, P., Xu, W., Tang, S., Cao, B., Wei, D., Zhang, M., Lin, J., Li, W. (2022). Isolation and Characterization of a Biosurfactant Producing Strain *Planococcus* sp. XW-1 from the Cold Marine Environment. *Int J Environ Res Public Health* 19(2), 782.

Joshi, P. A., & Shekhawat, D. B. (2014). Screening and isolation of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated soil. *Eur J Exp Biol*, 4(4), 164-169.

Karanth, N. G. K., Deo, P. G., Veenanadig, N. K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science* 77 (1), 116-126.

Lai, T. H. (1997). Lecture for Master in petroleum microbiology. *Science and Technology Publishing House*, 1997.

Lai, T. H., Duong, V. T., Nguyen, T. A., Tran, C. V., Doan, T. H. (2004). CHHBMSH-producing bacteria isolated from Nha Trang sea. *Journal of Marine Science and Technology*, 2, 2- 13.

Maneerat, S. (2005). Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27(3), 675-683.

Ohadi, M., Dehghannoudeh, G., Shakibaie, M., Banat, I. M., Pournamdari, M., Forootanfar, H. (2017). Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 12, 1-9.

Shah, M. U. H., Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., Yusup, S. B. (2016). A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Procedia Engineering* 148, 494-500.