Phân lập, định danh và nghiên cứu đặc điểm sinh học một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu mỏ trong mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại Quân khu 7

Đinh Thị Vân*, Ngô Cao Cường

Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Chi nhánh phía Nam

Ngày nhận bài 5/7/2018; ngày chuyển phản biện 10/7/2018; ngày nhận phản biện 20/9/2018; ngày chấp nhận đăng 25/9/2018

Tóm tắt:

Từ 3 mẫu đất bùn nhiễm dầu, đã tuyển chọn và phân lập được 3 chủng vi khuẩn và 3 chủng nấm men có khả năng phân hủy dầu. Tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân hủy 93% hàm lượng dầu bổ sung sau 9 ngày thử nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho vi khuẩn và nấm men là khoảng 30^{0}C, pH tối ưu là khoảng trung tính, các chủng vi sinh vật phát triển ở nồng độ muối loãng 0,1%. Bằng phương pháp sinh học phân tử đã định danh được 6 chủng vi sinh vật trong tổ hợp, bao gồm: chủng VKbt1 thuộc về loài *Chryseobacterium defluvii;* chủng VKbt2 thuộc về loài *Chryseobacterium gleum;* chủng VKbx thuộc chi *Pseudomonas* sp.*;* chủng NMbt1 thuộc về loài *Pichia jadinii;* chủng NMbt2 thuộc về loài *Candida tropicalis;* chủng NMbx thuộc về loài *Candida tropicalis.*

Từ khóa: **định danh, phân hủy dầu, vi sinh vật.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

Mở đầu

Dầu mỏ từ lâu đã là nguồn năng lượng cần thiết, không thể thiếu đối với nhiều quốc gia trên thế giới [1]. Trong quá trình sử dụng dầu mỏ, có một lượng dầu phát tán vào môi trường, nếu không được xử lý sẽ gây ô nhiễm. Các hoạt động như rửa xe, xúc rửa bể chứa nhiên liệu, xưởng sửa chữa động cơ… có thể là nguồn phát thải dầu mỡ và gây ô nhiễm môi trường.

Nhiều công nghệ đã được áp dụng để xử lý ô nhiễm dầu mỏ như tuyển nổi, lắng lọc, chưng cất, xử lý vi sinh, mỗi công nghệ có những ưu điểm và hạn chế riêng [2, 3]. Trong đó, xử lý dầu mỏ trong nước bằng công nghệ vi sinh được cho là giải pháp bền vững do đảm bảo tính thân thiện môi trường. Tuy nhiên, để đạt hiệu quả tối ưu về mặt kinh tế, nhóm tác giả đã áp dụng công nghệ phân tách dầu bằng cơ học, kết hợp sử dụng các chủng vi sinh vật bản địa để phân hủy lượng dầu trong nước thải. Việc tuyển chọn tập hợp vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu được tiến hành với các mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại một số địa điểm có các hoạt động sửa chữa động cơ và rửa xe tại Quân khu 7.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Trên cơ sở khảo sát một số đơn vị phát thải dầu mỡ, chúng tôi lựa chọn hai đơn vị đại diện thuộc Quân khu 7 là Trung đoàn vận tải và Xưởng sửa chữa động cơ để thu mẫu. Các mẫu đất và bùn được thu thập từ hệ thống xả thải tại Xưởng sửa chữa động cơ và cầu rửa xe của đơn vị.

Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu nghiên cứu được bảo quản lạnh ở 4^{0}C, chuyển về phòng thí nghiệm và tiến hành nuôi cấy trong môi trường khoáng GOST 9023-74 có bổ sung 5% dầu thô pha trong DO (tỷ lệ 5:95). Các chủng phân lập được nuôi cấy trên máy lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ 28±2^{0}C. Sau 7 ngày nuôi cấy, hút 10 ml dịch nuôi cấy lần 1 chuyển sang bình tam giác chứa môi trường khoáng có thành phần tương tự, tiếp tục nuôi cấy ở điều kiện tương tự. Quá trình cấy truyền thực hiện 3 lần. Lấy mẫu nuôi cấy lần 3 phân lập trên môi trường MPA thạch đĩa [thành phần (g/l): cao thịt - 3, pepton - 5, NaCl - 0,5, agar - 15, pH 6,8-7,5)] và cấy gạt trên môi trường đặc trưng cho nấm men và vi khuẩn [4]. Các chủng vi sinh vật đã phân lập được giữ trong môi trường MPA thạch nghiêng để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Hình thái khuẩn lạc của chủng vi sinh vật được quan sát trên môi trường khoáng GOST 9023-74 bổ sung 1% thạch. Hình thái tế bào của chủng vi sinh vật được quan sát dưới kính hiển vi quang học độ phóng đại 400 lần và 1.000 lần.

Phân loại vi khuẩn, nấm men dựa trên so sánh trình tự gene 16S rRNA và ITS. DNA tổng số của vi khuẩn và nấm men được tách bằng kít của Zymo Research (USA). Đoạn gen 16S rDNA được khuếch đại với cặp mồi 27F và 1492R; trình tự ITS được khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4.

*Tác giả liên hệ:Email: dinhthivan2004@gmail.com

Isolation and identification of biological characteristics of microorganism strains that have the ability to degrade oil in oil-contaminated muddy soil samples at the 7th Military Region

Thi Van Dinh*, Cao Cuong Ngo

Vietnam - Russia Tropical Center, South Branch

Received 5 July 2018; accepted 25 September 2018

Abstract:

From three oil-contaminated muddy soil samples, we selected a complex of microorganisms that has ability to degrade 93% of oil content after 9 days of testing. Three bacterial and three yeast strains were isolated from the complex of microorganisms. The ideal temperature for bacterial and yeast growth was 30^{0}C; optimal pH was neutral; the strains were cultivated in 0,1% dilute saline solution. By using molecular biology techniques, we identified 6 microorganism strains in the complex: the train VK_{bt1} belongs to *Chryseobacterium defluvii;* the train VK_{bt2} belongs to *Chryseobacterium gleum;* the train VK_{bx} belongs to genus *Pseudomonas* sp.; the train NM_{bt1} belongs to *Pichia jadinii;* the train NM_{bt2} belongs to *Candida tropicalis;* the train NM_{bx} belongs to *Candida tropicalis.*

Keywords: **identification, microorganism, oil degradation.**

Classification number: **1.6**

Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự động ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Công ty 1st BASE (Singapore). Các trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit (Ver. 6.0.7, USA) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega (Ver.7) theo phương pháp Neighbor - Joining.

Đánh giá khả năng sử dụng dầu thô pha trong DO của tập hợp chủng. Hàm lượng dầu tồn lưu trong các mẫu nuôi cấy ở môi trường dịch thể được đánh giá bằng phương pháp trọng lượng. Đã sử dụng 5% dầu thô pha trong DO (tỷ lệ 5:95) được bổ sung vào môi trường khoáng (lượng dầu bổ sung 5% tương đương 8,6 gam theo trọng lượng khi cân), nuôi trong điều kiện nhiệt độ 30^{o}C với tốc độ lắc 200 vòng/phút để nghiên cứu khả năng sử dụng dầu [5, 6].

Khảo sát một số yếu tố môi trường ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn phân lập. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và khả năng sử dụng các nguồn cacbon được khảo sát theo phương pháp đã được công bố bởi Atlas và cộng sự (1995) [6].

Kết quả và thảo luận

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu thô pha trong DO

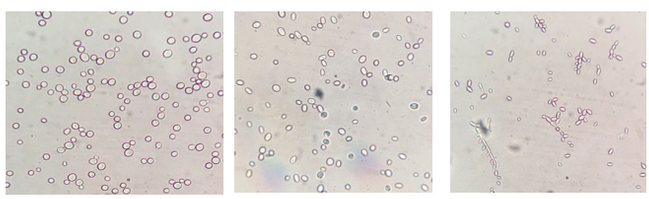
Từ mẫu thu thập, vi sinh vật sử dụng dầu thô pha trong DO được phân lập theo phương pháp làm giàu trên môi trường khoáng bổ sung 5% dầu thô pha trong DO. Tổ hợp vi sinh vật sinh trưởng trên đĩa thạch được tiến hành tách riêng từng chủng và quan sát hình thái khuẩn lạc (bảng 1).

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật sinh trưởng trên môi trường khoáng có bổ sung dầu thô pha trong DO.

TT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc
1	VK_{bx}	Khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt bóng
2	VK_{bt1}	Khuẩn lạc màu vàng, tròn bóng, mặt lồi
3	VK_{bt2}	Khuẩn lạc màu trắng trong, khuẩn lạc nhỏ, bề mặt lồi
4	NM_{bt1}	Khuẩn lạc trắng đục, bề mặt lồi, đường kính khoảng 1 mm
5	NM_{bt2}	Khuẩn lạc trắng đục, bề mặt lồi, nhăn
6	NM_{bx}	Khuẩn lạc trắng đục, bề mặt lồi đường kính khoảng 2 mm

Từ đặc điểm khuẩn lạc thấy trong 6 chủng vi sinh vật phân lập có thể là vi khuẩn hoặc nấm men. Theo các nghiên cứu của Vũ Thị Thanh, Boutheina, Nilanjana, nấm men và vi khuẩn đều được tìm thấy trong các mẫu đất, bùn nhiễm dầu [4, 7, 8] và chúng đã được nghiên cứu, áp dụng để xử lý ô nhiễm dầu mỏ đối với đất, nước… [2, 9, 10]. Để khẳng định thêm, các đặc điểm về phân loại học đã được tiến hành nghiên cứu. Các kết quả được minh họa dưới đây:

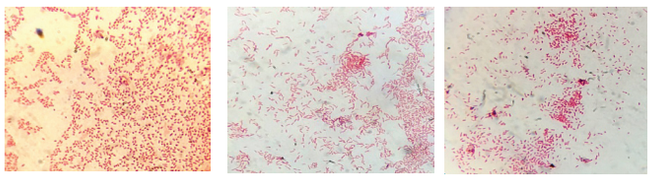
Đặc điểm hình thái tế bào của 6 chủng vi sinh vật phân lập: hình dạng tế bào 3 chủng được quan sát bằng kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần cho thấy có 1 chủng dạng hình cầu, 2 chủng dạng ô van (trong đó 1 chủng dạng ô van kết dính với nhau thành sợi). Cả 3 chủng trên đều có các chồi nhỏ đính ở đầu các tế bào lớn (hình 1).



NM_{bt1} NM_{bt2} NM_{bx}

Hình 1. Hình thái tế bào của 3 chủng NM_{bt1}; NM_{bt2}; NM_{bx} độ phóng đại 400 lần.

Ba chủng còn lại rất khó quan sát ở độ phóng đại 400 lần, do đó quan sát ở độ phóng đại 1.000 lần đã được thực hiện (hình 2).



VK_{bt1} VK_{bt2} VK_{bx}

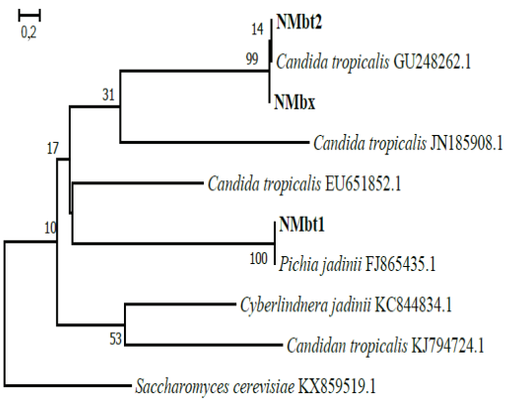
Hình 2. Hình thái tế bào của ba chủng VK_{bt1}; VK_{bt2}; VK_{bx} độ phóng đại 1.000 lần.

Hình dạng tế bào 3 chủng được quan sát bằng kính hiển vi với độ phóng đại 1.000 lần là tế bào hình que ngắn đến dài. Các tế bào đứng đơn độc không liên kết với nhau.

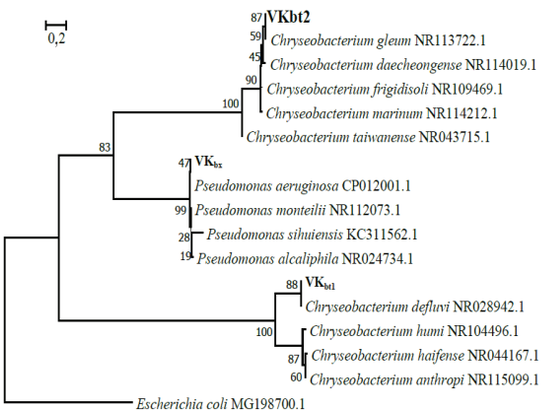
Từ kích thước tế bào, đặc điểm sinh sản có thể sơ bộ kết luận 3 chủng NM_{bt1}; NM_{bt2}; NM_{bx} thuộc nấm men theo mô tả của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự [11]. Để khẳng định nhận định trên, định danh bằng sinh học phân tử đã được tiến hành.

Định danh 6 chủng vi sinh vật phân lập: DNA tổng số của vi khuẩn và nấm men được tách bằng kít của Zymo Research (USA). Đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại với cặp mồi 27F và 1492R; trình tự ITS được khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4. Kết quả giải trình tự các đoạn DNA trên được Blast search trên NCBI và so sánh với ngân hàng cơ sở dữ liệu trên Genbank. Các đoạn trình tự tương đồng cao được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 3 và hình 4).

Qua hình 3 cho thấy, chủng nấm men ký hiệu NM_{bt1} có cùng nhánh với loài *Pichia jadinii,* chỉ số bootrap đạt 100, kết quả blast cũng cho thấy, chủng nấm men NM_{bt1} có độ tương đồng 99% với loài nấm men *Pichia jadinii.* Có thể kết luận, chủng nấm men NM_{bt1} thuộc về loài *Pichia jadinii.* Chủng nấm men NM_{bt2} và NM_{bx} cùng một nhánh với loài *Candida tropicalis,* chỉ số bootrap đạt 99 đối với NM_{bx}, còn NM_{bt2} đạt 14. Kết quả blast trên cũng cho thấy hai chủng NM_{bx} và NM_{bt2} có độ tương đồng cao với loài *Candida tropicalis* lần lượt là 100 và 99%. Khi đối chiếu với đặc điểm sinh học của hai chủng cho thấy có sự tương đồng về màu sắc và đặc điểm khuẩn lạc, tuy nhiên hình ảnh tế bào lại có sự sai khác đáng kể. Chủng NM_{bt2} có dạng hình trứng trong khi đó chủng NMbx dạng hình ô van, các tế bào gắn với nhau tạo thành sợi giả. Để có thể đưa ra kết luận chính xác hơn, nhóm nghiên cứu đã gửi hai mẫu NM_{bt2} và NM_{bx} định danh bằng phương pháp MALDI-TOF tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia. Kết quả cho thấy, 2 chủng NM_{bt2} và NM_{bx} thuộc về loài *Candida tropicalis.* Theo nghiên cứu của Kiều Thị Quỳnh Hoa và cs, chủng nấm men *Candida tropicalis* phân lập từ giếng khai thác dầu mỏ Bạch Hổ, Vũng Tàu có khả năng phân hủy 83,37% lượng dầu bổ sung sau 14 ngày thử nghiệm [12].



Hình 3. Cây phả hệ giữa các chủng NM_{bt2}, NM_{bt1} và NM_{bx} với các loài có họ hàng gần dựa vào trình tự ITS; loài *Saccharomyces cerevisiae* làm nhóm ngoài.



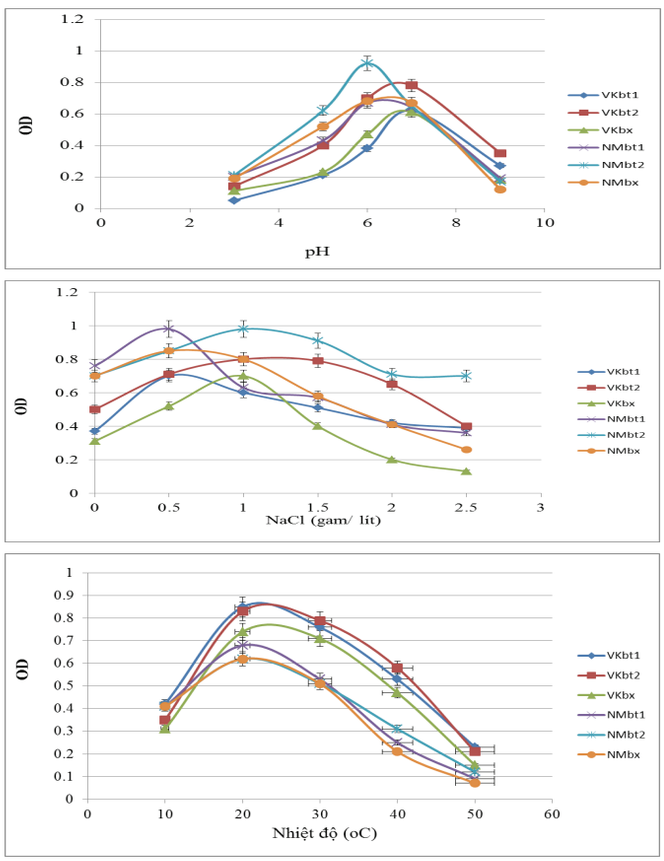
Hình 4. Cây phả hệ giữa các chủng VK_{bt2}, VK_{bx} và VK_{bt1} với các loài có họ hàng gần dựa vào trình tự 16S; loài *Escherichia coli* làm nhóm ngoài.

Kết quả blast cho thấy, 3 chủng vi khuẩn VK_{bt1}, VK_{bt2} và VK_{bx} có độ tương đồng 98% với các gen tương đồng trên GenBank lần lượt là *Chryseobacterium defluvii, Chryseobacterium gleum* và *Pseudomonas aeruginosa.* Cây phát sinh chủng loại (hình 4) cho thấy, chủng vi khuẩn VK_{bt1} cùng nhánh với *Chryseobacterium defluvii* chỉ số bootrap đạt 88, chủng vi khuẩn VK_{bt2} cùng nhánh với *Chryseobacterium gleum* chỉ số bootrap đạt 87, chủng vi khuẩn VK_{bx} cùng nhánh với *Pseudomonas aeruginosa,* tuy nhiên chỉ số bootrap đạt 47. Từ kết quả blast và mức độ gần gũi trên cây phát sinh chủng loại có thể kết luận chủng vi khuẩn VK_{bt1} là *Chryseobacterium defluvii;* VK_{bt2} là *Chryseobacterium gleum.* Chủng vi khuẩn VK_{bx} tuy cùng nhánh với *Pseudomonas aeruginosa* nhưng có hệ số bootrap đạt 47, chỉ có thể kết luận thuộc chi *Pseudomonas* sp.

Chi *Pseudomonas* được cho là có khả năng sử dụng hydrocacbon bằng các emzym ngoại bào [8, 9], ngoài ra nấm men *Candida tropicalis* cũng được phân lập từ nước thải công nghiệp và cũng được cho là có khả năng phân hủy

các sản phẩm dầu mỏ [7, 8]. Việc định danh 6 chủng vi sinh vật trong tổ hợp vi sinh vật được làm giàu từ mẫu đất, bùn nhiễm dầu từ hai đơn vị trên địa bàn Quân khu 7 cho thấy chúng là các chủng có tiềm năng ứng dụng trong xử lý ô nhiễm dầu mỏ gây ô nhiễm môi trường.

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa một số chủng vi sinh vật phân lập: để hiểu rõ đặc điểm tập hợp chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu, đặc tính sinh lý sinh hóa đã được tiến hành nghiên cứu. Các kết quả về sự phát triển của các vi sinh vật phân lập được thử nghiệm với các điều kiện pH và nồng độ muối cũng như nhiệt độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Đặc điểm sinh hóa của một số chủng vi sinh vật phân lập.

Kết quả khảo sát 3 chủng vi khuẩn cho thấy, các chủng vi khuẩn có dải pH và nồng độ muối phù hợp để sinh trưởng phát triển hẹp hơn so với chủng nấm men. Với pH, các chủng vi khuẩn chủ yếu sinh trưởng tốt ở pH trung tính, còn ở pH kiềm và axít các chủng đều sinh trưởng yếu hơn hẳn. Với nồng độ NaCl, các chủng vi khuẩn chỉ thích hợp nồng độ muối loãng, cụ thể là 0,1%, nồng độ muối lớn hơn quá trình sinh trưởng của các chủng kém đi. Từ đồ thị về khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng của vi sinh vật ta thấy 3 chủng vi khuẩn có dải nhiệt độ tối ưu dao động từ 20 đến 28^{0}C, khi nhiệt độ trên 30^{0}C thì hoạt động giảm đi một nửa. Với 3 chủng nấm men, khoảng nhiệt độ khảo sát từ 20÷50^{0}C, theo đồ thị nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng là 22^{0}C. Khoảng nhiệt độ tối ưu dao động từ 20÷28^{0}C. Khoảng nhiệt độ của 3 vi khuẩn và 3 chủng nấm men phù hợp với dải nhiệt độ của khí hậu miền Nam (nhiệt độ trung bình năm 27,96^{0}C).

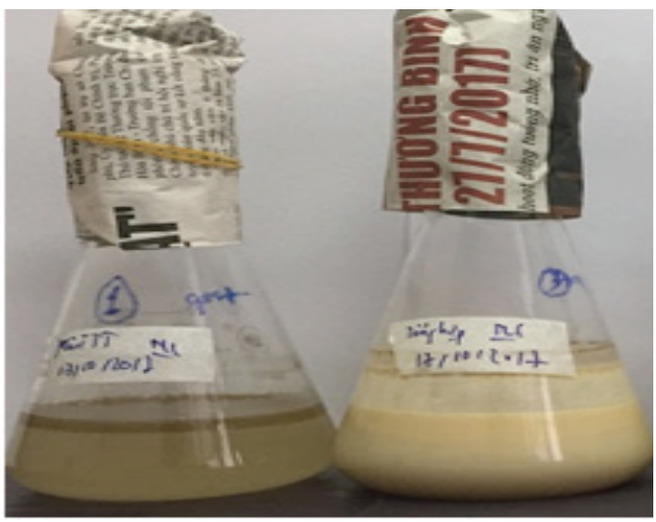
Đánh giá khả năng phân hủy dầu của tập hợp chủng vi sinh vật

Theo một số nhà khoa học, sử dụng tập hợp chủng vi sinh vật và vi sinh vật bản địa để xử lý ô nhiễm môi trường là hiệu quả [13, 14]. Với hàm lượng dầu bổ sung ban đầu 8,6 gam ở mẫu đối chứng và 8,61 gam ở mẫu thử nghiệm. Sau 9 ngày thử nghiệm kết quả phân hủy sinh học dầu thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng phân hủy dầu của các mẫu thử nghiệm.

TT	Thử nghiệm	Lượng dầu trước thử nghiệm (gam)	Lượng dầu sau thử nghiệm (gam)	% phân hủy
1	Mẫu đối chứng	8,6	8,6	0
2	Mẫu thử nghiệm	8,61	0,53	93,8

Kết quả bảng 2 cho thấy, sau 9 ngày xử lý tổ hợp vi sinh vật có khả năng phân hủy hơn 93% lượng dầu bổ sung. Theo Đỗ Văn Tuân và cs (2017) khi nghiên cứu về khả năng phân hủy dầu mỏ nhiễm trong nước thải của kho xăng dầu Đỗ Xá, Hà Nội bằng màng sinh học từ 6 chủng vi sinh vật gắn trên vật liệu mang phân hủy được 62% lượng dầu sau 5 ngày thử nghiệm và sau 7 ngày lượng dầu hầu hết đã được phân hủy [13].



(A) **(B)**

Hình 6. Ảnh thử nghiệm khả năng phân hủy dầu của các mẫu sau 9 ngày thử nghiệm. (A) Mẫu đối chứng; **(B)** Mẫu thử nghiệm.

Theo Sunday và cs (2014) tập hợp 9 chủng vi sinh vật phân lập tại một dòng sông bị ô nhiễm ở Nigeria có khả năng phân hủy lần lượt 78, 85 và 88% tương ứng dầu thô,

dầu diesel và dầu hỏa sau 14 ngày thử nghiệm [14]. Nhìn vào số liệu trên cho thấy, tập hợp chủng trong nghiên cứu của tác giả Đỗ Văn Tuân có khả năng phân hủy dầu mạnh hơn cả. Tuy nhiên, khi xét đến thành phần dầu mỏ sử dụng làm nguồn cơ chất cho thử nghiệm ta thấy, tác giả Đỗ Văn Tuân lấy nguồn dầu mỏ gây ô nhiễm trong nước thải của kho xăng dầu chủ yếu là ankan mạch thẳng. Các hợp chất này dễ được phân hủy sinh học hơn so với các hợp chất mạch vòng có trong dầu thô, điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu về khả năng phân hủy dầu mỏ và các hợp chất có nguồn gốc dầu mỏ của tác giả Sunday. Do đó, sự so sánh ở trên cũng chưa hoàn toàn đầy đủ để có thể kết luận chính xác về khả năng phân hủy của các tập hợp chủng được phân lập ở các mẫu và địa điểm khác nhau trong nghiên cứu này.

Kết luận

Đã tuyển chọn được tổ hợp vi sinh vật gồm 3 chủng vi khuẩn và 3 nấm men có khả năng phân hủy khoảng 93% hàm lượng dầu bổ sung sau 9 ngày thử nghiệm.

Các chủng vi sinh vật có dải nhiệt độ tối ưu từ 22÷30^{0}C, phát triển tốt ở pH trung tính và nồng độ NaCl thấp 0,1%. Các đặc điểm sinh học của vi sinh vật phù hợp với điều kiện khí hậu khu vực TP Hồ Chí Minh.

Đã định danh được 6 chủng vi sinh vật bằng kỹ thuật sinh học phân tử: chủng VKbt1 được đặt tên là *Chryseobacterium defluvii* VKbt1*;* chủng VKbt2 được đặt tên là *Chryseobacterium gleum* VKbt2*;* chủng VKbx được đặt tên là *Pseudomonas* sp. VKbx; chủng NMbt1 được đặt tên là *Pichia jadinii* NMbt1*;* chủng NMbt2 và NMbx được đặt tên là *Candida tropicalis* NMbt2, *Candida tropicalis* NMbx, tương ứng. Với khả năng phân huỷ cao, tập hợp các chủng vi sinh vật tuyển chọn trên có thể ứng dụng để xử lý môi trường nước, đất nhiễm dầu trên địa bàn Quân khu 7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Nguyễn Bá Diễn (2008), "Tổng quan pháp luật Việt Nam về phòng, chống ô nhiễm dầu ở các vùng biển", *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Kinh tế - Luật*, **24**, tr.224-238.

[2] Lê Thị Thoa, Đinh Ngọc Tấn, Đỗ Thúy Nga (2004), *Nghiên cứu công nghệ xử lý nước thải chứa dầu, mỡ bằng phương pháp hấp phụ và sinh học*, Hội nghị khoa học về môi trường lần thứ nhất, Trung tâm Khoa học kỹ thuật và Công nghệ quân sự, tr.232-237.

[3] Đỗ Ngọc Khuê (2004), *Nghiên cứu thử nghiệm các chế phẩm sinh học nâng cao hiệu quả các công trình xử lý nước thải công nghiệp đang triển khai tại các cơ sở quốc phòng*, Báo cáo kết quả nghiên cứu khoa học, KC.04.10.

[4] Vũ Thị Thanh, Lê Thị Nhi Công, Nghiêm Ngọc Minh (2014), "Nghiên cứu khả năng phân hủy phenol của các chủng vi khuẩn DX3 phân lập từ nước thải kho xăng dầu Đỗ Xá, Hà Nội", *Tạp chí Sinh học*, **36(1)**, tr.28-33.

[5] Đặng Thị Cẩm Hà (2004), *Báo cáo tổng kết đề tài "Nghiên cứu làm sạch ô nhiễm dầu mỏ vùng đất đá ven biển và cặn dầu bằng phương pháp phân hủy sinh học quy mô pilot,* nhánh đề tài KHCK 04-02, tr.33-34.

[6] R.M. Atlas, A.E. Brown, L.C. Parks Mosby-Year book (1995), *Laboratory manual experimental microbiology Inc*. USA.

[7] Boutheina Gargouri, Najla Mhiri, Fatma Karray, Fathi Aloui, and Sami Sayadi (2015), "Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater", *BioMed. Research International*, **2015**, pp.1-11.

[8] Nilanjana Das and Preethy Chandran (2011), "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", *Biotechnology Research International*, **2011**, pp.1-13.

[9] Magdalena Pacwa Płociniczak, Grażyna Anna Płaza, Anna Poliwoda, Zofia Piotrowska Seget (2014), "Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing Pseudomonas sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil", *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, pp.9385-9395.

[10] R.M. Atlas and R. Bartha (1992), "Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation", *Advances in Microbial Ecology,* **12**, pp.287-338.

[11] http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/nammen01.htm.

[12] Hoa Kieu Thi Quynh, Yen Nguyen Thi, Yen Dang Thi (2016), "The ability of crude oil degradation and bio-surfactant production by an yeast strain (1214-bk14) isolated from producing oil well at white tiger oil field, Vung Tau, Vietnam", *Biotechnology Journals*, **38(2)**, pp.179-185.

[13] Đỗ Văn Tuân, Lê Thị Nhi Công, Đỗ Thị Liên, Đồng Văn Quyền (2017), "Đánh giá khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon trong nước thải nhiễm dầu tại kho xăng dầu Đỗ Xá, Hà Nội bằng màng sinh học từ vi sinh vật gắn trên vật liệu mang xơ dừa", *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ,* **33(2S)**, tr.274-279.

[14] A. Adebusoye Sunday, et al. (2007), "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23(8)**, pp.1149-1159.