

HIỆU QUẢ CỦA VIỆC BỔ SUNG NITƠ ĐẾN KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HYDROCACBON DẦU MỎ TRONG ĐẤT/CÁT Ô NHIỄM CỦA TẬP HỢP CHỪNG NẤM MEN

Nguyễn Thị Diễm Quỳnh¹, Nguyễn Thị Yên¹, Nguyễn Minh Phương³,
Trần Hương Ly¹, Đinh Văn Tài¹, Kiều Thị Quỳnh Hoa^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Học Viện khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

³Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

TÓM TẮT

Phân hủy sinh học (Bioremediation) đất/cát ô nhiễm dầu bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như hàm lượng nitơ (N), photpho (P), kali (K), oxy, độ ẩm... Trong số các yếu tố này, N được xem là yếu tố chính ảnh hưởng đến hiệu quả và tốc độ phân hủy hydrocacbon dầu mỏ của vi sinh vật. N trong đất/cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ thường bị hạn chế do quá trình rửa trôi hoặc khử nitrat. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến quá trình phân hủy sinh học đất ô nhiễm dầu thô của tập hợp gồm 3 chủng nấm men (DSNM1, VNNM1 và NTN6) được phân lập từ nước biển ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ. Cả ba chủng này có hiệu quả phân hủy dầu thô và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học tốt trên hai nguồn N là NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến sinh trưởng và phân hủy dầu thô cho thấy, tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phân hủy dầu tốt trong đất với hàm lượng N là 500 - 1000 mg/kg, tốt nhất là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong đất bổ sung 500 và 1000 mgN/kg ở thời điểm ban đầu (0) là $1,1 \times 10^7$ MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ $7,5 \times 10^6$ - $7,5 \times 10^7$ MPN/g trong đất bổ sung 500 mgN/kg và $4,6 \times 10^7$ - $4,6 \times 10^8$ (MPN/g) trong đất bổ sung 1000 mg N/kg. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men là 48,3% khi không bổ sung N (0 mg N/kg); 74,5% khi bổ sung 500 mg N/kg; 89% khi bổ sung 1000 mg N/kg; 61% khi bổ sung 1500 mg N/kg. Kết quả nghiên cứu khẳng định tiềm năng phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men cũng như tác dụng của việc bổ sung N nhằm thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của chúng từ đó nâng cao hiệu quả phân hủy dầu.

Từ khóa: Bổ sung nitơ (N), đất/cát ô nhiễm dầu, dầu thô, nấm men, phân hủy sinh học.

MỞ ĐẦU

Bên cạnh những lợi ích kinh tế, các hoạt động thăm dò, khai thác và vận chuyển hydrocacbon dầu mỏ chứa đựng nhiều nguy cơ gây ô nhiễm môi trường do các sự cố tràn dầu gây ra. Hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm không chỉ gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến con người, sinh vật và hệ sinh thái biển (vùng triều bãi cát ven biển, rừng ngập mặn, rạn san hô, đầm phá...) mà còn tác động tới kinh tế biển thông qua các ngành du lịch và nuôi trồng thủy hải sản (Lim *et al.*, 2016). Do đó, việc xử lý ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ ô nhiễm từ các sự cố tràn dầu là cấp thiết.

Mặc dù phương pháp vật lý/cơ học (ngăn chặn, thu gom, làm đất, đốt tại chỗ, hấp phụ...) và hóa học (sử dụng chất phân tán, chất keo tụ, chất làm đông...) mang lại những hiệu quả nhất định nhưng các phương pháp này có chi phí xử lý cao do sử dụng hóa chất, vật liệu đắt tiền đồng thời gây ra ô nhiễm thứ cấp cho môi trường (Lại Thúy Hiền, 2011; Lim *et al.*, 2016). Với các ưu điểm như giá thành phù hợp, xử lý triệt để, không gây ô nhiễm thứ cấp, an toàn và thân thiện với môi trường, phương pháp phân hủy hydrocacbon dầu mỏ sinh học (Bioremediation) bằng vi sinh vật đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trong và ngoài nước (Edward *et al.*, 2007). Tuy nhiên, để thúc đẩy tốc độ, rút ngắn thời gian xử lý, cần nghiên cứu điều kiện phù hợp cho sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật phân hủy dầu.

Trong quá trình sinh trưởng, phát triển hình thành tế bào mới, N và P được xem như yếu tố không thể thiếu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật nói chung và VSV phân hủy dầu nói riêng vì đây là yếu tố tiên quyết, ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy dầu sinh học (Sawadogo *et al.*, 2016).

Sử dụng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) để xử lý đất, cát/trầm tích ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ có thể được ứng dụng ngay tại vùng ô nhiễm hoặc bên ngoài vùng ô nhiễm. So với các phương pháp khác,

phương pháp này an toàn và ít tốn kém hơn do đó, hiện được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu (Hamzah *et al.*, 2017).

Tuy nhiên, đất ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ thường bị hạn chế dinh dưỡng do nguồn cacbon chủ yếu là hydrocacbon dầu mỏ khó phân hủy và đặc biệt là nguồn chất dinh dưỡng cần thiết khác như N, P, K và các nguyên tố vi lượng khác bị hạn chế (Njoku *et al.*, 2012). Trong số các yếu tố kể trên, N được cho là chất dinh dưỡng quan trọng nhất ảnh hưởng tới tốc độ và hiệu quả phân hủy hydrocacbon dầu mỏ khi sử dụng phương pháp Bioremediation để xử lý đất, cát, trầm tích hay nước ô nhiễm dầu. Hàm lượng N bị hạn chế là do N trong đất có thể bị rửa trôi khi ở dạng nitrat (NO_3^-) và bay hơi khi ở dạng NH_3 hay N bị khử thành khí N_2O và N_2 (Okolo *et al.*, 2005). Hơn nữa, ở những nơi ô nhiễm hydrocarbon, hàm lượng cacbon cao sẽ nhanh chóng làm cạn kiệt các chất dinh dưỡng vô cơ khác như N, P và K.

Hiện các nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm men phân hủy dầu trong đất, cát/trầm tích ô nhiễm dầu vẫn còn hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá: (1) Ảnh hưởng của các hàm lượng N ban đầu tới sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men; và (2) Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N tới hiệu quả phân hủy đất/cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men này bằng phương pháp phân hủy sinh học

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Tập hợp gồm 3 chủng nấm men biển (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được phân lập lần lượt tại biển Hải Phòng (DSNM1), Vũng Tàu (VTNM1) và Nha Trang (NTNM16) có khả năng sinh trưởng và phát triển trên nguồn cơ chất dầu thô và có khả năng sinh trưởng và tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học (CHĐBMSH) tốt trên nguồn N là NH_4Cl và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Môi trường phân lập là Hansen (g/L): Glucose 30; MgSO_4 2; pepton 10; NaCl 20; agar 18; pH6 và môi trường khoáng tối thiểu (mineral salt medium-MSM) (g/L): KH_2PO_4 0,5; MgCl_2 1; MgSO_4 0,5; NaCl 20 có nguồn cacbon (dầu thô) và N phù hợp, pH6. Các chủng nghiên cứu được nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C. Dầu thô do xí nghiệp khai thác dầu khí, Liên doanh Việt Nga, Vietsovpetro cung cấp. Cát ở vùng triều cao, bãi biển (Khu 1) Đồ Sơn, Hải Phòng được sử dụng cho thí nghiệm. Các đặc tính vật lý và dinh dưỡng ban đầu của cát thí nghiệm được phân tích.

Phương pháp

Xác định số lượng nấm men bằng phương pháp pha loãng tới hạn MPN (most probable number) (Man, 1983). Phân tích khả năng phân hủy dầu thô bằng phương pháp cân khối lượng (Latha và Kalaivani, 2012). Đánh giá khả năng tổng hợp CHĐBMSH của tập hợp chủng nấm men bằng chỉ số nhũ hóa với xylene (E_{24}) (Cooper, 2003).

Thiết lập mô hình thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến sinh trưởng và khả năng phân hủy dầu của tập hợp chủng nấm men phân hủy hydrocacbon dầu mỏ

❖ Chuẩn bị cát thí nghiệm

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

(1) Đối chứng: Cát vô trùng nhiễm dầu thô nhân tạo được bổ sung nước khử ion vô trùng để duy trì hàm lượng nước 20% wt, các hộp đối chứng không bổ sung nấm men và chất dinh dưỡng N, P.

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

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

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

Đối với mỗi phương thức xử lý, các thí nghiệm được tiến hành trong các hộp nhựa. Các thí nghiệm đều được lặp lại 02 lần. Mỗi hộp nhựa chứa 500 g cát và 100 g nước khử ion vô trùng (để hàm lượng nước đạt 20% wt). Các hộp nhựa được nuôi cấy tĩnh trong 10 tuần ở nhiệt độ phòng. Độ ẩm của cát được theo dõi định kỳ bằng máy đo độ ẩm và nước trong các hộp được cung cấp định kỳ để giữ hàm lượng nước ổn định. Cát bên trong các hộp thí nghiệm được đảo trộn 2 lần/tuần để đảm bảo cung cấp đầy đủ không khí và O₂. Các mẫu cát được lấy lần lượt ở các thời điểm 0, 2, 4, 6, và 8 tuần thí nghiệm. Mẫu cát được bảo quản ở 4°C để phân tích vi sinh và -20°C để phân tích hàm lượng dầu thô.

Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men tiềm năng bằng phương pháp MPN (most probable number)

Khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) được đánh giá qua số lượng nấm men thu được từ các mẫu cát ô nhiễm dầu sau 0, 2, 4, 6, và 8 tuần nuôi cấy (Man, 1983): 2 g cát được đồng nhất trong 18 mL dung dịch muối sinh lý (0,85%, w/v) vô trùng trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút, với thời gian 1 giờ. Dịch cát sau khi đồng nhất được pha loãng hệ số bậc 10 tùy theo mật độ của nấm men có trong mẫu phân tích. Sau đó, 0,5 mL dịch cát ở các nồng độ pha loãng sau khi đồng nhất được cấy chuyển vào các ống nuôi cấy đầy nắp kín (12 mL) chứa 4,5 mL môi trường khoáng. 45 µL dầu thô được bổ sung vào mỗi ống môi trường nuôi cấy như nguồn cacbon duy nhất. Các mẫu cấy phân hủy dầu thô được nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 tuần. Sau đó, sử dụng INT (iodonitrotozolium violet) để xác định các mẫu dương tính. Sau 2 tuần nuôi cấy, INT được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy. Nếu xuất hiện màu đỏ khi bổ sung INT thì ống nuôi cấy dương tính, không màu là âm tính. Xác định mật độ nấm men phân hủy dầu bằng phương pháp MPN thích hợp và được biểu thị bằng log₁₀ MPN/g cát khô.

Đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng phân hủy cát ô nhiễm dầu của tập hợp chủng nấm men thông qua xác định hàm lượng dầu thô tổng số

Hiệu quả phân hủy dầu của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu được đánh giá thông qua phương pháp xác định dầu thô tổng số từ các mẫu cát ô nhiễm dầu sau 0 và 8 tuần thí nghiệm.

❖ **Phương pháp xác định dầu thô tổng số (TPH)**

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

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

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các nguồn N khác nhau đến khả năng tổng hợp CHĐBMSH của tập hợp chủng nấm men trên nguồn cơ chất dầu thô

Kết quả phân tích hàm lượng C, N, P trong cát sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 2. Kết quả cho thấy hàm lượng N, P thấp vì vậy cần thiết bổ sung N và P vô cơ để nâng cao khả năng phân hủy của chủng nấm men nghiên cứu. Để tìm nguồn N thích hợp, từng chủng nấm men được nuôi lắc trên môi trường khoáng bổ sung các nguồn N khác nhau (0,3% (w/v): KNO₃; (NH₄)₂SO₄; NH₄NO₃; NaNO₃; NH₄Cl; (NH₄)₂HPO₄). Các điều kiện nuôi cấy kèm theo: 2% (w/v) NaCl, 2% (v/v) giống, pH 6 và 30°C, hàm lượng dầu thô bổ sung vào môi trường khoáng nuôi cấy 3 chủng nấm men DSNM1, VTNM1 và NTNM6 lần lượt là 3%, 3% và 2% (w/v). Kết quả cho thấy, 3 chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) có khả năng tổng hợp CHĐBMSH cao và ổn định nhất trên nguồn N là NH₄Cl và (NH₄)₂SO₄ (Bảng 1). Do đó, NH₄Cl và (NH₄)₂SO₄ được lựa chọn là nguồn N cho nghiên cứu này.

Bảng 1. CHĐBMSH được tổng hợp bởi 3 chủng nấm men được xác định bằng chỉ số nhũ hóa E₂₄ (%)

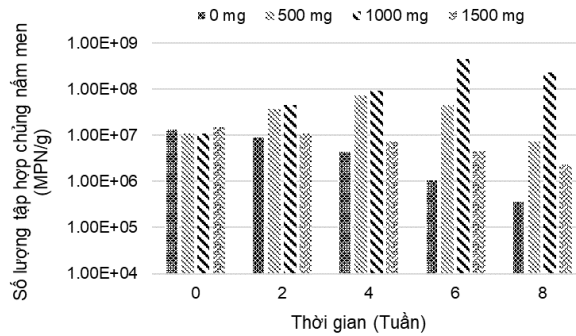
Chủng nấm men	Nguồn N					
	KNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃	NH ₄ Cl	(NH ₄) ₂ HPO ₄
DS-NM1	0,0	64,0	63,0	14,0	58,5	50,0
NTNM16	8,0	51,4	53,2	30,0	61,2	52,0
VTNM1	45,0	37,0	39,0	27,0	63,4	42,0

Bảng 2. Hàm lượng chất dinh dưỡng (C, N, P, K) trong cát tự nhiên sử dụng cho thí nghiệm

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

Ảnh hưởng của hàm lượng N đến khả năng sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men nghiên cứu

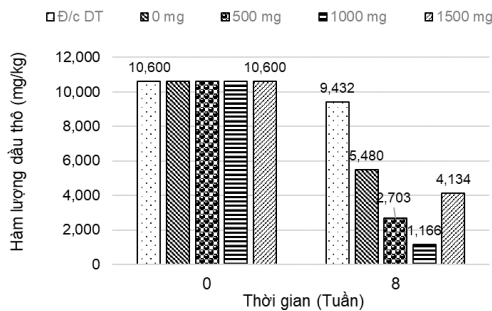
Số lượng chủng nấm men phân hủy dầu trong cát ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 0, 2, 4, 6, và 8 và tuần thử nghiệm được đánh giá bằng phương pháp MPN (Hình 1).



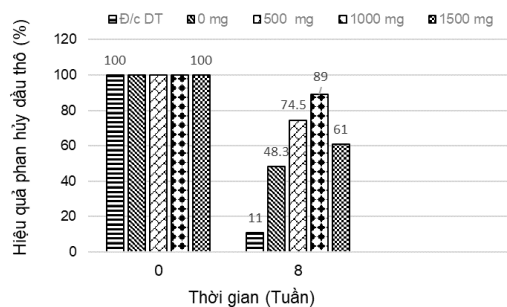
Hình 1. Sinh trưởng và phát triển của tập hợp chủng nấm men trong mô hình xử lý cát ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) với hàm lượng N khác nhau

Kết quả (Hình 1) cho thấy, tập hợp chủng nấm men sinh trưởng và phát triển tốt trong cát ô nhiễm dầu thô có bổ sung hàm lượng N là 500-1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mg N/kg ở thời điểm ban đầu (0) là 1,1×10⁷ MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ 7,5 × 10⁶ - 7,5 × 10⁷ MPN/g trong cát bổ sung 500 mg N/kg và 4,6×10⁷ - 4,6×10⁸ (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Tập hợp chủng nấm men đạt số lượng cao nhất từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 6 trong cát ô nhiễm dầu có bổ sung hàm lượng N là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men ở hai nghiệm thức không bổ sung N và bổ sung N với hàm lượng là 1500 mg/kg đều giảm theo thời gian từ 1,1×10⁷ MPN/g ở thời điểm ban đầu (0) xuống chỉ còn lần lượt là 3,8 × 10⁵ MPN/g (0 mg/kg) và 2,3×10⁶ MPN/g (1500 mg/kg) sau 8 tuần thử nghiệm. Kết quả này cho thấy vai trò của N trong quá trình phân hủy cát ô nhiễm dầu bằng phương pháp Bioremediation. Tuy nhiên, hàm lượng N phù hợp với tập hợp chủng nấm men trong nghiên cứu này từ 500 đến 1000 mg/kg. Nếu thấp dưới 500 mg N/kg số lượng nấm men sẽ suy giảm do thiếu chất dinh dưỡng. Còn lớn hơn 1000 mgN/kg, nấm men có thể bị ức chế do hàm lượng N dư thừa.

Khả năng phân hủy hydrocacbon dầu mỏ (dầu thô) của tập hợp chủng nấm men trong cát bổ sung N với hàm lượng khác nhau



Hình 2. Hàm lượng dầu thô tổng số trong thí nghiệm với các hàm lượng N khác nhau sau 8 tuần



Hình 3. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men sau 8 tuần

Kết quả (Hình 2 và 3) cho thấy, sau 8 tuần thí nghiệm, hàm lượng dầu thô tổng số (TPH-total petroleum hydrocarbons) giảm từ 10.600 mg/kg cát xuống còn 9432, 5480, 2703, 1166 và 4134 mg/kg lần lượt với thí nghiệm đối chứng (không bổ sung N) và bổ sung N với hàm lượng lần lượt là 0, 500, 1000 và 1500 mg N/kg cát. Hiệu quả phân hủy dầu tương ứng là 11; 48,3; 74,5; 89; 61%. Cả hai phương thức thúc đẩy sinh học (BA) (chỉ bổ sung tập hợp chủng nấm men không bổ sung N) và kết hợp thúc đẩy và kích thích sinh học (BA + BS) (bổ sung tập hợp chủng nấm men và N với hàm lượng khác nhau) đều có khả năng phân hủy TPH sinh học so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên, kết hợp BA+BS cho hiệu quả cao hơn. Điều này một lần nữa khẳng định việc bổ sung chất dinh dưỡng (N, P) là phương pháp hiệu quả giúp tăng cường khả năng phân hủy dầu của vi sinh vật nói chung và nấm men nói riêng. Trong nghiên cứu này, hàm lượng N phù hợp cho quá trình phân hủy sinh học Bioremediation của tập hợp chủng nấm men (DSNM1, VTNM1, và NTNM16) là 500 - 1000 mg N/kg cát tương đương với tỷ lệ C:N:P là 100:5:1 và 100:10:1. Điều này phù hợp với các nghiên cứu của cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (US, EPA, 2002) thông báo rằng tỷ lệ C:N:P thích hợp để xử lý đất, cát/trầm tích ô nhiễm dầu là 100:10:1, tỷ lệ này giúp quần thể VSV phân hủy dầu hoạt động tối ưu. Cát nhiễm dầu được xử lý bằng phương pháp kết hợp BA+BS cho thấy, số lượng nấm men cao hơn so với cát không được xử lý (mẫu đối chứng) hoặc cát được xử lý bằng phương pháp BA (Hình 1). Điều này cũng được minh chứng bằng hiệu quả phân hủy dầu. Nguyên nhân là do khi tỷ lệ C: N: P được cung cấp phù hợp dẫn tới kích thích sự sinh trưởng và phát triển khả năng phân hủy dầu của các chủng vi sinh vật (Atlas and Bragg, 2009). Hiệu quả phân hủy TPH của chủng tập hợp chủng nấm men lần lượt đạt 48,3% (BA); 74,5% (BA+BS; 500 mg N/kg); 89% (BA+BS; 1000 mg N/kg) và 61% (BA+BS; 1500 mg N/kg). Phương thức phân hủy BA (chỉ bổ sung vi sinh vật) được cho là hữu ích cho việc thúc đẩy sự phân hủy ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý đặc biệt là ở các khu vực mới ô nhiễm, khi VSV phân hủy dầu có mật độ thấp hoặc không có VSV phân hủy dầu do chưa thích nghi được với môi trường ô nhiễm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, sự kết hợp giữa hai phương thức BA và BS đem lại hiệu quả xử lý dầu tốt nhất (Suja *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, sau 8 tuần thí nghiệm, số lượng của tập hợp chủng nấm men giảm (Hình 1), nguyên nhân có thể là do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, do đặc tính của đất, cát/trầm tích ô nhiễm.

KẾT LUẬN

Tập hợp 3 chủng nấm men DSNM1, VTNM1, NTNM16 sinh trưởng và phân hủy dầu tốt với hàm lượng N là 500 - 1000 mg/kg, tốt nhất là 1000 mg/kg. Số lượng nấm men trong cát bổ sung 500 và 1000 mg N/kg ở thời điểm ban đầu (0) là $1,1 \times 10^7$ MPN/g. Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, số lượng nấm men dao động từ $7,5 \times 10^6$ - $7,5 \times 10^7$ MPN/g trong cát bổ sung 500 mg N/kg và $4,6 \times 10^7$ - $4,6 \times 10^8$ (MPN/g) trong cát bổ sung 1000 mg N/kg. Với các thí nghiệm không bổ sung N hoặc bổ sung 1500 mg N/kg, số lượng nấm men giảm dần theo thời gian là $3,8 \times 10^5$ MPN/g (BA; 0 mgN/kg) và $2,3 \times 10^6$ MPN/g (1500 mg N/kg) sau 8 tuần. Hiệu quả phân hủy dầu thô của tập hợp chủng nấm men là 11; 48,3; 74,5; 89; 61% tương ứng lần lượt với mẫu cát đối chứng, cát bổ sung N với hàm lượng lần lượt là 0, 500, 1000 và 1500 mg N/kg.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được cung cấp bởi nhiệm vụ Thủ tướng giao cho Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số CP 1862.02/20-22.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Atlas R and Bragg J (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not-the Exxon Valdez experience. *Microb Biotechnol*, 2 (2): 213-221.
- Cooper DG, Cavalero DA (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. *J Biotechnol*, 103: 31-41.
- Edward G, Pattanathu K, S, M, Rahman Mohamed H (2007) Microbial Biosurfactants: Review. *J Mar Atmos Res*, 3 (2): 1-17.
- Hamzah A, Manikan V, Abd Aziz N.A.F (2017). Biodegradation of Tapis Crude Oil Using Consortium of Bacteria and Fungi: Optimization of Crude Oil Concentration and Duration of Incubation by Response Surface Methodology. *Sains Malaysiana*, 46(1):43-50.
- Lại Thúy Hiền (2011) *Giáo trình vi sinh vật dầu mỏ*. Nhà xuất bản Tự nhiên và Công nghệ, tr 99-100.
- Latha R, Kalaivani R (2012). Bacterial Degradation of Crude Oil by Gravimetric Analysis. *Adv Appl SciRes*, 3 (5): 2789-2795.
- Lim MW, Lau EV, Poh PE (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - Present works and future directions. *Mar pollut bull*, 109 (1):14-45.
- Man D.J.C (1983). MPN tables, corrected. *Eur J ApplMicrobiolBiotechnol*, 17: 301-305.
- Njoku K.L, Akinola M.O, Obob B.O (2012). Phytoremediation of crude oil polluted soil: effect of cow dung augmentation on the remediation of crude oil polluted soil by glycine max. *Res J of Appl Sci*, 8 (1): 277-282.
- Okolo JC, Amadi EN, Odu CTI (2005). Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. *Appl Ecol and Environ Research*, 3 (1): 47-53.
- Sawadogo A, Otoiobiga HC, Nitiema LW (2016). Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of SAE 40/50 Used Oils and Diesel. *J AgricCheand Environ*, 5: 1-11.
- Suja F, Rahim, F, Taha MR, Hambani N (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations, *Int Biodeterior and Biodegradation*, 90: 115-122.

EFFECT OF NITROGEN ADDITION ON BIOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBON CONTAMINATED SOIL/SAND BY A YEAST CONSORTIUM

Nguyen Thi Diem Quynh¹, Nguyen Thi Yen¹, Nguyen Minh Phuong³,
Tran Hường Ly¹, Dinh Van Tai¹, Kieu Thi Quynh Hoa^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi*

³*Faculty of Environmental Sciences, University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

SUMMARY

Bioremediation of oil-contaminated sand/soil is dependent upon several factors that commonly affect biodegradation processes, such as content of N, P, oxygen and moisture, temperature... A characteristic of oil-contaminated sand/soil is its high concentration in carbon compared to the concentration of N and P. Nitrogen is particularly expected to affect degradation rates and extents, since soils commonly lose nitrogen due to nitrogen leaching and/or due to denitrification processes. Therefore, N and P is usually, the limiting nutrient in soil/sand and the addition of these nutrients in soil/sand bioremediation are necessary to stimulate oil biodegradation. The effect of nitrogen concentrations on the bioremediation of crude oil-contaminated sand by a yeast consortium was investigated in this study. The yeast consortium of three strains (DSNM1, VTNM1, and NTN6) that were isolated from oil-contaminated marine sites. The high ability of crude oil degradation and biosurfactant production by these three strains was determined with suitable nitrogen sources (NH₄Cl and (NH₄)₂SO₄). The effect of different nitrogen concentrations on growth and crude oil-degrading efficiency of the yeast consortium was evaluated in this study. Results showed bioaugmentation (0 mg N/kg) and biostimulation (500, 1000, and 1500 mg N/kg), respectively promoted 48.3; 74.5; 89 and 61%. However, the number of yeast consortium of all experiments decreased after 8 weeks. Therefore, in order to maintain a stable oil degradation efficiency, it is necessary to periodically add N with appropriate concentration during the bioremediation process. The results confirm the crude oil degradation potential of the yeast consortium as well as the effect of nitrogen additions in simulating the growth of three yeast strain, thereby improving the oil biodegradation efficiency.

Keywords: Bioremediation, crude oil, nitrogen addition (N), oil-contaminated soil/sand, yeast.

* Author for correspondence: Tel: 02437562000; Email: kieuithiquynhhoa@gmail.com/ktquynhhoa@ibt.ac.vn