

## NÂNG CAO HIỆU QUẢ XỬ LÝ NƯỚC Ô NHIỄM DẦU BẰNG CHỦNG *BACILLUS* CỐ ĐỊNH LÊN XÓP POLYURETHANE (PUF)

Kiều Thị Quỳnh Hoa<sup>1,3,✉</sup>, Nguyễn Vũ Giang<sup>2,3</sup>, Nguyễn Thị Yên<sup>1</sup>, Mai Đức Huynh<sup>2</sup>, Nguyễn Hữu Đạt<sup>2</sup>, Vương Thị Nga<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Hà<sup>1</sup>, Phạm Thị Phụng<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

<sup>3</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ktquynhhoa@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 15.11.2019

Ngày nhận đăng: 20.02.2020

### TÓM TẮT

Quá trình khai thác và vận chuyển hydrocarbon dầu mỏ gây ô nhiễm đất và nước ảnh hưởng nghiêm trọng tới môi trường biển và sức khỏe của con người. Hiện nay, ứng dụng phương pháp phân hủy sinh học để xử lý đất, nước ô nhiễm dầu được xem là phương pháp hiệu quả, an toàn và thân thiện với môi trường. Tuy nhiên, để tăng khả năng sống sót và duy trì ổn định số lượng cũng như hoạt tính của các tác nhân phân hủy sinh học tại các vùng ô nhiễm, vi sinh vật (VSV) cần được cố định lên chất mang. Khả năng phân hủy dầu của VSV cố định lên chất mang đã được minh chứng là tốt hơn so với VSV ở trạng thái tự do. Trong nghiên cứu này, khả năng cố định chủng *Bacillus* sp. VTVK15 lên xốp polyurethane (PUF) đã được đánh giá. Hiệu quả cố định lên PUF của chủng *Bacillus* sp. VTVK15 đạt 92% tương đương với  $(5,38 \pm 0,12) \times 10^8$  CFU/g sau 8 ngày cố định. Kết quả phân tích GC/MS cho thấy, chủng *Bacillus* sp. VTVK15 được cố định lên PUF có khả năng phân hủy hydrocarbon là 90%, tốt hơn 25% so với ở trạng thái tự do không được cố định (65%) sau 14 ngày. Điều này minh chứng tiềm năng ứng dụng chủng *Bacillus* sp. VTVK15 cố định lên PUF trong xử lý ô nhiễm hydrocarbon dầu mỏ ở vùng nước mở ven biển bằng phương pháp phân hủy sinh học (Bioremediation).

**Từ khóa:** *Bacillus*, chủng VTVK15, cố định, phân hủy hydrocarbon dầu mỏ, phân hủy sinh học, xốp polyurethane

### MỞ ĐẦU

Cùng với sự phát triển kinh tế, nhu cầu về năng lượng của Việt Nam ngày càng gia tăng. Việc khai thác và sử dụng mạnh mẽ dầu mỏ trong mọi lĩnh vực đang thúc đẩy quá trình công nghiệp hóa, hiện đại hóa của đất nước nhưng đồng thời cũng tạo ra nguy cơ làm ô nhiễm môi trường do tràn dầu dẫn đến mất cân bằng sinh thái.

Khi có sự cố tràn dầu trên biển, do dầu tràn lan nhanh trên mặt nước nên lượng dầu thu hồi được bằng các phương pháp vật lý và cơ học truyền thống như sử dụng phao vây dầu, bơm hút dầu, vật liệu hấp phụ, chất phân tán... thường thấp, lượng dầu còn lại bị sóng đánh vào bờ gây ô nhiễm đất, cát, trầm tích ở vùng triều ven biển (Merv Fingas, 2013).

Trong số các phương pháp được ứng dụng để khắc phục ô nhiễm dầu tràn ở vùng triều ven biển

như loại bỏ cơ khí, làm lại đất, tẩy rửa... biện pháp phân hủy sinh học (Bioremediation) bằng VSV đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ứng dụng thành công ở nhiều nước trên thế giới do phân hủy triệt để hydrocarbon dầu mỏ, chi phí thấp và không gây ảnh hưởng độc hại tới môi trường. Đây là phương pháp bổ sung VSV phân hủy dầu và chất dinh dưỡng (nitrogen, phosphorous...) vào môi trường ô nhiễm nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học hydrocarbon dầu mỏ. Trong quá trình này, các VSV sẽ đồng hóa các hydrocarbon dầu mỏ độc hại thành sinh khối tế bào và giải phóng ra các sản phẩm không độc hại như H<sub>2</sub>O và CO<sub>2</sub> (Rosenberg Ron, 2014; Ndimele *et al.*, 2018).

Tuy nhiên, khó khăn thường gặp phải khi ứng dụng phương pháp phân hủy sinh học để xử lý dầu tràn ở vùng triều ven biển, đặc biệt là vùng gian triều (nơi chịu tác động của sóng, gió, thủy triều) là VSV bổ sung vào môi trường ô nhiễm thường bị kết tủa (do không có thiết bị khuấy cơ học sẵn có) hay rửa trôi (do hòa tan vào nước biển). Vì vậy, khả năng tiếp xúc của VSV với dầu ô nhiễm thường thấp. Do đó, VSV cần được cố định lên chất mang để giúp chúng có thể khu trú tại giao diện nước-dầu nơi diễn ra quá trình phân hủy hydrocarbon dầu mỏ. Việc cố định VSV còn giúp cải thiện khả năng sống sót, duy trì ổn định số lượng cũng như hoạt tính của các VSV này, đồng thời bảo vệ chúng khỏi điều kiện môi trường khắc nghiệt (Ma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

Các nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam đã minh chứng, sử dụng các chất mang để cố định VSV giúp nâng cao hiệu quả xử lý đất, nước ô nhiễm dầu (Liu *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Lại Thúy Hiền, Vương Thị Nga, 2014; Lê Thị Nhi Công *et al.*, 2015). Do đó, việc nghiên cứu lựa chọn thêm các chất mang tốt, phù hợp để cố định VSV là cần thiết nhằm mở rộng ứng dụng phương pháp phân hủy sinh học.

Ngoài các ưu điểm như có khả năng cố định lượng lớn tế bào VSV, nổi trên bề mặt nước, có tính ổn định cơ học cao, không tan trong nước, giá thành phù hợp và không độc đối với môi trường sinh thái, PUF (chất hữu cơ tổng

hợp) được lựa chọn còn có khả năng hấp phụ, ổn định sinh học và hóa học, có khả năng khuếch tán cao, có tính kỵ nước, ưa dầu, độ rỗng (xốp). Hơn nữa, khả năng kiểm soát các đặc tính hóa lý của vật liệu này giúp VSV dễ dàng tiếp xúc với phân tử dầu để thực hiện quá trình phân hủy. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá (1) hiệu suất cố định chủng *Bacillus* lên PUF và (2) khả năng phân hủy nước ô nhiễm dầu của chủng *Bacillus* đã cố định này nhằm tạo chế phẩm xử lý dầu ô nhiễm ở vùng gian triều ven biển.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

\* **Chủng *Bacillus* sp. VTVK15 có khả năng phân hủy dầu** được phân lập từ giếng khoan dầu khí Vũng Tàu. Chủng này có khả năng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 20-42°C (tốt nhất ở 30-37°C), nồng độ muối (0-6%) (tốt nhất ở 2-4%), pH 4-9 (tốt nhất ở pH 6-8).

### \* Môi trường nuôi cấy vi khuẩn nghiên cứu

(1) **Môi trường nuôi cấy hoạt hóa và lên men thu sinh khối tế bào của chủng vi khuẩn nghiên cứu.** Môi trường HKTS (g/l): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; Glucose 1; KCl 0,25; MgCl<sub>2</sub> 1,2; Cao men 0,2; Cao thịt 3; peptone: 5; NaCl 20 (bổ sung 50% nước deion và 50% nước biển có độ muối 3%); pH7; (2) **Môi trường đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy dầu thô của chủng vi khuẩn nghiên cứu.** Môi trường khoáng tối thiểu (g/l): MgSO<sub>4</sub> 0.2; CaCl<sub>2</sub> 0,02; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4; FeCl<sub>3</sub> 0,05; NaCl 20; pH 7.

\* **Xốp Polyurethane (Polyurethane foam-PUF)** được cung cấp từ Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam có mật độ khối là 105-110g/lít. PUF đã được khử trùng bằng cồn và sấy khô chân không trước khi thử nghiệm.

\* **Dầu thô** được lấy từ mỏ Rồng, Vũng Tàu do Xí nghiệp khai thác dầu khí, Liên doanh Việt Nga, Vietsovpetro cung cấp.

### Phương pháp nghiên cứu

\* **Cố định vi khuẩn lên PUF:** Chủng *Bacillus* sp. VTVK15 giữ -30°C được hoạt hóa qua đêm ở 37°C được bổ sung vào môi trường HKTS và nuôi cấy ở điều kiện 180 vòng/phút. Sau 3 ngày, ly tâm thu hồi sinh khối tế bào ở 4000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Sinh khối tế bào được hòa lại trong môi trường khoáng sao cho số lượng vi khuẩn đạt khoảng  $10^8$  CFU/ml. Trộn hỗn hợp dịch chứa vi khuẩn lên PUF (1 cm x 1 cm x 1 cm) với tỷ lệ 10:1 (v/w) và nuôi cấy trong môi trường khoáng ở điều kiện 180 vòng/phút, 37°C trong 12 ngày. Theo dõi khả năng cố định của vi khuẩn lên PUF sau 2, 4, 6, 8, và 12 ngày (kể từ khi bắt đầu cố định). Mẫu được phân tích 2 lần lặp lại.

\* **Đánh giá khả năng cố định vi khuẩn lên PUF:** PUF đã cố định vi khuẩn được rửa 3 lần với môi trường khoáng để loại bỏ tế bào tự do. Sau đó bổ sung môi trường khoáng mới và thổi rửa vi khuẩn ra khỏi PUF bằng vortex (10 phút). Khả năng cố định của chủng vi khuẩn nghiên cứu lên PUF được xác định thông qua số lượng vi khuẩn cấy trải trước và sau khi cố định lên PUF.

\* **Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn nghiên cứu sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do:** Khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do được đánh giá sau 2, 4, 6, 8, 10, 12 và 14 ngày thông qua số lượng khuẩn lạc tạo thành (CFU/ml) từ dịch nuôi cấy.

\* **Đánh giá khả năng phân hủy dầu thô của chủng vi khuẩn sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do:** Khả năng phân hủy dầu thô của chủng vi khuẩn nghiên cứu được tiến hành trên môi trường khoáng. PUF sau khi cố định vi khuẩn được rửa bằng môi trường khoáng vô trùng và được bổ sung với tỉ lệ 2% (w/v) vào môi trường khoáng chứa 3% (v/v) dầu thô như nguồn carbon duy nhất, sau đó nuôi cấy 14 ngày ở 37°C, 180 vòng/phút. Thí nghiệm tương tự trong trường hợp tế bào vi khuẩn tự do và bình đối chứng (chỉ bổ sung 3% (v/v) dầu thô hoặc chỉ bổ sung chất mang (không cố định vi khuẩn) và 3% (v/v) dầu thô). Sau 14 ngày thí nghiệm, dầu ở cả pha nước lẫn dầu hấp phụ trong PUF được chiết

bằng dichloromethane cho đến khi dung môi chiết không màu. Dầu chiết được phân tích bằng phương pháp sắc kí khí (GC-MS).

#### \* Các phương pháp phân tích

- **Xác định số lượng vi khuẩn:** Pha loãng dung dịch vi khuẩn ở nồng độ pha loãng  $10^{-1}$  đến nồng độ pha loãng tới hạn (mỗi nồng độ pha loãng được lặp lại 3 lần) rồi cấy gạt lên môi trường thạch HKTS. Số lượng vi khuẩn có trong dung dịch được xác định sau 2-4 ngày nuôi cấy ở 37°C.

- **Xác định thành phần hydrocarbon trong dầu thô bằng phương pháp sắc kí khí khối phổ (GC-MS):** Các phân tích được thực hiện tại trường ĐH Bách Khoa, Hà Nội.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Khả năng cố định vi khuẩn lên PUF

Khả năng cố định chủng *Bacillus* sp. VTVK15 lên PUF được xác định thông qua số lượng vi khuẩn trước và sau khi cố định lên chất mang (Bảng 1).

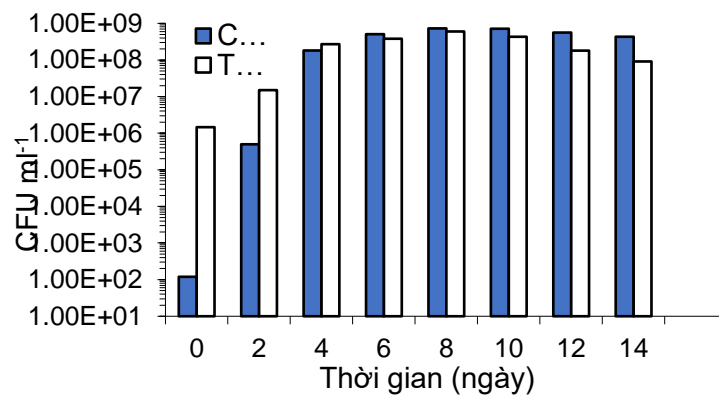
Kết quả (Bảng 1) cho thấy, chủng VTVK15 được cố định hiệu quả lên xốp PUF với hiệu suất từ 25 đến 92% sau 2 đến 12 ngày. Hiệu suất đạt cao nhất là 92% tương đương với  $(5,38 \pm 0,12) \times 10^8$  CFU/g sau 8 ngày cố định. Vì vậy, 8 ngày được lựa chọn là thời gian phù hợp để cố định chủng VTVK15 lên PUF lựa chọn.

##### \* Khả năng sinh trưởng của chủng VTVK15 sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do

Chủng VTVK15 được cố định trong 8 ngày được bổ sung với tỉ lệ 2% (w/v) vào môi trường khoáng chứa 3% (v/v) dầu thô, nuôi cấy 180 vòng/phút, 37°C trong 14 ngày. Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện tương tự trong trường hợp vi khuẩn được cố định và không được cố định (free cells) lên PUF và các bình đối chứng (đều bổ sung 3% (v/v) dầu thô). Khả năng sinh trưởng của chủng VTVK15 sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do được thể hiện ở Hình 1.

**Bảng 1.** Hiệu suất cố định của chủng *Bacillus* sp. VTVK15 lên PUF.

Thời gian cố định (ngày)	Số lượng chủng <i>Bacillus</i> sp. VTVK15		Hiệu suất cố định (%)	
	Trước cố định (CFU/ml)	Sau cố định (CFU/g)		
2	$(5,85 \pm 0,11) \times 10^8$	$(1,46 \pm 0,11) \times 10^8$	25	
4		$(3,74 \pm 0,13) \times 10^8$	64	
6		$(4,68 \pm 0,12) \times 10^8$	80	
8		$(5,38 \pm 0,12) \times 10^8$	92	
10		$(4,91 \pm 0,13) \times 10^8$	84	
12		$(3,93 \pm 0,11) \times 10^8$		
14				73



**Hình 1.** Khả năng sinh trưởng của chủng *Bacillus* sp VTVK15 khi cố định lên PUF (CĐ) và ở trạng thái tự do (TD).

Kết quả (Hình 1) cho thấy chủng VTVK15 sinh trưởng tốt khi cố định lên PUF. Ban đầu khả năng sinh trưởng của vi khuẩn cố định lên PUF ( $5 \pm 0,11 \times 10^5$  CFU/ml) chậm hơn so với vi khuẩn ở trạng thái tự do ( $1,5 \pm 0,12 \times 10^7$  CFU/ml). Tuy nhiên, chỉ sau 2 ngày, chủng VTVK15 cố định lên PUF sinh trưởng và phát triển nhanh và ổn định hơn so với ở trạng thái tự do. Chủng VTVK15 sinh trưởng và phát triển tốt từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 10 và tốt nhất sau 8 ngày với số lượng vi khuẩn cả cố định và ở trạng thái tự do lần lượt là  $(7,2 \pm 0,11) \times 10^8$  CFU/ml và  $(6 \pm 0,13) \times 10^8$  CFU/ml (Hình 1). Sau 14 ngày, vi khuẩn cố định lên PUF vẫn sinh trưởng tương đối tốt với số lượng đạt được là  $(4,3 \pm 0,12) \times 10^8$  CFU/ml. So với vi khuẩn được cố định, vi khuẩn ở trạng thái tự do sinh trưởng không tốt bằng và giảm đáng kể sau 14 ngày thí nghiệm ( $(9,1 \pm 0,13) \times 10^7$  CFU/ml).

**\* Khả năng phân hủy dầu thô của chủng VTVK15 sau khi cố định lên PUF và ở trạng thái tự do**

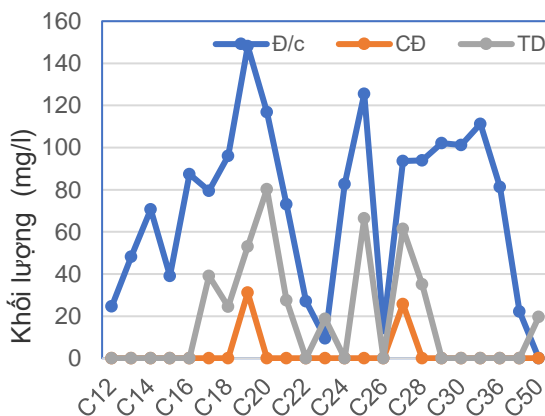
Khả năng phân hủy dầu thô của chủng VTVK15 được cố định lên PUF và ở trạng thái tự do (không cố định) được đánh giá thông qua thành phần hydrocarbon trong dầu ở bình đối chứng (1) chỉ bổ sung 3% (v/v) dầu thô và (2) mẫu bổ sung 3% (v/v) dầu thô và PUF không cố định vi khuẩn và bình thí nghiệm bổ sung vi khuẩn cố định lên PUF và vi khuẩn ở trạng thái tự do sau 14 ngày nuôi cấy.

Kết quả (Hình 2,3 và 4) cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy, vi khuẩn cố định và không cố định lên PUF đều có khả năng phân hủy dầu thô tốt lần lượt là 90% và 65% (so với đối chứng là 3% (v/v) tương đương với 22000 mg/l. Tuy nhiên, vi khuẩn cố định lên PUF cho kết quả phân hủy dầu

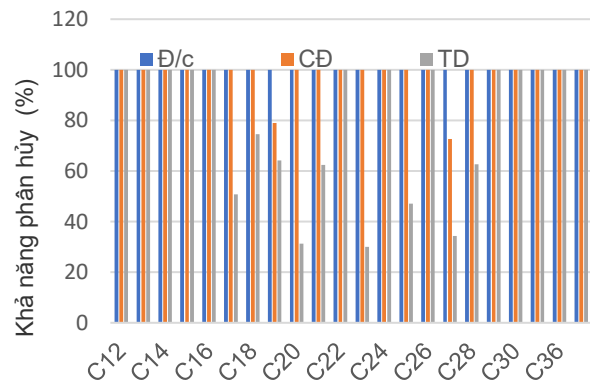
tốt hơn (cao hơn 25%) so với vi khuẩn không cố định.

Kết quả phân tích thành phần hydrocarbon trong dầu thô cũng khẳng định điều đó. Cả vi khuẩn được cố định lên PUF và vi khuẩn tự do đều có khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon trong dầu thô với chiều dài mạch carbon từ C11 đến C44. Trong đó, vi khuẩn cố định lên PUF có khả năng phân hủy hoàn toàn (100%) các phân đoạn C12-C18; C28-C31; C36 và C44 của dầu thô. Đối với các phân đoạn khác, chủng này cũng thể hiện khả năng phân hủy tốt với tỉ lệ phân hủy đạt từ 73 đến 90% so với đối chứng. Khả năng phân hủy của vi khuẩn tự do (không cố định lên PUF) cũng tương đối cao nhưng không bằng vi khuẩn được cố định lên PUF với khả năng phân hủy hoàn toàn (100%) các phân đoạn C12-C16. Các phân đoạn hydrocarbon còn lại có khả năng phân hủy từ 31,3 đến 74,5% so với đối chứng (Hình 3).

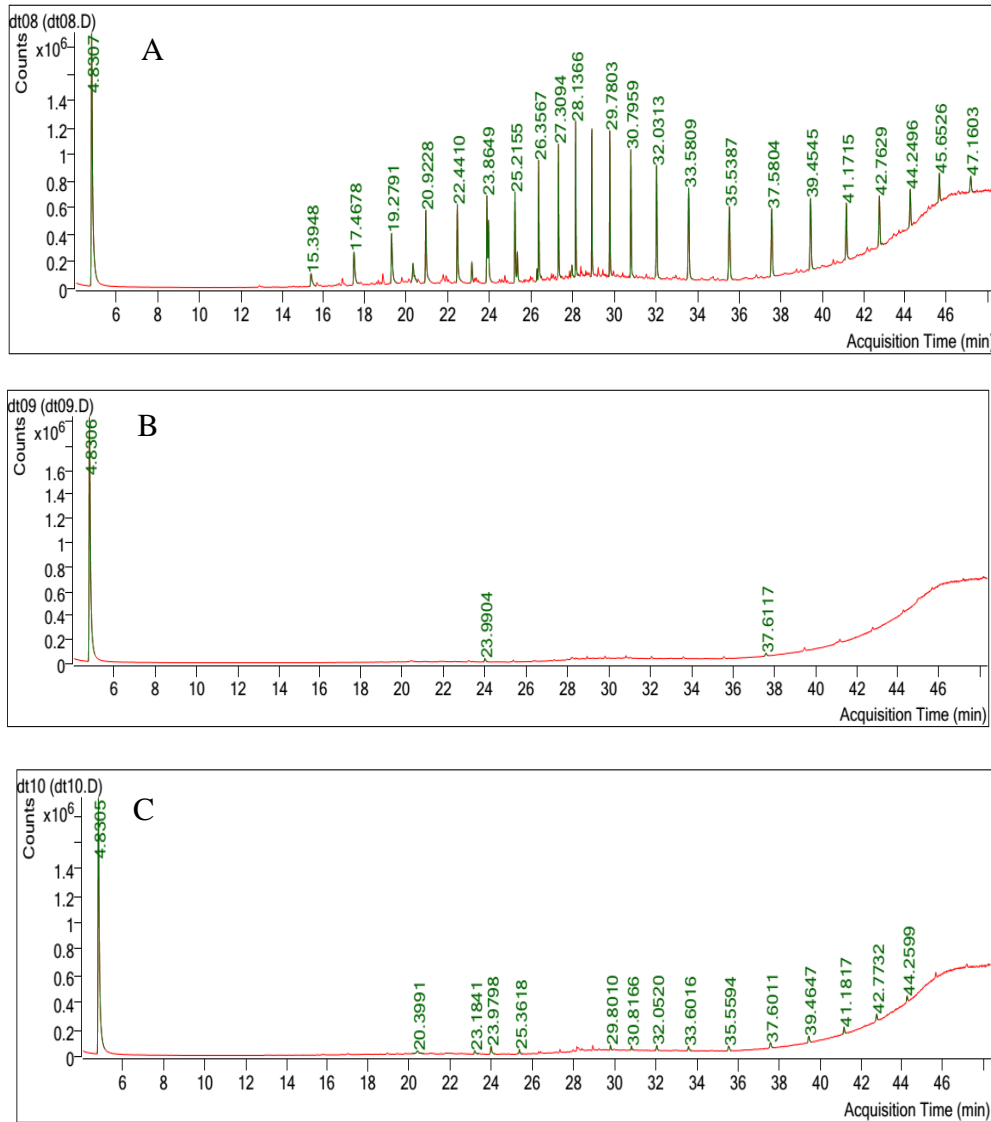
Như vậy, từ kết quả phân tích có thể kết luận rằng vi khuẩn được cố định lên PUF có khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon trong dầu thô hiệu quả hơn vi khuẩn tự do (không được cố định). Việc cố định vi khuẩn phân hủy dầu lên PUF cho thấy tiềm năng ứng dụng của chất mang này trong xử lý nước ô nhiễm dầu ở vùng triều ven biển. Quek và cộng sự (2006) đã nghiên cứu khả năng phân hủy dầu bằng chủng *Rhodococcus* sp. F92 cố định lên PUF. Kết quả cho thấy, chủng F92 có khả năng cố định với hiệu suất 90% lên PUF và khả năng phân hủy n-alkan là 90% sau 1 tuần thí nghiệm. Khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ của chủng *Bacillus* VTVK15 khi cố định lên PUF so với nghiên cứu của Quek và cs và các nghiên cứu trước đây cũng tương đối cao, cho thấy tiềm năng ứng dụng phân hủy dầu ô nhiễm tại các vùng triều ven biển.



**Hình 2.** Thành phần các nhóm hydrocarbon còn lại trong dầu thô sau 14 ngày. Chủng vi khuẩn cố định lên PUF (CĐ) và vi khuẩn ở trạng thái tự do (TD); Đối chứng (Đ/c) bổ sung 3% (v/v) dầu thô



**Hình 3.** Khả năng phân hủy thành phần hydrocarbon trong dầu thô sau 14 ngày. Chủng vi khuẩn cố định lên PUF (CĐ) và chủng vi khuẩn ở trạng thái tự do (TD); Đối chứng (Đ/c) bổ sung 3% (v/v) dầu thô



**Hình 4.** Sắc ký đồ thành phần hydrocarbon trong dầu thô sau 14 ngày. (A) Mẫu đối chứng bổ sung 3% (v/v) dầu thô; (B) Mẫu thí nghiệm bổ sung PUF cố định vi khuẩn và 3% (v/v) dầu thô; (C) Mẫu thí nghiệm bổ sung vi khuẩn ở trạng thái tự do (không cố định)

## KẾT LUẬN

Đã cố định được chủng *Bacillus* sp. VTVK15 lên PUF với số lượng tế bào sau cố định đạt  $(5,38 \pm 0,12) \times 10^8$  CFU/g. Chủng *Bacillus* sp. VTVK15 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường khoáng bổ sung 3% (v/v) dầu thô. Chủng VTVK15 cố định lên PUF sinh trưởng và phát triển nhanh và ổn định hơn so với ở trạng thái tự do, tốt nhất sau 8 ngày với số

lượng vi khuẩn là  $(7,2 \pm 0,11) \times 10^8$  CFU/ml cao hơn so với vi khuẩn không cố định ( $(6 \pm 0,13) \times 10^8$  CFU/ml). Vi khuẩn cố định lên PUF cho kết quả phân hủy hydrocarbon trong dầu thô tốt là 90% và cao hơn 25% so với vi khuẩn không cố định.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của nhiệm vụ

CP1862.02/20-22, thuộc kế hoạch 1862 do Thủ tướng Chính phủ giao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Nhi Công, Vũ Thị Thanh, Cung Thị Ngọc Mai, Nghiêm Ngọc Minh, Đỗ Thị Liên, Hoàng Phương Hà, Đỗ Văn Tuấn, Đỗ Thị Tô Uyên (2015) Thử nghiệm khả năng phân hủy dầu diesel của màng sinh học từ vi sinh vật gắn trên giá thể cellulose ở hệ thử nghiệm dung tích 50 lít. Tạp Chí công nghệ sinh học 13(2A): 703-708.

Lin M, Liu Y, Chen W, Wang H, Hu X (2014) Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *Inter Biodeteri- Biodegr* 88: 8–12.

Liu PWG, Liou JW, Li YT, Su WL, Chen CH (2015) The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *Int Biodeteri Biodegr* 102: 383–391.

Ma X, Li N, Jiang J, Xu Q, Li H, Wang L, Lu J (2013) Adsorption-synergic biodegradation of highconcentrated phenolic water by *Pseudomonas putida* immobilized on activated carbon fiber. *J Environ Chem Eng* 1: 466–472.

Merv Fingas (2013) The basics of oil spill clean-up. 3th ed., CRC press. *Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, U.S.A.*

Ndimele PE, Saba AO, Ojo DO, Ndimele CC, Anetekhai MA, Erondu ES (2018) Remediation of Crude Oil spillage. *The Political Ecol of Oil and Gas Act in the Nigerian Aqua Eco* :369-383.

Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 154–162.

Simons K, Ansar A, Kadali K, Bueti A, Adetutu E, Ball A (2012) Investigating the effectiveness of economically sustainable carrier material complexes for marine oil remediation. *Bioresour Technol* 126: 202–207.

Vương Thị Nga, Nguyễn Thị Yên, Kiều Thị Quỳnh Hoa, Lại Thúy Hiền (2014). Hiệu quả xử lý ô nhiễm dầu ven biển bằng chế phẩm hoạt hóa bề mặt sinh học được tổng hợp từ vi sinh vật biển. Tạp chí Công nghệ sinh học 12(1): 189-196.

Wang X, Liu M, Bu Y, Zhang J, Chen J, Zhao J (2015) Adsorption-synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin* 92: 195–200.

Queck E, Ting Y-P, Tan HM (2006) *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresour technol* 97: 32-38.

#### ENHANCED BIOREMEDIATION OF CRUDE OIL POLLUTED WATER BY A HYDROCARBON-DEGRADING *BACILLUS* STRAIN IMMOBILIZED ON POLYURETHANE FOAM (PUF)

Kieu Thi Quynh Hoa<sup>1,3</sup>, ✉ Nguyen Vu Giang<sup>2,3</sup>, Nguyen Thi Yen<sup>1</sup>, Mai Duc Huynh<sup>2</sup>, Nguyen Huu Dat<sup>2</sup>, Vuong Thi Nga<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Ha<sup>1</sup>, Pham Thi Phuong<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Institute for Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

<sup>3</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

#### SUMMARY

During the production and transportation of petroleum hydrocarbons, unsuitable operation and leakage may result in contamination of water and soil with petroleum hydrocarbons. Petroleum contamination causes significant marine environmental impacts and presents substantial hazards to human health. Bioremediation of contaminated water and soil is currently the effective and least

harmful method of removing petroleum hydrocarbons from the environment. To improve the survival and retention of the bioremediation agents in the contaminated sites, microbial cells must be immobilized. It was demonstrated that immobilized microbial cells present advantages for degrading petroleum hydrocarbon pollutants compared to free suspended cells. In this study, the ability of a *Bacillus* strain (designed as *Bacillus* sp. VTVK15) to immobilize on PUF and to degrade crude oil was investigated. The immobilized *Bacillus* strain had the highest number ( $5.38 \pm 0.12 \times 10^8$  CFU/g PUF) and a maximum attachment efficiency of 92% on PUF after 8 days. Analysis by GC-MS revealed that both free and immobilized cells of *Bacillus* sp. VTVK15 were able to degrade 65 and 90% of the hydrocarbons in 2% (v/v) crude oil tested after 14 days, respectively. The results suggest the potential of using PUF-immobilized *Bacillus* sp. VTVK15 to bioremediate petroleum hydrocarbons in an open marine environment.

**Keywords:** *Bacillus*, bioremediation, immobilization, petroleum hydrocarbon degradation, polyurethane foam, VTVK15 strain