

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

**KHUÔNG TRƯỜNG GIANG**

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU DIESEL  
CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TẠI CÂY XĂNG  
VIỆT HOÀNG HUYỆN PHÚ LƯƠNG TỈNH THÁI NGUYÊN**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**Mã số: 60 42 0201**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC  
PGS.TS: NGHIÊM NGỌC MINH**

*Thái Nguyên, Năm 2013*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác.

*Thái Nguyên, ngày tháng năm 2013*

**Tác giả**

**Khuông Trường Giang**

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới **PGS.TS Nghiêm Ngọc Minh**, Trưởng phòng Công nghệ Sinh học Môi Trường, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã trực tiếp hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức và những kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu.

Trong quá trình làm luận văn, tôi đã nhận được sự giúp đỡ nhiệt tình của các anh chị trong Phòng Công nghệ Sinh học Môi Trường. Đặc biệt là **TS. Lê Thị Nhi Công, Th.S. Cung Thị Ngọc Mai, CN. Vũ Thị Thanh ...**

Bên cạnh đó, tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Khoa sau Đại học - Đại học Thái Nguyên đã dạy dỗ và chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập tại trường.

Lời cuối cùng tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình, anh em và bạn bè đã động viên giúp đỡ tôi cả về vật chất lẫn tinh thần để tôi có thể hoàn thành khóa học và thực hiện tốt luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

*Thái Nguyên, ngày      tháng      năm 2013*

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT .....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
CHƯƠNG I: <u>MỞ ĐẦU</u> .....	1
CHƯƠNG II: <u>TỔNG QUAN TÀI LIỆU</u> .....	3
2.1. Đặc điểm chung của dầu mỏ .....	3
2.1.1 Cấu trúc hóa học và đặc điểm của dầu mỏ: .....	3
2.1.2 Các sản phẩm từ dầu mỏ: .....	4
2.2. Tình trạng ô nhiễm dầu hiện nay và ảnh hưởng của nó: .....	6
2.2.1 Tình hình ô nhiễm dầu trên thế giới: .....	7
2.2.3 Hậu quả tác động của nước ô nhiễm dầu. ....	10
2.3. Các phương pháp xử lý ô nhiễm dầu .....	12
2.3.1 Phương pháp cơ học: .....	12
2.3.2. Phương pháp hóa học: .....	12
2.4. Vai trò của vi sinh vật trong phân hủy dầu: .....	13
2.5. Cơ chế phân hủy dầu DO của vi sinh vật:.....	15
2.5.1. Phân hủy hydrocacbon no: .....	16
2.5.2 Phân hủy hydrocacbon thơm: .....	19
2.6. Các phương pháp phân loại vi sinh vật:.....	19
2.6.1. Phương pháp phân loại truyền thống: .....	20
2.6.2 Phương pháp phân loại bằng sinh học phân tử: .....	20
CHƯƠNG III: <u>VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</u> .....	22
3.1 Nguyên liệu, hoá chất và các thiết bị sử dụng: .....	22
3.1.1 Nguyên liệu: .....	22

3.1.2 Hoá chất, môi trường nuôi cấy:.....	22
3.1.3. Máy móc và thiết bị nghiên cứu.....	23
3.2. Phương pháp nghiên cứu: .....	24
3.2.1. Thu thập mẫu: .....	24
3.2.2. Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng dầu diesel. ....	25
3.2.3. Khảo sát khả năng sử dụng dầu diesel của các chủng vi khuẩn. ....	25
3.2.4. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn:.....	26
3.2.5. Đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện hóa lý tới khả năng phân huỷ dầu diesel:.....	27
3.2.7. Phương pháp phân loại vi sinh vật dựa vào xác định trình tự đoạn trên mã hóa 16S rRNA và xây dựng cây phát sinh chủng loại:.....	27
CHƯƠNG IV: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	31
4.1. Kết quả lấy mẫu đất và nước thải.....	31
4.3. Đặc điểm sinh học của chủng G10.....	41
4.4. Phân loại định tên và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn gen mã hoá 16S rRNA của chủng vi khuẩn G10. ....	42
4.5. Ảnh hưởng của pH, nồng độ muối NaCl đến khả năng sinh trưởng trong môi trường có dầu diesel của chủng G10:.....	45
4.6. Khả năng phân huỷ dầu diesel của chủng G10:.....	48
CHƯƠNG V: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	50
Kết luận .....	50
Kiến nghị:.....	50
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51

**DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT**

Atm	: Standard atmosphere
Bp	: Base pair ( cặp bazơ )
CFU	: Colony forming unit
DNA	: Deoxyribonucleic acid
KDa	: Kilo Dalton ( $\approx 1.66 \times 10^{-27}$ kg )
LB	: Luria - Broth
MPA	: Meat - Peptone - Agar
OD	: Optical Density ( mật độ quang học )
PCR	: Polymerase Chain Reaction ( phản ứng chuỗi trùng hợp )
Ppm	: Parts per million ( Đơn vị một phần triệu, mg/l )
RNA	: Ribonucleic acid
rRNA	: Ribosomal ribonucleic acid
vsv	: Vi sinh vật
X-gal	: 5 – bromo – 4 – chloro – indolyl - $\beta$ - D – galactopyranoside

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Máy móc và thiết bị dùng trong đề tài. ....	24
Bảng 4.1 Hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được ...	34
Bảng 4.2. Khả năng sinh trưởng trên môi trường có dầu diesel 1% của 10 chủng vi khuẩn. ....	35
Bảng 4.3. Khả năng sinh trưởng trên môi trường có dầu diesel 2% của 6 chủng vi khuẩn. ....	37
Bảng 4.4. Khả năng sinh trưởng trên môi trường có dầu diesel 5% của 5 chủng vi khuẩn. ....	39
Bảng 4.5. Khả năng sinh trưởng trên môi trường có dầu diesel 10% của 4 chủng vi khuẩn. ....	40
Bảng 4.6. Một số chủng có trình tự 16S rRNA tương đồng với chủng G10.....	43
Bảng 4.7. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng G10 với nồng độ DO 10% ở các giải pH khác nhau. ....	46
Bảng 4.8. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng G10 với nồng độ DO 10% ở các nồng độ muối NaCl khác nhau. ....	47

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 4.1. Mẫu đất và nước tại cây xăng Việt Hoàng, xã Yên Đổ, Phú Lương, Thái Nguyên. ....	31
Hình 4.2a. Làm giàu lần 1 trên môi trường khoáng có bổ sung 1% dầu DO.....	32
Hình 4.2b. Làm giàu lần 2 trên môi trường khoáng có bổ sung 1% dầu DO.....	32
Hình 4.2c. Làm giàu lần 3 trên môi trường khoáng có bổ sung 1% dầu DO.....	32
Hình 4.3. Tập đoàn vi sinh vật trên môi trường muối khoáng Gost thạch. ....	33
Hình 4.4. Đặc điểm dịch nuôi chủng trên môi trường muối khoáng có bổ sung 1% dầu diesel sau 7 ngày nuôi cấy. ....	35
Hình 4.5. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn ở nồng độ 1% dầu diesel.....	36
Hình 4.6. Khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường có 2% dầu diesel.....	37
Hình 4.7. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn ở nồng độ 2% dầu diesel.....	37
Hình 4.8. Khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường có 5% dầu diesel.....	38
Hình 4.9. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn ở nồng độ 5% dầu diesel.....	39
Hình 4.10. Khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường có 10% dầu diesel.....	40
Hình 4.11. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn	

ở nồng độ 10% dầu diesel.....	41
Hình 4.12. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng G10.....	41
Hình 4.13. Trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn G10.....	42
Hình 4.14. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn G10.....	44
Hình 4.15. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn G10 tại các giá trị pH khác nhau .....	46
Hình 4. 16. Đồ thị biểu thị mức độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn G10 tại các giá trị NaCl khác nhau .....	48

## CHƯƠNG I: MỞ ĐẦU

Ngành công nghiệp chế biến dầu mỏ của các nước trên thế giới trong đó có Việt Nam đã và đang phát triển không ngừng. Tuy nhiên cùng với sự phát triển của ngành này là tình trạng ô nhiễm môi trường do ảnh hưởng của các chất thải có nhiễm dầu. Các hiện tượng tràn dầu, rò rỉ dầu gây ô nhiễm nghiêm trọng cho môi trường, làm hủy hoại hệ sinh thái động thực vật và ảnh hưởng trực tiếp đến đời sống con người, trong đó ô nhiễm môi trường nước do dầu gây ra được xem là vấn đề đáng lo ngại bởi tốc độ lan truyền, quy mô ảnh hưởng rộng và thời gian tác động lâu dài. Ngoài những sự cố kể trên thì vấn đề bảo quản xăng dầu của các kho chứa cũng như tại các cây xăng cũng có một số lượng xăng dầu không nhỏ gây ảnh hưởng đến môi trường xung quanh các kho chứa và các cây xăng đó.

Đứng trước những hiểm họa do ô nhiễm dầu mỏ và các sản phẩm của nó, để có thể giải quyết một cách triệt để đòi hỏi phải có sự kết hợp nghiên cứu của nhiều nhà khoa học, công nghệ và các nhà quản lý môi trường cũng như sự hợp tác giữa các đơn vị vận chuyển, kinh doanh và sử dụng sản phẩm từ dầu mỏ. Với mục tiêu góp phần bảo vệ môi trường, ngoài việc tránh các hiện tượng rò rỉ dầu ra bên ngoài thì việc xử lý nước thải có nhiễm dầu được đặc biệt quan tâm chú ý.

Hiện nay, phân hủy sinh học (biodegradation) đã được áp dụng rộng rãi đối với xử lý ô nhiễm dầu và các chất độc hóa học cũng như các chất ô nhiễm khác. Bản chất của công nghệ phân hủy sinh học là kích thích sự phát triển của vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy dầu hoặc các chất gây ô nhiễm khác có sẵn trong tự nhiên, bằng cách thay đổi các yếu tố môi trường như độ thông khí, các chất dinh dưỡng, nguồn nitơ, phốt pho, các chất vi lượng, các chất hoạt động bề mặt sinh học ...v.v. Các yếu tố này có ý nghĩa là tạo ra điều kiện tối ưu để các vi sinh vật sử dụng các thành phần dầu mỏ phát triển và