

Nghiên cứu khả năng phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong nước thải nhiễm dầu của màng sinh học từ vi sinh vật gắn trên giá thể xơ dừa

Lê Thị Nhi Công¹, Cung Thị Ngọc Mai¹, Vũ Thị Thanh¹, Đỗ Thị Tố Uyên¹, Nghiêm Ngọc Minh²

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 10.7.2015, ngày chuyển phản biện 20.7.2015, ngày nhận phản biện 18.8.2015, ngày chấp nhận đăng 24.8.2015

Trong tự nhiên, các nhóm vi sinh vật thường tồn tại ở dạng liên kết chặt chẽ với nhau trên các bề mặt chất rắn hoặc các lớp trung gian giữa các bề mặt lỏng và rắn. Tập hợp này được gọi là màng sinh học (biofilm). Màng sinh học thường được tạo thành nhờ lớp protein ngoại bào của các tế bào gắn kết vào nhau. Nhờ đó, các quá trình chuyển hóa các thành phần cho các tế bào khác nhau được dễ dàng hơn, giúp cho các vi sinh vật chống chịu tốt hơn với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường sống cũng như vi môi trường giữa các tế bào. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tập trung vào các màng sinh học được tạo thành bởi hỗn hợp các chủng vi khuẩn và nấm men được gắn trên giá thể xơ dừa. Xơ dừa được sử dụng vừa là chất hấp phụ, vừa là giá thể sinh học cho các chủng vi sinh vật bám vào. Mật độ vi sinh vật có trên 1 cm³ xơ dừa được duy trì khá ổn định với mật độ ban đầu là 4,3 x 10¹⁰CFU và sau 7 ngày là 4,5 x 10⁹ CFU. Hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon khó phân hủy có trong nước thải nhiễm dầu nhờ hệ thống màng sinh học từ vi sinh vật gắn trên xơ dừa sau 7 ngày thử nghiệm là rất đáng kể. Các giá trị như pH, hàm lượng dầu tổng số và các thành phần hydrocarbon đa vòng (PAHs-polycyclic aromatic hydrocarbons) đã giảm trên 99% và đạt tiêu chuẩn nước thải loại B của Việt Nam. Kết quả này mở ra khả năng ứng dụng các chất mang sinh học có chứa các nhóm vi sinh vật tạo màng sinh học để tăng cường hiệu quả phân hủy sinh học các hợp chất hydrocarbon gây ô nhiễm như dầu thô.

Từ khóa: màng sinh học, ô nhiễm dầu, phân hủy, vi sinh vật.

Chỉ số phân loại 2.7

Đặt vấn đề

Hiện nay, trên thế giới nhiều công nghệ xử lý ô nhiễm dầu mỏ bằng vi sinh vật đã được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng. Trong số các công nghệ mới này, công nghệ xử lý bằng màng sinh học (biofilm) được xem là một trong những công nghệ xử lý ô nhiễm hiệu quả, chi phí thấp [1]. Công nghệ này thường xử lý kết hợp với các phương pháp vật lý hoặc hóa học mang lại hiệu quả cao. Sử dụng biofilm là một biện pháp xử lý ô nhiễm dầu tương đối mới ở Việt Nam. Trong nghiên cứu gần đây, nhóm tác giả đã đánh giá khả năng tạo biofilm một số chủng vi khuẩn và nấm men phân hủy dầu, phân lập từ các mẫu nước biển bị ô nhiễm dầu ở Thanh Hoá và Vũng Tàu [2]. Kết quả, đã xác định được các chủng như *Candida*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*... là những chủng vừa tạo biofilm vừa có khả năng phân hủy và chuyển hoá các thành phần dầu

mỏ rất tốt. Hơn thế nữa, sau 24 giờ nuôi cấy, ở dạng tạo biofilm chúng còn có khả năng phân hủy dầu tốt hơn ở dạng tế bào planktonic [3]. Điều này cho thấy tiềm năng phong phú về chủng loại vi sinh vật vừa tạo biofilm, vừa phân hủy và chuyển hoá hydrocarbon trong các mẫu đất và nước bị ô nhiễm dầu ở Việt Nam. Như vậy, nghiên cứu về biofilm sẽ mở ra khả năng ứng dụng các vi sinh vật đối với các hệ sinh thái và đời sống con người.

Để màng sinh học có được cấu trúc bền vững, mật độ tế bào vi sinh vật cao giúp màng sinh học chống chịu được với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường như: sự suy giảm nguồn dinh dưỡng và các yếu tố vật lý môi trường thay đổi (sự thay đổi về pH, nhiệt độ, sự thẩm thấu hay sự mất nước của tế bào...), từ đó làm tăng hiệu suất phân hủy các hợp chất ô nhiễm khi xử lý ngoài hiện trường; việc tìm được vật liệu mang phù

*Tác giả liên hệ: lenhicong@ibt.ac.vn

Degradation of hydrocarbons in oil polluted wastewater using biofilms formed by microorganisms on coconut fiber carrier

Summary

In nature, many microbial communities exist in close association with surfaces and interfaces as complex assemblages known as biofilms where multicellular aggregates hold together by an extracellular matrix. It is possible to take advantage of natural transformation processes on the constituent cells to have high resistance to environmental stresses and diverse microenvironments that help generate cellular heterogeneity. In this study, the authors focused on biofilms composed of mixed populations which were immobilized on the surface of coconut fibers. Coconut fibers were used as a crude oil sorbent as well as a biocarrier for microorganism immobilization. Microbial biomass reached 4.3×10^{10} cells/cm³ at the beginning time and 4.5×10^9 cells/cm³ after 7 day-incubation. The efficiency of degrading a number of particular xenobiotic compounds containing in crude oil wastewater by this biocarrier was demonstrated. After 7-day culture, all of values such as pH, total crude oil and PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) were reduced remarkably, and they all satisfied the Vietnam waste-water standard records. This study explored the role of biocarrier in enhancing biodegradation of hydrophobic contaminants such as crude oil, and discussed the function of biocarrier in improving oxygenmass transfer and water holding capacity in soil, etc.

Keywords: biofilm, degradation, microorganisms, oil pollution.

Classification number 2.7

hợp để gắn các vi sinh vật này là hết sức cần thiết [4]. Trong số vật liệu mang lựa chọn thử nghiệm, xơ dừa là loại vật liệu được sử dụng làm chất mang bởi các lý do: đơn giản, sẵn có trong nước; xốp, có độ bám dính cao do bề mặt tiếp xúc lớn; độ hấp thụ và tuần hoàn dinh dưỡng cao; giá thành rẻ và là nguồn nguyên liệu dễ xử lý sau khi sử dụng [5].

Nghiên cứu này thực hiện nhằm các mục tiêu: 1) Gắn được các chủng vi sinh vật lên giá thể xơ dừa; 2) Đánh giá hiệu quả phân hủy các thành phần hydrocarbon có trong nước thải nhiễm dầu của các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học ở điều kiện có gắn lên giá thể và không gắn vào giá thể.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

- Các chủng vi khuẩn và nấm men vừa có khả năng tạo màng tốt, vừa có khả năng phân hủy các hợp chất hydrocarbon được phân lập từ các mẫu đất, nước nhiễm dầu lấy tại một số vùng ven biển như Quảng Ninh, Hải Phòng, Thanh Hóa... bằng dụng cụ lấy mẫu chuyên dụng. Các chủng này đã được tối ưu các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học.

- Vật liệu mang là xơ dừa lấy từ phần vỏ của quả dừa, được khử trùng ươm và làm khô để diệt khuẩn (hình 1).



Hình 1: hình thái của xơ dừa

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế modul để cố định vật liệu mang: modul giữ vật liệu mang là vật liệu nhôm tĩnh điện hình chữ nhật, kích thước 34x25x4 (cm), vật liệu mang được giữ trong lưới thép không gỉ. Thiết bị tạo màng gồm 3 modul đặt song song có hệ thống máy bơm tuần hoàn môi trường để cung cấp đủ chất dinh dưỡng cho vi sinh vật tạo màng.

Tạo màng vi sinh vật trên vật liệu mang là xơ dừa: sau khi tạo được khung giữ màng sinh học, khung được đặt ngang trong bể kính với thể tích môi trường

hiều khí tổng số và môi trường Hansen tương ứng với số lượng các chủng vi khuẩn và nấm men có tổng thể tích môi trường là 50 l. Dịch nuôi của vi khuẩn và nấm men được bổ sung sao cho mật độ quang học (OD) trước tạo màng đạt 0,3. Nuôi tĩnh ở nhiệt độ phòng, sau 24 giờ nhấc khung tạo màng ra, rửa nhẹ nhàng bằng nước cất vô trùng.

Quan sát cấu trúc màng trên vật liệu cellulose dưới kính hiển vi điện tử quét: gắn (cố định) 1 cm³ vật liệu mang trên lá kính sạch, mỏng có gắn poly-L-lysine 0,1% (w/v) và cho vào eppendorf có chứa dung dịch cacodylate 0,1M. Sau đó cố định mẫu bằng 2,5-3% glutaraldehyde/cacodylate 0,1M pH 7,2-7,4 (1 giờ hoặc qua đêm ở nhiệt độ 4°C). Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M (5 phút/lần x 3 lần). Cố định mẫu bằng OsO₄ 1% trong cacodylate 0,1M trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1M (5 phút/lần x 2 lần). Hút nước trong mẫu bằng cồn các nồng độ 50, 70, 80, 90, 100° (5 phút/lần x 2 lần). Chuẩn bị để gắn mẫu sử dụng giấy bạc. Hòa loãng mẫu với nồng độ thích hợp trong cồn tuyệt đối, nhỏ mẫu lên giấy bạc gắn sẵn trên đế, để khô hoàn toàn. Phủ mẫu bằng một lớp dẫn điện Pt-Pd và tiến hành soi mẫu. Quá trình được thực hiện với sự phối hợp của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Đánh giá mật độ tế bào vi sinh vật trên màng bằng phương pháp tính CFU: 1 cm³ vật liệu mang được cắt ra và lắc trong 4,5 ml nước muối sinh lý trong 1 giờ. Mẫu sau đó được pha loãng tới hạn và gọt trên môi trường HKTS (đối với mẫu vi khuẩn) và Hansen (đối với mẫu nấm men). Sau 18-36 giờ, đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa, từ đó tính được số lượng tế bào trên 1 cm³ vật liệu mang theo công thức:

$$CFU = C \times 10^{n+1}$$

Trong đó, C: số khuẩn lạc có trên đĩa; n: độ pha loãng (mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần).

Xác định khả năng phân hủy dầu DO: lượng dầu DO được xác định bằng phương pháp phân tích khối lượng theo tiêu chuẩn TCVN 4582-88 tại Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam: 20 ml dịch nuôi được hòa tan trong 3 ml dung môi chloroform, sau khi hòa tan trong chloroform thì lắc nhẹ (khoảng 10 phút) cho dầu tan hoàn toàn (quá trình chiết được tiến hành 3 lần).

Khi đó, dầu và dung môi sẽ tách làm 2 lớp, dùng phễu chiết bỏ phần dung môi ở dưới đi. Phần dịch hòa tan còn lại được cô bay hơi bằng bếp cát cho tới cạn và cân khối lượng của dầu có trong 20 ml dung dịch đó.

Phương pháp đo quang xác định khả năng phân hủy phenol: hàm lượng phenol được xác định bằng phương pháp đo quang theo nguyên lý là trong môi trường kiềm, phenol kết hợp với dung dịch 4-aminoantipyrine để tạo ra phức antipyrine màu nâu đỏ, ổn định, cường độ màu tỷ lệ với hàm lượng phenol trong mẫu. Độ hấp phụ cực đại của màu này được xác định ở bước sóng 510 nm. 20 ml dịch nuôi được điều chỉnh tới pH < 4 bằng H₃PO₄. Các chất oxy hóa như chlorine trong mẫu được phát hiện bởi iot tự do được giải phóng ra trong quá trình oxy hóa mẫu trong sự có mặt của KI. Khi đó, Cl sẽ bị loại bỏ ngay lập tức sau khi thêm một lượng dư sắt (II) amoni sulfate vào mẫu. Mẫu được chung cất và điều chỉnh pH lên 10 bằng dung dịch đệm chứa NH₄Cl, NH₄OH và bổ sung dung dịch aminoantipyrine và dung dịch K₃Fe(CN)₆ cho tới khi mẫu lên màu nâu đỏ thì tiến hành đo quang ở bước sóng 510 nm. Dựa vào nồng độ phenol của dung dịch chuẩn, tiến hành dựng đường chuẩn và từ đó tính được nồng độ phenol có trong mẫu. Kết quả thử nghiệm khả năng phân hủy phenol của màng sinh học đa chủng nấm men được gửi phân tích ở Viện Hóa học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

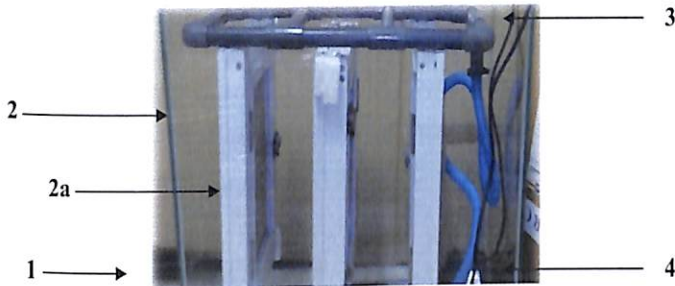
Xác định khả năng phân hủy PAH: PAH được xác định bằng phương pháp đo quang phân tử, dựa trên sự dịch chuyển điện tử trên các orbital π của các nối đôi liên kết trong vòng thơm của PAH. Khả năng chuyển hóa PAH của vi khuẩn trong dịch nuôi cấy được xác định trên máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-Vis: GBC - CINTRA 4. 20 ml dịch nuôi cấy vi sinh vật sử dụng PAH được chiết bằng 180 ml acetone, sau đó lọc toàn bộ, thu dịch lọc đưa đi phân tích. Nồng độ của mỗi PAH trước và sau xử lý được tính toán dựa vào chiều cao peak hấp thụ tại các bước sóng, các PAH hấp thụ tại các bước sóng như: pyrene 275 nm; fluorene: 257,7 nm, anthracene: 252 nm, naphthalene: 296 nm. Kết quả phân hủy PAH được gửi phân tích ở Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam.

Kết quả và thảo luận

Modul để cố định vật liệu mang và hệ thống tạo màng vi sinh vật

Modul để giữ cố định vật liệu mang phải đảm bảo các yêu cầu sau: modul được đặt trong bể kính thủy tinh chắc chắn với thể tích là 75 m³; vật liệu: inox không gỉ, chịu được ăn mòn trong môi trường acid và bazơ nhẹ; cấu tạo chắc chắn, dạng hộp chữ nhật kích thước 34x25x4 (cm), hai mặt được bao phủ bởi lưới thép để giữ vật liệu mang trong đó cùng với hệ thống đường ống và máy bơm tuần hoàn cung cấp đủ lượng oxy cho vi sinh vật.

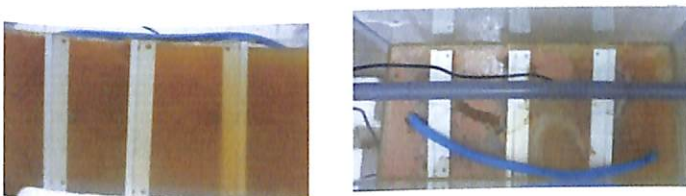
Dựa trên những yêu cầu trên, modul để cố định vật liệu mang được chúng tôi thiết kế như hình 2.



Hình 2: cấu tạo của modul để cố định vật liệu mang và hệ thống tạo màng vi sinh vật
1. Bể kính; 2. Modul; 2a. Lưới thép; 3. Đường ống; 4. Máy bơm

Tạo màng vi sinh vật trên vật liệu mang là xơ dừa

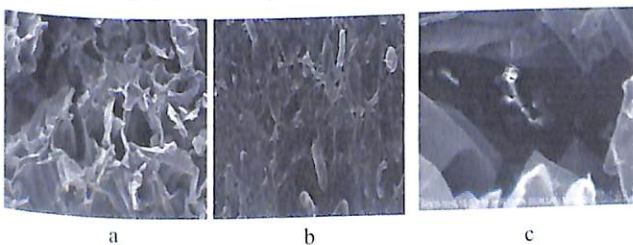
Các bước tạo màng vi sinh vật được thực hiện như đã mô tả ở phần phương pháp. Kết quả tạo màng sau 24 giờ trên vật liệu mang xơ dừa được chỉ ra ở hình 3.



Hình 3: màng sinh học trên giá thể xơ dừa ở hệ thử nghiệm dung tích 50 l

Cấu trúc màng trên xơ dừa dưới kính hiển vi điện tử quét

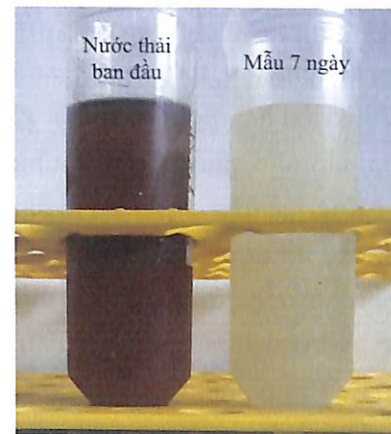
Dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 10.000 lần, cấu trúc màng sinh học khi không có vật liệu mang và khi có vật liệu mang là xơ dừa đã được quan sát cụ thể. Kết quả chỉ ra ở hình 4.



Hình 4: ảnh hiển vi điện tử quét của vật liệu mang và màng sinh học.
(a): vật liệu mang; (b): màng sinh học trong mô hình không có chất mang;
(c): màng sinh học được gắn trên vật liệu mang

Đánh giá khả năng phân hủy các thành phần hydrocacbon của màng sinh học đa chủng trên giá thể xơ dừa ở hệ thử nghiệm dung tích 50 l

Bằng cảm quan nhận thấy, màu sắc của môi trường nuôi cấy sau 7 ngày đã thay đổi so với mẫu ban đầu (từ màu đen chuyển sang màu vàng, môi trường trở nên trong hơn). Đồng thời, lượng dầu ở trên bề mặt đã giảm đi rất nhiều so với mẫu ban đầu (hình 5). Do vậy có thể phân nào khẳng định, các chủng nghiên cứu đều có khả năng phân hủy các thành phần hydrocacbon. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác khả năng phân hủy các thành phần hydrocacbon của biofilm đa chủng, chúng tôi đã tiến hành xác định số lượng vi sinh vật bằng phương pháp MPN và tiến hành gửi các mẫu đi phân tích các chỉ tiêu ở Viện Hóa học và Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam.



Hình 5: mẫu nước thải của kho xăng dầu Đỗ Xá trước và sau thí nghiệm

Kết quả kiểm tra MPN cho thấy, số lượng vi sinh vật trên 1 cm³ giá thể xơ dừa sau 7 ngày là khá cao. Điều này chứng tỏ, khả năng bám dính của biofilm đa chủng trên giá thể xơ dừa khá tốt và chúng đều có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường có hàm lượng hydrocacbon cao (bảng 1).

Bảng 1: số lượng vi sinh vật trên giá thể xơ dừa

Tên mẫu	Số lượng vi sinh vật (CFU/cm ³)
Mẫu xơ dừa 0 giờ	4,3 x 10 ¹⁰
Mẫu xơ dừa 7 ngày	4,5 x 10 ⁹

Tiến hành phân tích các chỉ tiêu như pH, COD, BOD... có trong nước thải nhiễm dầu trước và sau 7 ngày thử nghiệm. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: kết quả phân tích các chỉ tiêu thử nghiệm

STT	Chỉ tiêu thử nghiệm	Đơn vị	Mẫu ban đầu	Mẫu sau 7 ngày	Hiệu suất phân hủy	QCVN 40:2011/ BTNMT (cột B)
1	pH		8,5	7	ĐTC	5,5-9
2	SS (chất rắn lơ lửng)	mg/l	374	5,3	ĐTC	100
3	BOD ₅ (20°C)	mg/l	13345	30	99,8%	50
4	COD	mg/l	26686	110	99,9%	150
5	N (tổng nitơ)	mg/l	694,1	34	95,1%	40
6	P (tổng photpho)	mg/l	20,22	5,2	74,3%	6
7	Tổng dầu mỡ khoáng	mg/l	631950	9,1	ĐTC	10
8	Phenol	mg/l	910	0,25	99,9%	0,5
9	PAH - Acenaphthylene - Fluorene - Phenanthrene - Anthracene - Fluoranthene - Pyrene - Benzo(k)fluoranthene	g/l	1,159 2,005 0,802 0,057 1,07 0,0478 0,0168	KPHD KPHD KPHD KPHD KPHD KPHD KPHD	-	-

Ghi chú: KHPD: không phát hiện được; ĐTC: đạt tiêu chuẩn cho phép

Từ bảng 2 cho thấy, đã có sự thay đổi rõ rệt giữa các chỉ tiêu ở mẫu nước thải ban đầu và mẫu sau 7 ngày thử nghiệm. Hầu như các chỉ tiêu như pH, chất rắn lơ lửng, tổng dầu mỡ khoáng, PAH đều đạt tiêu chuẩn cho phép. Một số chỉ tiêu còn lại như BOD₅ (20°C), COD, tổng nitơ, tổng photpho, phenol đều đạt hiệu suất phân hủy trên 74%. Kết quả trên cho thấy, màng sinh học đa chủng trên giá thể xơ dừa cho hiệu suất phân hủy khá cao sau 7 ngày thử nghiệm. Đặc biệt, một số chỉ tiêu phân tích các hydrocarbon như tổng dầu mỡ khoáng và PAH đều đạt QCVN 40:2011/ BTNMT (cột B), đặc biệt, chỉ tiêu phenol đã đạt hiệu suất phân hủy lên tới 99,9% so với mẫu nước thải ban đầu với nồng độ là 910 (mg/l).

Từ năm 1999, nhóm tác giả [6] đã ứng dụng thành công xơ dừa thô trong bể xử lý kỵ khí để xử lý nước thải ngành chế biến cao su. Trong các mô hình này, các sợi xơ dừa được kết thành chuỗi tiết diện tròn, và không phủ cao su, đường kính 20 cm và dài 200 cm. Sau đó, các chuỗi này được buộc song song với nhau trên một khung hình khối chữ nhật. Nước thải từ các xưởng chế biến cao su được đưa vào các bể phân hủy kỵ khí có xơ dừa thô làm giá thể với thời gian lưu là 2 ngày. Qua kiểm nghiệm chất lượng nước thải trên 22 mẫu nước thải, hiệu suất xử lý đối với chất ô nhiễm hữu cơ vẫn ổn định, hàm lượng COD và BOD đã giảm khoảng 99%; hiện tượng cuốn trôi vi sinh vật ra khỏi

bể xử lý không đáng kể, thuận lợi cho những quá trình xử lý kế tiếp. Sau hơn 1 năm vận hành, bể kỵ khí dùng xơ dừa không có hiện tượng tắc nghẽn dòng chảy nước thải.

Đặc biệt, trong [7] đã nghiên cứu khả năng hấp phụ dầu trong nước thải bằng các vật liệu tự nhiên như thân bèo, lõi ngô, rom và xơ dừa rất thành công. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng, cứ 1 g vật liệu thì có khả năng hấp phụ 0,29 g dầu. Hơn nữa, vật liệu sau khi chế tạo đều có độ trương nở rất nhỏ nên khá bền trong môi trường nước. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, ở cùng một thể tích vật liệu được nhồi cột, lưu lượng nước thải càng lớn thì khả năng hấp phụ càng kém; độ mặn của nước thải càng thấp thì khả năng hấp phụ dầu của vật liệu càng cao [8].

Như vậy, màng sinh học từ vi sinh vật gắn trên chất mang xơ dừa đã loại bỏ được trên 99% các thành phần hydrocarbon có trong nước thải nhiễm dầu trong hệ thử nghiệm với dung tích 50 l. Kết quả này mở ra khả năng ứng dụng các chất mang sinh học có chứa các nhóm vi sinh vật tạo màng sinh học để tăng cường hiệu quả phân hủy sinh học các hợp chất hydrocarbon gây ô nhiễm như dầu thô.

Kết luận

Các chủng vi sinh vật tạo màng sinh học tốt và có khả năng phân hủy các hợp chất hydrocarbon có trong dầu mỏ đã được gắn thành công lên giá thể xơ dừa và được thử nghiệm trong hệ có dung tích là 50 l. Sau 7 ngày nuôi cấy, trên 99% các thành phần dầu đã được phân hủy hoặc chuyển hóa. Các chỉ tiêu như BOD, COD, pH, SS... của mẫu nước thải lấy ở kho xăng Đỗ Xá (Hà Nội) đã giảm đáng kể và đạt tiêu chuẩn nước thải loại B của Việt Nam.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài do Bộ KH&CN cấp, mã số KC04.21/11-15 và sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Morikawa M (2006), "Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species", *Journal of Bioscience and Bioengineerin*, **101**, pp.1-8.
- [2] Lê Thị Nhi Công, Bạch Hoàng Mi, Nghiêm Ngọc Minh (2014), "Nghiên cứu hai chủng nấm men tạo màng sinh học có khả năng phân hủy dầu diesel phân lập từ vùng biển Nghi Sơn, Thanh Hóa", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **11(2)**, tr.343-350.
- [3] Le Thi Nhi Cong, Cung Thi Ngoc Mai, Masaaki Morikawa, Nghiêm Ngọc Minh (2014), "Transformation of *iso*-pentylbenzene by a biofilm - forming strain of *Candidaviswanathii* TH1 isolated from oil-polluted sediments collected in coastal zones in Vietnam", *Journal of environmental science and health, part A49*, pp.777-786.
- [4] Nhi Cong L.T, Morikawa M, Hien L.T (2011), "Ability of hydrocarbon degradation by several biofilm - forming microorganisms isolated from Vietnam coastal zone", *The analytica Vietnam conference*.
- [5] Liang Y, Zhang X, Dai D, Li G (2009), "Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil", *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63**, pp.80-87.
- [6] Lin M, Liu Y, Chen W, Wang H, Hu X (2013), "Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil", *International Biodeterioration and Biodegradation*, **88**, pp.8-12.
- [7] Phạm Thị Dương, Bùi Đình Hoàn, Nguyễn Văn Tám (2010), "Nghiên cứu khả năng hấp phụ dầu trong nước thải bằng các vật liệu tự nhiên như thân bèo, lõi ngô, rơm và xơ dừa", *Tạp chí Khoa học công nghệ hàng hải*, **24**, tr.67-71.
- [8] Nguyễn Ngọc Bích và Lâm Minh Triết (2002), "Ứng dụng xơ dừa trong xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học kỵ khí", *Tạp chí Phát triển khoa học và công nghệ (Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh)*, **5(10)**, tr.38-42.