

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

PHẠM THỊ HẰNG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN KHU HỆ
VI SINH VẬT NHẦM HẠN CHẾ TÁC HẠI CỦA CHÚNG
TRONG NHIÊN LIỆU MÁY BAY JET A1**

Chuyên ngành: **Vi sinh vật học**

Mã số: **62 42 40 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2010

Công trình được hoàn thành tại Viện Công nghệ sinh học
Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn:

PGS.TS. Lại Thuý Hiền

PGS.TS. Trần Đình Mẫn

Phản biện 1: PGS.TS. Phạm Văn Toàn
Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

Phản biện 2: PGS. TS. Lê Gia Hy
Viện Công nghệ Sinh học

Phản biện 3: TS. Dương Văn Hợp
Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án tiến sỹ cấp Nhà nước, tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam - 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

Vào hồi giờ, ngày tháng năm 2010

Có thể tìm thấy luận án tại:

- Thư viện Công nghệ sinh học
- Thư viện Quốc gia

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

1. Lai Thuy Hien, **Pham Thi Hang**, Vuong Thi Nga, Hoang Hai, Nobuyasu Ymaguchi, Katsuji Tani (2008), Microbial diversity in trace water of jet fuel in Vietnam, *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, tr. 303-312.
2. **Pham Thi Hang**, Lai Thuy Hien (2008), Identification of fungi isolated from JetA1 fuel systems by 26s rRNA sequencing, *International 8th General Seminar of CUP on Environmental Science and Technology, Osaka, Japan 11/2008*, tr. 476-483.
3. **Pham Thi Hang**, Lai Thuy Hien, Dang Phuong Nga, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Michihiko Ike (2007), Identification of some predominant bacteria isolated from JetA1 fuel in Vietnam by sequence analysis of 16S rRNA gene, *International 7th General Seminar of CUP on Environmental Science and Technology*, tr. 301-308.
4. Lại Thúy Hiền, Đỗ Thu Phương, Vũ Phương Anh, Đặng Phương Nga, Hoàng Hải, **Phạm Thị Hằng**, Vương Thị Nga, Lê Gia Hy, Trần Đình Mẫn (2005), Nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật dầu mỏ, *Hội nghị Khoa học kỉ niệm 30 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, tr. 57-66.
5. **Phạm Thị Hằng**, Lại Thúy Hiền, Nguyễn Đình Quyển (2000), Đặc điểm phân loại và khả năng phân hủy hydrocacbon của một số chủng vi khuẩn Gram âm phân lập từ nhiên liệu máy bay JetA1, *Tạp chí Sinh học*, 22(4), tr. 31-37.
6. Lại Thúy Hiền, Phạm Thu Thủy, Đặng Phương Nga, Đỗ Thu Phương, Hoàng Hải, **Phạm Thị Hằng** (1999), Chọn chủng vi khuẩn phân hủy hydrocacbon mạch dài ứng dụng trong khai thác dầu khí, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, tr. 36-42.
7. Lại Thúy Hiền, Đỗ Thu Phương, Vũ Phương Anh, Đặng Phương Nga, Phạm Thu Thủy, Hoàng Hải, **Phạm Thị Hằng** (1998), Vi sinh vật trong nhiên liệu Jet A1 và giải pháp loại trừ bằng chất diệt khuẩn, *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*, tr. 286-301.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Nhiên liệu máy bay là một loại sản phẩm chuyên dụng dành riêng cho động cơ máy bay nên đòi hỏi phải có độ tinh sạch rất cao. Đối với nhiên liệu, việc kiểm soát về chất lượng bao gồm các đặc điểm vật lý, hóa học và vi sinh vật đều rất quan trọng. Vì dù chỉ một trong những chỉ tiêu này không bảo đảm đều có thể gây những hậu quả vô cùng nghiêm trọng, ảnh hưởng đến an toàn của các chuyến bay.

Trong nhiên liệu máy bay có thể bị nhiễm hàng trăm loại vi sinh vật khác nhau, nhiều loài trong số đó có khả năng sử dụng rất tốt hydrocarbon trong nhiên liệu. Chúng vừa có thể sinh trưởng rất tốt trong nhiên liệu vừa là những vi sinh vật tiên phong tấn công vào nhiên liệu, kéo theo sự phát triển của nhiều loại vi sinh vật khác.

Vi sinh vật nhiễm trong nhiên liệu máy bay có thể gây những ảnh hưởng rất nghiêm trọng đến chất lượng của nhiên liệu như: thay đổi thành phần hóa học, tính chất lý hóa của nhiên liệu; gây ăn mòn bể chứa và các đường ống dẫn; gây tắc lọc và hệ thống dẫn.

Do đó, việc nghiên cứu về đa dạng vi sinh vật đồng thời phát hiện những loài có khả năng sử dụng nhiên liệu máy bay là rất cần thiết, vừa có ý nghĩa khoa học vừa mang tính thực tiễn cao.

Để giải quyết các vấn đề còn tồn tại như đã nêu trên, luận án: ***“Nghiên cứu thành phần khu hệ vi sinh vật nhằm hạn chế tác hại của chúng trong nhiên liệu máy bay Jet A1”*** đã được thực hiện với mục tiêu và nội dung như sau:

2. Mục tiêu của đề tài

- Đánh giá được tính đa dạng của vi sinh vật phân lập trong nhiên liệu Jet A1 ở Việt Nam.

- Xác định được những vi sinh vật chủ chốt gây hại đối với nhiên liệu máy bay ở Việt Nam.

- Đánh giá được hiệu quả của chất diệt khuẩn đang được sử dụng ở Việt Nam và đưa ra khuyến cáo nhằm kiểm soát các vi sinh vật phá hỏng nhiên liệu, đảm bảo an toàn cho các chuyến bay

3. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập các mẫu nhiên liệu, vết nước nhiên liệu lấy từ các máy bay và các kho bể chứa nhiên liệu của Việt Nam.

- Phân lập các vi sinh vật ưu thế (vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn, nấm men).

- Phân loại một số chủng vi sinh vật chiếm ưu thế trong khu hệ này bằng phương pháp hình thái, sinh lý, sinh hoá và phân tích trình tự 16S, 26S rDNA.

- Xác định thành phần chủng loại và đánh giá đa dạng vi sinh vật trong nhiên liệu Jet A1 bằng kỹ thuật DGGE, so sánh với các phương pháp truyền thống.

- Phát hiện những vi sinh vật có khả năng sử dụng hydrocarbon trong nhiên liệu, gây ảnh hưởng đến an toàn bay.

4. Những đóng góp mới của luận án

(1) Đã phát hiện thêm một số loài vi khuẩn và nấm mốc thường gặp trong nhiên liệu máy bay Jet A1 ở Việt Nam.

(2) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã phân lập được *Dietzia* sp. từ nhiên liệu Jet A1. Vi khuẩn này có khả năng sử dụng các mạch carbon từ C8 – C25 và sinh tổng hợp CHHBMSH gồm một vòng benzene, hai nhóm COO⁻ và hai mạch carbon C12. CHHBMSH do vi khuẩn *Dietzia* sp. sinh ra có thể giúp nhiều loại vi khuẩn khác sinh trưởng và phá hỏng nhiên liệu.

5. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu của đề tài

Các mẫu nhiên liệu máy bay được lấy từ kho bể, xe téc và thùng chứa nhiên liệu ở hai cánh máy bay tại Nội Bài (Hà Nội), Cát Bi (Hải Phòng), Đà Nẵng và Tân Sơn Nhất (Tp. Hồ Chí Minh). Phạm vi nghiên cứu là những vi sinh vật chiếm ưu thế trong nhiên liệu và ảnh hưởng của chúng đến nhiên liệu.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 122 trang, trong đó phần mở đầu 3 trang, tổng quan tài liệu 30 trang, vật liệu và phương pháp nghiên cứu 20 trang, kết quả và thảo luận 53 trang, kết luận 2 trang, danh mục các công trình đã công bố 1 trang, tài liệu tham khảo 13 trang và phụ lục 10 trang.

Chương 1. Tổng quan tài liệu

1.1. Một số đặc điểm, tính chất của nhiên liệu máy bay

1.1.1. Thành phần hóa học của nhiên liệu máy bay

1.1.2. Các tính chất của nhiên liệu máy bay

1.1.3. Phân loại nhiên liệu máy bay

1.1.4. Một số chất phụ gia bổ sung trong nhiên liệu

1.2. Vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay

1.2.1. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay trên thế giới

1.2.2. Nấm mốc *Cladosporium resinae* trong nhiên liệu máy bay

1.2.3. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay ở Việt Nam

1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự tồn tại của vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay

1.3. Ảnh hưởng của vi sinh vật đến nhiên liệu máy bay

1.3.1. Vi sinh vật có thể làm thay đổi thành phần, tính chất của nhiên liệu dẫn đến làm hỏng nhiên liệu

1.3.2. Vi sinh vật gây ăn mòn các thiết bị tiếp xúc

1.3.3. Các ảnh hưởng khác

1.4. Ngăn ngừa và xử lý các thành phần nhiễm bẩn trong nhiên liệu

1.4.1. Xả nước thường xuyên

1.4.2. Sử dụng màng bảo vệ bề chứa

1.4.3. Lọc

1.4.4. Kết tủa

1.4.5. Loại trừ những thành phần dinh dưỡng của vi sinh vật

1.4.6. Sử dụng chất diệt khuẩn, chất ức chế vi sinh vật và các phụ gia

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Tổng số 50 mẫu nhiên liệu máy bay được lấy từ kho bể, xe téc và thùng chứa nhiên liệu ở hai cánh máy bay tại sân bay Nội Bài (Hà Nội), Cát Bi (Hải Phòng), Đà Nẵng và Tân Sơn Nhất (Tp. Hồ Chí Minh).

2.2. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng được cung cấp bởi các hãng có uy tín trên thế giới: Sigma, Takara, Invitrogen, Merck...

2.3. Phương pháp

2.3.1. Các phương pháp thu mẫu: lấy mẫu nhiên liệu bằng cần lấy mẫu chuyên dụng; Lọc mẫu nhiên liệu bằng màng lọc chịu dầu và bơm hút chân không.

2.3.2. Các phương pháp phân lập vi sinh vật: Phân lập và xác định số lượng vi sinh vật trong nhiên liệu theo phương pháp Koch; Đếm số lượng vi sinh vật theo phương pháp pha loãng tới hạn.

2.3.3. Các phương pháp phân tích mẫu: Xác định Gram; Quan sát nấm mốc bằng kỹ thuật tiêu bản phòng ẩm; Quan sát vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử quét; Xác định các đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn bằng kit chuẩn API 50 CHB, API 20 NE; Đánh giá khả năng sử dụng nhiên liệu bằng nuôi cấy trên môi trường 5% Jet A1 làm nguồn carbon; Đánh giá CHHBMSH bằng các phương pháp E24, Drop collapse và Oil spreading; Tách chiết thô và tinh sạch CHHBMSH bằng sắc ký bản mỏng; Xác định thành phần của dầu và CHHBMSH bằng sắc ký khí; Phân tích cấu trúc CHHBMSH bằng sắc ký khối phổ; Tách chiết DNA tổng số, PCR, điện di DNA - DGGE, đọc trình tự gen 16S và 26S rDNA.

2.3.4. Các phương pháp đánh giá kết quả: Sử dụng giao diện tìm kiếm BLAST của NCBI; Xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm CLUSTALX 1.83; Đánh giá độ đa dạng quần thể bằng các chỉ số Shannon, Simpson, Margalef và Menhinick.

Chương 3. Kết quả và thảo luận

3.1. Số lượng và thành phần vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay

3.1.1. Phân tích số lượng vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay

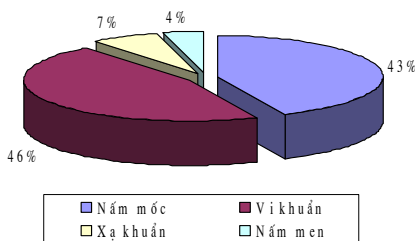
Tất cả 50 mẫu nhiên liệu máy bay đều xuất hiện vi sinh vật với số lượng khác nhau. Vi khuẩn hiếu khí từ $0,2 \times 10^1$ CFU/ml đến 10^6 CFU/ml. Các mẫu có số lượng vi sinh vật cao đột biến đều là các mẫu lấy từ máy bay và thường là các mẫu lẫn nước. Nấm mốc có mặt ở 27/27 mẫu nhiên liệu lấy từ máy bay, 9/12 mẫu bể chứa và 7/11 mẫu xe téc với số lượng cao nhất trong mẫu A345, lên tới $6,3 \times 10^2$ CFU/ml.

Số lượng vi sinh vật trong nhiên liệu cũng tăng dần theo thời gian và quá trình bảo quản, sử dụng, tương tự các nghiên cứu của Lại Thúy Hiền và đtg [68], [94].

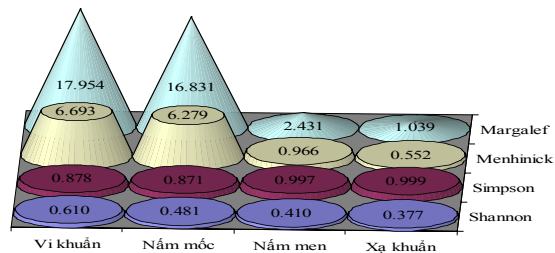
3.1.2. Thành phần vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay

Trong số các vi sinh vật phân lập được, các chủng vi khuẩn và nấm mốc chiếm ưu thế nhất với tỷ lệ gần bằng nhau (46,19 % và 43,33 %), do đó được chọn làm đối tượng cho các nghiên cứu tiếp theo. Xạ khuẩn có 14 chủng, chiếm 6,67 %. Nấm men chỉ có 8 chủng chiếm tỷ lệ 3,81 %. Cả hai nhóm này đã giảm cả về số lượng và đa dạng loài (Hình 3.1).

Sử dụng các công thức toán học để so sánh các chỉ số về độ đa dạng (Shannon), độ đồng đều (Simpson) và đa dạng quần thể (Menhinick, Margalef). Kết quả cho thấy, vi khuẩn và nấm mốc là hai nhóm chiếm ưu thế nhất, bỏ xa các nhóm còn lại là nấm men và xạ khuẩn (Hình 3.2).



Hình 3.1. Tỷ lệ các nhóm vi sinh vật có mặt trong nhiên liệu Jet A1

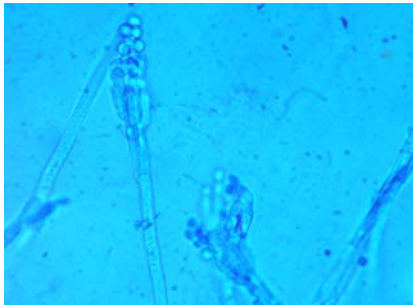


Hình 3.2. Đánh giá mức độ đa dạng và đồng đều của các nhóm vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay dựa vào các chỉ số toán học

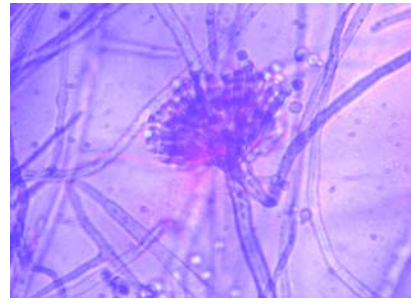
3.2. Phân loại và đánh giá đa dạng các chủng nấm mốc trong nhiên liệu

3.2.1. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm mốc

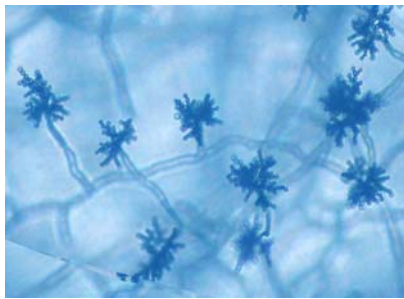
Các chủng nấm mốc đã được mô tả các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khuẩn ty. Chúng được xếp thành các nhóm gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia* và một số chủng chưa định tên.



Penicillium sp. A307.5



Aspergillus sp. A345.6



Cladosporium sp. A302.1

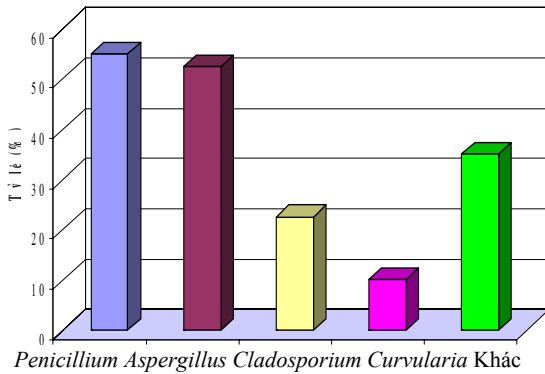


Curvularia sp. A348.6

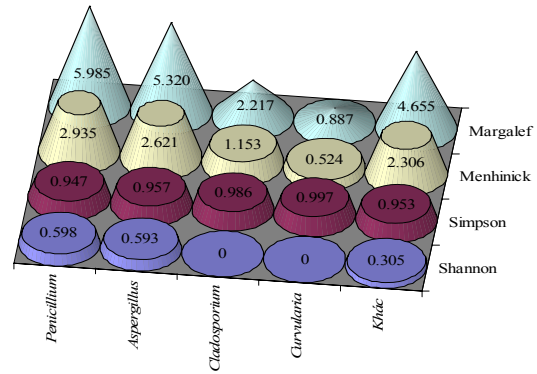
Hình 3.3. Hình thái cơ quan sinh bào tử của một số chủng nấm mốc phân lập trong nhiên liệu Jet A1

Kết quả phân lập và phân loại 91 chủng nấm mốc trong nhiên liệu máy bay ở Việt Nam cho thấy, *Penicillium* gồm 28 chủng và có mặt trong 55 % số mẫu có mốc, *Aspergillus* gồm 25 chủng và có mặt trong 52,5 % số mẫu có mốc. *Cladosporium* phân lập được 11 chủng, có mặt trong 9 mẫu, chiếm tỷ lệ 22,5 %. *Curvularia* có mặt trong 4 mẫu, chiếm tỷ lệ 10,0 %. Các loại mốc còn lại không thuộc 4 chi nêu trên và chiếm tỷ lệ 50 % (Hình 3.4).

Mặt khác, các nhóm nấm mốc trong nhiên liệu cũng được đánh giá về độ đa dạng, độ đồng đều. Kết quả cho thấy *Penicillium* và *Aspergillus* chiếm ưu thế nhất (Hình 3.5).



Hình 3.4. Tỷ lệ các chi nấm mốc có mặt trong nhiên liệu Jet A1



Hình 3.5. Đánh giá mức độ đa dạng và đồng đều của các chi nấm mốc trong nhiên liệu máy bay dựa vào các chỉ số toán học

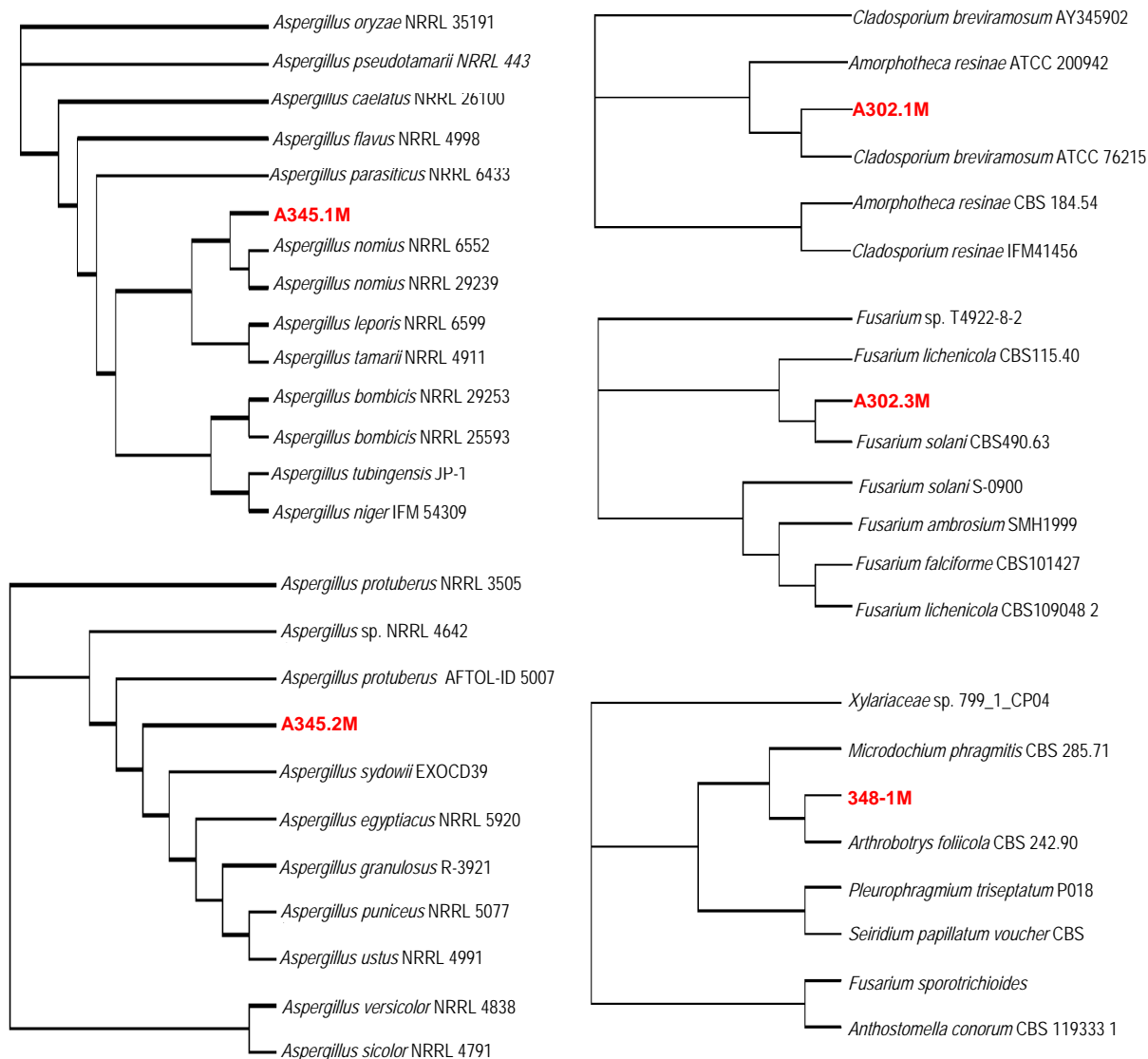
Như vậy, thành phần các loại mốc đã có sự thay đổi so với các nghiên cứu của Lại Thúy Hiền và đtg trước đây [8], [12]. Các nghiên cứu khác trên thế giới cũng đánh giá *Cladosporium* và *Aspergillus* là những mốc chiếm ưu thế trong nhiên liệu [46], [58], [112]. Nhưng trong các mẫu lấy tại Việt Nam, *Cladosporium* xuất hiện với tỷ lệ ít hơn hẳn. Đây là một câu hỏi còn đang bỏ ngõ, cần phải có thêm các nghiên cứu sâu hơn để tìm câu trả lời.

3.2.2. Phân loại nấm mốc bằng so sánh trình tự gen 26S rDNA

Một số chủng nấm mốc được phân loại bằng phương pháp so sánh trình tự gen 26S rDNA đoạn D1/D2 (Hình 3.6)

Dựa vào các kết quả về độ tương đồng so với GenBank và các đặc điểm hình thái học [55] có thể xếp các chủng nấm mốc nghiên cứu vào các loài như sau:

- Chủng A345.1M giống 98,1 % với *Aspergillus* sp.
- Chủng A345.2M giống 97,0 % với *Aspergillus sydowii*
- Chủng A302.1M giống 100 % với *Cladosporium breviramosum*
- Chủng A302.3M giống 99,8 % với *Fusarium solani*
- Chủng A348.1M giống 99,5 % với *Arthrotrrys foliicola*



Hình 3.6. So sánh mức độ tương đồng của các chủng nấm mốc nghiên cứu với những loài có họ hàng gần

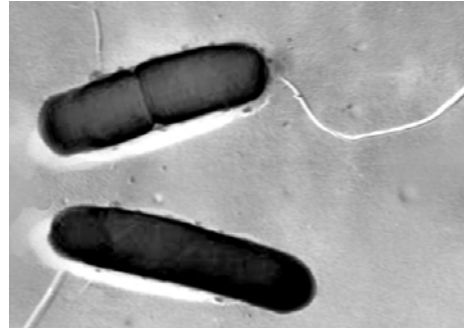
3.3. Phân loại và đánh giá đa dạng vi khuẩn trong nhiên liệu

3.3.1. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn

Vi sinh vật trong nhiên liệu rất đa dạng về hình thái. Tổng số 97 chủng vi khuẩn được chia thành 14 nhóm khác nhau, trong đó có 5 nhóm vi khuẩn Gram âm và 9 nhóm vi khuẩn Gram dương. Các chủng đại diện cho từng nhóm được quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (Hình 3.7) và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



F502.4



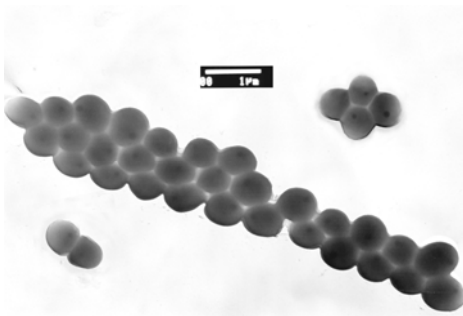
A345t.2



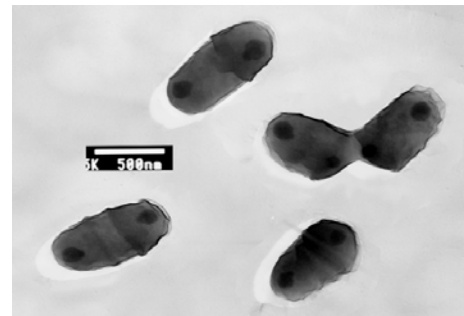
A309.1



A343.3



F502.1



A343.4

Hình 3.7. Hình thái tế bào của một số chủng vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử

3.3.2. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Đánh giá khả năng chuyển hóa hoặc đồng hóa các nguồn cơ chất khác nhau của các chủng nghiên cứu bằng kit API 20 NE (Gram âm) và kit API 50 CHB (Gram dương). Kết quả trình bày trong các Bảng 3.1, và 3.2.

Bảng 3.1. Một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn Gram âm thường gặp trong nhiên liệu Jet A1

Đặc điểm	F502.4	A309.1	A343.7	F502.1	A343.2
Khử nitrate	+	+	+	+ (NO ₂)	-
Chuyển hóa indole	-	-	+	-	-
Axit hóa glucose	+	-	+	+	+w
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	-
Urease	+	+	+	-	+w
Thủy phân					
Esculin	+	-	+	+	-
Gelatine	+	-	+	+	+
β-galactosidase	-	-	+	+	-
Đồng hóa					
Glucose	+	-	+	+	+
Arabinose	+	-	-	+	-
Mannose	+	-	+	+	-
Manitol	+	-	+	+	-
N-acetyl-glucosamine	+	-	+	+	-
Maltose	-	-	+	+	+
Gluconate	+	-	+	+	+
Caprate	+	-	+	-	-
Adipate	+	+	-	-	+
Malate	+	+w	+	-	+
Citrate	+	+w	+	-	+
Phenyl acetate	+w	-	+	-	+
Cytochrome oxidase	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+) phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính;
(+w) phản ứng dương tính yếu

Bảng 3.2. Một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn Gram dương thường gặp trong nhiên liệu Jet A1

Đặc điểm	A345t.2	A345.1	A343.4	A306.1	A343.1
Catalase	+	+	+	+w	+
Axit hóa glucose	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	+	+w	-
Erythritol	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	+	-
D-ribose	+	-	-	-	-
D-xylose	+	+	-	+	-
L-xylose	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	+	+	-
Methyl-β D-Xylopyranoside	-	-	+w	-	-
D-galactose	+	+	-	+	-
D-glucose	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	-
D-mannose	+	-	-	+	-
L-sorbose	-	-	-	+w	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	+	+w	+w	-
D-mannitol	+	-	-	+	-
D-sorbitol	+	-	-	+	-
Methyl-β D-manopyranoside	-	-	-	-	-
Methyl-β D-glucopyranoside	+	-	-	+	-
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	+	-
Amygdalin	+	+	+	-	-
Arbutin	+	+w	+w	-	-
Esculin	+	-	-	+w	-
Salicin	+	-	-	-	-
D-cellobiose	+	-	-	-	-
D-maltose	+	+	+	+	+
D-lactose	-	-	+w	-	-
D-melibiose	-	-	-	-	-
D-saccharose	+	-	-	+	-
D-trehalose	+	+	+	+w	-
Inulin	+	-	+	-	-
D-melezitose	-	-	-	+	-
D-raffinose	+	+	-	-	-
Amidon	+	-	-	-	-
Glycogen	+	-	-	+w	-
Xylitol	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	-	-	-	-
D-turanose	-	-	-	+	+
D-lyxose	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	+w	-	-
D-fucose	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	+	-
D-arabitol	-	+	-	+	-
L-arabitol	+	-	-	-	-
Kali gluconate	-	-	-	-	-
Kali 2-etogluconate	-	-	-	-	-
Kali 5-etogluconate	-	+	+	+	+

Ghi chú: (+) phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính; (+w) phản ứng dương tính yếu

Dựa vào các đặc điểm sinh hóa trong Bảng 3.1, 3.2, tra phần mềm APILAB Plus và đối chiếu với hệ thống phân loại vi sinh vật Bergey's Manuel [49], một số chủng có thể phân loại đến loài như sau:

- Chủng F502.4 giống 99 % với *Pseudomonas cepacia*.
- Chủng F502.1 giống 98 % với *Aeromonas* sp.
- Chủng A345t.2 giống 99 % với *Bacillus subtilis*.

3.3.3. Phân loại vi khuẩn bằng so sánh trình tự gen 16S rDNA

3.3.3.1. Tách chiết DNA tổng số từ vi khuẩn trong nhiên liệu máy bay

Tổng số 14 chủng vi khuẩn thường gặp, đại diện cho 5 nhóm vi khuẩn Gram âm và 9 nhóm vi khuẩn Gram dương được chọn để tách chiết DNA tổng số, sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng PCR tiếp theo.

3.3.3.2. Nhân bản đoạn gen 16S rDNA bằng kỹ thuật PCR

Có 13/14 chủng xuất hiện sản phẩm là một băng duy nhất, có kích thước khoảng 1356 bp. Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra được tinh sạch bằng kit và làm nguyên liệu cho việc đọc trình tự gen 16S rDNA.

3.3.3.3. Đọc trình tự đoạn gen 16S rDNA

Trình tự các đoạn gen được xác định theo phương pháp Sanger cải tiến [106], các dữ liệu được xử lý bằng chương trình PC/GENE. Sử dụng giao diện tìm kiếm BLAST để so sánh các trình tự nucleotide nhận được với các trình tự có sẵn trong GenBank. Dựa vào các kết quả về độ tương đồng so với GenBank, cây phát sinh chủng loại, kết hợp với các đặc điểm về hình thái, sinh hóa và đối chiếu với hệ thống phân loại vi sinh vật Bergey's Manuel, có thể xếp các chủng vi khuẩn nghiên cứu vào các loài như sau:

- Chủng A345.4 giống 98,3 % với *Bacillus flexus*
- Chủng A345t.2 giống 98,5 % với *Bacillus subtilis*
- Chủng A345.1 giống 99,2 % với *Brevibacillus borstelensis*
- Chủng A343.7 giống 98,8 % với *Sphingomonas paucimobilis*
- Chủng A343.4 giống 99,1 % với *Dietzia* sp.
- Chủng A343.3 giống 97,8 % với *Brachybacterium* sp.
- Chủng A343.2 giống 98,1 % với *Sphingomonas pseudosanguinis*
- Chủng A343.1 giống 98,8 % với *Brevibacterium casei*

- Chủng A309.1 giống 99,5 % với *Acinetobacter johnsonii*
- Chủng A306.1 giống 99,7 % với *Brachybacterium paraconglomeratum*
- Chủng A302.4 giống 99,6 % với *Staphylococcus epidermidis*
- Chủng A307.2 giống 97,8 % với *Serinicoccus*
- Chủng A502.1 chưa phân loại được.

Kết quả phân loại cho thấy, khu hệ vi sinh vật trong nhiên liệu khá đa dạng và đã có sự thay đổi mạnh mẽ so với các nghiên cứu đã công bố trước đây. *Bacillus* vẫn chiếm ưu thế như nhiều nghiên cứu đã công bố [14], [34], [41], [49], [62]. *Pseudomonas* là một đại diện quan trọng trong nhiên liệu và có khả năng sử dụng hydrocarbon nhiên liệu rất tốt lại giảm hẳn về số lượng và thành phần loài. Ngoài ra, *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* và *Brevibacterium* cũng là những đại diện khá phổ biến trong nhiên liệu máy bay [58], [99], [111]. Nhiều loài trước đây ít xuất hiện hoặc chưa từng công bố cũng thấy có mặt trong nhiên liệu (*Brevibacillus*, *Branchybacterium*, *Dietzia* và *Serinicoccus*). Một điều dễ nhận thấy là sự chiếm ưu thế của các loài thuộc nhóm Actinobacteridae (*Serinicoccus*, *Brevibacterium*, *Brachybacterium* và *Dietzia*).

Bằng phân tích trình tự gen 16S rDNA, nhiều loại vi khuẩn mới đã được phát hiện trong nhiên liệu máy bay Việt Nam. Sự thay đổi này có thể do những biến đổi về khu hệ vi sinh vật trong nhiên liệu, do tác động của các chất phụ gia, các chất diệt khuẩn, hay đơn giản chỉ là sự phát triển hơn của các kỹ thuật phân tích vi sinh vật hoặc những thay đổi về hệ thống phân loại học và định tên loài.

3.3.4. Đánh giá đa dạng vi khuẩn trong nhiên liệu máy bay bằng phương pháp DGGE

3.3.4.1. Tách chiết DNA tổng số của khu hệ vi khuẩn trong nhiên liệu máy bay

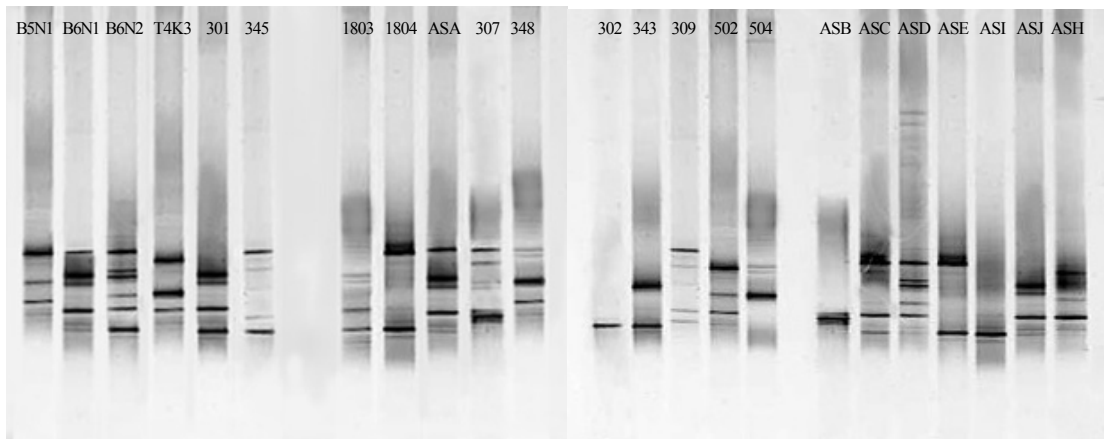
Các mẫu nhiên liệu được lọc để tách chiết DNA tổng số gồm 23 mẫu, trong đó có 17 mẫu lấy từ máy bay, 4 mẫu lấy từ bể chứa và 2 mẫu lấy từ xe téc.

3.3.4.2. Nhân bản đoạn gen 16S rDNA bằng kỹ thuật PCR

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR cho thấy, tất cả các mẫu đều xuất hiện băng tại vị trí khoảng 454 bp và có thể sử dụng làm nguyên liệu cho bước điện di biến tính theo gradient nồng độ tiếp theo.

3.3.4.3. Điện di biến tính theo gradient nồng độ

Tất cả các mẫu DGGE đều có sự phân tách thành nhiều băng với số lượng, kích thước khác nhau và tập trung chủ yếu ở vùng biến tính khoảng 55 – 60 %.



Hình 3.8. Kết quả DGGE các đoạn gen 16S rDNA của vi khuẩn trong mẫu nhiên liệu

Trong vùng biến tính từ 55 – 60 % xác định được tổng số 19 đường băng khác nhau, so với phương pháp phân lập trên thạch ở phần trước (Mục 3.2.3) đã có sự đa dạng hơn ít nhất 35,7 % (19 đường băng so với 14 nhóm chủng vi khuẩn).

Kết quả đọc trình tự đoạn 16S rDNA và so sánh với GenBank như sau:

- Mẫu số 2 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 98 % với chi *Dietzia*
- Mẫu số 3 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 100 % với loài *Brevibacterium casei*
- Mẫu số 4 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 98 % với chi *Acinetobacter*
- Mẫu số 6 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 100 % với loài *Bacillus subtilis*
- Mẫu số 8 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 99 % với chi *Brevibacillus*
- Mẫu số 15 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 100 % với chi *Pseudomonas*
- Mẫu số 16 có trình tự đoạn 16S rDNA giống 100 % với chi *Sphingomonas*.

Bảng phân tích DGGE đã xác định được các vi khuẩn thường gặp nhất trong trong nhiên liệu là *Bacillus* (87 %), *Brevibacterium* (83 %), *Dietzia* (78 %) và *Acinetobacter* (65 %).

3.4. Khả năng sử dụng hydrocarbon của các chủng vi sinh vật thường gặp trong nhiên liệu

3.4.1. Khả năng sử dụng hydrocarbon trong nhiên liệu của một số nấm mốc

Kết quả đánh giá sự sinh trưởng của các khuẩn ty nấm mốc trong thời gian 30 ngày trong môi trường Gost được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu của một số chủng nấm mốc thường gặp

STT	Tên chủng	Khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu	Tên loài
1	ASG.2M	–	<i>Cladosporium</i> sp.
2	A301.3M	+	<i>Penicillium</i> sp.
3	A301.4M	+	<i>Penicillium</i> sp.
4	A302.1M	+	<i>Cladosporium breviranmosum</i>
5	A302.3M	–	<i>Fusarium solani</i>
6	A306.1M	–	<i>Curvularia</i> sp.
7	A307.2M	–	<i>Penicillium</i> sp.
8	A307.4M	–	Chưa xác định
9	A343.1M	+	<i>Aspergillus sydowii</i>
10	A345.2M	++	<i>Aspergillus versicolor</i>
11	A345.3M	+	<i>Cladosporium</i> sp.
12	A345.4M	–	Chưa xác định
13	A345t.1M	+++	<i>Aspergillus</i> sp.
14	A348.5M	–	Chưa xác định
15	A504.1M	+++	<i>Penicillium</i> sp.

Ghi chú: (–) không sinh trưởng; (+) sinh trưởng yếu;
 (++) sinh trưởng tốt; (+++) sinh trưởng rất tốt

Kết quả cho thấy, chỉ có 8/15 chủng có khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu, trong đó có 3 chủng sinh trưởng tốt. Tất cả các chủng *Aspergillus* (3/3 chủng) đều có khả năng sử dụng nhiên liệu làm nguồn carbon duy nhất, 3/4 chủng *Penicillium* có khả năng sử dụng nhiên liệu và 2/3 chủng *Cladosporium* sinh trưởng yếu trong nhiên liệu. Ngoài ra, các chủng khác không có khả năng sinh trưởng độc lập trong nhiên liệu.

3.4.2. Khả năng sử dụng hydrocarbon trong nhiên liệu của một số vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn cũng được khảo sát khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu bằng nuôi cấy lắc trên môi trường khoáng tối thiểu bổ sung 5 % nhiên liệu Jet A1 làm nguồn carbon duy nhất (Bảng 3.4).

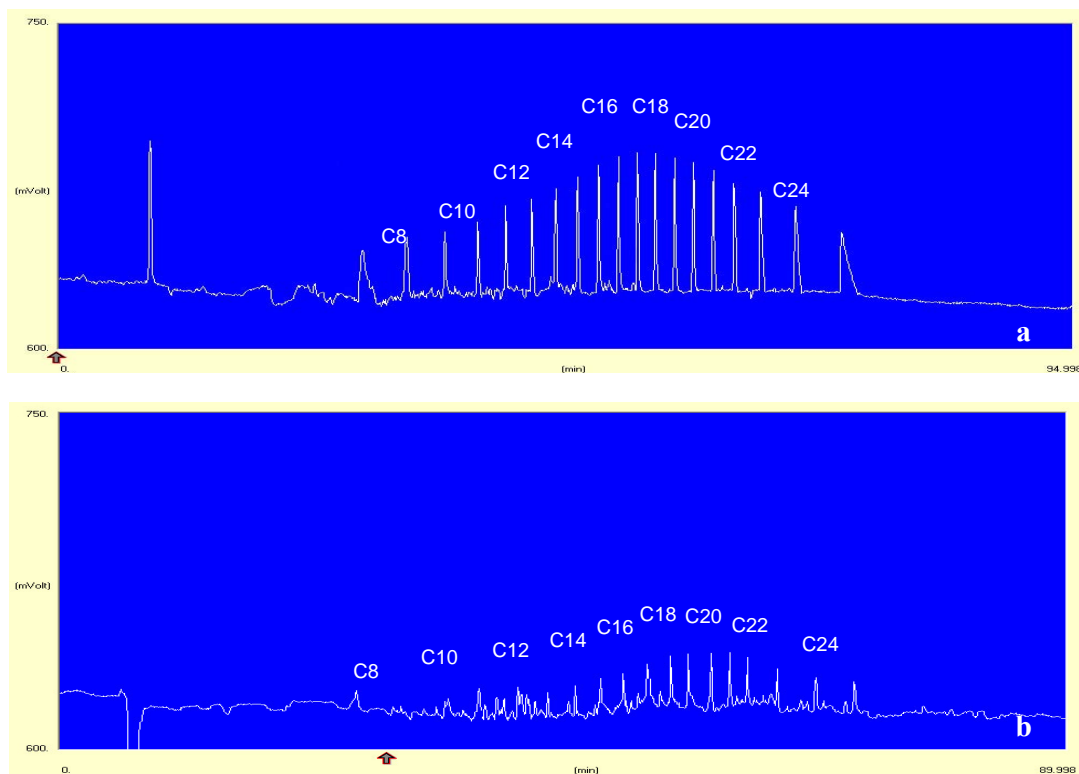
Bảng 3.4. Khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu của một số chủng vi khuẩn thường gặp

STT	Tên chủng	Khả năng sinh trưởng trong nhiên liệu	Tên loài
1	A345.4	–	<i>Bacillus flexus</i>
2	A345t.2	–	<i>Bacillus subtilis</i>
3	A345.1	–	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
4	A343.7	+	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
5	A343.4	+++	<i>Dietzia</i> sp.
6	A343.3	–	<i>Branchybacterium</i> sp.
7	A343.2	–	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>
8	A343.1	–	<i>Brevibacterium casei</i>
9	A309.1	+	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
10	A307.2	–	<i>Serinococcus</i> sp.
11	F502.1	–	Chưa xác định
12	A306.1	–	<i>Branchybacterium conglomeratum</i>
13	A302.4	–	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14	F502.4	++	<i>Pseudomonas</i> sp.

Ghi chú: (–) không sinh trưởng; (+) sinh trưởng yếu;
 (++) sinh trưởng tốt; (+++) sinh trưởng rất tốt

Kết quả khảo sát cho thấy, 4 chủng có khả năng sinh trưởng độc lập trong nhiên liệu, hai chủng sinh trưởng tốt nhất là A343.4 và F502.4.

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đã công bố về khả năng sử dụng hydrocarbon trong nhiên liệu của các loài *Pseudomonas* và đưa ra khuyến cáo ảnh hưởng của chúng đối với nhiên liệu ở mức cao nhất [6], [13], [45], [63], [121], [129]. Các nghiên cứu về các loài thuộc chi *Dietzia* hiện chưa nhiều và chỉ mới công bố trong một vài năm gần đây [43], [81], [91], [130]. Dịch nuôi cấy chủng *Dietzia* sp. A343.4 sau 7 ngày cũng được xác định các thành phần dầu tổng số còn lại bằng sắc ký khí (Hình 3.9).



Hình 3.9. Phổ sắc ký nhiên liệu Jet A1 trước và sau khi nuôi cấy với chủng *Dietzia* sp. A343.4

a. Trước khi nuôi cấy với vi khuẩn b. Sau khi nuôi cấy với vi khuẩn

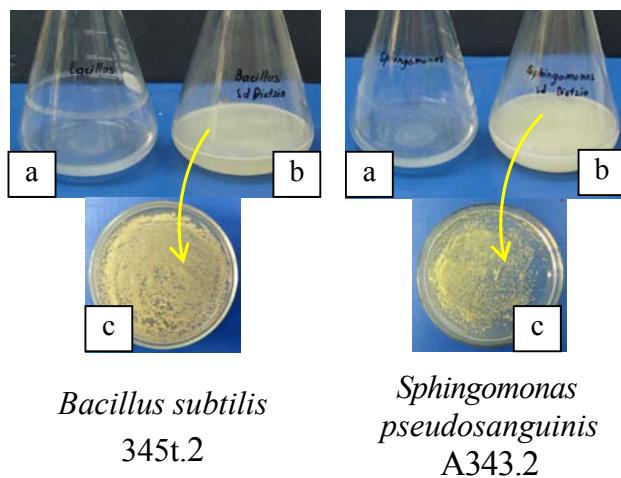
Sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường có 5 % Jet A1, chủng nghiên cứu đã sử dụng mạnh nhất carbon mạch ngắn từ C7 đến C9 (85 đến 97 %) và kém hơn các chuỗi carbon mạch dài.

3.4.3. Vai trò của chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 đối với sự sinh trưởng của các vi khuẩn khác trong nhiên liệu

Chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 được nuôi lắc trong môi trường khoáng Gost bổ sung 5 % Jet A1. Sau 3 ngày, dịch nuôi cấy được khử trùng để diệt *Dietzia* sp. A343.4. Tiếp tục đưa các chủng không sử dụng trực tiếp nhiên liệu cấy vào các bình đã tiệt trùng này và theo dõi sự sinh trưởng của chúng sau 7 ngày liên tục, kết quả trình bày ở Bảng 3.4 và Hình 3.10.

Bảng 3.4. Khả năng sinh trưởng của một số chủng vi khuẩn trong dịch nuôi cấy *Dietzia* sp. A343.4 đã khử trùng

STT	Tên chủng	Số lượng vi khuẩn (CFU/ml)		Khả năng sinh trưởng
		Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm	
1	A345t.2	$2,34 \times 10^3$	$3,64 \times 10^7$	Tốt
2	A345.1	$1,42 \times 10^3$	$8,55 \times 10^7$	Tốt
3	A343.2	$1,79 \times 10^3$	$5,91 \times 10^7$	Tốt
4	A343.3	$1,37 \times 10^3$	$4,35 \times 10^7$	Tốt
5	A343.1	$2,63 \times 10^3$	$1,45 \times 10^8$	Tốt
6	A309.1	$2,57 \times 10^3$	$2,32 \times 10^8$	Tốt
7	A307.2	$1,44 \times 10^3$	$3,22 \times 10^7$	Tốt
8	A502.1	$1,53 \times 10^3$	$7,30 \times 10^8$	Tốt
9	A302.4	$2,31 \times 10^3$	$8,47 \times 10^7$	Tốt



Hình 3.10. Khả năng sinh trưởng của một số chủng vi khuẩn trong dịch đã nuôi cấy chủng *Dietzia* sp. A343.4

- Không sinh trưởng khi nuôi lắc đơn chủng
- Sinh trưởng tốt khi nuôi lắc đơn chủng trong dịch đã nuôi cấy *Dietzia* sp. A343.4
- Gạt dịch nuôi cấy để kiểm tra sự sinh trưởng tốt và thuần khiết của chủng thí nghiệm

Như vậy, các sản phẩm trao đổi chất của *Dietzia* sp. A343.4 đã trở thành nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng và kéo theo sự sinh trưởng rất tốt của hàng loạt các vi khuẩn còn lại. Ngoài ra còn một sản phẩm nữa đã hỗ trợ

các vi khuẩn có thể sử dụng được nhiên liệu dễ dàng là CHHBMSH. Vấn đề này được trình bày ở phần tiếp theo.

3.5. Khả năng tạo CHHBMSH của chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4

3.5.1. Đặc điểm của CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. A343.4 tạo ra

Bằng các phương pháp đánh giá CHHBMSH, đã xác định *Dietzia* sp. 343.4 có khả năng tạo CHHBMSH tốt, dễ thu hồi. Kiểm tra sự sinh trưởng trong nhiên liệu của các vi khuẩn khác ở điều kiện chỉ có 0,5 % (v/v) CHHBMSH, 5 % Jet A1 và 1 % dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn lần lượt là *Bacillus subtilis* A345t.2 và *Sphingomonas pseudosanguinis* A343.2. Sau 3 ngày, các chủng vi khuẩn đều sinh trưởng tốt trong môi trường có Jet A1 làm nguồn carbon duy nhất.

Qua đây có thể kết luận, CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. A343.4 tạo ra đã giúp các vi sinh vật khác dễ dàng hơn trong việc sử dụng nhiên liệu làm nguồn carbon cho sự sinh trưởng. Do vậy, *Dietzia* sp. thực sự là đối tượng vi sinh vật nguy hiểm trong nhiên liệu máy bay. Vì nó vừa sử dụng rất tốt nhiên liệu, vừa kéo theo sự sinh trưởng và sử dụng hydrocarbon của hàng loạt các vi sinh vật khác trong nhiên liệu.

3.5.2. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

Ảnh hưởng của pH đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

Chủng *Dietzia* sp. A343.4 sinh trưởng và sinh tổng hợp CHHBMSH tốt nhất ở pH trung tính đến hơi axit, từ 6,5 đến 7. Chỉ số nhũ hóa E24 cao nhất sau 7 ngày đạt gần 60 % và giảm dần ở ngày thứ 8 (Hình 3.11a).

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

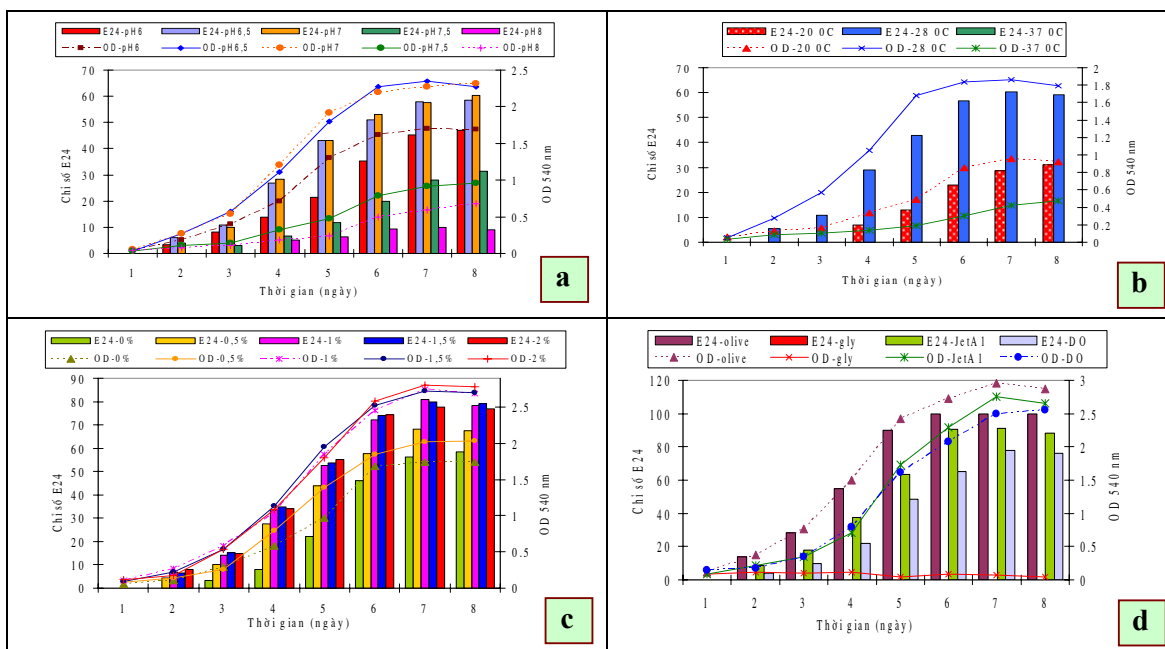
Chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 sinh trưởng và tạo CHHBMSH tốt nhất ở 28 °C. Sau 6 đến 7 ngày, chỉ số nhũ hóa E24 của dịch nuôi cấy đạt 60 % (Hình 3.11b).

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

Chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 có khả năng sinh trưởng tốt trong các điều kiện có nồng độ NaCl khác nhau. Ở các nồng độ NaCl lần lượt là 1; 1,5 và 2 vi khuẩn đều sinh trưởng tốt, tạo nhiều sản phẩm CHHBMSH, chỉ số như hóa E24 sau 6 đến 8 ngày đạt từ 75 đến 80 % (Hình 3.11c).

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

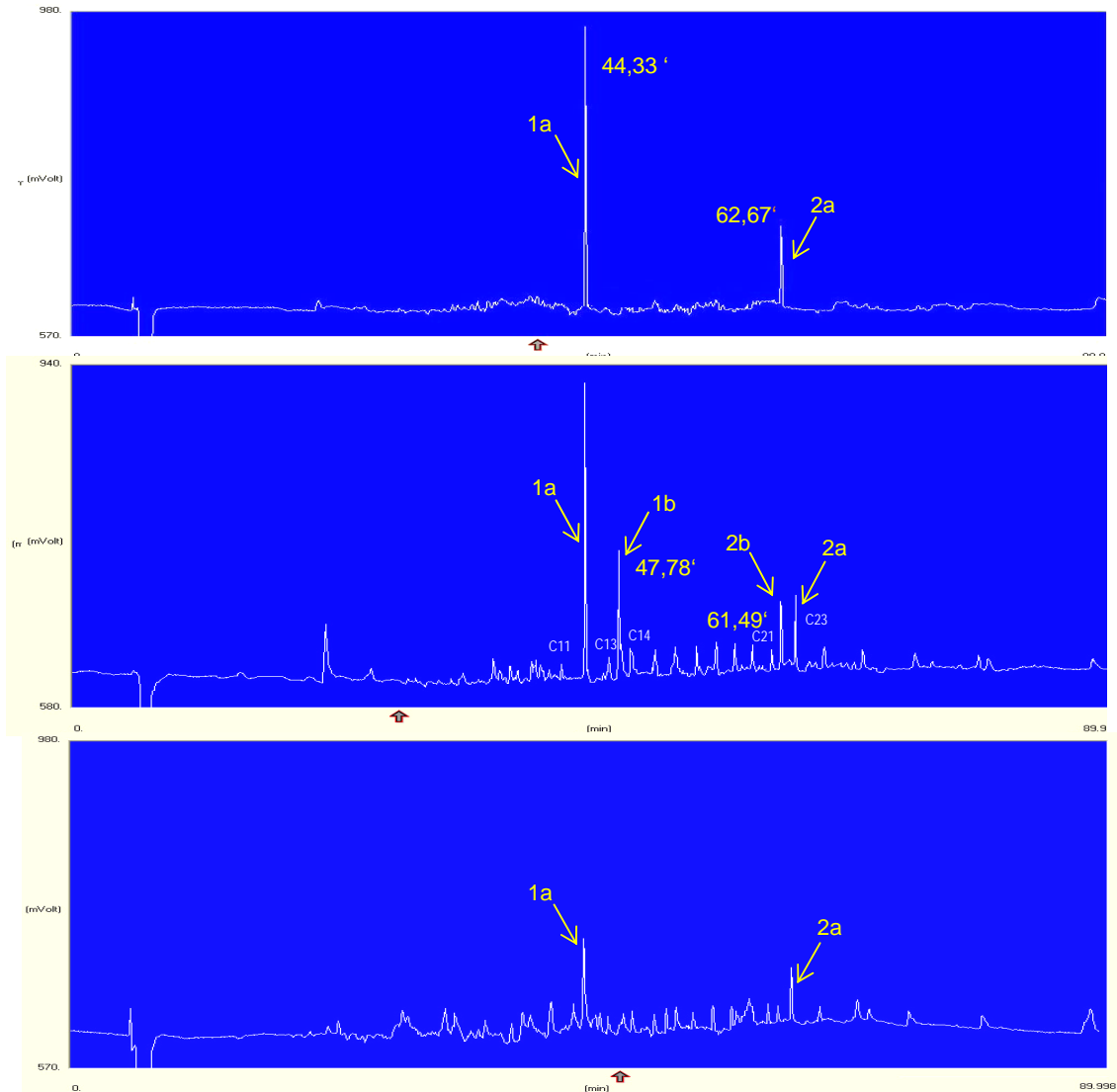
Chủng *Dietzia* sp. A343.4 có khả năng sinh tổng hợp CHHBMSH tốt nhất trong môi trường sử dụng dầu olive làm nguồn carbon, với chỉ số E24 lên tới 90 % sau 5 ngày nuôi cấy và đạt cực đại 100 % sau 6 ngày nuôi cấy. Chủng *Dietzia* sp. A343.4 cũng có thể sử dụng hai loại nhiên liệu là Jet A1 và dầu DO khá tốt nhưng không sử dụng glycerol (Hình 3.11d).



Hình 3.11. Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4

3.5.3. Xác định sự có mặt của CHHBMSH do vi khuẩn *Dietzia* sinh tổng hợp

CHHBMSH do *Dietzia* sp. A343.4 sinh ra được tách chiết và tinh sạch bằng sắc ký bản mỏng (TLC) và sử dụng sắc ký khí (GC) để xác định các đặc điểm pic (peak) và thời gian lưu (Hình 3.12a).



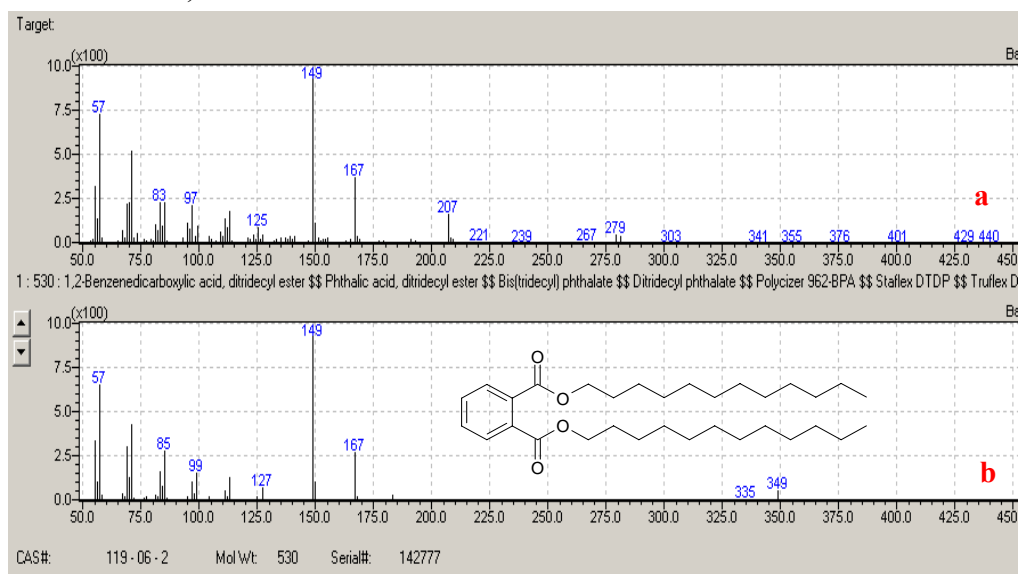
Hình 3.12. Sắc ký đồ CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. A343.4 sinh tổng hợp

- a. Tách chiết riêng CHBMSH
- b. Dịch nuôi cấy chủng *Dietzia* sp. A343.4
- c. Dịch nuôi cấy chủng *Dietzia* sp. A343.4, sau đó sử dụng để nuôi cấy chủng *B. subtilis* A345t.2

Từ kết quả nhận thấy, trong mẫu sắc ký đồ luôn xuất hiện từ 2 đến 4 pic đặc trưng. Hai pic lớn 1a và 2a thường xuyên có mặt trong tất cả các mẫu sắc ký có CHHBMSH. Hai pic nhỏ hơn 1b và 2b không xuất hiện thường xuyên trong các mẫu đã chạy sắc ký. Như vậy, sắc ký đồ CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. A343.4 sinh tổng hợp có các đặc điểm pic rất ổn định và đặc trưng. Tuy nhiên, để xác định cấu trúc CHHBMSH do chủng này tạo ra, cần phải tiếp tục có các nghiên cứu sâu hơn.

3.5.4. Xác định cấu trúc CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. A343.4 tạo ra bằng sắc ký khối phổ (GC-MS)

CHHBMSH do chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. sinh tổng hợp được phân tích bằng GC-MS (Hình 3.13) có chứa một vòng benzene, hai mạch hydrocarbon C12 và có một vị trí nhóm COO⁻ nằm ở cuối mạch (giống với chất chuẩn 85 %).



Hình 3.13. Xác định cấu trúc CHHBMSH do chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 sinh tổng hợp bằng GC-MS

a. CHHBMSH bị cắt thành các mảnh nhỏ

b. So sánh với cơ sở dữ liệu, CHHBMSH giống với chất chuẩn 85 %

3.6. Đánh giá hiệu lực của chất diệt khuẩn Biobor JF đối với vi sinh vật gây hại trong nhiên liệu máy bay Jet A1

3.6.1. Loại trừ vi sinh vật nhiễm trong nhiên liệu bằng chất diệt khuẩn Biobor JF

Hiện nay, Vietnam Airlines đang sử dụng 1 loại chất diệt khuẩn duy nhất là Biobor JF (Hammonds). Thử nghiệm liều diệt khuẩn 270 ppm (liều tối đa được phép sử dụng) đối với một số mẫu nhiên liệu cho kết quả ở Bảng 3.14. Với liều lượng diệt khuẩn 270 ppm, Biobor JF không thể diệt được hoàn toàn tất cả các nhóm vi sinh vật trong nhiên liệu. Biobor JF có hiệu lực hơn đối với nấm mốc và kém hiệu lực hơn với vi khuẩn, mẫu có nhiều nước kém hơn hẳn so với các mẫu nhiên liệu sạch nước.

Bảng 3.14. Hiệu lực diệt vi sinh vật trong nhiên liệu máy bay Jet A1 của chất diệt khuẩn Biobor JF, nồng độ diệt khuẩn 270 ppm

STT	Loại máy bay	Nhóm vi sinh vật	Trước xử lý (CFU/ml)	Sau xử lý (CFU/ml)	Ghi chú
1	S7-ASA	Vi khuẩn hiếu khí	$7,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^1$	không nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^2	10^1	
		Nấm mốc	$3,2 \times 10^3$	–	
2	S7-ASD	Vi khuẩn hiếu khí	$1,7 \times 10^4$	–	không nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^1	–	
3	S7-ASE	Vi khuẩn hiếu khí	$5,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^1$	có nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^3	10^1	
		Nấm mốc	$6,1 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	
		Nấm men	$2,9 \times 10^3$	–	
		Xạ khuẩn	$3,1 \times 10^2$	–	
4	S7-ASG	Vi khuẩn hiếu khí	$2,8 \times 10^3$	–	không nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^1	–	
		Nấm mốc	$2,1 \times 10^1$	–	
		Nấm men	$2,4 \times 10^1$	–	
5	S7-ASH	Vi khuẩn hiếu khí	$1,2 \times 10^7$	$9,7 \times 10^1$	vết nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^3	10^1	
		Vi khuẩn kỵ khí	10^1	–	
6	S7-ASI	Vi khuẩn hiếu khí	$1,0 \times 10^3$	–	không nước
		Vi khuẩn sử dụng Jet A1	10^1	–	

3.6.2. Đề xuất các biện pháp kiểm soát vi sinh vật gây hại trong nhiên liệu máy bay ở Việt Nam

1. Tăng cường kiểm tra vi sinh vật trong nhiên liệu.
2. Áp dụng các kit phát hiện nhanh vi sinh vật trong nhiên liệu.
3. Xả nước, xử lý lọc, vệ sinh thùng chứa nhằm hạn chế ở mức thấp nhất sự có mặt của nước trong nhiên liệu.
4. Xử lý nhiên liệu và thùng chứa nhiên liệu trên máy bay khi bị nhiễm vi sinh vật đúng quy trình.

KẾT LUẬN

1. Đã xác định được số lượng các nhóm vi sinh vật trong 50 mẫu nhiên liệu máy bay sử dụng ở Việt Nam. Vi khuẩn hiếu khí từ $0,2 \times 10^1$ đến $1,1 \times 10^6$ CFU/ml; nấm mốc từ $0,2 \times 10^1$ đến $6,3 \times 10^2$ CFU/ml; nấm men từ $0,2 \times 10^1$ đến 10^1 CFU/ml; vi sinh vật sử dụng nhiên liệu $<10^1$ đến 10^2 MPN/ml. Tỷ lệ các nhóm vi sinh vật trong nhiên liệu là: vi khuẩn chiếm 46,19 %; nấm mốc chiếm 43,33 %, xạ khuẩn chiếm 6,67 % và nấm men chiếm 3,38 %.
2. Các chi nấm mốc thường gặp trong nhiên liệu là *Penicillium* (55 %), *Aspergillus* (52,5 %), *Cladosporium* (22,5 %) và *Curvularia* (10 %).
3. Đã xác định được 14 loài vi khuẩn thường gặp trong nhiên liệu máy bay là *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus flexus*, *Bacillus subtilis*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brachybacterium* sp., *Brevibacillus borstelensis*, *Brevibacterium casei*, *Dietzia* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas pseudosanguinis*, *Serinicoccus* sp. và *Staphylococcus epidermidis*. Trong số đó, *Dietzia* và *Serinicoccus* chưa từng được công bố xuất hiện trong nhiên liệu máy bay.
4. Bằng phương pháp DGGE, đã xác định được trong nhiên liệu có ít nhất 19 nhóm vi khuẩn khác nhau, cao hơn so với các phương pháp phân lập thông thường là 35,7 %. Trong đó có 4 nhóm ưu thế nhất là *Bacillus* (87 %), *Brevibacterium* (83 %), *Dietzia* (78 %) và *Acinetobacter* (65 %).
5. Hai chi nấm mốc *Penicillium*, *Aspergillus* và hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. F502.4, *Dietzia* sp. A343.4 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong nhiên liệu. Chủng vi khuẩn *Dietzia* sp. A343.4 có khả năng sử dụng 56 đến 97 % hydrocarbon từ C8 đến C25. Các sản phẩm trao đổi chất, đặc biệt là CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp. A343.4 có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng và sử dụng nhiên liệu của các vi sinh vật khác.
6. Đặc điểm của CHHBMSH do chủng *Dietzia* sp. sinh tổng hợp: có khả năng khử hoá 82 % xylen, có khả năng đẩy 100 % dầu trong nước. Điều kiện thích hợp tạo CHHBMSH của chủng *Dietzia* sp.: pH từ 6,5 đến 7; nhiệt độ 28 °C; nồng độ NaCl từ 1 – 2 %; nguồn carbon là dầu olive, Jet A1 và DO.
7. CHHBMSH do *Dietzia* sp. tạo ra có thời gian lưu tương ứng với C12 và C22. Dựa vào phân tích GC – MS dự đoán cấu trúc của CHHBMSH do *Dietzia* sp. sinh tổng hợp gồm một vòng benzene, hai gốc COO⁻ và hai chuỗi hydrocarbon C12 đối xứng nhau.
8. Chất diệt khuẩn Biobor JF ở liều 270 ppm không diệt được hoàn toàn các nhóm vi sinh vật. Cần tăng cường kiểm soát thành phần và số lượng vi sinh vật trong nhiên liệu Jet A1 ở Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

1. Nghiên cứu xây dựng bộ kit phát hiện nhanh vi khuẩn *Dietzia* sp. trong nhiên liệu.
2. Nghiên cứu tìm chất diệt khuẩn phù hợp và có hiệu lực hơn.