



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027351

(51)⁷ C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2019-01599

(22) 29/03/2019

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/06/2019 375A

(73) 1. ĐẶNG THỊ CẨM HÀ (VN)

Nhà số 5, ngõ 158/43, Nguyễn Khánh Toàn, thành phố Hà Nội

2. NGUYỄN THANH TÚ (VN)

Số nhà 55 Hoàng Văn Thái, Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) ĐẶNG THỊ CẨM HÀ (VN); NGUYỄN THANH TÚ (VN); NGUYỄN THỊ PHƯƠNG THẢO (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN ƯA NHIỆT *UREIBACILLUS* SP. BCBT27 PHÂN HỦY MÀNG POLYME VÀ CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ XỬ LÝ RÁC THẢI MÀNG POLYME CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C và sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, CMCaza, chitinaza, amylaza ở nhiệt độ 55°C bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng và rắn. Dịch nuôi cấy hay chế phẩm dạng rắn có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối với cấu trúc hóa học khác nhau có khả năng phân hủy sinh học và thân thiện môi trường. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập tới chế phẩm dùng để xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối có khả năng phân hủy sinh học ở mức độ rất khác nhau chứa chủng vi khuẩn ưa nhiệt này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật xử lý rác thải môi trường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27 thuần khiết và mặt sinh học, có khả năng phân hủy màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ như túi nilon, chất dẻo (plastic), nhựa PE, nhựa PE đã được xúc tiến oxy hóa (exo-biodegradable plastic) và màng polyme có nguồn gốc là sinh khối. Chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27 này có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C, và sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, CMCaza, chitinaza và amylaza với hoạt tính khác nhau ở nhiệt độ cao 55°C. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập tới chế phẩm dùng để xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối có khả năng phân hủy sinh học ở mức độ khác nhau chứa chủng vi khuẩn nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất dẻo (plastic, nhựa, gọi tắt là polyme) được sử dụng từ giữa thế kỷ trước và nhu cầu sử dụng không ngừng gia tăng. Như đã biết polyme có khối lượng phân tử cao như polyethylen rất khó để vi sinh vật tấn công. Loại polyme này là sản phẩm tạo ra hàng hóa thương phẩm với số lượng lên tới 80 triệu tấn. Trong 3 thập kỷ vừa qua plastic sử dụng ngày càng tăng trong giao thông, thực phẩm - may mặc, xây dựng, sản xuất công nghiệp (máy bay, tàu chiến, máy tính, ô tô, v.v) ý tế, giải trí. Theo tính toán gần đây nhất (2014) thì lượng chất dẻo tiêu thụ tới hơn 300 triệu tấn/năm. Bình quân đầu người năm 2015 sử dụng ở các khu vực trên thế giới rất khác nhau, mức tiêu thụ trung bình trên đầu người gần 79 kg/năm. Tiêu thụ chất dẻo nhiều nhất là người Mỹ (155 kg/người) và ít hơn cả là người châu Á tiêu thụ hơn 48 kg/người. Năm 2012, lượng rác thải polyme thải vào môi trường ở Châu Âu là 25,2 triệu tấn, ở Mỹ là 29 triệu tấn. Theo các báo cáo về môi trường của Liên hợp Quốc, trên thế giới có khoảng 22 – 43% polyme thải vào môi trường khi xử lý bằng công nghệ chôn lấp, 35% đổ vào các đại dương.

Còn Việt Nam có mức tiêu thụ plastic lên đến hơn 40 kg/người. Nhu cầu sử dụng polyme tăng lên đồng nghĩa với việc tăng lượng chất thải, gây ô nhiễm môi trường toàn cầu. Ở Việt Nam, lượng chất thải rắn của cả nước phát sinh trung bình

hàng năm tăng gần 200% và còn tiếp tục tăng trong thời gian tới, ước tính khoảng 44 triệu tấn/năm, trong đó rác thải polyme chiếm một tỷ lệ lớn. Tính đến năm 2010 lượng rác phát sinh 26.224 tấn/ngày và tăng trung bình 10% mỗi năm. Riêng thành phố Hà Nội hiện nay có tới khoảng 5.400 tấn rác phát sinh và chỉ xử lý được 100 m³, còn lại là chôn lấp. Ở Thành phố Hồ Chí Minh mỗi ngày thải ra 8.300 tấn rác, chủ yếu là chôn lấp (tỷ lệ chôn lấp 76%). Chủ yếu tập trung ở bãi rác Đa Phước và xử lý bằng công nghệ chôn lấp 5.500 tấn/ngày với giá xử lý 20,9 đô la Mỹ/tấn. Dự báo đến năm 2020, tổng khối lượng rác sinh hoạt của thành phố tăng tới 10.080 tấn mỗi ngày (tăng bình quân 5 % mỗi năm) và đến năm 2025 tăng lên gần 13.000 tấn/ngày. Thành phố Hồ Chí Minh phấn đấu xây dựng lộ trình cụ thể đến năm 2020 giảm tỷ lệ chôn lấp chất thải rắn xuống còn 50 % đến năm 2025 là 20 %. Tất cả các số liệu liệt kê trên đều được thông báo trên phương tiện thông tin đại chúng.

Plastic do con người tạo ra và thành phần bao gồm cacbon, hydrogen, silicon, oxy, chlorid và nitơ. Dầu thô, than đá, khí tự nhiên đã là nguồn nguyên liệu cơ bản cho chiết xuất tạo nên plastic. Loại plastic rất bền vững theo thời gian. Chủ yếu, plastic đang sử dụng là polyethylen (LDPE, MDPE, HDPE and LLDPE), Poly Ethylen Terephthalat (PET), Polybutylen Terephthalat (PBT), nylon, Poly-Propylen (PP), Polystyren (PS), Polyvinyl clorua (PVC), and Polyurethan (PUR). Còn plastic tạo ra từ sinh khối hay nguồn nguyên liệu tái tạo như poly(hydroxybutyrat) (PHB), poly(lactid) (PLA) và tinh bột hỗn hợp được vi sinh vật hay enzyme của chúng sinh ra dễ dàng phân hủy sinh học có tên gọi là plastic sinh học “bioplastic”. Loại plastic cũng có thể phân hủy sinh học bằng cải thiện mức độ thủy phân hay độ dài của chuỗi polyme có thể được giảm bằng sự oxy hóa nhờ sinh trưởng của vi sinh vật. Loại plastic này có tên là “exo-biodegradable” và được tạo ra trên cơ sở polylyethyl (LDPE, MDPE, HDPE and LLDPE) kết hợp với các phụ gia xúc tiến oxy hóa và chúng thường là các ion kim loại chuyển tiếp được đưa vào ở dạng stearat hay phức chất với các phối tử hữu cơ khác. Các kim loại chuyển tiếp được sử dụng làm phụ gia xúc tiến oxy hóa gồm Ti, V, Cr, Mn, Fe, 2 Co, Ni, Cu, Zn, Ca v.v, trong đó hiệu quả nhất phải kể đến phức stearat của Co, Mn và Fe. Dưới tác động của tia cực tím (UV), nhiệt độ hoặc các tác động cơ học, các phụ gia thúc đẩy phản ứng oxy hóa mạch polyme tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v. tạo

điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp các mạch monome, dionome, oligome v.v.. Nhờ các chất xúc tiến oxy hóa, thời gian phân hủy plastic từ hàng trăm năm giảm xuống còn vài năm thậm chí là vài tuần hay vài tháng đối với plastic đã được cải biến này.

Như đã đề cập plastic cũng có cấu trúc gần giống lignin cho nên cách tác động của laccaza enzym cũng thường xảy ra tương tự. Các bước vi sinh vật phân hủy plastic xảy ra như sau: Vi sinh vật (ở dạng đơn lẻ hay tổ hợp, tuy nhiên trong tự nhiên là tổ hợp vi sinh vật) sinh trưởng và tạo nên các enzym ngoại bào; Các enzym ngoại bào do vi sinh vật tiết ra bám lên bề mặt của plastic; Chúng cắt chuỗi polyme và xảy ra bề mặt plastic bị xói mòn, phân hủy sinh học plastic xảy ra với tốc độ khác nhau do rất nhiều yếu tố tác động, sản phẩm cuối cùng của quá trình phân hủy plastic là CO_2 , H_2O và CH_4 .

Trong tự nhiên quá trình này xảy ra rất chậm nhưng nhiều công trình gần đây đã chứng minh rằng có thể khoáng hóa được plastic. Có những nghiên cứu cơ bản chứng minh được một số chủng vi sinh vật đơn lẻ có thể tham gia phân hủy được plastic nhưng một chủng đơn lẻ không thể khoáng hóa được plastic bởi cấu trúc của bền vững tạo nên plastic đều có nguồn gốc dầu mỏ. Trừ loại có khả năng phân hủy sinh học nhanh và hoàn toàn có xuất xứ từ sinh khối thì loại polyme tạo ra từ quá trình xúc tiến oxy hóa nhờ một số kim loại Fe, Co, Ni, Cu Ti, V, Cr, Mn, Zn, Ca v.v. đang được sử dụng tại một số quốc gia đã được thương mại hóa. Nếu được tác động trước (tiền xử lý) bởi các tác nhân hóa học, lý học và như tia cực tím (UV), các phụ gia, nhiệt độ hoặc các tác động cơ học khác nhau thì quá trình oxy hóa mạch polyme được thúc đẩy để các phản ứng tạo thành các nhóm chức như cacbonyl, cacboxyl, hydroxit, v.v. được hình thành nhanh hơn và đây là điều kiện cho vi sinh vật dễ dàng tiếp cận để phân hủy tiếp. Quá trình phân hủy loại polyme này cũng gần giống như đối với lignoxenluloza (lignin, hemixenluloza, xenluloza) chỉ khác là nguồn gốc và quá trình tạo ra các plastic khác hoàn toàn với polyme tái tạo có nguồn gốc thiên nhiên. Tổ hợp chuỗi các phản ứng sinh hóa xảy ra cũng

tương tự và tuân thủ theo các cơ chế mà ở đó các enzym ngoại bào, nội bào đều hoạt động.

Vậy sử dụng cùng một lúc tổ hợp của các chủng sinh các enzym như lipaza, esteraza, ligninaza, v.v. để phân hủy polyme có điểm nào khác với quy luật chung hay không? Và khác ở chỗ nào? Câu trả lời là không khác với quy luật mà chỉ khác ở chỗ chúng đóng vai trò là chất xúc tác mạnh hay tham gia vào chuỗi phản ứng để cắt ngắn cấu trúc của chuỗi polyme của plastic. Cuối cùng tất cả mọi quy trình sinh học cũng đi vào chu trình Creb để khoáng hóa thành các axit béo, sinh khối vi sinh vật, CO₂ và nước.

Cho đến nay chưa có giải pháp kỹ thuật nào mang tính khả thi cao cho các nước phát triển và đang phát triển về xử lý loại ô nhiễm rác thải plastic, đặc biệt là plastic sản xuất từ nguyên liệu hóa thạch và nhiều nhất là dầu mỏ. Còn rác thải từ plastic có khả năng phân hủy sinh học (bioplast) đã không còn là vấn đề rất khó với quá trình phân hủy sinh học nhờ có giải pháp hữu hiệu xử lý bằng các công nghệ khác nhau, trong đó có xử lý bằng hệ enzym hay ủ compost với nhiệt độ cao được kiểm soát. Hiện nay số lượng rác thải là nhựa có thể phân hủy sinh học chiếm một thị phần rất khiêm tốn vì sản xuất với kinh phí rất cao. Bốn thế kỷ qua các nghiên cứu phân hủy sinh học không ngừng tìm kiếm các con đường để xử lý rác thải là chất dẻo (nhựa, túi ni lông, bao bì sử dụng trong công nghiệp, y tế, nông nghiệp và trong đời sống hàng ngày). Rác thải là plastic chủ yếu vẫn đang được chôn lấp. Hệ lụy của việc này không chỉ tổn thất kinh tế mà gây nên ô nhiễm môi trường nước ngầm cũng như giảm chất lượng cuộc sống của cộng đồng sống quanh vùng chôn rác. Một trong các con đường để giảm tác động của rác thải plastic là sử dụng tổ hợp vi sinh vật sống cùng với tạo điều kiện môi trường phù hợp để cho quá trình phân hủy sinh học plastic có hiệu quả cao nhất có thể. Một con đường nữa là sử dụng hệ enzym từ xạ khuẩn, xạ khuẩn sợi, xạ khuẩn và vi khuẩn sinh tổng hợp để xử lý. Cách này cần thêm các chuỗi kỹ thuật khác để sao cho enzym tạo ra bền, tiêu hao thấp nhất và hoạt động được trong các điều kiện môi trường sinh thái khác nhau. Hơn thế nữa có thể kết hợp với nhiệt độ và các tác nhân vật lý, cơ học khác

nhằm tạo điều kiện thuận lợi để vi sinh vật có thể sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất với plastic để cuối cùng khoáng hóa được plastic mà sản phẩm ở điều kiện hiếu khí là CO_2 , H_2O , còn ở điều kiện kỵ khí là CO_2 , H_2O và CH_4 . Các quá trình phân hủy, chuyển hóa dẫn đến khoáng hóa hoàn toàn rất phức tạp và rất dài, tuy nhiên ở mỗi điều kiện môi trường và mỗi quần xã vi sinh vật hay mỗi nhóm enzym không hoạt động giống nhau nhưng chúng lại bổ trợ cho nhau, cho nên các nhà khoa học công nghệ cần chọn được con đường phân hủy hiệu quả nhất đối với từng loại plastic. Các nghiên cứu đã sử dụng lên men trực tiếp các vi sinh vật sống với các loại plastic nhưng cũng có thể sử dụng hỗn hợp enzym do chúng sinh tổng hợp trên môi trường rắn hoặc lỏng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của chúng (kể cả plastic khó phân hủy và plastic đã được cải biến là “exo-biodegradable” và bioplastic). Tuy nhiên để dễ đánh giá hiệu quả của công bố quốc gia và quốc tế thì chọn 1 hay 2 enzym để khảo sát theo thời gian với các tiêu chí chuẩn để đánh giá khả năng phân hủy, chuyển hóa các loại plastic có nguồn gốc và cách sản xuất khác nhau thường được lựa chọn đầu tiên. Cách này khó có thể làm cơ sở khoa học đủ mạnh để dẫn đến công nghệ khả thi nếu xét cả về mặt kỹ nghệ, kinh tế và bảo vệ môi trường.

Loại bỏ rác thải plastic bằng phân hủy sinh học tập trung vào các polyme được tiêu thụ chủ yếu như polyethylen, polypropylen, polyurethan and polystyren. Rất đáng tiếc các polyme trên cũng là các loại rất bền vững. Một trong các phương pháp thành công nhất có thể làm chủ được là phân hủy nhờ enzym và cần phải tăng cường tốc độ phân hủy chúng. Vậy các cơ sở khoa học có liên quan nằm ở đâu? Và tại sao sử dụng enzym đã trở thành một trong các giải pháp chìa khóa. Nhóm enzym nào cần nhất và quan trọng trong việc chuyển hóa phân hủy plastic. Các nhóm enzym đó thuộc họ enzym tham gia và quá trình chuyển hóa lignoxenluloza và các enzym hoạt động giống như các chất xúc tác oxy hóa các hợp chất phenol và không phải phenol.

Địa điểm tốt nhất để lấy mẫu phân lập và lựa chọn các vi sinh vật sinh tổng hợp các enzym tham gia phân hủy plastic là chỗ chôn lấp rác thải sinh hoạt, công

nghiệp lẫn nhựa, túi ni lông hay từ quá trình ủ compost mà nguyên liệu là lignoxenluloza v.v.. Khả năng chuyển hóa, phân hủy trong quá trình ủ compost cũng là một tiêu chí quan trọng của ASTM để đánh giá khả năng phân hủy sinh học của plastic. Trong hàng loạt enzym tiềm năng cao để phân hủy plastic thì các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn ưa nhiệt mang lại hiệu quả phân hủy sinh học rác plastic nhanh. Lý do là chúng sinh trưởng nhanh và tạo được cả hệ enzym hoạt động ở nhiệt độ cao và bản thân chúng cũng có thể sử dụng để ủ compost plastic. Hơn thế nữa, nhiệt độ cao trên 45°C kéo dài cũng là tác nhân làm tăng tốc quá trình phân hủy rác plastic. Nếu kết hợp được những ưu thế này thì nghiên cứu để tạo ra một công nghệ xanh cho xử lý rác plastic sẽ có tính khả thi cao hơn. Trong bài toán khó với lượng rác nhựa tăng dần mỗi năm trên toàn hành tinh của chúng ta và ở từng nước khác nhau, Việt Nam cũng không phải là ngoại lệ, nay phải đối diện với tìm giải pháp, công nghệ cho xử lý loại rác bền vững này mà không gây ô nhiễm thứ cấp và cũng có thể tái sử dụng đang được hết sức quan tâm.

Cho đến nay đã có tới hơn 90 chi vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng phân hủy plastic đã được công bố (Mahdiyah D, Mukti BH. 2013). Trong những năm gần đây đã có nhiều bài tổng quan, nghiên cứu chi tiết đề cập một cách chi tiết đến danh sách hàng loạt vi sinh vật đã được chứng minh phân hủy được plastic được tạo ra khác nhau và không chung nguồn gốc (Vinay Mohan Pathak and Navneet. 2017) và các chất chúng tạo ra trong quá trình sinh trưởng và tác động qua lại với cơ chất là plastic (Himani Bhardwaj và đtg 2013). Các công bố cũng chỉ ra chúng có khả năng phân hủy sinh học loại plastic nào, tốc độ và tính khả thi v.v.. Đặc biệt là đưa ra các bằng chứng rất cơ bản về sự thay đổi các đặc tính của plastic dưới tác động của các tác nhân sinh học riêng lẻ và đồng thời với các tác nhân khác. Thông qua sự giảm khối lượng, sự thay đổi cấu trúc hóa học, cấu trúc mặt, độ bền kéo đứt, sản phẩm trao đổi chất của các phản ứng sinh hóa do vi sinh vật tác động lên plastics sinh ra v.v. đã cung cấp cơ sở để tìm con đường xử lý rác plastic. Vấn đề này được cả thế giới quan tâm, tuy nhiên không phải là một bài toán có ngay đáp số. Trong bài tổng quan của mình các tác giả đã cho thấy các đại diện của xạ khuẩn đã được thông báo có khả năng phân hủy plastic phân hủy sinh học và khó

phân hủy sinh học. Ví dụ như xạ khuẩn và chủng *Amycolatopsis* sp. phân hủy làm giảm 100 mg màng film PLA (khoảng 60%) sau 14 ngày nuôi cấy ở môi trường lỏng ở 30°C. Các xạ khuẩn khác cũng phân hủy được PLA, PLC và PBC. Các đại diện khác của xạ khuẩn có khả năng phân hủy plastic có khả năng phân hủy sinh học bao gồm *Amycolatopsis* sp. 3118, *Amycolatopsis* sp. HT-6, *Saccharothrix* JMC9114, *Kibdelosporangium aridum* JMC7912 [58], *Actinomadura keratinilytica* T16-1 (Sukkhum et al., 2011), *Amycolatopsis thailandensis* PLA07, *Streptomyces bangladeshensis* 77T-4, *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2 (Raziyafathima và đtg 2016). Các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn được xác định đã phá trùng hợp polyme của polyethylen. Hai trong số vi khuẩn là loài *Pseudomonas aeruginosa* và chủng *Bacillus* sp, còn lại là xạ khuẩn, nấm sợi loài *Fusarium graminearum*. Quá trình giải trùng hợp polyme thông qua các enzym amylaza, lignin/manganaza peroxidaza, lacaza và sau đó là các enzym khác lacaza. Các chủng này có thể sử dụng để tái tạo môi trường bị ô nhiễm bởi polyethylen (Ganesh và đtg. 2017). So khả năng của xạ khuẩn và vi khuẩn thấy quá trình phân hủy plastic polyethylen terephthalat đã được các nhà khoa học Nhật Bản công bố năm 2016. Các sản phẩm tạo thành của quá trình phân hủy sinh học bởi vi khuẩn đã được phân tích chính xác. Họ đã phân lập và phân loại được loài vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 có thể “ăn” phân hủy poly(ethylen terephthalat) ở 30°C viết tắt là PET từ 250 mẫu của màng film PET. Sau 6 tuần vi khuẩn này sử dụng PET là nguồn cacbon và năng lượng chính duy nhất. Khi sinh trưởng trên PET, chủng này đã sinh tổng hợp 2 enzym có khả năng thủy phân PET và chất trung gian mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid. Cả hai enzym đều cần cho sự chuyển hóa PET nhờ enzym hiệu quả đối với PET và (2-hydroxyethyl) terephthalic acid, đầu tiên thành sản phẩm thân thiện môi trường là các monome, axit terephthalic và ethylen glycol (Yoshida và các đồng tác giả, 2016).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27.

Chủng vi khuẩn này sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C, và ở nhiệt độ cao 55°C sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, CMCaza, chitinaza và amylaza với hoạt tính khác nhau. Chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy màng polyme, chất dẻo khi ủ compost (compostable).

Chủng vi khuẩn trong sáng chế này được phân lập từ đồng ủ compost từ xã Ba Trại, huyện Ba Vì, Hà Nội có trình tự gen mã hóa 16S rARN với độ dài 1056 bp có độ tương đồng 99% với loài *Ureibacillus suwonensis*. Chủng BCB27 cũng là vi khuẩn ưa nhiệt gần gũi với *Ureibacillus suwonensis* clon SHBS1076 không nuôi cấy được. Chủng là cùng với các chủng vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm sợi ưa nhiệt có khả năng chuyển hóa phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi thành

Chủng thuần khiết về sinh học và được lưu giữ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Phân loại chủng vi khuẩn và trình tự gen 16S rARN của chủng này đã được đăng ký trên Genbank với mã số KX815279.1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ, sinh khối có khả năng phân hủy sinh học, chế phẩm này chứa chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 nêu trên.

Theo một phương án, chế phẩm này ở dạng lỏng và mật độ vi sinh vật của chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27 trong chế phẩm đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/ml chế phẩm.

Theo một phương án, chế phẩm này ở dạng rắn và mật độ chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/g chế phẩm. Chế phẩm này chứa chất mang rắn bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền và cám gạo với theo tỷ lệ khối lượng rơm nghiền : thân và lõi ngô nghiền : cám gạo là 3:3:4 và nguồn khoáng chất, và chế phẩm có độ ẩm 15-19%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện hoạt tính enzym ngoại bào chitinaza, CMCaza, proteaza, xylanaza, lipaza *Ureibacillus* sp. BCBT27 theo thời gian

Hình 2 thể hiện cấu trúc bề mặt (bằng SEM) các loại nilon trước và sau 30 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn *Ureibacillus* sp. BCBT27

Hình 3 thể hiện phổ FTIR của túi plastic HL đối chứng và sau 30 ngày xử lý bằng chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27

Hình 4 thể hiện phổ FTIR của túi plastic VHL đối chứng và sau 30 ngày xử lý bằng chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27

Hình 5 thể hiện phổ FTIR của túi plastic VN1 đối chứng và sau 30 ngày xử lý bằng cấy chủng BCBT27

Hình 6 thể hiện hình thái chủng vi khuẩn *Ureibacillus* sp BCBT27

Hình 7 thể hiện cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn *Ureibacillus* sp BCBT27

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn từ đồng ủ compost ở xã Ba Trại huyện Ba Vì, Hà Nội, Việt Nam. Môi trường HKTS được dùng làm môi trường phân lập vi khuẩn có thành phần như sau (g/l): Pepton 10; cao thịt 3; NaCl 5; pH 7. Các mẫu thu được từ các đồng ủ compost đã được pha loãng và gọt lên môi trường HKTS thạch (môi trường HKTS có thêm thành phần aga với lượng 18g/l). Sau đó, các đĩa thạch đã cấy mẫu được nuôi ở 55°C trong buồng nuôi cấy vô trùng. Chỉ sau 24-48 giờ, khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái khác nhau được hình thành trên các đĩa thạch được tách và làm sạch. Chủng vi khuẩn thu được trong sáng chế này đã được đánh giá khả năng sinh trưởng ở các nhiệt độ khác nhau, được kí hiệu là BCBT27. Chủng xạ khuẩn có hình thái khác nhau sẽ cấy trên môi trường HKTS thạch và được nuôi ở nhiệt độ 55 °C. Hình thái khuẩn lạc của chủng này được thể hiện trên hình 6. Khả năng sinh trưởng của chủng trong sáng chế này ở các mức nhiệt độ khác nhau 37 °C, 55 °C và 65 °C được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc tính nhiệt của chủng vi khuẩn BCBT27

Tên chủng	Nhiệt độ 37°C	Nhiệt độ 55°C	Nhiệt độ 65°C
BCBT27	+	+	+

Chú thích: (+) *sinh trưởng*

Để xác định hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào của chủng xạ khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất chitin, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym CMCaza ngoại bào của chủng vi khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất CMC (Carboxymethyl cellulose), nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym CMCaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym xylanaza ngoại bào của chủng vi khuẩn, thì được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất xylan, ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym xylanaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym proteaza ngoại bào của chủng vi khuẩn trong sáng chế này đã được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất casein, ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym proteaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính enzym amylaza ngoại bào của chủng vi khuẩn, chủng được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất tinh bột, ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính amylaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định hoạt tính lipaza ngoại bào của chủng vi khuẩn đã được nuôi trên môi trường HKTS bổ sung 5% cơ chất tween 80, nuôi ở nhiệt độ 37°C và 55°C. Hoạt tính enzym lipaza ngoại bào được xác định định tính theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ.

Để xác định chính xác hơn chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành phân loại vi khuẩn bằng cách xác định trình tự gen mã hóa 16S rARN và so sánh trình tự thu được với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank).

ADN tổng số của chủng vi khuẩn thu được được tách chiết theo các bước sau:

Thu sinh khối xạ khuẩn vào ống eppendorf bằng cách ly tâm 6000vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung ddH₂O để rửa sinh khối, ly tâm 6000vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; Bổ sung 400µl dung dịch đệm phân giải, vortex đều; Bổ sung 50 µl lysozym 10 mg/ml, ủ ở 37°C trong 30-45 phút; Bổ sung 20 µl proteinaza K ủ ở 56°C trong 1 giờ; Bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 (v:v), vortex, ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C; Hút phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf mới; Bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm; Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa; Bổ sung etanol 100% tỷ lệ 1:1 (v:v); Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, rửa tiếp bằng etanol 70%; Làm khô tủa; Hòa trong TE, bảo quản ở 4°C.

Sau khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn gen mã hoá 16S rARN bằng kỹ thuật PCR. Đoạn gen mã hóa 16S rARN được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') và 1492R (5' – TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T– 3') (Baker *et al.*, 2003; Bourne *et al.*, 2005).

Thành phần phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ cuối
Đệm Taq 10X	2,5	1X
dNTPs 2 mM	2,5	0,2 mM
MgSO ₄ 20 mM	2,5	2 mM
Mồi 27F 10 µM	1	0,4 µM
Mồi 1492R 10 µM	1	0,4 µM
Taq Polymeaza 5 U/ µl	0,2	1 U/25 µl
ADN khuôn	1	
ddH ₂ O	14,3	
Tổng thể tích	25 µl	

Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Chu kì luân nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/5 phút	1
Biến tính	94°C/1 phút	30
Gắn mồi	55°C/1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút 30 giây	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
	4 °C	Giữ ổn định

Quan hệ di truyền của chủng vi khuẩn BCBT27 phân lập từ ủ compost trong sáng chế này được thể hiện ở cây phát sinh chủng loài trên hình 7.

Bào tử của chủng vi khuẩn này được bảo quản và lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ 25 - 30°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Do đó, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C, và ở nhiệt độ cao 55°C sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, CMCaza, chitinaza và amylaza với hoạt tính khác nhau. Chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy màng polyme, chất dẻo khi ủ compost (compostable).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng để xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối có khả năng phân hủy sinh học với mức độ rất khác nhau (có những loại cần đến hàng trăm năm mới phân hủy được ở một số môi trường như ở biển), chế phẩm này chứa chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 nêu trên.

Theo một phương án, chế phẩm này ở dạng lỏng và mật độ vi sinh vật của chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27 trong chế phẩm đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/ml chế phẩm.

Sản xuất chế phẩm chứa *Ureibacillus* sp. BCBT27

Có hai cách sản xuất chủng vi khuẩn này:

(!) Nuôi cấy 200v/phút vi khuẩn trên môi trường lỏng ở 55°C có thành phần như sau (g/l): pepton 5; glucoza 1; NaCl 5; cao thịt 3; độ pH = 6,8, 55 °C, trong thời gian 4-5 ngày. Đây là chế phẩm dạng lỏng (dịch thể) và có thể bảo quản ở tủ lạnh thông thường trong thời gian 3-5 tháng. Hay nuôi đến giai đoạn hình thành bào tử thì ly tâm lấy pha rắn và trộn với chất mang (mantoza là sản phẩm thương mại bán rộng rãi trên thị trường). Cũng có thể sử dụng dịch nuôi cấy cùng sinh khối vi khuẩn này để xử lý rác thải. Nồng độ bào tử có thể đạt từ 10^8 đến 10^9 tế bào /g; Cả hai dạng nuôi cấy trên môi trường lỏng mô tả trên đều có thể sử dụng để xử lý rác thải là màng polyme có nguồn gốc dầu mỏ hay sinh khối (plastic được chứng nhận có khả năng phân hủy sinh học theo tiêu chuẩn của ASTM).

(!!) Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường rắn ở nhiệt độ ở 55°C trên môi trường lên men rắn, mà sau này đóng vai trò chất mang rắn trong chế phẩm, bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền tới kích thước khoảng 0,3-0,4cm và cám gạo với theo tỷ lệ rơm nghiền: thân và lõi ngô nghiền:cám gạo là 3:3:4. Đến giai đoạn bào tử thì sấy khô ở nhiệt độ 40-45 °C với độ ẩm cuối cùng 15-19 %. Trường hợp này không cần trộn với giá thể. Nồng độ bào tử có thể đạt từ 10^8 đến 10^9 tế bào /g chế phẩm. Công cụ để nuôi vi khuẩn có thể các bình tam giác thủy tinh có nút bông (không cần cung cấp oxy) hay sử dụng thiết bị cho lên men rắn nhiệt độ cao hay thiết kế bioreactor thổi khí có điều khiển tự động các thông số độ ẩm, nhiệt độ và tổ độ thông khí.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân hủy sinh học các loại màng polyme, chất dẻo (túi nilon) bởi chủng BCBT27 ở 55 °C

Các loại túi nilon có nguồn gốc khác nhau được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy bằng chế phẩm theo sáng chế. Các loại polyme dạng túi nilon được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy sinh học được thu thập từ (1) Hà Lan- HL (túi có nguồn gốc là sinh khối và được cấp chứng chỉ “phân hủy sinh học của châu Âu), (2) exo-biodegradable plastic- VHL(sử dụng các phụ gia xúc tiến oxy hóa PE

để tạo nên loại plastic này bởi công trình nghiên cứu khoa học tại Việt Nam, (3) từ các siêu thị Việt Nam-VN1, VN5 (được cấp chứng chỉ “thân thiện môi trường” bởi Bộ TNMT chứ không được cấp chứng chỉ “có khả năng tự phân hủy sinh học”); (4) một loại túi nilon hiện được sử dụng trong hầu hết hoạt động dân sinh ở Việt Nam (rất khó phân hủy sinh học, ở một số điều kiện môi trường như ở biển cần hàng trăm năm).

Giống vi khuẩn BCBT27 để đánh giá khả năng phân hủy sinh học được nuôi cấy lỏng trên môi trường HKTS có thành phần như sau (g/l): Pepton 10; cao thịt 3; NaCl 5; pH 7. Sau 1-3 ngày lên men trong điều kiện lắc 200 v/p ở 55 °C, các chủng đã sinh trưởng mạnh, có mật độ tế bào $10^7 - 10^8$ MPN/ml. Thu dịch nuôi cấy để tiến hành xử lý màng polyme, chất dẻo (gọi là: túi nilon) theo sáng chế.

Các loại mẫu túi nilon có nguồn gốc khác nhau được cắt thành miếng có kích thước 2x10cm, cho 1gram nilon mỗi loại riêng rẽ vào bình thủy tinh 250ml chứa 150ml môi trường nuôi cấy chủng BCBT27, thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện lắc 200 v/p ở nhiệt độ 55 °C. Xác định độ giảm hoạt tính enzym ngoại bào trong dịch nuôi theo thời gian. Sau 30 ngày nuôi cấy các chủng xạ khuẩn có mặt của mẫu túi nilon đã được đánh giá mức độ phân hủy bằng các thiết bị chuyên dụng với các chỉ tiêu bắt buộc trong đánh giá khả năng phân hủy sinh học (biodegradability) màng polyme, chất dẻo như: độ giảm khối lượng, độ bền kéo đứt, sự thay đổi màu, sự thay đổi cấu trúc hóa học bằng máy ghi phổ hồng ngoại biến đổi, sự thay đổi cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả được thể hiện dưới đây.

a) Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) của các mẫu túi nilon được xác định bằng máy ghi phổ hồng ngoại biến đổi Fourier Nexus, thực hiện như sau: mẫu ở dạng màng mỏng hoặc màng vụn (màng vụn sẽ được ép thành viên với KBr) và quét phổ ở vùng 400cm^{-1} - 4000cm^{-1} , độ phân giải 8cm^{-1} , số lần quét 32 lần. Phổ FTIR được ghi dưới dạng đường cong phụ thuộc phần trăm truyền qua vào số sóng

$(1/\lambda)$ hay bước sóng của bức xạ, sau khi đã bù trừ phổ nền của không khí (hoặc KBr).

Chỉ số cacbonyl (CI) được sử dụng để đánh giá sự thay đổi hàm lượng các nhóm cacbonyl hình thành do sự phân hủy oxy hóa quang màng polyme, chất dẻo.

Các giá trị CI được tính theo các công thức sau $CI = \frac{I_{C=O}}{I_{CH_3}}$. Trong đó, $I_{C=O}$ là cường độ dao động hóa trị của nhóm cacbonyl; I_{CH_3} là cường độ dao động biến dạng đối xứng của nhóm metyl.

b) Các tính chất cơ học

Các tính chất cơ học (độ bền kéo và độ giãn dài khi đứt) của túi nilon được đo trên máy Zwick Z2.5 theo tiêu chuẩn ASTM D638, tốc độ kéo 50 mm/phút ở nhiệt độ phòng, mỗi loại mẫu được đo 3 lần để lấy giá trị trung bình. Mẫu sau khi cắt dùng thước đo chuyên dụng để xác định bề dày (d) đo và đánh dấu để xác định khoảng cách l_0 (khoảng cách ban đầu). Sau đó mẫu cần đo được kẹp lên máy và đo, xác định được các đại lượng: Độ bền kéo (MPa) và độ giãn dài khi đứt (%).

- *Độ bền kéo đứt*

Khi tác dụng một lực kéo F lên mẫu ở một thời điểm bất kỳ thì tạo ra một ứng suất tức thời ứng với lực F tại thời điểm đó.

Ứng suất ứng với lực F tại thời điểm mẫu bị đứt gọi là ứng suất khi đứt (σ_k), được xác định bằng công thức sau:

$$\sigma_k = \frac{F}{S}$$

Trong đó: F : lực kéo tác dụng lên mẫu (N).

S : tiết diện ngang ban đầu của mẫu (m^2).

- *Độ giãn dài khi đứt*

Độ giãn dài khi đứt của vật liệu được xác định theo công thức sau:

$$\varepsilon = \frac{l_B - l_0}{l_0} \cdot 100\%$$

Trong đó: ε - % giãn dài của mẫu.

l_0 - chiều dài của mẫu trước khi kéo (cm).

l_B - chiều dài của mẫu tại thời điểm mẫu đứt (cm).

c) Sự thay đổi màu

Xác định sự thay đổi màu sắc của mẫu màng polyme, chất dẻo bằng số liệu hiển thị trên máy so màu. Bề mặt và màu sắc mẫu được xác định theo tiêu chuẩn ASTM D2244-89 trên máy ColorTec PCM (PSMTM, Mỹ) với L^* đo độ sáng và a^* , b^* là tọa độ màu. Trong đó: $+a^*$: là màu đỏ; $-a^*$: là màu xanh lá; $+b^*$: là màu vàng; $-b^*$: màu xanh dương; L^* thay đổi từ 100 (màu trắng) đến 0 (màu đen).

Các giá trị ΔE_n dùng để tính toán sự thay đổi màu sắc bề mặt mẫu. Nó như một hàm theo thời gian chiếu xạ tia cực tím với công thức:

$$\Delta E_n = \sqrt{(L^* - L_n)^2 + (a^* - a_n)^2 + (b^* - b_n)^2}$$

L^* , a^* , b^* là các giá trị màu tại thời điểm ban đầu.

L_n , a_n , b_n là các giá trị màu tại thời điểm n .

Nếu giá trị ΔE_n nhỏ tương ứng với ít thay đổi màu sắc của vật liệu. Nếu giá trị ΔE_n lớn thể hiện sự thay đổi màu sắc lớn, vật liệu chịu ảnh hưởng lớn của các tác nhân tác động.

d) Phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM)

Hình thái cấu trúc của các mẫu được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM- JSM-6510 LV, Jeol, Japan). Mẫu được phủ một lớp platin mỏng để dẫn điện và chụp trong môi trường khí nitơ.

Biến thiên trọng lượng của các loại túi plastic sau 30 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn ưa nhiệt

Bảng 5: Độ giảm khối lượng của các loại mẫu nylon sau 30 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn *Ureibacillus* sp. BCBT27

Tên mẫu	HL	VHL	VN1
Độ giảm khối lượng (%) khi xử lý bằng chủng <i>Ureibacillus</i> sp. BCBT27	33,15 - 39,90	1,48 - 2,00	1,93 - 5,00

Ngoài 3 loại túi plastic HL, VHL và VN1 thì sáng chế cũng đã nghiên cứu khả năng phân hủy sinh học thêm 1 đối tượng khác. Tác nhân sử dụng để xử lý 5 loại túi nêu trên là chủng vi khuẩn BCBT27 được nuôi cấy ở điều kiện lactic ở 55°C với thời gian 30 ngày. Tuy nhiên đã không có đủ điều kiện để phân tích toàn bộ số mẫu theo các tiêu chí như đã mô tả ở trên. Bảng 5 trình bày kết quả về mức độ mất trọng lượng của 3 mẫu. Trong đó túi plastic bán ở siêu thị với thông tin trên bao bì là: plastic nhập công nghệ nước ngoài, sản xuất từ HDPE với các chất thêm có khả năng phân hủy sinh học, nhận được chứng chỉ thân thiện môi trường do Bộ TNMT Việt Nam cấp (VN1) còn một số ví dụ khác cũng trình bày các đặc tính phân hủy trên đối tượng VN5 và VN4 là túi được sử dụng nhiều nhất hàng ngày trên toàn Việt Nam ở các hoạt động dân sinh.

Túi plastic được chủng vi khuẩn ưa nhiệt phân hủy sinh học ở mức độ khác nhau, tốt nhất là HL với mức độ mất trọng lượng giao động 33,15 - 39,90 % sau 30 ngày nuôi cấy (**Bảng 5**). Túi VHL được phân hủy với hiệu suất 14,06% bởi *Ureibacillus* sp. BCBT27. Hai loại túi nhập công nghệ sản xuất tại Việt Nam lần lượt bị mất trọng lượng bao gồm 3,41% VN1 và 4,10% VN5 bởi *Ureibacillus* sp. BCBT27.

Đặc tính của các loại túi plastic trước và sau 30 ngày xử lý

Bảng 6: Khả năng phân hủy túi nylon sau 30 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn *Ureibacillus* sp. BCBT27

Đặc điểm	Túi plastic đối chứng					Túi plastic sau 30 ngày xử lý bằng BCBT27				
	HL	VHL	VN1	VN4	VN5	HL	VHL	VN1	VN4	VN5

Độ bền kéo đứt (MPa)	8,39	24,25	15,41	Kxdđ	20,28	Kxdđ	Kxdđ	Kxdđ	Kxdđ	18,14
Độ giãn dài khi đứt (%)	14,82	180,21	585,22	Kxdđ	78,80	Kxdđ	Kxdđ	Kxdđ	Kxdđ	36,59
So màu (ΔE)	0	0	0	0	0	Kxdđ	3,55	2,10	12,92	3,92
CI	5,51	0,01	0,01	0,00	0,01	1,65	0,09	0,02	0,00	0,03

Kxdđ: không xác định được do mẫu bị nát vụn hoặc đứt gãy không thể đo được bằng máy chuyên dụng

Chỉ số CI của các túi plastic được xác định từ phổ hồng ngoại. Có thể sử dụng kết quả chỉ số CI để định lượng sự phân hủy. Quan sát kết quả ở **Bảng 6**, có thể thấy túi plastic HL có chỉ số CI giảm mạnh khi xử lý trong dịch lên men của chủng BCBT27. Số liệu đo được chứng tỏ các túi plastic HL trong các dung dịch phản ứng nêu trên đã bị phân hủy mạnh. Kết quả này thống nhất với kết quả quan sát trực quan mẫu túi sau xử lý. Tất cả các mẫu túi plastic HL trong dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn ưa nhiệt trên đều bị vỡ vụn, do đó các túi plastic HL sau xử lý không thể xác định được tính chất cơ học. Các túi plastic còn lại khi xác định tính chất cơ học thì đều bị đứt ngay sau khi tác dụng lực kéo. Kết quả này cho thấy các túi plastic sau xử lý có độ bền cơ học kém hơn trước xử lý và xử lý bằng hỗn hợp enzym ở nhiệt độ phòng. Phát hiện này chứng tỏ các túi plastic này đều đã thay đổi cấu trúc trong quá trình phân hủy. Như quan sát trên ảnh SEM, trong cấu trúc bề mặt của túi đều thấy xuất hiện các vi lỗ, chính các vi lỗ này là các điểm tập trung ứng suất lực khi kéo và làm cho mẫu dễ bị kéo đứt hơn.

Đối với mẫu VN5, sự suy giảm đáng kể độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt sau xử lý với các chủng vi khuẩn trên cho thấy túi plastic này đã bị phân hủy dưới tác động của các chủng vi khuẩn này. Kết quả từ **Bảng 6** cũng cho thấy các túi plastic xử lý có $\Delta E > 0$ tức là chúng có sự thay đổi màu sắc hay bị phân hủy trong các môi trường xử lý. Túi plastic HL và VHL bị vỡ vụn nên không thể xác định

được sự thay đổi màu sắc. Túi VN1, VN4 và VN5 có sự thay đổi trong chỉ số ΔE cho thấy các túi plastic này cũng bị phân hủy bởi các chủng vi khuẩn ưa nhiệt trên trong quá trình xử lý.

Như đã đề cập ở trên VN5 là loại túi khó phân hủy nhất do bản chất hóa học và rất đáng tiếc đang được sử dụng nhiều nhất ở Việt Nam. Tuy nhiên dưới tác dụng của vi khuẩn ưa nhiệt thì VN5 cũng bị phân hủy do đã thấy có sự thay đổi trong chỉ số ΔE , đây là kết quả khá lý thú và cần thêm các nghiên cứu để xử lý sinh học có hiệu suất cao hơn.

Sự thay đổi cấu trúc hóa học của túi nylon sau xử lý bằng chủng BCBT27

Kết quả ở bảng 7 cho thấy sau 30 ngày xử lý bằng chủng vi khuẩn BCBT27 thì các loại túi HL, VN1, VN5 đã không có sự thay đổi so với mẫu đối chứng còn túi VHL đã thấy sự xuất hiện mới liên kết C=O.

Bảng 7: Sự thay đổi cấu trúc hóa học của túi plastic sau xử lý bằng chủng BCBT27 ở 55°C

Loại túi plastic	Nhóm chức, liên kết plastic ở thí nghiệm đối chứng	Xử lý bằng <i>Ureibacillus</i> sp. BCBT27	Nhóm chức, liên kết mới hình thành và mất đi sau xử lý bằng <i>Ureibacillus</i> sp. BCBT27
HL	OH, CONH, N-H, CH, CH ₂ , C≡CH, C=O, C-O	-OH, CH, CH ₂ , CH ₃ , C≡CH, CONH, C-O, C=O	Không thay đổi
VHL	OH, NH, CH	OH, NH, CH, C=O, C-O-C	C=O
VN1	OH, NH, CH	OH, NH, CH	không thay đổi
VN5	-CH	-CH	không thay đổi

Quan sát phổ FTIR của túi plastic Hà Lan sau xử lý bằng BCBT27 trên hình 2, có thể thấy vị trí và cường độ các pic có sự dịch chuyển so với các pic tương ứng trên phổ FTIR của mẫu trước xử lý. Cụ thể, pic rộng, tù đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm -OH liên kết hydro hoặc nhóm -CONH hoặc -NH hoặc -C≡C-H trong phân tử plastic dịch chuyển từ $3367,50\text{ cm}^{-1}$ lên $3446,22\text{ cm}^{-1}$ với cường độ thấp hơn đáng kể so với pic tương ứng trên phổ IR của túi plastic HL trước xử lý. Pic đặc trưng cho dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm -CH no trong phân tử plastic dịch chuyển từ $2955,56\text{ cm}^{-1}$, $1389,45\text{--}1455,11\text{ cm}^{-1}$ xuống $2951,95\text{ cm}^{-1}$ và $1408,84\text{--}1457,77\text{ cm}^{-1}$. Pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm -C=O trong axit hoặc xeton trong plastic dịch chuyển từ $1716,96\text{ cm}^{-1}$ lên $1718,15\text{ cm}^{-1}$. Bên cạnh đó, cường độ pic đặc trưng cho dao động hóa trị đối xứng của nhóm -C-O ở $1026,27\text{--}1274,14\text{ cm}^{-1}$ cũng giảm đáng kể. Pic có thể đặc trưng cho dao động biến dạng của nhóm -NH trong plastic ở $1577,96\text{ cm}^{-1}$ dịch chuyển lên $1563,08\text{ cm}^{-1}$. Một số pic đặc trưng cho cấu trúc hóa học của phụ gia biến mất hoàn toàn sau quá trình xử lý. Kết quả này chứng tỏ BCBT27 đã tác động vào cấu trúc của túi plastic trên trong quá trình xử lý. Chúng tác động vào các nhóm -OH liên kết hydro hoặc nhóm -CONH hoặc -NH hoặc -C≡C-H và nhóm -C-O trong phân tử plastic nên làm thay đổi cường độ và vị trí của chúng. Sự dịch chuyển vị trí nhóm -C=O cho thấy các nhóm này cũng bị BCBT27 tác động và phân hủy trong quá trình xử lý. Các chất phụ gia hỗ trợ phân hủy thêm vào có thể đã bị hòa tan và thoát ra khỏi túi plastic để góp phần gia tăng khả năng phân hủy plastic trong quá trình xử lý.

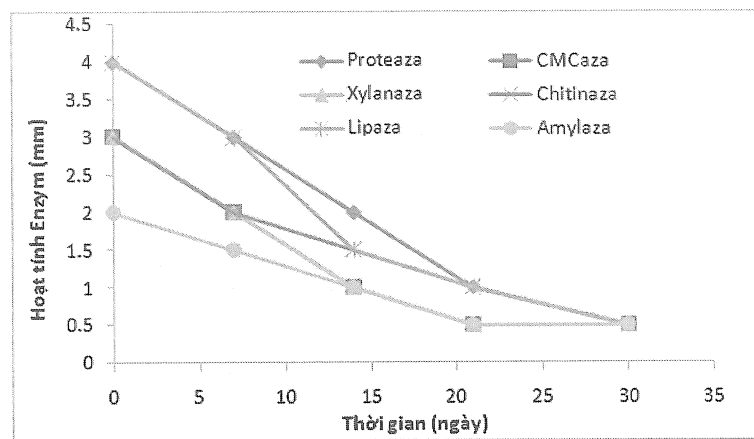
Hình 4 là phổ FTIR của túi plastic VHL. So sánh với kết quả phổ FTIR của túi plastic VHL trước xử lý, có thể thấy các pic đặc trưng cho dao động hóa trị và dao động biến dạng đặc trưng cho các nhóm -OH tự do, -CH no có sự thay đổi từ $2\text{--}8\text{ cm}^{-1}$. Đồng thời, có thể quan sát thấy trên phổ IR của túi VHL xử lý bằng chủng BCBT27 xuất hiện 1 pic mới ở số sóng $1711,86\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho dao động hóa trị của các liên kết -C=O trong plastic. Kết quả cho thấy plastic đã bị BCBT27 tác động và phân hủy tạo thành các xeton, este v.v. Ngoài ra, có thể quan sát thấy sự

biến mất của một số pic đặc trưng cho phụ gia trong plastic VHL sau xử lý. Bên cạnh đó, có thể quan sát thấy pic đặc trưng cho nhóm OH ở $3413,91\text{ cm}^{-1}$ chứng tỏ các nhóm -OH đã xâm nhập vào trong cấu trúc của plastic.

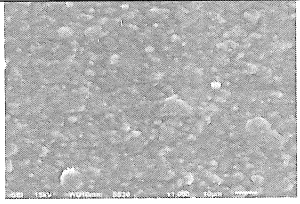
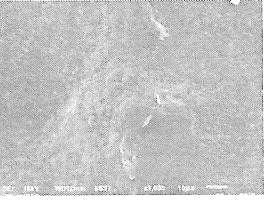
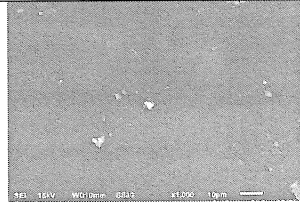
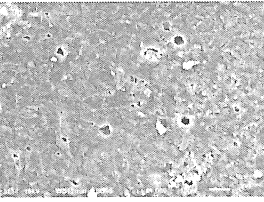
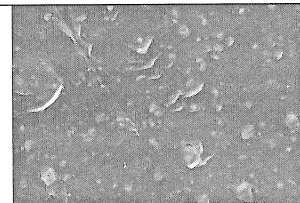
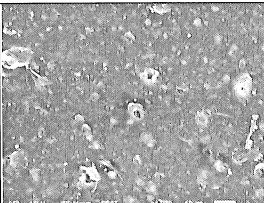
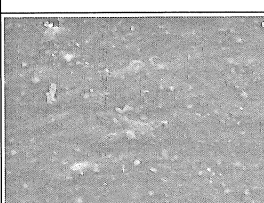
Phổ FTIR của túi plastic VN1 sau xử lý bằng chủng BCBT27 được trình bày trên hình 5. Có thể thấy vị trí một số pic đặc trưng cho dao động hóa trị của nhóm -OH tự do, dao động hóa trị, dao động biến dạng và dao động ngoài mặt phẳng của nhóm -CH no dịch chuyển từ $5-10\text{ cm}^{-1}$. Sự dịch chuyển một số pic trên cho thấy BCBT27 đã tác động vào cấu trúc của các phân tử plastic trong túi plastic VN1, đặc biệt là sự tác động tới các nhóm -OH tự do và các nhóm -CH no nên làm dịch chuyển vị trí các pic tương ứng của chúng trên phổ FTIR.

YÊU CẦU BẢO HỘ

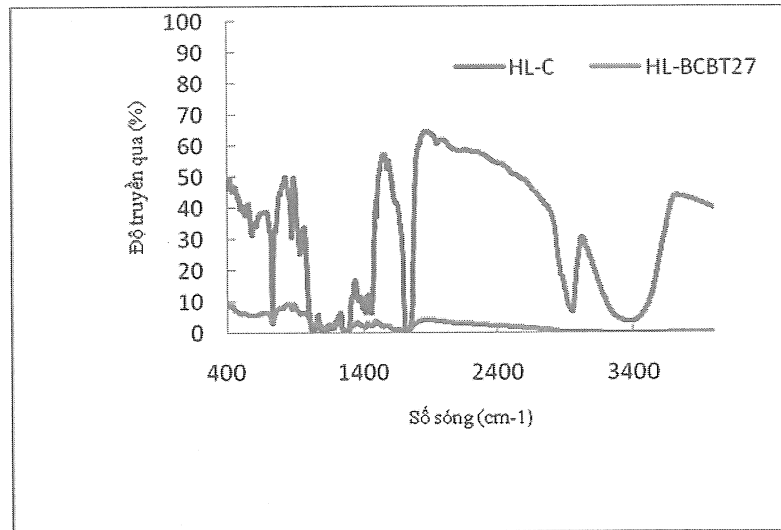
1. Chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, chitinaza ở nhiệt độ 37°C, và sinh tổng hợp các enzym lipaza, xylanaza, proteaza, CMCaza, chitinaza, amylaza ở nhiệt độ 55°C bằng phương pháp lên men chìm hoặc rắn, khác biệt ở chỗ chủng vi khuẩn này có khả năng phân hủy các loại màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ có khả năng phân hủy sinh học.
2. Chế phẩm dùng để xử lý rác thải màng polyme có nguồn gốc từ dầu mỏ và sinh khối có khả năng phân hủy sinh học ở mức độ khác nhau, chế phẩm này chứa chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng và mật độ vi sinh vật của chủng *Ureibacillus* sp. BCBT27 trong chế phẩm đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/ml chế phẩm.
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này ở dạng rắn và mật độ chủng vi khuẩn ưa nhiệt *Ureibacillus* sp. BCBT27 đạt khoảng 10^8 - 10^9 MPN/g chế phẩm.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chế phẩm này chứa chất mang rắn bao gồm rom nghiền, thân và lõi ngô nghiền và cám gạo với theo tỷ lệ khối lượng rom nghiền: thân và lõi ngô nghiền : cám gạo là 3:3:4 và nguồn khoáng chất, và chế phẩm có độ ẩm 15-19%.



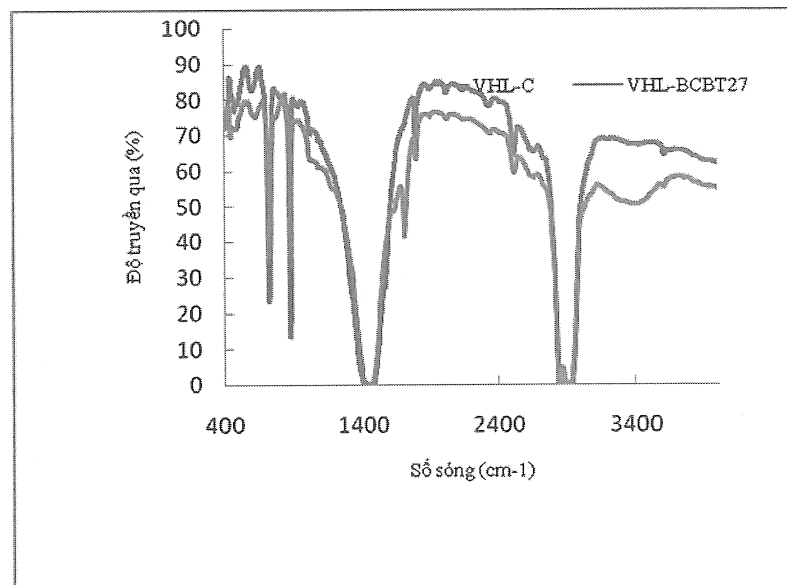
Hình 1

Loại túi plastic	Đối chứng	Sau xử lý
HL		
VHL		
VN1		
VN5		

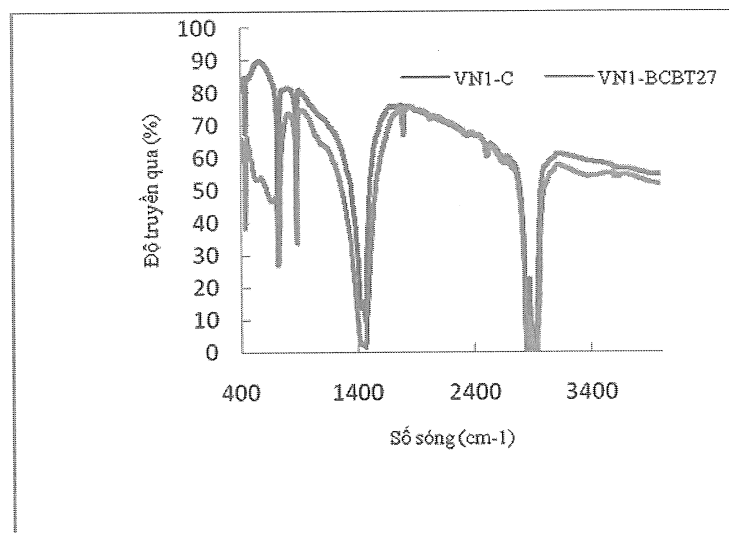
Hình 2



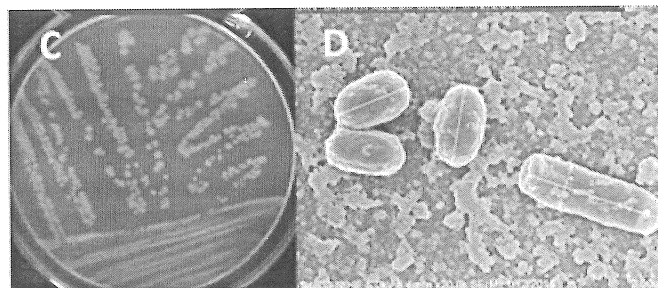
Hình 3



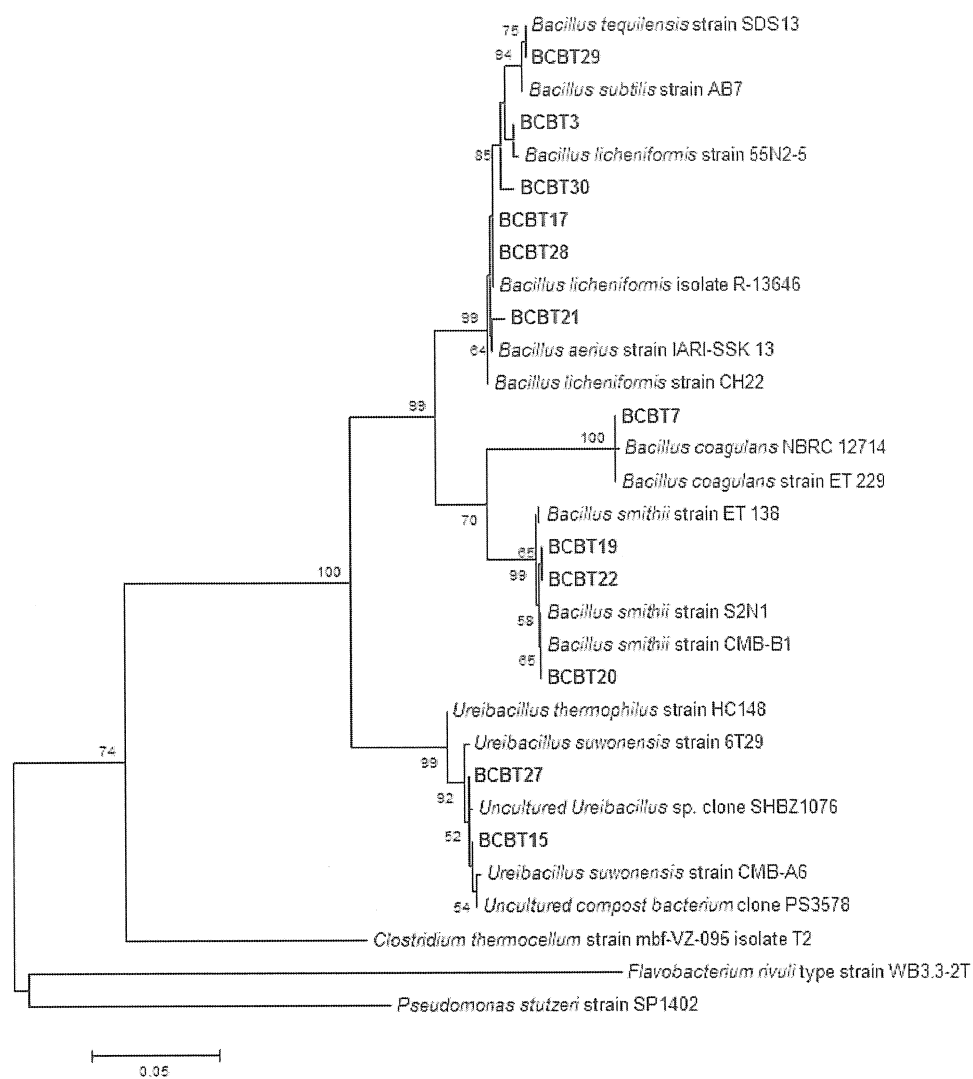
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7