



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048709

(51)<sup>2022.01</sup> C12N 1/20; C12R 1/07 (13) B

(21) 1-2023-08418

(22) 27/11/2023

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2024 430A

(73) Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)  
Nhà A13, 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Vũ Giang (VN); Trần Hữu Trung (VN); Mai Đức Huỳnh (VN); Nguyễn Hữu Đạt (VN); Kiều Thị Quỳnh Hoa (VN); Nguyễn Thị Yên (VN).

(54) CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS PVC7 ĐƯỢC PHÂN  
LẬP CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY VẬT LIỆU POLYME COMPOSIT  
PVC/GYPSUM

(21) 1-2023-08418

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập, trong đó chủng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí, gram dương, sinh bào tử, khuẩn lạc có mép gọn, hơi lồi, màu trắng đục có kích thước từ 2 đến 3 mm, được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật đầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam với số lưu giữ PVC7. Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 theo sáng chế có khả năng sử dụng vật liệu polyme composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và cho phép phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum với nồng độ lên tới 10 g/l trong thời gian từ 4 đến 12 tuần ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH=7.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực vi sinh vật và công nghệ xử lý rác thải và bảo vệ môi trường, cụ thể là sáng chế được đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập có khả năng phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Do có tính bền cơ học, nhựa polyvinyl chloride (PVC) được ứng dụng rộng rãi trong đời sống. Chúng được sử dụng để chế tạo nhiều loại sản phẩm thuộc các lĩnh vực khác nhau trong công nghiệp và dân dụng như mái lợp, tấm đệm ray đường sắt, cáp điện, đồ trang trí nội thất, ống luồn cáp, ống nước, khung cửa. PVC được chế tạo ở nhiều dạng, như vật liệu cứng hoặc dạng vật liệu mềm (Kowalska et al., The Use of Phosphogypsum as a Filler for Thermoplastics, Part II: Phosphogypsum as a Filler for Polyamide 6 and for PVC. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*. 2022, 21(11): 1043-1052; Nadagouda et al., Novel thermally stable Polyvinyl Chloride Composites for sulfate removal. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 188, 2011, pp 19-25; Nguyen, V.G et al., Surface modification of waste-gypsum fillers using stearic acid in PVC/waste-gypsum composites. *J. of Advanced Engineering and Technology*. 2013, 6(3):199-207). Tuy nhiên, do nhu cầu sử dụng các sản phẩm làm từ nhựa ngày càng gia tăng, bên cạnh lợi ích mang lại, nhựa PVC phế thải cũng gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và môi trường sống (Amobonye, A et al., Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes, *Science of The Total Environment*, 2021, 759, 14; Peng, B.Y et al., Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International*. 145, 2020). Nhựa PVC khi gia công thường được phối trộn với nhiều phụ gia như chất hóa dẻo, chất độn vô cơ để đảm bảo khả năng gia công và gia cường cơ tính. Do đó, vật liệu này có tỷ lệ tái sử dụng thấp hơn các loại nhựa họ polyolefin. Trên thực tế, phương pháp lựa chọn để xử lý rác thải từ loại nhựa này thường được lựa chọn là chôn lấp trong tự nhiên hoặc thiêu đốt gây ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường

sống và sức khỏe con người. Nhược điểm của cả hai phương pháp này là tốn kém do tiêu tốn năng lượng và gây ô nhiễm thứ cấp tới môi trường.

Rác thải nhựa nói chung, trong đó đặc biệt là hợp chất PVC sau thời gian dài chôn lấp cũng rất khó bị phân hủy sinh học mà thường chỉ có thể bị phân rã hóa lý một phần, tạo thành các mảnh nhựa hoặc vi nhựa có kích thước nhỏ. Hạt vi nhựa có thể ngấm từ bãi chôn lấp vào nguồn nước ngầm gây ô nhiễm nguồn đất, nước và môi trường biển. Các khí độc thải ra trong quá trình thiêu đốt rác thải nhựa phải kể đến là CO<sub>2</sub>, CFC (chlorofluorocarbon), vinyl monome và dioxin làm ô nhiễm không khí và môi trường. Dioxin không chỉ ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch và nội tiết mà còn gây ra các bệnh ung thư ở người (Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., Fava, F., 2019. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*”, *New Biotechnology*, 52, pp.35-41; Aji, M.M et al., 2020. Biopolymer (gum arabic) incorporation in waste polyvinylchloride membrane for the enhancement of hydrophilicity and natural organic matter removal in water”. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101569). Do đó, việc lựa chọn các phương pháp xử lý rác thải nhựa phù hợp, an toàn và thân thiện với môi trường là cần thiết.

Vật liệu composit kết hợp PVC và thạch cao phế thải (gypsum) đã được quan tâm nghiên cứu từ lâu với ý tưởng tận dụng thạch cao làm chất gia cường cho nhựa nền PVC. Vật liệu này thường chứa PVC, dioctyl phthalate (DOP) và gypsum, trong đó gypsum là hạt thạch cao phế thải được tạo thành trong quá trình sản xuất axit phosphoric theo phương pháp trích ly từ axit sulfuric và quặng phosphat. Gypsum có thành phần chính bao gồm CaSO<sub>4</sub> ngậm nước, CaSO<sub>4</sub> khan và phosphat với kích thước các hạt có kích thước nhỏ hơn 50 µm. Lượng gypsum được thải ra hàng năm trên thế giới khoảng hơn 150 triệu tấn. Tại Việt Nam, mặc dù chưa có số liệu thống kê đầy đủ, nhưng lượng phế thải gypsum chiếm một diện tích lớn ở các bãi chứa, đất ruộng, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng tới nguồn nước và khí quyển các vùng lân cận. Mặc dù phân hủy sinh học nhựa rác thải là hướng nghiên cứu đang được quan tâm, nhưng các nghiên cứu phân hủy sinh học vật liệu polyme composit trên cơ sở nhựa nền PVC gia cường bởi hạt gypsum phế thải vô cơ vẫn chưa được công bố.

Với đặc trưng cấu trúc hóa học có nhóm C-Cl, nhựa PVC có khả năng phân hủy sinh học chậm hơn nhựa polyethylen và polypropylen (Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M.N., Hill, G., Wallis, C., 2020. Determination of the carbonyl index of

polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *e-Polymers*. 20 (1): 369–381; Chernikova T., Bargicla R., Toshchakov S., Shivaraman V., Lunev EA., Yakimov Thomas D.N., Golyshin P.N., 2020. Hydrocarbon-degrading bacteria *Alcanivorax* and *Marinobacter* associated with microalgae *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Font Microbiol.* 11, 572931). Bên cạnh đó, lượng phụ gia trong đơn vật liệu thành phần của PVC luôn đa dạng hơn nhựa có nguồn gốc polyolefin, đặc biệt là hàm lượng chất hóa dẻo cao và luôn cần có chất độn vô cơ như hạt gypsum,  $\text{CaCO}_3$ , talc, v.v. (được gọi là vật liệu nhựa PVC) để gia cường tính chất. Phương pháp phân hủy bằng cách bổ sung vi sinh vật có khả năng phân hủy vật liệu nhựa PVC nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học loại nhựa này rất phức tạp, cần nhiều thời gian. Hàng năm, trên thế giới, nhu cầu sản xuất các sản phẩm công nghiệp và dân dụng từ vật liệu nhựa PVC đứng hàng thứ 3 trong tổng số các loại nhựa được chế tạo (chỉ sau nhựa polyethylen và polypropylen), điều này cho thấy rác thải, phế liệu từ vật liệu nhựa PVC rất lớn. Do đó, phát triển hướng nghiên cứu phân hủy sinh học với đối tượng vật liệu nhựa PVC gia cường là cấp thiết. Với ưu điểm an toàn và thân thiện với môi trường, phương pháp này hiện đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới.

Tuy vậy, do đặc tính trở nên rất ít chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng vật liệu PVC nói chung và PVC gia cường thạch cao phế thải nói riêng làm nguồn cacbon để sinh trưởng và phát triển, từ đó có thể phân hủy được vật liệu này. Hơn nữa, khả năng sử dụng PVC gia cường thạch cao phế thải như nguồn cacbon duy nhất của các chủng vi sinh vật khác nhau là không giống nhau. Vì vậy, để có thể xử lý ra thải nhựa theo hướng phân hủy sinh học thì điều kiện tiên quyết là phải phân lập, tìm ra các chủng vi sinh vật có khả năng sử dụng PVC gia cường thạch cao phế thải như nguồn cacbon duy nhất để có thể phân hủy PVC gia cường góp phần vào xử lý rác thải nhựa polyme composit bảo vệ môi trường.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế nhằm hướng đến việc xử lý rác thải nhựa, cụ thể là các rác thải từ vật liệu polyme composit PVC/gypsum theo phương pháp vi sinh nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học. Sáng chế dựa trên các vi sinh vật có khả năng phân hủy rác thải nhựa thành các sản phẩm như  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$  (sử dụng vi sinh vật hiếu khí) hay  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  và  $\text{CH}_4$  (vi sinh

vật kỵ khí). Do đó, sáng chế đề xuất đến việc phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum, cụ thể là sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập có khả năng sử dụng composit PVC/gypsum như cơ chất để sinh trưởng và phát triển cho phép phân giải hiệu quả vật liệu composit PVC/gypsum ứng dụng trong xử lý rác thải nhựa.

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1 được đăng ký trên ngân hàng gen (GenBank) với số hiệu truy cập là SUB 13936938 *Bacillus* OR751609, trong đó:

- chủng vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hiếu khí, gram dương, sinh bào tử, khuẩn lạc có mép gọn, hơi lồi, màu trắng đục có kích thước từ 2 đến 3 mm, được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam với số lưu giữ PVC7;

- chủng vi khuẩn này có khả năng sử dụng vật liệu polyme composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và cho phép phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum với nồng độ lên tới 10 g/l trong thời gian từ 4 đến 12 tuần ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH=7.

Theo một khía cạnh ưu tiên, trong đó vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập này được lưu giữ trong điều kiện môi trường khoáng MSM với glycerol 20% có bổ sung vật liệu composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và chủng được lưu trong điều kiện nhiệt độ đông sâu -30 hoặc -80°C trong môi trường hiếu khí.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp nuôi cấy làm giàu, phân lập, sàng lọc tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum, trong đó mẫu vi sinh vật được nuôi cấy phân lập trên môi trường MSM có bổ sung PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất để sinh trưởng và phát triển, sau đó thu khuẩn lạc hình thành và tuyển chọn chủng có khả năng phân giải vật liệu composit PVC/gypsum tốt nhất.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý rác thải chứa vật liệu composit PVC/gypsum, trong đó phương pháp này bao gồm bước hoạt hóa chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 theo sáng chế, và bổ sung chủng vi khuẩn này vào khu vực rác thải chứa vật liệu composit PVC/gypsum cần xử lý để chủng vi khuẩn này sử dụng vật liệu composit PVC/gypsum làm nguồn cơ chất để sinh trưởng, từ đó xử lý được rác thải này.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn PVC7 trên môi trường thạch MSM bổ sung composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất sau 14 ngày nuôi cấy.

Hình 2 là hình ảnh hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 trên môi trường dinh dưỡng hiếu khí.

Hình 3 là hình ảnh hình thái tế bào của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 4 là hình ảnh sản phẩm PCR trình tự 16S rADN của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7.

Hình 5 là hình ảnh vật liệu composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) sau 12 tuần dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 6 là hình ảnh vật liệu composit PVC/gypsum bị phân hủy bởi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 sau 4 tuần xử lý dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 7 là hình ảnh vật liệu composit PVC/gypsum bị phân hủy bởi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 sau 12 tuần xử lý dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 8 là hình ảnh phổ FT-IR của các mẫu composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) (A) và mẫu thử nghiệm (bổ sung chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7) (B) sau 12 tuần xử lý.

Hình 9 là hình ảnh phổ  $^1\text{H-NMR}$  của mẫu composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) sau 12 tuần.

Hình 10 là hình ảnh Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của các mẫu polyme composit đối chứng và thử nghiệm sau 12 tuần.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Để phân lập chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy composit PVC/gypsum, mẫu nước và mẫu bùn thu được từ các vùng ô nhiễm rác thải nhựa ven biển được sử dụng để làm giàu vi khuẩn phân hủy composit PVC/gypsum. Môi trường sử dụng là môi

trường khoáng MSM bổ sung từ 0,1 đến 1% (w/v) tương đương với từ 1 đến 10 g/l composit PVC/gypsum (môi trường composit PVC/gypsum-MSM). Một ml mẫu nước hoặc 1 g mẫu bùn được pha loãng vào 9 ml muối sinh lý. Sau đó 3 ml dịch mẫu pha loãng được bổ sung vào 100 ml môi trường bổ sung composit PVC/gypsum - MSM, pH=7 và được nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Sau 3 tuần nuôi lắc, tiếp tục cấy chuyên vào môi trường composit PVC/gypsum- MSM mới thêm 2 lần.

Dịch nuôi cấy sau 9 tuần làm giàu được pha loãng tới nồng độ phù hợp và gọt trên môi trường thạch dinh dưỡng hiếu khí và được nuôi cấy ở 30°C trong thời gian từ 2-3 ngày. Các chủng vi khuẩn thuần khiết có khuẩn lạc riêng với các hình thái khác nhau trên môi trường thạch dinh dưỡng hiếu khí được giữ ở nhiệt độ -80°C trong dịch glycerol 20% (v/v) cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các khuẩn lạc thu được trên môi trường thạch dinh dưỡng hiếu khí sau khi làm giàu tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường thạch khoáng MSM bổ sung 0,3 % (w/v) tương đương 3 g/l bột composit PVC/gypsum. Các chủng có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường thạch composit PVC/gypsum - MSM được lựa chọn.

Để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy composit PVC/gypsum của các chủng vi khuẩn sau khi sàng lọc trên môi trường thạch composit PVC/gypsum - MSM, tiến hành nuôi lắc các chủng vi khuẩn thu được trong bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường khoáng MSM bổ sung 3% (w/v) bột composit PVC/gypsum và 2% (v/v) dịch nuôi cấy trong 18 đến 24 giờ. Sau khi ly tâm thu hồi sinh khối và rửa 2 lần bằng môi trường MSM không chứa composit PVC/gypsum để đạt được mật độ ban đầu khoảng  $10^4$  CFU/ml.

Thử nghiệm sàng lọc được tiến hành ở 30°C, 180 vòng/phút trong 12 tuần. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được xác định thông qua số lượng khuẩn lạc (CFU/ml) 2 tuần/lần trên môi trường thạch dinh dưỡng. Chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt nhất sẽ được lựa chọn để xác định đặc điểm phân loại và đánh giá khả năng phân hủy composit PVC/gypsum.

Kết quả thu được khuẩn lạc được đánh số PCV7, chủng vi khuẩn này được nhân, kiểm tra trình tự gen mã hóa 16S-rARN của chủng vi khuẩn PVC7 bằng phản ứng PCR từ ADN tổng số. Cặp mồi được sử dụng là cặp mồi 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') và 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3')



theo chu trình nhiệt: 95°C trong 3 phút, 35 chu trình (95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C.

Sản phẩm của phản ứng PCR của chủng PCV7 được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích BioEdit. Mức độ tương đồng gen 16S rARN của chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen 16S rARN trong Genbank bằng công cụ BLAST trên NCBI. Kết quả cho thấy trình tự 16S ARN nêu trong SEQ ID NO.1, chủng này thuộc loài vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*, chủng này được đặt là *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7.

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập từ nước ô nhiễm rác thải nhựa tại ven biển tại Phú Quốc, Việt Nam thu được ở trên. Chủng này có trình tự 16S rADN đăng ký trên ngân hàng gen (GenBank) với số hiệu (accession number) là SUB 13936938 *Bacillus* OR751609.

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập từ mẫu nước ô nhiễm rác thải nhựa ven biển Phú Quốc, Việt Nam trên môi trường khoáng MSM dạng dịch và thạch agaroza. Môi trường MSM phân lập được thể hiện trên Bảng 1 bên dưới.

Bảng 1. Môi trường phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy composit PVC/gypsum

Thành phần (g/l)	Khoáng (MSM)	Dinh dưỡng hiếu khí
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	-
NaCl	20	20
KCl	-	0,25
MgCl <sub>2</sub>	-	1,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.002	-
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.002	-
Glucosa	-	1
Pepton	-	5
Cao nấm men	-	0,2
Cao thịt	-	3
Composit PVC/gypsum	1-10	-
Thạch aga	15	18

H <sub>2</sub> O khử ion	1000 ml	1000 ml
pH	7	7

Điều kiện phân lập có bổ sung vật liệu composit PVC/gypsum. Các chủng vi khuẩn được phân lập, tuyển chọn dựa trên khả năng sử dụng PVC/gypsum để sinh trưởng và phát triển. Các chủng vi khuẩn được lựa chọn dựa trên khả năng phát triển khuẩn lạc, sau đó chọn các khuẩn lạc có khả năng sinh trưởng tốt nhất. Các khuẩn lạc được đánh giá khả năng phát triển và định danh bằng phân tích trình tự 16S rARN. Kết quả phân lập được chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 có trình tự 16S rARN nêu trong SEQ ID NO.1, chủng vi khuẩn này khả năng phát triển tốt nhất trong môi trường dinh dưỡng hiếu khí dạng dịch và thạch. Khả năng phát triển trong 12 tuần của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập này có khả năng phát triển như nêu trong Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn PVC7 trên môi trường khoáng MSM bổ sung composit PVC/gypsum trong 12 tuần nuôi cấy

Chủng vi khuẩn	Mật độ trong môi trường composit PVC/gypsum - MSM (CFU/ml)						
	0h	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8	Tuần 10	Tuần 12
PVC7	$2,3 \times 10^4$	$8,8 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$

Thử nghiệm nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập trên môi trường khoáng MSM bổ sung composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất cho thấy chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng tốt trong 12 tuần nuôi cấy thử nghiệm.

Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập này là chủng vi khuẩn hiếu khí, gram dương, sinh bào tử, khuẩn lạc có mép gọn, hơi lồi, màu trắng đục có kích thước từ 2 đến 3 mm. Chủng vi khuẩn này được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam với số lưu giữ PVC7.

Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 này có khả năng sử dụng vật liệu polyme composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và cho phép phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum với nồng độ lên tới 10 g/l trong thời gian từ 4 đến 12 tuần ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH=7.

Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập này được lưu giữ trong điều kiện môi trường khoáng MSM với glycerol 20% có bổ sung vật liệu composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và chủng được lưu trong điều kiện nhiệt độ đông sâu -30 hoặc -80°C trong môi trường hiếu khí tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp nuôi cấy làm giàu, phân lập, sàng lọc tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum. Trong đó mẫu vi sinh vật được nuôi cấy phân lập trên môi trường MSM có bổ sung PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất để sinh trưởng và phát triển. Sau đó thu khuẩn lạc hình thành và tuyển chọn chủng có khả năng phân giải vật liệu composit PVC/gypsum tốt nhất.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xử lý rác thải chứa vật liệu composit PVC/gypsum. Trong đó phương pháp này bao gồm bước hoạt hóa chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 theo sáng chế. Sau đó bổ sung chủng vi khuẩn này vào khu vực rác thải chứa vật liệu composit PVC/gypsum cần xử lý để chủng vi khuẩn này sử dụng vật liệu composit PVC/gypsum làm nguồn cơ chất để sinh trưởng, từ đó xử lý được rác thải này.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### ***Ví dụ 1: Phân lập chủng vi sinh vật có khả năng phân giải rác thải nhựa từ mẫu nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển***

Mẫu nước và bùn ô nhiễm composit PVC/gypsum được thu thập từ nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển Phú Quốc, Việt Nam. Các mẫu nước và bùn ô nhiễm được lấy bằng dụng cụ chuyên dụng được vô trùng. Mẫu được giữ lạnh và được phân tích trong vòng 24 giờ.

Mẫu mẫu bùn và nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển được bổ sung vào môi trường khoáng MSM chứa bột composit PVC/gypsum với hàm lượng khác nhau. Sau 3 tuần, 3 ml dịch làm giàu tiếp tục được cấy chuyển 2 lần vào 100 ml môi trường composit PVC/gypsum-MSM mới. Sau 9 tuần làm giàu trên môi trường composit PVC/gypsum-MSM, dịch nuôi cấy được pha loãng rồi gặt trên môi trường thạch dinh dưỡng.

Các chủng vi khuẩn đã phân lập tiếp tục được sàng lọc trên môi trường thạch composit PVC/gypsum - MSM. Trong số các chủng phân lập được, chỉ có một số ít chủng có thể sinh trưởng và phát triển được trên môi trường thạch composit PVC/gypsum - MSM. Hình thái khuẩn lạc của các chủng trên môi trường thạch composit PVC/gypsum-MSM sau 14 ngày nuôi cấy nhỏ, tròn và có màu trắng đục như thể hiện trên Hình 1.

Các khuẩn lạc mẫu PVC7 thu được từ môi trường composit PVC/gypsum-MSM được cấy rìa trên môi trường dinh dưỡng hiếu khí để xác định hình thái khuẩn lạc và bảo quản trong môi trường MSM bổ sung composit PVC/gypsum với 20% (v/v) glycerol ở  $-30^{\circ}\text{C}$  và  $-80^{\circ}\text{C}$  cho các nghiên cứu tiếp theo.

### ***Ví dụ 2: Đánh giá đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn PVC7***

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn PVC7 trên môi trường dinh dưỡng HKTS sau từ 1 đến 2 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Hình 3. Dựa trên hình thái và đặc tính sinh trưởng cho thấy chủng PVC7 là vi khuẩn hiếu khí, gram dương, có bào tử, trên môi trường dinh dưỡng hiếu khí, chủng PVC7 có mép gọn, hơi lồi, bóng ướt, trắng đục, kích thước từ 2 đến 3 mm. Tuy nhiên, sau 3 ngày nuôi cấy bề mặt khuẩn lạc trở nên khô.

Tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 10 phút dịch nuôi cấy chứa chủng PVC7 sau từ 18 đến 24 giờ nuôi cấy. Hút bỏ pha trên và thu sinh khối. Bổ sung 0,5 ml dung dịch cố định mẫu glutaraldehyt 2,5% trong 60 phút và trộn đều bằng pipet. Sau đó rửa 03 lần bằng dung dịch đệm phosphat 0,1M, pH7. Mẫu được sấy khô, phủ Pt, đưa lên kính SEM (HITACHI, S - 4800, Nhật Bản) quan sát và chụp ảnh mẫu.

Kết quả hình ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét (SEM) thể hiện trên Hình 4 cho thấy tế bào của chủng PVC7 có dạng hình que đặc trưng cho các loài thuộc chi *Bacillus*, kích thước  $1 \times 2 \mu\text{m}$ .

### ***Ví dụ 3. Đánh giá khả năng sử dụng composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất của chủng PVC7***

Các chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển được trên môi trường thạch composit PVC/gypsum-MSM lại tiếp tục được sàng lọc dựa vào khả năng sinh trưởng

và phát triển của từng chủng trong môi trường dịch MSM bổ sung 0,3 % (w/v) bột composit PVC/gypsum hàm lượng 3g/l như nguồn cacbon duy nhất sau 12 tuần nuôi cấy. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn này sau 12 tuần nuôi cấy được xác định bằng số lượng vi khuẩn (CFU/ml) trên môi trường thạch dinh dưỡng hiếu khí, kết quả ở Bảng 3 thể hiện số lượng chủng PVC7 trong 12 tuần thử nghiệm.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn PVC7 trên môi trường khoáng MSM bổ sung composit PVC/gypsum trong 12 tuần nuôi cấy

Chủng vi khuẩn	Mật độ trong môi trường composit PVC/gypsum - MSM (CFU/ml)						
	0h	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8	Tuần 10	Tuần 12
PVC7	$2,3 \times 10^4$	$8,8 \times 10^4$	$2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, chủng vi khuẩn PVC7 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường MSM bổ sung composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất. Số lượng tế bào chủng PVC7 tăng chậm từ thời điểm ban đầu đến sau 2 tuần thử nghiệm. Tuy nhiên, từ tuần thứ 2 trở đi, chủng PVC 7 sinh trưởng và phát triển tốt với số lượng tăng từ  $8,8 \times 10^4$  (sau 2 tuần) đến  $5,4 \times 10^6$  CFU/ml (sau 10 tuần thử nghiệm). Tuy nhiên, số lượng chủng PVC7 có xu hướng cân bằng sau 12 tuần thử nghiệm.

Do sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường khoáng bổ sung composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất, chủng PVC7 được lựa chọn để xác định đặc điểm phân loại qua hình thái tế bào, khuẩn lạc và phân tích trình tự gen 16S rARN và đánh giá khả năng phân hủy composit PVC/gypsum thông qua phương pháp SEM (xác định hình thái cấu trúc vật liệu polyme composit PVC/gypsum), phân tích quang phổ hồng ngoại (FI-IR) và phân tích cộng hưởng từ hạt nhân proton ( $^1\text{H-NMR}$ ).

#### ***Ví dụ 4: Xác định vị trí phân loại của chủng PVC7 dựa trên trình tự gen 16S rARN***

ADN tổng số từ dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn PVC7 được phân lập sau từ 18 đến 24 giờ được tách bằng Kit của hãng Thermo scientific, Mỹ (Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA purification kit).

Sinh khối tế bào chủng PVC7 ở pha log sau 24 giờ nuôi cấy được ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó các thao tác được tiến hành cụ thể theo hướng dẫn của

nhà sản xuất. Sản phẩm ADN sau khi được tách được sử dụng khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR.

Gen mã hóa 16SrARN của chủng PVC7 được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ ADN tổng số sử dụng cặp mồi và chu trình nhiệt như trong phần Mô tả chi tiết sáng chế. Sản phẩm PCR của gen 16S rARN (1500 bp) được thể hiện trên Hình 4. Sản phẩm điện di được tinh sạch bằng Kit của hãng Thermo scientific, Mỹ (Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit). Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mức độ tương đồng gen 16S rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen 16S rARN trong Genbank bằng công cụ BLAST trên NCBI.

So sánh trình tự gen cho thấy, chủng PVC7 gần gũi nhất với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* BA17 (MH891764.1) với độ tương đồng khi so sánh trình tự của 16S rADN 1426 bp là 99,79 %. Dựa trên các phân tích về trình tự gen, chủng PVC7 được định danh là *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7. Đoạn 16S rADN đã phân tích trình tự và được đăng ký tại ngân hàng gen (GenBank) NCBI với số đăng ký (accession number) của trình tự là SUB 13936938 *Bacillus* OR751609.

**Ví dụ 5: Đánh giá khả năng phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7**

Khả năng phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum của chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7 được đánh giá thông qua việc sử dụng vật liệu này như (A) nguồn cacbon duy nhất như trong Ví dụ 3 và sự biến đổi cấu trúc của vật liệu composit PVC/gypsum này được quan sát (B) dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM); (C) phân tích quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR); và (D) phân tích cộng hưởng từ hạt nhân proton ( $^1\text{H-NMR}$ ).

Hình thái cấu trúc của composit PVC/gypsum dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM): khả năng phân hủy composit PVC/gypsum của chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7 đã được nghiên cứu sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung composit PVC/gypsum-MSM được thể hiện các Hình 5-7. Kết quả cho thấy, bề mặt vật liệu composit PVC/gypsum của mẫu đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) sau 12 tuần gần như còn nguyên vẹn, hình thái học bề mặt của mẫu khá phẳng. Trong khi đó, mẫu thử

nghiệm (xử lý với chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7) có sự biến đổi rõ rệt, trên bề mặt mẫu xuất hiện rất nhiều các hốc rỗ và xốp vật liệu như thể hiện trên Hình 8 (sau 4 tuần xử lý) và Hình 9 (sau 12 tuần xử lý). Kết quả này chứng tỏ chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7 có khả năng phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum. Hình 8 cho thấy phổ FT-IR của các mẫu composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) (A) và mẫu thí nghiệm (bổ sung chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7) (B) sau 12 tuần xử lý. Hình 9 cho thấy phổ hồng ngoại FT-IR của mẫu composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung chủng vi khuẩn) và mẫu thử nghiệm (xử lý với chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7) sau 12 tuần. Quá trình phân hủy này tập trung vào hai thành phần chính của vật liệu composit PVC/gypsum, đó là PVC và gypsum.

Sự so sánh giữa phổ của mẫu đối chứng (Hình 8) và mẫu thử nghiệm (Hình 9) cho thấy sự biến đổi trong các pic phổ đặc trưng của vật liệu này. Trong cả hai trường hợp, quan sát được sự hiện diện của pic có đặc trưng. Cụ thể, tại pic  $2959\text{ cm}^{-1}$  biểu thị nhóm  $\text{CH}_2$  trong PVC. Ngoài ra, có sự mở rộng của vùng pic trong khoảng  $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ , có thể giải thích bằng sự xuất hiện của các mạch aliphatic trong cấu trúc DOP và các dao động đặc trưng của nhóm ester ( $\text{C}=\text{O}$  ester) ở khoảng  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Ngoài ra, cũng quan sát các pic biểu thị các nhóm  $\text{CH}_2\text{-Cl}$  biến dạng ở  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CH-Cl}$  biến dạng góc ở  $1257\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C-H}$  ở  $959\text{ cm}^{-1}$ , và liên kết  $\text{C-Cl}$  ở  $832$ ,  $692$  và  $610\text{ cm}^{-1}$  (Kulkarni, R.K., Moore, E.G., Hegyeli, A.F., Leonard, F., 1971. Biodegradable poly (lactic acid) polymer. *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 169-181; Park, E., Park, B., Kim, Y., Canlier, A., Hwang, T-S., 2018. Elimination and Substitution Compete During Amination of Poly(vinyl chloride) with Ehtylenediamine: XPS Analysis and Approach of Active Site Index. *Macromolecular Research.* 26. 10.1007/s13233-018-6123-z; Khandare, S.D., Chaudhary, D.R., Jha, B., 2021. Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria. *Marine Pollution Bulletin.* 169. 10.1016/j.marpolbul.2021.112566.

Khi xem xét sự thay đổi cường độ pic và sự chuyển đổi bước sóng xảy ra do quá trình phân hủy sinh học do chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7 tác động lên thành phần hữu cơ như PVC và DOP có trong vật liệu, ta thấy sự mở rộng vùng của hydroxyl ( $\text{-OH}$ ), phân hủy cắt ngắn mạch xảy ra đồng thời gia tăng nhóm gia tăng cường độ của nhóm carbonyl. Điều này dẫn đến thay đổi cường độ pic trong vùng pic  $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  của nhóm  $\text{CH}_2$  và  $1720\text{ cm}^{-1}$  của nhóm carbonyl.

Để tìm hiểu sâu hơn về sự thay đổi trong cấu trúc của vật liệu polyme composit PVC/gypsum ở mẫu đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và mẫu thí nghiệm (xử lý với chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7) sau 12 tuần, phổ  $^1\text{H-NMR}$  đã được sử dụng (Hình 9). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  là một phương pháp thích hợp để theo dõi sự thay đổi trong cấu trúc hóa học của các hợp chất hữu cơ. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho phép quan sát dải tần số (hoặc pícs) tương ứng với proton trong mẫu. Sự thay đổi trong cấu trúc của polyme composit có thể được phân tích thông qua sự thay đổi trong số lượng và vị trí của các proton trên phổ. Cụ thể, sự xuất hiện hoặc biến mất của các pícs  $^1\text{H-NMR}$  có thể chỉ ra sự thay đổi trong thành phần hóa học của mẫu.

Dựa trên kết quả phổ  $^1\text{H-NMR}$ , các thay đổi cụ thể trong cấu trúc của polyme PVC/gypsum sau quá trình phân hủy sinh học có thể được xác định. Điều này một lần nữa minh chứng khả năng tác động và làm thay đổi thành phần hóa học của vật liệu polyme composit PVC/gypsum của chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7. Sự kết hợp giữa phổ  $^1\text{H-NMR}$  và phổ hồng ngoại FT-IR, như đã thảo luận ở trên giúp hiểu rõ hơn về quá trình phân hủy sinh học và ảnh hưởng của nó đối với vật liệu này.

Hình 9 thể hiện phổ  $^1\text{H-NMR}$  của mẫu polyme composit PVC/gypsum đối chứng (không bổ sung vi khuẩn). Trong phổ  $^1\text{H-NMR}$  của mẫu PVC/gypsum đối chứng, ta có thể quan sát các đỉnh tín hiệu đặc trưng của proton tương ứng với cấu trúc của nhựa PVC và dioctyl phthalate (DOP). Các tín hiệu này bao gồm các đỉnh tín hiệu của proton trong chuỗi alkyl của DOP và PVC, xuất hiện trong khoảng từ 0,8 đến 2,5 ppm.

Cụ thể, các đỉnh tín hiệu ở khoảng 2,1-2,5 ppm, 3,3 ppm và 4,12-4,17 ppm tương ứng với proton trong nhóm  $\text{CH}_2$  và  $\text{CHCl}$  trong PVC. Các đỉnh tín hiệu trong khoảng 1,2-1,4 ppm thuộc về nhóm  $\text{CH}_2$ , 0,87-0,89 ppm là của nhóm  $\text{CH}_3$  (j, l), 3,2-3,4 ppm là của nhóm OH, 4,3-4,5 ppm là của nhóm  $\text{O-CH}_2$ - (e), và cuối cùng, các đỉnh tín hiệu của proton trong nhóm aromatic xuất hiện trong khoảng từ 7,6 đến 7,8 ppm (b) trong DOP (d'Antuono, P., Botek, E., Champagne, B., Wieme, J., Reyniers, M-F., Marin, G., Adriaensens, P., Gelan, J., 2008. A Joined Theoretical-Experimental Investigation on the  $(^1\text{H})$  and  $(^{13}\text{C})$  NMR Signatures of Defects in Poly(vinyl chloride). *The J of phys chem. B.* 112 (47) 14804-18; Navarro, R., Pérez, M., Tardajos, M.G., Reinecke, H., 2010. Phthalate Plasticizers Covalently Bound to PVC: Plasticization with Suppressed Migration. *Macromolecules.* 43 (5).



Hình 10 trình bày phổ  $^1\text{H-NMR}$  của cả mẫu polyme composit đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) và thí nghiệm (bổ sung *B. amyloliquefaciens* PVC7) sau 12 tuần. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho thấy, cấu trúc của mẫu đối chứng gần như không thay đổi so với ban đầu, trong khi có sự thay đổi rõ rệt trong hình hình thái cấu trúc phân tử ở mẫu thí nghiệm (bổ sung chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7) sau 12 tuần xử lý. Sự biến đổi của mẫu thí nghiệm cũng được minh chứng rõ qua số liệu thống kê ở Bảng 4 như sau:

Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  vẫn bao gồm tín hiệu proton đặc trưng của 2 thành phần vật liệu composit là  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}$ ,  $\text{O-CH}_2$ -,  $\text{CH}_3$ , và các pic tương ứng với nhóm aromatic có trong PVC và DOP. Tuy nhiên, có sự thay đổi đáng kể về diện tích vùng pic, và đặc biệt, có sự xuất hiện của pic mới ở mẫu thí nghiệm tại vùng pic 5,75 ppm. Pic mới này được cho là thuộc về nhóm  $\text{R-C=C-H}$  và có thể là sản phẩm sau quá trình phân hủy sinh học của PVC. Bên cạnh đó, mẫu thí nghiệm xử lý bởi chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7 mất đi nhóm  $\text{-O-CH}_2$ - tại độ dịch chuyển hóa học từ 4,3-4,5 ppm thuộc DOP, kết quả này được cho là do sự phân hủy của cấu trúc chất hóa dẻo này (Yin L.V., Liu, J., Luo, Z., Wang, H., Wei, Z., 2017. Construction of chain segment structure models, and effects on the initial stage of the thermal degradation of poly(vinyl chloride). *RSC Adv.* 7. 37268-37275).

Những thay đổi này trong phổ  $^1\text{H-NMR}$  cung cấp thông tin quan trọng về sự tác động của quá trình phân hủy sinh học lên cấu trúc hóa học của vật liệu polyme composit PVC/gypsum, giúp hiểu rõ hơn về quá trình phân hủy và biến đổi trong thành phần của mẫu sau 12 tuần thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trên bảng

Bảng 4. Pic và diện tích pic của phổ  $^1\text{H-NMR}$  đối với mẫu composit PVC/gypsum đối chứng và mẫu thử nghiệm sau 12 tuần xử lý

Nhóm chức	Pic		Diện tích vùng pic	
	M1	M5	M1	M5
$\text{CH}_2$	1,2-1,4	1,28-1,38	5,72-12,64	2,31-6,42
	2,1-2,5	2,49-2,51	22,12	-
	3,33	3,32	-	-
$\text{CHCl}$	4,12-4,17	4,11-4,17	5,04	2,13
$\text{-O-CH}_2$ - (e)	4,3-4,5	-	12,53	-
$\text{CH}_3$	0,87-0,89	0,88-0,89	13,19	6,45

nhóm thơm	7,68-7,72	7,67-7,72	2,16-2,00	1,03-1,00
Pic mới (R-C=C-H)	-	5,75	-	-

**Ví dụ 6. Lưu giữ chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7**

Chủng *B. amyloliquefaciens* PVC7 được bảo quản trong môi trường khoáng bổ sung vật liệu composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất, với nồng độ glycerol 20% ở -30 và -80°C trong điều kiện hiếu khí. Chủng được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học với số lưu giữ PVC7.

**Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PVC7 theo sáng chế với hoạt tính phân hủy vật liệu composit PVC/gypsum thích hợp để xử lý triệt để, an toàn vật liệu polyme composit PVC/gypsum phế thải.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

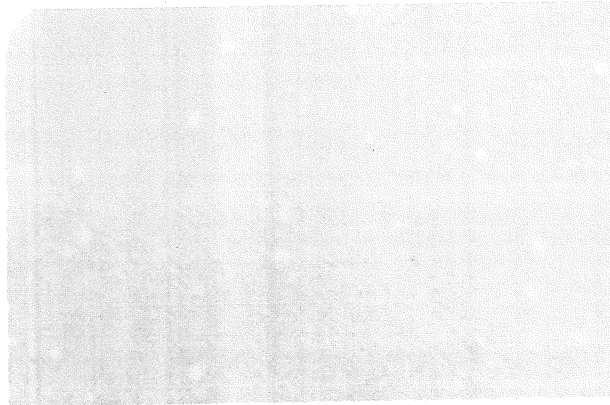
1. Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập có trình tự 16S rADN nêu trong SEQ ID NO.1 được đăng ký trên ngân hàng gen (GenBank) với số hiệu truy cập là SUB 13936938 *Bacillus* OR751609, trong đó:

- chủng vi khuẩn này là chủng vi khuẩn hiếu khí, gram dương, sinh bào tử, khuẩn lạc có mép gọn, hơi lồi, màu trắng đục có kích thước từ 2 đến 3 mm, được lưu giữ tại phòng Vi sinh vật dầu mỏ, Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam với số lưu giữ PVC7;

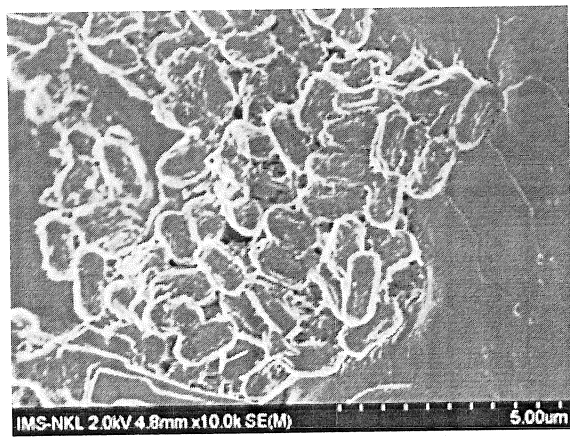
- chủng vi khuẩn này có khả năng sử dụng vật liệu polyme composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và cho phép phân hủy vật liệu polyme composit PVC/gypsum với nồng độ lên tới 10 g/l trong thời gian từ 4 đến 12 tuần ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH=7.

2. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập này được lưu giữ trong điều kiện môi trường khoáng MSM với glycerol 20% có bổ sung vật liệu composit PVC/gypsum như nguồn cacbon duy nhất và chủng được lưu trong điều kiện nhiệt độ đông sâu -30 hoặc -80°C trong môi trường hiếu khí.

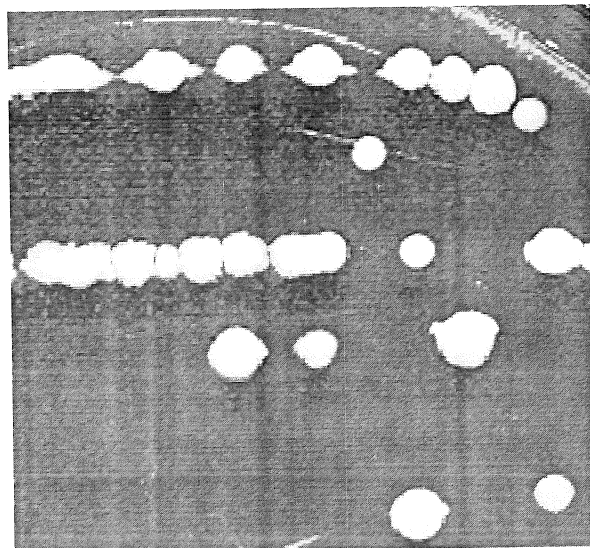
HÌNH 1



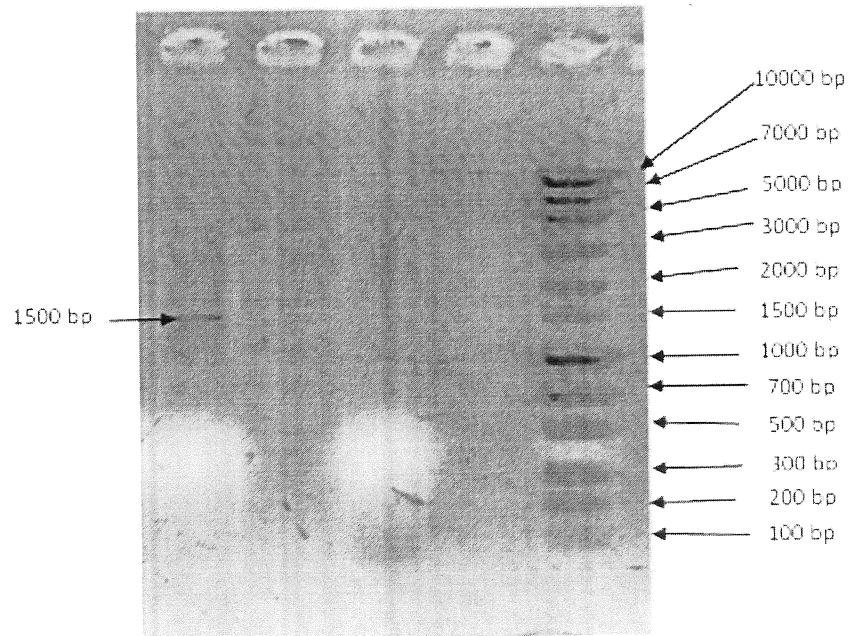
HÌNH 2



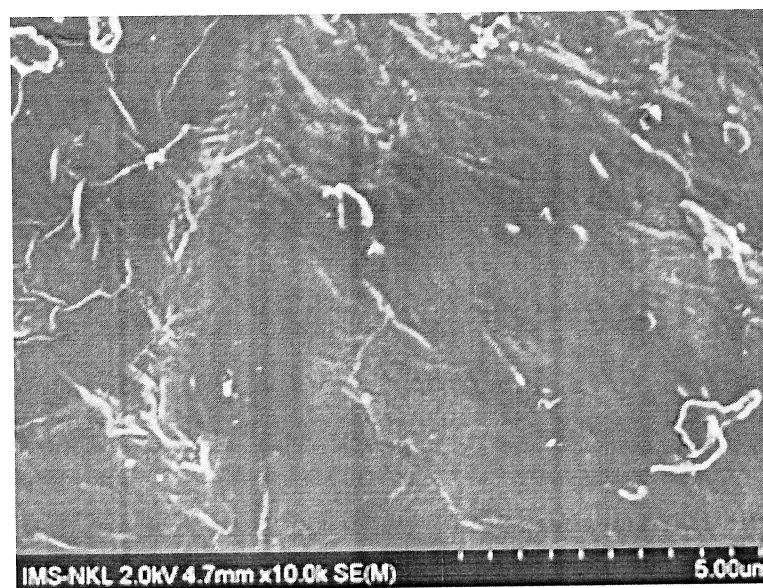
HÌNH 3



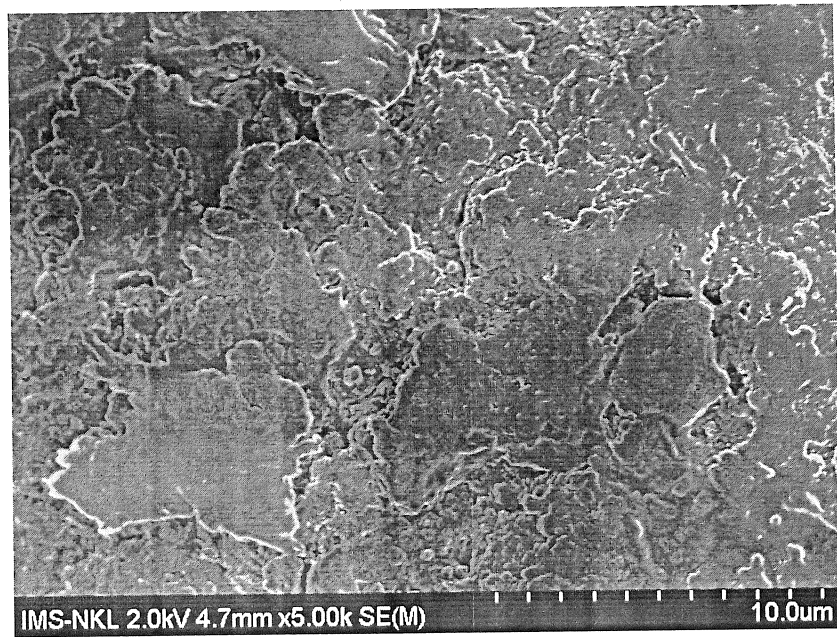
HÌNH 4



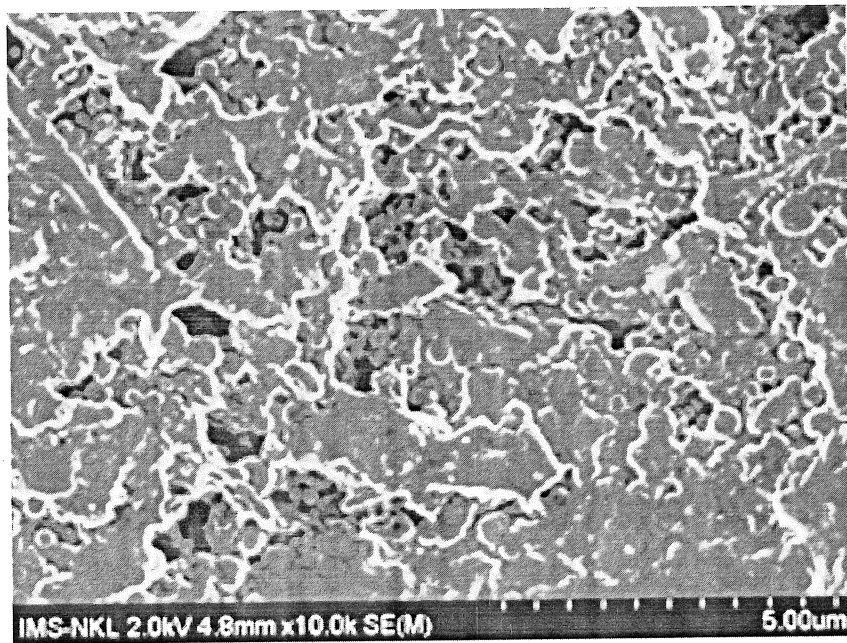
HÌNH 5



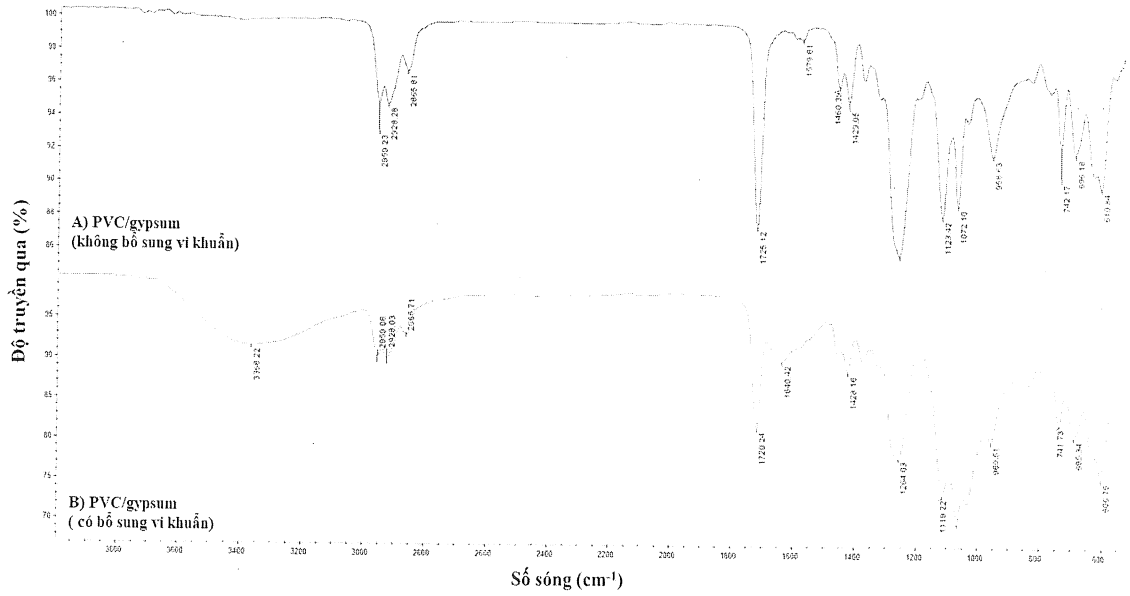
HÌNH 6



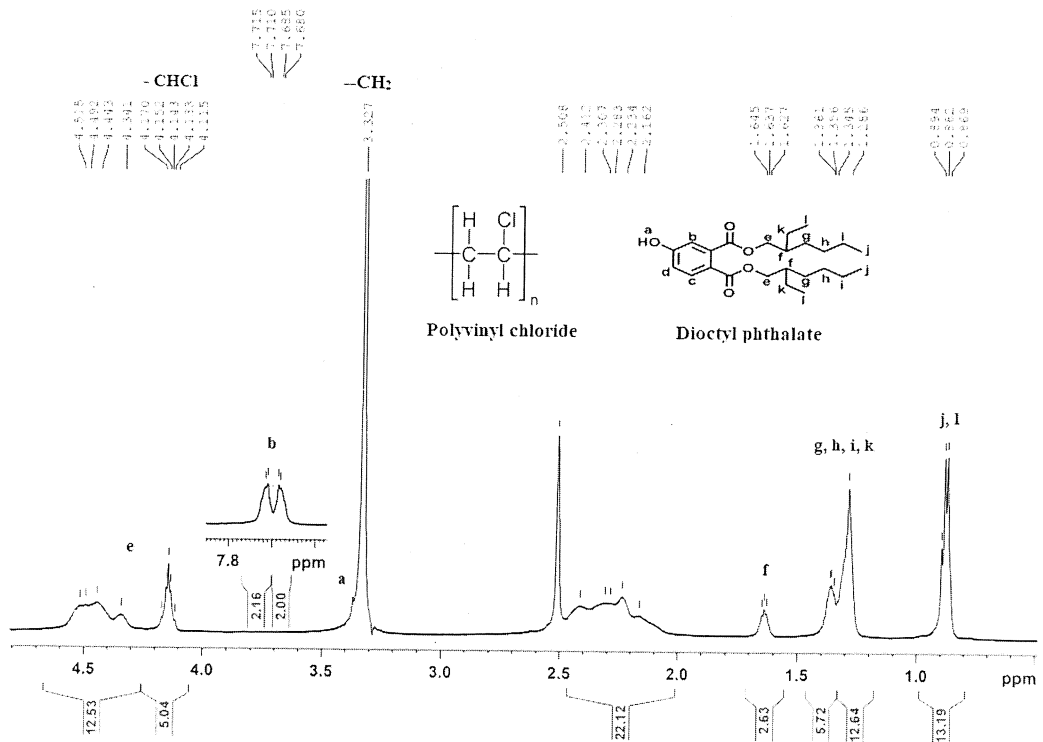
HÌNH 7



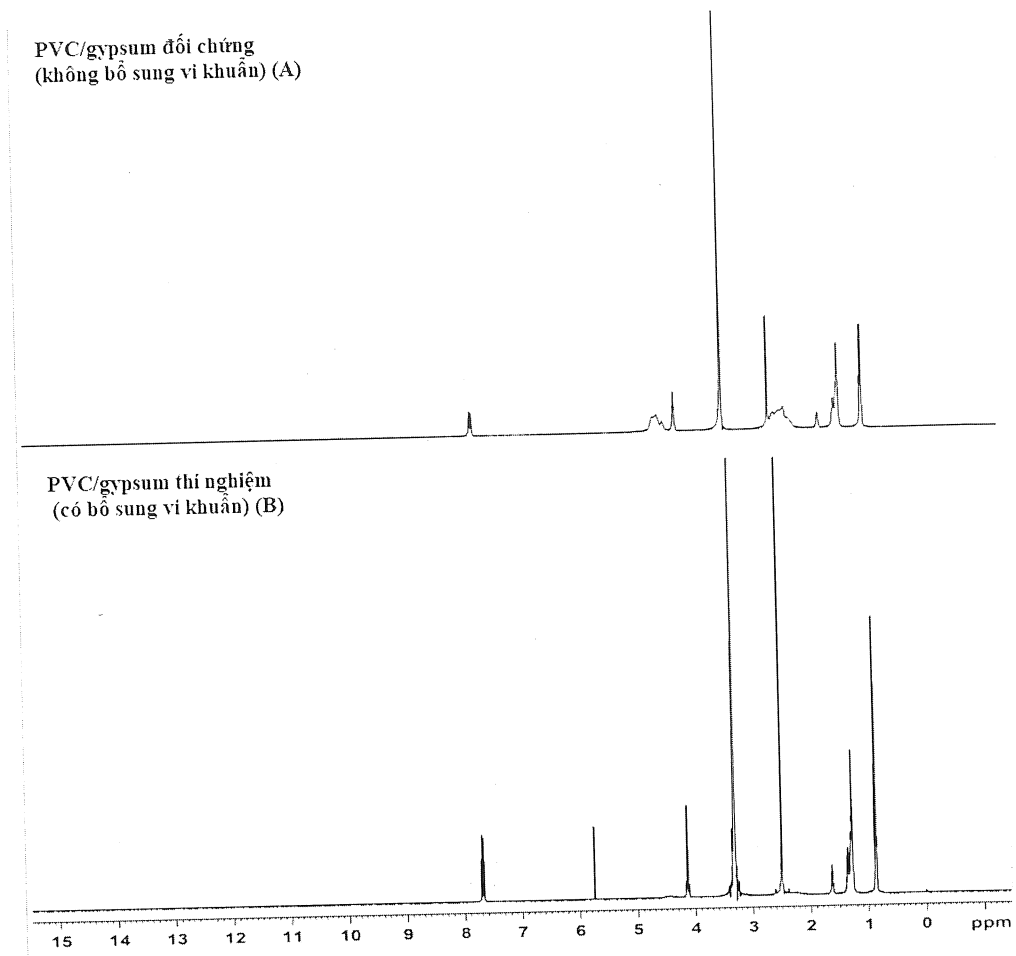
HÌNH 8



HÌNH 9



## HÌNH 10





## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> (Chủ đơn)

<120> Chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7 được phân lập có khả năng phân hủy vật liệu polyme composit PVC/GYPSUM

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 1426

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens* PVC7

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

ctatagntgc agtcgagcgg acagatggga gcttgctccc tgatgtagc ggcggacggg	60
tgagtaaacac gtgggtaacc tgcctgtaag actgggataa ctccgggaaa ccggggctaa	120
taccggatgg ttgtctgaac cgcattgggtc agacataaaa ggtggcttcg gctaccactt	180
acagatggac ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgaccga	240
tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc aactggggac tgagacacgg cccagactcc	300
tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg	360
cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtgccgt	420
tcaaataggc cggcaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag	480
cagccgcggc aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggctg aaagggctcg	540
caggcggttt cttagtctg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg gtcattggaa	600
actggggaac ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt	660
agagatgtgg aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg	720
agcgaagcgg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg	780
agtgctaagt gttaggggtt ttccgccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc	840
gcctggggag tacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc	900
ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct	960
ctgacaatcc tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacagggtg gtgcatgggt	1020
gtcgtcagct cgtgtcgtga gatggtgggt taagtcccgc aacgagcgc acccttgatc	1080
ttagttgcca gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag	1140
gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg	1200
gacagaacaa agggcagcga aaccgcgagg ttaagccaat cccacaaatc tgttctcagt	1260
tcggatcgca gtctgcaact cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag	1320
catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagcagagtt	1380
tgtaaacacc gaagtcggtg aggtaacctt taggagccag ccgccc	1426