

Bài báo nghiên cứu

PHÂN LẬP SÀNG LỌC TUYỂN CHỌN CHỦNG VI SINH VẬT
CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NHỰA POLYETYLEN

Đặng Thị Ngọc Sang*, Lê Thị Cúc Dung, Nguyễn Thúy Hương

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Đặng Thị Ngọc Sang – Email: sandang11@gmail.com

Ngày nhận bài: 22-9-2020; ngày nhận bài sửa: 02-12-2020; ngày duyệt đăng: 28-12-2020

TÓM TẮT

Việc sử dụng polyetylen đang tăng lên theo thời gian và việc phân hủy nó đang trở thành một thách thức lớn. hàng năm, khoảng 500 tỉ đến 1000 tỉ túi nhựa được tiêu thụ trên toàn cầu. Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập sàng lọc tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy nhựa polyetylen. Nghiên cứu tiến hành phân lập và thu thập chủng chuẩn, từ 25 chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE, qua sàng lọc và định danh đã tuyển chọn được 3 chủng là *Bacillus drentensis* (chủng phân lập), *Bacillus subtilis* ATCC 5230, *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 có tiềm năng phân hủy PE. Các kết quả khảo sát về khả năng giảm trọng lượng PE (48,8%); khoảng cách PE cách bề mặt môi trường; độ bền kéo; sự thay đổi FTIR và thay đổi cấu trúc bề mặt PE (SEM) đã chứng minh khả năng phân hủy PE của chủng an toàn ưu thế nhất là *Bacillus drentensis*. Nghiên cứu cũng kiến nghị cần khảo sát với các chủng ứng viên hiện đang bảo quản trong bộ sưu tập.

Từ khóa: phân hủy sinh học; FTIR; polyetylen; SEM

1. Giới thiệu

Ngày nay, Polyethylene (PE) là một loại nhựa nhiệt dẻo đã và đang được sử dụng rất phổ biến vì chúng có đặc tính là bền, đa dạng, tiện dụng và rất rẻ. Các loại nhựa nhiệt dẻo được sử dụng nhiều nhất là PE, PP, PVC và PET. Trong cơ cấu tiêu thụ vật liệu nhựa toàn cầu năm 2017, PE (với các dẫn xuất HDPE, LDPE, LLDPE) và PP chiếm tỉ trọng cao nhất với lần lượt 28% và 20% và đứng thứ 3 trong cơ cấu tiêu thụ là PVC với 12% (Muhonja, Christabel, Makonde, Magoma, & Imbuga, 2018).

Ở Việt Nam, lượng tiêu thụ sản phẩm nhựa đang tăng lên nhanh chóng. Các thống kê và nghiên cứu ở Việt Nam vẫn chưa cung cấp các thông tin cụ thể về lượng, loại và thành phần của nhựa thải ra môi trường, mà chỉ có một số nghiên cứu về chất thải nhựa nói chung ở một số địa phương. Phân tích và tổng hợp sinh thái quốc gia (NCEAS) của Hoa Kỳ đã công bố một kết quả nghiên cứu trên Tạp chí Science (tháng 2/2015), trong đó chỉ ra rằng tại Việt Nam, ước tính lượng nhựa thải ra biển khoảng 0,28-0,73 triệu tấn/năm (chiếm 6% tổng lượng nhựa thải ra biển của thế giới), đứng thứ 4 trong danh sách các quốc gia có lượng nhựa thải ra biển nhiều nhất (Jambeck et al., 2015).

Cite this article as: Dang Thi Ngoc Sang, Le Thi Cuc Dung, & Nguyen Thuy Huong (2020). Isolating, screening and selecting polyetylen able of degrading microorganisms. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 17(11), 2198-2209.

Hiểm họa từ rác nhựa thể hiện ở chỗ đây là chất liệu bền, chậm phân hủy nhưng lại dễ sản xuất. Nhựa là chất liệu không tự phân hủy sinh học mà chỉ có thể phân hủy bởi ánh sáng mặt trời hoặc phân rã thành những mảnh nhỏ. Nhựa đang trở thành thứ gây ô nhiễm môi trường lớn nhất có ở cả lòng đất, trên không khí và dưới đại dương (Jambeck et al., 2015).

Để thực hiện việc giảm thiểu chất thải nhựa vào môi trường và duy trì sự quản lí bền vững chất thải nhựa, Việt Nam cần có các chiến lược cụ thể cũng như hành động thiết thực về quản lí nhựa thải, đồng thời cần tham khảo cách quản lí, xử lí của các quốc gia trên thế giới, hướng đến tái sử dụng, nhất là tạo ra các sản phẩm thay thế có nguồn gốc sinh học, hoặc có thể phân hủy sinh học.

Phân hủy sinh học có thể định nghĩa là quá trình làm biến chất các vật liệu PE thông qua các vi sinh vật. Trong quá trình này cần có sự tham gia của nhiều loại vi sinh vật khác nhau và bị chi phối bởi các yếu tố như: đặc điểm polymer, loại vi sinh vật và bản chất của quá trình tiền xử lí. Trong quá trình phân hủy polymer đầu tiên sẽ được chuyển thành các monomer sau đó các monomer được khoáng hóa. Phần lớn các polymer quá lớn để đi qua màng tế bào nên chúng phải được khử thành các monomer trước rồi mới được hấp thụ và phân hủy trong tế bào vi sinh vật. Suốt trong quá trình phân hủy thì các exoenzyme từ vi sinh vật phá vỡ polymer phức tạp tạo ra các phân tử nhỏ hơn của chuỗi ngắn ví dụ như: oligomer, dimer, monomer những chuỗi ngắn này đủ nhỏ để vượt qua màng bán thấm bên ngoài vi khuẩn và sau đó được sử dụng như nguồn carbon và năng lượng. Khi sản phẩm cuối cùng là CO_2 , H_2O hay CH_4 thì hoàn thành quá trình phân hủy sinh học của polymer (như trích dẫn ở Shah et al., 2008).

Vì PE là chất được tổng hợp nhân tạo nên rất khó phân hủy sinh học nhưng qua nhiều thực nghiệm được tiến hành từ năm 1975 đến nay (Sangale, Shahnawaz, & Ade, 2012). Nhiều nghiên cứu đã tìm ra một số chủng giống vi sinh vật có khả năng phân hủy PE song số lượng còn hạn chế và đa số các chủng được tìm thấy là các chủng gây bệnh (Mierzwa-Hersztek, Gondek, & Kopec, 2019). Mục tiêu chính của nghiên cứu này là tìm thêm những chủng vi sinh vật an toàn có hoạt tính phân hủy PE, đồng thời khảo sát những chủng đã tìm thấy trước đó để tìm ra chủng vừa mang hoạt tính phân hủy PE cao vừa an toàn, đồng thời định hướng hỗ trợ cho một trong các giai đoạn phân hủy PE, nhằm rút ngắn thời gian làm cơ sở cho việc ứng dụng trong tạo các chế phẩm, chủ động trong việc tăng nhanh quá trình phân hủy tự nhiên và góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường của rác thải nhựa.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Loại PE được lựa chọn trong đồng bộ các thực nghiệm là LDPE có độ dày 22,5 μm , không có xúc tác hoặc phụ gia.

- Môi trường:

+ LCFBM (KH_2PO_4 : 0,7g; K_2HPO_4 : 0,7g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,7g; NH_4NO_3 : 1g; NaCl : 0,005g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,002g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,002g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,001g; nước cất: 1000mL; PE: 1g) môi trường lỏng đặc hiệu với nguồn carbon duy nhất là PE. Giúp chọn lọc vi khuẩn có khả năng phân hủy PE (Yang et al., 2014).

+ LCFSDA (nước cất: 1000mL; peptone: 10g; PE: 1g) môi trường lỏng đặc hiệu với nguồn carbon duy nhất là PE. Giúp chọn lọc các chủng nấm có khả năng phân hủy PE.

+ CFBAM (được chuẩn bị bằng cách bổ sung thêm 15g agar vào 1000mL môi trường LCFBM) môi trường thạch giúp phân lập vi khuẩn phân hủy PE (Yang et al., 2014).

+ CFBSDA (được chuẩn bị bằng cách bổ sung 15g agar vào 1000mL môi trường LCFSDA) môi trường thạch dùng phân lập nấm.

+ NB (tryptone: 10g; cao thịt: 5g; NaCl: 5g; nước cất: 1000mL), NA (được chuẩn bị bằng cách bổ sung thêm 15g agar vào 1000mL môi trường NB). Môi trường chứa hàm lượng dinh dưỡng chuẩn cho đa số các loài vi khuẩn và được sử dụng hỗ trợ phân lập vi sinh vật.

+ SDA (dextrose (glucose): 40g; peptone: 10g; agar: 15g; nước cất: 1000mL) môi trường hỗ trợ tăng sinh nấm.

- Các mẫu đất thu thập được từ các địa điểm khác nhau (bảng 1) của Thành phố Hồ Chí Minh

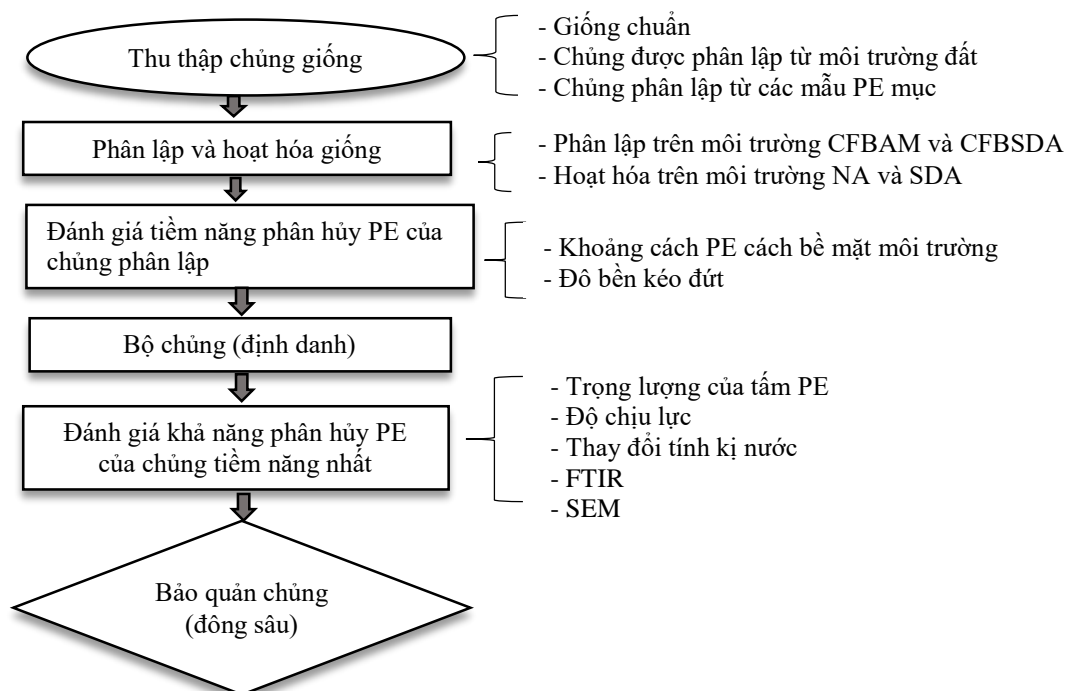
Bảng 1. Các địa điểm thu mẫu đất cho việc phân lập vi sinh vật

Mẫu	Địa chỉ
1	Khu luân chuyển rác Phường Tân Chánh Hiệp, Quận 12
2	Đất có lẫn mẫu nhựa PE tại công viên Lê Thị Riêng, Quận 10
3	Khu đất trống nơi tập trung rác ven kênh nước đen đường CN1, Phường Sơn Kỳ, Quận Tân Phú

- Các chủng chuẩn: *Bacillus subtilis* ATCC 5230; *Aspergillus niger* ATCC 6275; *Aspergillus oryzae* ATCC 10124; *Streptococcus lactis* ATCC 11454; *Aspergillus glaucus* ATCC 14567; *Brevibaccillus borstelensis* ATCC 51667.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu



2.2.2. Thu thập và trữ mẫu

- Các mẫu đất được thu thập từ các địa điểm khác nhau tại Thành phố Hồ Chí Minh như Bảng 1.

- Phương pháp thu thập và trữ mẫu: dùng dao lấy những mẫu đất bên dưới những miếng PE đã bị phân hủy cho vào túi nylon, ghi chú đem về trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C-8°C. Mẫu đất được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE

a. Tuyển chọn sơ bộ chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE

Lấy 20g đất/mẫu cho vào cốc thủy tinh và làm nhuyễn, pha loãng mẫu ở các nồng độ pha loãng khác nhau: 10^{-4} , 10^{-5} , trộn đều mẫu và hút 0,5 ml dịch pha loãng ở 2 nồng độ trên cho vào đĩa môi trường đặc hiệu dùng phân lập vi sinh vật phân hủy PE là CFBAM và CFBSDA với nguồn carbon duy nhất là PE. Mẫu được ủ trong tủ ở 37°C trong 21 ngày. Những khuẩn lạc phát triển trên môi trường này được cấy chuyển nhiều lần trên môi trường NA (vi khuẩn) và SDA (nấm) để tuyển chọn các chủng thuần trước khi cấy chuyển sang môi trường chọn lọc LCFBM và LCFSDA.

Chỉ tiêu theo dõi gồm: khoảng cách tấm PE cách bề mặt môi trường LCFBM, LCFSDA và độ chịu lực của tấm PE.

b. Định danh và bảo quản chủng

- DNA tổng số được tách chiết sau đó vùng gen 16s-rDNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số.

- Sản phẩm được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, xử lý bằng phần mềm BioEdit. Từ kết quả giải trình tự, so sánh trình tự thu được với ngân hàng gen để xác định loài. Mức độ tương đồng của trình tự gen vùng 16S-rDNA được so sánh với các trình tự trên NCBI.

- Mẫu được phân tích tại Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

- Các giống VSV sau khi định danh được bảo quản bởi phương pháp lạnh sâu -70°C.

2.2.4. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu

- Đo trọng lượng của tấm PE. Sự phân hủy xảy ra sẽ biết đôi các nhóm etylen trong cấu trúc của PE thành hợp chất khác nên sẽ xuất hiện sự giảm trọng lượng của các mẫu PE trong thí nghiệm. Đánh giá dựa vào các chỉ tiêu:

+ Đo vị trí các tấm PE cách bề mặt môi trường nuôi cấy bằng thước kẹp

+ Các tấm PE sau đó được rửa sạch, sấy khô và cân để xác định khối lượng.

- Đo độ chịu lực: dựa vào hai thông số là độ bền kéo đứt và độ giãn đứt của vật liệu, trong đó:

+ Độ bền kéo đứt là lực lớn nhất mà mẫu thử chịu được khi bị kéo đứt, có thể hiểu như là dùng một lực tác động tăng dần đến khi vật liệu dạng sợi hay trụ bị đứt;

+ Độ giãn đứt tuyệt đối là phần chiều dài của mẫu thử tăng thêm ở thời điểm đứt. Độ giãn đứt tương đối là tỉ số của độ giãn đứt tuyệt đối so với độ dài ban đầu của mẫu thử, tính bằng phần trăm;

+ Sử dụng máy kéo nén vạn năng 1 trục, hoặc 2 trục với ngàm kẹp phù hợp để đo độ chịu lực của mẫu PE.

- Đo quang phổ (FTIR): máy đo quang phổ FTIR dùng để nghiên cứu dao động của các cấu trúc trong phân tử, để xác định độ tinh khiết của chất, phân tích định lượng.

- Khảo sát sự thay đổi cấu trúc của tấm PE bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope – SEM). Chụp SEM được thực hiện tại Phòng Công nghệ Nano, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.5. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí với ba lần lặp, số liệu được thu thập, xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS version 22.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập, thu thập và sàng lọc bộ chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE

Từ 12 mẫu rác nylon mục, nghiên cứu đã phân lập trên môi trường đặc hiệu CFBAM được 12 chủng (được kí hiệu B1=> B12) và trên môi trường đặc hiệu LCFSDA được 7 chủng (được kí hiệu F1=> F7). Với số chủng phân lập, kết hợp với 6 chủng chuẩn (mục 2.1) đã được ghi nhận cũng có khả năng phân hủy PE (như trích dẫn ở Mierzwa-Hersztek, Gondek, & Kopec, 2019, p.605; Sangale, Shahnawaz, Ade, 2012, p.4-7). Đề tài tạo bộ 25 chủng vi sinh vật ứng viên cho nghiên cứu này.

Từ bộ 25 chủng được cấy chuyên và ổn định nuôi cấy, chúng tôi tiến hành sàng lọc chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE thông qua 2 chỉ tiêu là: khoảng cách tấm PE cách bề mặt môi trường và độ chịu lực. PE có đặc tính là nhẹ và kỵ nước vì thế khi tồn tại trong môi trường lỏng chúng nổi trên bề mặt của môi trường, đồng thời cũng ngăn cách sự tiếp xúc của vi sinh vật với bề mặt của tấm PE, vì vậy khi tấm PE bắt đầu chìm dần trong môi trường lỏng (xác định thông qua khoảng cách PE cách bề mặt môi trường) tức là các dấu hiệu của tính kỵ nước của tấm PE giảm dần và có sự thay đổi so với ban đầu và lực liên kết giữa các monomer yếu đi.

Kết quả khảo sát 2 chỉ tiêu trên sau 21 ngày nuôi cấy thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2. Sàng lọc chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE

STT	Kí hiệu/ Chủng	Khoảng cách PE cách bề mặt môi trường (mm)	Độ bền kéo đứt (GPa)
1	B1	1,2	29,2
2	B2	3,0	27,2
3	B3	2,5	28,0
4	B4	2,0	28,5
5	B5	5,0	26,5
6	B6	3,5	27,2
7	B7	4,2	26,9
8	B8	5,0	26,2
9	B9	5,5	26,0
10	B10	1,8	28,2
11	B11	3,0	27,3
12	B12	2,5	28,1
13	F1	0,5	31,2
14	F2	0,8	30,1
15	F3	1,2	29,5
16	F4	1,0	30,0
17	F5	1,0	29,8
18	F6	1,5	29,2
19	F7	3,0	27,5
20	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 5230	4,5	27,0
21	<i>Streptococcus lactis</i> ATCC 11454	3,5	27,4
22	<i>Brevibaccillus borstelensis</i> ATCC 51667	2,5	28,2
23	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	1,5	29,0
24	<i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124	4,0	27,1
25	<i>Aspergillus glaucus</i> ATCC 14567	2,0	28,8

Kết quả thu nhận được tại Bảng 1 cho thấy, cả 25 chủng ứng viên đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường đặc hiệu có bổ sung PE là nguồn carbon duy nhất. Trong 25 chủng vi sinh vật của bộ chủng, có 6 chủng sinh trưởng mạnh nhất. Trong đó gồm có 4 chủng phân lập được kí hiệu B5, B7, B8, B9 và 2 chủng chuẩn là *Bacillus subtilis* ATCC 5230, *Aspergillus oryzae* ATCC10124. Sau 21 ngày nuôi cấy cả 6 chủng đều có dấu hiệu phân hủy khá rõ khi kết quả đo về khoảng cách từ vị trí chìm của tấm PE đến bề mặt môi trường lớn nhất (≥ 4 mm) và độ bền kéo đứt thấp nhất ($\leq 27,1$ Gpa). Nghiên cứu này đã sàng lọc được 6 chủng có tiềm năng phân hủy PE cao để tiến hành các thực nghiệm tiếp sau.

Trong 6 chủng ưu thế có 4 chủng phân lập là chủng bản địa được kí hiệu B5, B7, B8, B9. Tiến hành định danh bộ chủng bản địa sàng lọc trên bằng phương pháp sinh học phân

tử. Kết quả định danh chủng B5 là *Pseudomonas aeruginosa*, B7 là *Enterobacter cloacae*, B8 là *Bacillus drentensis*, B9 là *Bacillus drentensis*.

Dựa vào kết quả định danh cho thấy chủng B5 (*Pseudomonas aeruginosa*) và chủng B7 (*Enterobacter cloacae*) là các chủng gây bệnh đồng thời có khả năng tạo độc tố gây bệnh cho người và động vật và đây là các chủng không an toàn (Ministry of Health, 2016). Vì thế từ 6 chủng sàng lọc, đề tài đã tuyển chọn được 3 chủng, 1 chủng phân lập bản địa là *Bacillus drentensis* B8 (B8 và B9 đều cùng loài *Bacillus drentensis* và có sự khác nhau không đáng kể về khoảng cách PE cách bề mặt môi trường và độ bền kéo đứt nhưng hình ảnh chủng B8 bám trên bề mặt PE rõ nét hơn chủng B9 nên chúng tôi chọn chủng B8 vào nghiên cứu sâu hơn) và 2 chủng chuẩn là *Bacillus subtilis* ATCC 5230, *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 để bảo quản bằng phương pháp đông sâu.

Về khía cạnh an toàn sinh học chủng *B. drentensis* là một chủng an toàn và không gây bệnh. Chủng này được báo cáo là một trong những chủng *Bacillus* có lợi trong ngành dược phẩm cũng như là ứng cử viên tiềm năng cho việc phát triển các loại thuốc mới. Các chất chuyển hóa thứ cấp từ *B.drentensis* có thể được sử dụng làm chất chống oxy hóa và kháng khuẩn mạnh (Hagaggi, 2020). Bên cạnh đó, *B. drentensis* đã được báo cáo là một chủng tiềm năng cho việc sản xuất polyhydroxybutyrate (PHB), một loại nhựa sinh học, rất hữu ích cho các ứng dụng khác nhau bao gồm vật liệu đóng gói, y tế và vật liệu phủ. Những kết quả này có thể chứng minh được *Bacillus drentensis* là một chủng an toàn không gây hại cho sức khỏe và là một ứng cử viên thích hợp trong góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm nhựa (Penkhrue et al., 2020).

3.2. Nghiên cứu khả năng phân hủy PE của chủng tiềm năng *Bacillus drentensis* B8

Bảng 3. Kết quả khảo sát sự thay đổi của tấm PE sau khi ủ với chủng *B. drentensis* B8

Chỉ tiêu Thời gian theo dõi (tuần)	Thay đổi trọng lượng tấm PE		Khoảng cách PE cách bề mặt môi trường (mm)	Độ bền kéo	
	Trọng lượng tấm PE (g)	Tỉ lệ giảm (%)		Độ bền kéo đứt (GPa)	Độ giãn dài khi đứt (%)
Ban đầu	1,000	0	0	32,82	69,15
4	0,868	13,2	6,0	25,11	57,41
8	0,680	32,0	9,2	19,25	40,18
12	0,512	48,8	11,5	15,45	22,15



Ổng nghiệm 1. Ổng đỏi chứng âm (mẫu không xử lí vi sinh)

Ổng nghiệm 2. Mẫu có xử lí vi sinh

Hình 1. Khảo sát sự thay đỏi của tấm PE sau khi ủ với chủng *B. drentensis* B8

Nghiên cứu về khả năng sinh trưởng của chủng *Bacillus drentensis* (chủng B8) trong môi trường khoáng có bổ sung PE là nguồn carbon duy nhất cho thấy trọng lượng tấm PE giảm dần theo thời gian đến tuần 12 giảm đến 48,8% so với mẫu ban đầu. Kết quả đo trọng lượng là trung bình lặp lại của 3 lần đo.

Khoảng cách PE cách bề mặt môi trường sau thời gian 4 – 8 – 12 tuần có sự khác biệt rõ rệt. Theo thời gian nuôi cấy đến tuần 12 tấm PE cách bề mặt môi trường là 11,5 mm, điều này chứng tỏ hoạt động của chủng *B. drentensis* B8 giúp làm giảm tính kỵ nước của vật liệu PE khiến tấm PE chìm dần vào môi trường nuôi cấy. Khi tính kỵ nước của vật liệu PE giảm sẽ giúp cho sự tiếp xúc của vi sinh vật với bề mặt tấm PE sẽ diễn ra thuận lợi hơn.

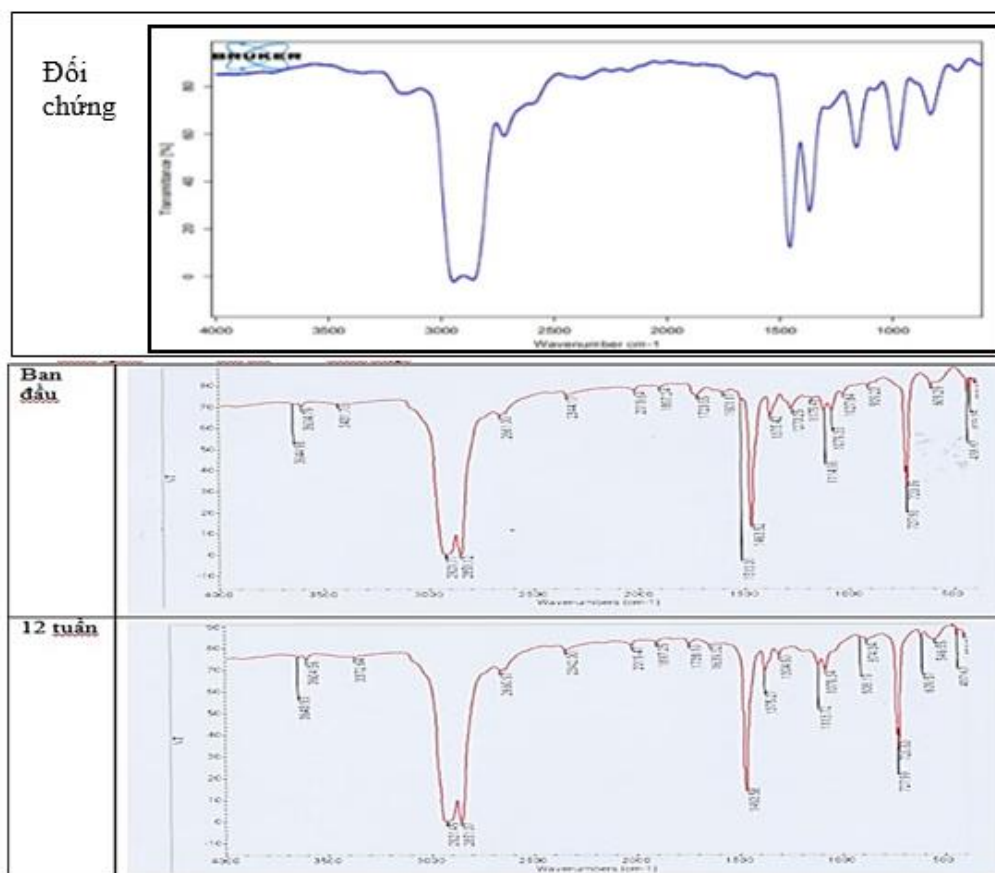
Độ bền kéo đứt của tấm PE giảm dần theo các tuần 4 – 8 – 12 từ 25,11 giảm xuống còn 15,45 GPa so với ban đầu là 32,82 GPa. Tuần thứ 12 thì độ giãn dài khi đứt là 22,15% khác biệt so với ban đầu là 69,15%.

Bảng 4. Tổng hợp so sánh với các nghiên cứu được công bố trước đây

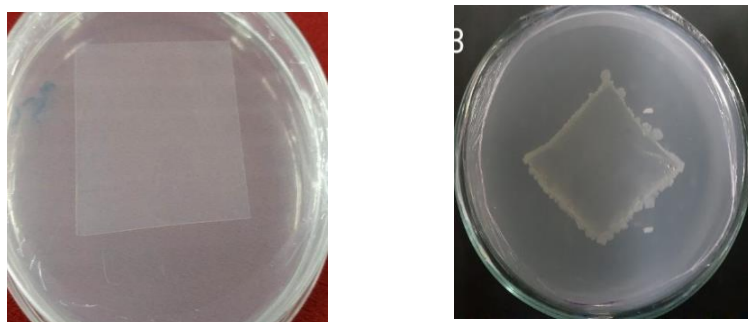
Thời gian	Tên chủng so sánh	Giảm trọng lượng (%)	
		Chủng so sánh	Chủng <i>B. drentensis</i> B8
4 tuần	<i>Aspergillus niger</i>	12,25	13,2
	<i>Streptococcus lactis</i>	12,5	13,2
	<i>Brevibaccillus borstelensis</i>	11	13,2
	<i>Arthrobacter</i> sp	12	13,2
	<i>Pseudomonas</i> sp	15	13,2
8 tuần	<i>Rhodococcus ruber</i>	7,5	32,0
	<i>Bacillus, Micrococcus, Listeria</i> và <i>Vibrio</i>	5%	32,0
12 tuần	<i>Bacillus cerues</i> và <i>Pseudomonas</i> sp.	12,5	48,8

Khi tiến hành tổng hợp so sánh với các nghiên cứu trước đó (Sangale, Shahnawaz, & Ade, 2012) thấy rằng chủng *Bacillus drentensis* B8 có khả năng làm giảm đáng kể trọng lượng tấm PE hơn so với các chủng so sánh ở Bảng 4. Sự khác nhau về kết quả như trên còn có thể do sự khác biệt của vật liệu tấm PE trong thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng loại LDPE độ dày 22,5 μm , không có xúc tác hoặc phụ gia. Có thể có khác biệt với loại LDPE mà những nghiên cứu so sánh đã thực hiện dẫn đến sự chênh lệch về giảm trọng lượng một cách đáng kể như trên. Một số chỉ tiêu đề tài tiến hành thực hiện như khoảng cách PE cách bề mặt môi trường (mm), độ bền kéo đứt (GPa), độ giãn dài khi đứt (%) nhưng không có trong các công bố trước đây và đây chính là các chỉ tiêu mà bài báo này chúng tôi đề xuất.

Khi khảo sát sâu hơn về sự hấp thụ bức xạ hồng ngoại của tấm PE khi ủ với chủng *B. drentensis* B8 sau 12 tuần, sử dụng phương pháp FTIR (Fourier Transformation InfraRed – ghi nhận các dao động đặc trưng của các liên kết hóa học giữa các nguyên tử) cho thấy có sự hiện diện của nhóm -CH tại mũi hấp thụ có bước sóng là 2921,79 cm^{-1} và 2851,12 cm^{-1} . Ngoài ra, còn có sự xuất hiện của các nhóm chức khác như -OH của ethylene glycol (mũi hấp thụ ở 3431,75 và 3604,79 cm^{-1}), nhóm C=O của carbonyl (mũi hấp thụ ở 1601,17 cm^{-1}).



Hình 2. Kết quả đo FTIR của tấm PE sau khi ủ với chủng *Bacillus drentensis* B8



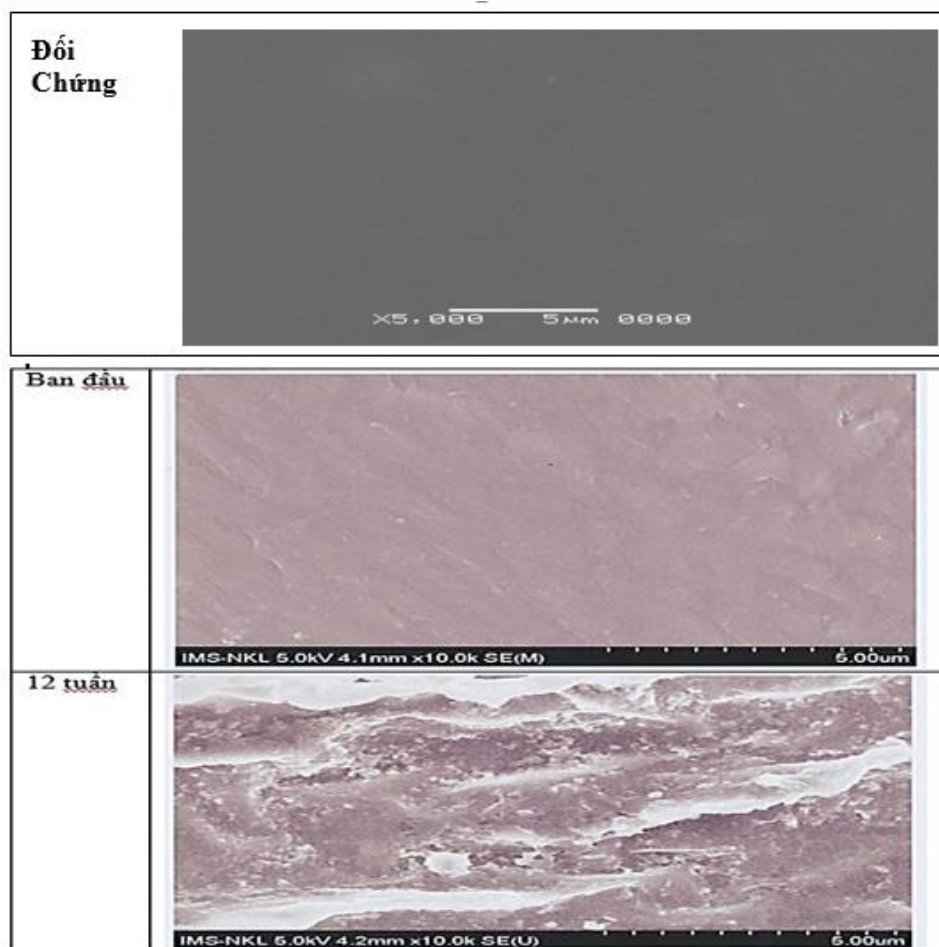
(a)

(b)

Hình 3. (a) Đĩa đối chứng không có chủng *Bacillus drentensis* B8.

(b) Chủng *Bacillus drentensis* B8 trên môi trường CFBAM

Chủng *B. drentensis* B8 chỉ xuất hiện ở phía dưới bề mặt tấm PE (Hình 3b), còn ở mặt ngoài môi trường đặc hiệu CFBAM thì không có, chứng tỏ chủng *B. drentensis* B8 đã sử dụng nguồn carbon trong PE để sống và phát triển đồng thời chủng tỏ thao tác thí nghiệm đúng và tấm PE không bị nhiễm.



Hình 4. Kết quả chụp tấm PE dưới kính hiển vi điện tử SEM

Hình ảnh chụp SEM trên bề mặt tấm PE dùng làm đối chứng âm không xử lí vi sinh (Hình 4) không hề xuất hiện một thay đổi bề mặt nào. Sự thay đổi cấu trúc tấm PE được thể hiện qua hình ảnh chụp SEM sau 12 tuần nuôi cấy cho thấy bề mặt bằng phẳng ban đầu của vật liệu đã trở nên gồ ghề, có các hố, khoang.

Vậy qua kết quả của thí nghiệm tiền đề cho thấy chủng *B. drentensis* B8 có khả năng sử dụng PE, sau 12 tuần khối lượng PE giảm 48,8% so với ban đầu. Kết quả FTIR cho thấy sự xuất hiện của sản phẩm phân hủy PE là chất có chứa nhóm C=O của carbonyl, nhóm –OH của ethylene glycol và nhóm –CH của polyetylene. Cấu trúc tấm PE dưới kính hiển vi điện tử SEM và tiến hành so sánh với mẫu đối chứng, ta thấy đã có sự tác động của vi khuẩn lên bề mặt tấm PE, làm cho bề mặt bằng phẳng ban đầu vật liệu không còn mà trở nên gồ ghề, xuất hiện các khe rãnh hoặc các hố, khoang (Hình 4). Các thí nghiệm trên cho thấy chủng *Bacillus drentensis* B8 có khả năng phân hủy PE.

4. Kết luận

Nghiên cứu tiến hành phân lập và thu thập chủng chuẩn được 25 chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy PE, qua sàng lọc và định danh đã tuyển chọn được 3 chủng là *Bacillus drentensis* B8 (chủng phân lập), *Bacillus subtilis* ATCC 5230, *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 có tiềm năng phân hủy PE. Các kết quả khảo sát về khả năng giảm trọng lượng PE (48,8%); khoảng cách PE cách bề mặt môi trường; độ bền kéo; sự thay đổi FTIR và thay đổi cấu trúc bề mặt PE (SEM) đã chứng minh khả năng phân hủy PE của chủng an toàn ưu thế nhất là *Bacillus drentensis* B8. Nghiên cứu cũng kiến nghị cần khảo sát với các chủng ứng viên hiện đang bảo quản trong bộ sưu tập đồng thời khảo sát thêm chủng tiềm năng B9 vì định danh B8 và B9 cùng loài nhưng đặc tính khác nhau nên cần khảo sát cả 2 chủng trên.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ministry of Health, (2016). Thông tư ban hành danh mục vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ an toàn sinh học phù hợp kỹ thuật xét nghiệm [Circular promulgating the list of microorganisms causing infectious diseases according to risk group and biosafety level in accordance with testing technique]
- Hagaggi, N. (2020). Phenolic Contents, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of Extracts from *Bacillus* spp. Associated with The Leaves of Some Medicinal Plants. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 12(1), 55-66. <https://doi.org/10.21608/eajbsg.2020.86784>
- Jambeck, J. R., Ji, Q., Zhang, Y.-G., Liu, D., Grossnickle, D. M., & Luo, Z.-X. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. In *Science* (Vol. 347, Issue 6223, 764-768). <https://doi.org/10.1126/science.1260879>
- Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., & Kopec, M. (2019). Degradation of Polyethylene and Biocomponent-Derived Polymer Materials: An Overview. In *Journal of Polymers and the Environment*, 27(3), 600-611. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01368-4>

- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLOS ONE*, *13*(7), e0198446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Penkhruue, W., Jendrossek, D., Khanongnuch, C., Pathomareeid, W., Aizawa, T., Behrens, R. L., & Lumyongid, S. (2020). Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. In *PLoS ONE*, *15*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230443>
- Sangale, M. K. (2012). A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, *3*(10). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000164>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, *26*(3), 246-65. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W.-M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environmental Science & Technology*, *48*(23), 13776-13784. <https://doi.org/10.1021/es504038a>

ISOLATING, SCREENING AND SELECTING POLYETHYLENE ABLE OF DEGRADING MICROORGANISMS

*Dang Thi Ngoc Sang**, *Le Thi Cuc Dung*, *Nguyen Thuy Huong*

Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

**Corresponding author: Dang Thi Ngoc Sang – Email: sandang11@gmail.com*

Received: September 22, 2020; Revised: December 02, 2020; Accepted: December 28, 2020

ABSTRACT

*Polyethylene has been used increasingly over time, and its degradation is becoming a great challenge. Annually, approximately 500 billion to 1 trillion polyethylene carry-bags are being consumed worldwide. This study aimed at isolating, screening and selecting microorganisms that are able to degrade polythene. A total of 25 microorganism were isolated. *Bacillus drentensis*, *Bacillus subtilis* ATCC 5230 and *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 were ones of the isolates identified in this study. They have the potential to degrade PE. The extent of biodegradation on the polyethylene sheets was assessed by various techniques including weight loss analysis (48.8%), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), PE distance from environmental surfac, tensile and change of surface structure of PE (SEM), genus *Bacillus drentensis* were confirmed to be good candidates for PE biodegradation. Further research is also recommended to survey biodegradation of strains of microorganisms preservation in strain collection.*

Keywords: Biodegradation; FTIR; Polyethylene; SEM