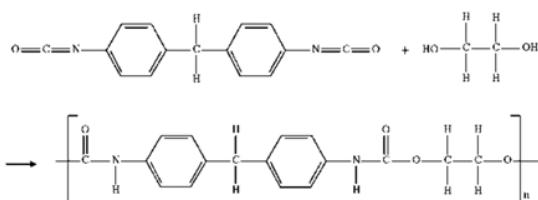


## NGHIÊN CỨU NẤM MEN PHÂN LẬP TỪ XỐP POLYESTE POLYURETHAN TRONG THÙNG NHIÊN LIỆU MÁY BAY SU-30 MK2 Ở SÂN BAY BIÊN HÒA

NGUYỄN THU HOÀI, ĐỖ TẤT THỊNH, LÊ NGỌC MINH,  
VŨ XUÂN NAM, PHẠM THỊ THU HUYỀN

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xốp Polyeste polyurethan (PPU) là sản phẩm tổng hợp từ phản ứng của di- hoặc poly-isocyanat với polyol, trong mạch polyme của chúng có những nhóm urethan ( $-\text{NH}-(\text{C=O})-\text{O}-$ ) (hình 1) [3].



Hình 1. Phản ứng tổng hợp PPU [2]

Trong các máy bay thế hệ 4 (Su-27, Su-30), xốp PPU được đặt trong thùng nhiên liệu ở thân và cánh máy bay, có tác dụng giữ cân bằng, ổn định nhiên liệu bay và do đó chống nổ, chống cháy. Theo hướng dẫn sử dụng của máy bay Su-27 và Su-30, sự phá hủy xốp PPU tạo thành các mảnh vụn và biến đổi màu của xốp PPU là hai yếu tố quyết định phải thay thế. Thực tế sử dụng trong điều kiện khí hậu ở Việt Nam cho thấy tuổi thọ của các tấm PPU trong thùng chứa nhiên liệu chỉ đạt một nửa thời gian so với mức quy định của nhà sản xuất.

Nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh khả năng của các loài vi sinh vật sử dụng PPU làm nguồn cacbon và năng lượng cho quá trình sinh trưởng nhờ một số enzym thủy phân như ureaza, proteaza và esteraza do vi sinh vật sinh ra cắt đứt các mối liên kết trong nhóm urethan [9]. Nhiều loài vi khuẩn cũng được nhiều tác giả phân lập và nghiên cứu khả năng phân hủy polyurethan là *Pseudomonas chlororaphas* [7] *Comamonas acidovorans* [8], *Bacillus subtilis* MZA-75 và *Pseudomonas aeruginosa* MZA-85 [10].

Trong bài báo này, nhóm tác giả trình bày những kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học của một số chủng nấm men phân lập được trên xốp PPU thu được từ máy bay Su-30 sử dụng tại sân bay Biên Hòa, đồng thời thử nghiệm gia tốc về ảnh hưởng của chúng lên chất lượng của xốp PPU.

### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu xốp PPU cũ thải loại được thu từ máy bay Su-30 (tháng 11/2016) và tấm xốp PPU mới do nhà máy A32/Quân chủng PKKQ cung cấp. Polyurethan sử dụng trong các thí nghiệm là Impranil DLN (Bayer, Đức).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Làm giàu và phân lập nấm men

Mẫu xốp PPU thải loại được cắt thành những miếng nhỏ với kích thước  $15 \times 15$  mm và đưa vào bình nón chứa môi trường khoáng dịch thể với thành phần như sau (trong 1 lít): 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>; 2,0 g MnCl<sub>2</sub>; 0,028 mg CuCl<sub>2</sub>; 0,022 mg ZnCl<sub>2</sub>; 0,04 mg CaCl<sub>2</sub>; 0,026 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,15 mg FeCl<sub>3</sub>; 0,02 g cao nấm men [5]. Bình được nuôi lắc ở tốc độ 250 rpm/phút trong 7 ngày ở điều kiện 28°C để làm giàu các vi sinh vật trong mẫu xốp PPU thải loại trên nguồn cơ chất polyurethan là Impranyl DLN (3g/l) [4].

Dịch nuôi sau lần cấy chuyển thứ 3 của vi sinh vật từ PPU thải loại trên môi trường khoáng với Impranyl là cơ chất duy nhất được cấy trang đều trên môi trường thạch Hansen (g/lít): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-3,0; MgSO<sub>4</sub>-3,0; glucose-50; pepton-10 và đặt nuôi ở 28°C. Sau 48 giờ, các khuẩn lạc nấm men có hình thái khác nhau được lựa chọn và tinh sạch trên môi trường Hansen thạch tới khi thu được chủng thuần khiết.

### 2.2.2. Xác định khả năng sinh enzym ngoại bào

#### 2.2.2.1. Xác định khả năng sinh ureaza

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường Christensen (pepton 1 g; NaCl 5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g; glucoza 5 g; thạch 20 g; nước cất 1 lít) có bổ sung thêm 6 ml dung dịch phenol đỏ 0,2%. Môi trường được khử trùng ở điều kiện 0,5 atm (115°C trong 15 phút), sau đó làm nguội tới ~50°C thì bổ sung 100 ml dung dịch ure 20% (đã được khử trùng qua màng lọc 0,22 µm). Hút 5 ml vào mỗi ống nghiệm vô trùng và đặt ống thạch nghiêng.

Các chủng nấm men được cấy vào ống thạch nghiêng và đặt ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 7 ngày. Chủng nấm men có khả năng sinh enzym ureaza sẽ thủy phân ure và làm môi trường chuyển từ vàng sang màu hồng quan sát được bằng mắt thường.

#### 2.2.2.2. Xác định khả năng sinh polyurethanaza

Các chủng nấm men được nuôi lắc trên môi trường khoáng dịch thể có bổ sung Impranol 3,0 g/lít, ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày, tốc độ lắc 250 vòng/phút. Hút 100 µl dịch nuôi nhỏ vào các lỗ đã đục sẵn trên đĩa môi trường khoáng thạch chứa Impranol làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Đặt đĩa thạch ở nhiệt độ 30°C trong thời gian từ 18–20 giờ. Nhuộm đĩa thạch bằng dung dịch Coomassie blue R-250 0,1% (w/v), chủng có hoạt tính thủy phân PPU tốt sẽ làm mất màu Coomassie blue tạo màu trắng sáng [6]. Đối chứng là mẫu môi trường khoáng vô trùng.

### 2.2.3. Đánh giá tác động của nấm men đối với tính bền của tấm xốp PPU

Chuẩn bị các miếng xốp PPU với kích thước  $15 \times 3 \times 3$  (cm) đặt trong lọ thủy tinh chứa 300 ml môi trường khoáng dịch thể, khử trùng tại áp suất 1 atm ở 121°C trong 20 phút. Tế bào nấm men được thu từ các khuẩn lạc trên môi trường thạch Hansen và tạo thành dịch tế bào nấm men với môi trường khoáng dịch thể (mật độ  $10^6$  tế bào/ml dịch khoáng). Bổ sung 10 ml dịch tế bào nấm men vào bình thí nghiệm, mẫu đối chứng không bổ sung vi sinh vật.

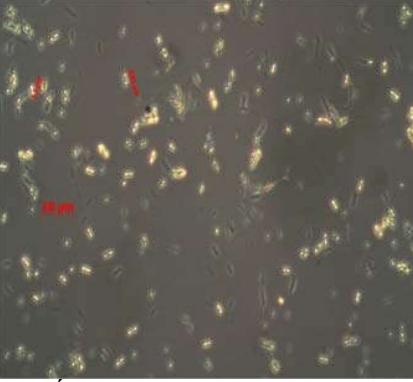
Các bình thí nghiệm và đối chứng được nuôi lắc ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C và theo dõi một số chỉ tiêu kỹ thuật về màu sắc, lực kéo đứt, độ giãn dài khi đứt tại các thời điểm 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày (so sánh với mẫu đối chứng).

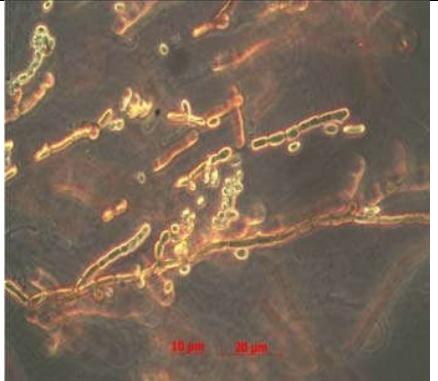
### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

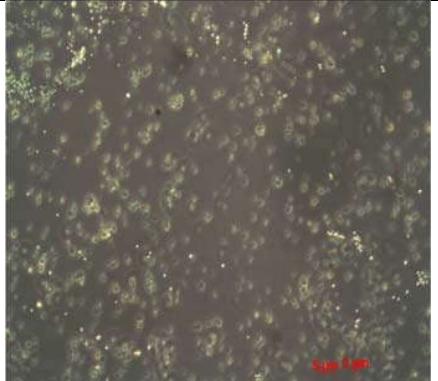
#### 3.1. Làm giàu và phân lập nấm men từ mẫu xốp PPU thải loại

Vật liệu xốp PPU được thay ra sau 6 năm sử dụng trong thùng nhiên liệu của máy bay Su-30 được sử dụng như nguồn vi sinh vật ban đầu để làm giàu các loài nấm men có khả năng phân hủy vật liệu này. Quá trình làm giàu được tiến hành trong môi trường khoáng dịch thể chứa Impranol làm nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Khả năng sinh trưởng của vi sinh vật sau 7 ngày được đánh giá dựa trên hoạt độ enzym ngoại bào (esteraza) so với ban đầu. Mẫu làm giàu qua lần cây chuyển thứ 3 được sử dụng để phân lập, kết quả thu được 6 chủng nấm men trên môi trường Hansen với đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào khác nhau (bảng 1).

**Bảng 1.** Các chủng nấm men phân lập từ mẫu xốp PPU thải loại từ máy bay Su-30

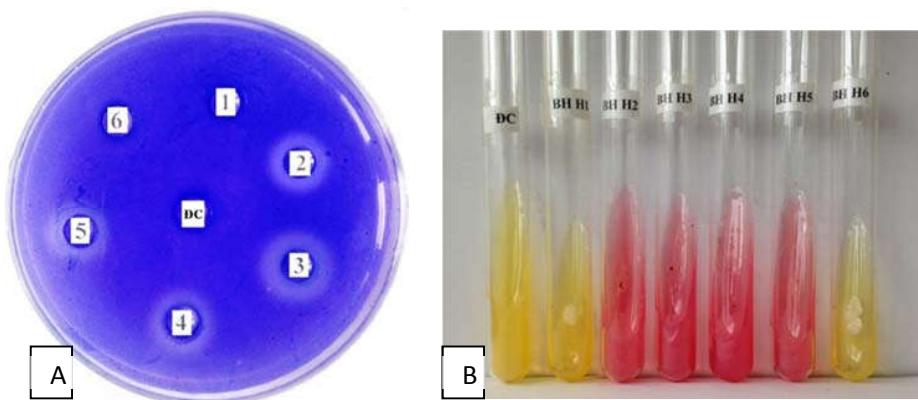
Ký hiệu	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
BHH1	 Bề mặt khuẩn lạc khô, màu trắng đục. Kích thước khuẩn lạc, Ø 5÷7 mm	 Tế bào hình que, kích thước 4÷5µm
BHH2	 Khuẩn lạc nhỏ, bề mặt trắng bóng, viền rẽ xung quanh. Già chuyển màu đen. Kích thước Ø 3÷5mm	 Tế bào hình elip, nối nhau thành chuỗi, kích thước 5÷7µm

BHH3		
	<p>Bè mặt nhẵn bóng, viền rẽ xung quanh. Già chuyển màu đen. Kích thước thay đổi theo thời gian, Ø 3÷5mm</p>	<p>Tế bào hình trứng, nảy chồi, kích thước 5÷7µm</p>
BHH4		
	<p>Bè mặt khuẩn lạc màu vàng nghệ bóng, viền rẽ xung quanh, kích thước Ø 5÷7mm</p>	<p>Tế bào hình trứng, kích thước 3÷4µm</p>
BHH5		
	<p>Bè mặt khuẩn lạc tròn bóng và ướt, viền rẽ viền rẽ xung quanh, kích thước Ø 3÷5mm</p>	<p>Tế bào hình trứng tạo thành chuỗi, kích thước 5÷7µm</p>

BHH6		
	Khuẩn lạc to tròn, màu trắng sữa, mặt nhẵn bóng, kích thước Ø 3÷5mm	Tế bào hình tròn, kích thước 3µm

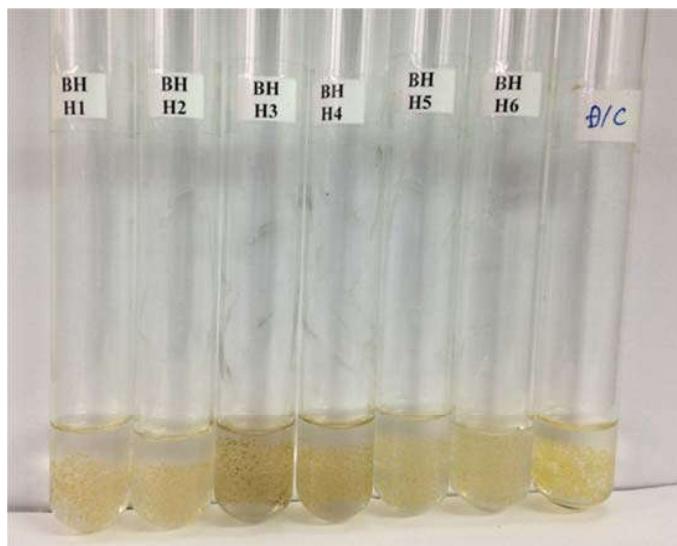
Các chủng nấm men đã phân lập và tinh sạch được nghiên cứu về khả năng gây tác động phá hủy vật liệu xốp PPU. Thí nghiệm được tiến hành với vật liệu xốp PPU chưa qua sử dụng, đưa vào môi trường khoáng dịch thể như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Khả năng sản sinh ra các enzym ngoại bào tác động lên vật liệu như ureaza và polyurethanaza của 6 chủng nấm men đã phân lập được đánh giá một cách định tính trên môi trường thạch chứa cơ chất tương ứng là ure và polyurethan (hình 2).

Kết quả thí nghiệm cho thấy trong số 6 chủng phân lập được thì 4 chủng BHH2, BHH3, BHH4, BHH5 có khả năng sản sinh cả 2 enzym polyurethanaza (hình 2A) và ureaza (hình 2B). Dựa trên kích thước vòng phân hủy màu sáng trắng trên môi trường thạch chứa PU khi nhuộm bằng dung dịch Coomassie blue 0,1%, mức độ sinh enzym của 4 chủng được xếp theo thứ tự giảm dần BHH3 > BHH4 > BHH2 > BHH5. Hai chủng BHH1 và BHH6 đều không sinh enzym ureaza cũng như polyurethanaza.



**Hình 2.** Đánh giá sơ bộ hoạt tính các enzym polyurethanaza (A) và ureaza (B) của 6 chủng nấm men phân lập từ mẫu PPU thải của máy bay SU 30 ở sân bay Biên Hòa. (ký hiệu xếp thứ tự từ 1 đến 6 tương ứng với tên chủng BHH1 - BHH6).

Bên cạnh đó, tác động của các chủng nấm men phân lập lên vật liệu PPU được đánh giá qua thí nghiệm nuôi các chủng này trong môi trường khoáng chứa các mảnh PPU chưa qua sử dụng như nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Các ống thí nghiệm được nuôi ở nhiệt độ 30°C ở tốc độ lắc 150 vòng/phút trong thời gian 7 ngày (hình 3).

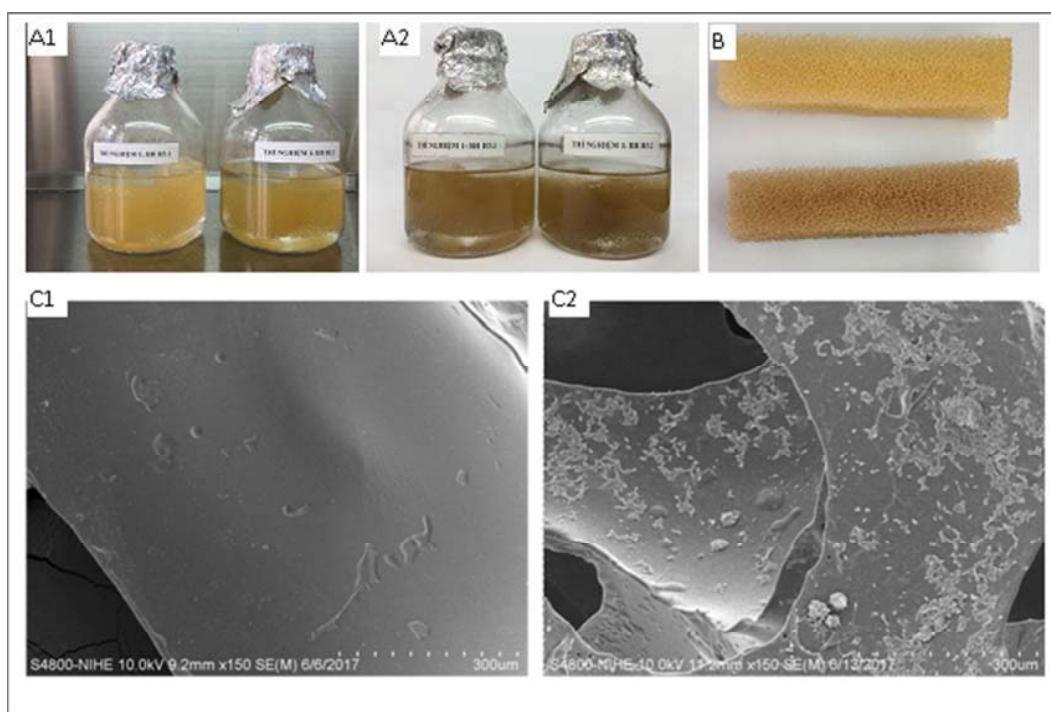


**Hình 3.** Đánh giá định tính tác động của 6 chủng nấm men trên vật liệu PPU

Kết quả cho thấy hai chủng BHH3 và BHH4 đã làm chuyển màu của xốp PPU một cách rõ rệt so với các chủng còn lại và đối chứng (hình 3). Đặc biệt chủng BHH3 đã biến đổi màu miếng xốp PPU từ vàng nhạt sang nâu đậm, có thể dễ dàng quan sát thấy bằng mắt thường. Sự biến đổi màu này có thể do (i) sinh khói vi sinh vật phát triển trên bề mặt vật liệu và (ii) tác động phân hủy vật liệu do các enzym ngoại bào từ vi sinh vật. Điều này được làm rõ bằng thí nghiệm về phân hủy PPU xốp do chủng nấm sợi *Cladosporium pseudocladosporioides*, các sợi nấm bám vào tấm xốp làm chuyển màu đen của tấm xốp, sau thời gian thử nghiệm 21 ngày, chủng nấm này đã làm thay đổi hình dạng, kích cỡ và trọng lượng so với các mẫu đối chứng không có chủng nấm sợi này [2].

### 3. Đánh giá tác động của chủng nấm men BHH3 tới vật liệu PPU qua thí nghiệm gia tốc trong điều kiện phòng thí nghiệm

Biến đổi về màu sắc của vật liệu xốp PPU sử dụng làm lớp đệm trong thùng nhiên liệu trên cánh máy bay thế hệ 4 là một trong những dấu hiệu làm căn cứ để quyết định thay thế lớp đệm này. Để nghiên cứu chi tiết tác động phá hủy của chủng BHH3 tới vật liệu xốp PPU, nhóm tác giả đã tiến hành đánh giá một số thông số kỹ thuật chủ yếu của vật liệu (như độ bền kéo đứt, cấu trúc bề mặt) trong môi trường có mặt chủng vi sinh vật này. Thí nghiệm được theo dõi trong thời gian 28 ngày theo tiêu chuẩn thử nghiệm [1].



**Hình 3.** Thí nghiệm gia tốc đánh giá tác động phá hủy của chủng nấm men BHH3 đối với vật liệu xốp PPU

A1 - Mẫu ban đầu; A2 - Mẫu thử nghiệm sau 28 ngày; B- hình ảnh vật liệu trước và sau khi xử lý với chủng BHH3; C1 - Hình ảnh SEM của bề mặt vật liệu trước thí nghiệm; C2 - hình ảnh SEM của bề mặt vật liệu sau 28 ngày tiếp xúc với chủng BHH3

Các chỉ tiêu kỹ thuật về lực kéo đứt và độ giãn dài khi đứt được phân tích tại Viện Nghiên cứu Ứng dụng quân nhu/Tổng cục Hậu cần cho thấy tác động phá hủy rõ rệt của chủng nấm men BHH3 đối với vật liệu xốp PPU (bảng 2).

**Bảng 2.** Đánh giá chỉ tiêu kỹ thuật của vật liệu xốp PPU dưới tác động phá hủy của chủng nấm men BHH3

Chỉ tiêu kỹ thuật	Phương pháp phân tích	Mẫu đối chứng	Mẫu thí nghiệm có nấm men BHH3
Lực kéo đứt, N/m <sup>2</sup>	ASTM D3574-03	12,6	11,8
Độ giãn dài khi đứt, %	ASTM D3574-03	335	249

Tính bền của vật liệu được đánh giá dựa trên hai chỉ tiêu độ bền kéo đứt (lực kéo đứt) và chỉ số độ giãn dài khi đứt. Kết quả thu được tại bảng 2 cho thấy sau thời gian tiếp xúc với chủng BHH3, vật liệu xốp PPU chịu lực kéo đứt thấp hơn ( $11,8 \text{ N/m}^2$ ) so với mẫu đối chứng ( $12,6 \text{ N/m}^2$ ). Bên cạnh đó, độ giãn dài khi đứt của vật liệu bị giảm đáng kể, chỉ đạt mức 249% so với 335% ở mẫu đối chứng (tương ứng với mức giảm 25,6%).

Như vậy, qua thí nghiệm gia tốc đánh giá tính bền của vật liệu xốp PPU dưới tác động của chủng nấm men BHH3 có thể kết luận rằng chủng vi sinh vật này có khả năng làm thay đổi màu sắc của vật liệu, đồng thời làm giảm độ bền kéo đứt tới mức 25% so với điều kiện không có tác động của vi sinh vật. Đây là một minh chứng lý giải cho tình trạng thời gian sử dụng vật liệu PPU bị rút ngắn ở điều kiện khí hậu Việt Nam khi trong môi trường làm việc có mặt các loại vi sinh vật tương tự như BHH3.

#### 4. KẾT LUẬN

- Chủng nấm men BHH3 được phân lập từ vật liệu xốp PPU thải loại từ thùng nhiên liệu của máy bay Su-30 tại sân bay Biên Hòa qua bước làm giàu và phân lập trên môi trường đặc hiệu. Chủng này có khả năng sinh các enzym ngoại bào ureaza và polyurethanaza ở mức cao, do vậy gây tác động phá hủy cao đối với vật liệu xốp PPU.

- Chủng BHH3 làm thay đổi màu sắc của xốp PPU từ vàng nhạt sang nâu chỉ sau 7 ngày trong điều kiện thử nghiệm gia tốc. Các chỉ số độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của mẫu thử nghiệm sau 28 ngày thử nghiệm có giá trị tương ứng  $11,8 \text{ N/m}^2$  và 249% thấp hơn so với mẫu đối chứng tương ứng là  $12,6 \text{ N/m}^2$  và 335%, thể hiện mức phá hủy cao của chủng BHH3 trên vật liệu xốp PPU trong điều kiện sử dụng trong thùng nhiên liệu của máy bay Su 30 ở sân bay Biên Hòa.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ASTM G21-96, *Standard practice for determining resistance of synthetic polymeric materials to fungi*.
2. Barraged J.A., Malfavon L.D., Suarez M.V., Hernandez R.G., Osorio G.A., Tavera H.L., *Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyester polyurethane foams*, Applied Environmental Microbiology, 2016, **82**(17):5225-5235.
3. Bayer O., *Polyurethanes*. Mod Plast, 1947, 24:149-152.
4. Biffinger J.C., Barlow D.E., Cockrell A.L., Cusick K.D., *The applicability of Impranil DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes*, Polymer Degradation and Stability, 2015, **120**:178-185.
5. Crabbe J.R., Campbell J.R., Thompson L., Wivatalz S., Schultz W.W., *Biodegradation of oil-based polyurethane by soil fungi*, International Biodeterioration & Biodegradation, 1994, **33**:103-113.
6. Howard G.T., Hilliard N.P., *Use of Coomassie blue polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria*, International Biodeterioration and Biodegradation, 1999, **43**:23-30.
7. Howard G.T., Ruiz C., Hilliard N.P., *Growth of Pseudomonas chlororaphis on a polyester polyurethane and the purification and characterization of a polyurethane esterase enzyme*, International Biodeterioration & Biodegradation, 1999, **43**:7-12

8. Kambe T.N., Onuma F., Akutsu Y., Nakahara T., *Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of Comamonas acidovorans Strain TB-35*, J. Fermentation Bioengineering, 1997, **83**(5):456-460.
9. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S., *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*, Biotechnology Advances, 2008, **26**:246-265.
10. Shah Z., Gulzar M., Hasan F., Shah A.A., *Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of Pseudomonas and Bacillus species isolated from soil*, Polymer Degradation and Stability, 2016, **134**:349-356.

## SUMMARY

### STUDY ON YEASTS ISOLATED FROM POLYESTER POLYURETHANE FOAM USED IN SU-30 MK2 AIRCRAFT'S FUEL TANK AT BIEN HOA AIRPORT

In the present study, six strains of yeast were isolated from the broken PPU foam, which has been used in Su-30 MK2 aircraft for 6 years at Bien Hoa airport. Strain BHH3 was determined as a yeast candidate capable of producing polyurethanase and urease to break down PPU. In liquid mineral medium supplemented with PPU as the only carbon and energy sources, the strain BHH3 grew and attached to the PPU foam surface, and changed its colour from light yellow to brown just after 7 days at 30°C. After 28 days testing, the tensile strength and elongation at break in the PPU foam was reduced significantly, reaching 11.8 N/m<sup>2</sup> and 249%, in comparison with that of the control of 12.6 N/m<sup>2</sup> and 335%, respectively.

*Keywords:* Biodegradation, polyester polyurethane, yeast, foam, polyurethanase, esterase.

Nhận bài ngày 06 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 9 tháng 10 năm 2017

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga