

## KHẢ NĂNG PHÂN HỦY POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) CỦA CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS GELATINI* PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

TRINH THỊ VÂN ANH, NGÔ THỊ KIM TOÁN, NGUYỄN QUANG HUY

*Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội*

Các vật liệu và sản phẩm có nguồn gốc từ nhựa tổng hợp polypropylen (PP), polyetylen (PE), polyvinylclorua (PVC)... khó bị phân hủy và tồn tại rất lâu trong đất, gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Một trong những giải pháp khắc phục là nghiên cứu và tìm ra các nguồn vật liệu mới nhựa sinh học để thay thế các loại nhựa tổng hợp. Nhựa sinh học có nhiều đặc tính tương tự như nhựa tổng hợp nhưng lại có khả năng bị phân hủy bởi vi sinh vật. Nhựa sinh học là dạng polymer tổng hợp từ các polyester như poly (L-lactic) (PLA), poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB), poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)... Các polyester này tuy khác nhau về tính chất vật lý, hoá học nhưng chúng đều có thể chuyển hóa thành các monomer và oligomer và cuối cùng phân hủy thành các thành phần cơ bản như cacbon, CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O do đó không gây ô nhiễm môi trường [11]. Trong số các polyester PHB đang được quan tâm đặc biệt do chúng không những mang các đặc tính tương tự nhựa tổng hợp mà còn có độ dẻo và tính chịu nhiệt cao. Đặc biệt, PHB có thể được phân hủy trong điều kiện tự nhiên nhờ các chủng vi sinh vật sử dụng PHB như là nguồn cacbon và năng lượng cho các hoạt động sống của chúng [1, 10].

Vi sinh vật phân hủy PHB trong tự nhiên tồn tại trong đất, nước biển, bùn hoạt tính... Chowdhury lần đầu tiên công bố các vi sinh vật có khả năng phân hủy PHB thuộc nhóm *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Streptomyces*. Đến nay nhiều chủng vi sinh vật hiếu khí cũng như kỵ khí có khả năng sử dụng PHB đã được phân lập và định danh [1, 3, 9, 11]. Trong đất các loài *Pseudomonas lemoigne*, *Comamonas* sp, *Acidovorax feacalis*, *Aspergillus fumigatus* và *Variovorax paradoxus*; trong bùn hoạt tính và trong điều kiện kỵ khí là các loài *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas*, *Illyobacter delafieldi* và trong nước ngọt là các loài *Comamonas*

*testosterone*, *Pseudomonas stutzeri* đã được phân lập. Năm 1993, Nishida và Tokiwa đã nghiên cứu sự phân bố của các vi sinh vật có khả năng phân PHB và PCL trong các môi trường khác nhau và cho thấy số lượng các vi sinh vật có khả năng phân hủy PHB chiếm từ 0,5 - 9,6%, phân hủy PCL chiếm 0,8 - 11% tổng số vi sinh vật trong các mẫu nghiên cứu. Trong nghiên cứu của Nishida và tập thể đã phân lập được 77 chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy polymer sinh học bao gồm 68 chủng vi khuẩn, trong đó có 41 chủng thuộc chi *Bacillus* [3]. Hầu hết vi sinh vật phân hủy PHB đều thuộc nhóm vi khuẩn ưa ấm, không có nhiều chủng vi sinh vật phân hủy PHB ở nhiệt độ cao được phân lập. Chủng nấm ưa nhiệt *Aspergillus* sp. là một trong số ít những chủng vi sinh vật phân lập được có khả năng phân hủy PHB mạnh, sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C chủng *Aspergillus* sp. đã phân hủy tới 90% khối lượng PHB bổ sung vào môi trường [7].

Tình hình ô nhiễm rác thải trong đó có ô nhiễm rác thải từ các sản phẩm nhựa, túi ni lông ở Việt Nam... là rất lớn. Hiện nay trong nước đã có một số kết quả nghiên cứu bước đầu về việc phân lập và đánh giá khả năng phân hủy polymer có nguồn gốc sinh học. Nguyễn Quang Huy và tập thể đã phân lập một số chủng xạ khuẩn, nấm có khả năng phân hủy PLA, PHB [5]. Tuy nhiên, chưa có nhiều công trình nghiên cứu về sự phân bố cũng như đặc điểm sinh học của các loài vi sinh vật có khả năng phân hủy PHB nhất là trong điều kiện nhiệt độ cao. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu phân lập các chủng vi khuẩn ở Việt Nam có khả năng phân hủy PHB ở nhiệt độ cao, làm cơ sở cho việc sản xuất và ứng dụng các chế phẩm nhựa mới, góp phần kiểm soát quá trình phân hủy polymer sinh học và giảm ô nhiễm môi trường.

## I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Nguyên liệu

Các mẫu đất được thu thập từ khu vực nhà máy xử lý rác thải thuộc địa phận xã Tây Mỗ, Từ Liêm, Hà Nội tháng 9/2009.

Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) được mua từ hãng Sigma (Mỹ) và Takara (Nhật Bản). Poly L-lactic (PLA) được cung cấp từ Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ môi trường và Phát triển bền vững, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội. Các hóa chất khác đạt độ tinh khiết trong nghiên cứu phân tích.

### 2. Phương pháp

Môi trường khoáng với thành phần chính gồm  $MgSO_4$ : 0,1g; NaCl: 0,1g;  $KH_2PO_4$ : 0,2g;  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ : 0,15g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ : 0,02g;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,01g; cao nấm men: 0,1g; nước cất 1 lít. PHB và các polymer sinh học được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nồng độ 0,2% (w/v).

Đánh giá sự phát triển của vi sinh vật trong các điều kiện khác nhau về nhiệt độ, pH và nồng độ muối NaCl dựa trên việc đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 600 nm của môi trường nuôi cấy. Hoạt tính enzym ngoại bào được thực hiện theo Nguyễn Quang Vinh và tập thể [4].

Đánh giá khả năng phân huỷ PHB và các polymer sinh học được tiến hành thông qua việc đo hàm lượng cacbon tổng số (TOC) có trong dung dịch nghiên cứu [2].

Trình tự 16S rARN của chủng vi khuẩn được đọc trực tiếp trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant (Hoa Kỳ). Kết quả trình tự được so sánh với trình tự 16S rARN các loài đã có trong ngân hàng gen quốc tế để xác định đến tên loài.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Phân lập và nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hoá của chủng vi khuẩn B2

Để phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ PHB, việc lựa chọn môi trường khoáng có bổ sung PHB là nguồn các bon duy nhất đã được tiến hành. Từ các mẫu đất, nước tại

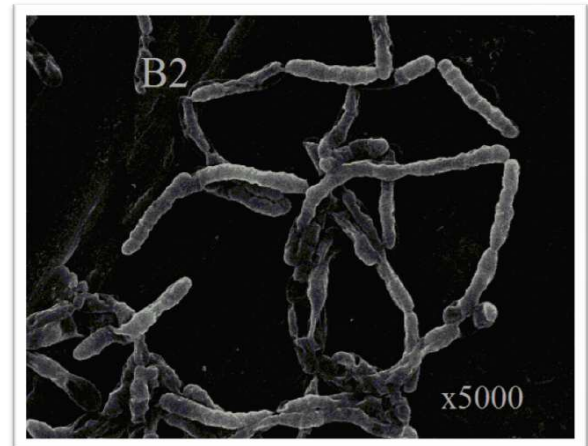
khu vực xử lý rác thải xã Tây Mỗ, Từ Liêm, Hà Nội chúng tôi đã phân lập được 11 chủng vi khuẩn khác nhau có khả năng phát triển và tạo vòng phân huỷ PHB trên môi trường khoáng ở nhiệt độ 50°C (bảng 1).

Bảng 1

### Khả năng phát triển một số chủng vi khuẩn trong môi trường có bổ sung PHB 0,2% (w/v)

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng phát triển	Số lượng tế bào (CFU/ml)
1	B1	++	$3,04 \times 10^8$
2	B2	+++	$2 \times 10^9$
3	B3	++	$5,6 \times 10^7$
4	B4	+	$2,3 \times 10^6$
5	B5	++	$3,4 \times 10^7$
6	B6	++	$3,24 \times 10^8$
7	B7	+	$2 \times 10^5$
8	B8	++	$3,7 \times 10^7$
9	B9	+	$1,5 \times 10^6$
10	B10	++	$4,5 \times 10^8$
11	B11	++	$4,5 \times 10^7$

Ghi chú: (+). phát triển yếu; (++) . Phát triển trung bình; (+++). Phát triển mạnh.



Hình 1. Chủng B2 dưới kính hiển vi điện tử

Để đánh giá mức độ phát triển, các chủng vi khuẩn đã phân lập ở trên được chia thành các nhóm khác nhau: nhóm phát triển mạnh có số lượng khuẩn lạc trên  $10^9$  CFU/ml, nhóm phát triển trung bình có số lượng khuẩn lạc từ  $10^7$  đến  $10^8$  CFU/ml và nhóm phát triển yếu có số lượng khuẩn lạc dưới  $10^7$  CFU/ml. Trong số 11

chủng vi khuẩn được phân lập có 1 chủng ký hiệu B2 thuộc nhóm phát triển mạnh, 7 chủng thuộc nhóm phát triển trung bình ký hiệu B1, B3, B5, B6, B8, B10, B11 và 3 chủng vi khuẩn ký hiệu B4, B7, B9 thuộc nhóm phát triển yếu (bảng 1). Kết quả này cho thấy, chủng B2 có khả năng sử dụng PHB tốt hơn so với 10 chủng còn lại. Do vậy, chúng tôi chọn chủng B2 trong các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng B2 cho thấy về mặt hình thái chủng B2 có dạng hình que, dạng chuỗi, bào tử không phình, Gram (+) (hình 1). Chủng B2 không phát triển ở nhiệt độ dưới 25°C và trên 65°C. Chủng B2 phát triển

tốt trong khoảng nhiệt độ từ 37 đến 60°C, đặc biệt chủng B2 phát triển mạnh nhất ở nhiệt độ 50°C, do vậy chủng B2 có thể thuộc nhóm vi khuẩn ưa nhiệt. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường như độ pH và nồng độ muối NaCl đối với sự phát triển chủng B2 cho thấy chủng B2 phát triển tốt trong môi trường có pH trung tính 6-7, chúng không phát triển trong môi trường axit pH dưới 4 và môi trường kiềm pH trên 8 (bảng 2). Chủng vi khuẩn B2 có thể phát triển trong điều kiện nồng độ muối NaCl khá cao trên 3%, tuy nhiên chúng phát triển tốt nhất ở nồng độ muối NaCl trong khoảng 0,5 đến 2% (bảng 2).

Bảng 2

Các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến sự phát triển của chủng vi khuẩn B2

		Yếu tố môi trường			
Nhiệt độ (°C)	Khả năng phát triển (OD <sub>600nm</sub> )	%NaCl	Khả năng phát triển (OD <sub>600nm</sub> )	pH	Khả năng phát triển (OD <sub>600nm</sub> )
4	0,024 ± 0,005	0	0,202 ± 0,056	4	0,011 ± 0,002
25	0,213 ± 0,079	0,5	0,4 ± 0,078	5	0,227 ± 0,061
37	0,849 ± 0,102	1	0,488 ± 0,133	6	0,282 ± 0,077
50	0,906 ± 0,028	2	0,413 ± 0,098	7	0,3 ± 0,065
60	0,155 ± 0,017	3	0,279 ± 0,059	8	0,174 ± 0,029
65	0,029 ± 0,001	5	0,22 ± 0,025	9	0,15 ± 0,016

Bảng 3

Một số đặc điểm sinh học của chủng B2

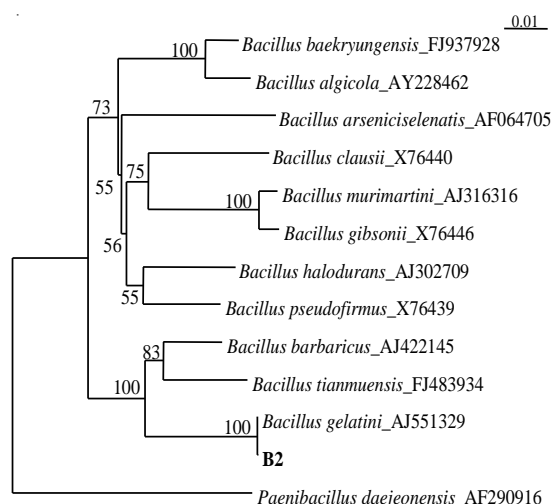
Đặc điểm nghiên cứu	Chủng B2	Đặc điểm nghiên cứu	Chủng B2
Nhiệt độ tối ưu	50 °C	Mannosamine	+
pH tối ưu	7	Lactose	+
Nồng độ NaCl tối ưu	1 %	L-Rhamose	+
<i>Khả năng sử dụng một số loại đường</i>		D-Glucose	+
D(+)-Galactose	+	Schacarose	+
D(+)-Glucosamin	-	<i>Hoạt tính một số enzym</i>	
L(-)-Fucose	+	Catalase	+
D(+)-Mannose	+	Cellulase	+
N-acetyl-D-Glucosamin	+	Protease	+
Fructose	+	Amylase	-
L(+)-Arabinose	+		

Để phân loại, nhận dạng vi sinh vật có khả năng chuyển hoá các loại đường cũng là một tiêu chí đánh giá. Chủng B2 có khả năng sử dụng được nhiều loại đường khác nhau. Trong số 12 loại đường thí nghiệm chủng B2 chỉ không sử dụng được D(+)-Glucosamin trong quá trình phát triển của chúng (bảng 3).

Hoạt tính của một số enzym ngoại bào như amylase, catalase, protease và cellulase của chủng B2 đã được tiến hành nghiên cứu. Các kết quả nghiên cứu cho thấy chủng B2 không có khả năng tổng hợp amylase, nhưng có hoạt tính của enzym protease, cellulase và catalase (bảng 3). Điều này cho thấy chủng B2 có thể có hoạt

tính enzym phân giải PHB (PHB depolymerase) thuộc nhóm protease. Dựa trên các phân tích đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá chủng B2 có thể thuộc chi *Bacillus*.

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng vi khuẩn B2 có trình tự tương đồng với 100% (1500/1500 nucleotit) so đoạn trình tự gen 16S rARN của chủng *Bacillus gelatini* ký hiệu AJ551329 trong ngân hàng gen (hình 2). Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hoá chủng B2 có tên là *Bacillus gelatini*. Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về việc phân lập chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* ưa nhiệt có khả năng phân huỷ PHB.



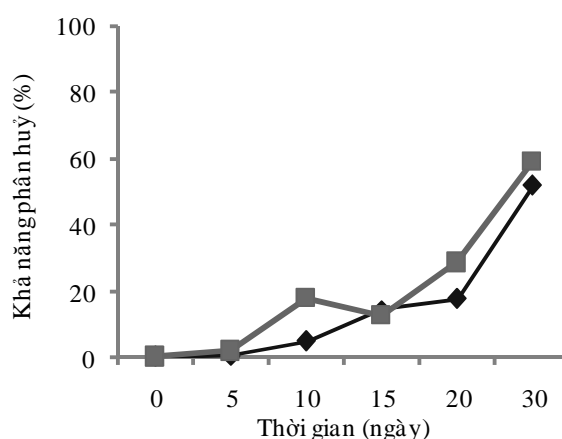
**Hình 2.** Cây phân loại phát sinh loài chủng B2

## 2. Khả năng phân huỷ một số polymer sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus gelatini*

Để đánh giá khả năng phân huỷ PHB của *B. gelatini*, chủng vi khuẩn này đã được tiến hành nuôi cấy lác trong môi trường khoáng có bổ sung PHB là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất trong thời gian 30 ngày ở các điều kiện tối ưu về độ pH, nhiệt độ và nồng độ muối NaCl. Lượng PHB do *B. gelatini* sử dụng được xác định bằng việc đo sự giảm hàm lượng cacbon tổng số (TOC) trong môi trường nuôi cấy tại các thời điểm khác nhau [2].

Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị TOC trong các mẫu có bổ sung chủng B2 đều giảm so với mẫu đối chứng chứng tỏ chủng *B. gelatini* có khả năng sử dụng PHB để sinh trưởng và phát triển (hình 3). Khả năng phân huỷ PHB của *B. gelatini* tăng dần theo thời gian. Tuy nhiên khả

năng phân huỷ tăng mạnh sau 10 ngày nuôi cấy. Với hai nồng độ PHB khác nhau được bổ sung vào môi trường nuôi cấy là 1 và 2 g/l khả năng phân huỷ *B. gelatini* là tương đương nhau. Sau 30 ngày khả năng phân huỷ PHB của *B. gelatini* so với mẫu đối chứng lần lượt là 59,09% và 51,84% tương ứng với nồng độ 1 và 2 g/l. Hiện nay chưa có nhiều công trình phân lập và đánh giá khả năng phân huỷ PHB của các chủng vi khuẩn ưa nhiệt. Các nghiên cứu gần đây mới chỉ công bố kết quả phân lập chủng nấm sợi *Aspergillus* sp. [7] và một số nhóm xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* [11] có khả năng phân huỷ PHB ở nhiệt độ cao.



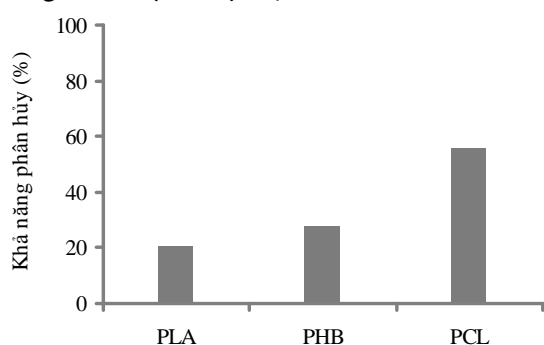
**Hình 3.** Khả năng phân huỷ PHB của *Bacillus gelatini*

*Ghi chú:* Khối lượng PHB bổ sung vào môi trường: ■ 1 g/l; ◆ 2 g/l.

Theo Teeraphatpornchai và tập thể [9] hầu hết các chủng vi sinh vật phân huỷ PHB phân lập được cũng có khả năng phân huỷ đối với PCL hay một số polyester khác. PLA và PCL là các polyester có các đặc trưng tương tự như những loại nhựa polypropyler tổng hợp, nhưng có thể phân huỷ hoàn toàn dưới tác động của vi sinh vật thành CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>O không gây ô nhiễm môi trường. PLA, PCL cùng với PHB là những polyester được sử dụng nhiều nhất trong sản xuất nhựa sinh học [5]. Nghiên cứu khả năng phân huỷ của *B. gelatini* đối với một số polymer sinh học khác cũng đã được tiến hành.

Chủng *B. gelatini* được nuôi lác trong môi trường khoáng chứa 0,05% PLA, PHB hoặc PCL là nguồn cacbon duy nhất nhằm đánh giá khả năng phân huỷ đối với các polyester này. Nhiệt độ nuôi cấy là 50°C. Kết quả cho thấy giá trị

TOC trong các mẫu có *B. gelatini* đều giảm so với thời điểm ban đầu chứng tỏ *B. gelatini* đã sử dụng PLA và PCL làm nguồn cacbon cho sự phát triển. *B. gelatini* có khả năng phân huỷ PCL cao nhất và phân huỷ PLA là thấp nhất. Sau 20 ngày khả năng phân huỷ PLA, PHB và PCL của *B. gelatini* lần lượt là 20,30; 27,80 và 56,02% lượng polymer được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (hình 4). Khả năng phân huỷ PLA của *B. gelatini* so với một số chủng nấm [5] và xạ khuẩn đã phân lập trước đây ở Việt Nam là chưa cao nhưng chúng lại có khả năng phân huỷ trong điều kiện nhiệt độ cao trên 50°C.



**Hình 4.** Khả năng phân huỷ một số polymer sinh học của chủng *Bacillus gelatini*

Theo các nghiên cứu trước đây của Song và tập thể [8] số lượng các chủng vi sinh vật trong tự nhiên vừa có khả năng phân huỷ PLA vừa có khả năng phân huỷ PHB, PCL là không nhiều. Tuy nhiên các chủng có khả năng phân huỷ PLA thường có khả năng sử dụng PHB và PCL nhưng ngược lại không phải chủng vi khuẩn nào phân huỷ PHB đều sử dụng được PLA đặc biệt trong điều kiện nhiệt độ cao. Kết quả nuôi cấy chủng *B. gelatini* với nguồn cơ chất là các polymer sinh học khác nhau cho thấy *B. gelatini* này có khả năng phân huỷ được nhiều loại polymer sinh học khác nhau ở nhiệt độ cao.

### III. KẾT LUẬN

Đã phân lập và nghiên cứu một số đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hoá chủng vi khuẩn B2 thuộc chi *Bacillus* có khả năng phân huỷ poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB) ở nhiệt độ cao. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rARN cho thấy chủng B2 có độ tương đồng 100% so với trình tự đoạn gen 16S rARN của loài *Bacillus gelatini*.

Chủng *Bacillus gelatini* phân huỷ được 59,09% khối lượng PHB bổ sung vào môi trường sau 30 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C. Chủng *Bacillus gelatini* sau 20 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C đã phân huỷ được 20,30% và 56,02% khối lượng PLA và PCL bổ sung vào môi trường.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Calabia B. P., Tokiwa Y., 2004: *Biotechnol. Lett.*, 26: 15-19.
2. Lê Đức, 2004: Một số phương pháp phân tích môi trường: 199-200. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. Nishida H. and Tokiwa Y., 1993: *J. Environ. Polym. Degrad.*, 1: 227-233.
4. Nguyễn Quang Vinh, Phan Tuấn Nghĩa, Bùi Phương Thuận, 2004: Thực hành Hoá sinh học, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
5. Nguyễn Quang Huy, Phạm Ngọc Vinh, Phạm Thị Trà Như, Lê Văn Chiêu, 2009: Một số đặc điểm sinh học của *Penicillium citrinum* Thom có khả năng phân huỷ PLA phân lập tại Việt Nam: 638-643. Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Công nghệ Sinh học, Thái Nguyên.
6. Paramuda H., Tokiwa Y. and Tanaka H., 1997: *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1637-1640.
7. Sanchez J. G., Tsuchii A., Tokiwa Y., 2000: *Biotechnol. Lett.*, 22: 849-853.
8. Song C. J., Wang S. F., Ono S., Zhang B. H., Shimasaki C. and Inoue M., 2003: *Polymer. Adv. Tech.*, 14: 184-188.
9. Teeraphatpornchai T., Nakajima K. T., Shigeno A. Y., Nakayama M., Nomura N., Nakahara T., Uchiyama H., 2003: *Biotechnol. Lett.*, 25: 23-28.
10. Tokiwa Y., Iwamoto A., Koyama M., Kataoka N., Nishida H., 1992: *Makromol. Chem; Makromol. Symp.*, 57: 273-279.
11. Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S., 2009: *Int. J. Mol. Sciences*, 10: 3722-3742.

# DEGRADATION OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) BY *BACILLUS GELATINI* ISOLATED FROM VIETNAM

TRINH THI VAN ANH, NGO THI KIM TOAN, NGUYEN QUANG HUY

## SUMMARY

Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) is a natural polymer produced by many bacteria as a means to store carbon and energy. PHB have attracted commercial biotechnological interest because of their biodegradability and biocompatibility. Several aerobic and anaerobic PHB-degrading microorganisms have been isolated from soil, activated and aerobic sludge, seawater and lake water. The percentage of PHB-degrading microorganisms in the environment was estimated to be 0.5 - 9.6% of the total colonies. Majority of the PHB-degrading microorganisms were isolated at ambient or mesophilic temperatures and a few of them were able to degrade PHB at higher temperature. The composting at high temperature is one of the most promising technologies for recycling biodegradable plastics and the thermophilic microorganisms that could degrade polymers play an important role in the composting process. Thus, microorganisms that are capable of degrading various kinds of polyesters at high temperatures are of interest. In this study, we have isolated 11 thermophilic PHB-degrading bacteria strains. Among them strain B2 was able to use PHB as a carbon source for growth at high temperature (50°C). This bacteria grew at temperatures between 37 - 60°C, at NaCl concentration between 0.5 - 3% and at pH between 5 - 8. This strain was able to used sucrose, D-glucose, fructose, mannose... but not used D (+) glucosamin. This strain produced some extracellular enzymes such as cellulase, protease, catalase but not amylase. 16S rDNA sequence analysis of strain B2 indicated that this novel isolation was related phylogenetically of *Bacillus* genus. Base on phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic results for strain B2, we describe a novel species named *Bacillus gelatini*. After 30 days of cultivation in the media with the concentration of PHB in the range of 1-2 g/l, *B. gelatini* degraded more than 50% total amount of PHB added. Strain *B. gelatini* can degrade not only PHB but also PLA, PCL at the rate of more than 20% after 20 days cultivation. For further studies, the purification of an extracellular PHB depolymerase from *B. gelatini* is necessary.

Key words: *Bacillus gelatini*, PHB, biopolymer, degradation.

Ngày nhận bài: 13-5-2010