Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CHỊU NHIỆT CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI KERATIN TỪ CHẤT THẢI CHĂN NUÔI Ở ĐỒNG THÁP

Quách Thị Thanh Tâm, Bùi Thị Minh Diệu[1] và Phạm Minh Triết

[1] *Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

Thông tin chung:
Ngày nhận: 23/01/2014
Ngày chấp nhận: 30/06/2014

Title:
Isolation and screening of keratin-degrading heat tolerant bacteria from wastes of slaughter – houses and farm in Dong Thap province

Từ khóa:
Bacillus megaterium, Bacillus sp. P014, Pseudomonas putida Rs-198, keratin, vi khuẩn chịu nhiệt

Keywords:
Bacillus megaterium, Bacillus sp. P014, Pseudomonas putida Rs-198, keratinase, heat tolerant bacteria

ABSTRACT

The temperature at the grave of the waste stream can increase and inhibit the degradation of normal microorganism strains. The aim of this study was to screen and isolate for the keratin degrading heat tolerant bacteria from slaughter-houses and farm. Five hair dumping soil samples and two waste water samples were collected from Dong Thap province for this study. These samples were serially diluted and plated on the feather-meal-containing medium for isolating and screening of efficient hair-degrading bacteria. Eighteen (18) aerobic heat resistant bacterial strains were isolated and 18 strains showed the degrading ability of feather and goat-hair. 18 strains were able to grow and degraded keratin at 45°C; 10 strains had the capacity of development at 50°C and two strains had the ability to survive at 55°C. 18 isolates showed the feather-degrading ability with most of them presented in the white color colonies, 17 rod shapes and 1 sphere shape (15 showed negative and 3 positive in Gram staining) were selected. The isolations designated as V1, V2 and V9 revealed significant differences among differentials with the highest rates as 35.64%, 32.29% and 37.76% respectively in the feather-degrading ability. In goat hair-containing medium they showed 40.48%, 40.85% and 42.18% of degradation. 16S rRNA gene sequences indicated that isolate V1 was related to Bacillus megaterium (with 99% similarity); while isolate V2 was 99% similar to Bacillus sp. P014 and V9 was related to Pseudomonas putida Rs-198 (with 93% similarity).

TÓM TẮT

Nhiệt độ ở các hố chôn nguồn chất thải lông có thể tăng cao và làm ức chế hoạt động phân hủy của các dòng vi khuẩn thông thường. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng phân hủy mạnh các cơ chất chứa keratin từ nguồn chất thải của lò giết mổ gia súc. Với 18 dòng vi khuẩn hiếu khí chịu nhiệt đã được phân lập từ năm mẫu đất và hai mẫu nước trên môi trường có bổ sung bột lông gia cầm. Và 18 dòng vi khuẩn đều có khả năng phát triển và phân hủy keratin ở 45°C; 10 dòng có khả năng phát triển ở 50°C và hai dòng có khả năng tồn tại ở 55°C. Các mẫu được pha loãng và nuôi cấy trên môi trường bột lông vũ để phân lập và khảo sát khả năng phân hủy cơ chất chứa keratin của vi khuẩn. Kết quả phân lập được 18 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông vũ với đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng đục, với đa số tế bào hình que chỉ 1 tế bào hình cầu (15 dòng gram âm và 3 dòng gram dương). Trong đó, các dòng V1, V2, V9 thể hiện khả năng phân hủy keratin mạnh nhất với kết quả phân hủy bột lông vũ lần lượt là 35,64%, 32,29% và 37,76%; kết quả phân hủy bột lông dê là 40,48%, 40,85% và 42,18%. Kết quả xác định trình tự của đoạn gen 16S rRNA dòng vi khuẩn V1 tương đồng với Bacillus megaterium ở mức 99% và dòng V2 tương đồng với Bacillus sp. P014 ở mức 99%, dòng V9 tương đồng với Pseudomonas putida Rs-198 ở mức 93%.

1 GIỚI THIỆU

Hằng năm, các nhà máy chế biến gia súc, gia cầm thải hàng trăm ngàn tấn phế phẩm ra môi trường gây ô nhiễm nghiêm trọng, trong đó thành phần chính là keratin (90%). Một trong những đặc điểm chính của keratin là ổn định cơ học, có khả năng chống phân hủy protein cao nhờ vào các liên kết disulfua, hydro và các liên kết khác (Onifade *et al*., 1998). Đối với gia súc như heo thì lông chiếm từ 0,5 – 0,8% trọng lượng cơ thể. Đối với gà trưởng thành thì lông chiếm 5 - 7% trọng lượng cơ thể. Việc thải trực tiếp lông gia súc gia cầm ra môi trường không chỉ làm ô nhiễm mà còn làm lãng phí nguồn protein. Vì vậy, ngày nay đã có nhiều nghiên cứu nhằm xử lý nguồn chất thải này. Tuy nhiên, các phương pháp vật lý và hóa học tiêu tốn khá nhiều năng lượng và không thân thiện với môi trường, đồng thời còn làm giảm giá trị dinh dưỡng của sản phẩm do việc mất đi một số acid amin (Wang và Parsons, 1997). Hướng xử lý mới cho nguồn chất thải này đang được nghiên cứu và mang lại hiệu quả thiết thực đó là sử dụng các dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh keratinase. Bên cạnh đó, trong việc xử lý các nguồn chất thải chứa keratin, nhiệt độ trong quá trình phân hủy có thể tăng cao, gây ức chế hoạt động của hầu hết các dòng vi khuẩn hoạt động phân hủy nguồn chất thải này. Vì vậy, nghiên cứu "Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng phân giải keratin từ chất thải chăn nuôi ở Đồng Tháp" được thực hiện với mục tiêu tìm ra các dòng vi khuẩn chịu nhiệt có khả năng phân hủy mạnh cơ chất chứa keratin nhằm góp phần xử lý hiệu quả loại chất thải này trong điều kiện nhiệt độ cao.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thời gian thực hiện: từ tháng 7/2013 đến tháng 12/2013.

2.2 Vật liệu

Năm mẫu đất (2 mẫu từ trại nuôi gà Cao Lãnh – Đồng Tháp; 2 mẫu từ trại nuôi vịt Cao Lãnh-Đồng Tháp; 1 mẫu từ trại nuôi heo Lai Vung, Đồng Tháp) và hai mẫu nước (1 mẫu thu tại lò giết mổ gia súc Cao Lãnh, Đồng Tháp và 1 mẫu thu ở lò giết mổ gia cầm Cao Lãnh, Đồng Tháp)

Cách thu mẫu:

– Với mẫu đất: đào khoảng 20 cm ở ngay cơ sở giết mổ và chuồng nuôi gia cầm và gia súc, thu khoảng 10 gram mẫu.

– Với mẫu nước: thu tại nơi trực tiếp thải nguồn nước ra (nơi nước tĩnh, đọng lại) và thu khoảng 10 ml nước.

2.3 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải keratin trên môi trường lông gia cầm

Các mẫu đất (1g) và nước sau khi mang về phòng thí nghiệm được lắc tăng sinh và được pha loãng từ nồng độ 10^0 đến 10^{-10}. Chọn các nồng độ từ 10^{-6} đến 10^{-8} để trải lên môi trường trường SMA (Skim milk agar) (5 g/l peptone, 3 g/l yeast extract, 100 ml/l sữa không béo tiệt trùng, 20 g/l agar) (bằng cách hút 100 µl dịch pha loãng trải lên môi trường sữa), ủ ở mức nhiệt độ 45ºC trong 24h. Các khuẩn lạc có hình dạng khác nhau tạo được vòng phân giải rõ rệt được chọn để cấy chuyển sang môi trường bột lông vũ và ủ ở 45ºC trong 24h. Những dòng có khả năng phát triển trên môi trường bột lông vũ được cấy chuyển tiếp tục trên môi trường này đến khi ròng. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của các dòng vi khuẩn bằng cách cấy các dòng vi khuẩn sang môi trường bột lông và ủ ở lần lượt các mức 50ºC, 55ºC, 60ºC và theo dõi sự phát triển của chúng trong vòng 24h-48h. Các đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của vi khuẩn được tiến hành quan sát về hình dạng, màu sắc, độ nổi, kích thước tế bào, đặc tính Gram (Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002). Các khuẩn lạc rời được cấy ria trên môi trường có bổ sung bột lông vũ đến khi ròng. Các mẫu vi khuẩn ròng được cấy vào ống nghiệm chứa môi trường bột lông vũ và trữ ở 4ºC.

2.4 Đánh giá khả năng phân hủy lông vũ của các dòng vi khuẩn phân lập được

Thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy lông vũ gồm 19 nghiệm thức với yếu tố thí nghiệm là loại vi khuẩn (18 dòng và nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn). Từng dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong môi trường tăng sinh khối (môi trường có bổ sung bột lông vũ như trên nhưng không chứa agar) đến khi đạt mật số khoảng 10^{11} tế bào/ml. Hút 4ml dịch vi khuẩn cho vào bình tam giác chứa 96 ml môi trường như trên có bổ sung thêm 2 g lông vũ và lắc 120 vòng/phút ở 30ºC trong 9 ngày. Sau thời gian nuôi, lượng lông còn lại được thu bằng việc rửa dịch nuôi cấy và lọc qua giấy lọc Whatman No.1, sấy khô và cân khối lượng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi dòng vi khuẩn. Tỉ lệ (%) lông vũ bị phân hủy bởi các dòng vi khuẩn được tính theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Thu Hiền *và ctv*, 2010.

Khảo sát khả năng phân hủy sợi lông gà của các dòng vi khuẩn

Chọn những chiếc lông gà cùng loại có kích thước và khối lượng tương đương, đem sấy khô ở 75ºC trong vòng 2 ngày. Cho mỗi chiếc lông vào

ống nghiệm chứa 20 ml môi trường gồm NaCl 0.5 g/l, KH_2PO_4 0.4 g/l, K_2HPO_4 0.3 g/l, NH_4Cl 0.5 g/l, sao cho toàn bộ chiếc lông bị ngập trong môi trường, đem khử trùng ở 121°C trong 10 phút. Lần lượt chủng vào mỗi ống nghiệm 4 ml huyền phù tế bào vi khuẩn, ủ ở 120rpm ở các mức nhiệt độ cao đã khảo sát. Quan sát và ghi nhận thời gian làm gãy rụng lông đối với mỗi dòng vi khuẩn trong vòng 10 ngày.

2.5 Đánh giá khả năng phân hủy lông dê của các dòng vi khuẩn được chọn

Thí nghiệm được tiến hành tương tự như trên với lông vũ được thay bằng lông dê.

2.6 Nhận diện các dòng vi khuẩn được tuyển chọn bằng phương pháp sinh học phân tử

Giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn, đối chiếu với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI bằng phần mềm BLAST để nhận diện các dòng vi khuẩn dựa vào mức độ tương đồng về trình tự của đoạn gen này với các dòng vi khuẩn đã được xác định. Qui trình được thực hiện như sau: ly trích DNA của vi khuẩn; kiểm tra độ tinh sạch của DNA đã trích được bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ OD (Optical density); thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi cặp mồi có trình tự như 16S rRNA (Barker *et al*., 2003) có trình tự như sau:

Mồi xuôi 8F: 5’ – AGAGTTTGATCCTGGCT CAG – 3’

Mồi ngược 1391R: 5' – GACGGGCRGTGWG TRCA – 3’

Kiểm tra kích thước và hàm lượng sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% có nhuộm Ethidium bromide ở hiệu điện thế 80V trong 50 phút, với thang chuẩn DNA 100 bp (Fermentas, USA). Sản phẩm từ phản ứng PCR được giải trình tự tại phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. So sánh trình tự thu được với ngân hàng gen trên trang web http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi để xác định loài của mẫu vi khuẩn khảo sát.

Kỹ thuật PCR: là kỹ thuật khuếch đại một trình tự DNA đặc hiệu *in vitro,* không cần sự hiện diện của tế bào, chỉ với sự hiện diện của một cặp mồi (primer) chuyên biệt, enzyme DNA polymerase, các nucleotide tự do, dung dịch đệm (buffer) theo các chu kỳ nhiệt (Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2002).

Phản ứng PCR là một chuỗi gồm nhiều chu kì lặp lại nối tiếp nhau. Đây là sự khuếch đại theo cấp số nhân. Đoạn trình tự DNA đặc trưng sẽ được khuếch đại với số lượng là 2n-1 (với n là số chu kỳ phản ứng).

Mỗi chu kỳ trong phản ứng PCR gồm ba giai đoạn (Khuất Hữu Thanh, 2006):

Giai đoạn biến tính (Denaturation): Dưới tác dụng của nhiệt độ cao (thường là 90 – 95°C, thời gian khoảng từ 60 giây đến 120 giây), các liên kết hydro trong phân tử DNA đứt ra, hai mạch của phân tử DNA tách rời nhau.

Giai đoạn gắn đoạn mồi (Annealing): Ở nhiệt độ 55 – 65°C, các đoạn mồi bắt cặp với các mạch đơn DNA khuôn ở các đầu 3’ theo nguyên lý Chargaff. Giai đoạn này kéo dài từ 30 giây đến 60 giây.

Giai đoạn tổng hợp hay kéo dài (Elongation): Enzyme DNA polymerase xúc tác hoạt động tổng hợp gắn thêm các nucleotide vào cuối đoạn mồi, các đoạn mồi được kéo dài trên cơ sở bắt cặp với mạch khuôn theo nguyên lí Chargaff, tạo nên mạch đơn DNA mới, giai đoạn này còn gọi là giai đoạn polymerase hoá (polymerization), được thực hiện ở nhiệt độ 70 – 72°C và kéo dài từ 30 giây đến vài chục phút, tuỳ thuộc vào kích thước của đoạn DNA.

Trong một phản ứng, sản phẩm của chu kì trước được làm khuôn cho chu kì kế tiếp nên số lượng bản sao tạo thành tăng theo cấp số nhân. Một phản ứng PCR thường có từ 20 - 40 chu kì, từ một đoạn DNA khuôn có thể tạo nên 220 - 240 bản sao DNA.

2.7 Phân tích kết quả và xử lý thống kê

Tất cả số liệu thu được trong đề tài được phân tích thống kê ANOVA (Analysis of Variance) bằng phần mềm MS Excel. Giá trị trung bình được kiểm tra thống kê khác biệt có ý nghĩa LSDT (Least Significant Difference Test) bằng phần mềm Statgraphic Plus version 3.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn

Từ 7 mẫu (5 mẫu đất và 2 mẫu nước) được thu tại lò mổ gia súc, lò mổ gia cầm, trại heo, trại gà, trại vịt tỉnh Đồng Tháp đã phân lập được 18 dòng vi khuẩn (Bảng 1). Tất cả các dòng vi khuẩn trên đều có thể phát triển và phân hủy keratin ở môi trường nhiệt độ cao từ 45°C đến 55°C. Trong đó, hai dòng có khả năng tồn tại ở 55°C (V17 và V18), tám dòng có khả năng phát triển ở 50°C (gồm V1, V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16) và tám dòng có khả năng phát triển ở 45°C (gồm V2,V3,V4,V5,V6,V7,V8,V9).

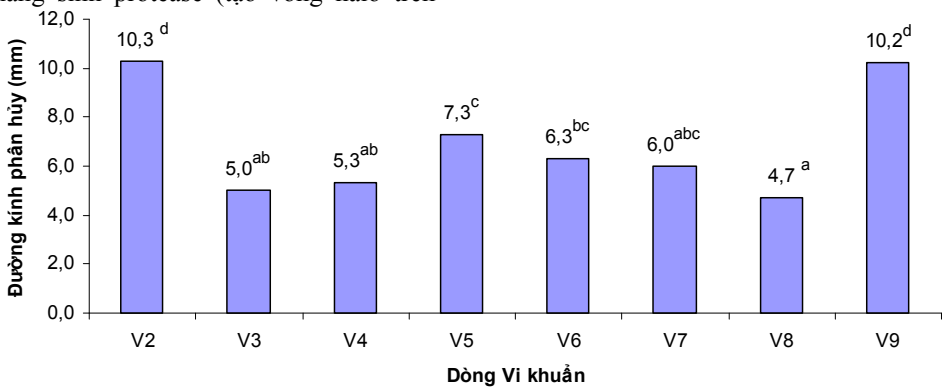
Bảng 1: Đặc điểm tế bào và khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn chịu nhiệt phân lập được

Đặc điểm tế bào				Đặc điểm khuẩn lạc				
STT	Tên	Hình dạng	Gram	Hình dạng	Độ nổi	Bìa	Màu sắc	Đường kính (mm)
1	V1	Que	+	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng hồng	1.5
2	V2	Que	+	Tròn	Lài	Nguyên	Trắng đục	6.0
3	V3	Cầu	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng sữa	2.0
4	V4	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng vàng	1.5
5	V5	Que	+	Tròn	Mô	Nguyên	Xanh nhạt	4.0
6	V6	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	0.8
7	V7	Que	_	Tròn	Lài	Nguyên	Trắng sữa	2.5
8	V8	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	3.0
9	V9	Que	_	Tròn	Lài	Răng cưa	Trắng vàng	5.0
10	V10	Que	_	Tròn	Lài	Răng cưa	Trắng sữa	1.2
11	V11	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	0.7
12	V12	Que	_	Tròn	Lài	Răng cưa	Trắng đục	0.8
13	V13	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng vàng	1.0
14	V14	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	1.1
15	V15	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	0.9
16	V16	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng đục	0.5
17	V17	Que	_	Tròn	Lài	Nguyên	Trắng đục	3.0
18	V18	Que	_	Tròn	Mô	Nguyên	Trắng vàng	0.5

3.2 Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn

Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 24h nuôi ủ ở các mức nhiệt độ thì các dòng vi khuẩn đều cho thấy khả năng sinh protease (tạo vòng halo trên môi trường sữa). Đường kính vòng halo biến thiên từ 4,7 mm đến 10,3 mm.

3.2.1 Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 45°C



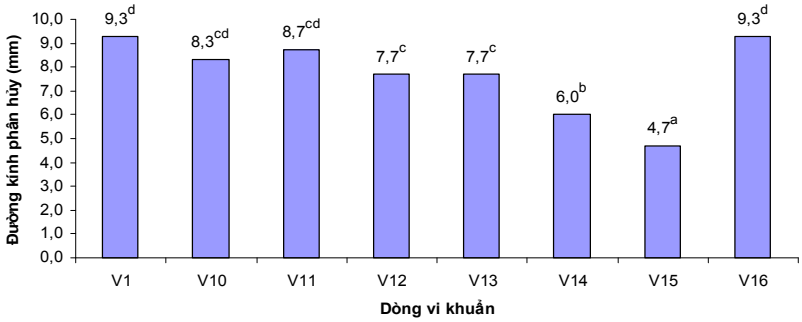
Hình 1: Đường kính vòng phân hủy của các dòng vi khuẩn trên môi trường sữa sau 24h ủ ở 45°C

Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Hai dòng vi khuẩn V2 và V9 tạo được vòng phân hủy tốt nhất trong nhóm với đường kính vòng phân hủy lần lượt là 10,3 mm của dòng V2 và 10,2 mm với dòng V9, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng còn lại cùng nhóm.

3.2.2 Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 50°C

Sự tạo vòng phân hủy của nhóm vi khuẩn khảo sát ở 50°C đồng đều hơn nhóm 45°C. Các dòng V10, V11 đều tạo được vòng phân hủy khá lớn (lần lượt là 8,3 mm và 8,7 mm) sau 24 giờ ủ. Trong khi đó, dòng V1 và V16 cho kết quả đo đường kính vòng phân hủy tốt nhất trong nhóm với 9,3 mm sau 24 giờ ủ ở 50°C.



Hình 2: Đường kính phân hủy của các dòng vi khuẩn trên môi trường sữa sau 24 giờ ủ ở 50°C

Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.2.3 Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 55°C

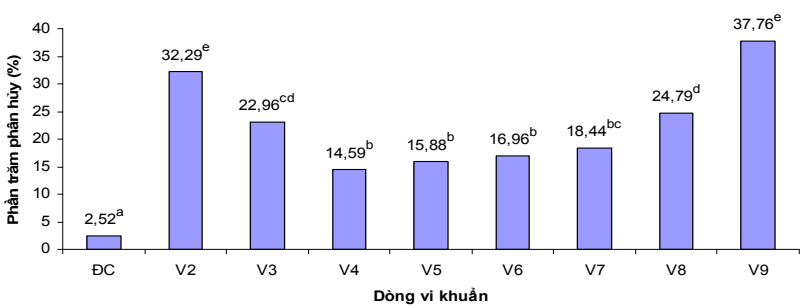
Khả năng tạo vòng phân hủy của nhóm vi khuẩn khảo sát ở 55°C là không đáng kể với 4,7 mm của dòng V17 và 7,2 mm của dòng V18 sau 24 giờ ủ.

3.3 Khả năng phân hủy lông gia cầm của các dòng vi khuẩn

Sau bảy ngày chủng và lắc ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau thì kết quả cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phân hủy keratin qua việc phân hủy bột lông gia cầm, khác biệt ý nghĩa ở mức 5% so với nghiệm thức đối chứng (không chủng vi khuẩn). Dòng V9 cho khả năng phân hủy tốt nhất trong các dòng phân lập được với 37,76% lượng lông bị phân hủy sau một tuần nuôi lắc. Trong ba nhóm nhiệt độ khảo sát thì nhóm khảo sát ở 45°C cho kết quả khác biệt nhất về khả năng phân hủy lông. Trong khi các dòng V2 và V9 có kết quả khá tốt thì các dòng còn lại cho khả năng phân hủy không đáng kể. Kết quả khảo sát ở nhóm 50°C khá đồng đều, chỉ có dòng V1 là cho thấy khả năng phân hủy lông tốt hơn cả với khả năng phân hủy đạt 35.67% sau một tuần khảo sát. Riêng nhóm vi khuẩn khảo sát ở 55°C thì kết quả phân hủy chưa đáng chú ý với các dòng V17 và V18 lần lượt là 26.75% và 27.75%. Kết quả này thấp hơn kết quả của các dòng vi khuẩn được phân lập từ đất và lông vũ trong nghiên cứu của Nguyễn Huy Hoàng *et al*. (2010) cho hiệu quả phân hủy từ 52,40% đến 98,45% sau một tuần lắc ủ ở 30°C. Thành phần môi trường và nhiệt độ là hai yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến sự tổng hợp enzyme keratinase của vi khuẩn. Sự tối ưu hóa hai yếu tố này có thể giúp nâng cao hiệu quả tổng hợp keratinase lên đến 40 lần (Brandelli, 2007). Vì vậy, để có được kết quả phân hủy tốt nhất thì cần xác định các điều kiện tối ưu cho các dòng vi khuẩn phân lập được.

3.3.1 Khả năng phân hủy lông gia cầm của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 45°C

Kết quả từ Hình 3 cho thấy khả năng phân hủy lông gia cầm của nhóm vi khuẩn khảo sát ở 45°C có sự khác biệt khá lớn. Các dòng V2 và V9 phân hủy hữu hiệu nhất với 32,29% lượng bột lông gia cầm bị phân hủy của dòng V2 và 37,76% với dòng V9 (khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng còn lại trong nhóm). Các dòng còn lại cũng có khả năng phân hủy bột lông gia cầm nhưng kết quả thấp không đáng kể.

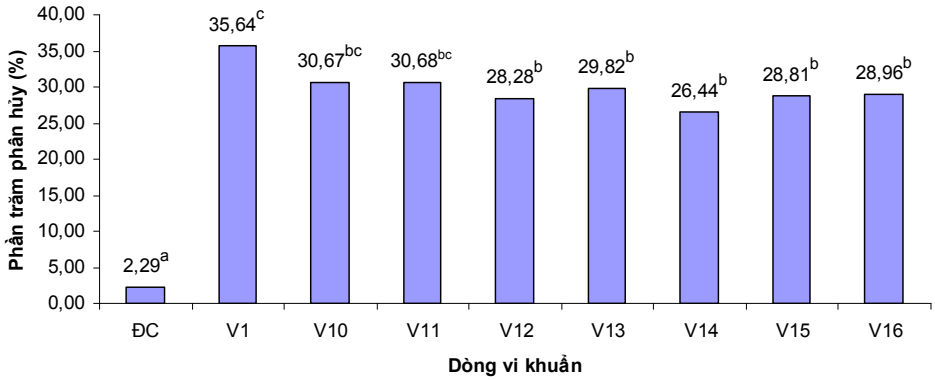


Hình 3: Khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn ở 45°C

Ghi chú: ĐC: đối chứng (mẫu bột lông không chủng vi khuẩn)
Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.3.2 Khả năng phân hủy lông gia cầm của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 50°C

Từ Hình 4 cho thấy khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 50°C khá đồng đều, không có nhiều chênh lệch như các dòng vi khuẩn ở 45°C. Tuy nhiên, dòng V1 có kết quả phân hủy tốt nhất trong nhóm với 35,64% lượng bột lông gia cầm bị phân hủy lại thấp hơn các dòng phân hủy hữu hiệu V2 và V9 ở nhóm 45°C.



Hình 4: Khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn ở 50°C

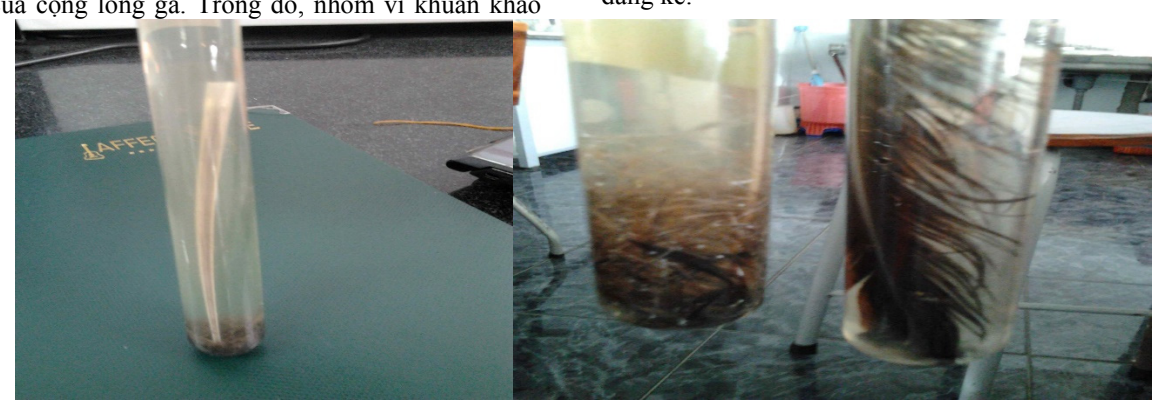
Ghi chú: ĐC: đối chứng (mẫu bột lông không chủng vi khuẩn)
Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.3.3 Khả năng phân hủy lông gia cầm của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 55°C

Các dòng vi khuẩn khảo sát ở 55°C cũng cho thấy khả năng phân hủy lông gia cầm sau một tuần chủng nhưng kết quả phân hủy không được cao với 27.75% của dòng V17 và 26.75% của dòng V18.

3.4 Khả năng phân hủy sợi lông gà của các dòng vi khuẩn khảo sát

Sau 10 ngày nuôi lắc ở các mức nhiệt độ khác nhau thì kết quả khảo sát sự phân hủy sợi lông gà nguyên cho thấy tất cả 18 dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng làm gãy rụng sợi lông con của cọng lông gà. Trong đó, nhóm vi khuẩn khảo sát ở mức 45°C cho thấy khả năng làm gãy rụng lông gà tốt nhất với khả năng làm gãy rụng lông gần như hoàn toàn sau 10 ngày chủng của dòng V2 và V9, dòng V13 cũng cho thấy khả năng làm gãy rụng các sợi lông con hơn 70%. Ở nhóm 50°C thì dòng V1 cho thấy khả năng làm gãy rụng sợi lông con tốt nhất với gần như trên 70% số lông gãy rụng sau thời gian khảo sát, các dòng còn lại cũng cho thấy khả năng làm gãy rụng nhưng kém hơn, chỉ đạt từ 20% đến 40%. Còn ở nhóm 55°C thì dòng V17 là cho thấy khả năng làm gãy rụng khá (làm gãy rụng hơn 50%) tổng số lông con. Còn dòng V18 cho khả năng phân hủy sợi lông gà không đáng kể.



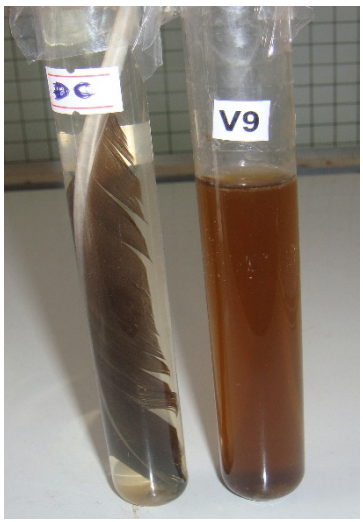
(V2) **(V17)** **(ĐC)**

Hình 5: Khả năng phân hủy sợi lông gà của các dòng vi khuẩn sau 10 ngày

Ghi chú: ĐC là nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn (Hình chụp ngày 8/9/2013)

Kết quả sự làm gãy rụng lông này thấp hơn kết quả từ dòng L1 của Cao *et al*. (2008) với kết quả làm gãy rụng toàn bộ lông chỉ sau ba ngày chủng (nhưng dòng L1 được khảo sát ở 40^{o}C).

Sau 10 tuần dòng V9 đã phân hủy toàn bộ cọng lông gà nguyên



Hình 6: Khả năng phân hủy sợi lông gà của dòng vi khuẩn V9 sau 10 tuần

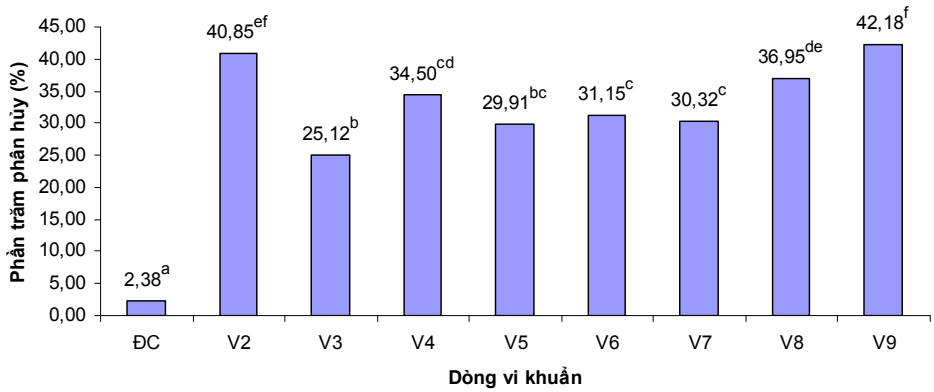
Ghi chú: ĐC là nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn (Hình chụp ngày 10/11/2013)

3.5 Khả năng phân hủy lông dê của các dòng vi khuẩn

Nhóm vi khuẩn khảo sát ở 45°C cho khả năng phân hủy bột lông dê tốt nhất với dòng V9 phân hủy 42,18% lượng bột lông sau một tuần chủng; dòng V2 cũng phân hủy được 40,85% lượng lông sau một tuần nuôi lắc; các dòng còn lại cho kết quả phân hủy từ 25% đến 36,9%. Khảo sát ở nhóm vi khuẩn ở 50°C cho kết quả gần tương đương với nhóm vi khuẩn ở 45°C với dòng V1 phân hủy được 40,47% lượng bột lông sau một tuần chủng, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; các dòng còn lại cho khả năng phân hủy lông đạt hơn 30%. Nhóm vi khuẩn khảo sát ở 55°C thì cho kết quả thấp hơn, với V17 đạt 30,35% và V18 đạt 30,46% sau thời gian khảo sát.

3.5.1 Khả năng phân hủy lông dê của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 45^{o}C

Khả năng phân hủy bột lông dê của các dòng vi khuẩn ở 45°C là khá cao, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, các dòng V9 cho kết quả phân hủy bột lông dê tốt nhất với 42,18% lượng bột lông bị phân hủy sau một tuần chủng vi khuẩn. Dòng V2 cũng cho kết quả phân hủy khá tốt. Các dòng còn lại cũng chứng tỏ có khả năng phân hủy bột lông dê với tỷ lệ phân hủy trong khoảng hơn 30%.

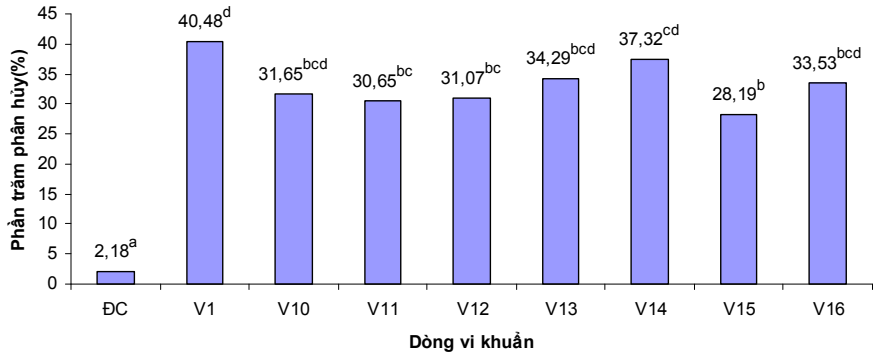


Hình 7: Khả năng phân hủy bột lông dê của các dòng vi khuẩn ở 45^{o}C

Ghi chú: ĐC: đối chứng (mẫu bột lông không chủng vi khuẩn)
Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

3.5.2 Khả năng phân hủy bột lông dê của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 50^{o}C

Kết quả từ Hình 8 cho thấy nhóm vi khuẩn khảo sát ở 50°C cũng cho kết quả phân hủy bột lông dê khá tốt. Tất cả các dòng trong nhóm, trừ dòng V15 đều cho kết quả phân hủy lớn hơn 30%. Trong đó, dòng V1 cho kết quả phân hủy tốt nhất với 40,48% lượng bột lông bị phân hủy sau một tuần chủng vi khuẩn.



Hình 8: Khả năng phân hủy bột lông dê của các dòng vi khuẩn ở 50ºC

Ghi chú: ĐC: đối chứng (mẫu bột lông không chủng vi khuẩn)
Các giá trị mang các mẫu tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

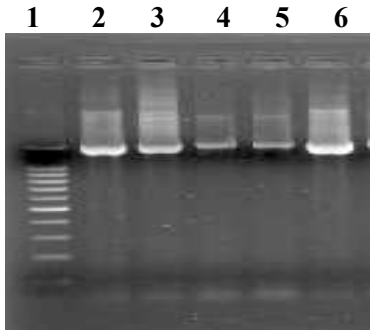
3.5.3 Khả năng phân hủy bột lông dê của các dòng vi khuẩn khảo sát ở 55ºC

Hai dòng vi khuẩn ở 55°C cũng cho thấy khả năng phân hủy bột lông dê khá hữu hiệu, kết quả phân hủy bột lông dê lần lượt của dòng V17 và V18 là 30,35% và 30,47% sau một tuần nuôi lắc.

3.6 Kết quả nhận diện 3 dòng vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

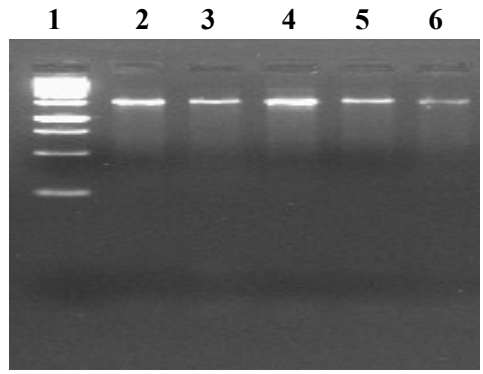
Ba dòng vi khuẩn V1, V2 và V9 được chọn để nhận diện do khả năng chịu nhiệt cũng như khả năng phân hủy lông gia súc, lông gia cầm khá cao và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại.

* Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 dòng vi khuẩn cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen 16S rRNA của chúng với kích thước khoảng 1500bp (Hình 9 và Hình 10).



Hình 9: Kết quả điện di sản phẩm PCR của 2 dòng vi khuẩn V1 và V2

Ghi chú: Giếng 1: Thang chuẩn 100bp
Giếng 2,3: mẫu vk V1
Giếng 4,5: mẫu vk V2
Giếng 6: Đối chứng dương
Kích thước mẫu 1500bp
Hình ghi nhận ngày 20/11/2013



Hình 10: Kết quả điện di sản phẩm PCR của dòng vi khuẩn V9

Ghi chú:
Giếng 1: Thang chuẩn 1Kb (Kích thước mẫu 1500bp)
Giếng 2; Đối chứng dương
Giếng 3, 4, 5, 6: Các mẫu V9 (lặp lại)
Kích thước mẫu 1500bp
Hình ghi nhận ngày 20/11/2013

*** Kết quả giải trình tự của 3 dòng vi khuẩn**

Dòng vi khuẩn V1 có kết quả giải trình tự 16S rDNA như sau:

TTTCCCCGGGGAACGCCGGGGTTCCCCT
GGGGGCTATCATGCAGTCGAGCGACTGATT
AGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGA
AGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCA
TGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTA
TCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC

AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGG
GTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACG
GTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGA
AGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
GTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAG
ATAGAGCGTTCCCCTTTCGGGGGG

Khi so sánh trình tự trên với dữ liệu ngân hàng gen trên trang web http://www.ncbi.nlm.nih.gov bằng chương trình BLAST, kết quả tra cứu cho thấy trình tự gen của dòng V1 có kết quả tương đồng với dòng *Bacillus megaterium* với độ tương đồng 99%.

Dòng vi khuẩn V2 có kết quả giải trình tự 16S rDNA như sau:

ATTCCCCAGGAGTAGGAAGGGGAGGGT
GGGGGCCTATCATGCAAGTCGAGCGAATG
GATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAA
CCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTC
GGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
TTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGA
GTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGT
CTGTAACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAA
GTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACCCTAGAGATAGGGGCTTCTCCT

Khi so sánh trình tự trên với dữ liệu ngân hàng gen trên trang web http://www.ncbi.nlm.nih.gov bằng chương trình BLAST, kết quả tra cứu cho thấy trình tự gen của dòng V2 có kết quả tương đồng với dòng *Bacillus* sp. P014 với độ tương đồng 99%.

Dòng vi khuẩn V9 có kết quả giải trình tự 16S rDNA như sau:

AGGGGGGGGGGGGCGGGGGGGGCGCG
GGACGCGCGGACGAAGGGGGAGCATGCAA
TCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCG
CATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCA
GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATG
GCTCAACTCAACAACGATCCCTAGGTGGTC
TGAAAGGATGACCGGCCATGATGACATTG
AGACATCCCCCCCATCCCCCCGGTTTGTCA
CCGGCGGTCTCCTTAGAATGACCACCACAA
CGTGCTCGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGC
TCTTTACGGGACTTAACCCTTTATCTCACGA
CACAAGCTGACGACATCCATGCAGCACCTG
TGTCAGATTTCCCGAAAGCACCCATCCATC
TCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTG
ATAAGGTTCTTCTCATTGCTTCTAATTAAAC
CACATGCTCCAGCGCTTGTGCGGGCCCCCG
GCAATTCATTTGAGTTCTAACCTTGCGGCC
GTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCCTT
AGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCA
ACGGCTAGTTGACATCGTTGACGGCTTGGA
CTACCAGGGTATCTCATCCTGTTTGCTCCCT
ACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCAAT
ACAAGTGGTCGCCTTCGGCACTGGCGTTCC
TTCCTATATCTACACATTTCACCGCTACACA
GGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTA
TCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTT

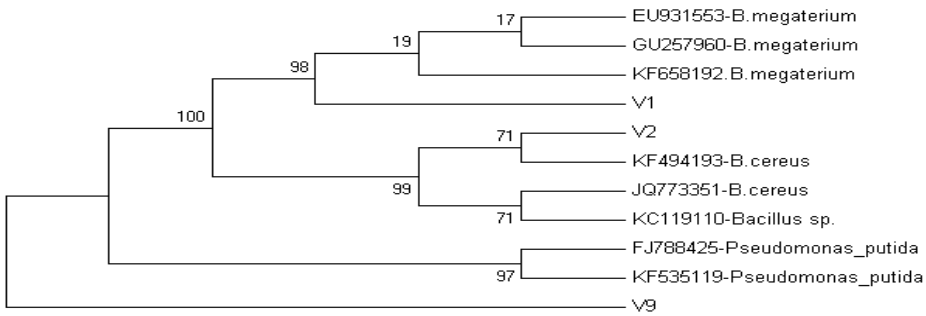
GAGCCCTGGGCTTTTACATCCAACTTAACA
AACCACCTACGCGCGTTTTACGCCCATTAA
TTCCCATTACGGCTTGCACCCTCTGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACAAAATTAGCCGGTGC
TTATTCTGTCCGTAACGTCAAATCAGCAAG
GTTTTAACTTAATGGCGTT

Khi so sánh trình tự trên với dữ liệu ngân hàng gen trên trang web http://www.ncbi.nlm.nih.gov bằng chương trình BLAST, kết quả tra cứu cho thấy trình tự gen của dòng V9 có kết quả tương đồng với dòng *Pseudomonas putida* Rs-198 với độ tương đồng 93%.

Như vậy, hai dòng vi khuẩn V1 và V2 được tuyển chọn từ nghiên cứu này thuộc chi *Bacillus*. Kết quả này phù hợp với kết luận của Ghosh *et al*. (2007) là phần lớn các dòng vi khuẩn có hoạt tính phân hủy keratin cao phân lập được đều thuộc chi *Bacillus*. Dòng *Bacillus* megaterium F7-1 đã được Geun - Tea Park và Hong – Joo Son nghiên cứu và cho thấy khả năng phân hủy đến 26% lượng bột lông gà sau 24 giờ chủng ở 30°C. Nghiên cứu về dòng *Bacillus* sp. cũng được thực hiện bởi Ilham Zerdani *et al*. (2004) cũng cho thấy toàn bộ protein giảm từ 13,6% xuống còn 1,92% sau 10 ngày khảo sát. Keratinase tổng hợp từ dòng *Bacillus* sp. này cũng đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu (Kim *et al*., 2001; Suh và Lee, 2001; Manczinger *et al*., 2003; Giongo *et al*., 2007). Khả năng ứng dụng các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* để xử lí rác thải chứa keratin được kỳ vọng rất cao.

Dòng V9 được tuyển chọn được định danh là *Pseudomonas putida* Rs-198. Nghiên cứu về *Pseudomonas* đã được Riffel và Brandelli (2006) nghiên cứu đã tiến hành phân lập vi khuẩn phân giải keratin từ chất thải lông gia cầm. Bốn dòng vi khuẩn sau khi nuôi cấy trên môi trường bột lông vũ được kiểm tra khả năng phân giải protein trên môi trường sữa. Trong đó, có ba dòng Gram âm (thuộc chi *Burkholderia*, *Chryseobacterium* và *Pseudomonas*) và một dòng Gram dương (*Microbacterium* sp.). Những vi khuẩn này có thể phát triển trên đa dạng các chất thải chứa keratin như bột lông vũ, lông vũ thô, móng gà, tóc và len. Hoạt tính phân giải protein của dịch trích enzyme thô từ các dòng vi khuẩn này được kiểm tra với hai cơ chất azokeratin và azocasein. Kết quả cho thấy enzyme keratinase hoạt động trên cả hai cơ chất và có khả năng phân giải keratin tương đương với các enzyme phân giải protein có nguồn gốc từ vi khuẩn trên thị trường.

3.7 Cây phả hệ các dòng VK đã nhận diện



Hình 11: Cây phả hệ các dòng VK V1, V2 và V9

4 KẾT LUẬN

18 dòng vi khuẩn hiếu khí đã được phân lập. Đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, độ nổi lài và bìa nguyên. Tất cả các dòng vi khuẩn (trừ dòng V3 có hình cầu) đều có hình que. Có 15 dòng Gram âm và 3 dòng Gram dương. Tất cả 18 dòng vi khuẩn đều phát triển ở mức nhiệt độ từ 45°C đến 55°C. Trong đó, có hai dòng tồn tại ở 55°C, 8 dòng vẫn phát triển ở 50°C. Cả 18 dòng vi khuẩn đều biểu hiện hoạt tính protease trên môi trường sữa với đường kính phân hủy biến thiên từ 4,7 mm đến 10,3 mm sau 24 giờ ủ ở các mức nhiệt độ khảo sát. Kết quả khảo sát sự phân hủy keratin qua việc phân hủy lông gia súc và gia cầm cho thấy các dòng vi khuẩn phân hủy được từ 14,59% đến 37,76% khối lượng bột lông gia cầm sau một tuần lắc ủ ở các mức nhiệt độ khảo sát; kết quả phân hủy long dê cao hơn từ 25% đến 40,47%. Ngoài ra, kết quả theo dõi sự làm gãy rụng sợi lông gà sau 10 ngày cũng cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng làm gãy rụng các sợi lông con trên sợi lông gà lớn. Ba dòng vi khuẩn V1, V2 và V9 cho thấy khả năng phân hủy cơ chất keratin qua việc phân hủy lông hữu hiệu hơn các dòng còn lại. Kết quả định danh cho thấy dòng V1 có kết quả tương đồng với dòng *Bacillus megaterium* với độ tương đồng 99% và dòng V2 có kết quả tương đồng với

dòng *Bacillus* sp. P014 với độ tương đồng 99% và dòng V9 tương đồng với *Pseudomonas putida* Rs-198 ở mức 93%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akhtar W. and Edwards H.G.M. 1997. Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. *Spectrochim Acta.* 53: 81-90.
2. Barker G.C., Smith J.J. and Cowan D.A. 2003. Review and reanalysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Method. 55*: 541-555.
3. Brandelli, A. 2007. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology An International Journal*, 10.1007/s11947-007-0025-y.
4. Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Hữu Hiệp. 2002. *Thực tập vi sinh vật đại cương. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học*. Trường Đại học Cần Thơ.
5. Daniel J.D., Ana P.F.C. and Brandelli A. 2009. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus sp. P45* isolated from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 63: 358–363.
6. Ghosh A., Maity B., Chakrabarti K. and Chattopadhyay D. 2007. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microbial Ecology.* 54: 452-459.
7. Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2002. *Sinh học phân tử*. Nxb Giáo dục.
8. Kim, J.M., W.J. Lim and H.J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 37: 287-291.
9. Khuất Hữu Thanh. 2006. *Cơ sở di truyền phân tử và kỹ thuật gen.* Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, trang 137-146.
10. Lateef A, Oloke J. K., Kana E. B. G., Sobowale B. O., Ajao S. O. and Bello B.Y. 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 64: 162-165.
11. Matikevičienė V., Masiliūnienė D. and Grigiškis S. 2009. Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity. *International Scientific and Practical Conference.* 1: 284-289.
12. Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Huy Hoàng. 2010. Phân lập chủng vi khuẩn *Chryseobacterium* có khả năng thủy phân lông vũ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học.* 8(3A): 923-928.
13. Nguyễn Huy Hoàng, Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai và Nguyễn Ngọc Dũng. 2010. *Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông vũ tạo nguồn thức ăn cho nuôi trồng thủy sản*. Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
14. Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A. and Al-Zarban S. 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology.* 66: 1-11.
15. Riffel, A. and A. Brandelli. 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, ISSN 1517-8382.
16. Joshi S.G., Tejashwini M.M., Revati N., Sridevi R. and Roma D. 2007. Isolation, identification and characterazation of a feather degrading bacterium. International Journal of Poultry Science. 6(9): 689-693.
17. Tanada N., Kageura M., Hara K., Hieda Y., Takamoto M. and Kashimura S. 1994. Demonstration of oxidation dyes on human hair. *Forensic sci lnt. 64:* 1-8.
18. Tapia D.M.T. and Contiero J. 2008. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater. *African Journal of Biotechnology*. 7(3): 296-300.
19. Zambare V.P., Nilegaonkar S.S. and Kanekar P.P. 2007. Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent. *World J Microbiol Biotechnol*. 1569-1574.
20. Wang, X. and C.M. Parsons. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. *Poultry Sci*, 76:491–496.