



PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY LÔNG GIA SÚC - LÔNG GIA CẦM TỪ CÁC LÒ MỔ GIA SÚC Ở BA HUYỆN TAM BÌNH, LONG HỒ VÀ VŨNG LIÊM TỈNH VĨNH LONG

Quách Thị Thanh Tâm¹ và Bùi Thị Minh Diệu²

¹Trường Cao đẳng Cộng đồng Vĩnh Long

²Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 08/05/2015

Ngày chấp nhận: 21/12/2015

Title:

Isolation and selection of animal fur and feather degrading bacteria from animal slaughter-house in Vinh Long

Từ khóa:

Azokeratin, *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, keratin

Keywords:

Azokeratin, *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, keratin

ABSTRACT

Every year, there are thousands of tons of livestock and poultry hair waste that have not been processed in Vietnam. The keratin is the main structural component of animal hair quite hard to decompose in nature. The aim of this study was to isolate and screen keratin degrading bacteria from waste samples collected from animal slaughter-house. These samples were serially diluted and plated on pig-hair-containing medium for isolating and screening of efficient hair-degrading bacteria. The forty seven isolates showed their animal-hair-degrading ability with most of them presented white color colonies were selected. All isolates got keratinase with azokeratin substrate reaction at 50°C for 15 minutes. Strain Kr42 had the highest keratinase activity with 114.3 U/ml. The isolates designated as Kr11, and Kr45 revealed significant differences among differentials with the highest rates as 37.66% and 29.41%, respectively in animal-hair-degrading ability. In feather-containing medium, Kr45 was the best with 72.79% of degrading rates. Bergey's method and the modern method of 16S rRNA gene sequences indicated that the isolate Kr11 was closely related to *Bacillus flexus* and the isolate Kr45 was closely correlated to *Bacillus megaterium*.

TÓM TẮT

Hàng năm, tại Việt Nam có hàng ngàn tấn lông gia súc, lông gia cầm thải ra môi trường mà chưa được xử lý. Keratin là thành phần cấu tạo chính của lông gia súc, gia cầm và là hợp chất rất khó bị phân hủy trong tự nhiên. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy mạnh các loại cơ chất chứa keratin này từ mẫu đất, mẫu lông và nước thải thu ở lò giết mổ gia súc thuộc tỉnh Vĩnh Long. Các mẫu vật được pha loãng và nuôi cấy trên môi trường chứa bột lông heo như nguồn carbon và nitơ duy nhất để phân lập vi khuẩn. Kết quả phân lập được 47 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông heo với đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng đục. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều cho hoạt tính keratinase với cơ chất azokeratin ở 50°C sau 15 phút phản ứng. Dòng Kr42 có hoạt độ keratinase cao nhất là 114,3U/ml và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng vi khuẩn còn lại. Bên cạnh đó, dòng Kr11 và Kr45 cho kết quả phân hủy lông heo tốt nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại với tỷ lệ phân hủy lần lượt là 37,66% và 29,41%. Dòng Kr45 có khả năng phân hủy lông gia cầm tốt nhất với tỷ lệ 72,79%. Kết hợp giữa phương pháp định danh của Bergey (John et al, 1994) và phương pháp định danh hiện đại dựa vào trình tự của đoạn gen 16S rRNA đã cho kết luận dòng vi khuẩn Kr11 có quan hệ gần với loài *Bacillus flexus* và dòng vi khuẩn Kr45 có tương quan gần với loài *Bacillus megaterium*.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lông gia súc và lông gia cầm có thành phần chính là keratin rất khó phân hủy và chiếm tỉ lệ khá lớn trong nguồn rác thải từ các lò giết mổ trở thành một nguồn ô nhiễm nghiêm trọng (Gupta và Ramnani, 2006). Đã có nhiều phương pháp được áp dụng để xử lý các lông này như chôn, đốt bỏ hoặc làm thức ăn gia súc (Tapia và Contiero, 2008). Tuy nhiên, chi phí cho phương pháp đốt hoặc chôn khá cao và còn gây ô nhiễm cho môi trường đất, nước và không khí; còn việc sử dụng bột lông xay nhuyễn làm thức ăn gia súc thì cho tỉ lệ tiêu hóa rất thấp (Joshi *et al.*, 2007). Các nghiên cứu trong nước về vi sinh vật có khả năng phân giải keratin đã đạt được những thành công nhưng số lượng nghiên cứu còn ít và đều tập trung ở phía Bắc-vùng khí hậu khá khác biệt với Đồng bằng sông Cửu Long. Do đó, việc phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gia súc và lông gia cầm từ các lò giết mổ gia súc ở tỉnh Vĩnh Long là nghiên cứu cần thiết nhằm tìm kiếm các dòng vi khuẩn phân hủy lông gia súc, lông gia cầm mạnh để phục vụ cho sản xuất chế phẩm sinh học giúp chế biến nguồn chất thải này thành phân hữu cơ sinh học hoặc sản phẩm bổ sung protein với độ hấp thu cao làm thức ăn cho cá, gia súc, gia cầm; đồng thời giúp giảm thiểu ô nhiễm môi trường từ ngành chăn nuôi. Ngoài ra, tương lai còn có thể phát triển để sản xuất keratinase với nhiều ứng dụng cho các ngành công nghiệp nhẹ khác.

Trong nghiên cứu này, các mẫu đất, nước và lông hoai mục được thu thập tại các lò giết mổ gia súc ở 3 huyện Tam Bình, Long Hồ và Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long. Các dòng vi khuẩn có khả năng phân giải keratin được phân lập trên môi trường bột lông và được chọn lọc dựa vào hoạt tính keratinase, khả năng phân hủy lông gia cầm và lông heo. Các dòng vi khuẩn tuyển chọn được định danh dựa vào đặc điểm hình thái, đặc tính sinh hóa và trình tự đoạn gen 16S rDNA.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Tiến hành lấy mẫu ở 7 lò giết mổ gia súc tại ba huyện Tam Bình, Long Hồ và Vũng Liêm tỉnh Vĩnh Long. Mỗi lò giết mổ gia súc thu 1 mẫu nước, 1 mẫu lông và 1 mẫu đất.

Cơ chất chứa keratin: bột lông heo, bột lông gia cầm.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải keratin trên môi trường bột lông heo:

Đất được đào sâu khoảng 20 cm ở ngay cơ sở giết mổ gia súc để thu khoảng 10 g mẫu đất. Mẫu lông được thu khoảng 10 g mẫu lông đang phân hủy trong đất ở ngay cơ sở giết mổ gia súc. Mẫu nước được tiến hành thu tại nơi trực tiếp thải nguồn nước ra (nơi nước tĩnh, đọng lại) và thu khoảng 50 ml nước. Các mẫu được cho vào túi nilon sạch, loại dùng một lần, ghi nhãn đem về phòng thí nghiệm giữ ở nơi mát đến khi tiến hành phân lập.

Chuẩn bị cơ chất chứa keratin, đối với bột lông heo: lông heo được thu tại các lò giết mổ tại tỉnh Vĩnh Long, rửa sạch tạp chất, sấy khô, loại bỏ da và các tạp chất còn lại, sau đó cắt nhuyễn khoảng 1,5 mm; đối với bột lông gia cầm: lông gà và lông vịt được thu tại các lò giết mổ gia cầm tại tỉnh Vĩnh Long, rửa sạch loại bỏ tạp chất, sấy khô, xay nhuyễn, trộn với tỷ lệ 1: 1.

Cân 1 g mẫu đối với đất, lông hoặc hút 10 ml đối với mẫu nước cho vào bình tam giác 250 ml chứa 99 ml (90 ml đối với mẫu nước) môi trường lỏng có bổ sung bột lông heo ủ ở 30°C trên máy lắc (120 vòng/phút) trong vòng 24 giờ nhằm tăng sinh khối các vi khuẩn trong mẫu. Thu lấy dịch chứa vi khuẩn, bỏ phần cặn lắng.

Dịch môi trường được pha loãng từ nồng độ 10^9 đến nồng độ 10^{10} , trải lên môi trường khoáng có bổ sung bột lông, ủ ở 30°C trong vòng 2 ngày. Các khuẩn lạc mọc to, rõ rệt sẽ được chọn để cấy chuyển trên môi trường bột lông heo cho đến khi rờng. Các mẫu rờng sau đó được trữ trong ống môi trường thạch nghiêng có cùng thành phần ở 4°C. (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 2010)

2.2.2 Đánh giá khả năng phân hủy bột lông heo của các dòng vi khuẩn:

Đối với mỗi dòng vi khuẩn, chuẩn bị một bình thủy tinh 75 ml chứa 25 ml môi trường bột lông heo với thành phần như môi trường phân lập và được khử trùng ở 121°C trong 10 phút. Lần lượt chủng vào mỗi bình thủy tinh 1,15 ml dịch nuôi vi khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập được, ủ ở 30°C trên máy lắc (120 vòng/phút). Một bình thủy tinh với cùng thể tích môi trường nhưng không chủng vi khuẩn mà thay bằng 1,15 ml nước cất vô trùng được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau 7

ngày nuôi lãc, tiến hành lọc và rửa môi trường qua vải lọc đã được khử trùng và cân khối lượng trước đó, cân lượng bột lông còn lại sau khi đã lọc và sấy khô ở 60°C đến khối lượng không đổi để tính khối lượng bột lông đã bị phân hủy trong quá trình nuôi cấy. (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 2010)

Khả năng phân hủy bột lông heo của vi khuẩn được tính theo công thức sau: (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 2010)

$$A (\%) = (m_{BD} - m_c) \times 100 / m_{BD}$$

Trong đó: A (%) là tỉ lệ bột lông heo bị phân hủy bởi vi khuẩn;

m_{BD} : là khối lượng bột lông ban đầu;

m_c : là khối lượng bột lông còn lại sau khi bị phân hủy.

2.2.3 Đánh giá khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn

Thí nghiệm khảo sát khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn phân lập được tiến hành tương tự như khảo sát khả năng phân hủy bột lông heo, nhưng với cơ chất là bột lông gia cầm.

2.2.4 Đánh giá hoạt tính keratinase của các dòng vi khuẩn

Tạo Azo-keratin

Phương pháp này được thực hiện tương tự như các bước trong quy trình tạo azoalbumin:

Bột lông gia cầm được nghiền thật mịn, cho 1 g vào bình tam giác 100 ml; Cho vào 20 ml nước đã khử ion, dùng khuấy từ trộn đều hỗn hợp; Cho tiếp vào hỗn hợp 2 ml NaHCO₃ 10% (w/v), khuấy đều.

Dùng ống nghiệm 10 ml, cho vào 174 mg sulfanilic acid hòa tan trong 5 ml NaOH 0.2 N. Tiếp tục cho 69 mg NaNO₂ hòa tan vào dung dịch. Thêm vào 0,4 ml HCl 5N. Lắc đều trong 2 phút, sau đó trung hòa bởi 0,4 ml NaOH 5N.

Cho tất cả phần dung dịch trong ống nghiệm 10 ml vào bình tam giác 100 ml có bột lông gia cầm đã chuẩn bị ở trên, trộn đều trong 10 phút. Lọc hỗn hợp phản ứng bằng giấy lọc Whatman – số 1, phần azokeratin không tan được rửa hoàn toàn với nước khử ion. Azokeratin sẽ được hòa lơ lửng trong nước, được lắc đều ở 50 °C trong 2 giờ và được lọc lại lần nữa. Chu kỳ rửa được lặp lại cho đến khi pH của dịch rửa 6,0 – 7,0 và sự hấp thụ quang phổ của dung dịch ở bước sóng 450 nm nhỏ hơn 0,01. Cuối cùng, chu trình rửa được lặp lại ít nhất hai lần sử dụng dung dịch đệm potassium phosphate 50 mM

pH 7,5. Azokeratin được rửa một lần nữa với nước và làm khô qua đêm trong chân không ở 50°C.

Trữ lạnh azokeratin (4-10°C) để sử dụng trong thời gian dài. (Areeb *et al.*, 2012)

Đo hoạt tính keratinase của các dòng vi khuẩn trên cơ chất Azo-keratin

Cho 5 mg azokeratin vào ống nghiệm eppendorf 1,5 ml cùng với 0,8 ml dung dịch đệm potassium phosphate 50 mM, pH = 7,5. Đảo đều hỗn hợp trên cho đến khi azokeratin tan hoàn toàn. Thêm 0,2 ml dịch keratinase thô vào dung dịch azokeratin, trộn và ủ lãc trong 15 phút ở 50°C. Kết thúc phản ứng bằng cách thêm vào ống nghiệm eppendorf 0,2 ml acid trichloroacetic 10%. Hỗn hợp được lọc và phân tích bằng cách đo ở bước sóng 450 nm với máy hấp thụ quang phổ Thermo Spectronic genesys 10 UV. Mẫu đối chứng được chuẩn bị bằng cách thêm 0,2 ml acid trichloroacetic 10% trước khi cho dịch keratinase thô. Đơn vị hoạt động của keratinase được xác định là số lần tăng độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm sau 15 phút phản ứng so với 0,01. (Areeb *et al.*, 2012)

2.2.5 Định danh các dòng vi khuẩn được tuyển chọn

Một dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy bột lông gia súc và một dòng vi khuẩn phân hủy bột lông gia cầm mạnh nhất được tuyển chọn và được giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, đối chiếu với dữ liệu trên GenBank bằng công cụ BLAST để xác định mức độ tương đồng về trình tự của đoạn gen này với các dòng vi khuẩn đã được công bố. 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 phổ biến (8F – 1391R) dùng để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn (Baker *et al.*, 2003) có trình tự như sau:

Mồi xuôi 8F:

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Mồi ngược 1391R:

5'-GACGGGCGGTGWGTRCA -3'

Kiểm tra kích thước 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 rRNA thu được với dữ liệu trên GenBank ở trang web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dựa vào tỉ lệ tương đồng của trình tự đoạn gen 16S rRNA, kết hợp với các đặc tính hình thái và sinh hóa (theo hệ thống phân loại Bergey) để xác định loài của hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn.

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

Chọn những chiếc lông gà cùng loại có khối lượng tương đương (khoảng 10g), sấy khô ở 50°C trong vòng 2 ngày. Cho mỗi chiếc lông vào ống nghiệm chứa 20 ml môi trường gồm NaCl 0,5g/l, KH₂PO₄ 0,4 g/l, K₂HPO₄ 0,3 g/l, NH₄Cl 0,5 g/l, sao cho toàn bộ chiếc lông bị ngập trong môi trường, khử trùng ở 121°C trong 10 phút. Mỗi ống nghiệm được chũng vào 4 ml dịch huyền phù vi khuẩn, ủ ở 120rpm ở mức nhiệt độ 37°C đã khảo sát. Quan sát và ghi nhận thời gian làm gãy rụng lông đối với dòng vi khuẩn tuyển chọn trong 10 tuần.

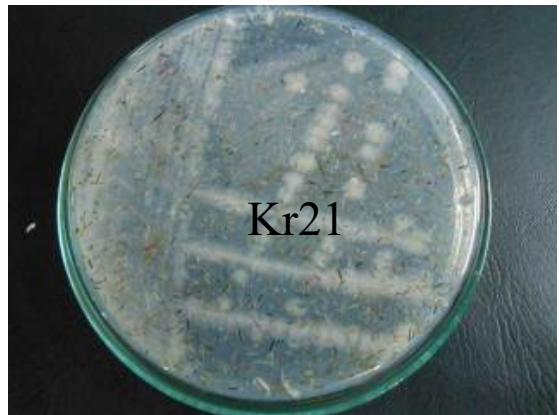
2.2.7 Phân tích kết quả và xử lý thống kê

Các kết quả trung bình các lần lặp lại và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Minitab version 16.2.1 bằng phép thử DUNCAN và LSD ở mức độ 5%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn

Từ 21 mẫu (7 mẫu đất, 7 mẫu nước, 7 mẫu lông) thu tại các lò giết mổ gia súc ở huyện Tam Bình, Long Hồ, Vũng Liêm của tỉnh Vĩnh Long đã phân lập được 47 dòng vi khuẩn trong điều kiện hiếu khí. Tất cả các dòng này đều có khả năng phát triển trên môi trường khoáng cơ bản có bổ sung bột lông heo như nguồn carbon và nitơ duy nhất, chứng tỏ chúng có khả năng sử dụng bột lông heo cho sự phát triển (Daniel *et al.*, 2009). Sau khi phân lập xong, các dòng vi khuẩn được cấy trên môi trường đặc có cùng thành phần để quan sát hình thái khuẩn lạc. Thời gian trung bình để tế bào vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc trên môi trường phân lập là từ 24 – 48 giờ. Đặc điểm về hình thái khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn được mô tả trong Bảng 1.



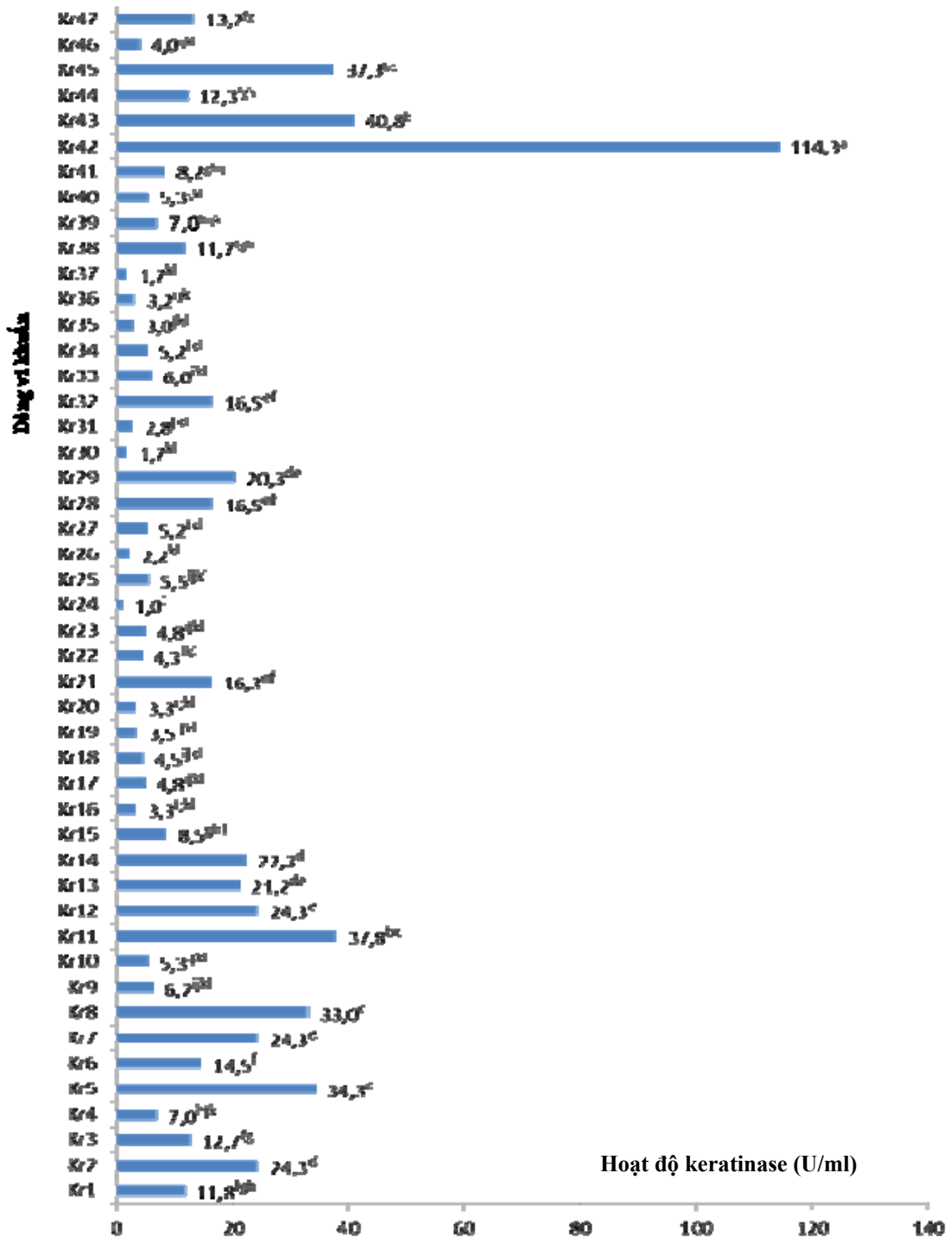
Hình 1: Hình thái khuẩn lạc của dòng vi khuẩn Kr21

Bảng 1: Đặc điểm khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn hiếu khí phân lập được

Đặc điểm	Hình thái	Số lượng khuẩn lạc	%
Màu sắc	Hồng nhạt	1	2,13
	Trắng đục	33	70,21
	Trắng trong	9	19,15
	Vàng trong	4	8,51
Hình dạng	Tròn	47	100,00
Kiểu bìa	Nguyên	19	40,43
	Răng cưa	28	59,57
Độ nổi	Mô	30	63,83
	Lài	12	25,53
	Phẳng	5	10,64

3.2 Kết quả kiểm tra hoạt tính keratinase bằng cơ chất azokeratin

Sau 2 ngày lactic (đã đồng nhất mật số vi khuẩn), enzyme thô được lọc và ly tâm để thực hiện phản ứng với cơ chất azokeratin. Kết quả tính hoạt độ enzyme keratinase của các dòng vi khuẩn được thể hiện trong Hình 2. Kết quả cho thấy hầu như tất cả các dòng vi khuẩn đều cho phản ứng với cơ chất azokeratin. Trong đó, dòng Kr42 cho hoạt tính cao nhất với 114,33U/ml, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với tất cả các dòng vi khuẩn còn lại. Các dòng Kr37, Kr30, Kr24 thuộc nhóm có hoạt độ keratinase thấp nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% và thấp hơn khoảng 68 – 114 lần so với dòng cho hoạt tính cao nhất là Kr42.



Hình 2: Hoạt tính keratinase của các dòng vi khuẩn

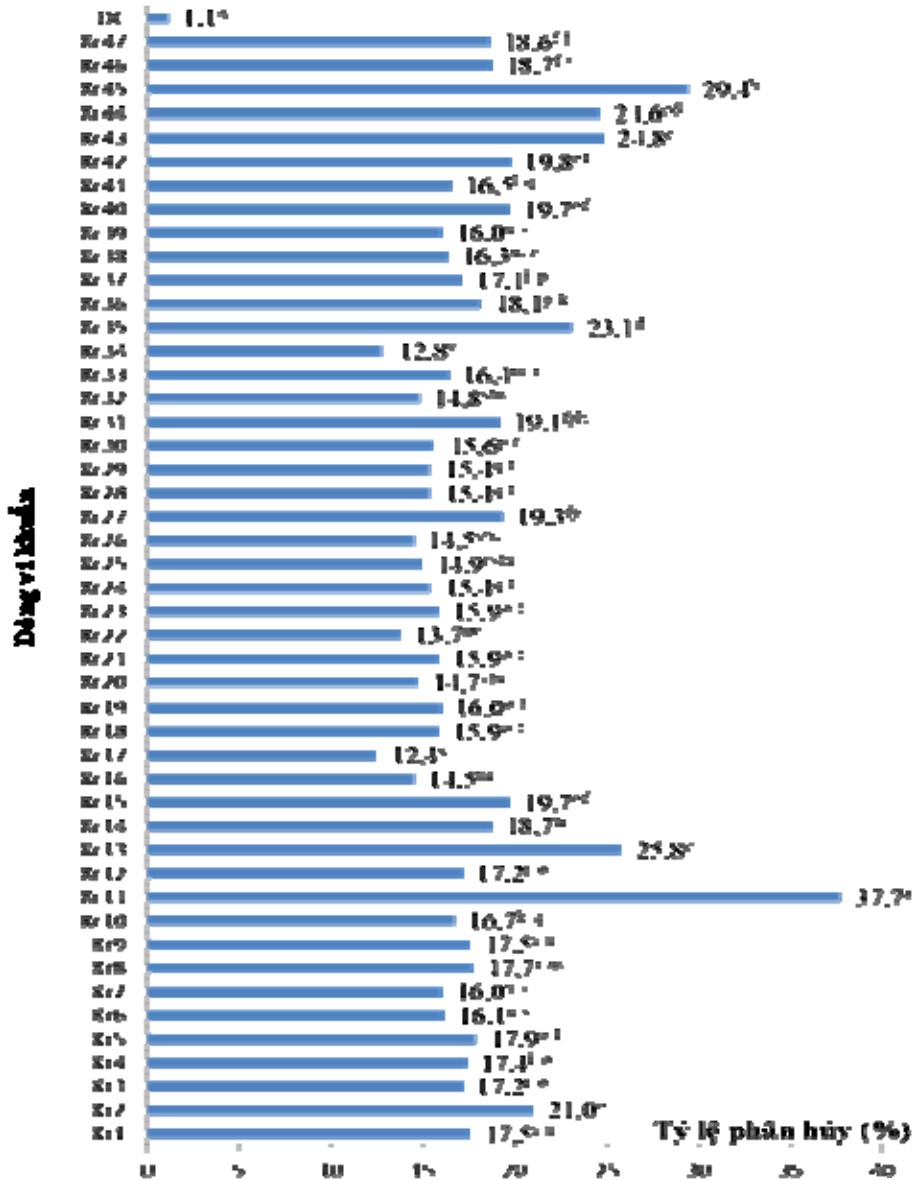
Ghi chú: - Số liệu thống kê trên hình là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

- Các giá trị trung bình có các mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5%. (theo phép thử Duncan)

Hoạt tính keratinase ở dòng Kr42 cao hơn so với hoạt tính keratinase thô trong nghiên cứu của Mozammel et al. (2005) với các mức 58,1U/ml ở dòng *Bacillus subtilis* MZK-7 và 39U/ml ở dòng *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, hay 33,9U/ml ở *Bacillus licheniformis* MZK-3. Kết quả hoạt tính

keratinase thu được có thấp hơn so với nghiên cứu của Savitha et al. (2010), tuy nhiên enzyme từ dòng *B. licheniformis* KI8102 ở nghiên cứu này là keratinase tinh sạch (hoạt tính 500 U/ml).

3.3 Khả năng phân hủy bột lông heo của các dòng vi khuẩn phân lập được



Hình 3: Khả năng phân hủy bột lông heo của các dòng vi khuẩn

Ghi chú: - DC: Mẫu đối chứng, không chủng vi khuẩn.

- Số liệu thống kê trên hình là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

- Các giá trị trung bình ở mỗi thanh có các mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 5% theo phép thử Duncan.

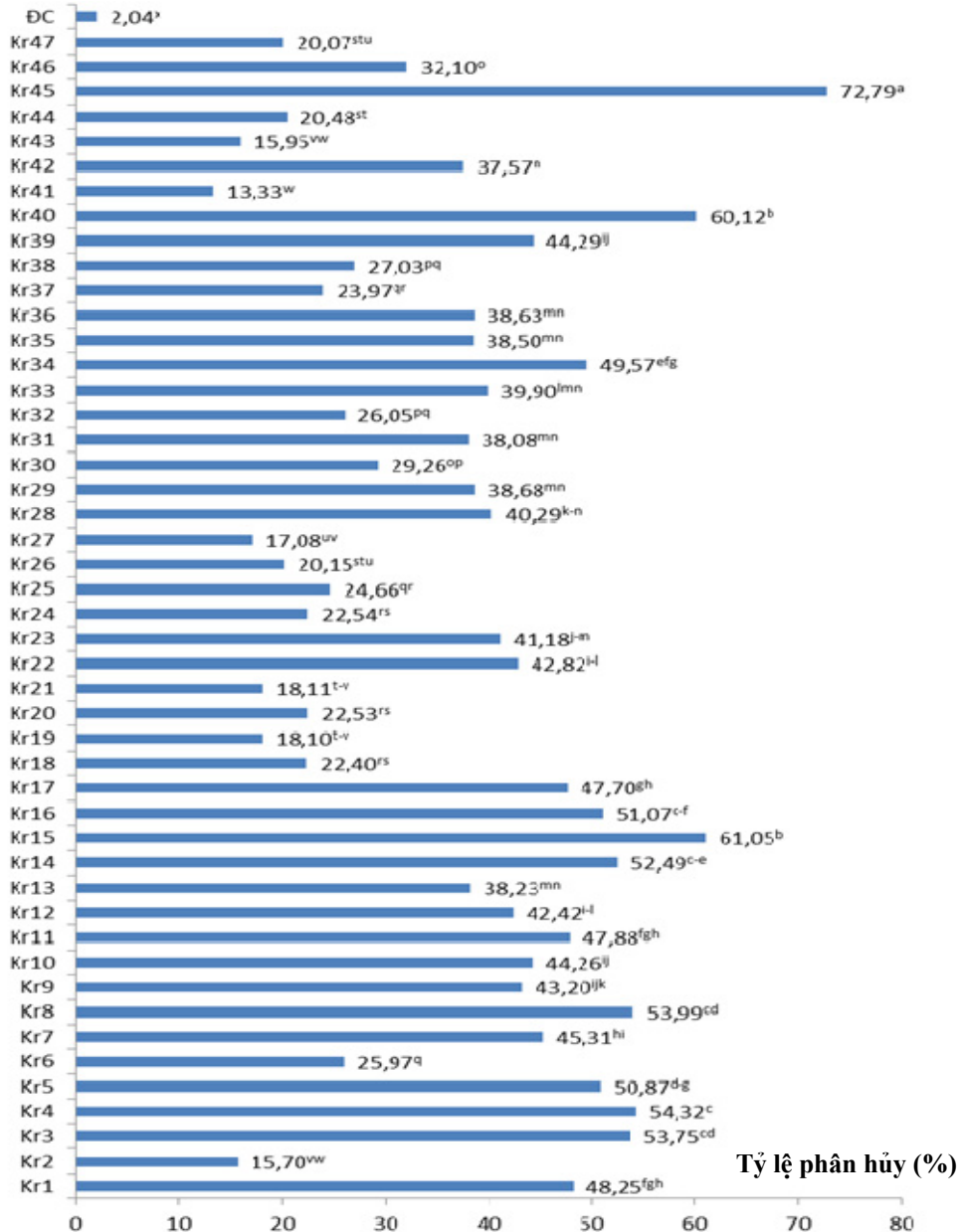
Kết quả khảo sát (hình 3) cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phân hủy

lông heo sau 7 ngày nuôi cấy với mật số vi khuẩn chủng vào lúc đầu là 4×10^{11} (CFU/ml). Dòng

Kr11 cho kết quả phân hủy bột lông heo cao nhất 37,66%, kết quả phân hủy này cao gấp khoảng 34,24 lần so với kết quả phân hủy bột lông heo ở mẫu đối chứng không chủng vi khuẩn; kể đến là dòng Kr45 với tỷ lệ phân hủy bột lông heo là 29,4% cao gấp 26,73 lần so với tỷ lệ phân hủy bột lông heo ở mẫu đối chứng. Đồng thời, kết quả phân

tích thống kê cũng cho thấy khả năng phân hủy lông heo của hai dòng này khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan so với mẫu đối chứng và với tất cả các dòng còn lại.

3.4 Khả năng phân hủy bột lông gia cầm của các dòng vi khuẩn phân lập được



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

Ghi chú: - ĐC: Mẫu đối chứng, không chủng vi khuẩn.

- Số liệu thống kê trên hình là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

- Các giá trị trung bình có các mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử Duncan

Hình 4 thể hiện khả năng phân hủy lông gia cầm của 47 dòng vi khuẩn phân lập được. Kết quả khảo sát sau 7 ngày nuôi cấy cho thấy rằng cả 47 dòng vi khuẩn đều có khả năng phân hủy lông gia cầm. Dòng vi khuẩn Kr45 có khả năng phân hủy lông gia cầm mạnh nhất với tỷ lệ là 72,79%. và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với mẫu đối chứng và với các dòng còn lại.

Kết quả thu được thể hiện khả năng phân hủy lông gia cầm cao hơn hẳn so với khả năng phân hủy lông gia súc hầu như ở tất cả các dòng vi khuẩn tương ứng (Hình 3 và Hình 4), mặc dù chúng được phân lập từ các lò giết mổ gia súc. Điều này cho thấy khả năng phân hủy cơ chất chứa keratin không chỉ phụ thuộc vào dòng vi khuẩn và hoạt độ enzyme keratinase do chúng tạo ra, mà còn phụ thuộc vào cấu trúc của keratin, chứ không bị ảnh hưởng nhiều từ nguồn phân lập. Sự khác biệt về khả năng phân hủy lông gia cầm và khả năng



Hình 5: Sợi lông gà đã phân hủy sau 10 tuần được chủng dòng Kr45 so với đối chứng

Ghi chú: ĐC- đối chứng : không chủng vi khuẩn

3.6 Kết quả định danh các dòng vi khuẩn được tuyển chọn

Dòng vi khuẩn Kr11(được phân lập từ mẫu đất ở lò giết mổ bò ở huyện Tam Bình) phân hủy lông gia súc mạnh nhất và Kr45 (được phân lập từ mẫu lông ở lò giết mổ bò ở huyện Tam Bình) phân hủy lông gia cầm mạnh nhất được chọn để định danh

phân hủy lông heo ở các dòng vi khuẩn cũng có thể là do sự khác biệt về cấu trúc keratin giữa lông gia súc (α -keratin) và lông gia cầm (β -keratin) cũng như hàm lượng sulfur (cầu nối disulfide) trong hai loại cơ chất này (Akhtar và Edwards, 1997).

3.5 Khả năng phân hủy sợi lông gà nguyên của 47 dòng vi khuẩn trong ống nghiệm

Kết quả theo dõi sự làm rụng lông con trên sợi lông gà nguyên của 47 dòng vi khuẩn sau 10 ngày nuôi cấy cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn đều có khả năng làm gãy rụng lông con trên sợi lông gà nguyên. Trong đó, dòng Kr45 và dòng Kr11 bắt đầu làm rụng lông con từ ngày thứ ba sau khi chủng và làm rụng toàn bộ lông con sau 10 ngày (chỉ còn lại lông ống) và làm tan rã toàn bộ sợi lông gà sau 10 tuần (Hình 5 và Hình 6). Các dòng còn lại cũng cho thấy khả năng làm rụng lông con từ ngày thứ tư nhưng chưa đến 50% số lông con sau 10 ngày chủng.



Hình 6: Sợi lông gà đã phân hủy sau 10 tuần được chủng dòng Kr11 so với đối chứng

bằng cách kết hợp phương pháp truyền thống theo hệ thống phân loại Bergey và phương pháp hiện đại dựa vào trình tự gen 16S rRNA.

Đặc điểm sinh hoá của hai dòng vi khuẩn tuyển chọn được khảo sát để định danh theo phương pháp truyền thống với hệ thống phân loại Bergey.

Bảng 2: Kết quả khảo sát đặc điểm của hai dòng vi khuẩn hiếu khí được tuyển chọn

STT	Dòng vi khuẩn	Khả năng di động	Hình dạng tế bào	Bào tử	Catalase	Gram	Kích thước vi khuẩn (µm)	
							Chiều dài	Chiều rộng
1	Kr11	Có	Que	Có	+	+	3,2	1,0
2	Kr45	Có	Que	Có	+	+	4,1	1,5

Như vậy, trong 35 nhóm vi khuẩn theo hệ thống phân loại Bergey (John *et al.*, 1994), có 3 nhóm cho kết quả phù hợp nhất là nhóm 18 (nhóm vi khuẩn gram dương hình cầu hoặc hình que hình thành bào tử); nhóm 19 (nhóm vi khuẩn gram dương hình que không hình thành bào tử, thường xuyên) và nhóm 20 (nhóm vi khuẩn gram dương hình que không hình thành bào tử, không

thường xuyên).

Vi hai dòng VK được tuyển chọn là nhóm vi khuẩn gram dương có bào tử (Bảng 2), nên chúng thuộc nhóm 18. Dựa vào đặc tính của các nhóm vi khuẩn hình que, có khả năng chuyển động ở Bảng 3 (trích từ John *et al.*, 1994) có thể nhận ra 2 dòng VK này không thuộc nhóm *Sporosarcina* và nhóm *Sulfidobacillus*.

Bảng 3: Phân biệt các đặc tính khác nhau giữa các nhóm vi khuẩn có bào tử

Đặc tính	<i>Amphibacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Sprohalobacter</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Sporosarcina</i>	<i>Sulfidobacillus</i>	<i>Syntrophospora</i>
Hình que	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Khả năng chuyển động	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND
Catalase	-	+	-	-	ND	-	-	+	ND	ND

Ghi chú : + : dòng dương tính ; - : dòng âm tính ;

ND: không xác định

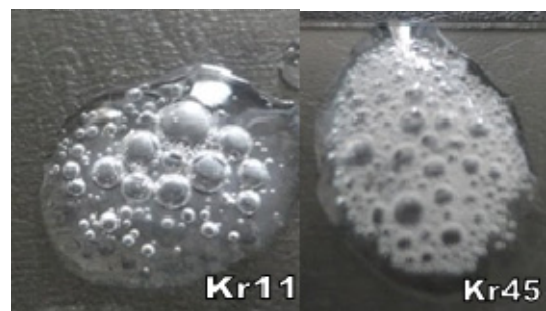
Thực hiện thử nghiệm catalase với hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn đều cho kết quả dương tính với H₂O₂ và nhóm *Bacillus* được xem là nhóm phù hợp nhất về các đặc tính sinh hoá của hai dòng vi khuẩn Kr11 và Kr45.

Kết quả khảo sát đặc điểm của 2 dòng vi khuẩn ở Bảng 2 càng cho thấy rõ nhóm *Bacillus* là nhóm vi khuẩn phù hợp nhất về các đặc tính sinh hoá của hai dòng vi khuẩn Kr11 và Kr45.

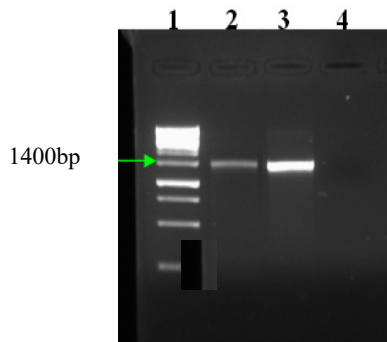
Trình tự đoạn gen 16S rDNA của hai dòng vi khuẩn trên được xác định bằng phương pháp Sinh học Phân tử. DNA của chúng được ly trích và đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 8F và 1391R.

Kết hợp với phương pháp nhận diện dựa vào

trình tự gen 16S rRNA: DNA của chúng được ly trích và đoạn gen 16S rRNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 8F và 1391R.



Hình 7: Bọt khí sinh ra khi khảo sát hoạt tính catalase của dòng vi khuẩn Kr11 và Kr45



Giếng 1: Thang chuẩn 1kp
Giếng 2: mẫu Kr11
Giếng 3: mẫu Kr45
Giếng 4: Đối chứng âm

Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose của hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn

(Ngày 12/12/2014)

Bảng 4: Kết quả mối tương quan di truyền các dòng vi khuẩn phân giải keratin phân lập với các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI)

Các dòng vi khuẩn phân lập	Đại diện loài có quan hệ gần gũi	Mã số	Tỉ lệ tương đồng (%)
Kr11	<i>Bacillus flexus</i> RB85	KJ623600	96
Kr45	<i>Bacillus megaterium</i> strain AIMST 3	HQ670528	97

Kết hợp giữa phương pháp định danh truyền thống Bergey và phương pháp định danh hiện đại dựa vào trình tự đoạn gen 16S rDNA của hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn với trình tự của các dòng vi khuẩn khác ở GenBank cho thấy chúng đều thuộc chi *Bacillus*, dòng Kr11 có quan hệ gần gũi với *Bacillus flexus* RB85, dòng Kr45 tương quan gần với dòng *Bacillus megaterium* AIMST 3.

Như vậy, hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn từ nghiên cứu này đều 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 chúng ở 30°C.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Từ chất thải lò giết mổ gia súc đã phân lập được vi khuẩn có khả năng phân hủy lông gia súc (lông heo) và lông gia cầm. Khả năng phân hủy cơ chất chứa keratin không chỉ phụ thuộc vào hoạt tính keratinase mà còn phụ thuộc vào các yếu tố khác (có thể là tế bào vi khuẩn và kiểu cấu trúc keratin, Edward *et al.*, 2001). Trong thí nghiệm, hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy lông heo mạnh (*Bacillus flexus* Kr11) và lông gia cầm mạnh (*Bacillus megaterium* Kr45) đều thuộc chi *Bacillus*, kỳ vọng ứng dụng để xử lý rác thải chứa keratin. Dòng vi khuẩn Kr45 liên quan gần với loài *Bacillus megaterium* với khả năng phân hủy cọng

lông gà nguyên hoàn toàn sau 10 tuần có tiềm năng đưa vào thử nghiệm ứng dụng phân hủy lông gia cầm ở điều kiện môi trường tự nhiên để làm thức ăn chăn nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akhtar W. and H.G.M. Edwards, 1997. Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. *Spectrochim Acta*. 53: 81-90.
Barker G.C., J.J.Smith and D.A. Cowan, 2003. Review and reanalysis of domain specific 16S primers. *Journal of Microbiological Method*. 55: 541-555.
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.
Edward H.Burt, Jr. and Jann M.Ichida, 2001. Bacteria useful for degrading keratin. United States Patent.
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.
- Gupta, R. and P. Ramnani, 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70:21–33.
- Mohammad, S. H., K. A. Abul, S. M. Abu Sayem, M. Golam and H. Mozammel, 2007. Production and Partial characterization of feather-degrading keratinolytic serine protease from *Bacillus licheniformis* MZK-3. *J. Biological Sciences*, 7 (4):599-606.
- Nguyễn Huy Hoàng, Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Quỳnh Mai và Nguyễn Ngọc Dũng. 2010. Phân lập chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lông vũ tạo nguồn thức ăn cho nuôi trồng thủy sản. *Toàn văn Hội nghị thủy sản 2010*.
- Savitha S. Desai, Swati Hegde, Preeti Inamdar, Nagaraj Sake and M. S. Aravind, 2010. Isolation of keratinase from bacterial isolates of poultry soil for waste degradation, *International Journal of Engineering in Life Sciences*, Volume 10, Issue 4, pages 361–367.
- John G. Holt, Peter H.S. and Nobel R.K., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins, United States, 9-754 pp.
- Joshi S.G., Tejashwini M.M., Revati N., Sridevi R. and Roma D., 2007. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *International Journal of Poultry Science*. 6(9): 689-693.
- Park Geun.Tea and Hong-Joo Son, 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. *Microbiological Research*, 164: 478-485.
- Tapia D.M.T. and J. Contiero, 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.