

Bài báo nghiên cứu

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI VI KHUẨN SINH PROTEASE TỪ LÒ MỔ GIA CẦM TẠI TIỀN GIANG

Đoàn Thị Ngọc Thanh^{*}, Đoàn Thị Kim Tuyền

Trường Đại học Tiền Giang, Việt Nam

**Tác giả liên hệ: Đoàn Thị Ngọc Thanh – Email: dtntthanh@tgu.edu.vn*

Ngày nhận bài: 30-8-2023.; ngày nhận bài sửa: 02-10-2023; ngày duyệt đăng: 16-10-2023

TÓM TẮT

Một trong những thành phần chính của chất thải chăn nuôi là protein. Do vậy, vi sinh vật sinh protease đã và đang được áp dụng trong quá trình xử lý chất thải cũng như có nhiều nghiên cứu được thực hiện để tìm nguồn vi sinh vật bản địa có khả năng phân giải protein. Nghiên cứu này đã phân lập 41 chủng có khả năng phân giải protein từ mẫu đất, nước và bùn bể nước thải của lò mổ gia cầm tại Tiền Giang. Trong đó, có 3 chủng cho hoạt tính protease ngoại bào cao nhất là T17, T24 và T36 với kết quả phân loại khi so sánh trình tự đoạn 16S rRNA trên ngân hàng NCBI tương ứng là *Bacillus subtilis*, *Bacillus statosphericus*, *Bacillus flexus*. Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh protease cho thấy cả ba chủng đều có khả năng sinh protease ngoại bào ở khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 45°C, pH thích hợp cho việc sản sinh protease của ba chủng khác nhau là khác nhau. Đây là dữ liệu ban đầu cho việc áp dụng các chủng này trong xử lý môi trường có nhiều protein.

Từ khóa: *Bacillus flexus*; *Bacillus statosphericus*; *Bacillus subtilis*; lò mổ gia cầm; vi khuẩn sinh protease; tỉnh Tiền Giang

1. Giới thiệu

Tỉnh Tiền Giang là một trong những tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long có quy mô chăn nuôi gia cầm lớn của cả nước. Gia cầm được phân phối trực tiếp hoặc sau khi giết mổ đến các nơi tiêu thụ. Ngoài 14 lò giết mổ gia cầm được kiểm soát vệ sinh, có rất nhiều địa điểm giết mổ tự phát, không xử lý nước thải trước khi thải ra môi trường gây ô nhiễm nguồn nước (Tien Giang Department of Statistics, 2022). Trong thành phần chất thải của lò mổ, protein chiếm tỉ lệ khá cao (15%-25%). Do đó, việc xử lý rác thải, nước thải từ các lò mổ gia cầm cần có enzyme protease (Johns, 1995). Trong đó, việc áp dụng vi sinh vật sinh protease vào quá trình xử lý là một trong những biện pháp sinh học được ứng dụng rộng rãi do việc áp dụng chế phẩm enzyme riêng lẻ gặp nhiều hạn chế. Do đó, các nghiên cứu về phân lập, thu nhận những vi sinh vật sinh protease có khả năng sinh enzyme trong khoảng pH và nhiệt

Cite this article as: Doan Thi Ngoc Thanh, & Doan Thi Kim Tuyen (2023). Isolation, screening, and survey of culture conditions of protease-producing bacteria from Tien Giang poultry slaughterers. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(10), 1696-1706.

độ rộng vẫn đang được thực hiện trên thế giới, nhằm định hướng ứng dụng trong công nghiệp thuộc da, công nghiệp tẩy rửa, công nghiệp xử lý môi trường (Mussarat et al., 2008; Raga et al., 2013; Sanchez-Gonzalez, 2011). Ở Việt Nam, nhiều nghiên cứu về phân lập vi sinh vật sản sinh protease được thực hiện nhằm tìm ra chủng vi sinh sản sinh enzyme protease cho việc xử lý môi trường nước nuôi thủy sản, nước thải nhà máy chế biến thịt, cá, lò mổ gia súc (Nguyen & Phan, 2014; Vo et al., 2012; Hoang & Pham, 2020). Khi dùng biện pháp xử lý bằng vi sinh cần chú ý điều kiện môi trường sống của chúng tại nơi xử lý, vì vậy việc phân lập vi sinh từ nhiều địa điểm khác nhau hoặc tuyển chọn vi sinh bản địa sau đó thuần hóa sẽ mang lại lợi ích lâu dài hơn (Sanchez-Gonzalez, 2011; Nguyen & Nguyen, 2017). Nghiên cứu này phân lập vi sinh sản sinh protease từ mẫu nước thải, mẫu đất và mẫu bùn trong bể thải của lò mổ gia cầm tại Tiền Giang định hướng tạo ra chế phẩm vi sinh xử lý chất thải chứa nhiều protein như chất thải từ trang trại chăn nuôi, chất thải từ nhà máy chế biến gia cầm, thủy hải sản.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu dùng phân lập vi khuẩn sinh protease

Mẫu đất, mẫu nước thải và bùn đáy bể trữ nước thải của 03 lò mổ gia cầm tại huyện Châu Thành, Tiền Giang được dùng để phân lập vi khuẩn sinh protease.

2.1.2. Môi trường và hóa chất

Môi trường Nutrient bổ sung casein (NC) rắn dùng cho phân lập vi khuẩn sinh protease (Pepton 10 g/l, cao nấm men 3 g/l, NaCl 5 g/l, casein 10 g/l, agar 20 g/l); môi trường Tryptone Soya Broth (TSB, pH 7,5, Himedia Ấn Độ). Tất cả môi trường được hấp khử trùng ở 121⁰C, 15 phút (Nguyen & Phan, 2014).

Hóa chất đo hoạt tính protease: dung dịch casein 1% (được pha trong đệm phosphate pH 7,5), trichloroacetic acid 5%, NaOH 0,5N, HCl 0,2N, Tyrosin chuẩn 1mM.

Hóa chất nhuộm Gram, Malachite green, bộ Kit GenAll (Hàn Quốc) dùng li trích DNA và hóa chất khuếch đại gen (2x Master Mix, cặp mồi universal 27F: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', 1492R: 5'TACGGTTACCTTGTTACGACTT 3').

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu đất: chung quanh lò mổ gia cầm, dùng dao đã khử trùng lấy mẫu cách mặt đất 02-10cm, thu khoảng 100 g mẫu vào dụng cụ chứa vô trùng, ở mỗi lò mổ lấy 03 vị trí. Mẫu nước: chọn 05 vị trí thu mẫu khác nhau của một bể chứa nước thải (nước trong bể được lưu trước khi thải), dùng chai đã vô trùng thu 100 ml nước thải. Mẫu bùn đáy bể: dùng gàu thu mẫu vớt bùn tại 05 vị trí khác nhau của bể chứa nước thải, dùng chai vô trùng thu 100 ml bùn. Tất cả các mẫu được vận chuyển lạnh về phòng thí nghiệm phân tích trong vòng 24 giờ.

2.2.2. Phân lập và sàng lọc vi khuẩn sinh protease

Tất cả các mẫu được pha loãng bậc 10 và 100 μ l dịch pha loãng được trải trên đĩa thạch môi trường NC. Sau khi ủ ở 37⁰C, 24 giờ, những khuẩn lạc trên đĩa có vòng phân giải casein xung quanh được chọn cấy chuyển và làm thuần.

Các chủng sau khi làm thuần được nuôi cấy lắc trong 5 ml môi trường TSB, pH 7,5 ở 37⁰C. Sau 16 giờ, dịch nuôi cấy được li tâm trong 15 phút, 6000 vòng/phút, thu lấy dịch nổi. Chuẩn bị các đĩa môi trường NC đã được đục lỗ, mỗi lỗ 5 mm. Sau đó, cho 100 μ l dịch trên vào mỗi lỗ thạch, ủ các đĩa petri ở 30⁰C và tiến hành đo đường kính thủy phân sau 24 giờ để đánh giá sơ bộ hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn. Trong đó, Đường kính thủy phân = Đường kính vòng Halo – Đường kính lỗ thạch (Hoang & Pham, 2020).

2.2.3. Đo hoạt tính protease ngoại bào

Các chủng có đường kính thủy phân casein lớn từ thí nghiệm trên được nuôi cấy lắc trong môi trường TSB ở 37⁰C. Sau 16 giờ, dịch nuôi cấy sau li tâm loại tế bào được đo hoạt tính protease bằng phương pháp Anson cải tiến: hút 1 ml dịch chứa enzyme vào ống nghiệm chứa 5 ml casein 1% pH 7,5, ủ ở 37⁰C trong 20 phút; dừng phản ứng bằng 10 ml TCA, để yên 30 phút và lọc, dịch trong của sản phẩm phân giải được cho phản ứng với thuốc thử Folin. Sau 10 phút, 2 ml hỗn hợp được đo ở bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn Tyrosin để tính toán nồng độ Tyrosin tạo ra. Một đơn vị hoạt tính của protease được định nghĩa là lượng enzyme thủy phân casein giải phóng ra một lượng amino acid tương đương 1,0 mM Tyrosin trong vòng 1 phút ở 37⁰C, pH7,5. Mỗi thí nghiệm đo hoạt tính được lặp lại 3 lần, mỗi lần là 1 ống nghiệm 10 ml (Vo et al., 2012).

Công thức tính hoạt tính enzyme:

Hoạt tính enzyme = (Tx16)/(1x20x2) (U/ml) với T là số μ M Tyrosin được giải phóng.

2.2.4. Phân loại sơ bộ vi khuẩn sinh protease

Chọn 03 chủng vi khuẩn sinh có khả năng sinh protease cao được quan sát hình thái qua nhuộm Gram, nhuộm bào tử với Malachite Green. Sau đó, tiến hành tách chiết DNA bộ gen vi khuẩn bằng bộ Kit Exgene™ cell SV (GeneAll). Trình tự 16S rRNA được khuếch đại trong máy luân nhiệt với chu trình nhiệt: 94⁰C 4 phút, (94⁰C 4 phút, 50⁰C 1 phút, 72⁰C 2 phút) x 30 chu kỳ, 72⁰C 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Kit Expin™ PCR SV (GeneAll) và được gửi Công ty Macrogen để giải trình tự. Trình tự nucleotide được so sánh với ngân hàng dữ liệu trên NCBI bằng công cụ BLAST (Nguyen & Nguyen, 2017).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến hoạt tính protease ngoại bào

Chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao hơn giữa các chủng nghiên cứu để khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh protease. Khảo sát pH và nhiệt độ thích hợp: thí nghiệm được bố trí 2 nhân tố nhiệt độ (ba mức độ: 23⁰C, 30⁰C, và 37⁰C) và pH (năm giá trị: 6; 6,5; 7; 7,5; 8), tổng số có 15 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi lần lặp lại là 10 ml môi trường TSB được chủng 200 μ l vi khuẩn đã nuôi qua đêm. Sau 24 giờ nuôi cấy lắc 200 vòng/phút, dịch khuẩn được thu nhận và đo hoạt tính protease (Nguyen et al., 2019).

2.2.6. Xử lý số liệu

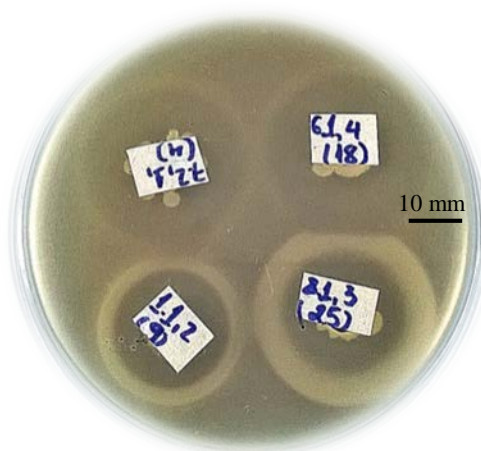
Các kết quả được nhập và phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS. Phân tích phương sai ANOVA 1 nhân tố, 2 nhân tố và so sánh giá trị trung bình bằng kiểm định DUNCAN để phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh protease

Từ 39 mẫu gồm đất, nước thải và bùn từ 03 lò mổ gia cầm, đã phân lập được 41 chủng có khả năng phát triển trên môi trường NC và cho vòng phân giải casein xung quanh khuẩn lạc. Trong đó, có 26 chủng được phân lập từ mẫu nước, 10 chủng phân lập từ đất và 5 chủng được phân lập từ bùn. Điều này cho thấy, sự phân bố của vi sinh vật phân giải protein hiện diện trong nhiều loại mẫu khác nhau, tương tự như nghiên cứu của Võ Hồng Thi và cộng sự (Vo et al., 2012).

Từ 41 chủng thu được, tiến hành đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào trong môi trường lỏng. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSB ở 37°C, lắc 200 vòng/phút, sau 24 giờ đo hoạt tính protease được tiết ra trong dịch nuôi cấy sau li tâm. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy 41 chủng được phân lập có khả năng sinh protease ngoại bào để phân cắt casein trong môi trường thạch. Đường kính thủy phân dao động từ 10 đến 26 mm. Hình 1 cho thấy vòng phân giải casein của protease ngoại bào từ các chủng phân lập. Kết quả này rất tiềm năng so với nghiên cứu trước đây khi cho thấy vi khuẩn sinh protease tốt nhất trong 180 chủng phân lập từ dạ cỏ bò, nước thải nhà máy sữa cho đường kính thủy phân là 17,3 mm (Nguyen & Nguyen, 2017) trong khi hai chủng sinh protease tốt nhất được phân lập từ nước thải lò mổ gia súc tại Huế có đường kính vòng phân giải là 24,7 và 27,3 mm (Hoang & Pham, 2020). Cùng nhóm tác giả của nghiên cứu trên cũng phân lập được vi khuẩn sinh protease từ nước rỉ rác cho thấy hoạt tính enzyme mạnh hơn thông qua đường kính vòng phân giải của hai chủng mạnh nhất lần lượt là 30,8 và 33,5 mm (Hoang & Tran, 2020). Điều này cũng cho thấy với những nguồn mẫu khác nhau, địa điểm khác nhau thì thu nhận được các chủng có hoạt tính khác nhau.



Hình 1. Hình ảnh vòng phân giải casein của dịch nuôi các chủng T04, T09, T18 và T25

Sau khi xác định sơ bộ hoạt tính protease của 41 chủng thông qua đường kính thủy phân, chọn 15 chủng có đường kính thủy phân cao hơn trong Bảng 1 (18 mm trở lên) để tiếp tục đo hoạt tính protease ngoại bào của chúng bằng phương pháp Anson cải tiến. Kết quả trong Bảng 2 cho thấy, hoạt tính protease ngoại bào của các chủng dao động từ 0,13 đến 0,48 U/ml. Do mục tiêu của nghiên cứu là sàng lọc vi khuẩn sinh protease cao để phục vụ cho việc tạo chế phẩm xử lý môi trường có ô nhiễm protein sau này, nên 3 chủng có hoạt tính protease ngoại bào mạnh nhất được chọn để nghiên cứu các nội dung tiếp theo. Ba chủng có hoạt tính enzyme cao nhất là T17, T24 và T36 với hoạt tính enzyme lần lượt là 0,45; 0,48 và 0,40 U/ml. Hoạt tính protease của chủng T24 trong nghiên cứu này tương đương trong nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Anh và cộng sự khi phân lập vi khuẩn từ sữa cho thấy hoạt tính protease cao nhất là 0,43 U/ml (Nguyen & Nguyen, 2017), nhưng thấp hơn hoạt tính protease trong nghiên cứu của Võ Hồng Thi và cộng sự phân lập từ nước thải chế biến thịt và thủy sản (1,15 U/ml) (Vo et al., 2012). Trong nghiên cứu phân lập, định danh và tối ưu hóa môi trường cho việc sản sinh protein ngoại bào của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* Bs04 đã báo cáo hoạt tính cao nhất là 0,7 U/ml (Nguyen et al., 2019). Như vậy, từ kết quả hoạt tính trên đĩa thạch và hoạt tính protease ngoại bào, các chủng trên được chọn để sử dụng cho những nghiên cứu tối ưu sau này.

Bảng 1. Đường kính thủy phân casein của 41 chủng phân lập

Tên chủng mã hóa	Đường kính thủy phân (mm)	Tên chủng mã hóa	Đường kính thủy phân (mm)	Tên chủng mã hóa	Đường kính thủy phân (mm)
T01	13	T15	18	T29	17
T02	18	T16	10	T30	17
T03	15	T17	20	T31	17
T04	17	T18	17	T32	15
T05	18	T19	16	T33	22
T06	13	T20	18	T34	15
T07	20	T21	17	T35	17
T08	17	T22	15	T36	20
T09	13	T23	18	T37	11
T10	18	T24	26	T38	18
T11	17	T25	16	T39	15
T12	16	T26	18	T40	21
T13	15	T27	17	T41	21
T14	14	T28	13		

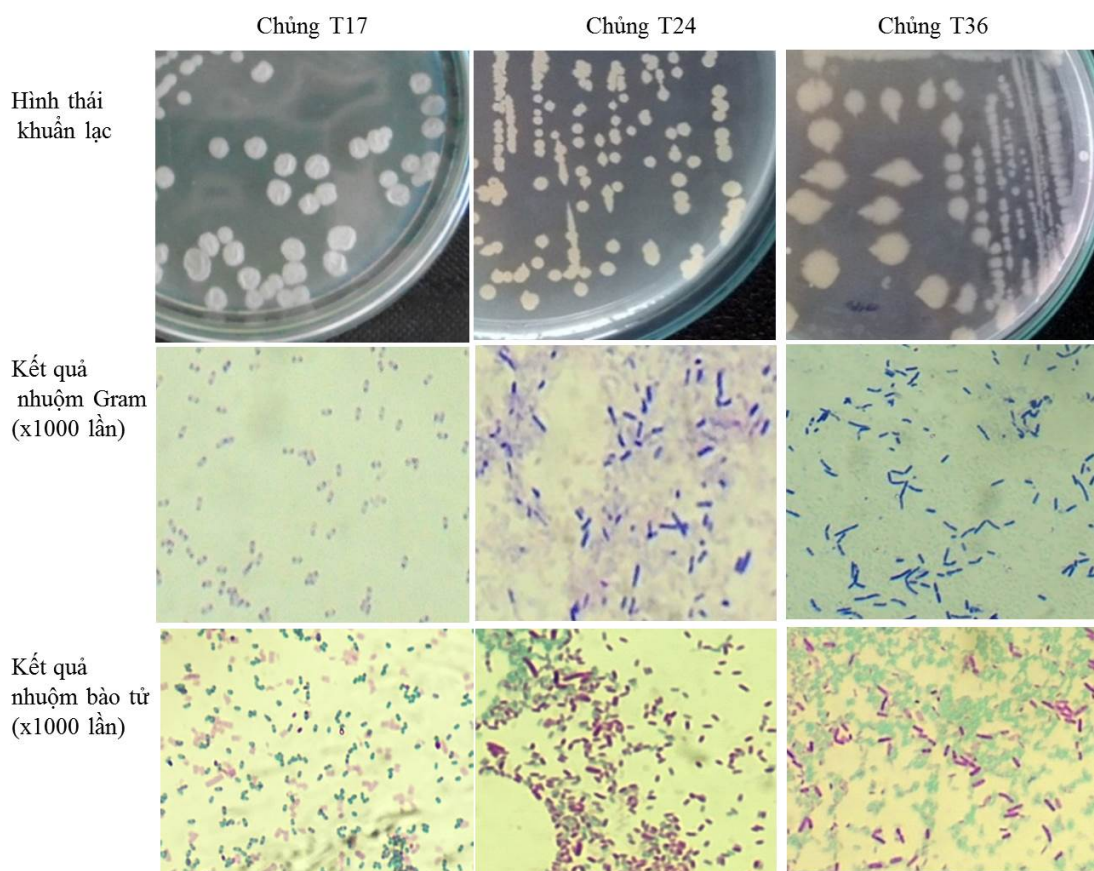
Bảng 2. Hoạt tính enzyme protease ngoại bào của các 15 chủng phân lập

Tên chủng mã hóa	Hoạt tính enzyme (U/ml)	Tên chủng mã hóa	Hoạt tính enzyme (U/ml)
T02	0,13±0,01	T24	0,48±0,05
T05	0,15±0,03	T26	0,36±0,05
T07	0,37±0,04	T33	0,38±0,03
T10	0,21±0,03	T36	0,40±0,04
T15	0,29±0,04	T38	0,35±0,04
T17	0,45±0,04	T40	0,33±0,03
T20	0,35±0,04	T41	0,37±0,05
T23	0,36±0,04		

3.2. Đặc tính của các chủng vi khuẩn sinh protease được sàng lọc

3.2.1. Hình thái của các chủng vi khuẩn sinh protease được sàng lọc

Ba chủng vi khuẩn có hoạt tính protease ngoại bào cao nhất là T17, T24, T36 được kiểm tra đặc tính Gram và khả năng sinh bào tử. Kết quả từ Hình 2 cho thấy ba chủng đều có hình dạng tế bào là hình que, Gram dương và có khả năng sinh bào tử.



Hình 2. Hình thái các chủng vi khuẩn T17, T24, T36

3.2.2. Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

DNA của 3 chủng vi khuẩn được li trích bằng bộ Kit GenAll và dùng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1495R. Sản phẩm PCR được tinh chế và gửi giải trình tự. Trình tự thu được có tín hiệu rõ ràng, không bị nhòe, không trùng đỉnh tín hiệu được chọn để so sánh trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST. Đoạn trình tự đạt yêu cầu có kích thước 1366 bp (chủng T36), 1382 (chủng T24) và 1400 bp (chủng T17) được so sánh trên ngân hàng NCBI. Kết quả so sánh trình tự được trình bày trong Bảng 3.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy cả ba chủng trong nghiên cứu này đều thuộc giống *Bacillus*. Trong đó, chủng T17 tương đồng 100% với *B. subtilis*, chủng T24 tương đồng 100% với *B. stratosphericus* và chủng T36 tương đồng 99% với *B. flexus*.

Bảng 3. Kết quả định danh bằng so sánh đoạn 16S rRNA

Tên chủng	Accession number	Tên vi khuẩn	Max score	Total score	Query Coverage	E-value	Max Identity	Gap
T17	KY76606 7.1	<i>Bacillus subtilis</i> MSB3	2586	2586	100%	0,0	100%	0%
T24	MF52156 5.1	<i>Bacillus stratosphericus</i> SSPR13	2567	2567	100%	0,0	100%	0%
T36	MG40766 3.1	<i>Bacillus flexus</i> VISTP6	2477	2477	99%	0,0	99%	0%

Trong nhiều nghiên cứu, đa số chủng vi khuẩn có khả năng sinh protease cao được phân lập từ nhiều nguồn mẫu khác nhau thường thuộc giống *Bacillus*. Trong đó *B. subtilis* là vi khuẩn thường được tìm thấy nhất trong các nghiên cứu do sự phân bố rộng, khả năng sinh enzyme ngoại bào như protease, cellulase, amylase cao và là sinh vật an toàn sử dụng trong sản xuất enzyme công nghiệp (Schallmeyer et al., 2004). *B. stratosphericus* được tìm thấy lần đầu trên không khí cách mặt đất hơn 30 km, được xem là loài hiếm, có khả năng tiết protease kiềm, duy trì hoạt tính trong khoảng nhiệt độ và pH rộng (Raga et al., 2013). *B. flexus* có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào như protease, xylanase, amylase và phenolic acid esterase và có tiềm năng ứng dụng cao trong công nghiệp (Sanchez-Gonzalez et al., 2011).

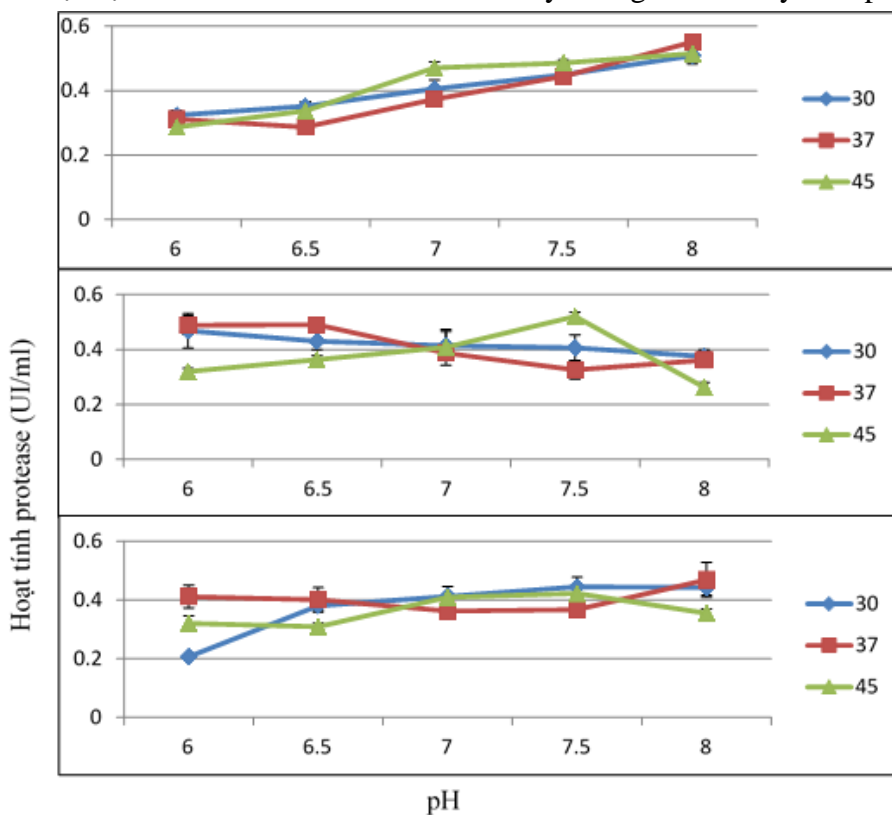
3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ nuôi đến khả năng sinh protease

Ảnh hưởng của pH ban đầu và nhiệt độ nuôi cấy đến hoạt tính enzyme ngoại bào trong môi trường TSB được trình bày trong Hình 3.

Đối với chủng T17, khoảng nhiệt độ nghiên cứu trong đề tài không ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme nhưng pH có ảnh hưởng thuận với hoạt tính enzyme; hoạt tính càng tăng khi pH tăng ở và đạt tối đa là 0,52 U/ml ở pH 8. Trong các nghiên cứu trước đây cho thấy chủng *B. subtilis* có khả năng sinh protease ở pH kiềm cao: Sivasubramanian và cộng sự, 2008 cho thấy pH ban đầu thích hợp là 9 (Sivasubramanian et al., 2008), trong khi Musarat và cộng sự công bố là 11 (Musarat et al., 2008).

Trong nghiên cứu này, hoạt tính enzyme ngoại bào của chủng T24 được nuôi cấy ở khoảng nhiệt độ từ 30-45⁰C không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (độ tin cậy 95%), ở nhiệt độ 45⁰C, hoạt tính vẫn duy trì ở mức 0,38 U/ml so với 0,41 U/ml ở 37⁰C, tương tự như nghiên cứu của Raga Aruna Bindu và cộng sự. Tác giả trên công bố chủng *B. stratosphericus* DF sinh trưởng và sản sinh protease ngoại bào có hoạt tính duy trì từ 25⁰C đến 45⁰C và đạt cao nhất ở 35⁰C. Tuy nhiên, khoảng pH tối thích trong nghiên cứu trên là pH kiềm, hoạt tính protease tăng dần từ pH 6 và đạt cao nhất ở pH 10, giảm ở pH 11 (Raga et al., 2013); trong khi nghiên cứu này cho thấy hoạt tính protease cao nhất 0,43 U/ml thu được ở pH 6,5 và tại pH 8 hoạt tính giảm 1,3 lần so với hoạt tính cao nhất.

Công trình nghiên cứu về điều kiện môi trường tối thích cho sản sinh enzyme ngoại bào của chủng *B. flexus* cho thấy mỗi chủng có điều kiện tối thích khác nhau. (Sanchez-Gonzalez et al., 2011) tìm ra hai chủng *B. flexus* có khả năng sinh phenolic acid esterase phân lập từ bánh bắp nejayote cho thấy pH tối ưu của chủng *B. flexus* NJY2 là 6 trong khi chủng NJY4 là 8. Hai chủng đều sản sinh enzyme ngoại bào cao nhất tại 40⁰C. Nghiên cứu của Sankaralingam và cộng sự cho thấy protease được *B. flexus* sản sinh nhiều nhất trong điều kiện pH 7 và 40⁰C, giảm nhẹ ở pH 8 và 45⁰C (Sankaralingam et al., 2014). Trong nghiên cứu này, chủng T36 sản sinh protease ngoại bào với hoạt tính cao nhất thu được ở pH 8 là 0,42 U/ml. Nhiệt độ từ 30⁰C-45⁰C đều có thể nuôi cấy chủng vi sinh này sinh protease.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng (Từ trên xuống: chủng T17, chủng T24 và chủng T36)

Khi phân tích tương quan hai nhân tố cho thấy pH và nhiệt độ không tương quan với nhau ($p > 0,05$), nghĩa là hoạt tính protease của các chủng khi phân tích ở 3 mức nhiệt độ trong nghiên cứu này không phụ thuộc vào pH ban đầu của môi trường.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã phân lập được 41 chủng có khả năng sinh protease ngoại bào từ 39 mẫu đất, nước và bùn trong ao xử lý của 3 lò mổ gia cầm trong tỉnh Tiền Giang. Trong đó có 15 chủng cho đường kính vòng phân giải casein ≥ 18 mm. Hoạt tính protease ngoại bào đo được bằng phương pháp Anson cải tiến cho thấy có 3 chủng có khả năng sinh enzyme cao nhất là T17 (0,44 U/ml), T24 (0,48 U/ml) và T36 (0,40 U/ml). Ba chủng này đều có hình que, Gram dương và sinh bào tử. Kết quả so sánh dựa trên trình tự 16S rRNA trên NCBI cho thấy chủng T17 tương đồng 100% với *Bacillus subtilis* MSB3, chủng T24 tương đồng 100% với *Bacillus stratosphericus* SSPR13, và chủng T36 tương đồng 99% với *Bacillus flexus* VISTP6. Nhiệt độ và pH thích hợp cho việc sản sinh protease của ba chủng vi khuẩn trong khoảng 30-45°C không ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, pH cho hoạt tính enzyme cao nhất trong nghiên cứu này của *B. subtilis* là 8, của *B. stratosphericus* là 6,5 và của *B. flexus* là 8. Dựa vào những thông số này có thể áp dụng cho việc xử lý môi trường thích ứng cho từng loại mẫu.

- ❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.
- ❖ **Lời cảm ơn:** Đề tài này được tài trợ kinh phí bởi Trường Đại học Tiền Giang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hoang, D. T. H., & Pham, T. H. (2020). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải protein từ lò giết mổ gia súc ở Thừa Thiên Huế [Isolation and selection of proteolytic bacteria from slaughterhouses in Thua Thien Hue province]. *Proceedings of National Conference on Biotechnology*, 420-425.
- Hoang, D. T. H., & Tran, T. H. N. (2020). Phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn phân giải protein và cellulose trong nước rỉ rác ở Thừa Thiên Huế [Isolation and selection of proteolytic and cellulolytic bacteria from wastewater of municipal solid waste in Thua Thien – Hue Province]. *Journal of Science and Technology, Hue University of Science*, 15(2), 111-119.
- Johns, M. R. (1995). Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: A review. *Bioresource Technology*, 54(3), 203-216. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00140-9)
- Mussarat, S., Aamer, A. S., Abdul, H., & Fariha, H. (2008). Influence of culture condition on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pakistan Journal of Microbiology*, 40(5), 2161-2169.

- Nguyen, H. A., & Nguyen, V. G. (2017). Tuyển chọn, định danh vi khuẩn Bacillus sinh enzyme protease, và xác định đặc tính chịu nhiệt của enzyme [Screening, identification of protease producing Bacillus and characterization of thermo-tolerant enzyme]. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 15(8), 1062-1069.
- Nguyen, H. T., Pham, T. D., Phan, T. K. N., & Ngo, V. K. T. (2019). Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp protease từ vi khuẩn Bacillus subtilis Bs04 và xác định đặc tính của enzyme [Optimisation of the conditions for protease synthesis from Bacillus subtilis Bs04 and characterisation of the enzyme]. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 61(8), 12-17. <https://vjol.info.vn/index.php/khcn/article/view/44236>
- Nguyen, V. P., & Phan, T. P. T. (2014). Phân lập, định danh và xác định các đặc tính có lợi của chủng Bacillus spp. từ ao nuôi tôm ở tỉnh Bến Tre [Isolating, identifying and determining the beneficial properties of Bacillus spp. strains from shrimp ponds in Ben Tre Province]. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 64, 94-102. <https://vjol.info.vn/index.php/sphcm/article/view/18287>
- Raga, A. B. D., Silpa, S., Rajesh, B., & Bhaskar, R. I. (2013). Isolation and Identification of A Novel Strain Bacillus stratosphericus DF Producing Alkaline Protease and Optimization of Enzyme Production. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4(11), 444-451.
- Sanchez-Gonzalez, M., Blanco-Gamez, A., Escalante, A., Valladares, A.G., & Olver, C. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic Bacillus flexus strains from maize processing waste water (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 413-419. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03021.x>
- Sankaralingam, S., Meenakshi, S. V., Chardrasekar, M., Shankar, T., Prabu, D., & YasodKumar, N. (2014). Solid state fermentation of protease production by newly isolated Bacillus flexus. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 4(1), 66-78.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Sivasubramanian, S., Manohar, B. S., & Puvanakrishnan, R. (2008). Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 70(6), 1025-1034. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.07.084>
- Tien Giang Department of Statistics. (2022). *Tình hình kinh tế - xã hội tỉnh Tiền Giang năm 2022* [The Socio-economic situation of Tien Giang Province February 2022]. <http://thongkietiengiang.gov.vn/Info.aspx?id=2812202215750486>
- Vo, H. T., Nguyen, H. M., & Pham, T. H. (2012). Hoạt tính protease của một số chủng Bacillus phân lập từ nước thải chế biến thịt và thủy hải sản [Study of protease activity of several Bacillus strains isolated from slaughterhouse and seafood processing wastewater]. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 28(2), 116-124. <https://js.vnu.edu.vn/NST/article/view/1178>

**ISOLATION, SCREENING, AND SURVEY OF CULTURE CONDITIONS
OF PROTEASE-PRODUCING BACTERIA
FROM TIEN GIANG POULTRY SLAUGHTERS**

*Doan Thi Ngoc Thanh**, *Doan Thi Kim Tuyen*

Tien Giang University, Vietnam

**Corresponding author: Doan Thi Ngoc Thanh – Email: dnthanh@tgu.edu.vn*

Received: August 30, 2023; Revised: October 02, 2023; Accepted: October 16, 2023

ABSTRACT

*One of the main components of livestock waste is protein. Therefore, protease-producing microorganisms have been applied in the waste treatment process, and thus many studies have been conducted to find sources of local proteolytic microorganisms. This study isolated 41 protein hydrolyzing bacteria from soil, wastewater, and sludge collected at poultry slaughters. Three of the strains with the highest extracellular protease activity were screened and classified when comparing 16S rRNA sequences on the NCBI database as *Bacillus subtilis* (T17), *Bacillus statosphericus* (T24), and *Bacillus flexus* (T36). The results of examining the effects of pH and temperature on producing proteases showed that all three strains were capable of producing extracellular proteases at temperatures ranging from 30°C to 45°C. The appropriate pH for producing proteases in three different strains was varied. This is the initial data for the application of these strains in the treatment of high-protein waste.*

Keywords: *Bacillus flexus; Bacillus statosphericus; Bacillus subtilis; poultry slaughter; protease-producing bacteria; Tien Giang Province*