

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN PHÂN GIẢI PROTEIN TỪ LÒ GIẾT MỔ GIA SÚC Ở THỪA THIÊN HUẾ

Hoàng Dương Thu Hương*, Phạm Thị Hạnh

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Protein là một trong những chất hữu cơ cao phân tử chiếm tỷ lệ khá lớn trong nước thải của các cơ sở giết mổ gia súc. Chính vì vậy, việc ứng dụng các phương pháp sinh học để xử lý chất thải chứa protein có ý nghĩa thiết thực trong việc giảm thiểu ô nhiễm môi trường mà không gây hại đến sức khỏe của con người, động vật, thực vật và không ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái. Trong nghiên cứu này, bằng phương pháp Koch chúng tôi đã phân lập được 52 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein từ 10 mẫu nước thải thu được từ các lò giết mổ gia súc ở Thừa Thiên Huế, với số lượng vi khuẩn dao động trong khoảng $8,20 \times 10^6$ - $31,60 \times 10^6$ CFU/mL. Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chúng tôi đã chọn được hai chủng C20 và C51 có khả năng phân giải protein mạnh với kích thước vòng phân giải đạt 24,67 - 27,33 mm. Kết quả khảo sát về điều kiện nuôi cấy cho thấy hai chủng vi khuẩn có sự tích lũy sinh khối và hoạt tính enzyme mạnh nhất trong môi trường có pH 7,0 - 7,5 sau 36 - 60 giờ. Đó là cơ sở để tiếp tục triển khai nghiên cứu ứng dụng khả năng xử lý nước thải của các chủng đã được tuyển chọn.

Từ khóa: C20 và C51, lò giết mổ gia súc, phân giải protein, Thừa Thiên Huế, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Trong số các loại hình công nghiệp chế biến thực phẩm tại Việt Nam nói chung và tỉnh Thừa Thiên Huế nói riêng thì ngành chế biến gia súc phát triển khá đa dạng và phong phú, nhiều cơ sở giết mổ gia súc đã thành lập và ngày càng mở rộng quy mô hoạt động. Tuy nhiên, việc thu gom và xử lý nước thải tại các cơ sở chế biến này chưa được quan tâm, phần lớn lượng nước thải phát sinh không được xử lý hoặc chỉ được xử lý một phần trước khi đổ ra sông ngòi, ao hồ đã và đang gây nhiễm nghiêm trọng về lâu dài nguồn nước và môi trường xung quanh. Điểm đặc trưng trong nước thải chế biến thịt là sự hiện diện với hàm lượng lớn các chất hữu cơ cao phân tử như protein, amino acid, lipid và một số chất khác (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2003). Các chất hữu cơ cao phân tử này chậm phân hủy chính là tác nhân khiến nguồn nước bị ô nhiễm nặng nề (Chowdhury *et al.*, 2010; Johns, 1995). Trong nước thải của các nhà máy chế biến khác nhau, tải lượng và nồng độ của chúng có thể khác biệt, phụ thuộc vào loại nguyên liệu chế biến, chất phụ gia sử dụng, loại sản phẩm sản xuất,... nhưng phần chất hữu cơ chủ yếu đều là protein (Gonzalez, 1996), thường chiếm từ 15-25% trọng lượng tươi thịt gia súc (Johns, 1995; Sikorski, 1990). Do vậy, để giảm thiểu ô nhiễm, bên cạnh các phương pháp xử lý hóa học, hóa lý, cơ học thì xử lý sinh học được đặc biệt quan tâm và đem lại hiệu quả cao do nồng độ lớn các protein trong nước thải chế biến thịt có thể phân hủy sinh học. Vấn đề này hiện nay cũng đã và đang có rất nhiều nghiên cứu và ứng dụng ở trong nước và thế giới nhưng do thành phần chất thải, điều kiện môi trường ở mỗi nơi khác nhau vì vậy mà các chế phẩm này không đạt nhiều hiệu quả khi áp dụng ở các địa phương khác. Vì vậy, một trong những biện pháp để góp phần xử lý nước thải chính là tách, tạo được các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein mạnh trực tiếp tại địa phương để tạo thành chế phẩm sinh học ứng dụng trong việc xử lý nước thải trong các lò giết mổ gia súc.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng giống: Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải protein phân lập từ mẫu nước thải ở các lò giết mổ gia súc ở Thừa Thiên Huế.

Môi trường: Thành phần môi trường Vinogradski

Glucose	20 g	Gelatin	10 g
FeSO ₄	0,01 g	CaCO ₃	3 g
MnSO ₄	0,001 g	Agar	20 g
KCl	0,01 g	Nước	1000 mL
NaCl	0,5 g	pH	7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g		

Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải protein trên môi trường thạch Vinogradski thạch đĩa nhưng thay nguồn KNO_3 bằng gelatin (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

Xác định số lượng tế bào vi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

Sơ tuyển các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột

Các chủng vi khuẩn được cấy vạch lên bề mặt thạch đĩa, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C sau 48h rồi nhuộm màu bằng thuốc thử Fraziae (Nguyễn Lân Dũng *et al.*, 1978).

Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy lắc tốc độ 120 rpm ở nhiệt độ 30°C trong 48h. Ly tâm dịch nuôi bằng máy ly tâm lạnh, tốc độ 8000 rpm trong 10 phút thu phần dịch nổi.

Chuẩn bị các đĩa petri chứa môi trường thạch - cơ chất: gồm 2% thạch và 0,5% cơ chất là gelatin.

Tạo giếng thạch có đường kính 12 mm, dùng micropipette hút 0,7 mL dịch enzyme vào giếng. Làm lạnh trong 12 giờ ($4 - 6^\circ\text{C}$) rồi đưa vào tủ ẩm $28 - 30^\circ\text{C}$ ủ trong 36 giờ. Nhuộm màu bằng thuốc thử Fraziae và đo đường kính vòng phân giải (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

Xác định một số đặc điểm hình thái

Tiến hành nuôi chủng vi khuẩn được chọn trên môi trường thạch đĩa Vinogradski thạch đĩa nhưng thay nguồn KNO_3 bằng gelatin ở nhiệt độ 30°C sau 48 h lấy ra đo kích thước khuẩn lạc, quan sát màu sắc, hình dạng, độ dày, mép khuẩn lạc (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

Sử dụng phương pháp nhuộm đơn để quan sát hình thái tế bào (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012): Làm vết bôi và cố định vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn. Nhỏ thuốc thử lên vết bôi và giữ 2-3 phút. Rửa lại bằng nước cất cho đến khi nước chảy qua vết bôi không có màu nữa, làm khô tự nhiên hoặc hơi nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn và quan sát dưới kính hiển vi.

Thăm dò một số điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sinh tổng hợp enzyme amylase của vi khuẩn

Tối ưu hóa một số điều kiện lên men: thời gian, pH thích hợp cho sinh trưởng phát triển và sinh tổng hợp enzyme của vi khuẩn bằng phương pháp truyền thống "một lúc - một biến" (one - variable - at - a - time - method).

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và xác định số lượng vi khuẩn

Từ 10 mẫu nước thải thu được từ các lò giết mổ gia súc trên địa bàn Thừa Thiên Huế như lò giết mổ lợn Bãi Dâu - phường Phú Hậu, lò giết mổ ở phường Thủy Biều, lò giết mổ Quảng Thành - xã Quảng Thành - huyện Quảng Điền, lò giết mổ thị trấn Sịa, lò giết mổ Thuận An đã tiến hành phân lập và đếm số lượng khuẩn lạc vi khuẩn có khả năng phân giải protein trên môi trường thạch cơ bản (chứa gelatin). Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn trong các mẫu nước thải nghiên cứu

STT	Đợt thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	CFU/mL ($\times 10^6$)
1	03/01/2020 (Đợt 1)	N1	Lò giết mổ Quảng Thành	8,96
2		N2	Lò giết mổ thị trấn Sịa	20,00
3		N3	Lò giết mổ thị trấn Sịa	11,16
4	09/01/2020 (Đợt 2)	N4	Lò giết mổ Thuận An	15,00
5		N5	Lò giết mổ Thuận An	21,60
6		N6	Lò giết mổ Bãi Dâu	19,67
7	14/01/2020 (Đợt 3)	N7	Lò giết mổ Bãi Dâu	21,83
8		N8	Lò giết mổ Bãi Dâu	31,60
9	17/01/2020 (Đợt 4)	N9	Lò giết mổ Quảng Thành	8,20
10		N10	Lò giết mổ Quảng Thành	16,33

Qua bảng 1 nhận thấy, số lượng vi khuẩn có khả năng phân giải protein trong các mẫu nước thải có sự khác biệt và dao động tùy vào từng vị trí lấy mẫu. Số lượng vi khuẩn có khả năng phân giải protein cao nhất là mẫu N8

được lấy từ lò giết mổ Bãi Dâu ($31,60 \times 10^6$ CFU/mL). Mẫu N9 được lấy từ lò giết mổ Quảng Thành có số lượng vi khuẩn thấp nhất ($8,20 \times 10^6$ CFU/mL).

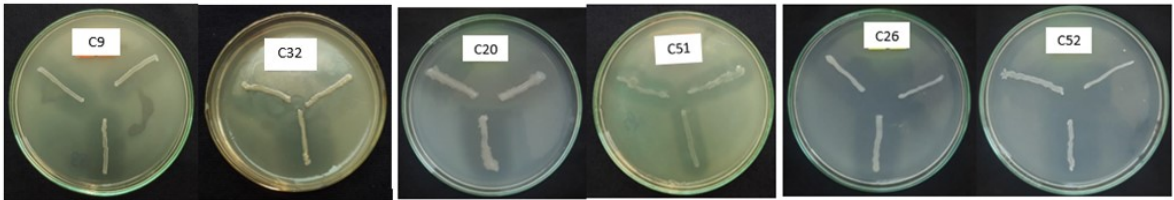
Cùng một địa điểm lấy mẫu nhưng tại các thời điểm khác nhau thì số lượng vi khuẩn cũng không giống nhau. Cụ thể là số lượng vi khuẩn ở mẫu N6 (19,67 CFU/mL) được lấy từ lò giết mổ Bãi Dâu vào đợt 2 ít hơn so với mẫu N7, N8 (21,83 CFU/mL - 31,60 CFU/mL) được lấy từ lò giết mổ Bãi Dâu vào đợt 3. Sự chênh lệch số lượng vi khuẩn trong các đợt thu mẫu có thể là do sự khác biệt về các yếu tố nhiệt độ, pH và nguồn thức ăn của gia súc ở mỗi thời điểm là khác nhau.

Đánh giá khả năng phân giải protein của vi khuẩn

Bảng 2. Khả năng phân giải protein của các chủng vi khuẩn phân lập

Hoạt tính enzyme	Chiều rộng vạch phân giải (nm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	$w < 10$	8	15,38
Trung bình	$10 \leq w \leq 15$	21	48,08
Mạnh	$15 < w \leq 20$	14	26,92
Rất mạnh	$w > 20$	9	17,31

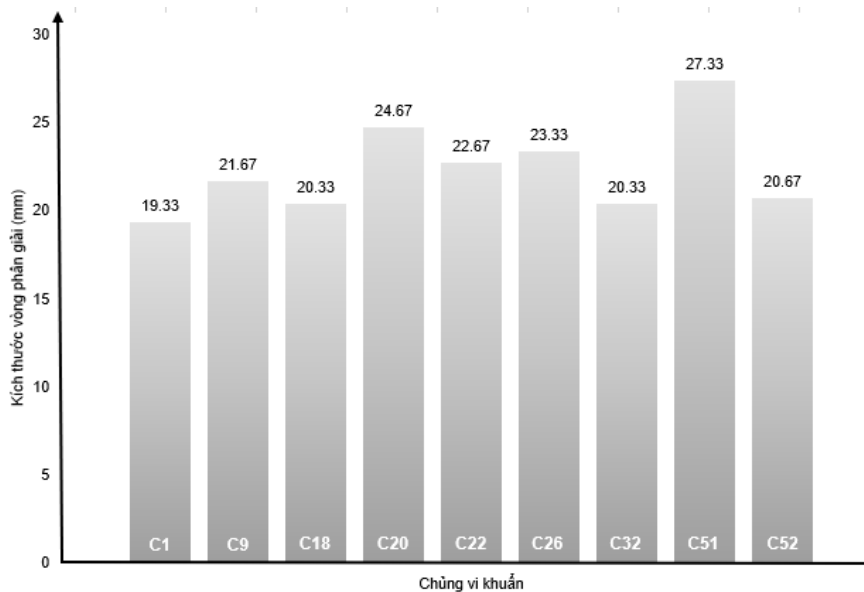
Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng phân giải protein nhưng ở các mức độ khác nhau. Có 21 chủng có khả năng phân giải protein trung bình, chiếm tỷ lệ cao nhất (48,08%). Các chủng có khả năng sinh trưởng phát triển và phân giải protein mạnh chiếm tỷ lệ khá lớn (26,92%). Thông qua sơ tuyển phát hiện được 9 chủng vi khuẩn có hoạt lực phân giải protein rất mạnh chiếm tỷ lệ 17,31%.



Hình 1. Vạch phân giải gelatin mạnh của một số chủng vi khuẩn

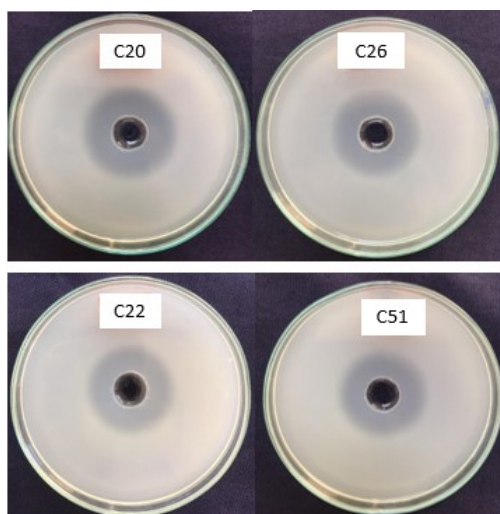
Hoạt lực phân giải gelatin của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, chúng tôi chọn ra 9 chủng có kích thước vạch phân giải lớn nhất để tiến hành tuyển chọn bằng phương pháp khuếch tán thạch đĩa. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Kích thước vòng phân giải gelatin của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Từ kết quả ở hình 2, chúng tôi chọn ra 2 chủng có kích thước vòng phân giải gelatin lớn nhất là C20 (24,67 mm) và C51 (27,33 mm) để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

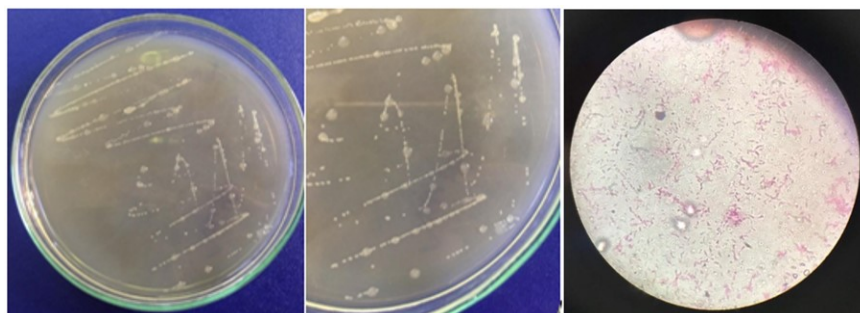


Hình 3. Vòng phân giải gelatin của một số chủng vi khuẩn mạnh

Đặc điểm hình thái chủng C20

Khuẩn lạc dạng tròn, kích thước 1,5-3 mm, bề mặt lồi, trơn, màu trắng trong.

Tiến hành nhuộm đơn chủng C20 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại $\times 100$, cho thấy tế bào chủng C20 bắt màu hồng, hình que ngắn và đứng riêng lẻ.

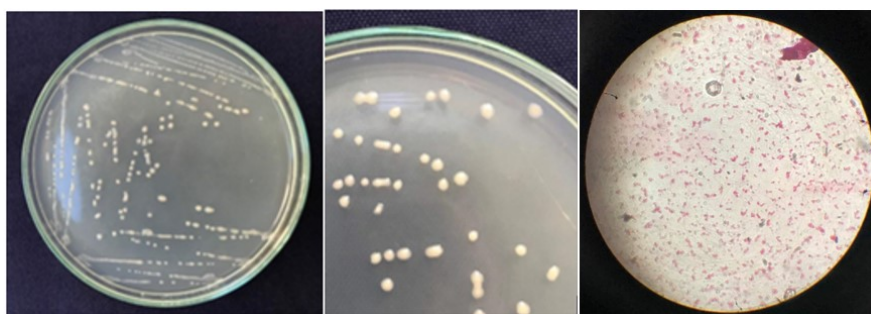


Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng C20 (x100)

Đặc điểm hình thái chủng C51

Khuẩn lạc dạng oval, kích thước 2-3 mm, bề mặt lồi, nhẵn, màu trắng đục.

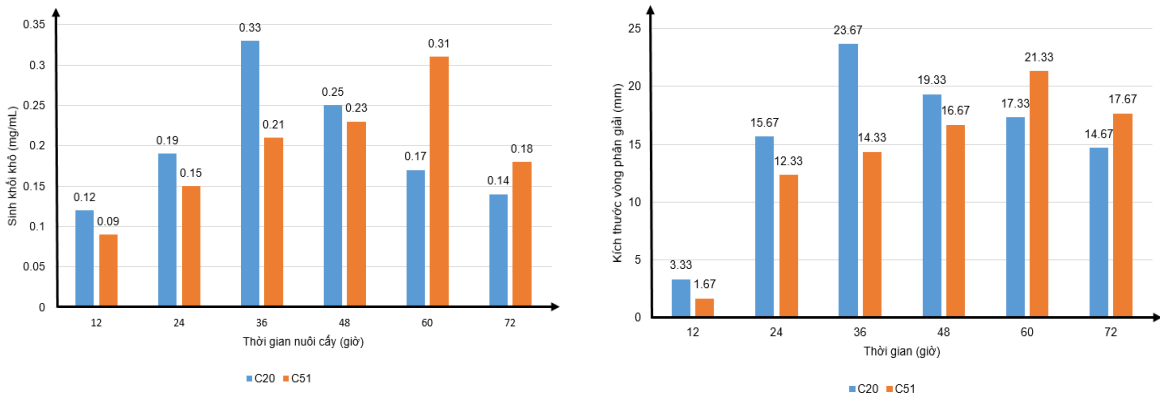
Tiến hành nhuộm đơn chủng C51 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại $\times 100$, cho thấy tế bào chủng C51 bắt màu hồng, hình cầu và đứng riêng lẻ.



Hình 5. Hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng C51 (x100)

Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh trưởng, phát triển và hoạt tính enzyme của vi khuẩn

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển và hoạt tính enzyme của vi khuẩn, tiến hành nuôi cấy lắc hai chủng vi khuẩn trong môi trường Vinogradski dịch thể. Sau các mốc thời gian 12, 24, 36, 48, 60, 72 giờ xác định hoạt tính protease và sinh khối 2 chủng vi khuẩn.



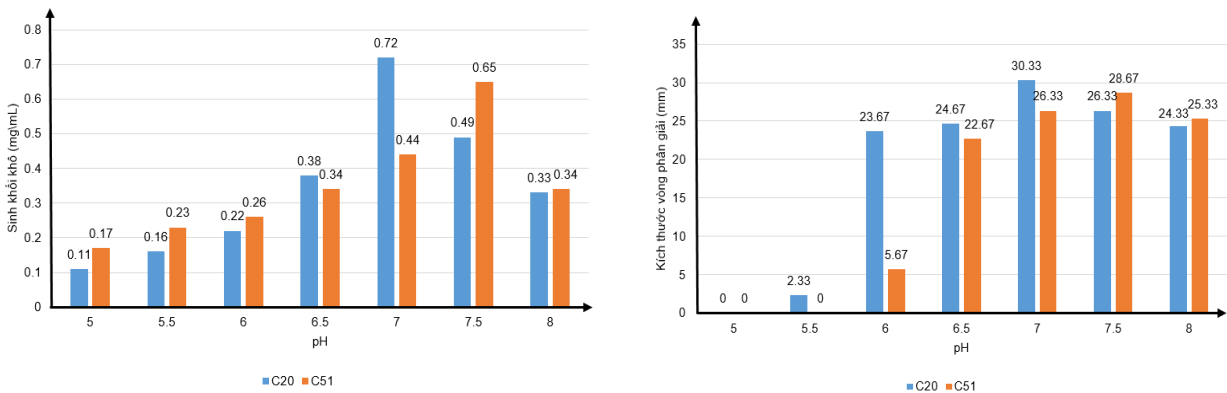
Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển và hoạt tính protease của chủng C20 và C51

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự tích lũy sinh khối và hoạt tính protease bắt đầu tăng mạnh sau 12 giờ ở cả hai chủng vi khuẩn và đạt cực đại ở 36 giờ đối với chủng C20 và 60 giờ đối với chủng C51. Sau các khoảng thời gian này, hoạt tính protease và sinh khối bắt đầu giảm, điều này có thể là do cuối pha sinh tổng hợp tế bào bắt đầu tự phân và tốc độ tích lũy enzyme chậm lại.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thủy và Trần Thanh Phong cho rằng 96 giờ là khoảng thời gian tối thích cho các chủng vi khuẩn phân giải protein P46 và P58 (Nguyễn Thị Thu Thủy *et al.*, 2004). Nghiên cứu của Võ Hồng Thi cho thấy, 10 chủng *Bacillus* lựa chọn đều có hoạt tính phân giải protein cao nhất tại thời điểm 72 giờ (Võ Hồng Thi *et al.*, 2012). Qua đây, chúng tôi nhận thấy rằng khoảng thời gian thích hợp cho hoạt động phân giải protein của các chủng vi khuẩn chúng tôi nghiên cứu là ngắn hơn so với kết quả thực nghiệm của các tác giả trên.

Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng, phát triển và hoạt tính enzyme của vi khuẩn

pH môi trường được điều chỉnh ở các mức 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; sau thời gian nuôi cấy thích hợp (36 giờ đối với chủng C20 và 60 giờ đối với chủng C51) xác định hoạt tính protease và sinh khối 2 chủng vi khuẩn.



Hình 7. Ảnh hưởng của pH nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển và hoạt tính protease của chủng C20 và C51

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng và phát triển ở khoảng pH khá rộng, trong đó chủng C20 thích hợp nhất ở pH 7,0 và chủng C51 thích hợp nhất ở pH 7,5. Khi pH môi trường tăng lên, sinh khối và hoạt tính enzyme của 2 chủng vi khuẩn đều giảm. Đây cũng là ưu điểm khi ứng dụng các chủng này làm chế phẩm thúc đẩy quá trình phân hủy nhanh protein trong công tác xử lý nước thải trong các lò giết mổ gia súc vì pH của các loại nước thải này trên thực tế thường dao động trong khoảng 6,5 - 7,5.

Theo nghiên cứu của Võ Hồng Thi, cả 10 chủng *Bacillus* được lựa chọn đều biểu hiện hoạt tính phân giải protein mạnh nhất ở pH 7 (Võ Hồng Thi *et al.*, 2012), kết quả này cũng tương đương với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Số lượng vi khuẩn có hoạt tính protease phân lập được từ các mẫu nước thải trong lò giết mổ gia súc dao động trong khoảng $8,2.10^6$ CFU/mL - $31,6.10^6$ CFU/mL. Trong 52 chủng vi khuẩn phân lập được, đã tuyển chọn được 2 chủng C20 và C51 có khả năng phân giải protein mạnh. Điều kiện thích hợp cho sinh trưởng phát triển và hoạt tính enzyme mạnh của 2 chủng vi khuẩn; thời gian nuôi cấy và pH môi trường tương ứng là 36 giờ, pH 7,0 ở chủng C20 và 60 giờ, pH 7,5 ở chủng C51.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chowdhury P, Viraraghavan P, Srinivasan A (2010). Biological treatment processes for fish processing wastewater. A review, *Biores Technol* 101: 439-439.
- Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Lê Đình Lương, Đoàn Xuân Mượu, Phạm Văn Ty (1978). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật* (2), NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Gonzalez JF (1996). Wastewater treatment in the Fishery Industry. *FAO Fisheries Technical Paper*. Rome, FAO. (355): 52-52.
- Johns MR (1995). Developments in wastewater treatment in the meat processing industry. A review, *Biores Technol* 54: 203-203.
- Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Giáo trình thực tập Vi sinh vật học*, NXB Đại học Huế.
- Nguyễn Đức Lương, Nguyễn Thị Thủy Dương (2003). *Công nghệ sinh học môi trường. Công nghệ xử lý nước thải* (1), NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- Sikorski Z (1990). Seafood Resource: Nutrient Composition and Preservation. *CRC Press Inc., Boca Raton*.
- Võ Hồng Thi, Nguyễn Hoàng Mỹ, Nguyễn Phạm Huyền (2012). Hoạt tính protease của một số chủng *Bacillus* phân lập từ nước thải chế biến thịt và thủy hải sản. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 28: 116-124.
- Nguyễn Thị Thu Thủy, Trần Thanh Phong (2004). Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn phân lập từ nước thải. *Thông tin khoa học trường Đại học Khoa học Huế* 13(2): 55 - 58.

ISOLATION AND SELECTION OF PROTEOLYTIC BACTERIA FROM SLAUGHTERHOUSES IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Hoang Duong Thu Huong*, Pham Thi Hanh

Department of Biology, University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Protein is one of the organic polymeric substances that makes up a large percentage of wastewater from slaughterhouses. Hence, applying the biological methods to processing protein waste plays an important part in mitigating environmental pollution without harming the health of people, animals, plants, and the eco-environment. In this study, we used Koch's method and isolated 52 proteolytic bacterial strains from 10 samples of wastewater that had collected from the slaughterhouses in Thua Thien Hue, lead to the number of bacteria is from $8,20 \times 10^6$ - $31,6 \times 10^6$ CFU/mL. Among them, two strains were named as C20 and C51, which have showed strong proteolysis ability with enzyme activity at 24,67 - 27,33 mm were selected. Our findings indicate that these two proteolytic bacteria strains have the best rise of biomass and enzyme at pH 7,0 - 7,5, after 36 - 60 hours. Based on these findings, we continue our research on the ability of processing wastewater of the selected strains.

Keywords: Bacteria, C20 and C51, proteolytic, Thua Thien Hue, slaughterhouses.

* Author for correspondence: Tel: +84-985000311; Email: thuhuongcnk32@gmail.com