

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY PROTEIN TỪ BỂ TẬP KẾT NƯỚC THẢI CỦA NHÀ MÁY CHẾ BIẾN THỦY SẢN KHU CÔNG NGHIỆP TRÀ NÓC, THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Đỗ Thị Xuân^{1,*}, Dương Văn Thành Đô¹, Đặng Kim Thảo¹,

Nguyễn Thị Bạch Kim², Phạm Thị Hải Nghi¹,

Văn Phạm Trọng Tính², Nguyễn Võ Châu Ngân³

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ

² Khoa Phát triển Nông thôn, Đại học Cần Thơ

³ Khoa Môi trường và Tài nguyên thiên nhiên, Đại học Cần Thơ

* Email: dtxuan@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy protein (VK-Pro) từ các bể tập kết nước thải của nhà máy chế biến thủy sản tại Khu Công nghiệp Trà Nóc, thành phố Cần Thơ. Các chủng VK-Pro sau phân lập được khảo sát định tính và định lượng khả năng sinh enzyme protease, đánh giá khả năng phân hủy cá và thịt heo vụn của các chủng VK-Pro có chỉ số phân hủy protein cao được tuyển chọn và định danh các chủng VK-Pro có hiệu quả cao trong phân hủy cá và thịt vụn. Kết quả, đã phân lập được 40 chủng VK-Pro và tuyển chọn được 20 chủng VK-Pro có chỉ số phân hủy protein cao. Bốn trong 20 chủng VK-Pro có khả năng phân hủy tyrosin cao nhất đến giai đoạn 96 giờ ủ với hàm lượng enzyme protease đạt từ $905,2 \pm 25,3$ đến $4312,8 \pm 41,6$ U/mL. Ở mật độ nguồn chủng là 10^8 CFU/gkk, chủng vi khuẩn ký hiệu SR3 có tỉ lệ phân hủy cá vụn ($82,0 \pm 0,3\%$) và thịt vụn ($66,2 \pm 0,54\%$) đạt cao nhất và chủng HVD7 có tỉ lệ phân hủy cá vụn ($75,0 \pm 0,52\%$) và thịt vụn ($65,2 \pm 0,36\%$) cao thứ hai so với các chủng đơn và sự phối trộn của 4 chủng VK-Pro còn lại. Kết quả định danh xác định chủng SR3 và HVD7 lần lượt có độ tương đồng 99,04% và 100% với vi khuẩn *Pseudomonas* sp. SR3 và *Priestia* sp. HVD7 dựa vào trình tự gen 16S rRNA. Hai chủng này có tiềm năng trong xử lý phụ phẩm có nguồn gốc protein từ cá và thịt heo vụn.

Từ khóa: Cá basa vụn, chỉ số phân hủy protein, protease, thịt heo vụn, tyrosin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong ngành công nghiệp chế biến thủy sản đặc biệt là chế biến cá da trơn, lượng nước thải từ xử lý nguyên liệu chiếm khoảng 5 - 7 m³/tấn nguyên liệu [1]. Nguồn nước thải này tiềm tàng gây ô nhiễm môi trường bởi tính chất và thành phần có trong chất thải [2]. Nước thải chế biến thủy sản chứa hàm lượng protein (nitơ hữu cơ) từ 70 - 110 mg/L, là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường đất, nước và không khí [3].

Trong tự nhiên, các vi khuẩn sinh enzyme protease rất đa dạng về chủng loài như: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Priestia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* và *Thermus* [4, 5]. Nhóm vi khuẩn phân hủy protein đóng vai trò quan trọng trong chu trình nitơ. Enzyme protease ngoại bào do vi khuẩn tiết ra có tiềm năng phục vụ trong công nghiệp, nông nghiệp, trong dược phẩm (sản xuất peptide sinh học) và xử lý môi trường [6]. Trước đây, trong công nghiệp nguồn enzyme

protease chủ yếu ly trích từ động vật bao gồm: Từ dạ dày bê; từ thực vật như dừa, sung, đu đủ; và vi sinh vật của *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. [7, 8]. Tuy nhiên, việc sản xuất enzyme từ động, thực vật bị hạn chế bởi yếu tố khí hậu cũng như tính đạo đức nên việc sản xuất enzyme protease từ vi sinh vật chiếm ưu thế [9].

Nhiều nghiên cứu khai thác nguồn protease từ vi khuẩn *Bacillus* cho thấy, một số loài thuộc chi này có khả năng sinh enzyme protease và trong điều kiện tối ưu hóa môi trường nuôi cấy cho vi khuẩn thì hàm lượng enzyme protease có thể đạt từ 500 U/mL đến 1780,03 U/mL [10 - 12]. Tương tự vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn *Priestia* cùng họ với *Bacillus* và có khả năng sinh protease. Một số nghiên cứu cho thấy, *Priestia* có khả năng sinh nhiều dạng enzyme protease giúp phân hủy protein hiệu quả và trong điều kiện nuôi cấy tối ưu lượng protease được sinh ra đạt đến 739 U/mL sau 72 giờ nuôi cấy [13]. Thêm vào đó, *Priestia* được xem là vi sinh vật xử lý kim loại nặng và hỗ trợ sinh trưởng cây trồng [14, 15]. Đối với vi khuẩn thuộc chi

Pseudomonas, tùy thuộc vào nhiệt độ môi trường, nguồn thức ăn trong môi trường nuôi cấy mà enzyme protease được sinh ra dao động trong khoảng từ 20 - 60 U/mL sau 6 giờ xử lý của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* [16] và đạt đến 337,9 U/mL sau 6 giờ xử lý đối với vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* [17] trong điều kiện tối ưu hóa môi trường nuôi cấy.

Hiện nay, trong hệ thống xử lý nước thải của nhà máy chế biến thủy sản, khu tập kết nước thải từ quá trình sơ chế và xử lý nguồn nguyên liệu cá da trơn có hàm lượng protein rất cao và đây là nguồn cung cấp thức ăn liên tục cho nhóm vi khuẩn có khả năng phân hủy protein [18]. Do đó, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy protein từ các nguồn tập kết nước thải xử lý nguồn nguyên liệu cá da trơn và từ bùn thải của nhà máy chế biến thủy sản thuộc Khu Công nghiệp Trà Nóc, thành phố Cần Thơ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tổng cộng 20 mẫu nước thải (Hình 1A) và bùn thải (Hình 1B) từ các bể tập kết nước thải chưa qua xử lý của các nhà máy chế biến thủy sản tại Khu Công nghiệp Trà Nóc, thành phố Cần Thơ. Môi trường skim milk agar (SMA, Prolabo, Ấn Độ) được sử dụng để phân lập vi khuẩn phân hủy protein. Các hóa chất phục vụ cho thí nghiệm sử dụng thuộc Công ty Prolabo (Ấn Độ). Các thiết bị gồm: Nồi hấp tiệt trùng Hirayama HV-110 (Nhật Bản), cân phân tích SATORIUS CP 224S (châu Âu), Quang phổ kế UV Vis GENESIS 10 (Thermo, Mỹ), ống Eppendorf (Merck, Đức), máy lắc tròn (BioTech BONMUA, Việt Nam), tủ cấy an toàn sinh học cấp II (ESCO, Indonesia), micropipette 300 μ L, 1.000 μ L và 5.000 μ L (Nichiryo, Nhật Bản).



Hình 1. Các nguồn vật liệu phục vụ nghiên cứu

Ghi chú: (A) mẫu nước thải được sử dụng để phân lập vi khuẩn phân hủy protein; (B) bùn thải được thu tại bể tập kết nước thải từ nhà máy chế biến thủy sản; (C) cá basa vụn được sử dụng cho thí nghiệm; (D) thịt heo vụn được sử dụng cho thí nghiệm.

2.3. Phương pháp phân lập vi khuẩn phân hủy protein

Các mẫu nước thải và bùn thải được thu, trữ trong các chai nhựa sạch, được bảo quản trong điều kiện mát

(3 - 8°C) và được vận chuyển về Phòng thí nghiệm Vi sinh vật Nông nghiệp, Bộ môn Công nghệ Vi sinh vật, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ. Mẫu sau khi thu về được pha loãng với dung dịch phosphate buffer (23,99 g NaH_2PO_4 và 15,59 g Na_2HPO_4 trong 1 L nước cất) đã được thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút ở các mức độ pha loãng từ 10^4 - 10^6 lần và được sử dụng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy protein sử dụng môi trường SMA [19]. Các đĩa môi trường được ủ đến 48 giờ ở nhiệt độ phòng dao động trong khoảng 28°C đến 32°C và sử dụng hai lớp bọc nylon đen để bảo quản mẫu trong điều kiện tối. Khi các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường và tạo vòng halo trong suốt xung quanh khuẩn lạc (Hình 2A), các khuẩn lạc được thu nhận và tiến hành tách rông cho đến khi thu được các khuẩn lạc thuần và đồng nhất.

2.4. Khảo sát định tính và định lượng khả năng phân hủy protein của các chủng vi khuẩn được phân lập

2.4.1. Khảo sát định tính khả năng tiết enzyme protease

Các chủng vi khuẩn sau khi tách rông được nuôi tăng sinh trên môi trường SMA trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, sinh khối của khuẩn lạc được thu và thực hiện khảo sát định tính khả năng phân hủy protein. Mỗi đĩa môi trường SMA được cấy 6 khuẩn lạc của 6 chủng vi khuẩn khác nhau về đặc điểm hình thái khuẩn lạc (Hình 2B) và mỗi chủng vi khuẩn được thực hiện trên 3 đĩa riêng biệt là 3 lần lặp lại cho mỗi chủng vi khuẩn. Các đĩa sau khi cấy vi khuẩn có khả năng phân hủy protein (VK-Pro) và được ủ ở nhiệt độ phòng trong điều kiện tối. Sau 48 giờ ủ tiến hành đo trực tiếp đường kính vòng halo xuất hiện xung quanh khuẩn lạc. Chỉ số phân hủy protein được xác định dựa vào đường kính khuẩn lạc và đường kính vòng phân hủy theo phương pháp của Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp (2011) [20].

$$\text{Chỉ số phân hủy protein (\%)} = 100 \times (D2 - D1)/D1$$

Trong đó: D1 là đường kính khuẩn lạc (mm); D2 là đường kính tạo bởi vòng sáng (mm).

2.4.2. Khảo sát định lượng enzyme protease của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Chuẩn bị vật liệu: Mười chủng vi khuẩn VK-Pro có chỉ số phân hủy protein cao nhất được sử dụng để xác định hàm lượng protease do vi khuẩn tiết ra. Các chủng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường nutrient agar (Prolabo, Ấn Độ) trong 24 giờ trước khi sử dụng cho thí nghiệm.

Phương pháp thực hiện: Khuẩn lạc đơn của mỗi chủng vi khuẩn VK-Pro được thu và điều chỉnh mật độ

tế bào là 10^6 CFU/mL sử dụng môi trường nutrient broth (Prolabo, Ấn Độ) và chuyển 15 mL dung dịch huyền phù vào ống falcon 50 mL. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 10 nghiệm thức được chủng với 10 chủng vi khuẩn riêng lẻ, nghiệm thức đối chứng chỉ sử dụng 15 mL dung dịch nutrient broth và 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức. Các ống falcon được ủ trên máy lắc với tốc độ 140 vòng trên phút trong điều kiện tối cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Hàm lượng protease được xác định tại bốn thời điểm bao gồm: 24, 48, 72 và 96 giờ sau khi ủ.

Phương pháp xác định hàm lượng protease: Hàm lượng protease được xác định theo phương pháp mô tả của Cupp-Enyard (2008) [21]. Tại các thời điểm thu mẫu, 2 mL hỗn hợp dịch vi khuẩn VK-Pro được thu, chuyển vào ống falcon 50 mL và được ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 6 phút. Tiến hành thu 1 mL dịch nổi phía trên, chuyển vào ống nghiệm, thêm 5 mL dung dịch casein 0,65% (w/v) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 phút. Sau đó, tiếp tục thêm 5 mL dung dịch axit trichloroacetic 110 mM được thêm vào mỗi ống nghiệm và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút. Dung dịch được lọc qua màng lọc cellulose nitrate (0,45 μm). Dung dịch sau khi lọc được thêm lần lượt 5 mL natri carbonate 500 mM, 1 mL thuốc thử Folin 0,5 mM, trộn đều và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút. Sau cùng, dung dịch được xác định hàm lượng protease sử dụng máy quang phổ ở bước sóng 660 nm để xác định hàm lượng protease trong mẫu. Hàm lượng protease được xác định dựa vào công thức:

$$\text{Hàm lượng protease (U/mL)} = (A \times B) / (C \times D \times E)$$

Trong đó: A là hàm lượng tyrosine được phóng thích trong dung dịch (μmole); B là tổng thể tích

Bảng 1: Tóm tắt các thí nghiệm xử lý phụ phẩm từ cá vụn và thịt vụn

Số TT	Nghiệm thức	Phụ phẩm cá vụn (25 g/falcon)		Phụ phẩm thịt vụn (25 g/falcon)	
		10^6 CFU/g	10^8 CFU/g	10^6 CFU/g	10^8 CFU/g
1	Đối chứng (ĐC)	+	+	+	+
2	SR3	+	+	+	+
3	HVD7	+	+	+	+
4	CBM2	+	+	+	+
5	CTB9-1	+	+	+	+
6	Hỗn hợp các chủng VK-Pro (Mix)	+	+	+	+

Thí nghiệm được ủ trong 15 ngày ở nhiệt độ phòng từ $28 - 32^\circ\text{C}$ trong điều kiện tối. Khi kết thúc thí nghiệm tiến hành thu mẫu và xác định tỉ lệ phân hủy các phụ phẩm.

Tỉ lệ phân hủy phụ phẩm cá vụn và thịt vụn: Tại thời điểm kết thúc thí nghiệm, các mẫu cá và thịt vụn được thu và sấy ở nhiệt độ 105°C đến khi khối lượng không đổi. Phần trăm vật liệu hữu cơ được phân hủy được tính theo công thức sau:

của dung dịch (mLm); C là thời gian thực hiện thí nghiệm (phút); D là thể tích enzyme được sử dụng (E là thể tích mẫu được sử dụng để đo độ hấp thụ quang phổ (μLp)).

2.4.3. Đánh giá khả năng phân hủy cá vụn và thịt vụn của các chủng vi khuẩn triển vọng

Chuẩn bị nguồn chủng: Bốn chủng vi khuẩn VK-Pro có khả năng sinh nhiều enzyme protease nhất được sử dụng để đánh giá khả năng phân hủy các phụ phẩm cá basa (cá vụn) và thịt heo vụn (thịt vụn). Các chủng vi khuẩn VK-Pro được chuẩn bị như mô tả ở mục 2.2.2 và được điều chỉnh mật độ tế bào đạt 10^6 CFU/g và 10^8 CFU/g vật liệu. Hỗn hợp các chủng vi khuẩn VK-Pro được chuẩn bị từ các chủng vi khuẩn VK-Pro đơn và phối trộn với cùng thể tích và mật độ tế bào của từng chủng vi khuẩn.

Chuẩn bị nguồn phụ phẩm giàu đạm: Phụ phẩm từ cá vụn và thịt vụn được mua tại chợ dân sinh tại thành phố Cần Thơ. Tỉ lệ mỡ vụn và thịt vụn của cá hoặc thịt heo là 1 mỡ: 3 thịt vụn (theo khối lượng w:w). Phụ phẩm cá và thịt vụn được rửa sạch bụi và tiến hành xay nhuyễn.

Phương pháp thí nghiệm: Tiến hành cân 25 g cá vụn hoặc thịt vụn vào ống falcon 50 mL đã được tiệt trùng, sau đó tiến hành cấy từng chủng VK-Pro hoặc hỗn hợp các chủng vi khuẩn vào các mẫu cá vụn (Hình 1C) và mẫu thịt vụn (Hình 1D) với hai tỉ lệ của nguồn chủng là 10^6 CFU/g và 10^8 CFU/g vật liệu. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với bốn thí nghiệm nhỏ tương ứng với 2 nguồn vật liệu, 2 mật độ nguồn chủng khác nhau và 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức. Thông tin các thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

$$\text{Phần trăm phân hủy (\%)} = \frac{(\text{Khối lượng ban đầu} - \text{Khối lượng còn lại})}{\text{Khối lượng ban đầu}} \times 100$$

2.5. Định danh các chủng vi khuẩn có hiệu quả phân hủy protein

Các chủng VK-Pro có hiệu quả phân hủy cá vụn và thịt vụn được trích ADN, và giải trình tự tại vùng gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F/1492R [19] do Công ty Cổ phần Phù sa Genomics thực hiện. Kết quả

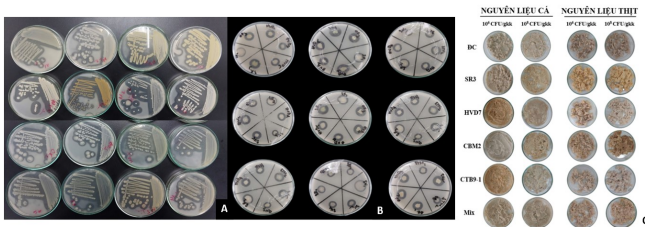
giải trình tự của các chủng VK-Pro được Blast trên ngân hàng NCBI để xác định tên chi và loài tham khảo. Cây phát sinh loài được xây dựng để đánh giá sự đa dạng di truyền của các chủng VK-Pro sử dụng phương pháp Neighbor-Joining với hệ số bootstrap là 10.000 lần của phần mềm MEGA12.

2.6. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu thu thập được nhập, tính toán và vẽ đồ thị sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2019. Sự khác biệt về trung bình của các nghiệm thức tại các thời điểm khảo sát sử dụng phần mềm Minitab 16 để phân tích phương sai (ANOVA) và so sánh sự khác biệt giữa các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Tukey's với độ tin cậy 99%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy protein



Hình 2. Sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc có khả năng tạo vòng halo trên môi trường SMA tham gia phân hủy cá vụn và thịt vụn

Ghi chú: (A) Các khuẩn lạc tạo vòng halo trên môi trường SMA khi được tách rỗng; (B) Kết quả định tính khả năng tạo vòng halo của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn; (C) Nguồn nguyên liệu cá vụn và thịt vụn còn lại sau khi kết thúc thí nghiệm phân hủy

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 40 chủng vi khuẩn có khả năng tạo vòng halo trên môi trường MSA. Dựa vào kích thước vòng halo của các chủng vi khuẩn, 20 chủng vi khuẩn tạo vòng halo lớn nhất

(VK-Pro) và khác nhau về hình thái khuẩn lạc được tuyển chọn (Hình 2A-B, bảng 2). Điều này cho thấy, có sự đa dạng của các chủng VK-Pro và kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Song và cs (2023) [3] Wei và cs (2021) [22] kết luận rằng các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy protein rất đa dạng về mặt di truyền và thuộc các chi như *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Aeromonas* và *Thermus*.

3.2. Kết quả khảo sát định tính và định lượng khả năng sinh enzyme protease

3.2.1 Kết quả khảo sát định tính khả năng sinh enzyme protease

Kết quả khảo sát định tính khả năng tạo vòng halo của VK-Pro cho thấy, chỉ số phân hủy protein của các chủng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) trên môi trường SMA. Các chủng VK-Pro như HVD6 ($63,77 \pm 1,06\%$), CBM6 ($59,77 \pm 2,08\%$), CTB9-1 ($59,78 \pm 1,53\%$), SR3 ($56,24 \pm 5,99\%$), CBM2 ($58,61 \pm 3,76\%$), CTB8 ($54,87 \pm 1,98\%$), HH2 ($54,69 \pm 2,38\%$), và CTB9 ($54,69 \pm 2,38\%$) có hoạt tính phân hủy protein mạnh với chỉ số phân hủy protein đạt trên 54% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng VK-Pro còn lại (Bảng 2). Thêm vào đó, 5 chủng VK-Pro HVD6, CBM6, CTB9-1, SR3, CBM2 có đường kính khuẩn lạc tương đối nhỏ hơn các chủng vi khuẩn còn lại, tuy nhiên chỉ số phân hủy protein đạt trên 56% khi khảo sát. Bốn chủng VK-Pro HH1, HH2, HH3 và HVD3 có kích thước khuẩn lạc lớn nhưng chỉ số phân hủy đạt dưới 55%. Kết quả này cho thấy, đường kính của khuẩn lạc chưa thể hiện khả năng sinh enzyme protease trong nghiên cứu này. Một số nghiên cứu chứng minh quá trình tổng hợp protease phụ thuộc nhiều vào điều kiện di truyền, môi trường nuôi cấy [2, 23] và được điều hòa bởi trạng thái sinh lý tế bào và nhu cầu nitơ [24, 25].

Bảng 2. Kết quả khảo sát định tính khả năng tạo vòng halo do VK-Pro tạo ra trên môi trường skim milk agar sau 24 giờ ủ

STT	Dòng VK-Pro	Hình thái tế bào	Gram vi khuẩn	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Đường kính vòng halo (mm)	Chỉ số phân hủy protein (%)
1	CBM2	Que	-	$8 \pm 0,87^{bcd}$	$19,33 \pm 1,16^{abc}$	$58,61 \pm 3,76^{abc}$
2	CBM6	Que	+	$7,17 \pm 0,2^d$	$17,83 \pm 0,76^{cdefg}$	$59,77 \pm 2,08^{ab}$
3	CDV5	Que	+	$8,17 \pm 0,29^{abcd}$	$16,33 \pm 0,58^{efg}$	50 ± 0^{bcd}
4	CDV6	Cầu	-	$8,67 \pm 0,58^{abcd}$	$16 \pm 0,87^{fg}$	$45,86 \pm 0,7^d$
5	CGN2	Cầu	-	$8,5 \pm 0^{abcd}$	$16,67 \pm 0,58^{defg}$	$48,96 \pm 1,8^{cd}$
6	CTB7	Que	-	$8,5 \pm 0,5^{abcd}$	$18,33 \pm 0,58^{bcdef}$	$53,66 \pm 1,65^{abcd}$
7	CTB8	Cầu	-	$8,5 \pm 0,5^{abcd}$	$18,83 \pm 0,76^{abcde}$	$54,87 \pm 1,98^{abcd}$
8	CTB9	Cầu	-	$8,33 \pm 0,29^{abcd}$	$17,5 \pm 0,5^{cdefg}$	$54,69 \pm 2,38^{bcd}$
9	CTB9-1	Que	-	$7,5 \pm 0,5^{cd}$	$18,67 \pm 1,44^{bcde}$	$59,78 \pm 1,53^{ab}$
10	HH1	Cầu	-	$9,83 \pm 0,29^{ab}$	$20,67 \pm 0,58^{ab}$	$52,38 \pm 2,38^{bcd}$
11	HH2	Que	-	$9,67 \pm 0,58^{ab}$	$21,33 \pm 0,58^a$	$54,69 \pm 2,38^{abcd}$
12	HH3	Cầu	-	$9,17 \pm 0,29^{abc}$	$19,0 \pm 1^{abcd}$	$51,62 \pm 3,99^{bcd}$

STT	Dòng VK-Pro	Hình thái tế bào	Gram vi khuẩn	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Đường kính vòng halo (mm)	Chỉ số phân hủy protein (%)
13	HVD3	Cầu	-	10,0 ± 1 ^a	19,67 ± 0,58 ^{abc}	49,12 ± 5,23 ^{bcd}
14	HVD6	Que	+	7,0 ± 0 ^d	19,33 ± 0,58 ^{abc}	63,77 ± 1,06 ^a
15	HVD7	Que	+	9,17 ± 0,29 ^{abc}	19,67 ± 0,29 ^{abc}	53,4 ± 0,78 ^{abcd}
16	SR3	Cầu	-	8,0 ± 0,87 ^{bcd}	18,33 ± 0,58 ^{bcdetf}	56,24 ± 5,99 ^{abcd}
17	SV2	Que	-	8,83 ± 0,76 ^{abcd}	17,17 ± 0,58 ^{cdefg}	48,43 ± 5,93 ^{cd}
18	SV4	Cầu	-	8,17 ± 0,76 ^{abcd}	15,33 ± 0,58 ^g	46,81 ± 3,13 ^d
19	SV5	Cầu	-	10,0 ± 0,01 ^a	19,67 ± 0,58 ^{abc}	49,12 ± 1,52 ^{bcd}
20	vCBM2	Que	-	8,33 ± 0,58 ^{abcd}	17,67 ± 0,76 ^{cdefg}	52,86 ± 1,47 ^{bcd}
P value				**	**	**
CV (%)				6,34	4,02	5,67

Ghi chú: Trong cùng một cột các ký tự theo sau số liệu giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Tukey; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

Với kết quả định tính enzyme protease, 10 chủng VK-Pro có hoạt tính phân giải cao nhất bao gồm: HVD6 (63,77 ± 1,06%), CTB9-1 (59,78 ± 1,53%), CBM6 (59,77 ± 2,08%), CBM2 (58,61 ± 3,76%), SR3 (56,24 ± 5,99%), CTB8 (54,87 ± 1,98%), HH2 (54,69 ± 2,38%), CTB7 (53,66 ± 1,65%), HVD7 (53,4 ± 0,78%), và vCBM2 (52,86 ± 1,47%), được xác định hàm lượng enzyme protease.

3.2.2 Kết quả khảo sát định lượng khả năng sinh enzyme protease

Kết quả xác định hàm lượng enzyme protease của 10 chủng VK-Pro cho thấy 6 chủng VK-Pro có khả năng sinh enzyme protease tăng dần và đạt cao nhất ở giai đoạn 72 giờ ủ bao gồm: Chủng SR3 (6634,6 ± 45,5 U/mL), HVD7 (5198,2 ± 63,1 U/mL), vCBM2 (1144,1 ± 45,5 U/mL), CTB8 (1049,3 ± 78,9 U/mL), CTB7 (903,5 ± 88,4%) và CBM6 (706,6 ± 50,5%) và sau đó hàm lượng protease của các chủng này giảm dần đến giai đoạn 96 giờ ủ. Trong 6 chủng này, chủng SR3 và HVD7 có khả năng sinh enzyme nhiều nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) tại các thời điểm khảo sát. Chủng CBM2 sinh enzyme với hàm lượng cao sau chủng SR3 và HVD7 nhưng khả năng sinh

enzyme ổn định và đạt hiệu quả đến 96 giờ ủ (3055,7 ± 34,4 U/mL) của thí nghiệm ($p < 0,01$). Hai chủng CTB9-1 (1079,7 ± 34,9 U/mL) và HVD6 (861,7 ± 9,68 U/mL) sinh enzyme protease đạt cao nhất ở giai đoạn 24 giờ ủ và sau đó giảm dần đến giai đoạn 96 giờ ủ (Bảng 3). Nhìn chung các chủng VK-Pro có khả năng sinh protease có xu hướng cao hơn các chủng vi khuẩn *Bacillus*, *Priestia* và *Pseudomonas* trong điều kiện tự nhiên [11, 12, 16] và có xu hướng tương tự như các chủng vi khuẩn được tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để đạt được hàm lượng enzyme mong muốn [13, 17]. Sự khác biệt này có thể được lý giải bởi yếu tố di truyền và đặc tính sinh lý của từng chủng vi khuẩn, bao gồm khả năng hấp thu nguồn dinh dưỡng và khả năng sinh enzyme [26, 27]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Solanki và cs (2021) [28] kết luận rằng điều kiện nuôi cấy như pH, nguồn carbon và nitơ hiện diện trong môi trường có thể ảnh hưởng đến tốc độ tổng hợp protease. Kết quả này phù hợp với quan sát thực nghiệm khi một số chủng tăng hoạt tính và mật số tăng nhanh nên có thể làm giảm nguồn dinh dưỡng trong môi trường từ đó ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme trong quá trình khảo sát.

Bảng 3. Sự thay đổi hàm lượng enzyme protease của các chủng vi khuẩn theo thời gian khảo sát

STT	Dòng	Hàm lượng enzyme protease được xác định theo thời gian ủ (U/mL)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
1	SR3	2337,7 ± 86,1 ^a	3126,7 ± 36,1 ^a	6634,6 ± 45,5 ^a	4037,1 ± 43,8 ^b
2	HVD7	1666,8 ± 63,5 ^c	1761,2 ± 27,6 ^c	5198,2 ± 63,1 ^b	4312,8 ± 41,6 ^a
3	CBM2	2019,0 ± 34,9 ^b	2344,7 ± 68,3 ^b	2748,2 ± 33,4 ^c	3055,7 ± 34,4 ^c
4	CTB9-1	1079,7 ± 34,9 ^d	967,2 ± 27,6 ^d	903,5 ± 12,6 ^{def}	624,0 ± 25,3 ^e
5	vCBM2	844,9 ± 42,2 ^e	949,1 ± 58,0 ^d	1144,1 ± 45,5 ^d	491,7 ± 9,6 ^f
6	CTB8	537,4 ± 58,1 ^f	738,6 ± 27,6 ^{ef}	1049,3 ± 78,9 ^{de}	905,2 ± 25,3 ^d
7	CTB7	436,8 ± 29,1 ^f	762,6 ± 54,1 ^f	903,5 ± 88,4 ^{ef}	728,8 ± 16,5 ^e
8	HVD6	861,7 ± 9,68 ^e	804,7 ± 27,6 ^{ef}	524,3 ± 121,8 ^g	298,7 ± 33,1 ^g
9	HH2	487,1 ± 33,5 ^f	1063,4 ± 68,3 ^d	619,1 ± 25,3 ^g	337,3 ± 25,3 ^g
10	CBM6	475,9 ± 42,2 ^f	654,4 ± 18 ^f	706,6 ± 50,5 ^{fg}	375,9 ± 9,6 ^{fg}
P value		**	**	**	**
CV(%)		4,45	3,42	3,15	1,9

Ghi chú: Trong cùng một cột các ký tự theo sau số liệu giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Tukey; **: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.2.3, Sự thay đổi mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn theo thời gian khảo sát hàm lượng protease

Kết quả khảo sát mật độ tế bào của các chủng VK-Pro cho thấy, mật độ tế bào của các chủng thay đổi và khác biệt có ý nghĩa thống kê theo thời gian khảo sát ($p < 0,01$) và mật độ tế bào các chủng duy trì cao đến 96 giờ ủ (Bảng 4). Ba chủng HVD7 ($12,7 \pm 0,18 \log_{10}$ CFU/mL), CTB9-1 ($11,7 \pm 0,8 \log_{10}$ CFU/mL) và CTB7 ($12,1 \pm 0,33 \log_{10}$ CFU/mL) có mật độ tế bào tăng dần đến giai đoạn 48 giờ ủ và sau đó giảm dần đến 96 giờ ủ. Chủng SR3 ($17,8 \pm 0,10 \log_{10}$ CFU/mL), vCBM2 ($15,7 \pm 0,22 \log_{10}$ CFU/mL), và CTB8 ($11,9 \pm 2,24 \log_{10}$ CFU/mL) có mật độ tế bào tăng dần đến giai đoạn 72 giờ ủ và giảm dần đến 96 giờ ủ. Các chủng VK-Pro còn lại có mật độ tế bào tăng dần đến 96 giờ ủ. Tại mỗi thời điểm khảo sát, thì mật độ tế bào của chủng SR3 thể hiện cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mật độ tế bào của chủng vCBM2 tại các thời điểm 24, 72 và 96 giờ ủ. Nhìn chung, các chủng VK-Pro SR3, vCBM2, CT8, CBM2 có hoạt tính enzyme tăng tỉ lệ thuận với mật độ tế bào theo thời gian thí nghiệm tương tự như báo cáo của Kumar và cs (2014) [29]. Trong khi đó, mật độ tế bào của chủng HVD7 ($12,7 \pm 0,18 \log_{10}$

CFU/mL), CT7 ($12,1 \pm 0,33 \log_{10}$ CFU/mL) đạt cao nhất ở giai đoạn 48 giờ ủ nhưng hàm lượng enzyme của 2 chủng này sinh ra đạt cao nhất ở giai đoạn 72 giờ ủ. Kết quả này cho thấy, sự chuyển sang pha sinh tổng hợp enzyme cao khi tốc độ nhân đôi tế bào bắt đầu chậm lại [3]. Các chủng VK-Pro còn lại sự gia tăng mật độ tế bào không có mối liên hệ với hàm lượng enzyme do các vi khuẩn sinh ra.

Sự ổn định của mật độ tế bào trong quá trình thí nghiệm được xem là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme ngoại bào và quá trình này thường đạt cực đại khi vi khuẩn duy trì trạng thái sinh lý ổn định [30]. Các chủng vi khuẩn có mật độ tế bào cao và ổn định không chỉ giúp gia tăng hàm lượng enzyme, mà còn đảm bảo khả năng duy trì hoạt tính trong điều kiện nuôi cấy quy mô lớn hoặc ứng dụng trong công nghiệp [31]. Do đó, với kết quả định tính, định lượng enzyme protease và sự ổn định mật độ tế bào của các chủng VK-Pro khảo sát, bốn chủng vi khuẩn có tiềm năng nhất là SR3 ($14,5 \pm 0,13 \log_{10}$ CFU/mL), HVD7 ($12,5 \pm 0,08 \log_{10}$ CFU/mL), CBM2 ($12,4 \pm 0,06 \log_{10}$ CFU/mL) và CTB9-1 ($8,6 \pm 0,16 \log_{10}$ CFU/mL) được tuyển chọn cho thí nghiệm đánh giá hiệu quả phân hủy cá vụn và thịt vụn.

Bảng 4. Sự thay đổi mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn theo thời gian khảo sát hàm lượng protease

STT	Dòng	Mật độ tế bào của vi khuẩn ($\log_{10}$ CFU/mL)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
1	SR3	$14,1 \pm 0,22^a$	$17,3 \pm 0,25^a$	$17,8 \pm 0,10^a$	$14,5 \pm 0,13^a$
2	HVD7	$10,7 \pm 0,14^c$	$12,7 \pm 0,18^b$	$12,1 \pm 0,15^b$	$12,5 \pm 0,08^{bc}$
3	CBM2	$11,0 \pm 0,13^c$	$9,9 \pm 0,19^f$	$9,8 \pm 0,14^{cde}$	$12,4 \pm 0,06^{bc}$
4	CTB9-1	$7,8 \pm 0,84^d$	$11,7 \pm 0,8^{bc}$	$8,6 \pm 0,11^f$	$8,6 \pm 0,16^d$
5	vCBM2	$12,5 \pm 0,2^b$	$12,8 \pm 0,19^b$	$15,7 \pm 0,22^a$	$14,5 \pm 0,12^a$
6	CTB8	$6,5 \pm 0,08^f$	$9,8 \pm 0,5^f$	$11,9 \pm 2,24^{bc}$	$10,9 \pm 0,15^c$
7	CTB7	$8,3 \pm 0,16^{def}$	$12,1 \pm 0,33^{bc}$	$9,3 \pm 0,15^f$	$11,1 \pm 0,14^c$
8	HVD6	$8,1 \pm 0,11^{ef}$	$11,0 \pm 0,08^{de}$	$11,5 \pm 0,06^{bc}$	$12,9 \pm 0,08^{abc}$
9	HH2	$11,4 \pm 0,2^{bc}$	$10,56 \pm 0,3^{ef}$	$10,9 \pm 0,51^{cde}$	$12,2 \pm 1,93^{bc}$
10	CBM6	$10,7 \pm 0,09^c$	$11,4 \pm 0,01^{cde}$	$11,3 \pm 0,05^{bcd}$	$14,1 \pm 0,14^{ab}$
P value		**	**	**	**
CV(%)		8,59	6,1	6,19	5,02

Ghi chú: Trong cùng một cột các ký tự theo sau số liệu giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Tukey; **: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.3. Kết quả đánh giá khả năng phân hủy vật liệu cá và thịt vụn của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Kết quả đánh giá khả năng phân hủy vật liệu cá và thịt vụn cho thấy, các nghiệm thức được bổ sung với các chủng VK-Pro đơn cũng như nghiệm thức được bổ sung với 4 chủng VK-Pro (nghiệm thức Mix) có khả năng phân hủy cá và thịt vụn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với nghiệm thức đối chứng (ĐC) (Bảng 5).

Với nguyên liệu cá vụn: Ở mật độ tế bào là 10^8

CFU/gkk, chủng SR3 cho tỉ lệ phân hủy cá vụn là $56,7\% \pm 0,76\%$, đạt cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại và nghiệm thức ĐC có tỉ lệ phân hủy đạt thấp nhất với $27,3 \pm 0,60\%$ ($p < 0,01$). Nghiệm thức Mix 4 chủng VK-Pro có tỉ lệ phân hủy thấp hơn so với nghiệm thức bổ sung chủng SR3 nhưng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,01$). Khi tăng mật độ tế bào lên 10^8 CFU/gkk, tỉ lệ phân hủy cá vụn của các nghiệm thức có bổ sung các chủng VK-Pro đơn tăng lên đáng kể, đạt tỉ lệ phân hủy cao hơn và

khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức ĐC, tuy nhiên tỉ lệ phân hủy của nghiệm thức Mix có tỉ lệ phân hủy không thay đổi (Bảng 5). Nghiệm thức được bổ sung với chủng SR3 đạt hiệu quả phân hủy cao nhất với $82,0 \pm 0,3\%$ so với các nghiệm thức còn lại. Hai chủng HVD7 và CBM2 có tỉ lệ phân hủy lần lượt đạt $75,0 \pm 0,5\%$ và $72,6 \pm 0,2\%$ và đạt cao hơn so với nghiệm thức của bổ sung chủng CTB9-1 ($74,2 \pm 0,2\%$), Mix ($50,1 \pm 0,13\%$). Mặc dù nghiệm thức Mix có tỉ lệ phân hủy cá đạt $50,1 \pm 0,13\%$ cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,01$), tuy nhiên tỷ lệ phân hủy này đạt thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức được bổ sung các chủng VK-Pro đơn lẻ. Kết quả này có thể xảy ra hiện tượng ức chế giữa 4 chủng vi khuẩn khi phối trộn chung với nhau [32] từ đó dẫn đến tỉ lệ phân hủy cá vụn đạt thấp hơn so với tỉ lệ phân hủy cá vụn của từng chủng đơn. Nghiệm thức được bổ sung chủng SR3 có hiệu quả phân hủy cá vụn cao nhất và khi tăng mật độ tế bào của nguồn chủng này giúp tăng nhanh quá trình phân hủy của cá vụn.

Với nguyên liệu thịt vụn: Xu hướng phân hủy thịt vụn đạt tương tự như ở thí nghiệm phân hủy của cá vụn. Nghiệm thức ĐC không bổ sung VK-Pro có tỉ lệ phân hủy thịt vụn đạt thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,01$) ở hai mật độ tế bào. Ở mật độ tế bào là 10^8 CFU/gkk, nghiệm thức được bổ sung với chủng SR3 và HVD7 đạt tỉ lệ phân hủy cao nhất lần lượt là $63,7 \pm 0,68\%$ và $62,9 \pm 0,54\%$, tiếp theo là nghiệm thức được bổ sung với chủng CBM2 ($58,5 \pm 0,45\%$) và CTB9-1 ($53,5 \pm 0,26\%$). Nghiệm thức Mix cho tỉ lệ phân hủy thịt vụn đạt cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với nghiệm thức đối chứng và chủng CTB9-1 nhưng đạt thấp hơn so với các chủng VK-Pro còn lại. Khi tăng mật độ tế bào lên 10^8 CFU/gkk, tỉ lệ phân hủy thịt vụn tăng không đáng kể, trong đó chủng SR3 đạt $66,2 \pm 0,54\%$ và HVD7 đạt $65,2 \pm 0,36\%$ và đạt cao nhất so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,01$) và nghiệm thức

được chủng với chủng CTB9-1 chỉ đạt $61,0 \pm 0,62\%$. Nghiệm thức Mix có tỉ lệ phân hủy thịt vụn đạt cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với nghiệm thức đối chứng nhưng đạt thấp hơn so với nghiệm thức được chủng với chủng SR3 và HVD7 ($p < 0,01$). Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng SR3 và HVD7 có hiệu quả phân hủy thịt vụn so với các chủng VK-Pro còn lại.

Nhìn chung, kết quả nghiên cứu phân hủy cá và thịt vụn của các chủng VK-Pro cho thấy 4 chủng VK-Pro thể hiện khả năng phân hủy cá vụn và thịt vụn tăng đáng kể so với nghiệm thức Mix 4 chủng VK-Pro. Tuy nhiên, tỉ lệ phân hủy cá vụn đạt cao hơn so với tỉ lệ phân hủy thịt vụn. Điều này có thể do cấu trúc mô của cá có hàm lượng collagen thấp và ít liên kết chéo hơn mô cơ của động vật có vú bao gồm thịt heo nên cơ thịt cá mềm hơn và dễ bị thủy phân hơn [33]. Tương tự, Ando và cs. (1992) [34] xác định enzyme ngoại bào do vi khuẩn tiết ra tiếp cận dễ hơn các sợi cơ và protein liên kết bao quanh bó cơ trong mô cá so với mô thịt nên giúp sự hấp thu enzyme protease nhanh hơn so với vụn thịt heo. Khi tăng mật độ tế bào của các chủng vi khuẩn, tỉ lệ phân hủy thịt vụn có xu hướng không thay đổi nhưng tỉ lệ phân hủy cá vụn tăng lên đáng kể. Kết quả này có thể do các bề mặt kết nước thải và bùn thải từ nguồn chế biến cá chứa hàm lượng dinh dưỡng cao và ổn định nên đã thiết lập hệ vi sinh vật phân hủy protein phong phú và tham gia vào quá trình phân hủy protein có nguồn gốc đa dạng hơn [35, 36, 37] bao gồm phân hủy được protein từ thịt vụn. Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn có khả năng phân hủy hiệu quả cá vụn và thịt vụn trong nghiên cứu này cho thấy vai trò của enzyme protease do các chủng vi khuẩn sinh ra có thể có nhiều chức năng và chủng vi khuẩn SR3 có tỉ lệ phân hủy cá và thịt vụn đạt cao nhất ở các mật độ nguồn chủng khác nhau. Chủng HVD7 có hiệu quả phân hủy cá và thịt vụn đạt tốt nhất ở mật độ nguồn chủng là 10^8 CFU/gkk.

Bảng 5. Kết quả phân hủy thịt và cá của các dòng vi khuẩn được tuyển chọn

STT	Nghiệm thức	Tỉ lệ phân hủy cá (%)		Tỉ lệ phân hủy thịt (%)	
		10^6 CFU/gkk	10^8 CFU/gkk	10^6 CFU/gkk	10^8 CFU/gkk
1	ĐC	$27,3 \pm 0,60^e$	$27,3 \pm 0,60^e$	$21,1 \pm 0,70^d$	$21,1 \pm 0,70^c$
2	SR3	$56,7 \pm 0,76^a$	$82,0 \pm 0,3^a$	$63,7 \pm 0,68^a$	$66,2 \pm 0,54^a$
3	HVD7	$46,2 \pm 0,16^c$	$75,0 \pm 0,52^b$	$62,9 \pm 0,54^a$	$65,2 \pm 0,36^a$
4	CBM2	$44,9 \pm 0,79^{cd}$	$72,6 \pm 0,20^c$	$58,5 \pm 0,45^b$	$59,6 \pm 0,07^b$
5	CTB9-1	$43,6 \pm 0,45^d$	$74,2 \pm 0,21^b$	$53,5 \pm 0,26^c$	$61,0 \pm 0,62^b$
6	Mix	$50,0 \pm 0,47^b$	$50,1 \pm 0,13^d$	$56,8 \pm 0,55^b$	$60,5 \pm 0,35^b$
P value		**	**	**	**
CV(%)		10,2	15,9	6,7	4,5

Ghi chú: Trong cùng một cột các ký tự theo sau số liệu giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép kiểm định Tukey; **: Khác biệt ở mức ý nghĩa 1%.

3.4. Định danh các chủng vi khuẩn tiềm năng

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của hai chủng vi khuẩn cho thấy, chủng SR3 và HVD7 có trình tự đạt 848 nucleotide. Trình tự gen của chủng SR3 có sự tương đồng đạt 99,04% so với trình tự gen của chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (KM659186.1) (Hình 3A) và chủng HVD7 có sự tương đồng đạt 100% so với trình tự gen chủng vi khuẩn *Priestia megaterium* (OP035869) trên ngân hàng NCBI (Hình 3B). Kết quả này tương

đồng với đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của vi khuẩn. Hai chủng Vk-Pro này tách biệt nhau dựa trên sơ đồ cây phát sinh loài (Hình 3C). Với mức độ tương đồng cao ở kết quả so sánh trình tự trên ngân hàng NCBI cũng như mối quan hệ gần gũi được thể hiện trong cây phát sinh loài của chủng SR3 với *Pseudomonas aeruginosa* và HVD7 với *Priestia megaterium*, có thể kết luận SR3 là vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* sp. SR3 và chủng HVD7 là *Priestia* sp. HVD7.

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 184.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	1116	100%	0.0	99.04%	1417	KM659186.1
☒ <i>Pseudomonas</i> sp. NCCP-640 16S rRNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas</i> sp. NCCP-640	1116	1116	100%	0.0	99.04%	976	AB020902.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain CASM21.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	1116	100%	0.0	99.04%	1173	NR040451.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SFR59-0270 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	4465	100%	0.0	99.04%	6964156	CP037999.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain N16.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	1116	100%	0.0	99.04%	1082	M2713414.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain N16.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	1116	100%	0.0	99.04%	910	NR021522.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BMD 694.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	1116	100%	0.0	99.04%	713	KY081300.1
☒ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 2023CK-01620 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1116	4465	100%	0.0	99.04%	7009390	CP149513.1

Hình 3A. Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng của chủng SR3 với trình tự 16S-rRNA

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ <i>Priestia megaterium</i> strain R04.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Priestia megaterium</i>	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1457	CP035869.1
☒ <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain ZJ_1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp. (in: Firmicutes)	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1445	MM979345.1
☒ <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain Pz1203.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp. (in: Firmicutes)	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1413	MM919191.1
☒ <i>Priestia megaterium</i> strain LQ001.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Priestia megaterium</i>	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1457	PQ271398.1
☒ <i>Bacillus</i> sp. KT35.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp. (in: Firmicutes)	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1457	KJ23927.1
☒ <i>Priestia megaterium</i> strain AGNT1280.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Priestia megaterium</i>	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1484	OL588021.1
☒ <i>Priestia megaterium</i> strain M01.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Priestia megaterium</i>	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1420	PV727111.1
☒ <i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain J01.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp. (in: Firmicutes)	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1447	MM971245.1
☒ <i>Priestia megaterium</i> strain F01-15.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Priestia megaterium</i>	1548	1548	100%	0.0	100.00%	1461	MM985005.1

Hình 3B. Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng của chủng HVD7 với trình tự 16S-rRNA

Vi khuẩn *Priestia megaterium* thường hiện diện trong nước thải và bùn đáy ao. *Priestia megaterium* M1VB5 có khả năng sản xuất enzyme ngoại bào như cellulase, amylase, protease... và có khả năng sản xuất chất kết tụ sinh học và được ứng dụng trong quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ, tạo kết tủa các chất rắn không tan trong nước, giúp giảm độ đục của nước [38, 39]. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Nascimento và cs. (2024) [40] cho thấy vi khuẩn *P. megaterium* LAMA1607 có khả năng xử lý protein và tham gia vào quá trình phân giải photpho. Hiệu quả phân giải protein và ứng dụng enzyme protease của chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* được ghi nhận ở nhiều nghiên cứu [41, 42]. Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* K-187 tiết enzyme protease có hoạt tính cao giúp loại bỏ protein hiệu quả khỏi vỏ tôm cua [41] và *Pseudomonas aeruginosa* PD100 có tiềm năng phân hủy protein trong môi trường có dung môi tẩy lông da bò và phân hủy các protein tự nhiên [42]. Từ những kết quả nghiên cứu được công bố khẳng định tiềm năng của 02 chủng vi khuẩn thuộc hai chi *Pseudomonas* sp. SR3 và *Priestia* sp. HVD7 trong việc sinh enzyme protease có hoạt tính cao và phân hủy được protein từ nguồn cá vụn và thịt vụn. Do đó, trong kết quả của nghiên cứu hiện tại, hai chủng SR3 và HVD7 được xem là nguồn vi khuẩn triển vọng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm khai thác enzyme protease phục vụ xử lý nước thải, chất thải hữu cơ sinh học và giúp cải thiện chất lượng môi trường nuôi trồng thủy

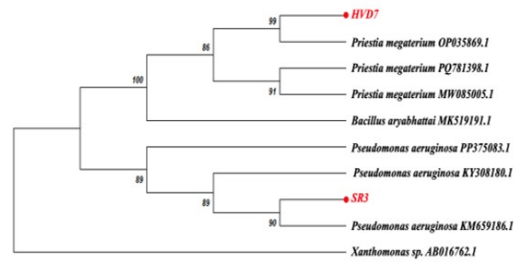
sản theo hướng bền vững.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 40 chủng VK-Pro từ nước thải và bùn thải tại khu tập kết nước thải từ công ty chế biến cá tra. Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được hai được 4 chủng SR3, HVD7, CBM2 và CTB9-1 có khả năng sinh hoạt tính enzyme protease đạt cao nhất và duy trì được mật độ tế bào cao tại thời điểm 96 giờ ù. Ở mật độ nguồn chủng là 10^8 CFU/gkk, chủng SR3 có tỉ lệ phân hủy cá vụn ($82,0 \pm 0,3\%$) và thịt vụn ($66,2 \pm 0,54\%$) đạt cao nhất và chủng HVD7 có tỉ lệ phân hủy cá vụn ($75,0 \pm 0,52\%$) và thịt vụn ($65,2 \pm 0,36\%$) cao thứ hai hơn so với các chủng đơn và sự phối trộn của 4 chủng VK-Pro còn lại. Kết quả giải trình tự và định danh hai chủng SR3 và HVD7 cho thấy, chủng SR3 được định danh là *Pseudomonas* sp. SR3 với độ tương đồng đạt 99,04% với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Chủng HVD7 được định danh là *Priestia* sp. HVD7 với độ tương đồng đạt 100% với vi khuẩn *Priestia megaterium*. Từ những kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng hai chủng vi khuẩn SR3 và HVD7 trong xử lý phế phẩm giàu protein và giúp xử lý môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ từ đề tài nhánh CTCSS2024-05-01 thuộc Chương trình Nghiên cứu cơ sở Đại học Cần Thơ năm 2024.



Hình 3C. Cây phát sinh loài của hai chủng vi khuẩn SR3 và HVD7

Ghi chú: Cây phát sinh loài được xây dựng sử dụng phương pháp Neighbor-Joining với hệ số bootstrap là 10000 lần; Giá trị trên cây phả hệ là các giá trị bootstrap với độ tương đồng trên 85%

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. NGO. Tình chất nước thải chế biến thủy sản. <https://ngoenvironment.com/vn/tin-tuc-n37-tinh-chat-nuoc-thai-che-bien-thuy-san-d129.html>, ngày truy cập: 28/03/2026.
2. Lê Hoàng Việt, Ngô Huệ Đức, Nguyễn Hữu Thuận và Nguyễn Võ Châu Ngân (2017). Xử lý nước thải chế biến cá da trơn bằng lồng quay sinh học yếm khí kết hợp lồng quay sinh học hiếu khí. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 20, 122 - 130.
3. Song, P., Zhang, X., Wang, S., Xu, W., Wang, F., Fu, R. and Wei, F. (2023). Microbial proteases and their applications. *Frontiers in microbiology*, 14, 1236368.
4. Liu, Y., Kai, Y. and Yang, H. (2023). Biodegradable fish gelatin/chitosan-based active films alter chill-stored golden pomfret (*Trachinotus blochii*) metabolites mainly through modulating four metabolic pathways. *Food Packaging and Shelf Life*, 101046.
5. Dat, T. T. H., Tam, V. T. T., Dung, T. T. K., Bui, L. M., Anh, H. L. T., and Oanh, P. T. T. (2019). Isolation and screening of cellulose and organic matter degrading bacteria from aquaculture ponds for improving water quality in aquaculture. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 266, p. 012002). IOP Publishing.
6. Anbu, P., Gopinath, S. C. B., Cihan, A. C. and Chaulagain, B. P. (2019). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, 1 - 2.
7. Shafee, N., Aris, S. N., Rahman, R. N. Z. A., Basri, M., and Salleh, A. B. (2005). Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *J Appl Sci Res*, 1(1), 1 - 8.
8. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597 - 635.
9. Jisha, V. N., Smitha, R. B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K. N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M. S. and Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1(3), 39 - 51.
10. Masi, C., Gemechu, G. and Tafesse, M. (2021). Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. *Annals of Microbiology*, 71, 1 - 11.
11. Emon, T. H., Hakim, A., Chakraborty, D. and Azad, A. K. (2023). Enhanced production of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* mutant E29 by consolidated bioprocessing using response surface modeling. *Biomass Convers. Biorefin.* DOI: 10.1007/s13399-023-04244-3.
12. Sun, B., Zou, K., Zhao, Y., Tang, Y., Zhang, F., Chen, W., Tang, X., Chang, C. and Zheng, Y. (2023). The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Front. Microbiol.*, 14:1301065.
13. Sawant, P. S. and Thumar, J. (2023). Sensing oxy anodic microbial fuel cell potential of halotolerant protease producer *Priestia megaterium* BorS17B13 belonging to mangrove biota. *J App Biol Biotech.* 11(6): 249 - 254.
14. Zelaya-Molina, L., Guerra-Camacho, J., Ortiz-Alvarez, J., Viguera-Cortés, J. M., Villa-Tanaca, L., and Hernández-Rodríguez, C. (2023). Plant growth-promoting and heavy metal-resistant *priestia* and *bacillus* strains associated with pioneer plants from mine tailings. *Archives of Microbiology*, 205(9), 318.
15. Park, J., Kim, J. H. and Jeong, D. W. (2023). Complete genome sequence of *Priestia flexa* DMP08 isolated from kimchi, traditional Korean fermented vegetables. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 51(2), 208 - 211.
16. Anh, P. T., Kroeze, C., Bush, S. R. and Mol, A. P. (2010). Water pollution by *Pangasius* production in the Mekong Delta, Vietnam: Causes and options for control. *Aquaculture research*, 42(1), 108-128.
17. Kalaiaarasi, K. and Sunitha, P. U., (2009). Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7035 - 7041.
18. Sivaprakasam, S., Dhandapani, B. and Mahadevan, S. (2011). Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1506 - 1515.
19. Trần Văn Dũng, Cao Thị Mỹ Tiên, Võ Dương Lan Anh, Nguyễn Thiện Mỹ, Bùi Thị Minh Diệu, Thái Chí Phong, Nguyễn Phạm Anh Thi, Nguyễn Hoàng Hậu và Đỗ Thị Xuân. (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân hủy protein và cellulose từ các nguồn rác thải hữu cơ được thu tại thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại*

học Cần Thơ, 57 (Chuyên đề Môi trường & Biến đổi khí hậu), 34 - 41.

20. Võ Văn Phước Quê và Cao Ngọc Diệp. (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 18a, 177 - 184.

21. Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay - Casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 899.

22. Wei, Y., Bu, J., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Ren, W. and Xie, Z. (2021). Community structure of protease-producing bacteria cultivated from aquaculture systems: potential impact of a tropical environment. *Frontiers in microbiology*, 12, 638129.

23. Ojo-Omoniyi, O. A., Moro, D. D. and Afolab, O. B. (2024). Microbial Proteases: Sources, Significance and Industrial Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 13, 1 - 23.

24. Ananya, R., Kumar, P. and Singh, A. (2021). Regulation of protease synthesis in bacteria: Role of growth and nitrogen availability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 1 - 10.

25. Ananta, Y. (2025). Literature review on characterization and optimization of protease enzymes for medical applications. *Dinasti Health and Pharmacy Science*, 2(2), 43 - 50.

26. Masi, C., Gemechu, G. and Tafesse, M. (2021). Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. *Annals of Microbiology*, 71(1), 24.

27. Feyissa, B. H. (2025). Screening, identification, and optimization of protease producing *Bacillus pumilus* strain DT-15 from tannery waste disposal site in Addis Ababa, Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2025(1), 7176092.

28. Solanki, K., Sharma, R. and Mehta, S. (2021). Influence of culture conditions on protease production in *Bacillus* spp. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100698.

29. Kumar, R., Singh, P. and Gupta, R. (2014). Correlation between cell density and protease production in *Bacillus* sp. GA CAS10. *Journal of Microbial Enzyme Engineering*, 9(3), 45 - 52.

30. Aguilar, C. N., Olmos, J. and Rito-Palomares, M. (2019). Stability of bacterial cell populations and extracellular enzyme production. *Process Biochemistry*, 80, 21 - 30.

31. Karray, F., Sayadi, S. and Bejar, S. (2021). High-cell-density culture and protease stability for industrial applications. *Biotechnology Reports*, 30, e00640.

32. Xuan, D. T., Rosling, A., Alström, S., Khuong, N. Q., Dung, T. V., Trinh, N. T. and Högberg, N. (2023). Straw microorganisms with combined cellulolytic and chitinolytic activities drive decomposition of rice straw and antagonism against *Rhizoctonia solani* causing rice sheath blight. *International Journal of Agricultural Technology*, 19(2): 833 - 848.

33. Listrat, A., Lebret, B. and Louveau, I. (2016). Intramuscular connective tissue and its impact on meat quality. *Meat Science*, 122, 113 - 124.

34. Ando M., Toyohara H. and Sakaguchi M. (1992). Three-dimensional structure of collagen fibrillar network of pericellular connective tissue in association with firmness of fish muscle. *The Japanese Society of Fisheries Science*, 58(7), 1361-1364.

35. Ellouz, Y., Bayoudh, A., Kammoun, S., Gharsallah, N. and Nasri M. (2001) Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresour Technol*, 80(1): 49 - 51

36. Ramakrishnan, V., Ghaly, A.E., Rooks, M. S. and Budge, S. M. (2013). Enzymatic extraction of amino acids from fish waste for possible use as a substrate for production of jadomycin. *Msc. dissertation. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, March 2013*.

37. Triki-Ellouz, Y., Ghorbel, B., Souissi, N., Kammoun, S., Nasri, M. (2003) Biosynthesis of Protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 19, 41 - 45.

38. Dang, N. T., Phan, T. T. H., Tran, H. T., Le, T. T., Nguyen, L. T. H., Nguyen, T. K. B., Ngo, H. V. and Van Cao, S. (2024). Biofilm biosynthesis of *Priestia megaterium* M1VB5 strain Muc Son Thanh Hoa paper mill. *Journal of Science and Technology Development*, 27(1), 3301 - 3307.

39. Oyewole, O. A., Maude, A. M., Yakubu, J. G., Phillip, D. E., Ajibola, A., Emmanuel, P., Egwim, E. C. and Maddela, N. R. (2024). Application of bioflocculants produced by *Prestia megaterium* for drinking water purification. *Bioresource Technology Reports*, 28, 101997.

40. do Nascimento, M. E. C., Montagna, L. C., Manfro, L., de Oliveira Laaf, Y., Maiocchi, L. F., da Silva, M. A. C. and de Souza Lima, A. O. (2024).

- Newly isolated *Priestia megaterium* LAMA1607 for enhanced biological phosphorus removal: A genomic and functional characterization. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 16(4), 37.
41. Oh, Y. S., Shih, L., Tzeng, Y. M. and Wang, S. L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 3 - 10.
42. Najafi, M. F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D. (2005). Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic journal of biotechnology*, 8(2), 79 - 85.

ISOLATION AND SELECTION OF PROTEIN DEGRADING BACTERIAL STRAINS FROM WASTEWATER COLLECTION TANKS OF SEAFOOD PROCESSING FACTORIES AT TRA NOC INDUSTRIAL ZONE - CAN THO CITY

Do Thi Xuan¹, Duong Van Thanh Do¹, Dang Kim Thao¹,

Nguyen Thi Bach Kim², Pham Thi Hai Nghi¹,

Van Pham Trong Tinh², Nguyen Vo Chau Ngan³

¹*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

²*Faculty Rural Development, Can Tho University*

³*Faculty of Environment and Natural Resource, Can Tho University*

Abstract

This study was aimed at investigating and selecting protein degrading bacterial strain (VK-Pro) from wastewater and waste sludge sources of catfish processing factories in Tra Noc industrial Zone of Can Tho city. The pure VK-Pro isolates were investigated the qualitative and quantitative assessment of protease activity under *in vitro* conditions, the ability of the VK-Pro with high degradation index to degrade by products of catfish and of pork meat and identified the potential beneficial bacterial isolates. The results showed that 40 VK-Pro strains that produced halo zones on the protein medium were isolated. Among them, 20 bacterial isolates gained significantly higher the degradation index (%). Based on the quantitative test, 4 VK-Pro strains were selected for their highest tyrosine-degrading capacity up to 96 hours of incubation, with protease activity ranging from 905.2 ± 25.3 to $4,312.8 \pm 41.6$ U/mL. With a bacterial density of 10^8 CFU/gkk, the SR3 strain gained the highest degradation efficiency for both catfish ($82.0 \pm 0.3\%$) and pork ($66.2 \pm 0.54\%$) by products and the HVD7 strain was the second effective strain in degrading fish ($75.0 \pm 0.52\%$) and pork ($65.2 \pm 0.36\%$) by products compared to those of other treatments. These strains were identified as a species specy of *Pseudomonas* sp. SR3 (99.04% of the similarity) and *Priestia* sp. HVD (100 % of the similarity) based on the 16S rRNA sequence. The study successfully selected two bacterial strains with the potential application for treating biological organic wastes containing high protein-based by-products from catfish and pork.

Keywords: *protein degradation index, protease, tyrosin, by-product of catfish, by-product of pork.*

Ngày nhận bài: 10/12/2025

Ngày chuyển phản biện: 24/12/2025

Ngày thông qua phản biện: 17/02/2026

Ngày duyệt đăng: 5/3/2026