



DOI:10.22144/ctujos.2024.308

## TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT CHẤT KẾT TỤ SINH HỌC TỪ NƯỚC THẢI SẢN XUẤT BÚN

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm\*, Huỳnh Yến Nhi, Lại Phú Quý, Lê Nguyễn Phúc Thịnh và Ngô Lý Mỹ Tiên  
 Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hnttam@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 28/11/2023

Sửa bài (Revised): 18/12/2023

Duyệt đăng (Accepted): 25/04/2024

**Title:** Selection and identification of biofloculant -producing bacteria from vermicelli production wastewater

**Author(s):** Huỳnh Ngọc Thanh Tâm\*, Huỳnh Yến Nhi, Lại Phú Quý, Lê Nguyễn Phúc Thịnh and Ngô Lý Mỹ Tiên

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học từ nước thải sản xuất bún tại quận Bình Thủy (Thành phố Cần Thơ). Nghiên cứu đã tuyển chọn được 28/32 dòng vi khuẩn có khả năng sản xuất chất kết tụ sinh học có bản chất polysaccharide và 27/32 dòng vi khuẩn có khả năng sản xuất chất kết tụ sinh học có bản chất protein thông qua khả năng tạo chất nhầy trên môi trường thạch. Hai dòng vi khuẩn T11 và T17 được xác định cho tỷ lệ kết tụ sinh học với kaolin tốt nhất ở giá trị pH 5,0 và nguồn carbon bổ sung vào môi trường là glucose bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 550 nm để đo độ đục hỗn hợp huyền phù vi khuẩn với kaolin, tỷ lệ kết tụ đạt lần lượt ở hai chủng T11 và T17 là 68,02% và 79,87%. Hai dòng vi khuẩn này được xác định là *Bacillus velezensis* và *Klebsiella pneumoniae* với độ tương đồng 100% bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA. Hai dòng vi khuẩn này sẽ là những dòng vi khuẩn hứa hẹn đây tiềm năng trong lĩnh vực hỗ trợ xử lý nước thải trước khi nguồn nước ô nhiễm này được xả thải ra môi trường.

**Từ khóa:** Kết tụ sinh học dạng polysaccharide, kết tụ sinh học dạng protein, nước thải, phân lập, vi khuẩn

### ABSTRACT

The study was conducted to select bacterial strains capable of creating biofloculants from vermicelli production wastewater in Binh Thuy district (Can Tho City). The study has selected 28/32 bacterial strains capable of producing polysaccharide biofloculant and 27/32 bacterial strains capable of creating protein biofloculant through the ability to create mucus on agar culture. Two bacterial strains T11 and T17 were determined to have the best biofloculant rate with kaolin at pH value 5.0 and the carbon source added to the medium was glucose using spectrophotometric method at 550 nm wavelength to measure the turbidity of the mixture of bacterial suspension with kaolin, the percentage flocculating activity (% FA) of two strains T11 and T17 was 68.02% and 79.87%, respectively. These two bacterial strains were identified as *Bacillus velezensis* and *Klebsiella pneumoniae* with 100% similarity by 16S rRNA gene sequencing. These two strains of bacteria will be promising bacteria strains with great potential in the field of supporting wastewater treatment before this polluted water source is discharged into the environment.

**Keywords:** Bacteria, isolation, protein biofloculant, polysaccharide biofloculant, wastewater

### 1. GIỚI THIỆU

Việt Nam là một trong những quốc gia nổi tiếng về các loại thực phẩm có nguồn gốc từ tinh bột như cơm, bún, hủ tiếu, phở, bánh mì,... Do nhu cầu sử dụng loại thực phẩm truyền thống này rất lớn nên các làng nghề cũng như cơ sở sản xuất cũng ngày càng tăng dẫn đến nguồn nước thải từ quá trình sản xuất cũng được xả thải ra môi trường ngày càng lớn. Tuy nhiên, đại đa số các cơ sở sản xuất bún đều mang tính tự phát, nhỏ lẻ nên chưa thật sự chú trọng đến công tác xử lý tốt nguồn nước thải trước khi nguồn nước ô nhiễm này được xả thải ra môi trường; từ đó, gây ô nhiễm trầm trọng đến nguồn nước và môi trường sống quanh đó. Để xử lý nước, quy trình kết tụ sinh học được đề nghị áp dụng vì kết tụ là công đoạn ban đầu cần thiết, giúp loại bỏ các tạp chất, tạo thuận lợi cho các công đoạn xử lý tiếp theo. Kết tụ sinh học là quá trình do vi sinh vật tổng hợp ra hợp chất đa phân tử có khả năng thu gom và làm lắng các vật chất lơ lửng trong dung dịch (Kwon et al., 1996; Shih et al., 2001). Kết tụ sinh học có tính chất hóa học thuộc dạng polysaccharide, protein hoặc glycoprotein, acid nucleic, cellulose, đường và acid polyamino, tuy nhiên các nghiên cứu về các chất kết tụ sinh học chỉ tập trung vào nghiên cứu của chất kết tụ sinh học có thành phần chủ yếu là polysaccharide hoặc protein vì các chất này chiếm tỷ lệ cao nhất trong các polyme sinh học có chức năng kết tụ sinh học (Rebah et al., 2018). Gần đây, chất kết tụ sinh học là sự thay thế an toàn cho chất kết tụ hóa học trong xử lý nước thải (Kurniawan et al., 2021) vì chất kết tụ sinh học không gây hại cho vi sinh vật vì chúng không mang độc tố và có khả năng phân hủy sinh học (Bahniuk et al., 2022). Tuy nhiên, hiệu quả kết tụ phụ thuộc vào đặc tính của từng giống loài vi sinh vật tạo chất kết tụ cũng như chịu ảnh hưởng của các yếu tố như chất dinh dưỡng, điều kiện nuôi cấy, điều kiện của môi trường... Vì

khả năng có thể sử dụng các chất dinh dưỡng trong môi trường để tổng hợp các chất đa phân tử trong tế bào dưới sự hoạt động của các loại enzyme khác nhau, các đa phân tử này có thể được bài tiết ra ngoài và tồn tại trong môi trường hoặc trên bề mặt vỏ tế bào vi khuẩn. Cho nên, hoạt động của vi khuẩn biến đổi những chất có trong môi trường thành các đa phân tử phức tạp có thể sử dụng trong kết tụ (Deng et al., 2002), có nhiều dạng tổng hợp chất kết tụ sinh học ở vi khuẩn có thể ở dạng polyme ngoại bào của các tế bào sống (Salehizadeh et al., 2000) hoặc quá trình tích lũy chất kết tụ sinh học ngoại bào và sự gom tụ tế bào (Jie et al., 2006). Vì vậy, việc tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học và khảo sát được giá trị pH và nguồn carbon tối ưu để vi khuẩn đạt được hiệu quả kết tụ tốt nhất là tiền đề cho việc ứng dụng các dòng vi khuẩn này trong xử lý nước thải trong tương lai.

### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu thí nghiệm

Ba mươi hai dòng vi khuẩn được phân lập từ hai mẫu nước thải cơ sở sản xuất bún được lưu trữ với glycerol 50% ở 4°C tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh Thực phẩm, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Tuyển chọn dòng vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất bún có khả năng tạo chất kết tụ sinh học trên đĩa thạch

Hoạt hóa các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường cơ bản NA (Nutrient Agar) bao gồm 3 g/L beef extract, 5 g/L peptone, 5 g/L NaCl và 20 g/L agar (Shivaji et al., 2006). Sau đó, tiến hành cấy ria các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide và protein theo bảng sau:

**Bảng 1. Thành phần môi trường tạo chất kết tụ sinh học (Deng et al., 2002)**

Môi trường	Thành phần	Khối lượng
Tạo chất kết tụ sinh học có bản chất polysaccharide	Glucose	10 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	NaCl	0,1 g
	Carbamide	0,5 g
	Yeast extract	0,5 g
	Agar	20 g
		Nước cất vừa đủ 1000 mL

Môi trường	Thành phần	Khối lượng
<b>Tạo chất kết tụ sinh học cố bản chất protein</b>	Glucose	20 g
	L- Acid glutamic	50 g
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
	Yeast extract	0,5 g
	Agar	20 g
	Nước cất vừa đủ 1000 mL	

Ghi nhận kết quả: Quan sát hình thái, màu sắc khuẩn lạc và ghi nhận bước đầu về khả năng tạo chất kết tụ sinh học của các dòng vi khuẩn thông qua độ nhầy khuẩn lạc của từng dòng vi khuẩn. Ký hiệu (+): độ nhầy thấp; kéo sợi < 2 cm; (++) : độ nhầy trung bình, kéo sợi dài từ 2-3 cm; (+++) : độ nhầy cao; kéo sợi > 3 cm (Loan, 2020).

2.2.2. *Tuyển chọn dòng vi khuẩn từ nước thải sản xuất bún có khả năng tạo chất kết tụ sinh học trong môi trường lỏng*

Khả năng kết tụ của các dòng vi khuẩn trên môi trường lỏng bằng kaolin: 1 mL huyền phù mỗi dòng vi khuẩn được chuyển vào 9 mL môi trường lỏng (điều chỉnh pH 7, mật số 10<sup>8</sup> CFU/mL) trong ống nghiệm, sau đó lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 4 ngày ở nhiệt độ phòng (Mai và ctv., 2014). Sau đó, 100 µL huyền phù vi khuẩn sau 4 ngày nuôi lắc được hút và chuyển vào 100 mL hỗn hợp gồm dung dịch gồm kaolin (5g/L) và CaCl<sub>2</sub> (1%) (tỷ lệ 9:1) (điều chỉnh pH 7). Cuối cùng, hỗn hợp được khuấy đều trong 30 giây và để yên trong 5 phút, phần dịch trong trên mặt sẽ được xác định độ đục bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 550 nm (Deng et al., 2002), mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không bổ sung vi khuẩn.

Ghi nhận kết quả: Dòng vi khuẩn được chọn cho tỷ lệ kết tụ sinh học cao nhất để tiến hành thí nghiệm theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ kết tụ (\%)} = \frac{OD_{\text{đối chứng âm}} - OD_{\text{mẫu}}}{OD_{\text{đối chứng âm}}} \times 100$$

2.2.3. *Khảo sát điều kiện pH tối ưu để vi khuẩn sản xuất chất kết tụ sinh học*

Dòng vi khuẩn sau khi tuyển chọn sẽ được nuôi lắc để tạo chất kết tụ sinh học tương tự như thí nghiệm trên trong 4 ngày. Sau đó, 100 µL huyền phù vi khuẩn sẽ được chuyển vào 100 mL hỗn hợp dung dịch gồm kaolin (5g/L) và CaCl<sub>2</sub> (1%) (tỷ lệ 9:1) đã điều chỉnh pH 5 đến 9.

Kết quả được ghi nhận theo công thức (1), từ đó chọn được giá trị pH mà tại đó vi khuẩn cho tỷ lệ kết

tụ cao nhất. Giá trị pH tối ưu sẽ được chọn để tiến hành thí nghiệm khảo sát nguồn carbon bổ sung vào môi trường nuôi cấy để tạo chất kết tụ sinh học.

2.2.4. *Khảo sát nguồn carbon tối ưu để vi khuẩn sản xuất chất kết tụ sinh học*

Dòng vi khuẩn được tuyển chọn sẽ được nuôi lắc để tạo chất kết tụ sinh học tuy nhiên thay thế nguồn carbon là glucose trong môi trường nuôi cấy bằng sucrose và tinh bột. Sau đó, 100 µL huyền phù vi khuẩn sẽ được chuyển vào 100 mL hỗn hợp dung dịch gồm kaolin (5g/L) và CaCl<sub>2</sub> (1%) (tỷ lệ 9:1) đã điều chỉnh pH về pH đã tuyển chọn ở thí nghiệm trên.

Ghi nhận kết quả theo công thức (1), từ đó chọn được nguồn carbon tối ưu để vi khuẩn cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

2.2.5. *Định danh dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học*

Dòng vi khuẩn được chọn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học tốt nhất được tuyển chọn để tiến hành định danh đến mức độ loài bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và đối chiếu trên dữ liệu ngân hàng gen NCBI.

Cặp mồi 27F và 1492R được sử dụng để khếch đại đoạn gen mục tiêu.

Mồi xuôi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'

Mồi ngược 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3'

Kết quả giải trình tự được BLAST trên ngân hàng gene NCBI để so sánh với các trình tự tương đồng đã được công bố.

2.2.6. *Xử lý số liệu*

Các giá trị trung bình được tính bằng phần mềm Excel 2016, số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Minitab 16 để kiểm định sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Turkey.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả tuyển chọn dòng vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất bún có khả năng tạo chất kết tụ sinh học trên đĩa thạch**

Kết quả thu được 28/32 dòng vi khuẩn phân lập có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường thạch có bản chất polysaccharide. Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn đều có dạng hình tròn và độ nổi

mô; có màu vàng, trắng trong, trắng ngà hoặc trắng đục, bìa nguyên hoặc chia thùy (Bảng 2).

Kết quả thu được 27/32 dòng vi khuẩn phân lập có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường thạch có bản chất protein. Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn đều có dạng hình tròn; có màu trắng ngà hoặc trắng đục, bìa nguyên hoặc chia thùy; độ nổi mô hoặc lồi (Bảng 3).

**Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide**

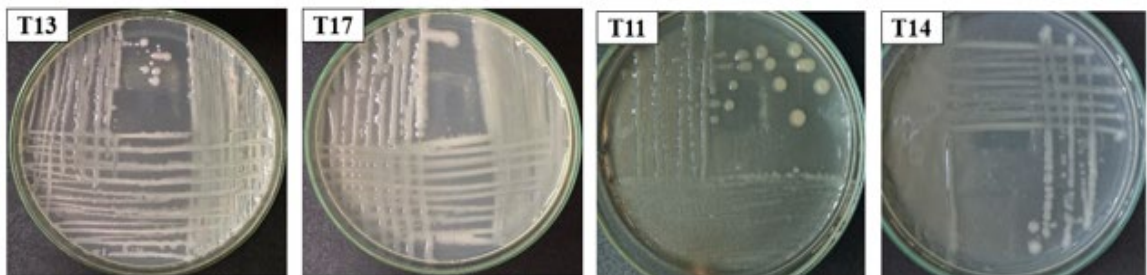
STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				
		Hình dạng	Màu sắc	Dạng bìa	Độ nổi	Độ nhầy
1	B4	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
2	B5	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Mô	+++
3	B6	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Mô	+++
4	B7	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
5	B8	Tròn	Vàng	Nguyên	Mô	+++
6	B9	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
7	B10	Tròn	Vàng	Nguyên	Mô	+++
8	B11	Tròn	Vàng	Nguyên	Mô	+++
9	B12	Tròn	Vàng	Nguyên	Mô	+++
10	B13	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
11	B14	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
12	B15	Tròn	Trắng trong	Nguyên	Mô	+++
13	T1	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
14	T2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
15	T3	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
16	T4	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
17	T5	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
18	T7	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
19	T8	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
20	T9	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
21	T10	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
22	T11	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Mô	+
23	T12	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
24	T13	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+
25	T14	Tròn	Trắng đục	Răng cưa	Mô	+++
26	T15	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
27	T16	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
28	T17	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++

Ghi chú: (+): độ nhầy thấp; (++) : độ nhầy trung bình, kéo sợi dài từ 2-3 cm; (+++): độ nhầy cao

**Bảng 3. Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường tạo chất kết tụ sinh học dạng protein**

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				
		Hình dạng	Màu sắc	Dạng bìa	Độ nổi	Độ nhậy
1	B1	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
2	B2	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	++
3	B3	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
4	B8	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
5	B9	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	++
6	B10	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	++
7	B11	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
8	B12	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	++
9	B13	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
10	B14	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
11	B15	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+++
12	T1	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Mô	+
13	T2	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	+
14	T3	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Lài	+++
15	T4	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Mô	+
16	T5	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
17	T6	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
18	T7	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	+
19	T8	Tròn	Trắng đục	Chia thùy	Lài	++
20	T10	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
21	T11	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
22	T12	Tròn	Trắng ngà	Nguyên	Mô	+++
23	T13	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	++
24	T14	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
25	T15	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++
26	T16	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Lài	++
27	T17	Tròn	Trắng đục	Nguyên	Mô	++

Ghi chú: (+): độ nhậy thấp; (++): độ nhậy trung bình, kéo sợi dài từ 2-3 cm; (+++): độ nhậy cao



(a) Môi trường tạo chất kết tụ dạng polysaccharide (b) Môi trường tạo chất kết tụ dạng protein

**Hình 1. Khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường tạo chất kết tụ sinh học trên đĩa thạch**

Ghi chú: Ký hiệu “T13” “T17” “T11” và “T14” là tên chủng vi khuẩn

Vi khuẩn kết tụ sinh học protein hay polysaccharide tăng sinh rất nhanh trên môi trường chuyên biệt (12 hay 24 giờ sau khi ủ), khuẩn lạc tạo ra nhiều chất nhầy ngoại bào (exopolymeride) tạo ra độ nhầy nhớt (viscosity) rất cao và chính chất nhầy nhớt này giúp gom tụ các chất lơ lửng trong môi trường để lắng xuống đáy, làm cho môi trường trong hơn, kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của Vinh (2010) và Mai và ctv. (2014). Sự hình thành chất nhầy trên môi trường chuyên biệt cho thấy có sự tương quan giữa khả năng kết tụ với đặc tính khuẩn lạc, những dòng có khuẩn lạc phát triển nhanh và độ nhầy càng cao thì cho chất kết tụ sinh học có khả năng kết tụ càng cao. Điều này cho thấy, các dòng này có khả năng sản sinh các đa phân tử kết tụ sinh học tạo nên độ nhầy, những dòng sản sinh

càng nhiều sẽ cho khuẩn lạc phát triển nhanh và độ nhầy càng cao (Gong et al., 2008).

**3.2. Kết quả tuyển chọn dòng vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất bún có khả năng tạo chất kết tụ sinh học trong môi trường lỏng**

Từ kết quả sàng lọc các dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất nhầy trên môi trường thạch, thí nghiệm được tiến hành đối với 28/32 dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide và 27/32 dòng vi khuẩn tạo chất kết tụ sinh học dạng protein trên môi trường lỏng. Trong đó, có 23.32 chủng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học ở hai dạng polysaccharide và protein (Bảng 4).

**Bảng 4. Tỷ lệ kết tụ sinh học của các dòng vi khuẩn**

STT	Dòng vi khuẩn	Tỷ lệ kết tụ (%)	
		Môi trường nuôi cấy tạo chất kết tụ có bản chất polysaccharide	Môi trường nuôi cấy tạo chất kết tụ có bản chất protein
1	B1	-	55,31 <sup>bcd</sup> ±0,80
2	B2	-	41,06 <sup>ijkl</sup> ±0,51
3	B3	-	47,90 <sup>efgh</sup> ±1,31
4	B4	71,70 <sup>ab</sup> ±0,58	-
5	B5	60,56 <sup>b-h</sup> ±1,09	-
6	B6	70,76 <sup>abc</sup> ±2,41	-
7	B7	57,84 <sup>c-i</sup> ±1,90	-
8	B8	62,75 <sup>a-f</sup> ±3,99	50,84 <sup>de</sup> ±5,70
9	B9	62,58 <sup>a-f</sup> ±0,73	49,44 <sup>ef</sup> ±2,91
10	B10	69,10 <sup>abc</sup> ±0,81	47,34 <sup>efghi</sup> ±1,40
11	B11	65,33 <sup>a-e</sup> ±2,50	57,26 <sup>bc</sup> ±2,42
12	B12	63,77 <sup>a-f</sup> ±3,54	48,74 <sup>efg</sup> ±0,91
13	B13	47,41 <sup>ij</sup> ±2,23	57,96 <sup>b</sup> ±0,78
14	B14	48,77 <sup>hij</sup> ±3,48	43,30 <sup>hijkl</sup> ±1,31
15	B15	66,85 <sup>a-d</sup> ±3,75	57,26 <sup>bc</sup> ±1,18
16	T1	58,49 <sup>c-i</sup> ±3,68	39,95 <sup>ijkl</sup> ±0,94
17	T2	48,64 <sup>hij</sup> ±4,41	38,69 <sup>kl</sup> ±1,32
18	T3	49,50 <sup>ghi</sup> ±3,06	52,10 <sup>cde</sup> ±0,63
19	T4	53,40 <sup>c-i</sup> ±3,37	38,69 <sup>kl</sup> ±0,92
20	T5	50,15 <sup>g-i</sup> ±2,94	43,58 <sup>ghijk</sup> ±0,68
21	T6	-	47,34 <sup>efghi</sup> ±1,58
22	T7	53,94 <sup>c-i</sup> ±3,91	38,13 <sup>l</sup> ±0,76
23	T8	50,10 <sup>ghi</sup> ±6,13	47,90 <sup>efgh</sup> ±1,31
24	T9	51,73 <sup>f-i</sup> ±3,67	-
25	T10	63,08 <sup>a-f</sup> ±1,24	44,69 <sup>fghij</sup> ±1,24
26	T11	36,38 <sup>ijk</sup> ±5,51	63,83 <sup>a</sup> ±1,35
27	T12	62,94 <sup>a-f</sup> ±1,18	51,96 <sup>de</sup> ±1,23

STT	Dòng vi khuẩn	Tỷ lệ kết tụ (%)	
		Môi trường nuôi cấy tạo chất kết tụ có bản chất polysaccharide	Môi trường nuôi cấy tạo chất kết tụ có bản chất protein
28	T13	33,74 <sup>k</sup> ±5,74	42,74 <sup>hijkl</sup> ±0,33
29	T14	61,44 <sup>a-g</sup> ±2,10	43,30 <sup>hijkl</sup> ±1,31
30	T15	55,05 <sup>d-i</sup> ±4,04	43,44 <sup>hijk</sup> ±1,26
31	T16	59,76 <sup>b-i</sup> ±4,25	44,27 <sup>ghij</sup> ±0,31
32	T17	73,41 <sup>a</sup> ±3,98	42,60 <sup>ijkl</sup> ±0,67

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Tukey.

Kết quả trên cho thấy dòng vi khuẩn B1, B2, B3 và T6 không có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide nhưng lại có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng protein. Ngược lại, dòng vi khuẩn B4, B5, B6, B7 và T9 không có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng protein nhưng lại có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide. Cụ thể, đối với thí nghiệm tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide có 22/28 dòng vi khuẩn có tỷ lệ kết tụ trên 50%. Trong đó, dòng vi khuẩn T17 cho khả năng kết tụ sinh học cao nhất với tỷ lệ kết tụ là 73,41%. Đối với thí nghiệm tạo chất kết tụ sinh học dạng protein có 8/27 dòng vi khuẩn có tỷ lệ kết tụ trên 50%. Trong đó, dòng vi khuẩn T11 cho khả năng kết tụ sinh học cao nhất với tỷ lệ kết tụ là 63,83%.

Kết quả trong nghiên cứu này phù hợp với nhận định của Bakar et al. (2021) các polyme kết tụ sinh học có bản chất hay thành phần là polysaccharide cao (trên 80%) sẽ đạt tỷ lệ kết tụ sinh học cao (trên 90%). Nghiên cứu của Vimala et al. (2020) đã xác nhận rằng cấu trúc của các nhóm chức như carboxyl, hydroxyl, amino hay nhóm phosphate thuộc

polysaccharide có thể ảnh hưởng đến hoạt động kết tụ của các chất kết tụ sinh học. Tuy nhiên, việc thành phần ưu thế có trong chất kết tụ sinh học là polysaccharide hay protein còn phụ thuộc rất nhiều vào từng dòng vi khuẩn, các ngưỡng điều kiện môi trường, tốc độ tăng trưởng và giai đoạn tăng trưởng của từng chủng vi khuẩn.

### 3.3. Kết quả khảo sát điều kiện pH của hỗn hợp kaolin và CaCl<sub>2</sub> để vi khuẩn sản xuất chất kết tụ sinh học

Một số yếu tố như nồng độ carbon và nitơ, pH của môi trường nuôi cấy hoặc pH của nước thải, nhiệt độ, thời gian và các loại ion cùng nhiều yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến quá trình sản xuất chất kết tụ sinh học. Môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng mạnh mẽ đến các đặc tính cấu trúc, thành phần cũng như quá trình sản xuất chất kết tụ sinh học (Wang et al., 2019, Caccamo et al., 2020). Do đó, hai dòng vi khuẩn T17 và T11 là hai dòng vi khuẩn được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo về khảo sát pH (Bảng 5) và nguồn carbon (Bảng 6) để vi khuẩn đạt khả năng kết tụ sinh học tốt nhất.

**Bảng 5. Kết quả khảo sát pH của hỗn hợp kaolin và CaCl<sub>2</sub> đến khả năng kết tụ sinh học bởi chủng vi khuẩn**

pH của Kaolin (5g/L) + CaCl <sub>2</sub> (1%) (tỷ lệ 9:1)	Tỷ lệ kết tụ (%)	
	T17 - pol	T11 - protein
5,0	81,64 <sup>a</sup> ±0,43	67,96 <sup>a</sup> ±0,41
6,0	72,11 <sup>b</sup> ±0,82	64,85 <sup>bc</sup> ±0,43
7,0	71,24 <sup>b</sup> ±0,29	63,92 <sup>c</sup> ±0,73
8,0	68,54 <sup>c</sup> ±0,33	59,76 <sup>d</sup> ±0,30
9,0	66,83 <sup>c</sup> ±1,73	65,56 <sup>b</sup> ±0,91

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Tukey. T17 - pol: Dòng vi khuẩn T17 nuôi trong môi trường tạo chất kết tụ dạng polysaccharide; T11 - protein: Dòng vi khuẩn T11 nuôi trong môi trường tạo chất kết tụ dạng protein.

Kết quả cho thấy pH có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tạo kết tụ sinh học. Từ kết quả trên cho thấy tại các giá trị pH khảo sát tỷ lệ kết tụ sinh học của dòng vi khuẩn T17 trên môi trường tạo chất kết

tụ dạng polysaccharide và T11 trên môi trường tạo chất kết tụ dạng protein đều đạt trên 50%. Đặc biệt, tại giá trị pH 5,0, tỷ lệ kết tụ sinh học dạng polysaccharide và protein đều đạt cao nhất, lần lượt

ở dòng vi khuẩn T17 và T11 là 81,64% và 67,96%. Tuy nhiên, tỷ lệ kết tụ sinh học có xu hướng giảm dần từ pH 5,0 đến pH 9,0 đối với dòng vi khuẩn T17 trên môi trường tạo chất kết tụ dạng polysaccharide, kết quả nghiên cứu có xu hướng tương tự với kết quả nghiên cứu của Zulkeflee et al. (2012) khi dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. UPMB13 cho tỷ lệ kết tụ với kaolin đạt trên 90% trong điều kiện pH từ 5,0 đến 6,0. Gupta et al. (2023) rằng nếu chất kết tụ sinh học có hàm lượng polysaccharide cao và được tạo điều kiện kết tụ trong môi trường có giá trị pH từ 5,0 đến 7,0 thì ion H<sup>+</sup> trong môi trường sẽ liên kết với gốc carboxyl COO<sup>-</sup> trong chất kết tụ sinh học cho ra gốc COOH<sup>+</sup>, điều này sẽ hỗ trợ tăng liên kết giữa nhóm chức này với điện tích âm của các hạt kaolin từ đó làm tăng khả năng kết tụ.

Ngược lại, tỷ lệ kết tụ sinh học trên môi trường protein bởi dòng vi khuẩn T11 lại có xu hướng giảm từ pH 5,0 đến pH 8,0 và tăng lên tại pH 9,0, kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Mai và ctv.

**Bảng 6. Kết quả khảo sát nguồn carbon bổ sung vào môi trường ảnh hưởng đến khả năng kết tụ sinh học bởi chủng vi khuẩn**

Nguồn carbon	Tỷ lệ kết tụ (%)	
	T17 - pol	T11 - protein
Glucose	79,87 <sup>a</sup> ±0,79	68,02 <sup>a</sup> ±0,26
Sucrose	64,57 <sup>b</sup> ±0,26	45,57 <sup>b</sup> ±2,64
Tinh bột	38,06 <sup>c</sup> ±2,09	37,88 <sup>c</sup> ±2,04

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5% bằng kiểm định Tukey. T17 - pol: Dòng vi khuẩn T17 nuôi trong môi trường tạo chất kết tụ dạng polysaccharide; T11 - protein: Dòng vi khuẩn T11 nuôi trong môi trường tạo chất kết tụ dạng protein.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nguồn carbon là glucose đều cho tỷ lệ kết tụ cao nhất ở cả hai dòng vi khuẩn T17 và T11 lần lượt ở chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide và protein. Cụ thể, tại nghiệm thức bổ sung nguồn carbon là glucose vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ kết tụ sinh học đạt gần 80% (79,87%) đối với dòng vi khuẩn T17 và 68,02% đối với dòng vi khuẩn T11, các kết quả này có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với các nghiệm thức còn lại. Tinh bột là nguồn carbon cho tỷ lệ kết tụ sinh học thấp nhất trong các nghiệm thức được khảo sát. Kết quả nghiên cứu của Liu et al. (2010) đã chứng minh rằng dòng vi khuẩn *Chryseobacterium daeguense* W6 có khả năng tạo chất kết tụ sinh học cao nhất trong môi trường có bổ sung glucose với tỷ lệ kết tụ đạt 88,87% trong khi đó nếu bổ sung nguồn carbon là sucrose thì tỷ lệ kết tụ sinh học của W6 chỉ ở mức 70%. Dòng vi khuẩn *Bacillus velezensis* có khả năng tạo kết tụ sinh học đạt tỷ lệ 96,8% khi bổ sung 16 g/L glucose kết hợp với các thành phần khác trong môi trường nuôi cấy

(2014) khi tỷ lệ kết tụ sinh học dạng protein cho tỷ lệ kết tụ cao nhất ở pH 5,0, 6,0 và 9,0. Thực tế, các hạt biofloculant và kaolin biểu hiện nhiều điện tích và trạng thái ở các giá trị pH khác nhau. Ở điều kiện acid, các chất kết tụ sinh học và kaolin có thể đã hấp thụ các ion H<sup>+</sup>, làm suy yếu sự hình thành phức hợp chất kết tụ - kaolin, dẫn đến hoạt động kết tụ giảm đi. Tuy nhiên, ở độ pH tối ưu là 8,0 hoặc 9,0 ion OH<sup>-</sup> được hấp thụ đã thúc đẩy sự hình thành các phức chất giữa chất kết tụ sinh học và kaolin, do đó dẫn đến hoạt động kết tụ đạt hiệu quả hơn (Tsilo et al., 2021).

**3.4. Kết quả khảo sát nguồn carbon để vi khuẩn sản xuất chất kết tụ sinh học**

Nguồn carbon được xem là yếu tố chính trong quá trình sản xuất chất kết tụ sinh học vì chúng thúc đẩy tốc độ tăng trưởng và sản xuất chất kết tụ sinh học của các dòng vi khuẩn. Ảnh hưởng của 03 nguồn carbon như glucose, sucrose và tinh bột đến hiệu quả kết tụ sinh học được trình bày tại **Bảng 6**.

như 3,5 g/L MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O và 1,6 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Agunbiade et al., 2022).

Sở dĩ, các dòng vi khuẩn có khả năng cho hiệu quả kết tụ tối ưu ở các nguồn carbon khác nhau có thể vì khả năng và nhu cầu sử dụng chất dinh dưỡng ở các dòng vi khuẩn là khác nhau. Trong nghiên cứu này, có thể dòng vi khuẩn T17 và T11 là hai dòng có xu hướng thích sử dụng glucose làm nguồn carbon hơn vì glucose có cấu trúc đơn giản, dễ hấp thụ, dễ sử dụng nên chúng có thể sử dụng trực tiếp mà không cần trải qua quá trình dị hóa, cho nên tốc độ tăng trưởng và phát triển sẽ nhanh hơn, chất kết tụ được sản xuất nhiều hơn, từ đó nâng cao hiệu suất tạo chất kết tụ trong khi sucrose là đường disaccharide và tinh bột là một hợp chất cao phân tử và vi khuẩn khó có khả năng sử dụng trực tiếp như đường monosaccharide mà phải cần thời gian để chuyển hóa và hấp thụ.

Trong nghiên cứu này, pH và nguồn carbon tối ưu để hai dòng vi khuẩn T17 và T11 đạt tỷ lệ kết tụ hiệu quả nhất là pH 5,0 và nguồn carbon là glucose



và xu hướng tạo chất kết tụ dạng polysaccharide cho hiệu quả kết tụ sinh học cao hơn chất kết tụ sinh học dạng protein. Kết quả nghiên cứu này rất phù hợp với điều kiện pH trong nước thải bún thường dao động từ 5,5 đến 6,5. Đồng thời, chất thải trong nước thải sản xuất bún giàu nguồn carbohydrate là tinh bột và tinh bột dễ bị thủy phân cho ra đường khử (như glucose). Do đó, hai dòng vi khuẩn T17 và T11 là hai dòng tiềm năng trong giai đoạn làm lắng và loại bỏ các chất rắn lơ lửng có trong nước thải, góp phần hỗ trợ xử lý nước thải sản xuất bún một cách hiệu quả hơn.

### 3.5. Kết quả định danh dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học

Kết quả trên cho thấy chủng vi khuẩn T11 và T17 có tiềm năng cao về khả năng tạo chất kết tụ trong nước thải. Do đó, chủng vi khuẩn T11 và T17 được chọn để giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh độ tương đồng trên ngân hàng gene NCBI. Kết quả định danh chủng vi khuẩn T11 và T17 lần lượt là chủng *Bacillus velezensis* và *Klebsiella pneumoniae* với độ tương đồng đạt 100% (Hình 2).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus velezensis strain VJH504 chromosome, complete genome	<i>Bacillus velezensis</i>	1387	12474	100%	0.0	100.00%	3980773	CP131928.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nts-58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	1387	1387	100%	0.0	100.00%	1450	OR393026.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nts-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	1387	1387	100%	0.0	100.00%	1458	OR392983.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nts-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	1387	1387	100%	0.0	100.00%	1443	OR392981.1
Bacillus sp. (in: firmicutes) strain nts-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus sp. (in: firmicutes)</i>	1387	1387	100%	0.0	100.00%	1439	OR392971.1

(a)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain KP18-31 chromosome, complete genome	<i>Klebsiella quasi...</i>	2052	16322	100%	0.0	100.00%	5157396	CP045641.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain cly20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella quasi...</i>	2052	2052	100%	0.0	100.00%	1402	MN1177203.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain NCTC9170 genome assembly, chromosome_1	<i>Klebsiella quasi...</i>	2052	16333	100%	0.0	100.00%	5142131	LR588411.1
<i>Klebsiella sp.</i> strain PAK/UVAS/PATH/SA20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella sp.</i>	2052	2052	100%	0.0	100.00%	1402	MK789286.1
<i>Klebsiella sp.</i> strain PAK/UVAS/PATH/SA19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella sp.</i>	2052	2052	100%	0.0	100.00%	1409	MK789287.1
<i>Klebsiella sp.</i> strain PAK/UVAS/PATH/SA15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella sp.</i>	2052	2052	100%	0.0	100.00%	1401	MK789283.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain NCTC9180 genome assembly, chromosome_1	<i>Klebsiella quasi...</i>	2052	16239	100%	0.0	100.00%	5320817	LR134202.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> strain ATCC 700603 chromosome, complete genome	<i>Klebsiella quasi...</i>	2052	16255	100%	0.0	100.00%	5285790	CP029597.1
Enterobacteriaceae bacterium S05 chromosome, complete genome	Enterobacteriac...	2052	16266	100%	0.0	100.00%	5157054	CP024784.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella pneu...</i>	2047	2047	100%	0.0	99.91%	1444	MZ389281.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain AMHWRB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella quasi...</i>	2047	2047	100%	0.0	99.91%	1417	MZ379583.1
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> strain RS17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Klebsiella quasi...</i>	2047	2047	100%	0.0	99.91%	1413	MZ169421.1

(b)

**Hình 2. Kết quả định danh của dòng vi khuẩn T11 và T17**

Ghi chú: (a) Kết quả BLAST trình tự dòng vi khuẩn T11 trên NCBI, (b) Kết quả BLAST trình tự dòng vi khuẩn T17 trên NCBI

Các loài vi khuẩn thuộc Chi *Bacillus* là vi khuẩn hình que và hầu hết đều không gây hại đối với con người. Các dòng vi khuẩn này phát triển nhanh trong điều kiện giàu oxy và tồn tại bằng cách hình thành nội bào tử ngay cả trong điều kiện yếm khí. Do có khả năng hình thành bào tử nên các dòng vi khuẩn này có thể tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt của môi trường như chất dinh dưỡng cạn kiệt và duy trì sự sống trong thời gian dài. Một số dòng vi khuẩn *Bacillus sp.* đã được nghiên cứu và ứng dụng trong các giai đoạn khác nhau của quá trình xử lý nước thải do chúng có khả năng tạo chất kết tụ sinh học và tích lũy poly-phosphate (Seo et al., 2022). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Layly et al. (2021) đã phân

lập dòng vi khuẩn *B. velezensis* từ nhà máy sản xuất dầu cọ có khả năng phân giải lipid. Nghiên cứu của Agunbiade et al. (2022) cũng đã chứng minh rằng dòng vi khuẩn *B. velezensis* có khả năng tạo chất kết tụ sinh học trên 90%. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các dòng vi khuẩn thuộc chi *Klebsiella* có tiềm năng nổi bật trong việc tạo chất kết tụ sinh học và được ứng dụng nhiều trong các quá trình xử lý các chất rắn lơ lửng có trong nước thải. Dòng vi khuẩn *K. pneumoniae* NJ7 có khả năng tạo chất kết tụ sinh học dạng polysaccharide trên 85% (Joshi et al., 2017) và trên 73% đối với dòng *Klebsiella sp.* TG1 (Liu et al., 2013) và trên 75% đối với dòng *Klebsiella sp.* ZZ-3 (Selepe et al., 2022). Bên cạnh

đó, nghiên cứu của Nie et al. (2011) đã xác định được chất kết tụ sinh học MNXY1 có dạng polysaccharide được tạo ra từ dòng vi khuẩn *K. pneumoniae* NY1 trong điều kiện tối ưu về pH, nguồn nitơ và carbon sẽ cho tỷ lệ kết tụ đạt trên 85%. Vì vậy, các dòng vi khuẩn thuộc Chi *Bacillus* và *Klebsiella* sẽ là những dòng vi khuẩn hứa hẹn đầy tiềm năng trong lĩnh vực hỗ trợ xử lý nước thải trước khi nguồn nước ô nhiễm này được xả thải ra môi trường.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được 28/32 dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học có bản chất polysaccharide và 27/32 dòng vi khuẩn có khả năng tạo chất kết tụ sinh học có bản chất protein trên môi trường thạch thông qua khả năng tạo chất nhầy trên môi trường. Hai dòng vi khuẩn T11 và T17 có khả năng hình thành chất kết

tụ sinh học cao nhất trong điều kiện môi trường bổ sung nguồn carbon là glucose, hỗn hợp kaolin và CaCl<sub>2</sub> tại giá trị pH 5,0 cho tỷ lệ kết tụ sinh học cao nhất lần lượt dạng polysaccharide đối với dòng vi khuẩn T17 và dạng protein đối với dòng vi khuẩn T11 là 79,87% và 68,02%. Kết quả giải trình tự gene 16S rRNA cho thấy hai dòng vi khuẩn này lần lượt là dòng *Klebsiella pneumoniae* và *Bacillus velezensis* với độ tương đồng đạt 100%. Với kết quả trong nghiên cứu, hai dòng vi khuẩn T11 và T17 là hai dòng vi khuẩn có tiềm năng cao trong việc hỗ trợ làm lắng các chất rắn lơ lửng gây ô nhiễm trong nước thải, góp phần nâng cao hiệu quả xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học trong tương lai.

#### LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: T2023-178.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agunbiade, M., Oladipo, P., Ademakinwa, A. N., Awolusi, O. Adesiyun, I. M., Oyekola, O., Ololade, O., & Ojo, A. (2022). Biofloculant produced by *Bacillus velezensis* and its potential application in brewery wastewater treatment. *Scientific Reports*, 12, 10945. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15193-8>.
- Bahniuk, M. S., Alidina, F., Tan, X., & Unsworth L. D. (2022). The last 25 years of research on biofloculants for kaolin flocculation with recent trends & technical challenges for the future. *Frontier in Bioengineering & Biotechnology*, 10, 1048755. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1048755>.
- Bakar, S. N. H. A., Hasan, H. A., Abdullah, S. R. S., Kasan, N. A., Muhamad, M. H., & Kurniawan, S. B. (2021). A review of the production process of bacteria-based polymeric flocculants. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101915. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101915>.
- Caccamo, M. T., Gugli, C., Zammuto, V., & Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 77-83. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163.
- Deng, S., Bai, R., & Hu, X. (2003). Characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus mucilaginosus* & its use in starch wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 588-593. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1159-5>.
- Gong, W. X., Wang, S. G., Sun, X. F., Liu, X. W., Yue, Q. Y., & Gao, B. Y. (2008). Biofloculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 99(11), 4668-4674. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.077>
- Gupta, A., Kumar, M., Sharma, R., Tripathi, R., Kumar, V., & Thakur, I. S. (2023). Screening & characterization of biofloculant isolated from thermotolerant *Bacillus* sp. ISTVK1 & its application in wastewater treatment. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103135. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103135>.
- Jie, C., Timothy, S., Sitrin, R.D., John, P. & Hennessey, J. (2006). Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine. *Journal of Virological Methods*, 131(2), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.013>.
- Joshi, N., Naresh, D. R., Anil, K. M. & Mody K. H. (2017). Recycling of Starch Processing Industrial Wastewater as a Sole Nutrient Source for the Biofloculant Production. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(5), 1458-1465. <https://doi.org/10.1002/ep.12608>.
- Kurniawan, T. A., Avtar, R., Singh, D., Xue, W., Othman, M. H. D., Hwang, G. H., Iswanto, I., Albadarin, A. B., & Kern, A. O. (2021). Reforming MSWM in Sukunan (Yogyakarta, Indonesia): A case-study of applying a zero-waste approach based on circular economy paradigm. *Journal of Cleaner Production*, 284, 124775-124775. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124775>.
- Kwon, G. S., Moon, S. H., Hong, S. D., Lee, H. M., Kim, H. S., Oh, H. M., & Yoon, B.D. (1996). A

- novel flocculant biopolymer produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. *Biotechnology Letters*, 18, 1459-1464. <https://doi.org/10.1007/BF00129355>.
- Layly, I. R., Meryin, A., Heianti, I., & Astuti, R. I. (2021). Identification of lipase producing bacteria from palm oil sewage sludge processing plant at Malimping, Banten, Indonesia. *Biodiversitas*, 22, 4512 - 4524. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221045>.
- Liu, W. J., Wang, K., Li, B. Z., Yuan, H. L., & Yang, J. S. (2010). Production & characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. *Bioresour. Technol.*, 101, 1044–1048.
- Liu, Z., Hu, Z., Wang, T., Chen, Y., Zhang, J., Yu, J., Zhang, T., Zhang, Y., & Li, Y. (2013). Production of novel microbial flocculants by *Klebsiella* sp. TG-1 using waste residue from the food industry & its use in defecating the tronasuspension. *Bioresource Technology*, 139, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.165>
- Loan, L. T. (2020). *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn kết tụ sinh học, hấp thu N và tích lũy polyphosphate trong nước thải sản xuất hồ tiêu Mỹ Tho và ứng dụng xử lý nước thải*. Luận án Tiến sĩ Vi sinh vật học. Đại học Cần Thơ.
- Mai, Đ. T. H., Toàn, H.T., & Điệp, C. N. (2014). Tối ưu hóa và ứng dụng vi khuẩn tạo chất kết tụ sinh học trên môi trường protein vào xử lý nước ao nuôi cá tra ở quy mô phòng thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 30, 13-21.
- Nie, M., Yin, X., Jia, J., Wang, Y., Liu, S., Shen, Q., Li, P. & Wang, Z. (2011). Production of a novel bioflocculant MNXY1 by *Klebsiella pneumoniae* strain NY1 & application in precipitation of cyanobacteria & municipal wastewater treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 547-558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05080.x>.
- Rebah, F.B., Mnif, W., & Siddeeg, S. M. (2018). Microbial flocculants as an alternative to synthetic polymers for wastewater treatment: a review. *Symmetry*, 10, 556, 19 pages. <https://doi.org/10.3390/sym10110556>.
- Salehizadeh, H., Vossoughi, M. & Alemzadeh, I. (2000). Some investigations on bioflocculant producing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 5(1), 39-44. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00066-2).
- Selepe, T. N., Akanbi, R., Maliehe, T. S., Moganedi, K., & Masoko, P. (2022). Flocculating Activity of a Bioflocculant from *Bacillus megaterium* BMBF in Treatment of Domestic and Coal Mine Wastewater. *Applied Sciences*, 12(16), 8312. <https://doi.org/10.3390/app12168312>.
- Seo, K. W., Gu, M. B., Tsang, Y. F., Choi, Y. S., & Chung, J. (2022). Application of endospore-forming *Bacillus* species to food waste-recycling wastewater treatment: A focus on the fate of macromolecular nutrients. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107584>.
- Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G., & Chang, Y.N. (2001). Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* & its flocculation properties. *Bioresource Technology*, 78(3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00027-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00027-x).
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., & Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. & *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1465–1473. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>.
- Tsilo, P. H., Basson, A. K., Ntombela, Z. G., Maliehe, T. S., & Pullabhotla, R. V. R. S. (2021). Isolation and Optimization of Culture Conditions of a Bioflocculant-Producing Fungi from Kombucha Tea SCOBY. *Microbiology Research*, 12, 950 - 966. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12040070>
- Vimala, R. T. V, Escaline, L. J., & Sivaramakrishnan, S. (2020). Characterization of self-assembled bioflocculant from the microbial consortium & its applications. *Journal of Environmental Management*, 258, 110000. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110000>.
- Vinh, B. T., Quốc, P. T. và Điệp, C. N. (2010). Phân lập và nhận diện vi khuẩn sản xuất chất kết tụ sinh học trong chất thải sữa và ứng dụng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8(3A), 805-809.
- Wang, J., David, Salem, R., & Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Polyme carbohydrate*, 205, 8-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.011>.
- Zulkeflee, Z., Aris, A. Z., Shamsuddin, Z. H. & Yusoff, M. K. (2012). Cation Dependence, pH Tolerance and Dosage Requirement of a Bioflocculant Produced by *Bacillus* spp. UPMB13: Flocculation Performance Optimization through Kaolin Assays. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-7. <https://doi.org/10.1100/2012/495659>.