

DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.158

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG LÀM GIẢM MÀU MẬT RI ĐƯỜNG SAU LÊN MEN CỒN TỪ MỘT SỐ HẠT NGŨ CỐC

Võ Thị Lệ Trinh<sup>1</sup> và Nguyễn Khởi Nghĩa<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viên cao học ngành Sinh thái học, khóa 23, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Khởi Nghĩa (email: [nknghia@ctu.edu.vn](mailto:nknghia@ctu.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 22/07/2018

Ngày duyệt đăng: 27/12/2018

### Title:

Isolation, selection and identification of bacterial strains from various cereal grains for decolorization of molasses-based distillery wastewater

### Từ khóa:

*Enterococcus italicus*, giảm màu, hạt ngũ cốc, mật ri sau lên men cồn, nước thải

### Keywords:

Cereal grains, decolorization, *Enterococcus italicus*, molasses-based distillery wastewater, wastewater

### ABSTRACT

Discharging improperly untreated distillery waste water from sugarcane molasses-based ethanol industries may greatly cause an adverse affect on water and aquatic living organisms. The study was aimed to isolate a number of endophytic bacteria from rice, corn, sesame and soybean grains to reduce color of the molasses after ethanol fermentation. Liquid minimal salt medium containing 30% molasses-based distillery wastewater (MBDW) was used to quantify the decolorization ability of isolated strains. The remained color of MBDW in the liquid culture medium was determined by spectrophotometer at 650 nm. The results showed that a total of 39 bacterial strains were isolated from 4 kinds of cereal grains. Ten out of 39 isolates from rice and corn grains showed their high capacity of decolorization. Especially, G4 and G5 strains decolorized up to 30%, and 25.3%, respectively of the MBDW in liquid culture medium after three days of incubation. The results of an assessment for decolorization efficacy of three microbial by-products fermented individually with G4, G5 strains and endophytic microbial community from rice grains showed that after two consecutive treatment stages, the decolorization efficacy of these three microbial by-products was very high (60.2%, 68.5% and 79.5%, respectively) and significantly higher than that of the control treatment (only with distilled water) (34%). Basing on the 16S-rRNA gene sequence, G4 and G5 strains were indentified relatively to belong to the genus of *Enterococcus* and they have the closest relationship with *Enterococcus italicus* G4 and *Enterococcus italicus* G5, respectively.

### TÓM TẮT

Mật ri đường sau lên men cồn (MRSLM) nếu không được xử lý trước khi xả thải sẽ ảnh hưởng lớn đến môi trường nước và thủy sinh. Nghiên cứu nhằm phân lập một số dòng vi khuẩn từ hạt gạo, bắp, mè và đậu nành để giảm màu MRSLM. Môi trường khoáng tối thiểu lỏng chứa 30% MRSLM được sử dụng để định lượng khả năng giảm màu MRSLM. Lượng màu MRSLM còn lại trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 650 nm. Kết quả cho thấy tổng cộng có 39 dòng vi khuẩn phân lập từ 4 loại hạt ngũ cốc. Trong đó, 10 dòng vi khuẩn phân lập từ hạt gạo và bắp thể hiện khả năng giảm màu MRSLM cao. Hai dòng vi khuẩn G4 và G5 lần lượt giảm 30% và 25,3% màu MRSLM sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả khảo sát với 3 chế phẩm chứa riêng lẻ vi khuẩn G4, G5 và cộng đồng vi khuẩn phân lập từ hạt gạo cho thấy sau 2 giai đoạn xử lý, khả năng giảm màu của 3 chế phẩm đều rất cao, lần lượt đạt 60,2%, 68,5% và 79,5% và cao hơn so với nghiệm thức đối chứng xử lý với nước cất (30%). Kết quả định danh thông qua 16S-rRNA cho thấy 2 dòng vi khuẩn G4 và G5 thuộc chi *Enterococcus* và có quan hệ gần gũi nhất với loài *Enterococcus italicus* G4 và *Enterococcus italicus* G5.

Trích dẫn: Võ Thị Lệ Trinh và Nguyễn Khởi Nghĩa, 2018. Phân lập, tuyển chọn và định danh một số dòng vi khuẩn có khả năng làm giảm màu mật ri đường sau lên men cồn từ một số hạt ngũ cốc. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9A): 37-45.

## 1 GIỚI THIỆU

Việc sử dụng nhiên liệu sinh học thay thế cho xăng được bắt đầu vào những năm 70 của thế kỷ hai mươi khi khủng hoảng nguồn cung dầu mỏ xảy ra trên toàn thế giới. Nhiên liệu sinh học là loại nhiên liệu được hình thành từ các hợp chất có nguồn gốc động và thực vật, có nhiều ưu điểm hơn so với các loại nhiên liệu hóa thạch (dầu khí, than đá...) (Licht, 2013). Trong số các dạng nhiên liệu sinh học, bio-ethanol (cồn sinh học) là loại nhiên liệu thông dụng nhất hiện nay vì có khả năng sản xuất ở quy mô công nghiệp từ các nguồn nguyên liệu chứa đường (mật củ cải đường, mật mía, nước ép mía), tinh bột (bắp, lúa mì, khoai mì, gạo) và cellulose (Lin *et al.*, 2006). Một thách thức lớn nhất trong quá trình sản xuất cồn từ mật ri đường là xử lý một lượng lớn nước thải có hàm lượng chất hữu cơ cao, pH thấp, nhiều chất lơ lửng, đậm màu và nhiệt độ cao. Vấn đề chính trong việc xử lý nguồn nước thải này là làm thế nào để làm giảm độ đậm màu của nước thải vì theo nghiên cứu Wedzicha và Kaputo (1992) trong nước thải MRSLM có chứa một lượng lớn hợp chất màu nâu đậm, các hợp chất màu này làm ngăn cản quá trình quang hợp và suy giảm lượng oxy hòa tan trong nước, do đó cần phải xử lý trước khi xả thải nếu không sẽ gây ô nhiễm môi trường sinh thái đặc biệt là nguồn nước. Hiện nay, có nhiều phương pháp xử lý nước thải trong sản xuất cồn bằng mật ri đường, chủ yếu là các phương pháp hóa học và vật lý, nhưng chi phí xử lý cao và sau khi xử lý đã sinh ra lượng bùn thải rất lớn (Lê Đức Trung, 2010). Do đó, việc tìm ra phương pháp xử lý nguồn nước thải này một cách hiệu quả và tiết kiệm chi phí đang được các nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu. Trong đó, biện pháp xử lý sinh học thông qua việc sử dụng vi sinh vật có lợi trong tự nhiên có tiềm năng ứng dụng rất lớn vì cho hiệu quả xử lý cao, chi phí thấp và thân thiện với môi trường sinh thái do vi sinh vật có khả năng chuyển hóa và phân hủy sinh học các phức hợp hữu cơ, độc hại, bền vững và gây hại cho môi trường (Pandey *et al.*, 2003). Một vài nghiên cứu đã cho thấy một số dòng vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí có khả năng phân hủy màu trong nguồn nước thải này như *Lactobacillus hilgardii* (Ohmomo *et al.*, 1988), *Bacillus* sp. (Kumar and Chandra, 2006), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Proteus mirabilis* (Mohana *et al.*, 2007). Tuy nhiên, ở Việt Nam, mặc dù có nhiều nhà máy và cơ sở sản xuất cồn từ mật ri đường đang vận hành nhưng các nghiên cứu về sử dụng vi sinh vật trong đó đặc biệt là vi khuẩn dùng để xử lý màu MRSLM còn rất hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và định danh một số dòng vi khuẩn nội sinh trong hạt ngũ cốc để giảm màu MRSLM trong nước thải của ngành sản xuất cồn từ mật ri đường.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Vật liệu thí nghiệm

Nguồn nước thải MRSLM còn được thu nhận từ nhà máy sản xuất cồn từ mật ri đường ở Quận Thốt Nốt, thành phố Cần Thơ. Mẫu nước thải được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ các tạp chất và được tiệt trùng uớt ở 121°C trong 20 phút trước khi sử dụng.

### 2.2 Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

- Môi trường khoáng tối thiểu lỏng (Minimal Salts Medium, MSM) dùng để nuôi cấy và khảo sát khả năng giảm màu MRSLM (Chen *et al.*, 2010) gồm: 1 g NaCl; 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,935 g MgCl<sub>2</sub>; 0,015 g CaCl<sub>2</sub>; 0,49 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 0,375 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hòa tan đều trong 1 L nước khử khoáng và hiệu chỉnh pH = 7.

- Môi trường Tryptose Soybean Agar (TSA) dùng để phân lập vi khuẩn gồm 30 g Tryptone Soybean Broth (TSB), 15 g agar hòa tan đều trong 1 L nước khử khoáng.

- Môi trường Man Rogosa Sharpe (MRS) dùng tạo chế phẩm vi sinh (Pathak and Martirosyan, 2012) gồm: 20 g Glucose; 1 g Tween-80; 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 g Na-acetate; 2 g Ammonium citrate; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O và 0,05 g MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O hòa tan đều trong 1 L nước khử khoáng.

- Môi trường Luria-Bertani (LB) dùng nuôi vi khuẩn cho định danh (Schmidt *et al.*, 2003) gồm 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract và 10 g NaCl.

Tất cả các môi trường được khử trùng 121°C trong 20 phút trước khi sử dụng.

### 2.3 Phương pháp thí nghiệm

2.3.1 Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng giảm màu MRSLM từ hạt ngũ cốc

#### a. Trích vi khuẩn từ hạt ngũ cốc

Trước tiên, cân 100 g hạt ngũ cốc cho mỗi loại gồm: gạo, bắp, mè và đậu nành cho vào từng bình tam giác 250 mL tương ứng (Ikeda *et al.*, 2013). Ngâm từng mẫu hạt ngũ cốc với 200 mL cồn 70° trong 3 phút, sau đó loại bỏ cồn và tiếp tục ngâm với 200 mL NaClO trong 3 phút. Sau 3 phút, loại bỏ NaClO và ngâm tiếp với 200 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Cuối cùng loại bỏ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và rửa hạt 3 lần với nước khử khoáng đã tiệt trùng. Tiếp theo ngâm riêng các mẫu hạt ngũ cốc với nước khử khoáng tiệt trùng theo tỉ lệ 1:3 (100 g hạt ngũ cốc với 300 mL nước) trong bình tam giác 500 mL, đậy kín bằng nút gòn và để ở điều kiện tĩnh và trong tối trong 4 ngày. Tiến hành thu phần nước chứa vi khuẩn từ hạt ngũ cốc cho vào bình tam giác 500 mL. Sau đó pha dịch chiết vi khuẩn với sữa tươi theo tỉ lệ 1:10 (1 mL vi khuẩn với 10 mL sữa tươi) đậy kín lại bằng nút gòn và để ở điều kiện tĩnh, trong 4 ngày. Khi môi trường nuôi

đã tách lớp, tiến hành thu cộng đồng vi khuẩn acid lactic (phần dung dịch nằm phía dưới lớp màng sữa). Các cộng đồng vi khuẩn sau khi phân lập được nhân nuôi liên tục qua 5 thế hệ nhằm gia tăng mật số vi khuẩn có khả năng giảm màu MRSLM. Quy trình nhân nuôi được thực hiện bằng cách hút 1 mL dịch cộng đồng vi khuẩn cho vào bình tam giác 100 mL có chứa sẵn 49 mL môi trường MSM lỏng bổ sung 30% MRSLM (v/v) đã được tiệt trùng. Các bình chứa mẫu được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày. Sau đó, chuyển 1 mL dung dịch nuôi sang bình tam giác chứa môi trường MSM lỏng chứa 30% MRSLM mới. Lặp lại quy trình nuôi cấy thêm bốn lần nữa (tổng cộng 5 lần). Đây là nguồn vi khuẩn dùng để phân lập.

#### *b. Phân lập và tách riêng các dòng vi khuẩn có khả năng giảm màu MRSLM*

Bốn cộng đồng vi khuẩn phân lập từ 4 loại hạt ngũ cốc sau khi gia tăng mật số ở mục a được kiểm tra về khả năng giảm màu MRSLM trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng MSM bổ sung 30% MRSLM. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện phòng thí nghiệm theo thể thức ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức và được kéo dài trong 5 ngày. Cách thực hiện như sau: hút 1 mL dịch vi khuẩn của từng cộng đồng sau khi nuôi tăng sinh cho vào bình tam giác 100 mL chứa 49 mL môi trường MSM với 30% MRSLM. Các bình chứa mẫu được đặt trên máy lắc tròn với tốc độ 100 vòng/phút ở nhiệt độ  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  và trong tối. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn. Xác định lượng màu MRSLM còn lại trong môi trường nuôi cấy vào các thời điểm 1, 3 và 5 ngày bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 650 nm. Cách xác định lượng màu MRSLM còn lại trong môi trường nuôi cấy được thực hiện như sau: Hút 2 mL dịch mẫu môi trường nuôi cấy vi khuẩn tại thời điểm thu mẫu cho vào Eppendorf 2 mL, ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút. Dung dịch mẫu nằm bên trên sau khi ly tâm được tiến hành đo trên máy so màu ở bước sóng 650 nm để xác định lượng màu MRSLM còn lại trong môi trường nuôi cấy. Cộng đồng vi khuẩn có khả năng giảm màu tốt được tuyển chọn để bố trí thí nghiệm chọn nồng độ MRSLM thích hợp nhất dùng trong thí nghiệm đánh giá khả năng giảm màu MRSLM. Cách bố trí thí nghiệm tương tự như trên nhưng bổ sung lần lượt các mức nồng độ MRSLM khác nhau tương ứng cho 5 nghiệm thức gồm: 10, 20, 30, 40 và 50% (v/v). Vào thời điểm kết thúc thí nghiệm tiến hành phân lập vi khuẩn bằng cách hút 1 mL mẫu dịch vi khuẩn pha loãng thành các dãy nồng độ  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  và  $10^{-7}$  (hệ số pha loãng 10), sau đó hút 50  $\mu\text{L}$  dung dịch huyền phù vi khuẩn ở các nồng độ pha

loãng và trải trên đĩa môi trường nuôi cấy TSA. Các đĩa môi trường TSA chứa vi khuẩn được ủ trong tủ ở nhiệt độ  $35^\circ\text{C}$  trong 3 ngày. Tiến hành chọn các khuẩn lạc có hình thái khác nhau trên đĩa môi trường và cấy chuyển liên tục 4 lần trong cùng một môi trường để thu được các dòng vi khuẩn ròng. Khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn sau khi đã phân lập và làm thuần được mô tả hình thái khuẩn lạc và tế bào cũng như nhuộm Gram vi khuẩn.

#### *2.3.2 Đánh giá và so sánh khả năng giảm màu MRSLM của các dòng vi khuẩn phân lập*

##### *a. Nguồn vi khuẩn*

Các dòng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi trong bình tam giác 100 mL chứa 30 mL dung dịch TSB đã tiệt trùng. Các bình chứa vi khuẩn được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 100 vòng/phút trong 3 ngày và trong tối. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được thu hoạch riêng biệt từng dòng bằng cách chuyển toàn bộ dung dịch nuôi cấy vào ống Falcon 50 mL tiệt trùng, ly tâm trong 3 phút với tốc độ 6.000 vòng/phút trên máy ly tâm (Mikro 220R, Hettich, Tuttlingen, Germany). Sau khi ly tâm, loại bỏ nhanh phần nước ở trên, giữ lại phần sinh khối vi khuẩn bên dưới. Tiếp tục cho 20 mL nước khử khoáng tiệt trùng vào ống Falcon chứa sinh khối vi khuẩn, vortex 2 phút nhằm hòa tan sinh khối vi khuẩn vào nước và tiếp tục ly tâm. Thao tác được lặp lại liên tục 4 lần nhằm loại bỏ hoàn toàn nguồn carbon còn sót lại từ môi trường giàu dinh dưỡng TSB. Tiếp theo, hiệu chỉnh độ đục của dung dịch chứa vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng bằng máy đo quang phổ về độ đục (optical density)  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,7$  (Nguyễn Khởi Nghĩa và *ctv.*, 2015).

##### *b. Bố trí thí nghiệm*

Thí nghiệm được bố trí như sau: Hút 1 mL dịch vi khuẩn đã được chuẩn bị cho vào các bình tam giác 100 mL chứa 49 mL môi trường MSM lỏng có bổ sung 30% MRSLM (chọn 30% MRSLM từ kết quả thí nghiệm khảo sát chọn nồng độ MRSLM phù hợp). Môi trường nuôi cấy được tiệt trùng trước ở  $121^\circ\text{C}$  trong 20 phút, sau đó bổ sung dung dịch vi lượng vào môi trường vừa tiệt trùng. Thành phần vi lượng trong 1 L dung dịch như sau: 10 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 25 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 15 mg  $\text{ZnCl}_2$ ; 5 mg  $\text{CuCl}_2$  và 10 mg  $\text{FeCl}_3$ . Dung dịch vi lượng được lọc với màng lọc tiệt trùng (Minisart NY 25, Sartorius Stedim Biotech, GmHbH, Germany, đường kính 0,20  $\mu\text{m}$ ). Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn vào. Các bình chứa mẫu được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ 100 vòng/phút ở điều kiện phòng thí nghiệm, trong tối và kéo dài trong 3 ngày vì dựa vào kết quả nghiên cứu của Sanroman *et al.* (2010)

vi khuẩn có khả năng khử màu mật ri đường trong thời gian nuôi cấy rất ngắn từ 48 – 72 giờ.

*c. Chỉ tiêu theo dõi*

Ghi nhận hàm lượng MRSLM còn lại trong môi trường nuôi cấy tại các thời điểm 1 và 3 ngày sau khi nuôi cấy bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 650 nm được mô tả trong mục 2.3.1.2.

**2.3.3 Xử lý giảm màu MRSLM bằng chế phẩm vi sinh từ các dòng vi khuẩn và cộng đồng vi khuẩn được tuyển chọn**

*a. Tạo chế phẩm vi sinh xử lý màu MRSLM từ các dòng và cộng đồng vi khuẩn*

Dòng vi khuẩn có khả năng giảm màu MRSLM cao nhất chọn từ kết quả khảo sát ở mục 2.3.2 (ít nhất 2 dòng) và cộng đồng vi khuẩn chứa các dòng vi khuẩn này được nhân nuôi để tạo ra các chế phẩm vi sinh lỏng. Việc lựa chọn các dòng vi khuẩn và cộng đồng vi khuẩn tạo chế phẩm vi sinh nhằm giúp tăng hiệu quả giảm màu MRSLM so với biện pháp xử lý bằng vi khuẩn nhưng không tạo chế phẩm vi sinh.

*b. Bố trí thí nghiệm*

Thí nghiệm được thực hiện dưới điều kiện phòng thí nghiệm với 3 lặp lại cho mỗi nghiệm thức với 1 nhân tố. Tổng cộng có 3 nghiệm thức trong thí nghiệm và được liệt kê như sau:

1/ Đối chứng: Xử lý với nước cất

2/ Xử lý bằng chế phẩm vi sinh chứa cộng đồng vi khuẩn

3/ Xử lý bằng chế phẩm vi sinh chứa từng dòng vi khuẩn riêng lẻ

Cho 100 mL môi trường khoáng tối thiểu lỏng chứa 30% MRSLM vào trong bình tam giác 250 mL, tiếp theo cho 60 mL chế phẩm vi sinh vào (tỉ lệ giữa dung dịch MRSLM và chế phẩm là 1:0,6, v/v, dựa vào kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu), lắc đều trong 30 giây và để yên trong 10 phút (đây gọi là giai đoạn xử lý 1). Tiến hành hút lấy toàn bộ lớp nước nằm bên trên cho vào bình tam giác 250 mL mới và bổ sung thể tích chế phẩm theo tỉ lệ quy định (1:0,6, v/v) vào, lắc đều trong 30 giây và để yên trong 10 phút (đây gọi là giai đoạn xử lý 2). Tiếp tục lặp lại quy trình xử lý đến hết giai đoạn 5. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự nhưng chỉ xử lý với nước cất. Sau mỗi giai đoạn xử lý tiến hành xác định lượng màu MRSLM còn lại theo phương pháp mô tả trong mục 2.3.1.2.

**2.3.4 Định danh các dòng vi khuẩn tuyển chọn bằng sinh học phân tử**

Các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở mục 2.3.2 được nuôi riêng trong ống nghiệm chứa môi trường LB và lắc trên máy lắc trong 16 giờ. Hút 4 mL dịch vi

khẩn cho vào Eppendorf 2 mL, sau đó đem ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ phần nước phía trên, giữ lại phần sinh khối vi khuẩn bên dưới Eppendorf. Hòa tan sinh khối vi khuẩn với 250 µL dung dịch TE (pH= 8,0). Sau đó, ly trích DNA của vi khuẩn bằng CTAB 3% theo quy trình của Ihrmark *et al.* (2012). DNA của hai dòng vi khuẩn được khuếch đại gen 16S-rRNA với cặp môi được sử dụng là (Weisburg *et al.*, 1991): 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTC-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTGTTACGACT-3') và giải trình tự. Trình tự ADN của gen 16S-rRNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI) bằng BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) để so sánh mức độ tương đồng của gen 16S-rRNA của vi khuẩn phân lập với gen tương ứng của các vi khuẩn hiện có trong cơ sở dữ liệu.

**2.4 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm được tổng hợp, tính toán bằng phần mềm Excel và kiểm định thống kê ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.2.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

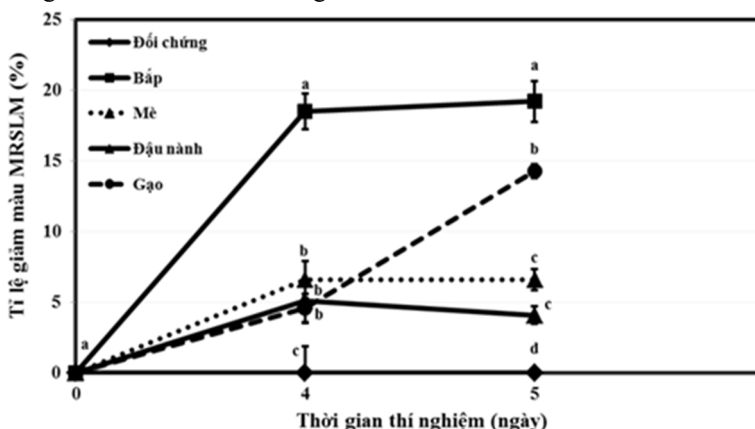
**3.1 Phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn trong hạt ngũ cốc có khả năng loại màu MRSLM**

Sau khi đạt được 4 cộng đồng vi khuẩn nội sinh từ 4 loại hạt ngũ cốc gạo, bắp, đậu nành và mè, tiến hành khảo sát khả năng giảm màu của 4 cộng đồng và chọn cộng đồng vi khuẩn thể hiện khả năng giảm màu tốt để phân lập các dòng vi khuẩn giảm màu MRSLM. Kết quả khảo sát khả năng giảm màu MRSLM của 4 cộng đồng vi khuẩn nội sinh từ 4 loại hạt ngũ cốc trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng bổ sung 30% MRSLM được trình bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy giai đoạn 0 - 4 ngày sau khi nuôi cấy, màu của MRSLM giảm rất nhanh ở tất cả 4 cộng đồng vi khuẩn. Tuy nhiên, trong giai đoạn 4 – 5 ngày khả năng giảm màu MRSLM của 3 cộng đồng vi khuẩn từ hạt bắp, đậu nành và mè có xu hướng bình ổn, ngoại trừ cộng đồng vi khuẩn gạo. Khả năng giảm màu MRSLM của cộng đồng vi khuẩn gạo tăng lên đến 14,3% sau 5 ngày nuôi cấy. Khả năng giảm màu của 4 cộng đồng vi khuẩn khác biệt nhau ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) sau 5 ngày nuôi cấy. Cộng đồng vi khuẩn bắp có khả năng giảm màu đạt 19,2%, kế đến là cộng đồng vi khuẩn mè và đậu nành lần lượt đạt 6,6% và 4,1%. Nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn không thể hiện khả năng giảm màu MRSLM (0%) ở các thời điểm thu mẫu. Do đó, hai cộng đồng vi khuẩn phân lập từ hạt bắp và gạo được chọn để phân lập các dòng vi khuẩn có tiềm năng giảm màu MRSLM. Theo nghiên cứu của



Tondee và Sirianuntapiboon (2011), vi khuẩn có khả năng hấp phụ các hợp chất tạo màu trong MRSLM lên trên màng tế bào vi khuẩn và thời gian

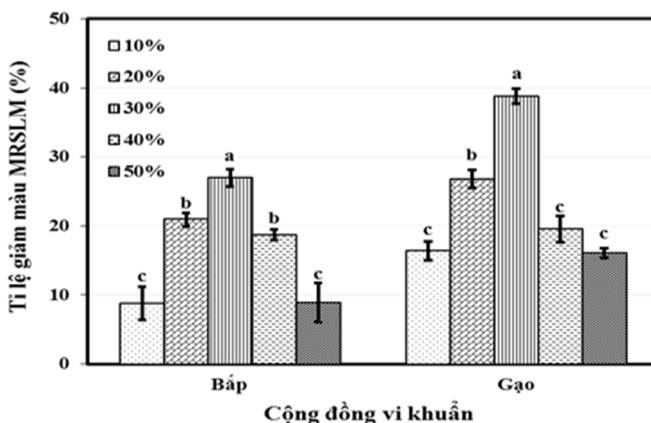
hấp phụ mạnh trong những ngày đầu của thí nghiệm, khả năng giảm màu tăng khi mật số vi khuẩn tăng lên.



**Hình 1:** Khả năng giảm màu MRSLM của 4 cộng đồng vi khuẩn nội sinh từ 4 loại hạt ngũ cốc trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng MSM bổ sung 30% MRSLM sau 5 ngày nuôi cấy

Trước khi phân lập các dòng vi khuẩn giảm màu MRSLM tốt từ hai cộng đồng vi khuẩn gạo và bắp, tiến hành thí nghiệm khảo sát để chọn nồng độ MRSLM thích hợp dùng bố trí thí nghiệm giảm màu MRSLM của các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả đánh giá và chọn nồng độ MRSLM phù hợp từ các mức nồng độ khác nhau của MRSLM gồm: 10%, 20%, 30%, 40% và 50% khi thử nghiệm với hai cộng đồng vi khuẩn từ gạo và bắp trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng được trình bày trong Hình 2. Diễn biến về khả năng giảm màu MRSLM ở các nồng độ khác nhau trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng có xu hướng giống nhau ở hai cộng đồng vi khuẩn thử nghiệm. Tỉ lệ giảm màu MRSLM của hai cộng đồng vi khuẩn tăng lên và khác biệt ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) khi nồng độ MRSLM tăng lên trong khoảng từ 10 - 30%, khi đó tỉ lệ giảm màu MRSLM tăng lên từ 8,8% đến 26,9% và từ 16,4% đến 38,7% lần lượt ở cộng đồng vi khuẩn bắp và cộng đồng vi khuẩn gạo. Tuy nhiên, tỉ lệ giảm màu MRSLM đạt

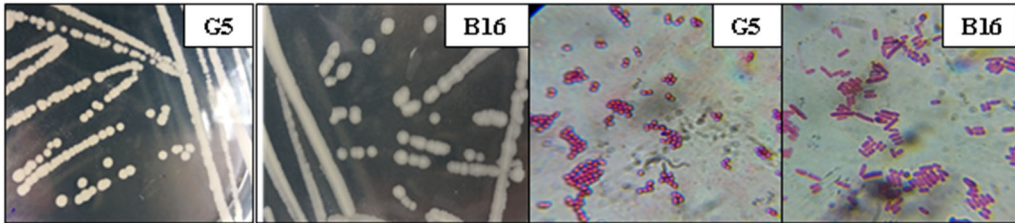
cao nhất ở nồng độ 30% và sau đó khi tăng nồng độ MRSLM từ 40 - 50%, tỉ lệ giảm màu MRSLM của hai cộng đồng vi khuẩn lại giảm xuống rất đáng kể (từ 26,9% xuống còn 8,7% và từ 38,7% xuống còn 16% cho lần lượt hai cộng đồng vi khuẩn bắp và gạo) và khác biệt thống kê khi so sánh các nồng độ MRSLM với nhau trong cùng 1 cộng đồng vi khuẩn ( $p < 0,05$ ). Việc tăng nồng độ MRSLM làm giảm tỉ lệ giảm màu bởi hai cộng đồng vi khuẩn có thể là do tác động ức chế vi sinh vật của MRSLM khi ở nồng độ cao vì theo Wedzicha và Kaputo (1992) trong MRSLM có chứa một lượng lớn các hợp chất màu nâu đậm được hình thành từ phản ứng Maillard giữa nhóm amino và carbonyl. Các hợp chất này có tính chất chống oxy hoá và gây độc đối với nhiều vi sinh vật tham gia vào quá trình xử lý nước thải, nồng độ cao làm ức chế sự phát triển của vi sinh vật (Kitts *et al.*, 1993). Do đó, kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ MRSLM 30% là thích hợp nhất dùng cho các nghiên cứu về xử lý màu MRSLM.



**Hình 2:** Khả năng giảm màu MRSLM của 2 cộng đồng vi khuẩn bắp và gạo trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng MSM bổ sung các mức nồng độ MRSLM khác nhau sau 5 ngày nuôi cấy

Kết quả phân lập và tách ròng vi khuẩn từ 2 cộng đồng vi khuẩn bắp và gạo cho thấy đã phân lập được tổng cộng 39 dòng vi khuẩn trong đó 19 dòng từ cộng đồng vi khuẩn gạo có ký hiệu từ G1 – G19 và 20 dòng vi khuẩn được phân lập từ cộng đồng vi khuẩn bắp có ký hiệu từ B1 – B20. Kết quả về hình thái khuẩn lạc cho thấy như sau: Hình dạng tròn

chiếm tỷ lệ cao nhất 64,1% (25 dòng), còn lại 35,9% thuộc dạng hình không đều (14 dòng). Hình thái tế bào vi khuẩn dạng hình cầu chiếm tỷ lệ cao nhất 58,9% (23 dòng) trong khi dạng hình que và hình liên cầu lần lượt có tỷ lệ 30,7% (12 dòng) và 10,4% (4 dòng). Đồng thời, vi khuẩn Gram dương cao hơn vi khuẩn Gram âm và lần lượt đạt 71,7% (28 dòng) và 28,3% (11 dòng) (Hình 3).

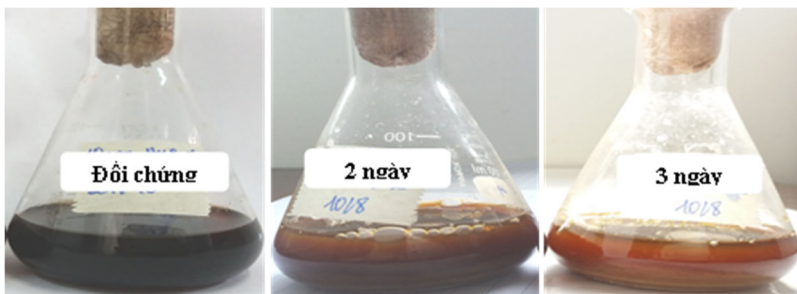


**Hình 3: Hình thái khuẩn lạc và tế bào của hai dòng vi khuẩn đại diện G5 và B16 được phân lập từ hạt gạo và hạt bắp**

**3.2 Đánh giá khả năng giảm màu MRSLM trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng MSM của 39 dòng vi khuẩn phân lập**

Kết quả đánh giá về khả năng giảm màu MRSLM của 39 dòng vi khuẩn trong môi trường MSM bổ sung 30% MRSLM cho thấy, ở thời điểm 3 ngày nuôi cấy thì tỉ lệ giảm màu của các dòng vi khuẩn phân lập từ cộng đồng vi khuẩn bắp và các dòng vi khuẩn phân lập từ cộng đồng vi khuẩn gạo dao động từ 7,5% đến 20% và từ 8% đến 30%. Từ kết quả của 39 dòng vi khuẩn trên tuyển chọn được 10 dòng đại diện cho khả năng giảm màu cao nhất sau 3 ngày nuôi cấy và kết quả được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy khả năng giảm màu của 10 dòng vi khuẩn dao động từ 15% đến 30% sau 3 ngày nuôi cấy và đều khác biệt ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng (không chủng vi khuẩn). Trong đó, dòng vi khuẩn ký hiệu G4 có tỉ lệ giảm màu cao nhất ở thời điểm 2 và 3 ngày thu mẫu, đạt 30% sau 3 ngày nuôi cấy (Hình 4). Dòng vi khuẩn G5 cũng cho tỉ lệ giảm màu cao và giảm 25,3% màu MRSLM sau 3 ngày nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn có khả năng làm giảm màu MRSLM trong thời gian ngắn sau 0 - 3 ngày nuôi cấy và kết quả nghiên cứu này tương tự

với nghiên cứu của Sanroman *et al.* (2010) cho thấy vi khuẩn có khả năng khử màu mật rỉ đường trong thời gian nuôi cấy rất ngắn từ 48 – 72h cùng với sự tăng trưởng tối đa của mật số vi khuẩn. Kim và Shoda (1999) cho rằng sử dụng vi khuẩn để loại màu MRSLM sẽ giảm thời gian nuôi cấy và trong môi trường lỏng vi khuẩn phát triển tốt hơn. Nghiên cứu của Tondee và Sirianlntapiboon (2008) với dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* No. PV71-1861 cho khả năng giảm màu mật mía đường cao nhất, đạt 55,3% trong thời gian 7 ngày trong môi trường lỏng bổ sung 5% mật rỉ đường. Ngoài ra, Krzywonos và Seruga (2012) cũng nghiên cứu trên dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* cho thấy khả năng giảm màu mật mía đường của dòng vi khuẩn này sau 4 ngày đạt 27%, 44%, và 35% lần lượt trong môi trường lỏng chứa 30%, 25% và 20% mật rỉ đường. Dòng vi khuẩn *Lactobacillus hilgardii* giảm 28% màu mật rỉ đường trong điều kiện kỵ khí sau 3 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, khi cố định tế bào vi khuẩn này trong gel Ca-alginate thì hiệu suất giảm màu đạt 40% trong điều kiện hiếu khí, do *Lactobacillus hilgardii* cần một lượng nhỏ oxy cho quá trình khử màu và khi cố định trong gel Ca-alginate giúp cung cấp cho vi khuẩn một lượng nhỏ khí oxy trong quá trình giảm màu (Ohmomo *et al.*, 1988).



**Hình 4: So sánh tỉ lệ làm giảm màu MRSLM của dòng vi khuẩn G4 sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường MSM chứa 30% MRSLM so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn**

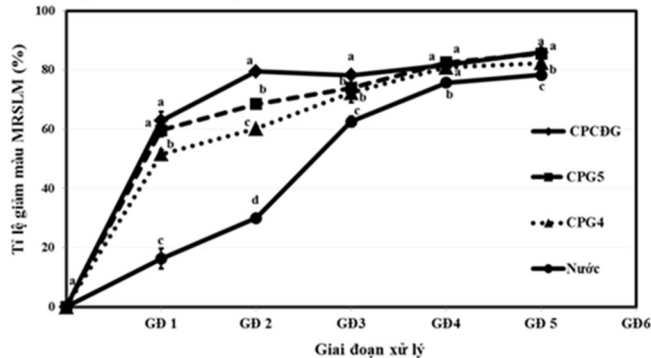
**Bảng 1: Tỷ lệ giảm màu MRSLM của 10 dòng vi khuẩn tiêu biểu nhất trong tổng số 39 dòng thử nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu lỏng MSM bổ sung 30% MRSLM sau 3 ngày nuôi cấy**

STT	Dòng vi khuẩn	Tỷ lệ giảm màu MRSLM (%)	
		2 ngày	3 ngày
1	Đối chứng	0,0 <sup>h</sup>	0,0 <sup>h</sup>
2	G4	21,3 <sup>a</sup>	30,3 <sup>a</sup>
3	G5	18,1 <sup>ab</sup>	25,3 <sup>b</sup>
4	G12	10,6 <sup>de</sup>	22,1 <sup>bcd</sup>
5	G15	6,9 <sup>fg</sup>	23,0 <sup>bc</sup>
6	G16	3,9 <sup>g</sup>	19,4 <sup>de</sup>
7	G18	10,9 <sup>de</sup>	18,7 <sup>ef</sup>
8	B10	11,1 <sup>de</sup>	14,9 <sup>g</sup>
9	B12	7,6 <sup>ef</sup>	15,0 <sup>g</sup>
10	B16	15,2 <sup>bc</sup>	16,2 <sup>fg</sup>
11	B20	13,6 <sup>cd</sup>	20,2 <sup>cde</sup>
	F	78,4 <sup>*</sup>	153,4 <sup>*</sup>
	CV (%)	55,9	40,3

\* Ghi chú: \* Khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%, trên cùng một cột các chữ số theo sau giống nhau thì không khác biệt thống kê theo phép thử Turkey

**3.3 Khả năng giảm màu MRSLM bằng chế phẩm vi sinh từ của hai dòng vi khuẩn G4, G5 và cộng đồng vi khuẩn hạt gạo**

Khả năng làm giảm màu MRSLM của 3 chế phẩm vi sinh từ 2 dòng vi khuẩn G4, G5 và cộng đồng vi khuẩn từ hạt gạo qua 5 giai đoạn xử lý được trình bày ở Hình 5. Nhìn chung, khả năng giảm màu MRSLM ở tất cả các nghiệm thức tăng dần theo giai đoạn xử lý, kể cả nghiệm thức đối chứng xử lý với nước và giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhau (p<0,05). Kết quả cho thấy khả năng giảm màu MRSLM tăng nhanh ở giai đoạn xử lý 1 và 2, sau đó có xu hướng tăng chậm lại và ổn định ở các giai đoạn xử lý sau.



**Hình 5: Phần trăm giảm màu MRSLM sau 5 giai đoạn xử lý với 3 chế phẩm vi sinh từ cộng đồng vi khuẩn hạt gạo, dòng vi khuẩn G5 và G4**

\* Lưu ý: Các chữ số hiển thị khác biệt thống kê trong hình chỉ dùng để so sánh các số liệu giữa các nghiệm thức với nhau trong cùng 1 giai đoạn xử lý, không so sánh các giai đoạn xử lý khác nhau trong cùng một nghiệm thức

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy ở giai đoạn 1 các nghiệm thức đều thể hiện tốc độ giảm màu rất nhanh, trong đó nghiệm thức xử lý bằng chế phẩm vi sinh từ cộng đồng vi khuẩn gạo và từ dòng vi khuẩn G5 thể hiện khả năng giảm màu cao, lần lượt đạt 62,8% và 59,6%, tuy nhiên không khác biệt thống kê khi so sánh với nhau, nhưng khác biệt thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức xử lý với chế phẩm vi sinh từ dòng vi khuẩn G4 (51,5%) và với nước (16,3%). Ở giai đoạn 2, tất cả các nghiệm thức đều khác biệt thống kê (p<0,05) khi so sánh với nhau, trong đó nghiệm thức xử lý với chế phẩm vi sinh từ cộng đồng vi khuẩn gạo cho hiệu quả giảm màu tốt nhất (79,5%), kể đến là nghiệm thức xử lý với chế phẩm vi sinh từ dòng vi khuẩn G5, G4 và nước lần lượt đạt 68,5%, 60,2% và 30%, từ đó cho thấy khả năng giảm màu của chế phẩm cộng đồng vi khuẩn gạo hiệu quả hơn so với chế phẩm từng dòng đơn G4 và G5. Tuy nhiên, từ giai đoạn xử lý 3 trở về sau, hiệu quả giảm màu MRSLM của 3 chế phẩm vi sinh không còn tốt khi so với nghiệm thức xử lý bằng nước. Khi xử lý màu MRSLM bằng nước vôi cũng cho hiệu quả giảm màu MRSLM do nước đã hòa loãng màu của MRSLM, tuy nhiên, tỉ lệ giảm màu khi xử lý với nước thấp hơn và phải xử lý qua nhiều giai đoạn hơn. Do đó, để đạt hiệu quả giảm màu cao nhất, rút ngắn thời gian xử lý và tiết kiệm chi phí thì nên xử lý màu MRSLM bằng các chế phẩm vi sinh chứa các dòng vi khuẩn loại màu tốt qua hai hoặc ba giai đoạn xử lý. Theo Alkane *et al.* (2006), sự khử màu mật rỉ mía đường của vi khuẩn thường nhanh hơn nấm, nhưng để giảm màu tốt nên sử dụng nhóm vi khuẩn hoặc cộng đồng vi khuẩn giúp quá trình trao đổi chất diễn ra nhanh hơn và việc giảm màu hiệu quả hơn. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Kumar và Chandra (2006), khi sử dụng nhóm vi khuẩn *Bacillus* spp. giúp làm giảm màu mật rỉ mía đường cao gấp 2 đến 4 lần so với từng dòng vi khuẩn đơn trong nhóm vi khuẩn này.

**3.4 Kết quả giải mã trình tự một đoạn gen 16S rRNA và định danh tên khoa học của hai dòng vi khuẩn G4 và G5 bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Hai dòng vi khuẩn được tuyển chọn cho hiệu quả giảm màu MRSLM tốt nhất ký hiệu là G4 và G5 được phân lập từ hạt gạo và đều thuộc vi khuẩn Gram dương, tế bào dạng hình liên cầu. Hình thái khuẩn lạc của dòng G4 có dạng tròn, màu vàng đục, bề mặt trơn còn dòng G5 có dạng không tròn, màu trắng đục và bề mặt gồ ghề. Khi so sánh trình tự đoạn gen 16S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen thế giới bằng chương trình BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của cả hai dòng vi khuẩn G4 và G5 tương đồng với đoạn gen 16S rRNA của loài vi khuẩn *Enterococcus italicus* với tính đồng hình lần lượt là 99% và 100%. Như vậy, hai dòng vi khuẩn có chức năng giảm màu MRSLM này đều thuộc chi *Enterococcus* và có quan hệ gần gũi nhất với loài *Enterococcus italicus* G4 và *Enterococcus italicus* G5, xếp theo bậc phân loại sinh vật từ liên

giới Eukaryota; giới Bacteria; ngành Firmicutes; lớp Bacilli; bộ Lactobacillales; họ Enterococcaceae và chi *Enterococcus* (Bảng 2). Theo nghiên cứu của Charles *et al.* (2011), chi *Enterococcus* có vai trò quan trọng trong quá trình lên men thực phẩm, sản xuất các chế phẩm vi sinh, dược phẩm dùng cho người và động vật, một số loài thuộc chi này được biết đến với vai trò tham gia vào quá trình phân hủy sinh học các chất ô nhiễm. Tuy nhiên, dựa vào thông tin tài liệu tham khảo của các nghiên cứu trước đây cho thấy chưa có nghiên cứu nào công bố loài vi khuẩn *Enterococcus italicus* có khả năng giảm màu MRSLM, chỉ có nghiên cứu của Sahasrabudhe *et al.* (2014) cho thấy loài vi khuẩn *Enterococcus faecalis* YZ 66 chứa hệ enzyme ngoại bào chuyên biệt có khả năng phân hủy hoặc hấp thụ màu nhuộm trong nước thải công nghiệp vào sinh khối vi khuẩn (50 mg/L thuốc nhuộm Diazo Direct Red 81) nhờ một chuỗi các tiến trình chuyển hóa sinh học. Do đó, nghiên cứu này bổ sung vào kiến thức về hai dòng vi khuẩn thuộc chi *Enterococcus* trong tự nhiên có khả năng giảm màu của MRSLM với hiệu quả cao.

**Bảng 2. Tóm tắt kết quả định danh hai dòng vi khuẩn giảm màu MRSLM G4 và G5**

TT	Dòng	Độ đồng hình (100%)	Các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu		Định danh
			Vi khuẩn	Số đăng kí	
1	G4	99	<i>Enterococcus italicus</i>	NR_025625.1	<i>Enterococcus italicus</i> G4
2	G5	100	<i>Enterococcus italicus</i>	NR_025625.1	<i>Enterococcus italicus</i> G5

**4 KẾT LUẬN**

Vi khuẩn nội sinh từ hạt ngũ cốc đặc biệt từ gạo và bắp chứa các dòng vi khuẩn có chức năng làm giảm màu MRSLM. Từ bốn mẫu hạt ngũ cốc gồm hạt gạo, bắp, mè và đậu nành đã phân lập được 39 dòng vi khuẩn. Trong đó, có 6 trong tổng số 19 dòng vi khuẩn phân lập từ gạo và 4 trong tổng số 20 dòng vi khuẩn phân lập từ bắp thể hiện chức năng giảm màu MRSLM cao sau 3 ngày nuôi cấy. Hai dòng vi khuẩn G4 và G5 được phân lập từ gạo là hai dòng có khả năng giảm màu MRSLM tốt nhất. Cả ba chế phẩm vi sinh được tạo ra từ hai dòng vi khuẩn G4, G5 và cộng đồng vi khuẩn gạo cho hiệu quả cao trong xử lý làm giảm màu MRSLM ở 2 giai đoạn xử lý đầu tiên so với biện pháp xử lý bằng nước. Cả 2 dòng vi khuẩn G4 và G5 thuộc chi *Enterococcus* và có quan hệ gần gũi nhất với loài *Enterococcus italicus* G4 và *Enterococcus italicus* G5, cả hai dòng vi khuẩn này có tiềm năng ứng dụng cao và được đánh giá an toàn trong xử lý làm giảm màu MRSLM của các nhà máy sản xuất cồn sinh học.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Alkane, H.V., Dange, M.N. and Selvakumari, K., 2006. Optimization of anaerobically digested distillery molasses spent wash decolorization

using soil as inoculum in the absence of additional carbon and nitrogen source. *Bioresource Technology*, 97(16): 2131–2135.

Charles, M. A.P., Huch, M., Abriouel, H. and Holzapfel, W., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2): 125–140.

Chen, J., Xu L., Giesy, J.P. and Jin, H.J., 2010. Biodegradation of Paclotrazol by a microbial consortium isolated from industrially contaminated sediment. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(8): 1487-1494.

Ikedo, D.M., Weinert, E., Chang, K.C.S., McGinn, J.M., Miller, S.A., Keliihoomalu, C. and Duponte, M.W., 2013. *Natural Farming: Lactic Acid Bacteria*. College of Tropical Agriculture and Human Resources, SA-8 (2013).

Ihrmark, K., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J. and Clemmensen, K.E., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3): 666–677.

Krzywonos, M. and Seruga P., 2012. Decolorization of sugar beet molasses vinasse, a high-strength distillery wastewater, by lactic acid bacteria.



- Department of Bioprocess Engineering, Wroclaw University of Economics, 21(4): 943–948.
- Kim, S.J. and Shoda M., 1999. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1): 114-119.
- Kumar, P. and Chandra R., 2006. Decolorisation and detoxification of synthetic molasses melanoidins by individual and mixed cultures of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology*, 97(16): 2096–2102.
- Kitts, D.D., Wu, C.H., Stich, H.F. and Powrie W.D., 1993. Effect of glucose–glycine Maillard reaction products on bacterial and mammalian cells *muta-gensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(12): 2353–2358.
- Licht F.O., 2013. F.O Lich’s world ethanol and biofuels report, 12(2).
- Lin, Y. and Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Application of Microbiology and Biotechnology*, 69(6): 627-642.
- Lê Đức Trung, 2010. Xử lý màu và COD của nước thải sản xuất cồn từ mật ri đường bằng hệ keo tụ vô cơ. *Viện Môi trường và Tài Nguyên, ĐH QG TP HCM*, 13 (M2-2010).
- Mohana, S., Desai, C. and Madamwar, D., 2007. Biodegradation and decolourization of anaerobically treated distillery spent wash by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 98(2): 333–339.
- Nguyễn Khởi Nghĩa, Nguyễn Thị Kiều Oanh, Đỗ Hoàng Sang, Lâm Từ Lăng và Dương Minh Viễn, 2015. Gia tăng tốc độ phân hủy sinh học hoạt chất propoxur trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong biochar. *Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 39(A): 44-51.
- Ohmomo, S., Daengsubha, W., Yoshikawa, H., Yui, M., Nozaki, K., Nakajima, T. and Nakamura, I., 1988. Screening of anaerobic bacteria with the ability to decolorize molasses melanoidin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(12): 3339–3346.
- Pandey, R.A., Malhotra, S., Tankhiwale, A., Pande, S., Pathe, P.P. and Kaul, S.N., 2003. Treatment of biologically treated distillery effluent- A case study. *International Journal of Environmental Studies*, 60(3): 263-275.
- Pathak, M. and Martirosyan, D., 2012. Optimization of an effective growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in strict vegetarian food products. *Functional Foods in Health and Disease*, 2(10): 369–378.
- Sanroman, M.A., Deive, F.J., Dominguez, A., Barrio, T. and Longo, M.A., 2010. Dye decolorization by newly isolated thermophilic microorganisms. *Chemical Engineering Transactions*, 20: 151-156.
- Sahasrabudhe, M.M., Saratale, R.G., Saratale, G.D. and Pathade G.R., 2014. Decolorization and detoxification of sulfonated toxic diazo dye C.I. Direct Red 81 by *Enterococcus faecalis* YZ 66. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1): 1–13.
- Schmidt, K.L., Peterson, N.D., Kustusch, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J. and Weiss, D.S., 2004. A Predicted ABC Transporter, FtsEX, Is Needed for Cell Division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(3): 785–793.
- Tondee, T. and Siriantapiboon, S., 2008. Decolorization of molasses wastewater by *Lactobacillus plantarium* No. PVT1-1861. *Bioresource Technology*, 99(14): 6258–6261.
- Tondee, T. and Siriantapiboon, S., 2011. Melanoidin decolorization mechanism and some properties of *Issatchenkia orientalis* No.SF9-246. *African Journal of Biotechnology*, 10(47): 9683–9693.
- Wedzicha, B.L. and Kaputo, M.T., 1992. Melanoidins from glucose and glycine: Composition, characteristics and reactivity towards sulphiteion. *Food Chemistry, Melanoidins from glucose and glycine: Composition, characteristics and reactivity towards sulphiteion. Food Chemistry*, 43(5): 359–367.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.