



TỐI ƯU HÓA KHẢ NĂNG TỔNG HỢP CHẤT KẾT TỤ SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus aryabhatai* KG12S VÀ THỬ NGHIỆM XỬ LÝ NƯỚC THẢI SAU BIOGAS TỪ TRẠI CHĂN NUÔI HEO

Huỳnh Văn Tiền¹, Cao Ngọc Diệp² và Trương Trọng Ngôn²

¹ Nghiên cứu sinh chuyên ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 08/10/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

Title:

Optimization of bioflocculant produced by *Bacillus aryabhatai* KG12S and its application in piggery wastewater treatment after biogas system

Từ khóa:

Bacillus aryabhatai KG12S, kết tụ sinh học, nguồn carbon, nguồn nitrogen, nước thải sau biogas chuồng trại chăn nuôi heo

Keywords:

Bacillus aryabhatai KG12S, bioflocculant, carbon sources, nitrogen sources, piggery wastewater treatment after biogas system

ABSTRACT

Piggery wastewater after biogas still contains high organic and inorganic pollutants and it must be treated before discharging into environment. Bioflocculation is extracellular polymer, which is produced by microorganisms. It is safety, strong effect, biodegradable and harmless to human and environment in comparison to conventional synthesis flocculant. Therefore they were applied for treating piggery wastewater after biogas system. *Bacillus aryabhatai* strain KG12S was isolated from piggery wastewater in Kien Giang province, Vietnam. The optimal medium for *Bacillus aryabhatai* strain KG12S consisted of glucose (1,12%), glutamate (5,7%), and K_2HPO_4 (0,4%) + KH_2PO_4 (0,8%) at pH 6 with kaolin solution after 5 minutes together with $CaCl_2$ solution and 0.2% inoculant (bacterial liquid) increased the flocculating activity up to 96.87%. Results from applying this strain for treating piggery wastewater showed that Chemical Oxygen Demand (COD), total solid suspension (TSS), total nitrogen, total phosphorus and ammonium concentrations were reduced 50,85%, 67,21%, 75,00%, 85,42% and 77,78%; in comparison to initial concentrations, respectively. Especially, total phosphate parameters met the requirement of Vietnamese standard (QCVN_40/2011/BTNMT).

TÓM TẮT

Nước thải chăn nuôi heo sau khi được xử lý bằng hệ thống biogas vẫn còn chứa hàm lượng chất hữu cơ và vô cơ cao cần phải được xử lý trước khi thải ra môi trường. Chất kết tụ sinh học (bioflocculants) là một hợp chất cao phân tử được tổng hợp trong quá trình phát triển của các vi sinh vật. Chúng có tác dụng lắng tụ nhanh chóng, có khả năng tự phân hủy, an toàn cho con người và môi trường nên được nghiên cứu và ứng dụng để xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas. Chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S được phân lập từ mẫu nước thải sau hệ thống biogas của trại chăn nuôi heo ở tỉnh Kiên Giang, có khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học với thành phần môi trường tối ưu cho khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học gồm glucose (1,12%), glutamate (5,7%), K_2HPO_4 (0,4%) và KH_2PO_4 (0,8%) ở pH 6 cho tỷ lệ kết tụ 96,87% với dung dịch kaolin sau 5 phút để lắng, bổ sung dung dịch $CaCl_2$ và 0,2% dịch nuôi sinh khối vi khuẩn. Kết quả ứng dụng chủng vi khuẩn này trong xử lý nước thải sau hệ thống biogas của trại chăn nuôi heo đã làm giảm COD, TSS, Nitơ tổng, photpho tổng và hàm lượng Amonium lần lượt là 50,85%, 67,21%, 75,00%, 85,42% và 77,78% so với chỉ số ban đầu. Chỉ tiêu Photpho tổng đạt cột A của quy chuẩn QCVN_40/2011/BTNMT.

1 GIỚI THIỆU

Sự kết tụ trong nước được chia làm 3 nhóm chính gồm: Kết tụ vô cơ như phèn chua (aluminium sulphate và chloride aluminium), kết tụ hữu cơ tổng hợp (các dẫn xuất từ polyacrylamide với polyethylene imine và các chất kết tụ tự nhiên như chitosan, sodium alginate) và kết tụ bởi vi sinh vật (microbial flocculants). Các chất kết tụ hóa học tuy có giá thành thấp nhưng lại ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường, chẳng hạn như các hợp chất kết tụ của nhôm là nguyên nhân gây ra bệnh Alzheimer (Kurane *et al.*, 1994), còn các dẫn xuất từ polyacrylamide là độc tố cho hệ thần kinh và là chất gây ung thư, khó phân hủy trong tự nhiên (Yokoi *et al.*, 1996). Trái lại, chất kết tụ sinh học (biofloculants) là chất được tổng hợp từ vi sinh vật, có tác dụng nhanh chóng và an toàn cho con người và môi trường (Sheng *et al.*, 2006).

Công nghệ kết tụ (Flocculation technology) đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực xử lý nước thải, đặc biệt là trong công đoạn tiền xử lý của nhiều hệ thống xử lý nhờ ưu điểm là đầu tư cơ sở hạ tầng nhỏ và thời gian xử lý ngắn. Sự kết tụ sinh học là sự kết tụ các vật chất lơ lửng trong nước giúp làm giảm các chỉ tiêu như COD, TSS và từ đó giúp làm giảm một phần độ đục của nước thải trước khi được xử lý bằng phương pháp khác (Gong *et al.*, 2008). Một số nghiên cứu cho thấy ứng dụng chất kết tụ sinh học trong xử lý nước thải như: chất kết tụ sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật được sử dụng để xử lý nước thải từ xí nghiệp nhuộm (Zang *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2005), các chất lơ lửng vô cơ (bentonite, đất sét, Ca(OH)₂, aluminum oxide), (Shih *et al.*, 2001; Yim *et al.*, 2007), acid humic (Zouboulis *et al.*, 2004) và các chất lơ lửng khác (Salehizadeh *et al.*, 2000).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định các yếu tố cho sự tổng hợp chất kết tụ sinh học cao nhất cũng như tỷ lệ kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S được phân lập từ nước thải sau biogas của chuồng trại chăn nuôi heo ở tỉnh Kiên Giang (Huỳnh Văn Tiền và Cao Ngọc Điệp, 2013) và thử nghiệm hiệu suất xử lý nước thải chăn nuôi heo sau hệ thống biogas thông qua xác định các chỉ tiêu COD và TSS, hàm lượng Nitơ tổng, hàm lượng Photpho tổng (P) và hàm lượng Amonium trong thành phần nước thải.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Sử dụng chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S phân lập từ nước thải sau biogas trại chăn

nuôi heo ở tỉnh Kiên Giang (Huỳnh Văn Tiền và Cao Ngọc Điệp (2013)), thời gian nuôi sinh khối vi khuẩn sau 96 giờ cho tỷ lệ kết tụ cao nhất ở có mật số vi khuẩn trên 5×10^9 tương ứng OD₆₆₀ = 1,24 ± 0,02.

Nước thải chăn nuôi heo sau biogas thu tại trại heo hộ Lê Hoàng Minh, ấp Đông Hưng 2, xã Đông Thành, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Kết quả hàm lượng các chỉ tiêu ban đầu của nguồn nước thải (sau biogas) được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Hàm lượng các chỉ tiêu ban đầu của nước thải chăn nuôi heo (sau biogas) ở trại heo hộ Lê Hoàng Minh

Chỉ tiêu	Đơn vị	Hàm lượng
pH		5,67 ¹
Amonium (N_NH ₄ ⁺)	mg/l	311,02 ²
Phosphate (P_PO ₄ ³⁻)	mg/l	-
Đạm tổng (TKN)	mg/l	369,86 ²
Phospho tổng (TP)	mg/l	4,54 ²
Nhu cầu oxi hóa học (COD)	mg/l	1.104 ²
Tổng chất rắn lơ lửng (TSS)	mg/l	153,5 ²

Nguồn: ¹ Phân tích tại PTN Vi sinh vật môi trường-Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Phân tích tại Trung tâm Kỹ thuật và Ứng dụng Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ Tp. Cần Thơ

2.2 Xác định tỷ lệ kết tụ sinh học

Chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S được nuôi cấy trong 50 ml môi trường tổng hợp chất kết tụ sinh học polysaccharide (Deng *et al.*, 2003) với thành phần các chất gồm 10 g Glucose, 5 g KH₂PO₄, 2 g K₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄.7H₂O, 0,1 g NaCl, 0,5 g Carbamide, 0,5 g yeast extract, 20 g agar (bổ sung khi đổ môi trường thạch), nước cất bổ sung đủ 1 lít và điều chỉnh giá trị pH=7 trong bình tam giác 100 ml. Lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 160 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C.

Dung dịch vi khuẩn sau thời gian 4 ngày nuôi ở được sử dụng để kiểm tra khả năng kết tụ bằng hỗn hợp gồm 90 ml dung dịch kaolin (5 g/l), 10 ml dung dịch CaCl₂ 1% và bổ sung 100 µl dung dịch vi khuẩn với mật số >10⁹ tế bào/ml (tỉ lệ 0,1%). Hỗn hợp được khuấy đều 60 vòng/phút trong 30 giây bằng máy khuấy từ (Yellow may MS7, IKA) sau đó để yên 5 phút, phần trong ở trên cách mặt nước 2 cm được hút để xác định độ đục quang phổ (Madison WI 53711, USA) ở bước sóng 550 nm (Deng *et al.*, 2003). Mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không bổ sung dịch vi khuẩn, tỷ lệ kết tụ được tính theo công thức:

$$\frac{\text{ODđôi chứng} - \text{ODmẫu}}{\text{OD đôi chứng}} \times 100\%$$

Phương pháp này được sử dụng để xác định tỷ lệ kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S trong tất cả các thí nghiệm.

2.3 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến tổng hợp chất kết tụ sinh học và hiệu suất kết tụ của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S

Các thí nghiệm được tiến hành bố trí khối ngẫu nhiên để khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường, thành phần môi trường nuôi ủ, các muối kim loại và nồng độ dung dịch vi khuẩn bổ sung đến hiệu suất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S. Từ đó, xác định được các điều kiện thích hợp để chủng vi khuẩn cho hiệu quả kết tụ sinh học cao nhất.

2.3.1 Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường nuôi ủ

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi ủ đến tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S được khảo sát trong

khoảng pH từ 2 đến 11.

Thí nghiệm được thực hiện gồm 11 nghiệm thức tương ứng với mỗi nghiệm thức là một giá trị pH khác nhau: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp lại. Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường tổng hợp chất kết tụ sinh học polysaccharide (Deng *et al.*, 2003). Giá trị pH được điều chỉnh phù hợp ở từng nghiệm thức bằng dung dịch HCl 1M hay NaOH 3M (Merck). Lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 160 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi 4 ngày và dung dịch vi khuẩn sẽ được đánh giá khả năng kết tụ theo phương pháp đã được mô tả ở mục 2.2. Từ đó, chọn được giá trị pH môi trường nuôi sinh khối thích hợp cho sự tổng hợp chất kết tụ sinh học cao nhất.

2.3.2 Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ

Các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ khảo sát được trình bày trong Bảng 2. Các nguồn dinh dưỡng này được lựa chọn vì chúng phổ biến Yeast extract (Merck) và các hóa chất còn lại của (China).

Bảng 2: Các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ được bổ sung trong môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S

Nguồn carbon	Nguồn nitrogen	Nguồn khoáng vô cơ
Glucose (1%)	Glutamic Acid (5%)	KCl (0,5%)
Sucrose (1%)	Yeast extract (0,05%)	FeCl ₃ (0,5%)
Tinh bột (1%)	Urea (0,05%)	CaCl ₂ (0,5%)
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05%)	K ₂ HPO ₄ (0,2%) + KH ₂ PO ₄ (0,5%)

Phương pháp tiến hành bằng cách nhân sinh khối chủng vi khuẩn trong 20 ml môi trường với sự phối hợp của ba nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ ở trên, với giá trị pH đã chọn, nhiệt độ 30°C, lắc 160 vòng/phút, sau thời gian 4 ngày tiến hành xác định hiệu quả kết tụ với dung dịch kaolin theo như mô tả ở mục 2.2. Phối hợp ba nguồn dinh dưỡng (3 nguồn carbon + 4 nguồn nitrogen + 4 nguồn khoáng vô cơ) có 48 nghiệm thức khác nhau và mỗi nghiệm thức được thực hiện 3 lần lặp lại.

Kết quả cuối cùng chọn ra được môi trường tối ưu có nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ thích hợp cho vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

2.3.3 Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến hiệu quả tổng hợp chất kết tụ sinh học

Nuôi sinh khối chủng vi khuẩn trong môi trường gồm 3 nguồn carbon, nitrogen và khoáng đã được chọn ở thí nghiệm trên. Mỗi nguồn dinh dưỡng sẽ được chia thành 3 mức độ khác nhau và phối hợp tạo ra 27 nghiệm thức với tỷ lệ carbon, nitrogen và khoáng vô cơ bổ sung khác nhau (Bảng 3).

Chủng vi khuẩn được nhân sinh khối trong ống fancoil 50 ml chứa 20 ml môi trường tổ hợp từ 3 nguồn dinh dưỡng với tỷ lệ khác nhau, điều chỉnh về giá trị pH cho tỷ lệ kết tụ cao nhất đã chọn, ủ lắc 160 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C. Đánh giá khả năng kết tụ với dung dịch kaolin, phân tích hồi quy tuyến tính 3 nhân tố từ đó chọn ra nghiệm thức có tỷ lệ bổ sung thích hợp cho vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

Bảng 3: Nghiệm thức bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên khảo sát ảnh hưởng của các tỷ lệ carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến hiệu quả kết tụ sinh học

Nguồn carbon	Nguồn nitrogen			Nguồn khoáng vô cơ
	N(b ₁ %)	N(b ₂ %)	N(b ₃ %)	
C(a ₁ %)	1	4	7	M(c ₁ %)
	2	5	8	M(c ₂ %)
	3	6	9	M(c ₃ %)
C(a ₂ %)	10	13	16	M(c ₁ %)
	11	14	17	M(c ₂ %)
	12	15	18	M(c ₃ %)
C(a ₃ %)	19	22	25	M(c ₁ %)
	20	23	26	M(c ₂ %)
	21	24	27	M(c ₃ %)

* Ghi chú: C: nguồn carbon; a: mức độ (%); N: nguồn nitrogen; b mức độ (%); M: nguồn khoáng vô cơ; c: mức độ (%)

2.3.4 Khảo sát ảnh hưởng của bổ sung các muối kim loại đến tỷ lệ kết tụ

Ảnh hưởng của các muối kim loại khác nhau: KCl, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄, FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ đến tỷ lệ kết tụ với dung dịch kaolin của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S được khảo sát. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách bổ sung lần lượt 10 ml dung dịch 1% muối kim loại trên vào 90 ml dung dịch kaolin (5 g/l). Sau đó bổ sung 0,1 ml (0,1%) dung dịch sinh khối vi khuẩn, mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không bổ sung dung dịch muối kim loại. Khuấy đều hỗn hợp trên trong 30 giây bằng máy khuấy từ, giữ yên hỗn hợp trong 5 phút, phần trong ở trên cách mặt nước 2 cm được hút để xác định độ đục quang phổ ở bước sóng 550 nm. Từ đó, muối kim loại bổ sung cho hiệu quả kết tụ cao nhất sẽ được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm gồm 8 nghiệm thức và mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.3.5 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch vi khuẩn bổ sung

Tiến hành kiểm tra khả năng kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn với kaolin ở những nồng độ khác nhau: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 và 2%. Đánh giá khả năng kết tụ bằng cách bổ sung 10 ml dung dịch 1% muối kim loại đã xác định ở thí nghiệm trên vào 90 ml dung dịch kaolin (5 g/l) vào cốc 250 ml. Sau đó thêm dung dịch vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học ở những nồng độ khác nhau. Mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không chủng vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học. Trộn đều hỗn hợp trên trong 30 giây bằng máy khuấy từ, giữ yên hỗn hợp trong 5 phút, lấy phần trong cách mặt nước 2 đến 3 cm xác định chỉ số OD ở bước sóng 550 nm. Tính khả năng kết tụ

và chọn nồng độ vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học có khả năng kết tụ cao nhất ứng với từng dòng vi khuẩn kết tụ sinh học.

2.3.6 Thử nghiệm hiệu suất xử lý nước thải chăn nuôi heo sau hệ thống biogas của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S

Áp dụng các điều kiện thích hợp về độ pH, muối kim loại bổ sung, nguồn dinh dưỡng nuôi và liều lượng dịch vi khuẩn đã tìm được cho chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S để xử lý nước thải chuồng trại chăn nuôi heo sau hệ thống biogas ở quy mô phòng thí nghiệm (binh 10 lít). Qui trình như sau: 8 lít nước thải chuồng trại chăn nuôi heo sau hệ thống biogas được chứa trong bình có thể tích 10 lít chứa, bổ sung muối khoáng kim loại, dung dịch vi khuẩn thích hợp; sục khí trong 5 phút, để yên 60 phút. Thu phần nước trong phía trên để xác định các chỉ tiêu COD, TSS, hàm lượng Nitơ tổng, hàm lượng Photpho tổng (P) và hàm lượng Amonium của nước thải sau xử lý ở Trung tâm Kỹ thuật và Ứng dụng Công nghệ Cần Thơ.

2.3.7 Ghi nhận kết quả và xử lý

Tất cả thí nghiệm lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) và so sánh sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức thông qua sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XV.I.

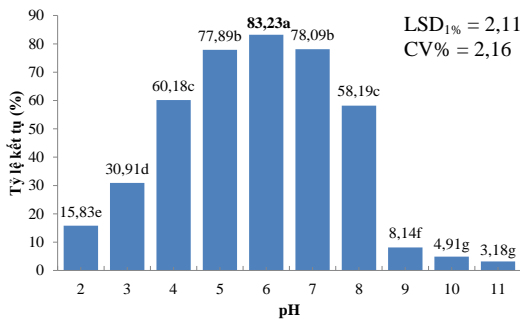
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả tối ưu hóa tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryadhtai* KG12S

3.1.1 Giá trị pH

Nhân tố pH của môi trường nuôi cấy được cho là nhân tố xác định điện tích trao đổi của các tế bào với nhau cũng như là các cầu nối cộng hóa trị - yếu tố ảnh hưởng đến sự hấp thu chất dinh dưỡng và

các phản ứng của enzyme (Xia et al., 2008). Môi trường nuôi sinh khối ở các giá trị pH khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học (Salehizadeh và Shojaosadati, 2001).



Hình 1: Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi sinh khối đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai*

Tỷ lệ kết tụ kaolin của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S là 79,13% ở pH 7, sau khi thay đổi pH môi trường nuôi cấy ở các giá trị pH khác nhau thì tỷ lệ kết tụ cũng thay đổi khác nhau (Hình 1). Khi được nuôi cấy trong môi trường có giá trị pH từ 5 đến 7 thì chủng vi khuẩn cho tỷ lệ kết tụ cao và đạt tỷ lệ kết tụ cao nhất ở giá trị pH 6 (83,23%) khác biệt có ý nghĩa so với ở các giá trị pH khác. Kết quả tương đồng với kết quả nghiên cứu của Zhang et al. (2007) là chất kết tụ sinh học MMF1 được tổng hợp từ hỗn hợp vi khuẩn MM1 gồm vi khuẩn *Staphylococcus* sp. (BAFRT4) và *Pseudomonas* sp. (CYGS1) cho tỷ lệ kết tụ cao nhất khi được nuôi cấy ở môi trường có giá trị pH 6. Theo kết quả nghiên cứu của Li et al. (2009) ở vi khuẩn *Bacillus licheniformis* X14 cho thấy pH tối ưu của môi trường nuôi cấy cho sự tổng hợp chất kết tụ đạt tỷ lệ kết tụ cao là 6,5.

Mỗi chủng vi khuẩn thích hợp với khoảng pH nhất định và đạt tỷ lệ kết tụ cao nhất tại một giá trị

duy nhất. Theo kết quả thí nghiệm, pH 6 được chọn là pH môi trường nuôi cấy dòng vi khuẩn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.2 Nguồn carbon, nguồn nitrogen và khoáng vô cơ

Các nguồn dinh dưỡng khác nhau trong thành phần môi trường nuôi sinh khối có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhattai* KG12S.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến tỷ lệ kết tụ của chủng vi khuẩn *Bacillus Aryabhattai* KG12S (Bảng 4) cho thấy tỷ lệ kết tụ cao nhất đạt được là 88,36% với nguồn carbon là glucose (1%), nguồn nitrogen là glutamate (5%), nguồn khoáng vô cơ là K_2HPO_4 (0,2%) và KH_2PO_4 (0,5%). Ngoài ra, thành phần môi trường gồm tinh bột 1%, glutamate 5%, K_2HPO_4 (0,2%) và KH_2PO_4 (0,5%) cũng cho tỷ lệ kết tụ cao là 81,42%. Theo Zheng et al. (2008) đối với vi khuẩn *Bacillus* sp. F19 thì nguồn carbon thích hợp là sucrose (8 g/l) và nguồn nitrogen là dịch trích nấm men (0,25 g/l). Vi khuẩn *Bacillus subtilis* MSBN17 cho tỷ lệ kết tụ cao nhất là 92,07% khi được nuôi trong môi trường có nguồn carbon là đường thốt nốt, 89,04% với nguồn nitrogen là NH_4NO_2 và 88,36% với nguồn khoáng vô cơ là NaCl (Sathiyarayanan et al., 2013).

Qua kết quả nghiên cứu này cho thấy chủng vi khuẩn có thể thích ứng với nhiều nguồn carbon, nguồn nitrogen và nguồn khoáng vô cơ khác nhau. Tuy nhiên, chỉ có một nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ thích hợp nhất cho sự tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ cao nhất. Vì vậy, chọn nguồn dinh dưỡng gồm glucose (1%), glutamate (5%), K_2HPO_4 (0,2%) và KH_2PO_4 (0,5%) làm môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nguồn carbon, nitrogen và khoáng vô cơ đến tỷ lệ kết tụ (%) của chủng vi khuẩn *Bacillus Aryhadtai* KG12S

Ký hiệu	Nguồn carbon	Nguồn nitrogen			Yeast extract (0,05%)	Nguồn khoáng vô cơ
		Glutamate (5%)	Ure (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,05%)	(0,05%)		
KG12S	Glucose (1%)	68,17	46,18	75,17	44,16	MgSO ₄ (0,5%)
		71,34	43,18	46,18	46,18	CaCl ₂ (0,5%)
		73,41	75,12	69,08	75,24	FeCl ₃ (0,5%)
	88,36	58,38	79,15	68,31	K₂HPO₄(0,2%)+KH₂PO₄(0,5%)	
	S	62,34	51,72	70,02	66,19	MgSO ₄ (0,5%)
LSD _{1%} = 3,84	Sucrose (1%)	66,18	49,17	69,53	68,16	CaCl ₂ (0,5%)
		69,98	52,18	66,17	69,09	FeCl ₃ (0,5%)
CV% = 2,76	Tinh bột (1%)	79,95	53,85	69,09	55,18	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)
		68,17	42,14	71,23	42,39	MgSO ₄ (0,5%)
		65,87	68,13	70,21	50,18	CaCl ₂ (0,5%)
		71,24	71,28	72,18	54,14	FeCl ₃ (0,5%)
		81,42	79,14	78,19	76,16	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)

3.1.3 Tỷ lệ glucose, glutamate và khoáng vô cơ

Kết quả tối ưu hóa tỷ lệ glucose, glutamate, K₂HPO₄ và KH₂PO₄ bổ sung trong thành phần môi trường nhân sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S được trình bày ở Bảng 5 cho thấy ở các nghiệm thức gồm glucose (1%) và glutamate (5%) cho tỷ lệ kết tụ rất cao lần lượt là 87,88% , 88,36% và 91,35% và đạt tỷ lệ kết tụ cao nhất là 91,35% ở nghiệm thức gồm glucose (1%) và glutamate (5%), K₂HPO₄ (0,4%) và KH₂PO₄ (1%) và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Trong khi ở các nghiệm thức glucose (0,5% và 1,5%), glutamate (2,5% và 7,5%) cho tỷ lệ kết tụ thấp hơn (từ 60,18% đến 85,47%). Điều này chứng tỏ khi tăng tỷ lệ thành phần dinh dưỡng thì không làm tăng khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học. Từ kết quả thí nghiệm chọn nghiệm thức glucose (1%) và glutamate (5%), K₂HPO₄ (0,4%) và KH₂PO₄ (1%) là thành phần môi trường nuôi

cây chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S có tỷ lệ kết tụ cao nhất.

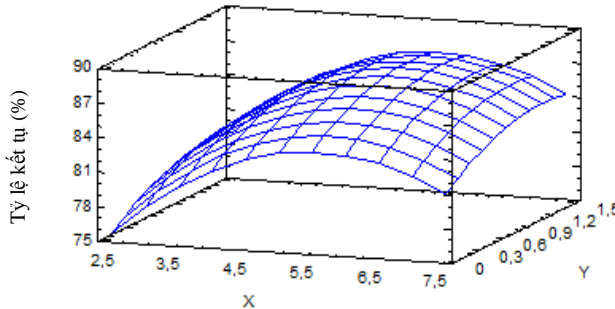
Sử dụng các số liệu kết quả thí nghiệm trên phân tích tìm ra phương trình hồi qui nhiều biến bằng chương trình Statgraphics XVI, dựa trên phương trình xác định được nghiệm thức tối ưu nhất cho môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S. Kết quả phân tích tương quan cho thấy tỷ lệ kết tụ (%) có tương quan với 10 biến theo phương trình:

$$\begin{aligned} \text{Tỷ lệ kết tụ (\%)} = & -5,225 + 114,399*\text{Glucose} \\ & + 9,156*\text{Glutamate} + 16,367*\text{Khoangvoco} - \\ & 51,723*\text{Glucose}*\text{Glutamate} - \\ & 0,829*\text{Glutamate}*\text{Glutamate} - 2,531*\text{Khoang} \text{ vo} \\ & \text{co}*\text{Khoang vo co} + 0,186*\text{Glucose}*\text{Glutamate} - \\ & 10,136*\text{Glucose}*\text{Khoang vo co} - \\ & 1,775*\text{Glutamate}*\text{Khoang vo co} + \\ & 1,767*\text{Glucose}*\text{Glutamate}*\text{Khoang vo co} \end{aligned}$$

Bảng 5: Ảnh hưởng của sự thay đổi tỷ lệ (%) glucose, glutamate, K₂HPO₄ và KH₂PO₄ đến tỷ lệ kết tụ (%) của chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S

Ký hiệu	Nguồn carbon	Nguồn nitrogen			Nguồn khoáng vô cơ (%)
		Glutamate (2,5%)	Glutamate (5%)	Glutamate (7,5%)	
KG12S	Glucose (0,5%)	60,18	66,72	63,18	K ₂ HPO ₄ (0,1%)+KH ₂ PO ₄ (0,25%)
		62,31	67,18	64,58	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)
		65,98	68,34	62,19	K ₂ HPO ₄ (0,4%)+KH ₂ PO ₄ (1%)
	76,24	87,88	81,19	K ₂ HPO ₄ (0,1%)+KH ₂ PO ₄ (0,25%)	
	LSD _{1%} = 13,05	Glucose (1%)	77,11	88,36	82,18
75,98	91,35		85,47	K ₂ HPO ₄ (0,4%)+KH ₂ PO ₄ (1%)	
CV% = 8,06	Glucose (1,5%)	70,13	75,18	78,19	K ₂ HPO ₄ (0,1%)+KH ₂ PO ₄ (0,25%)
		71,26	77,98	79,08	K ₂ HPO ₄ (0,2%)+KH ₂ PO ₄ (0,5%)
		69,98	76,28	80,01	K ₂ HPO ₄ (0,4%)+KH ₂ PO ₄ (1%)

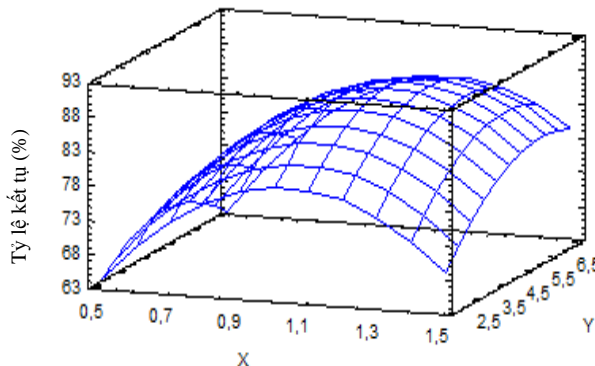
Qua phương trình hồi quy đa biến trên, thay thế glucose = 1%, glutamate = X (2,5% - 7,5%) và khoáng vô cơ $K_2HPO_4+KH_2PO_4 = Y = (0,35\% - 1,4\%)$ thì phần mềm Statgraphics XVI sẽ cho đồ thị mặt đáp ứng (surface plotting) ở Hình 2a và đồ thị đường định mức (contour) ở Hình 2b với



Hình 2a: Đồ thị mặt đáp ứng của tỷ lệ kết tụ theo glucose = 1%, glutamate = X (2,5% - 7,5%) và khoáng vô cơ $K_2HPO_4+KH_2PO_4 = Y (0,35\% - 1,4\%)$

Từ đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường mức ở Hình 8 và Hình 9 được vẽ từ phương trình hồi qui khi thay thế glucose = 1%, glutamate = X (2,5% - 7,5%) và khoáng vô cơ $K_2HPO_4+KH_2PO_4 = Y (0,35\% - 1,4\%)$, cho thấy 2 nhân tố glutamate = X = 5,7% và $K_2HPO_4+KH_2PO_4 = Y = 1,2\%$ cho tỷ lệ kết tụ cao nhất.

Từ kết quả trên, thay thế glutamate = Y (2,5% - 7,5%), glucose = X = (1,5% - 2,5%) và

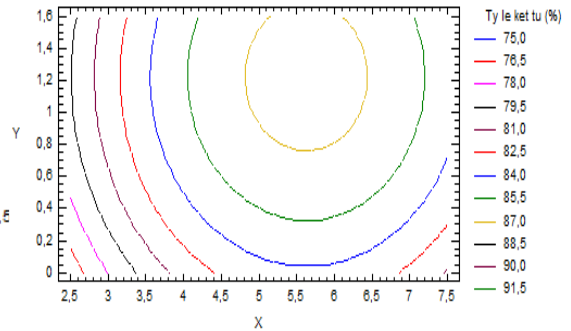


Hình 3a: Đồ thị mặt đáp ứng của tỷ lệ kết tụ theo khoáng vô cơ = 1,2%, glucose = X (0,5% - 1,5%) và glutamate = Y (2,5% - 7,5%)

Từ đồ thị mặt đáp ứng và đồ thị đường mức ở Hình 10 và Hình 11 được vẽ từ phương trình hồi qui khi thay thế khoáng vô cơ = 1,2%, glucose = X (0,5% - 1,5%) và glutamate = Y (2,5% - 7,5%), cho thấy 2 nhân tố glucose = X = 1,12% và

phương trình như sau:

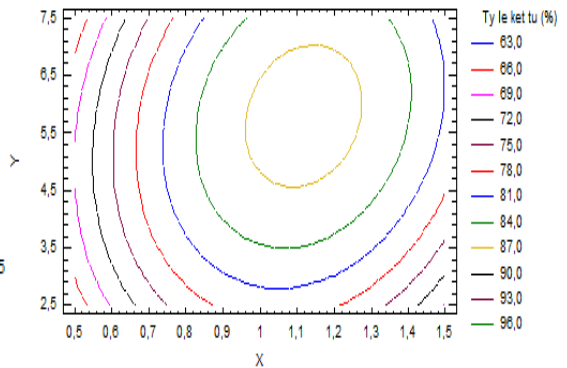
$$\begin{aligned} \text{Tỷ lệ kết tụ (\%)} = & -5,22457 + 114,399*1 + 9,15619*x + 16,3672*y - 51,723*1*1 - \\ & 0,829452*x*x - 2,53061*y*y + 0,186333*1*x - \\ & 10,1361*1*y - 1,77456*x*y + 1,76748*1*x*y \end{aligned}$$



Hình 2b: Đồ thị đường mức của tỷ lệ kết tụ theo glucose = 1%, glutamate = X (2,5% - 7,5%) và khoáng vô cơ $K_2HPO_4+KH_2PO_4 = Y (0,25\% - 1,4\%)$

$K_2HPO_4+KH_2PO_4 = 1,2$ vào phương trình hồi quy, phần mềm Statgraphics sẽ cho đồ thị mặt đáp ứng (surface plotting) ở Hình 3a và đồ thị đường định mức (contour) ở Hình 3b với phương trình như sau:

$$\begin{aligned} \text{Tỷ lệ kết tụ (\%)} = & -5,22457 + 114,399*x + 9,15619*y + 16,3672*1,2 - 51,723*x*x - \\ & 0,829452*y*y - 2,53061*1,2*1,2 + 0,186333*x*y - \\ & 10,1361*x*1,2 - 1,77456*y*1,2 + 1,76748*x*y*1,2 \end{aligned}$$



Hình 3b: Đồ thị đường mức của tỷ lệ kết tụ theo khoáng vô cơ = 1,2%, glucose = X (0,5% - 1,5%) và glutamate = Y (2,5% - 7,5%)

glutamate = Y = 5,7% sẽ cho sinh khối vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học cao nhất.

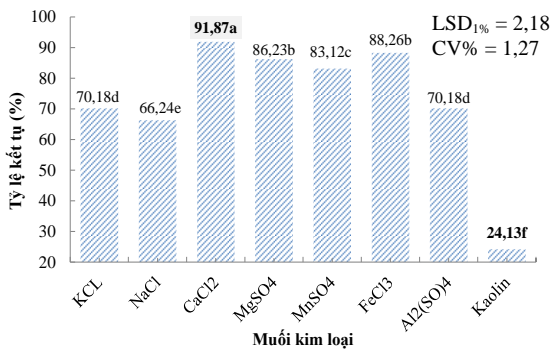
Từ các kết quả trên cho thấy khi bổ sung 1,12% glucose, 5,7% glutamate và 1,2% khoáng vô cơ ($K_2HPO_4 (0,4\%) + KH_2PO_4(0,8\%)$) vào môi trường nuôi sinh khối chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai*

KG12S sẽ cho tỷ lệ kết tụ sinh học cao nhất và tỷ lệ thành phần môi trường này được sử dụng cho các thí nghiệm nghiên cứu tối ưu hóa khả năng tổng hợp chất kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S và thử nghiệm hiệu quả xử lý nước thải sau hệ thống biogas chuồng trại chăn nuôi heo.

3.1.4 Ion kim loại bổ sung

Các cation có tác dụng tăng cường hoạt tính kết tụ do có thể trung hòa và ổn định các nhóm chức năng bằng cách hình thành cầu nối giữa các hạt phân tử kaolin với nhau (Salehizadeh *et al.*, 2000). Theo kết quả nghiên cứu của Sheng *et al.* (2006) các cation khi cho vào dung dịch kaolin sẽ làm tăng điện tích âm của vật thể từ đó làm tăng khả năng hấp thu các chất lơ lửng thông qua các cầu nối và làm tăng sự kết tụ sinh học.

Kết quả ở (Hình 4) cho thấy sự khác biệt về tỷ lệ kết tụ của chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S khi có và không bổ sung muối kim loại. Khi bổ sung muối kim loại vào dung dịch kaolin đã được bổ sung dịch vi khuẩn sẽ cho tỷ lệ kết tụ cao hơn mẫu đối chứng (chỉ gồm dung dịch kaolin và dịch vi khuẩn) từ 2 đến 3,8 lần. Muối kim loại cho tỷ lệ kết tụ với dung dịch kaolin cao nhất là Ca^{2+} (91,87%) và khác biệt có ý nghĩa so với các muối còn lại. Kết quả nghiên cứu của Zufarzaana *et al.* (2012) cho thấy chất kết tụ sinh học



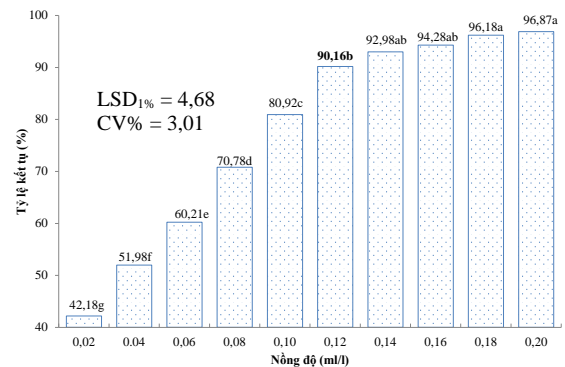
Hình 4: Ảnh hưởng của các muối kim loại đến hiệu quả kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus Aryhadtai* KG12S

UPMB13 cho tỷ lệ kết tụ cao khi bổ sung muối kim loại là $CaCl_2$ (87,2%) và $MgCl_2$ (85,2%). Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu của Salehizadeh và Shojaosadati (2001) và nghiên cứu của Gong *et al.* (2008) là những kim loại hóa trị II như Ca^{2+} và Mg^{2+} (trừ Fe^{2+}) sẽ làm tăng hoạt tính kết tụ hơn các kim loại hóa trị I và III. Qua kết quả trên cho thấy ảnh hưởng của các muối kim loại khác nhau đến hiệu quả kết tụ của

chủng vi khuẩn là khác nhau. Chọn muối kim loại Ca^{2+} là muối kim loại bổ sung làm tăng tỷ lệ kết tụ sinh học để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.5 Nồng độ dịch vi khuẩn bổ sung vào môi trường kaolin

Tỷ lệ kết tụ của chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S cao nhất ở nồng độ vi khuẩn 0,2% là 96,87%, nồng độ 0,18% là 96,18% và thấp nhất ở nồng độ vi khuẩn 0,01% (42,18%). Tỷ lệ kết tụ tăng dần theo sự tăng dần nồng độ vi khuẩn, và khi ở nồng độ cao hơn 0,2% thì sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Hình 5).



Hình 5: Ảnh hưởng của nồng độ dịch vi khuẩn bổ sung đến khả năng kết tụ sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus Aryhadtai* KG12S

Nồng độ dịch vi khuẩn bổ sung là 0,2% cho tỷ lệ kết tụ 96,87% đối với chủng vi khuẩn *Bacillus aryhadtai* KG12S đã đạt hiệu quả kết tụ sinh học cao hơn so với các nghiên cứu khác như: chủng *Bacillus coagulans* As 101 có liều lượng 40 ml/lít cho tỷ lệ kết tụ là 90% (Salehizadeh *et al.*, 2000), chủng *Bacillus licheniformis* liều lượng 150 ml/L cho tỷ lệ kết tụ 98,4% (Shih *et al.*, 2001). Ở nồng độ 0,18% và 0,2% thì tỷ lệ kết tụ khác biệt không có ý nghĩa thống kê nhưng để đảm bảo hiệu quả kết tụ và dễ dàng trong tính toán thì nồng độ vi khuẩn 0,2% được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Hiệu suất xử lý nước thải chăn nuôi heo sau biogas

Kết quả xử lý nước thải trại nuôi heo sau hệ thống biogas của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S thể hiện trong Bảng 11 cho thấy hàm lượng COD đã giảm 50,85%, chỉ tiêu Nitơ tổng giảm 75,00% và hàm lượng amonium giảm 69,12%. Ba chỉ tiêu này so với quy định nước thải đầu ra của QCVN_40/2011/BTNMT thì 3 chỉ tiêu này không đạt vì trong thành phần nước thải từ chăn nuôi heo chứa nguồn đạm cao. Chỉ tiêu TSS giảm 67,21% đạt tiêu chuẩn B và chỉ tiêu photpho

tổng giảm 85,42% đạt tiêu chuẩn loại A, hai chỉ tiêu này so với quy định của QCVN 40/2011/BTNMT đạt yêu cầu so với quy định nước thải đầu ra.

Qua các chỉ tiêu phân tích khi ứng dụng chủng vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học *Bacillus aryabhatai* KG12S cho thấy, ngoài khả năng kết tụ làm giảm chỉ số COD và TSS còn làm giảm các chỉ số khác như nitơ tổng, photpho tổng và hàm lượng amonium.

Bảng 6: Kết quả hiệu suất xử lý nước thải chăn nuôi heo sau hệ thống biogas của chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S

Chỉ tiêu	Trước xử lý Đ/C	Sau xử lý		QCVN 40_2011/BTNMT	
		LA.51*	Tỷ lệ giảm %	A	B
COD (mg/l)	1104,00	542,67±104,46 ^b	50,85	75	150
TSS (mg/l)	153,50	50,33±20,04 ^a	67,21	50	100
Nitơ tổng (mg/l)	369,86	92,47±24,91 ^a	75,00	20	40
Photpho tổng (mg/l)	4,54	0,66±0,33 ^a	85,42	4	6
Hàm lượng Amonium mg/l)	311,02	69,12±37,84 ^a	77,78	5	10

Ghi chú: * Kết quả trung bình 3 lần lặp lại, phân tích tại: Trung tâm Kỹ thuật và Ứng dụng Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ Tp.Cần Thơ

4 KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S tổng hợp chất kết tụ sinh học cho tỷ lệ kết tụ trong dung dịch kaolin 91,87% ở các điều kiện: nguồn dinh dưỡng dùng để nuôi sinh khối là glucose 1,12%, glutamate 5,7% và khoáng vô cơ 1,2% (K₂HPO₄ 0,4% + KH₂PO₄ 0,8%); pH 6; bổ sung muối kim loại CaCl₂ và nồng độ dịch vi khuẩn 0,2%. Ứng dụng chủng vi khuẩn *Bacillus aryabhatai* KG12S xử lý nước thải sau hệ thống biogas chuồng trại chăn nuôi heo cho hiệu suất COD, TSS, nitơ tổng, phospho tổng và ammonium lần lượt là 50,85%, 67,21%, 75,00%, 85,42% và 77,78%. Trong đó, chỉ tiêu TSS đạt cột A QCVN 40 2011/BTNMT, các chỉ tiêu còn lại chưa đạt yêu cầu theo QCVN 40 2011/BTNMT. Cần tiếp tục nghiên cứu các điều kiện khác để tăng hiệu quả xử lý nước thải của vi khuẩn này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Deng, S., R. Bai and X. Hu, 2003. Characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl microbial biotechnol*, 60: 588-593.
- Deng, S., G. Yu and Y.P. Ting, 2005. Production of a biofloculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44: 179-186.
- Gong, W.X., S.G. Wang., X.F. Sun., X.W. Liu., Q.Y. Yue and B.Y. Gao, 2008. Biofloculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in

wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 99: 4668-4674.

- Huỳnh Văn Tiền và Cao Ngọc Diệp, 2013. Phân lập, tuyển chọn và phân tích đa dạng vi khuẩn tổng hợp chất kết tụ sinh học polysaccharide trong chất thải sau biogas chuồng trại nuôi heo ở Đồng bằng sông Cửu Long, Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013, quyển 2: 518-522.
- Kurane, R., K. Hatamochi, T. Kakuno, M. Kiyohara, K. Kawaguchi, Y. Mizuno, M. Hirano and Y. Taniguchi, 1994. Purification and characterization of liquid biofloculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58: 1977-1982.
- Li, W.W., S. Zhong, H.Y. Lei, R.W. Chen, Q. Yu and H.L. Li, 2009. Production of a novel biofloculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. *Bioresour Technol*, 100: 3650-3656.
- Salehizadeh, H., M. Vossoughi and I. Alemzadeh, 2000. Some investigations on biofloculant production bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 5: 39-44.
- Salehizadeh, H. and S.A. Shojaosadati, 2001. Extracellular biopolymeric flocculants: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 19 (5): 371-385.
- Sathiyarayanan, G., G.S. Kiran and J. Selvin, 2013. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide

- biofloculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 102: 13-20.
10. Sheng, Y., Q. Zang and H. Wang, 2006. Screening and flocculating of biofloculant-producing microorganisms. *Science and Technology Beijing*, 13: 289-292.
 11. Shih, I.L., Y.T Van, L.C. Yeh, H.G. Lin and Y.N. Chang, 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource Technology*, 78 (3): 267-272.
 12. Xia, S.Q., Z.Q. Zhang, X.J. Wang, A.M. Yang, L. Chen, J.F. Zhao, D. Leonard, N. Jaffrezic-Renault, 2008. Production and characterization of a biofloculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. *Bioresour Technol*, 99: 6520-6527.
 13. Yim, J.H., S.J. Kim, S.H. Ahn, H.K. Lee, 2007. Characterization of a novel biofloculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. *Bioresour Technol*, 98: 361-367.
 14. Yokoi, H., T. Arima, S. Hayashi and Y. Takasaki, 1996. Flocculation properties of poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *J Ferment Bioeng*, 82: 84-87.
 15. Zang, J., Z. Liu., S. Wang and P. Jiang, 2002. Characterization of a biofloculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 517-522.
 16. Zhang, Z.Q., L. Bo, X.S. Qing, W.X. Jiang and Y.A. Ming, 2007. Production and application of a novel biofloculant by multiple- microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 667-673.
 17. Zheng, Y., Z.L. Ye, X.L. Fang, Y.H. Li and W.M. Cai, 2008. Production and characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus* sp. F19. *School of Environmental Science and Engineering*, 99(16): 7686-7691.
 18. Zouboulis, A.I., Xiao-Li C., Katsoyiannis I.A, 2004. The application of biofloculant for the removal of humic acids from stabilized landfill leachates. *Journal of Environmental Management*, 70 (1): 35-41.
 19. Zufarzaana, Z., Ahmad Zaharin Aris, Zulkifli H. Shamsuddin, and Mohd Kamil Yusoff, 2012. Cation Dependence, pH Tolerance, and Dosage Requirement of a Biofloculant Produced by *Bacillus* spp. UPMB13: Flocculation Performance Optimization through Kaolin Assays. *The Scientific World Journal*. PMID: 495659, 7pp.