

Tạp chí

**NÔNG NGHIỆP
&
PHÁT TRIỂN
NÔNG THÔN**

*Science and Technology Journal
of Agriculture & Rural Development*

MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT, VIETNAM

Tạp chí Khoa học và Công nghệ

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

5

2020

TẠP CHÍ

**NÔNG NGHIỆP
& PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN**

ISSN 1859 - 4581

NĂM THỨ HAI MƯƠI

SỐ 380 NĂM 2020
XUẤT BẢN 1 THÁNG 2 KỲ

**TỔNG BIÊN TẬP
PHẠM HÀ THÁI**
ĐT: 024.37711070

**PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
DƯƠNG THANH HẢI**
ĐT: 024.38345457

TOÀ SOẠN - TRỊ SỰ
Số 10 Nguyễn Công Hoan
Quận Ba Đình - Hà Nội
ĐT: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinongnghiep@vnn.vn
Website: www.tapchikhoahocnongnghiep.vn

**VĂN PHÒNG ĐẠI DIỆN TẠP CHÍ
TẠI PHÍA NAM**
135 Pasteur
Quận 3 - TP. Hồ Chí Minh
ĐT/Fax: 028.38274089

Giấy phép số:
290/GP - BTTTT
Bộ Thông tin và Truyền thông
cấp ngày 03 tháng 6 năm 2016

Công ty TNHH In ấn Đa Sắc
Địa chỉ: Số 7, P. Xuân Phương,
Q. Nam Từ Liêm, Hà Nội

Giá: 30.000đ

**Phát hành qua mạng lưới
Bưu điện Việt Nam; mã ấn phẩm
C138; Hotline 1800.585855**

MỤC LỤC

- TRẦN NHƯ KHUYẾN, ĐẶNG THANH SƠN. Cách mạng công nghiệp 4.0 trong lĩnh vực nông nghiệp và định hướng phát triển ngành chế biến nông sản thực phẩm ở Việt Nam 3-12
- HÀ MINH THANH, TRẦN NGỌC KHÁNH, VŨ THỊ PHƯƠNG BÌNH, NGUYỄN THU HÀ, HỒ HẠNH, LƯƠNG HỮU THÀNH, PHẠM HỒNG HIỂN, PHẠM VĂN TOÀN. Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học tổng hợp kiểm soát nấm, tuyến trùng hại hồ tiêu 13-21
- NGUYỄN THỊ LANG, LÊ HOÀNG PHƯƠNG, BIÊN ANH KHOA, BÙI CHÍ BỬU. Nghiên cứu sự biến động di truyền của giống lúa OM 6162 đột biến tại đồng bằng sông Cửu Long bằng tia gamma (Co^{60}) 22-27
- NGUYỄN QUANG HỌC, NGUYỄN TUẤN ANH, NGUYỄN BÁ LÂM. Tính chất một số loại đất chính tỉnh Đắk Lắk 28-38
- NGUYỄN MẠNH HIỂU, NGUYỄN THỊ TÚ QUỲNH, ĐỖ THU TRANG, LÊ THỊ HIỂN, PHẠM ANH TUẤN. Ảnh hưởng của xử lý 1-Methylcyclopropene đến chất lượng quả sầu riêng Monthong 39-44
- HOÀNG QUANG BÌNH, DƯƠNG THỊ NGỌC DIỆP. Nghiên cứu ổn định hợp chất betacyanin và polyphenol trong nước thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) 45-49
- NGUYỄN TRỌNG TUÂN, TRẦN HUỲNH HOÀNG LỘC. Hoạt tính kháng ôxi hóa của cao chiết ethanol thân, rễ Ngải tiên (*Hedychium coronarium* Koenig.), Nghệ rừng (*Curcuma amada* Roxb.) và Bông nga trụi (*Boesenbergia pandarata* Roxb.) 50-55
- VÕ KHÁNH HÀ, TRƯƠNG THỊ MINH HẠNH, GIANG THỊ KIM LIÊN, MAI THỊ PHƯƠNG CHI, TRẦN THỊ PHƯƠNG THẢO. Khảo sát một số hoạt tính sinh học của dịch chiết rễ cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack) thu hái ở vùng núi huyện Ia Grai, tỉnh Gia Lai 56-61
- ĐÀO THỊ HỒNG VÂN, ĐỖ PHƯƠNG KHANH, NGUYỄN VĂN HIỂU. Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển của các chủng *Bacillus* sp. BH1, *Bacillus* sp. BH2 và *Pseudomonas* sp. BH3 có tiềm năng xử lý nước thải làng nghề nấu rượu 62-69
- NGUYỄN MINH THU, NGÔ DUY KỶ, NGUYỄN THỊ VIỆT ANH. Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic thích hợp cho lên men tạo kefiran từ dịch thủy phân gạo lứt 70-76
- NGUYỄN LỘC NINH, VÕ HOÀNG VIỆT, NGUYỄN NGỌC NHƯ QUỲNH, NGÔ MINH NHUẬN, NGÔ THỤY DIỄM TRANG. Sử dụng bùn thải ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thâm canh trồng cây hoa huệ trắng (*Polianthes tuberosa*) 77-84
- NGUYỄN NGUYỄN THÀNH NHƠN, ĐẶNG THỤY BÌNH, TRẦN QUANG SÁNG, NGUYỄN MINH CHÂU, PHẠM THỊ HẠNH. Ứng dụng chỉ thị microsatellite phân biệt quần đàn tôm hùm xanh (*Parulinus homarus*) ở Việt Nam và Sri Lanka 85-92
- NGUYỄN MINH TY. Nghiên cứu đặc tính dinh dưỡng cá trôi Việt (*Cirrhinus molitorella* Cuvier & Valenciennes, 1842) ở sông Ba, tỉnh Phú Yên 93-97
- NGUYỄN THẾ HINH. Công nghệ chăn nuôi lợn thịt không xả thải ra môi trường nhằm giảm thiểu ô nhiễm môi trường 98-104
- NGUYỄN VĂN THỊ, TRẦN QUANG BẢO, LÊ SỸ DOANH, PHẠM VĂN DUẨN, NGUYỄN NAM HẢI, TRẦN XUÂN HÒA. Nghiên cứu kết hợp ảnh vệ tinh quang học Sentinel-2 và radar Sentinel-1 trong phát hiện mất rừng ở tỉnh Gia Lai 105-112
- LÊ CẢNH NAM, NGUYỄN THÀNH MẾN, HỒ NGỌC THỌ, BẢO HUY. Mô hình sinh trưởng và tăng trưởng đường kính Thông 5 lá (*Pinus dalatensis* Ferré) theo vùng phân bố tại Tây Nguyên 113-119
- NGUYỄN THÀNH CHUNG, NGUYỄN THỊ HOÀI THƯƠNG, NGUYỄN HUY HÙNG, LÊ THỊ HƯƠNG. Đa dạng họ cỏ roi ngựa (Verbenaceae) ở Khu Bảo tồn Thiên nhiên Pù Hoạt, tỉnh Nghệ An 120-125
- TRẦN THỊ TRANG, MAI HÀ AN, VƯƠNG VĂN QUỲNH. Giải pháp nâng cao độ chính xác của dự báo nguy cơ cháy rừng 126-134

**VIETNAM JOURNAL OF
AGRICULTURE AND RURAL
DEVELOPMENT**
ISSN 1859 - 4581

THE TWENTIETH YEAR

No. 380 - 2020

Editor-in-Chief
PHAM HA THAI
Tel: 024.37711070
Deputy Editor-in-Chief
DUONG THANH HAI
Tel: 024.38345457

Head-office
No 10 Nguyenconghoan
Badinh - Hanoi - Vietnam
Tel: 024.37711072
Fax: 024.37711073
E-mail: tapchinongnghiep@vnn.vn
Website: www.tapchikhoahocnongnghiep.vn

Representative Office
135 Pasteur
Dist 3 - Hochiminh City
Tel/Fax: 028.38274089

**Da Sac printing
Company limited**

CONTENTS

- | | | |
|---|--|---------|
| ☐ | TRAN NHU KHUYEN, DANG THANH SON. The fourth industrial revolution (FIR) in agriculture and orientation for agricultural products processing development in Vietnam | 3-12 |
| ☐ | HA MINH THANH, TRAN NGOC KHANH, VU THI PHUONG BINH, NGUYEN THU HA, HO HANH, LUONG HUU THANH, PHAM HONG HIEN, PHAM VAN TOAN. Study on production and application of multistrain preparation to control fungi and nematode damaged black pepper | 13-21 |
| ☐ | NGUYEN THI LANG, LE HOANG PHUONG, BIEN ANH KHOA, BUI CHI BUU. Genetic variation of mutant rice variety OM6162 in the Cuu Long delta by gamma (Co ⁶⁰) | 22-27 |
| ☐ | NGUYEN QUANG HOC, NGUYEN TUAN ANH, NGUYEN BA LAM. Properties of some types of land in Dak Lak province | 28-38 |
| ☐ | NGUYEN MANH HIEU, NGUYEN THI TU QUYNH, DO THU TRANG, LE THI HIEN, PHAM ANH TUAN. Effect of 1-MCP treatment to the quality of Monthong durian fruits | 39-44 |
| ☐ | HOANG QUANG BINH, DUONG THI NGOC DIEP. Research stability betacyanin and betacyanin compound of red flesh dragon fruit juice (<i>Hylocereus polyrhizus</i>) | 45-49 |
| ☐ | NGUYEN TRONG TUAN, TRAN HUYNH HOANG LOC. Antioxidant activity of ethanolic extracts of <i>Hedychium coronarium</i> Koenig., <i>Curcuma amada</i> Roxb. and <i>Boesenbergia pandarata</i> Roxb. rhizome | 50-55 |
| ☐ | VO KHANH HA, TRUONG THI MINH HANH, GIANG THI KIM LIEN, MAI THI PHUONG CHI, TRAN THI PHUONG THAO. Investigation on some biological activities of <i>Eurycoma longifolia</i> Jack root extracts collected from Ia Grai district, Gia Lai province | 56-61 |
| ☐ | DAO THI HONG VAN, DO PHUONG KHANH, NGUYEN VAN HIEU. Study on factors affecting the growth and development of bacterial strains <i>Bacillus</i> sp. BH1, <i>Bacillus</i> sp. BH2 and <i>Pseudomonas</i> sp. BH3 capable of treating wastewater from a liquor production village | 62-69 |
| ☐ | NGUYEN MINH THU, NGO DUY KY, NGUYEN THI VIET ANH. Screening of lactic bacteria for kefiran fermentation from hydrolyzed brown rice | 70-76 |
| ☐ | NGUYEN LOC NINH, VO HOANG VIET, NGUYEN NGOC NHU QUYNH, NGO MINH NHUAN, NGO THUY DIEM TRANG. Use of sediment from intensive whiteleg shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> pond for planting tuberose <i>Polianthes tuberosa</i> | 77-84 |
| ☐ | NGUYEN NGUYEN THANH NHON, DANG THUY BINH, TRAN QUANG SANG, NGUYEN MINH CHAU, PHAM THI HANH. Microsatellite markers for separation Vietnam and Sri Lanka spiny lobster <i>Parulinus homarus</i> populations | 85-92 |
| ☐ | NGUYEN MINH TY. Study of nutritional characteristics mud carp <i>Cirrhinus miltiorella</i> Cuvier & Valenciennes, 1842 in Ba river, Phu Yen province | 93-97 |
| ☐ | NGUYEN THE HINH. Research on the no-waste discharged technology for raising finishing pigs to reduce environment pollution | 98-104 |
| ☐ | NGUYEN VAN THI, TRAN QUANG BAO, LE SY DOANH, PHAM VAN DUAN, NGUYEN NAM HAI, TRAN XUAN HOA. Study on deforestation detection in Gia Lai province using Sentinel-2 optical satellite image and Sentinel-1 radar data | 105-112 |
| ☐ | LE CANH NAM, NGUYEN THANH MEN, HO NGOC THO, BAO HUY. Diameter growth and increment models of <i>Pinus dalatensis</i> Ferré species in the central Highlands of Vietnam | 113-119 |
| ☐ | NGUYEN THANH CHUNG, NGUYEN THI HOAI THUONG, NGUYEN HUY HUNG, LE THI HUONG. Diversity of Verbenaceae family in Pu Hoat Nature Reserve, Nghe An province | 120-125 |
| ☐ | TRAN THI TRANG, MAI HA AN, VUONG VAN QUYNH. Solutions to enhance the correct of the forest fire risk predicting | 126-134 |

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA CÁC CHỦNG *Bacillus* sp. BH1, *Bacillus* sp. BH2 và *Pseudomonas* sp. BH3 CÓ TIỀM NĂNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI LÀNG NGHỀ NẤU RƯỢU

Đào Thị Hồng Vân¹, Đỗ Phương Khanh¹, Nguyễn Văn Hiếu²

TÓM TẮT

Các chủng *Bacillus* sp. BH1 (MN519478), *Bacillus* sp. BH2 (MN519479) và *Pseudomonas* sp. BH3 (MN519480) là những vi khuẩn bản địa phân lập được từ nước thải làng nghề nấu rượu, có khả năng phân hủy tốt hợp chất hữu cơ. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, quá trình sinh trưởng của các chủng vi khuẩn này bị ảnh hưởng bởi các yếu tố dinh dưỡng trong môi trường và điều kiện lên men - hai điểm quan trọng để tạo ra các sản phẩm có mật độ tế bào cao khi lên men lỏng. Trong nghiên cứu này, tác động của môi trường lên men (nguồn carbon, nguồn nitơ) và điều kiện lên men (tỷ lệ giống, tốc độ lắc, pH ban đầu, thời gian lên men) đến quá trình sinh trưởng của ba chủng vi khuẩn BH1, BH2 và BH3 được phân tích bằng thí nghiệm đơn yếu tố. Kết quả nghiên cứu cho thấy, với các nguồn carbon khác nhau, glucose là thích hợp cho sự phát triển của chủng BH3, trong khi đó với hai chủng vi khuẩn BH1 và BH2 thì nguồn carbon thích hợp là đường vàng; với các nguồn nitơ hữu cơ là bột đậu tương, bột nấm men thích hợp cho cả ba chủng. Nghiên cứu các điều kiện lên men của ba chủng cho thấy pH ban đầu thích hợp là pH 7,0; tỉ lệ tiếp giống là 1%, tốc độ lắc trong khi lên men là 140 vòng/phút; nhiệt độ lên men ở 37°C và thời gian lên men 24-30 giờ. Bước đầu sử dụng các chủng đã có hiệu quả trong việc loại bỏ các hợp chất hữu cơ (COD, BOD₅) và nitơ, đạt giới hạn quy định tại QCVN 40:2011/BTNMT.

Từ khóa: *Bacillus*, *Pseudomonas*, xử lý nước thải.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoạt động sản xuất rượu và chăn nuôi giúp nâng cao đời sống vật chất của người dân, tuy nhiên trong quá trình đó đã thải ra các thủy vực một lượng lớn các hợp chất hữu cơ. Quá trình phân hủy kỵ khí làm cho nước có màu đen và mùi hôi thối. Các nguồn nước thải không được xử lý khi đổ vào hệ thống thoát nước thải chung đã dẫn đến các chỉ số COD, BOD, SS cao hơn nhiều lần so với tiêu chuẩn cho phép, không những gây ô nhiễm nguồn nước mặt mà ảnh hưởng đến nguồn nước ngầm, tác động xấu đến môi trường không khí và sức khỏe con người [3, 5, 7]. Từ lâu vi sinh vật đã được sử dụng như là một tác nhân thúc đẩy quá trình phân hủy chất hữu cơ với mục tiêu rút ngắn thời gian xử lý nước thải và nâng cao chất lượng nước thải sau xử lý để đáp ứng các yêu cầu đầu ra. Các nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật, đặc biệt là vi sinh vật bản địa để xử lý nước thải càng có nhiều ưu thế nên được nhiều nhà khoa học quan tâm. Các loài thuộc chi *Bacillus* được ứng dụng nhiều

trong xử lý nước thải bởi khả năng sinh trưởng nhanh, sức chịu đựng cao với điều kiện bất lợi của môi trường. Một số tác giả còn sử dụng các chi vi khuẩn khác như *Pseudomonas*, *Aeromonas* để loại bỏ tinh bột, cellulose, nitơ từ nguồn cống nước thải, hồ tập trung [3, 5, 12].

Trong quá trình lên men, các yếu tố cần được nghiên cứu gồm có các điều kiện môi trường (pH, nhiệt độ, tốc độ khuấy trộn, v.v.) và các thành phần môi trường (ví dụ: carbon, nitơ, v.v.). Các yếu tố này phải được xác định và tối ưu hóa cho phù hợp với đặc tính của từng chủng vi khuẩn. Các thông số được xác định phù hợp với từng chủng sẽ giúp cho quá trình lên men thu nhận sinh khối diễn ra thuận lợi và đạt mật độ vi sinh vật trong sản phẩm cao nhất [2, 4, 6, 9, 10, 11].

Các chủng vi khuẩn bản địa *Bacillus* sp. BH1 (MN519478); *Bacillus* sp. BH2 (MN519479) và *Pseudomonas* sp. BH3 (MN519480) phân lập từ nước thải làng nghề nấu rượu Đại Lâm, tỉnh Bắc Ninh với một số đặc điểm sinh học như hoạt tính enzym đa dạng với sự có mặt của protease, amylase, cellulase, tốc độ sinh trưởng nhanh, không gây bệnh trên

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Mở Hà Nội

² Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

người và động vật, khả năng kết lắng tốt. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố (pH, nhiệt độ, tốc độ lắng, v.v.) và các thành phần môi trường (cacbon, nitơ, v.v.) đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn, bước đầu sử dụng sinh khối của các chủng này để thử nghiệm xử lý nước thải trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- *Chủng giống*: *Bacillus* sp. BH1 (MN519478); *Bacillus* sp. BH2 (MN519479) và *Pseudomonas* sp. BH3 (MN519480) được phân lập từ mẫu nước thải tại làng nghề nấu rượu Đại Lâm (xã Tam Đa, huyện Yên Phong, tỉnh Bắc Ninh).

- *Nước thải*: lấy tại mương của làng Đại Lâm.

- *Môi trường*: MPA (g/l): cao thịt 5,0; peptone 10,0; NaCl 5,0; glucose 2,0; agar 20,0; pH 7,2±0,2. Môi trường King'B (g/l): Peptone 20; K₂HPO₄ 1,5; MgSO₄ 7H₂O agar 20,0; pH 7,2±0,2. Môi trường LB (g/l): Cao nấm men 5; Tryptone 10; NaCl 5; Aga20; nước cất 1000 ml; thanh trùng ở 121°C trong 20 phút; pH = 7,0-7,2. Môi trường LM (g/l): (NH₄)₂SO₄ 0,5; KH₂PO₄ 2,5; MgSO₄.7H₂O 0,2; FeSO₄.7H₂O vết; Saccaroza 10; pH 7,0-7,2. Môi trường lên men LM1 (g/l): Bột giấy 1; NPK 1; bột đậu tương 5; MgSO₄.7H₂O 0,3; NaCl 3; nước cất 1000 ml; thanh trùng ở 121°C trong 20 phút; pH = 7,0-7,2. Môi trường lên men LM2 (g/l): Đường kính 5; NPK 1; bột đậu tương 5; MgSO₄.7H₂O 0,3; NaCl 3; nước cất 1000 ml; thanh trùng ở 121°C trong 20 phút; pH = 7,0-7,2.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng được thực hiện theo phương pháp Egorov (1983) [1]. Các chủng vi sinh vật được nhân giống trên môi trường KB ở điều kiện nuôi lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ 37°C, thời gian 20 giờ. Sau đó giống được cấy vào môi trường lên men dịch thể với tỉ lệ 1% để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố đến sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật như các loại môi trường nhân giống (KB, MP, LB), môi trường lên men (LM, LM1, LM2), các nguồn cacbon, nitơ, các giá trị pH môi trường (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10; 11), các nhiệt độ (25, 37; 45°C); tỉ lệ tiếp giống (0,25; 0,5; 1; 2; 5%), tốc độ

lắc (100; 140. 180; 200 vòng/phút) và thời gian nuôi cấy (3; 6; 12; 18; 24; 30; 36 giờ). Xác định khả năng sinh trưởng, phát triển của chủng bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 600 nm (OD_{600nm}).

2.2.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu trong nước thải

- Phương pháp xác định COD: TCVN 6491:1999 (ISO 6060:1989).

- Phương pháp xác định BOD₅: TCVN 6001: 1995 (ISO 8815-1989).

- Phương pháp xác định Nitơ-Kjeldahl: TCVN 5987:1995 (ISO 5663-1984).

2.2.3. Thử nghiệm xử lý gián đoạn nước thải giàu hữu cơ

Cho 1 ml dịch giống chủng giống BH1, BH2, BH3 mỗi loại vào 300 ml nước thải lấy từ làng nghề nấu rượu Đại Lâm (nước thải được sử dụng trong 2 giờ sau khi mang về từ địa điểm lấy mẫu). Lắc ở 120 vòng/phút ở 37°C. Xác định BOD₅, COD và nitơ tổng ban đầu và sau 24 giờ ở bình có và không có bổ sung vi sinh vật (bình đối chứng).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống và môi trường lên men đến quá trình sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp các hợp chất sinh học của các chủng vi khuẩn phụ thuộc rất nhiều vào thành phần môi trường nhân giống và lên men bao gồm nguồn cacbon, nitơ và các nguyên tố vi lượng, đây là các yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sinh trưởng và tham gia vào cấu trúc của sản phẩm. Quá trình nhân giống cấp 1 đã sử dụng các môi trường LB, KB và MP là những môi trường giàu dinh dưỡng phù hợp với nhiều loài vi khuẩn và đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Sau 20 giờ nhân giống ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ 37°C, đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn dựa trên giá trị OD_{600nm}, kết quả thể hiện ở bảng 1.

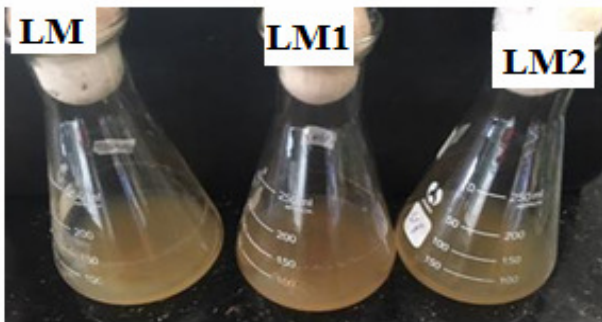
Kết quả ở bảng 1 cho thấy thành phần môi trường nhân giống và lên men cấp 1 có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng phát triển của 3 chủng. Các chủng vi khuẩn phát triển tốt trên cả ba môi trường nhân giống và môi trường lên men lựa chọn nhưng mức độ không giống nhau, trong đó phát triển mạnh nhất là trên môi trường KB, sau đó đến môi trường MP và LB. Các giá trị OD_{600nm} thu được trên môi

trường KB từ 1,686 – 1,783. Nếu được sử dụng làm môi trường để nhân giống thu sinh khối trước khi nhân giống ở cấp độ lớn thì môi trường KB là thích hợp nhất cho nhân giống cấp độ 1, sau đó chuyển sang môi trường LM để thu nhận sinh khối. Mặc dù

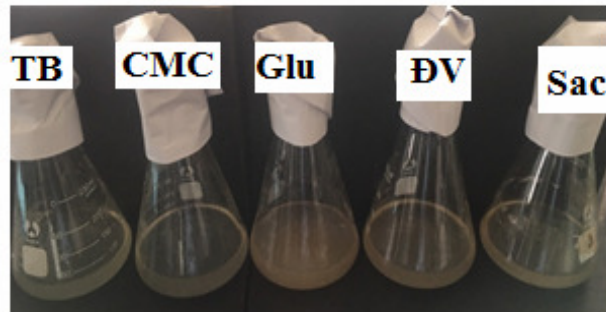
các giá trị OD_{600nm} thu được thấp hơn so với môi trường KB, trong môi trường LM có các thành phần đơn giản, dễ triển khai ở qui mô lớn, giá thành rẻ có tính ứng dụng cao, giúp các chủng vi khuẩn thích nghi nhanh khi đưa vào xử lý.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống và lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Chủng	Ảnh hưởng của môi trường nhân giống và môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn (OD _{600nm})					
	KB	MP	LB	LM	LM1	LM2
BH1	1,783	1,583	1,489	1,283	1,189	1,110
BH2	1,695	1,595	1,413	1,295	1,213	1,076
BH3	1,686	1,606	1,594	0,926	0,794	0,629



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường lên men đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng BH1



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng BH3

3.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Để đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn trên môi trường lên men có sự thay thế các nguồn cacbon, trên môi trường LM tiến

hành thay thế nguồn cacbon Saccarosa bằng các nguồn cacbon khác là đường vàng, glucose, CMC và tinh bột tan. Sau 30 giờ đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn dựa trên giá trị OD_{600nm}, kết quả thể hiện ở bảng 2, hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon thay thế đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Chủng	Ảnh hưởng của các nguồn cacbon trong môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn (OD _{600nm})				
	Saccarosa	Đường vàng	Glucose	CMC	Tinh bột tan
BH1	1,293	1,583	1,483	1,110	1,083
BH2	1,308	1,595	1,395	1,076	1,195
BH3	0,921	1,116	1,186	0,429	0,586

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, môi trường lên men có sự thay thế các nguồn cacbon khác nhau đã ảnh hưởng mạnh đến sự sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn. Các chủng phát triển khá tốt trên tất cả các môi trường có nguồn cacbon thay thế nhưng với mức độ không giống nhau; trong đó chủng BH1 và BH2 phát triển mạnh nhất trên môi trường có nguồn cacbon là đường vàng với các giá trị OD_{600nm}

từ 1,583 - 1,595, sau đó đến môi trường chứa glucose. So với 2 chủng BH1 và BH2 thì chủng BH3 phát triển kém trong tất cả các môi trường, ở môi trường có nguồn cacbon là glucose có giá trị OD_{600nm} cao nhất đạt 1,186 và kém nhất ở môi trường có nguồn cacbon thay thế là CMC và tinh bột.

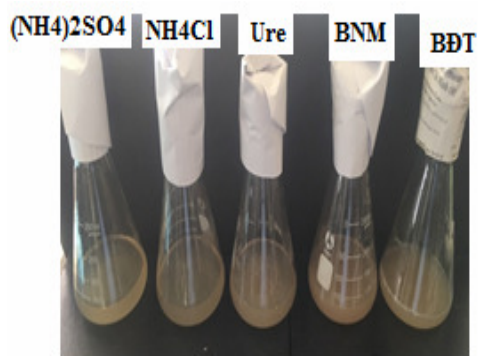
3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ thay thế đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Để đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn trên các môi trường lên men, thí nghiệm thực hiện sự thay thế các nguồn nitơ ban đầu bằng các nguồn nitơ khác như bột đậu tương, bột

nấm men, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và Ure. Sau 30 giờ đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn dựa trên giá trị $\text{OD}_{600\text{nm}}$, kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ thay thế đến khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn

Chủng	Ảnh hưởng của môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn ($\text{OD}_{600\text{nm}}$)				
	Bột đậu tương	Bột nấm men	NH_4Cl	Ure	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
BH1	1,783	1,732	0,609	0,689	1,287
BH2	1,795	1,744	0,624	0,613	1,299
BH3	1,486	1,508	0,932	0,894	1,023



Hình 3. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn BH1

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, môi trường có sự thay thế các nguồn nitơ khác nhau đã ảnh hưởng mạnh đến sự phát triển của các chủng vi khuẩn. Các chủng phát triển tốt trên môi trường có nguồn nitơ là bột đậu tương, cao nấm men, tiếp đến là môi trường có nguồn nitơ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với các giá trị $\text{OD}_{600\text{nm}}$ thu được ở các môi trường này là từ 1,023-1,795 đơn vị. Kết quả này trùng với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác cho rằng dịch chiết nấm men và bột đậu tương là nguồn nitơ tốt nhất cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *Bacillus* [4, 6]. Ngoài ra, bột nấm men cũng là nguồn nitơ khá tốt cho các chủng vi khuẩn này. Còn đối với chủng BH3, sự phát triển tốt nhất là trên môi trường bột nấm men. Trên môi trường có nguồn nitơ NH_4Cl và Ure, chủng BH3 đã thể hiện sự phát triển tốt hơn so với chủng BH1 và BH2.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Nhiệt độ tác động đến quá trình sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn, đồng thời tác động mạnh đến hiệu quả chuyển hóa chất dinh dưỡng của vi khuẩn khi có mặt trong các hệ thống xử lý nước thải. Các chủng vi khuẩn BH1, BH2 và BH3

được lên men trong các điều kiện nhiệt độ từ 25, 37 và 45°C, kết quả được thể hiện ở bảng 4, hình 4.

Từ bảng 4 và hình 4 cho thấy cả ba chủng đều phát triển khá tốt ở dải nhiệt độ 25-45°C. trong đó ở 37°C cả 3 chủng đều phát triển tốt nhất. Ở nhiệt độ 45°C cho thấy 2 chủng vi khuẩn BH1 và BH2 có sự phát triển tốt, trong khi chủng BH3 phát triển yếu hơn hai chủng còn lại, điều này khá phù hợp với đặc tính của 3 chủng.

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng, phát triển của 3 chủng vi khuẩn ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau sau 30 giờ

Nhiệt độ (°C)	Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn ($\text{OD}_{600\text{nm}}$)		
	BH1	BH2	BH3
25	0,745	0,621	0,756
37	1,283	1,253	0,983
45	1,189	1,189	0,567



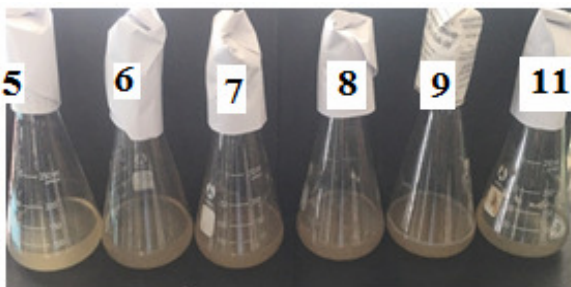
Hình 4. Sự sinh trưởng, phát triển của 3 chủng vi khuẩn khi nuôi ở nhiệt độ 37°C

3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra, pH môi trường có ý nghĩa quyết định đối với nhiều chủng vi sinh vật và tác động mạnh tới các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật. Giới hạn hoạt động của vi sinh vật trong khoảng pH 2-12. Các giới hạn pH cần cho sinh trưởng và phát triển ứng với các giá trị pH tương ứng cho hoạt động của nhiều enzyme, do đó những

biến đổi dù là nhỏ của nồng độ ion H⁺ và OH⁻ cũng ảnh hưởng mạnh đến vi sinh vật. Để đánh giá ảnh hưởng của pH đến khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn được thực hiện trên môi trường lên men có pH từ 5-11, kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Từ bảng 5 cho thấy, ở pH 5 thì chủng BH1 cho khả năng phát triển tốt nhất trong 3 chủng với giá trị OD_{600nm} đạt 0,587 đơn vị. Ở pH 7 cả 3 chủng đều phát triển tốt, và ở pH 10 chủng BH3 có khả năng phát triển tốt nhất trong 3 chủng với giá trị OD_{600nm} đạt 0,911 đơn vị. Ở pH 11 chủng BH1 và BH3 phát triển yếu (giá trị OD_{600nm} 0,123 và 0,205 đơn vị) còn chủng BH2 không phát triển.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn BH1

3.6. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

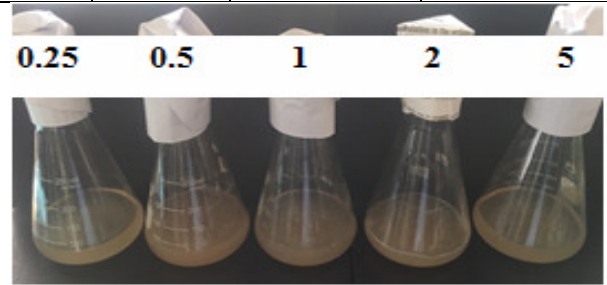
Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra, lượng giống bổ sung vào môi trường có ý nghĩa quyết định đối với nhiều chủng vi sinh vật và có tác động mạnh tới các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật, khả năng sinh trưởng nhanh, tốc độ thích ứng với môi trường và khả năng sinh ra nhiều enzyme. Kết quả ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các 3 chủng vi khuẩn

Tỉ lệ tiếp giống (%)	Ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn (OD _{600nm})		
	BH1	BH2	BH3
0,25	0,931	0,835	0,753
0,5	1,293	1,278	1,083
1	1,334	1,453	1,151
2	1,260	1,405	1,124
5	1,251	1,393	1,104

Bảng 5. Khả năng sinh trưởng, phát triển của 3 chủng vi khuẩn ở các điều kiện pH khác nhau sau 30 giờ nuôi cấy ở 37°C trên môi trường lên men

Giá trị pH ban đầu	Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn (OD _{600nm})		
	BH1	BH2	BH3
5	0,587	0,435	0,453
6	1,133	0,988	0,975
7	1,293	1,278	1,283
8	1,261	1,253	1,224
10	0,455	0,545	0,911
11	0,123	0,098	0,205



Hình 6. Ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đến sự sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn BH1

Tỷ lệ giống có ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh trưởng và phát triển của 3 chủng vi khuẩn. Kết quả ở bảng 6 cho thấy, với lượng giống bổ sung từ 0,5-5%, mức độ sinh trưởng thể hiện tốt nhất với cả 3 chủng khi bổ sung giống với tỷ lệ 1% (giá trị OD_{600nm} 1,151-1,334) và thấp nhất khi lượng giống bổ sung là 0,25%.

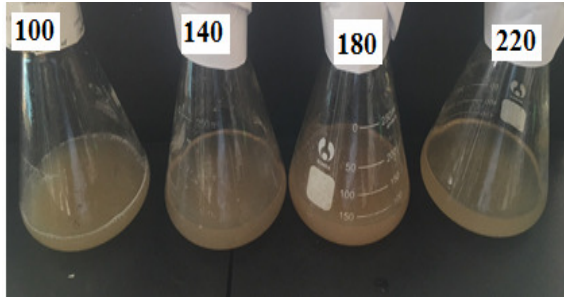
3.7. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Bảng 7. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh trưởng, phát triển của 3 chủng vi khuẩn

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn (OD _{600nm})		
	BH1	BH2	BH3
100	1,231	1,335	1,053
140	1,334	1,353	1,151
180	1,134	1,253	1,051
220	1,161	1,153	1,024

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra, tốc độ lắc trong quá trình nuôi cấy ảnh hưởng mạnh đến quá trình cấp khí vào dịch lên men. Ba chủng vi khuẩn

đều thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí cho nên quá trình cung cấp đủ oxy có ý nghĩa quyết định tới sự trao đổi chất, khả năng sinh trưởng nhanh và sinh ra nhiều enzyme. Kết quả ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mức độ sinh trưởng của 3 chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 7.



Hình 7. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến quá trình sinh trưởng, phát triển của chủng BH2

Vì ba chủng vi khuẩn lựa chọn đều thuộc nhóm vi sinh vật hiếu khí nên lượng không khí bổ sung trong quá trình lên men sẽ quyết định khả năng sinh trưởng của chủng. Kết quả thu được ở bảng 7 cho thấy, tốc độ lắc 100 - 220 vòng/phút là thích hợp cho sự sinh trưởng và tạo sinh khối của cả 3 chủng, với giá trị OD_{600nm} thu được của ba chủng 1,051-1,353 đơn vị. Trong đó, tốc độ lắc tốt nhất là 140 vòng/phút.

3.8. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn

Thời gian lên men có ý nghĩa rất quan trọng trong công nghệ sản xuất các sản phẩm trao đổi chất từ vi sinh vật. Thời gian lên men được sử dụng để tính toán các thông số kỹ thuật, làm cơ sở xây dựng quy trình công nghệ sản xuất các sản phẩm trao đổi chất, sinh khối tế bào của vi sinh vật. Do tế bào chỉ sinh trưởng đến một lượng sinh khối nhất định sau đó tạo ra các sản phẩm thứ cấp, nghiên cứu này đã đánh giá ảnh hưởng của thời gian lên men đến sự

phát triển của 3 chủng vi khuẩn, kết quả thể hiện ở bảng 8.

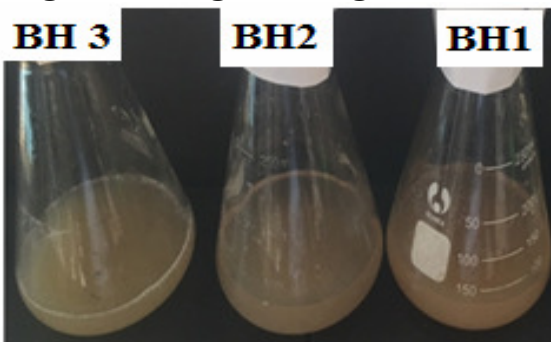
Bảng 8. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng sinh trưởng, phát triển của 3 chủng vi khuẩn trên môi trường thích hợp

Thời gian lên men (giờ)	Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn (OD_{600nm})		
	BH1	BH2	BH3
0	0,090	0,070	0,072
3	0,220	0,240	0,180
6	0,544	0,644	0,244
12	1,182	1,282	0,782
18	1,234	1,301	0,978
24	1,368	1,363	1,151
30	1,324	1,310	1,187
36	1,321	1,289	1,143

Kết quả bảng 8 cho thấy, mật độ tế bào vi khuẩn trong dịch lên men chủng BH1 và BH2 đạt cực đại tại thời điểm 24 giờ lên men với giá trị OD_{600nm} từ 1,363-1,368 đơn vị, còn chủng BH3 sau 30 giờ lên men thì OD_{600nm} đạt 1,187 đơn vị; tương ứng với cuối pha phát triển và trong giai đoạn đầu của pha cân bằng trong động học phát triển của vi khuẩn. Khi kéo dài thời gian lên men, sinh khối không tăng mà có xu hướng giảm. Vì vậy, thời gian kết thúc lên men của chủng BH1, BH2 là 24 giờ và chủng BH3 là 30 giờ.

3.9. Nghiên cứu ứng dụng 3 chủng vi khuẩn vào xử lý nước thải

Bước đầu đánh giá khả năng xử lý nước thải bằng cách bổ sung dịch lên men các chủng vi khuẩn vào nước thải làng nghề nấu rượu để đánh giá hiệu quả của quá trình xử lý thông qua các thông số: COD, BOD₅, tổng nitơ khi so sánh với mẫu không bổ sung vi sinh vật, kết quả thể hiện ở bảng 9.



Hình 8. Kết quả sau quá trình lên men của 3 chủng vi khuẩn



Hình 9. Kết quả sau các quá trình xử lý nước thải có sử dụng 3 chủng vi khuẩn

Bảng 9. Đánh giá hiệu quả xử lý nước thải của các chủng vi khuẩn

Thông số	Đầu vào	Không có chủng		Hỗn hợp chủng		QCVN 40:2011/BTNMT	
		Đầu ra	Hiệu suất (%)	Đầu ra	Hiệu suất (%)	A	B
COD (mg/l)	1450	281,3	85,45	81,2	94,4	75	150
BOD ₅ (mg/l)	1240	117,8	90,5	31,0	97,5	30	50
T-N (mg/l)	111,72	33,41	70,1	23,2	79,6	20	40

Kết quả thể hiện ở bảng 9 cho thấy, khi nước thải có mặt ba chủng vi khuẩn đã đem lại hiệu quả xử lý rõ rệt so với không bổ sung. Chỉ số COD, BOD₅, nitơ tổng ở mẫu bổ sung vi khuẩn giảm khá rõ rệt so với mẫu không bổ sung với hiệu suất lần lượt là 94,4%, 97,5% và 79,6%, trong khi đó ở mẫu không bổ sung các chỉ số lần lượt là 85,45%; 90,5% và 70,1%. Với mẫu bổ sung chế phẩm chứa 3 chủng vi khuẩn, 3 chỉ số phân tích đều đạt tiêu chuẩn loại B, hai chỉ số BOD và COD còn đạt tiêu chuẩn loại A. Như vậy bước đầu sử dụng các chủng vi khuẩn đã có hiệu quả trong việc loại bỏ các hợp chất hữu cơ khó tan, các giá trị COD, BOD, đều có thể đáp ứng với QCVN 40:2011/BTNMT. Trong nghiên cứu của Wang và cộng sự (2008) [12], một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*, *Bacillus* được sử dụng trong loại bỏ phospho, nitơ từ nước hồ. Hiệu quả loại bỏ tổng cacbon hữu cơ, tổng nitơ và tổng phospho lần lượt là 80,2%, 81,6%, và 86,8%. Trong khi đó, một số loài thuộc chi *Bacillus* như *B. cereus*, *B. subtilis* và *B. licheniformis* thể hiện hoạt tính cao trong quá trình nitrat hóa và khử nitrat hóa [5].

4. KẾT LUẬN

- Chủng *Bacillus* sp. BH1 và *Bacillus* sp. BH2: môi trường nhân giống KB, môi trường lên men LM, nguồn cacbon đường vàng, nguồn nitơ bột đậu tương, nhiệt độ 37°C, pH 7.0, tỷ lệ cấp giống 1%, tốc độ lắc 140 vòng/phút, thời gian lên men 24 giờ.

- Chủng *Pseudomonas* sp. BH3: môi trường nhân giống KB, môi trường lên men LM, nguồn cacbon glucose, nguồn nitơ bột nấm men, nhiệt độ 37°C, pH 7.0, tỷ lệ cấp giống 1%, tốc độ lắc 140 vòng/phút, thời gian lên men 30 giờ.

- Bước đầu sử dụng các chủng *Bacillus* sp. BH1, *Bacillus* sp. BH2 và *Pseudomonas* sp. BH3 đã có hiệu quả trong việc loại bỏ các hợp chất hữu cơ và nitơ trong nước thải làng nghề nấu rượu Đại Lâm. Các giá

trị COD, BOD₅, T-N đạt giới hạn quy định tại QCVN 40:2011/BTNMT (cột B).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng (dịch từ Egorov NX, 1983). Thực hành vi sinh vật. *NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội*.
2. Baez A, J. Shiloach (2014). Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbial Cell Factories* 13(1).
3. Crawford DL, RL Crawford (1999). Microbial degradation of ligno-cellulose, *Environ. Microbiol* 31: 714-777.
4. Harish D, Kamla Chaudhary (2011). Production of *Bacillus thuringiensis* S6 biomass using different cheap nitrogen sources. *Acta Agriculturae Serbica* 16(31):3-8.
5. Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R (2005). Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology* 96: 1897-1906.
6. Li YY, Xu YX, Li WH, Yang Y, Wang L, Yu J, Wang CJ, Li XH (2019). Study on Optimizing Nutrition and Fermentation Conditions for Compound *Bacillus* spp. *American J Molecular Biology* 9: 75-84.
7. Rsenberg SL (1978). Cellulose and lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerances fungi. *Mycologia* 70(1).
8. Petersson G, Raices M, Heriksson G (1996). Cellobiose dehydrogenase an unsolved problem in fungalwood degradation. *Biotechnol Applicada* 13(3): 210-111.
9. Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth

- Review. *Front. Microbiol* 7:2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087. doi: batch fermentation using central composite design. *Electronic J Biotechnol* 17: 132–136. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.04.010.
10. Yanjun T, Yixiao F, Jianjun L, Xiangying Z, Wei C (2016). Effect of nitrogen, carbon sources and agitation speed on acetoin production of *Bacillus subtilis* SF4-3. *Electronic J Biotechnology* 19: 41-49.
11. Zhong J, Zhang X, Ren Y, Yang J, Tan H, Zhou J (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jeean-peptide production in fed
12. Wang L, Huang LJ, Yun LJ, Tang F, Zhao JH, Liu YQ, Zeng X, Luo QF (2008). Removal of nitrogen, phosphorus, and organic pollutants from water using seeding type immobilized microorganisms. *Biomedical Environmental Sciences* 21(2):150-156.

STUDY ON FACTORS AFFECTING THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF BACTERIAL STRAINS *Bacillus* sp. BH1, *Bacillus* sp. BH2 and *Pseudomonas* sp. BH3 CAPABLE OF TREATING WASTEWATER FROM A LIQUOR PRODUCTION VILLAGE

Dao Thi Hong Van¹, Do Phuong Khanh¹, Nguyen Van Hieu²

¹*Department of Biotechnology, Hanoi Open University*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

Summary

The three bacterial strains of *Bacillus* sp. BH1 (MN519478), *Bacillus* sp. BH2 (MN519479) and *Pseudomonas* sp. BH3 (MN519480) indigenously isolated from brewery wastewater are capable of decomposing organic matter. Previous research showed that the growth of these bacterial strains was influenced by nutritional factors in the environment and fermentation conditions – the two important points for creating liquid fermentation products with high cellular density. In this study, the impact of fermentation medium (carbon source, nitrogen source) and fermentation conditions (rate of breed, shaking speed, initial pH, fermentation time) on the growth of three bacterial strains (BH1, BH2 and BH3) were analyzed by single-factor experiments. Research results showed that, with different experimental carbon sources, glucose was suitable for the development of the BH3 strain, while the appropriate carbon source for the another two bacterial strains (BH1 and BH2) was brown sugar, the suitable organic nitrogen sources for all the three bacterial strains were soybean powder and yeast powder. The experiments on fermentation conditions showed that the appropriate initial pH for the three strains was pH 7.0; the appropriate rate of breeding was 1%; the appropriate rate of shaking during fermentation was 140 rpm. The appropriate fermentation temperature was 37°C and the appropriate fermentation time was 24-30 hours. The initial use of these bacterial strains were effective in removing organic compounds (COD, BOD5) and nitrogen that reached the thresholds allowed in QCVN 40: 2011/ BTNMT.

Keywords: *Bacillus, Pseudomonas, Wastewater Treatment.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 6/12/2019

Ngày thông qua phản biện: 7/01/2020

Ngày duyệt đăng: 14/01/2020