

# NGHIÊN CỨU CÁC HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHẾ PHẨM VI SINH CHỨA VI KHUẨN *BACILLUS LICHENIFORMIS* TT01

## STUDY ON BIOACTIVES OF MICROBIAL FORMULATIONS CONTAINING *BACILLUS LICHENIFORMIS* TT01

Đoàn Thị Vân<sup>1\*</sup>, Võ Châu Tuấn<sup>1</sup>, Trần Quang Dân<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

\*Tác giả liên hệ: dtvan@ued.udn.vn

(Nhận bài: 12/3/2021; Chấp nhận đăng: 27/8/2021)

**Tóm tắt** - Với mục đích tạo ra chế phẩm vi sinh dùng xử lý chất thải từ các cơ sở nuôi chim cút, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tạo ra 02 công thức chứa chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 (Biopro và Biopro1) và đánh giá hoạt tính sinh học liên quan đến khả năng xử lý chất thải. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Biopro có số lượng vi sinh vật nhiều hơn Biopro1 là 10000 lần. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào (amylase, protease, cellulase, phytase) của chế phẩm Biopro cao hơn so với chế phẩm Biopro1. Biopro có khả năng ức chế và tiêu diệt sự phát triển của vi sinh vật gây hại có trong phân chim cút (*Salmonella typhi*, *E. coli*). Đặc biệt, Biopro có khả năng sinh enzyme phytase rất cao, đường kính vòng phân giải đạt  $5,31 \pm 0,18$  cm. Đây là một trong các cơ sở khoa học quan trọng để ứng dụng Biopro trong xử lý phân chim cút trực tiếp trong trại chăn nuôi.

**Từ khóa** - Chế phẩm vi sinh; *Bacillus licheniformis* TT01; phân chim cút; Biopro; Biopro1

**Abstract** - With the aim to produce a microbial product used for treating wastes from quail farms (mainly manure and urine), in this study, the authors prepared two microbial formulations containing *Bacillus licheniformis* TT01, namely Biopro and Biopro1, and evaluated their bioactives that indicate capacity in the waste treatment. The results showed that density of *B. licheniformis* TT01 in Biopro was 10000 times higher than that in Biopro1. The synthesis of extracellular enzymes (amylase, protease, cellulase, phytase) of Biopro was higher than that of Biopro1. Also, Biopro showed a higher effectiveness of inhibiting harmful microorganisms than Biopro1. In particular, Biopro was capable of producing a high content of phytase enzyme with inhibition zone diameters of  $5.31 \pm 0.18$  cm. These findings suggest that Biopro may be used for the quail waste treatment.

**Key words** - Microbial products; *Bacillus licheniformis* TT01; quail manure; Biopro; Biopro1

### 1. Đặt vấn đề

Thân thiện với môi trường, con người và phát triển bền vững trong các lĩnh vực ứng dụng – đó là một trong những ưu điểm của chế phẩm vi sinh. Vì thế, ngày nay chế phẩm vi sinh vật được nghiên cứu đa dạng và đã ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau trong đời sống, như: Trong nông nghiệp trồng trọt, chăn nuôi, dược liệu, xử lý môi trường... Điển hình như: Năm 2015, Nguyễn Văn Thao cùng các cộng sự đã nghiên cứu thành công chế phẩm vi sinh vật để sản xuất phân hữu cơ sinh học từ bã nấm và phân gà [1]; Năm 2018, Dương Thị Hương cùng các cộng sự đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ13 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh-bột mỳ) [2]; Năm 2016, Nguyễn Thiết cùng nhóm tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguyên liệu đệm lót và men Balasa 01 lên sinh trưởng và môi trường chuồng nuôi gà tàu vàng [3]. Tuy nhiên, phần lớn các công bố chưa nghiên cứu sâu về phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật. Mặt khác, các nghiên cứu về ứng dụng vi sinh vật để xử lý phân chim cút còn hạn chế. Trong khi đó, nghề nuôi chim cút đang rất phát triển ở nước ta. Theo thống kê chỉ tính riêng tại xã Hòa Phước, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng đã có trên 60 hộ và hợp tác xã chăn nuôi chim cút với tổng số đàn lớn hơn 130.000 con. Lượng phân chim cút thải ra rất lớn, gây mùi hôi chuồng trại. Đây là nguồn tiềm ẩn gây ra những dịch bệnh, ảnh hưởng đến sức khỏe của chim cút, cũng như gây ô nhiễm môi trường của con người.

Từ phân chim cút ủ thô, nhóm tác giả đã phân lập và định danh thành công chủng *Bacillus licheniformis* TT01 từ phân chim cút, tại huyện Điện Bàn, tỉnh Quảng Nam. *Bacillus licheniformis* TT01 có hoạt tính sinh học cao, sinh trưởng phù hợp với điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng tại Quảng Nam - Đà Nẵng nói riêng, cũng như trên địa bàn Duyên Hải Nam Trung bộ nói chung [4]. Việc nghiên cứu sâu về ảnh hưởng các điều kiện nuôi cấy đến các hoạt tính sinh học của chủng *Bacillus licheniformis* TT01, nhằm xây dựng quy trình tạo chế phẩm vi sinh hoàn thiện là điều cần thiết. Nhóm tác giả hướng đến sản xuất chế phẩm vi sinh từ chủng vi sinh vật này và ứng dụng để xử lý phân chim cút trực tiếp trong trại chăn nuôi để phát triển nghề chăn nuôi chim cút một cách bền vững.

### 2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 được phân lập từ phân chim cút và bảo quản tại phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh - Hóa sinh thuộc Khoa Sinh - Môi Trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Phương pháp hoạt hóa chủng *Bacillus licheniformis* TT01

Chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh - Hóa sinh thuộc Khoa Sinh - Môi Trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng dưới dạng ống eppendorf, được bảo

<sup>1</sup> The University of Danang - University of Science and Education (Thi Van Doan, Vo Chau Tuan, Tran Quang Dan)

quản lạnh sâu ở  $-23^{\circ}\text{C}$ . *Bacillus licheniformis* TT01 được hoạt hóa trong môi trường LB (Luria Bertani Broth), pH từ 7,0 đến 7,5, ở nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , trong vòng từ 15-24h nuôi cấy [4].

### 2.2.2. Phương pháp tạo chế phẩm vi sinh từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01

Cho 200ml môi trường LB được chuẩn bị trong bình thủy tinh tròn có dung tích 500ml. Hấp tiệt trùng trong nồi hấp ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ , trong vòng 20 phút. Để nguội môi trường trong tủ cấy. Tiếp giống *Bacillus licheniformis* TT01 theo tỷ lệ 3% (với mật độ tế bào đạt  $10^8$  CFU/ml). Khử trùng nút bông và miệng bình thủy tinh dưới đèn cồn. Đóng nút bông của bình thủy tinh, quấn chặt miệng và cổ bình thủy tinh bằng parafilm. Tiến hành tạo chế phẩm vi sinh theo 2 công thức (CT):

CT1: Đặt các bình trong tủ ấm, ở nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , trong vòng 48h. Đặt tên cho chế phẩm là Biopro.

CT2: Cho bình vào lắc ở 150 vòng/phút, nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , trong vòng 48h. Đặt tên cho chế phẩm là Biopro1.

### 2.2.3. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 trong chế phẩm

Mật độ *Bacillus licheniformis* TT01 trong chế phẩm được xác định bằng phương pháp cảm quan và pha loãng, đếm số lượng vi sinh vật trên đĩa Petri, trên môi trường LB, ở nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , nuôi cấy trong vòng 18-24h theo TCVN 4884: 2001.

Phương pháp pha loãng chế phẩm: Đối với Biopro cần lắc đều sinh khối bằng tay. Sau đó, các bước pha loãng chế phẩm Biopro và Biopro 1 đều giống nhau, như sau: Sử dụng máy vortex để lắc đều sinh khối tế bào ở chế độ 800 vòng/phút. Tiến hành hút dịch ở trung tâm bình giống để pha loãng. Ở các bước pha loãng đều sử dụng máy vortex để lắc đều sinh khối của vi khuẩn.

### 2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme ngoại bào của chế phẩm

Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của chế phẩm Biopro và Biopro1 được tiến hành qua các bước như sau: Lấy 5ml chế phẩm vào các ống nghiệm, mang ly tâm ở 13000 vòng/ phút trong vòng 10 phút, sau đó tiến hành xác định hoạt tính enzyme amylase, cellulase, protease và phytase bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [5] Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức:

$$X=D-d$$

Chú thích: X - đường kính vòng phân giải (cm);

D - đường kính vòng phân giải lớn (cm);

d - đường kính lỗ thạch (cm).

### 2.2.5. Phương pháp xác định khả năng đối kháng của chế phẩm với các chủng vi sinh vật có hại

Sử dụng phương pháp cấy vuông góc để xác định hoạt tính đối kháng giữa chế phẩm vi sinh vật được tạo ra từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01 với các chủng vi sinh vật gây hại, thường xuất hiện trong phân gia súc, gia cầm: *Salmonella typhi*, *E. coli*.

### 2.2.6. Phương pháp phân tích thống kê

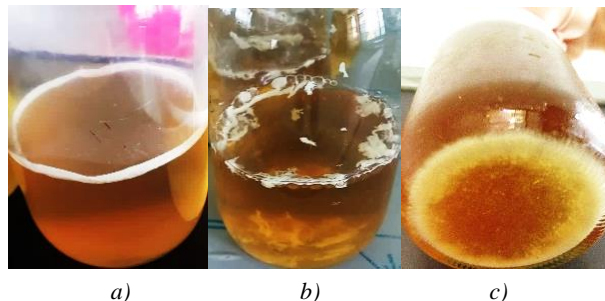
Tất cả các số liệu thu thập được sau thí nghiệm được tính toán và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích

phương sai một chiều (ANOVA) bằng phần mềm Excel. Tất cả các thí nghiệm đều được làm lặp lại 03 lần.

## 3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

### 3.1. Chế phẩm vi sinh vật từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01

Để tạo chế phẩm vi sinh vật, tiến hành cho 6ml chủng *Bacillus licheniformis* TT01 vào 200ml môi trường LB tiệt trùng. Cho bình vào lắc ở nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , 150 vòng/phút, trong vòng 48h, thu được chế phẩm lỏng, thể hiện ở Hình 1.



**Hình 1.** Chế phẩm vi sinh vật chứa chủng *Bacillus licheniformis* TT01: A- Biopro sau 24 giờ nuôi cấy; B- Biopro sau khi lắc nhẹ; C- Biopro1

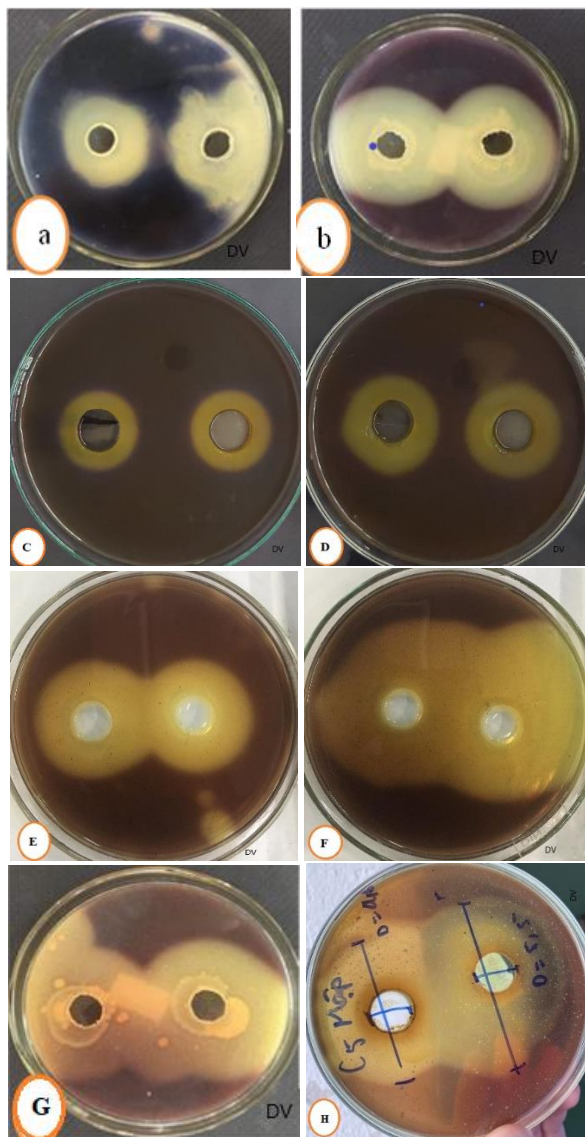
Qua Hình 1 cho thấy, chế phẩm Biopro và Biopro1 chứa chủng *Bacillus licheniformis* TT01 ở dạng lỏng, đều có màu vàng, dưới đáy lắng nhiều sinh khối vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 – có màu trắng. Tuy nhiên, khi chế phẩm vi sinh vật được tạo trong điều kiện không lắc, sau 01 ngày để trong tủ ấm có xuất hiện lớp sinh khối màu trắng trên bề mặt dung dịch. Dùng tay lắc nhẹ bình, lớp sinh khối tan ra và có phần lắng xuống đáy bình. Sau 48h, Biopro có màu vàng sáng. Qua cảm quan, nhận thấy sinh khối của bình Biopro nhiều hơn so với Biopro1. Biopro1 có màu vàng đục hơn Biopro.

Khảo sát trên đĩa Petri cho thấy, số lượng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 của Biopro1 dao động khoảng  $3.10^8$  CFU/ml, còn của Biopro lớn hơn  $10^{12}$  CFU/ml. Như vậy, khi tạo chế phẩm vi sinh vật từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 theo chế độ không lắc, đặt bình trong tủ ấm, ở nhiệt độ từ  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ , trong vòng 48h thì số lượng vi sinh vật hữu hiệu cao hơn so với chế độ lắc, ở  $35^{\circ}\text{C}$  đến  $40^{\circ}\text{C}$ . Biopro và Biopro1 đều có số lượng vi sinh vật hữu hiệu  $\geq 10^8$  CFU/ml - điều này phù hợp với yêu cầu về chất lượng chế phẩm vi sinh vật theo TCVN 6168:2002 [6] và TCVN 7304-1:2003 [7].

### 3.2. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của chế phẩm

Sau khi xác định số lượng vi sinh vật hữu hiệu, tiến hành khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào của 2 dạng chế phẩm bằng phương pháp đục lỗ thạch trên các môi trường đặc trưng. Kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào của chế phẩm được thể hiện ở Hình 2.

Từ Hình 2 cho thấy, chế phẩm Biopro và Biopro1 được tạo ra từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01 đều xuất hiện vòng phân giải enzyme amylase, protease, cellulose, phytase. Tiến hành đo đường kính vòng phân giải enzyme thu được kết quả thể hiện ở Bảng 1.



**Hình 2.** Khả năng sinh enzyme ngoại bào: amylase (A-Biopro1, B-Biopro); protease (C-Biopro1, D- Biopro); cellulase (E- Biopro1, F- Biopro); phytase (G- Biopro1, H- Biopro)

**Bảng 1.** Đường kính vòng phân giải

Enzyme ngoại bào	Đường kính vòng phân giải (cm)		
	Biopro	Biopro1	P-value
Amylase	3,46 ± 0,18	2,74 ± 0,13	0,00
Protease	2,55 ± 0,28	2,42 ± 0,18	0,02
Cellulase	3,60 ± 0,17	2,77 ± 0,25	0,01
Phytase	5,31 ± 0,18	3,45 ± 0,09	0,00

Chú thích: P-value được xác định theo phân tích ANOVA một yếu tố với  $n=3$ . Các giá trị  $P<0,05$  cho thấy, sự sai khác có ý nghĩa thống kê của hoạt tính các enzyme giữa Biopro và Biopro1.

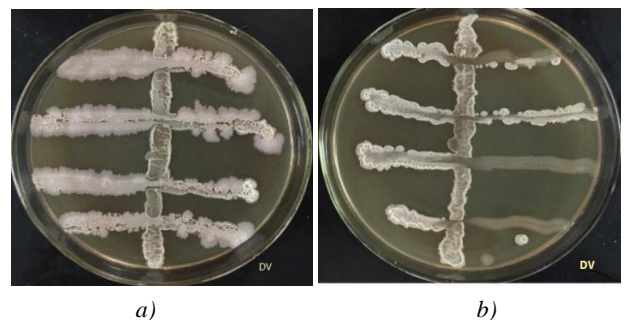
Từ Bảng 1 cho thấy, chế phẩm Biopro và Biopro1 đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào (amylase, protease, cellulase, phytase) cao. Vì vậy, chế phẩm Biopro và Biopro1 đều có khả năng phân giải các hợp chất cao phân tử, đang phân hủy dở dang trong phân chim cút, như: Tinh bột, cellulose, protein, acid phytic. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó về đặc tính sinh học của tế bào vi khuẩn *Bacillus* sp. [8, 9, 10].

Đường kính vòng phân giải của chế phẩm Biopro cao hơn Biopro1, điều này cho thấy, khi tạo chế phẩm vi sinh từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01, ở nhiệt độ từ 35°C đến 40°C, không lắc bình, sau 48 giờ sẽ thu được chế phẩm tốt hơn so với chế phẩm thu được từ các bình lắc. Đặc biệt, chế phẩm Biopro có khả năng sinh enzyme phytase rất cao, đường kính vòng phân giải đạt  $5,31 \pm 0,18$  cm. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Elsorra E. Idriss, et al. [11] và Nguyễn Văn Giang cùng các cộng sự [9]. Enzyme phytase không những giúp phân giải acid phytic, dẫn tới giảm sự ô nhiễm phosphophytate, mà còn giúp cho sự phân giải các hợp chất chứa  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  và một số dạng phức hợp của protein, góp phần làm giảm mùi hôi từ phân chim cút, giảm ô nhiễm môi trường [10, 11, 12]. Riêng khả năng sinh enzyme protease ngoại bào ở 2 công thức không có sự sai khác rõ rệt. Điều này có thể giải thích rằng, chế độ lắc ít ảnh hưởng tới khả năng sinh enzyme này. Theo nhiều nghiên cứu trước đó cho thấy, khả năng sinh enzyme protease ngoại bào chịu ảnh hưởng nhiều vào thời gian, nhiệt độ, pH, hàm lượng và thành phần cơ chất của nuôi cấy chủng vi sinh vật [10, 16].

Qua nghiên cứu về cảm quan, đếm số lượng vi sinh vật hữu hiệu trên đĩa Petri và khả năng sinh 04 loại enzyme ngoại bào của Biopro và Biopro 1 cho thấy, Biopro có số lượng vi sinh vật hữu hiệu nhiều hơn và khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase và phytase cao hơn so với Biopro1. Với mục đích nghiên cứu được phương pháp tạo chế phẩm vi sinh từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01 đơn giản, để ứng dụng vào xử lý phân chim cút tạo phân hữu cơ vi sinh, nhóm tác giả chọn Biopro để nghiên cứu các bước tiếp theo.

### 3.3. Xác định khả năng đối kháng của chế phẩm vi sinh với các chủng vi sinh vật gây hại

Chế phẩm Biopro được tạo ra sau 48 giờ nuôi cấy *Bacillus licheniformis* TT01 trong môi trường LB lỏng, ở nhiệt độ từ 35°C đến 40°C, không lắc. Sử dụng phương pháp cấy vuông góc để xác định khả năng đối kháng của chế phẩm Biopro với các chủng vi sinh vật có hại trong phân chim cút là *E. coli* và *Salmonella typhi*. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.



**Hình 3.** Khả năng đối kháng của chế phẩm Biopro với: A- vi khuẩn *Salmonella typhi*; B- Vi khuẩn *E. coli*

Theo Hình 3 cho thấy, chế phẩm Biopro có chứa chủng *Bacillus licheniformis* TT01 sinh trưởng trên môi trường LB có màu trắng đục, viền răng cưa, sần xù [4] chiếm ưu thế hơn khuẩn lạc của *E. coli* có màu trắng, trơn, bóng (Hình 3B) và khuẩn lạc *Salmonella typhi* có màu phớt hồng, bóng, trơn (Hình 3A). Khi thực hiện cấy vuông góc từ trái qua phải các chủng vi sinh vật gây bệnh đi qua đường cấy của *Bacillus*

*licheniformis* TT01 thì khuẩn lạc *Bacillus licheniformis* TT01 đối kháng mạnh theo hướng ngược lại từ phải sang trái. Khi cấy ria vi khuẩn gây hại, thì hoạt lực của chủng giảm theo cuối đường cấy và chúng bị tác động của chủng *Bacillus licheniformis* TT01. Trong đường cấy ria (số 2,3,4) các chủng *Salmonella typhi* và *E. coli* đều xuất hiện chủng vi sinh vật có màu trắng đục, viền răng cưa, sần xù – đó chính là hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 có trong chế phẩm Biopro [4]. Điều này cho thấy, chế phẩm Biopro có khả năng đối kháng cao với các chủng vi sinh vật gây bệnh thường xuất hiện ở trong phân gia súc, gia cầm *Salmonella typhi* và *E. coli* [13]. Đây là cơ sở khoa học để ứng dụng chế phẩm này trong xử lý phân chim cút trực tiếp trong chuồng trại, góp phần giảm mùi hôi trong trại chăn nuôi chim cút.

#### 4. Bàn luận

Qua kết quả nghiên cứu từ Phần 3.1; 3.2; 3.3 cho thấy, khi sản xuất chế phẩm vi sinh từ vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01 trong điều kiện nuôi cấy không lắc, ở nhiệt độ từ 35°C đến 40°C, sau 48 giờ thu được Biopro có số lượng vi sinh vật hữu hiệu lớn hơn  $10^{12}$  CFU/ml, cao hơn so với Biopro (lắc ở 150 vòng/phút) 1000 lần. Khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào của Biopro cũng cao hơn so với Biopro1. Điều này chứng tỏ, *Bacillus licheniformis* TT01 sống kỵ khí tùy nghi, thích hợp với điều kiện không lắc hơn so với lắc ở chế độ 150 vòng/phút. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó về chi *Bacillus* [8, 11].

Trong phân gia cầm luôn tiềm ẩn các chủng vi sinh vật gây hại, như *Salmonella typhi*, *E. coli* gây bùng phát dịch bệnh trong chuồng trại [13]. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, Biopro có khả năng đối kháng với *Salmonella typhi*, *E. coli*. Đây là yếu tố quan trọng, giúp giảm dịch bệnh trong chăn nuôi, cũng như giảm mùi hôi từ phân của gia cầm [3, 14].

Mặt khác, Biopro khả năng sinh enzyme phytase cao. Theo nhiều nghiên cứu trước đó cho thấy, phytate hoặc acid phytic còn tạo liên kết chặt chẽ với các khoáng kim loại, axit amin, protein, tinh bột, gây ra hiệu ứng kháng dinh dưỡng, làm giảm khả năng tiêu hóa của các dưỡng chất này. Lượng photpho ở dạng phytate hoặc acid phytic không được động vật tiêu hóa sẽ thải ra ngoài theo phân gây ra ô nhiễm môi trường, đồng thời lượng photpho này sẽ là nguồn thức ăn cho vi khuẩn gây bệnh phát triển [8, 9, 12].

Chế phẩm Biopro dạng lỏng, được sản xuất từ chủng *Bacillus licheniformis* TT01 với công nghệ đơn giản, có hoạt tính sinh học cao, số lượng vi sinh vật phù hợp với TCVN 7304:2003, TCVN 6168:2002 và QCVN 02-32-1:2019/BNNPTNT [6, 7, 15]. Vì vậy, Biopro có tiềm năng trong việc ứng dụng để phân giải các hợp chất trong phân chim cút, giúp tăng thể tích chứa phân trong các giỏ chăn nuôi, giảm dịch bệnh, cũng như mùi hôi chuồng trại chăn nuôi chim cút.

#### 5. Kết luận

Chế phẩm Biopro có khả năng sinh các enzyme ngoại bào cần thiết để phân hủy các hợp chất hữu cơ có trong phân chim cút, như: Tinh bột, cellulose, protein, acid

phytic. Và Biopro có thể ức chế, tiêu diệt các chủng vi sinh vật có hại, thường xuất hiện trong phân chim cút *Salmonella typhi*, *E. coli*. Đây là cơ sở khoa học để ứng dụng chế phẩm Biopro trong xử lý nguồn thải từ chăn nuôi chim cút.

Đề xuất: Để hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh cần nghiên cứu thêm ảnh hưởng các chế độ lắc khác nhau đến sinh trưởng và hoạt tính sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* TT01. Tiếp theo, cần nghiên cứu quy trình ứng dụng chế phẩm Biopro để xử lý phân chim cút trong quy mô trại thử nghiệm, cũng như tại chuồng chăn nuôi chim cút để bài được hoàn thiện hơn.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Đà Nẵng đã cấp kinh phí để thực hiện nghiên cứu này. Mã số của đề tài: B2019-DN03-45.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Văn Thao và cs., “Nghiên cứu chế phẩm vi sinh vật để sản xuất phân hữu cơ sinh học từ bã nấm và phân gà”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Tập 13, số 8, 2015, 1414-1423.
- [2] Dương Thị Hương và cs., “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm *Aspergillus oryzae* KZ13 kết hợp *Aspergillus awamori* HK1 có khả năng sinh protease cao trên môi trường bán rắn (ngô mảnh-bột mỳ)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, Tập 127, số 2A, 55-68.
- [3] Nguyễn Thiêt và cs., “Ảnh hưởng của nguyên liệu làm đệm lót và men balasa 01 lên sinh trưởng và môi trường chuồng nuôi gà tàu vàng giai đoạn từ 5 đến 12 tuần tuổi”, *Tạp chí khoa học Cần Thơ*, lần 44, 2016, 119-126.
- [4] Thi Van Doan, et al., “Isolation of *Bacillus licheniformis* TT01 to apply it in Compost Production from Quail Manure”, *Biotechnology*, Tom 34, Số 3, 2018, 53-58.
- [5] Shimizu M., Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56(8): 1266-1269.
- [6] TCVN 6168:2002. *Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo*.
- [7] TCVN 7304:2003. *Chế phẩm sinh học*.
- [8] Mohamed Ali Borgi, et al., “The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: Biochemical and molecular characterization”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:6161 DOI 10.1007/s00253-013-5421-9.
- [9] Nguyễn Văn Giang và cs., “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp phytase ngoại bào”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, Tập 13, Số 4, 2013, 558-564.
- [10] Raziqa Hadjidj, et al., “Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A”, *National library of Medicine*. Vol. 144, 2018, 1033-1040.
- [11] ElSORRA E. Idriss, et al., “Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect”, *Microbiology*, 148, 2002, 2097-2109.
- [12] Phan Thị Thu Mai, “Phân lập tuyển chọn vi sinh vật sinh enzyme phytase”, Luận văn Thạc sĩ ngành Vi sinh vật. Mã số: 604240, 2012.
- [13] QCVN 01-15:2010/BNNPTNT. *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia. Điều kiện trại chăn nuôi gia cầm an toàn sinh học*.
- [14] Trần Hồng Nhung, Nguyễn Kiều Băng Tâm, “Ứng dụng đệm lót sinh học trong cải thiện một số chỉ tiêu môi trường khu chăn nuôi gia cầm tại hai xã tỉnh Hà Nam”, *Tạp chí khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội*, tập 32, 2016, 296-300.
- [15] QCVN 02-32-1:2019/BNNPTNT. *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về sản phẩm xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản. Phần 1: Hóa chất, chế phẩm sinh học*.
- [16] Đỗ Thị Bích Thủy, “Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự thu nhận chế phẩm protease ngoại bào của *Bacillus amyloliquefacien* N1”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, tập 71, số 2, năm 2012, 279-290.