



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003711

(51) **C12N 1/14**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00524

(22) 25/11/2022

(45) 25/09/2024 438

(43) 27/02/2023 419

(73) Trường Đại học Kinh tế- Kỹ thuật công nghiệp (VN)

Số 456 Đường Minh Khai, Phường Vĩnh Tuy, Quận Hai Bà Trưng, Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Mai Hương (VN); Phạm Thị Thu Hoài (VN).

(54) **CHỦNG NẤM ASPERGILLUS TERREUS ĐL1 ĐƯỢC PHÂN LẬP VÀ CHẾ
PHẨM NẤM CỘNG SINH RỄ CÂY ĐÌNH LĂNG CHỨA CHỦNG NẤM NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1, chủng nấm này có khả năng cộng sinh rễ cây đình lăng (*Polyscias fruticosa* L.), có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch, có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy, và có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đình lăng thu được từ quy trình này để ứng dụng như chế phẩm nông dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh ứng dụng trong nông nghiệp, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình này ứng dụng như một loại phân bón nấm cộng sinh với rễ cây đinh lăng để cung cấp phospho hòa tan và chất kích thích sinh trưởng IAA cho cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong các nghiên cứu về lĩnh vực vi sinh vật học, việc nghiên cứu về tính đa dạng nhằm phát triển các chế phẩm vi sinh cho phép tăng cường hiệu quả đối với từng loại cây trồng đang được chú trọng.

Hiện tại trong việc trồng các cây dược liệu, vẫn sử dụng một số loại phân bón hóa học để thúc đẩy sinh trưởng nhằm tăng năng suất cây trồng. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân bón hóa học có thể gây nên các tác dụng không mong muốn đối với dược liệu thu được. Việc sử dụng phân bón vi sinh được xem là hướng phát triển bền vững, cho phép hạn chế được việc sử dụng phân bón hóa học mà còn góp phần tăng tính đa dạng sinh học trong vùng đất trồng cây và tạo nên mối quan hệ cộng sinh giữa các loài sinh vật có lợi, giảm thiểu tác hại của các tác nhân gây bệnh.

Nấm vùng rễ là một hình thức cộng sinh giữa nấm có lợi trong đất và rễ của thực vật bậc cao. Đây là quần hợp nấm - thực vật được biết nhiều nhất và đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của thực vật cũng như hệ sinh thái, hơn 90% các loài thực vật có quan hệ với nấm theo hình thức nấm rễ và phụ thuộc vào mối quan hệ này để tồn tại. Nấm sẽ cố định trong rễ nhận các sản phẩm từ quá trình quang hợp và phát triển mạng lưới hệ sợi nấm trong vùng bầu rễ để tạo thuận lợi cho việc lấy nước, chất dinh dưỡng như phospho, lưu huỳnh, nitơ và các vi chất dinh dưỡng khác trong đất. Hiện đã có nhiều nghiên cứu, phân lập các nấm cộng sinh, ví dụ trên cây ngô, cây cà chua, cây cam, cây cà phê,... (Đỗ Thị Xuân, 2016, Lê Thị Hoàng Yến, 2018; Nguyễn Thị Kim Liên, 2012; Nguyễn Văn Viên, 2012), tuy nhiên đối với cây dược liệu vẫn chưa có nghiên cứu phân lập, đặc biệt là các cây như bạch chỉ, đinh lăng và cỏ ngọt.

Nấm cộng sinh vùng rễ làm tăng diện tích bề mặt rễ để hút nước và chất dinh dưỡng (Hamel et al., 2007), việc sử dụng phân bón sinh học nấm rễ giúp rễ cây phân nhánh nhiều hơn, sợi nấm phát triển từ gốc xuống đất tạo điều kiện cho rễ cây tiếp xúc với diện tích bề mặt đất rộng hơn, do đó, tăng diện tích hấp thụ nước và chất dinh dưỡng của cây hệ thống rễ cây. Vì vậy, cây trồng có tổ chức rễ nấm sẽ cho hiệu quả hấp thụ các chất dinh dưỡng cao hơn như đạm, lân, kali, canxi, magie, kẽm, đồng; và cũng tăng khả năng chống hạn của cây trồng. Lợi ích của việc bón phân sinh học nấm rễ cho phép giúp cây trồng hấp phụ chất dinh dưỡng khó sử dụng, từ đó tăng năng suất cây trồng thông qua kích thích sự phát triển tự nhiên của cây, đồng thời cải thiện sức đề kháng của cây đối với bệnh hại, đặc biệt là đối với vi khuẩn gây bệnh, như bệnh thối rễ và thối cổ rễ. Sự liên kết của nấm rễ trong rễ cây sẽ giúp cây chống lại các bệnh thối rễ và thối cổ rễ do các loại nấm khác gây ra. Hơn nữa, có thể được sử dụng nấm rễ với các hóa chất nông nghiệp khác mà không bị ảnh hưởng đến hiệu quả.

Sự liên kết của nấm rễ không chỉ làm tăng lượng dinh dưỡng và nước sẵn có mà còn bảo vệ cây trồng khỏi nhiều loại stress phi sinh học (Evelin et al. 2009; Miransari 2010). Nấm rễ đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường sự phát triển của cây trồng bằng các cơ chế khác nhau. Việc khám phá các cơ chế thúc đẩy tăng trưởng của nấm rễ cộng sinh sẽ giúp tăng cường sự phát triển của thực vật bằng cách sử dụng các quần thể vi sinh vật này cùng nhau. Mặc dù một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc áp dụng kết hợp nấm rễ có thể là một cách tiếp cận có ý nghĩa cho nông nghiệp bền vững (Denton, 2007; Najafi et al., 2012; Ordookhani et al., 2010). Tuy vậy, vẫn còn một số khía cạnh cần được nghiên cứu thêm để thu được lợi ích tối đa trong điều kiện tăng trưởng thực vật được cải thiện từ quần thể tự nhiên này. Sự kết hợp cho nhận và ngược lại giữa rễ cây và nấm có ảnh hưởng lớn đến số lượng và chất lượng cây trồng. Chúng hình thành mối quan hệ cộng sinh với thực vật trên cạn cũng như dưới nước (Christie et al. 2004; Liu và Chen 2007; Willis et al. 2013).

Bên cạnh khả năng hỗ trợ sinh trưởng của cây chủ, nhiều nấm nội sinh còn có khả năng sinh tổng hợp nhiều chất kháng sinh, kháng nấm có tác dụng trong ức chế vi sinh vật gây bệnh. Năm 2003, Strobel và cộng sự đã nghiên cứu về chủng nấm nội sinh *Cryptosporiosis quercina* được ly trích từ cây *Tripterigeum wilfordii*, vì nấm này có thể sản xuất cryptocandin và cryptocin. Trong đó, cryptocandin kháng một số vi nấm gây bệnh cho người như *Candida albicans*, *Trichophyton* spp. và chống một số nấm

gây bệnh thực vật như *Sclerotinia sclerotiorum* và *Botrytis cinerea*. Cryptocin có tác dụng kháng *Pryriaria oryzae* và một số vi nấm gây bệnh thực vật (Germain, 1995). Cùng năm 2003, Taechowisan và Lumyong đã nghiên cứu về endophyt có hoạt tính kháng nấm từ rễ cây *Zingiber officinale* và *Alpinia galanga*. Năm 2019, Lê Thị Minh Thành và cộng sự đã tìm ra vi nấm *Penicillium* sp. LDL4.4 từ *Huperzia serrate* có khả năng sản xuất huperzin A có tác dụng là chất ức chế enzym acetylcholinesteraza, và được dùng trong điều trị bệnh Alzheimer. Kusari và cộng sự (2009), đã phân lập được *Fusarium solani* từ *Camptotheca acuminata* có khả năng sản xuất camptothecin và 2 dẫn xuất (9-methoxycamptothecin và 10-hydroxycamptothecin) có khả năng chống ung thư. Năm 2012, Agnes Joseph Aswathy và cộng sự đã nghiên cứu về endophyt trong cây Nghệ (*Curcuma longa*). Các chất dinh dưỡng trong thân rễ của cây nghệ là môi trường sống đa dạng cho các nhóm vi khuẩn khác nhau. Một số vi khuẩn nội sinh liên quan có thể thúc đẩy tăng trưởng. Trong nghiên cứu này, hai chủng endophyt *Paenibacillus* sp. được phân lập từ thân rễ củ nghệ và cả hai chủng đã được tìm thấy có khả năng để sản xuất IAA qua phân tích HPLC. Cùng năm này, Cui và cộng sự đã phát hiện vi nấm nội sinh *Fusarium oxysporum* phân lập từ cây *Ginkgo biloba* có khả năng sản xuất ginkgolid B dùng để điều trị bệnh tim mạch.

Nói chung, nấm rễ cộng sinh tăng cường sự phát triển của thực vật trong môi trường bằng cách cân bằng một số cơ chế như: điều chỉnh dinh dưỡng thực vật, sản xuất hormone, enzym chống oxy hóa và điều chỉnh một số quá trình sinh lý. Tuy nhiên, cũng có thể thấy rõ hiệu quả của các cơ chế này còn phụ thuộc vào mức độ của nấm rễ và sự liên kết của cây chủ cũng như một số yếu tố đất và thực vật.

Đối với các chất kích thích sinh trưởng như IAA, các nghiên cứu cho thấy chúng có khả năng được sinh tổng hợp từ vi sinh vật. Đây là một hướng hữu hiệu trong việc kích thích sinh trưởng thực vật bền vững. Akbari và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn được một số chủng *Azospirillum* spp. có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sinh trưởng cây lúa mì. Kết quả là sự nhiễm các chủng *Azospirillum* spp. đã làm tăng đường kính gốc lúa, chiều dài rễ, trọng lượng khô và số lượng lông rễ so với đối chứng (Akbari *et al.*, 2007). Naiman và cộng sự đã nghiên cứu gây nhiễm vi khuẩn *Azospirillum brasilens* và *Pseudomonas fluorescens* cho lúa mì. Kết quả cho thấy chiều cao cây tăng 12%, đường kính gốc thân tăng 40%, năng suất tăng 16% (Naiman *et al.*, 2009).

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy, hầu hết các vi khuẩn vùng rễ là các vi khuẩn Gram âm, không sinh bào tử nên việc bảo quản các chế phẩm chứa các chủng vi khuẩn tồn kém và ít hiệu quả. Chính vì vậy, một hướng đi trong sản xuất phân bón vi sinh là sử dụng nấm vùng rễ có khả năng sinh IAA và phân giải phospho khó tan là lựa chọn có thể thay thế cho phân bón vô cơ nhằm giúp tăng trưởng và năng suất cây (Ladha & Reddy, 2000). Bên cạnh đó, các vi sinh vật phân lập từ rễ các loại cây có khả năng sinh IAA như chất chuyển hóa thứ cấp giúp tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng cho cây, có vai trò quan trọng đối với sự nảy mầm, sinh trưởng và tăng năng suất cây trồng. Trong đó, nấm rễ còn thể hiện như một yếu tố kích thích cây sản sinh ra các chất có hoạt tính tự bảo vệ mình thường được gọi là các phytoalexin. Muraleedharan và cộng sự đã khảo sát vai trò của nấm rễ trên rễ cây *Trifolium repens* trong việc kích thích cây chủ sinh ra các chất có hoạt tính kích thích sinh trưởng của nấm rễ, chủng *Penicillium digitatum* và ức chế chủng gây bệnh *Rhizoctonia* sp. khi nuôi cây *in vitro* (Muraleedharan G.Nair et al., 1991).

Theo Phạm Thanh Hà và cộng sự (1999), 02 chủng nấm sợi *Aspergillus awamori* MN1 và *Penicillium cyaneofulvum* ĐT1 có khả năng phân giải phospho khó tan và nguồn dinh dưỡng KNO_3 , NaNO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường nuôi chủng MN1 để tạo khả năng phân giải lân cao. Ngoài ra, Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015) đã phân lập được 36 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường LGI từ các mẫu rễ cây khoai lang trồng ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tất cả các dòng vi khuẩn này đều có dạng hình que và có khả năng chuyển động. Thực hiện các phép thử sinh hóa đã xác định được các dòng KL9, KL11, KL39a, KL39b là các vi khuẩn nội sinh có đủ 3 đặc tính tốt là cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA. Khi giải trình tự đoạn gen 16S-DNA của 4 dòng vi khuẩn này, nhận diện được dòng KL9 có tỷ lệ đồng hình của đoạn gen 16S-DNA với loài *Burkholderia sprentiae* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16S-DNA của dòng KL39a với loài *Burkholderia ambifaria* và *Burkholderia vietnamiensis* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16S-rDNA của dòng KL39b với loài *Enterobacter ludwigii* và *Enterobacter cloacae* là 99%; tỷ lệ đồng hình đoạn gen 16SDNA của dòng KL11 với loài *Klebsiella pneumoniae* là 99%.

Kết quả nghiên cứu ở nhiều nơi cho thấy phân vi sinh phân giải phospho khó tan có thể nâng cao hiệu quả sử dụng lân khoáng lên 20-30% so với đối chứng, đồng thời

có tác dụng nâng cao năng suất cây trồng 5-10% tùy loại đất trồng. Việc sử dụng vi sinh vật phân giải lân có thể thay thế 30-50% lượng lân cần bón bằng quặng phosphorit với hàm lượng lân tổng số tương đương mà năng suất cây trồng không bị giảm sút. Ngoài ra, các vi sinh vật phân giải lân còn có khả năng sản sinh ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật hoặc các chất kháng sinh giúp cây trồng phát triển và chống chịu tốt hơn với các điều kiện bất lợi từ môi trường. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai (2005) đã nghiên cứu khả năng tiết enzym phosphatase của 10 chủng vi sinh vật hòa tan lân và nhận thấy rằng ngoài khả năng hòa tan lân khó tan các chủng vi sinh vật này có khả năng sản sinh enzym phosphat (chủ yếu là nấm sợi và vi khuẩn) enzym này đóng vai trò xúc tác không thể thiếu cho quá trình phân hủy sinh học các hợp chất hữu cơ chứa lân. Vũ Thúy Nga và cộng sự (2003) nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phosphate vô cơ khó tan của vi khuẩn *Bradyrhizobium*. Kết quả cho thấy chúng có khả năng tổng hợp IAA với hàm lượng 20-100 µg/ml môi trường nuôi cấy. Phạm Thanh Hà và Nguyễn Thị Phương Chi (1999) nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên khả năng phân giải phospho khó tan của hai chủng nấm sợi *Aspergillus awamori* MN1 và *Penicillium cyaneofulvum* ĐT1. Tác giả đã sử dụng 7 nguồn nitơ khác nhau, kết quả cho thấy KNO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường nuôi chủng MN1 tạo khả năng phân giải phosphate cao. Còn đối với chủng ĐT1 là NH_4Cl .

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy rằng các chủng vi khuẩn có khả năng tạo IAA như vi khuẩn thuộc chi *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* đã cho kết quả khả quan (Phạm Việt Cường, 2003; Lăng Ngọc Dậu, 2004; Vũ Thúy Nga, 2003).

Nhận thấy rằng ở nước ta, các nghiên cứu chủ yếu là tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn và một số ít nghiên cứu về khu hệ nấm cộng sinh trong rễ và đất, đặc biệt là về khả năng vừa phân giải phospho và vừa sinh chất kích thích sinh trưởng IAA của chúng còn rất hạn chế, trong khi đó, phospho là một nguyên tố cần thiết đối với cây trồng, tham gia vào việc hình thành màng tế bào, axit nucleic, làm tăng sự phát triển của rễ. Do đó, vẫn có nhu cầu về các chủng vi sinh có khả năng vừa phân giải phospho vừa sinh chất kích thích sinh trưởng IAA cũng như các chế phẩm vi sinh ổn định chứa các chủng này để sử dụng cho cây trồng góp phần giảm sự phụ thuộc vào phân bón vô cơ.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là nhằm phát triển chế phẩm nấm thay thế cho phân bón vô cơ, các tác giả đã phân lập thành công chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 từ rễ cây đinh lăng có đặc tính nông dụng hữu ích. Do đó, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng chứa bào tử của chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 này để cung cấp phospho hòa tan và chất kích thích sinh trưởng axit indol axetic (IAA) cho cây đinh lăng.

Theo mục đích thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL01, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm.

Theo mục đích thứ hai, giải pháp đề cập đến chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1 (theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 với lượng ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 1.255,04 ppm và tổng hợp IAA lên tới 40 ppm.

Chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 và chế phẩm nấm cộng sinh thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích để phát triển phân bón vi sinh đặc hiệu cho cây đinh lăng, giúp giảm sự phụ thuộc vào phân bón vô cơ, cho phép phát triển nền nông nghiệp bền vững.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 kết quả xác định hình thái của chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 phân lập được.

Hình 2 là kết quả xác định cây phả hệ của đoạn 16S dựa trên trình tự gen ITS của chủng nấm phân lập được (ĐL1).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ cụ thể, tuy nhiên các phương án và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích là rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích thu hẹp phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL01, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) hoạt hóa chủng giống gốc; b) thu hỗn hợp bào tử nấm; và c) thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng.

Trong bước hoạt hóa chủng giống gốc, tiến hành tan đông mẫu chủng giống nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 có số lưu giữ ĐL01 tại Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Chủng sau khi hoạt hóa này được cấy vào môi trường PDA thạch vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 7 ngày thu được chủng giống gốc nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 hoạt hóa ở dạng cụm khuẩn lạc màu đen.

Trong bước thu hỗn hợp bào tử nấm, tiến hành cấy chủng giống gốc *Aspergillus terreus* ĐL1 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ từ 25 đến 30°C sau từ 7 đến 10 ngày. Bào tử sản sinh được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm.

Để thu chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, tiến hành cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ từ 2 đến 5% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn. Giá thể rắn được sử dụng theo sáng chế để nuôi cấy chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội với tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng). Sau đó chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C. Duy trì điều kiện nuôi cấy trong điều kiện độ ẩm giá thể duy trì từ 40 đến 60%. Thời gian nuôi cấy được thực hiện trong khoảng từ 7 đến 14 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử. Sau khi sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%, nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ đinh lăng dạng bột.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1 (theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 đạt ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 1.255,04 ppm và tổng hợp IAA lên tới 40 ppm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Phân lập nấm cộng sinh từ rễ cây đinh lăng

Mẫu rễ và đất xung quanh rễ cây đinh lăng được thu thập từ huyện Hải Hậu, Nam Định và huyện Sapa, Lào Cai. Các mẫu được thu thập tại các độ sâu khác nhau từ mặt đất đến độ sâu 20 cm. Các mẫu đất và rễ này được cho vào túi nilon sạch, bao quản ở 4°C chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập.

Đối với mẫu rễ, rửa mẫu dưới vòi nước chảy trong 5 phút. Khi bề mặt mẫu đã ráo nước, ngâm mẫu trong cồn 70°C trong 1 phút. Để mẫu khô trong tủ cấy vô trùng. Dùng dụng cụ vô trùng cắt mẫu rễ thành những đoạn nhỏ dài từ 5 đến 10mm, đặt các đoạn rễ lên đĩa petri có môi trường phân lập (môi trường MMN: glucoza 10 g/l;

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,25 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0732 g/l; KH_2PO_4 0,5 g/l, CaCl_2 0,0662 g/l; NaCl 0,025 g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/l, sau khi khử trùng bổ sung kháng sinh streptomycin, ampicillin, tetracyclin hoặc cloramphenicol), sau đó chuyển vào tủ ấm 30°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ.

Đối với mẫu đất, lấy một lượng đất nhỏ đưa vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất đã vô trùng, lắc đều, dùng pipet hút dịch nổi vào đĩa petri có môi trường phân lập (môi trường MMN, như trên), sau đó chuyển vào tủ ấm 30°C trong thời gian từ 48 đến 72 giờ.

Chọn các sợi nấm mọc ra từ mô rễ cây trên các đĩa phân lập, cấy ria trên môi trường MMN để tinh sạch chủng. Lựa chọn các chủng sạch để cấy trên môi trường thạch nghiêng MMN hoặc môi trường PDA để lưu giữ trong môi trường thạch nghiêng cao malt 2% ở nhiệt độ từ 25 đến 27°C , kiểm tra hoạt tính phosphatase và chọn lọc theo hoạt tính mong muốn.

Chọn lọc các chủng có hoạt tính enzym phosphatase theo nguyên lý khuếch tán trên thạch bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường Pikovskaya (cao nấm men 5 g/l, dextroza 10 g/l, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/l, KCl 0,2 g/l, MgSO_4 0,1 g/l, MnSO_4 0,0001 g/l, FeSO_4 0,0001 g/l, agar 20 g/l, pH=6). Dịch nuôi cấy (chứa enzym thô) được đưa vào các lỗ thạch chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phương pháp đục lỗ thạch, chọn lọc những chủng có đường kính vòng phân giải lớn nhất.

Chọn lọc các chủng có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) bằng phương pháp định lượng phospho hòa tan trong dịch nuôi cấy theo TCVN 8565:2010. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy lắc trong môi trường Pikovskaya trong 7 -10 ngày. Dịch nuôi cấy được ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút, gạn lấy phần nước trong; Hàm lượng phospho trong dung dịch chiết được xác định bằng phương pháp trắc quang sau khi đã phân giải gốc xitrat. Đo màu xanh molipden do phản ứng của phospho với molybdat tạo thành phức đa dị vòng có màu xanh khi bị khử, từ đó suy ra hàm lượng phospho hòa tan trong mẫu. Chọn lọc các chủng có khả năng tích lũy phospho hòa tan lớn nhất.

Chọn lọc các chủng có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l, chọn lọc các chủng có khả năng tổng hợp IAA lớn nhất.

Kết quả chọn lọc từ mẫu rễ thu được 06 chủng ứng viên, từ mẫu đất thu được 05 chủng ứng viên. Thu được chủng nấm có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm và tích lũy P_2O_5 hòa tan đạt tới 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy và có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm. Chủng phân lập này được ký hiệu là ĐL1.

Chủng ĐL1 sau khi phân lập, làm sạch được nuôi trên môi trường khoai tây cho thấy đây là chủng nấm có khuẩn lạc lúc non có màu sữa trắng sau ngả dần sang màu hoa cau, khi già có màu phấn hồng. Sợi nấm màu trắng. Mặt trái khuẩn lạc có màu nâu, có hiện tượng tiết sắc tố ra thạch khi già. Cuống sinh bào tử hình thành từ sợi khí sinh hoặc hình thành từ đám đĩa sợi. Dạng điển hình, phân nhánh đơn giản (từ 2 đến 3 nhánh), kích thước cuống từ 10 đến 30 μm . Thể bình hình chai, thường từ 2 đến 4 thể bình/cuống, kích thước thể bình khoảng từ 10-17 x 1-2 μm . Bào tử hình elip hoặc hình cầu nhẵn, không có gai, kích thước 2,7 x 3,5 μm . Có sự xuất hiện thể quả trên khuẩn lạc, màu hồng phấn, kích thước đạt từ 100 đến 300 μm . Kết quả phân lập và xác định hình thái như được thể hiện trên Hình 1.

Ví dụ 2. Định danh và phân loại chủng nấm ĐL1 phân lập

Để xác định chính xác chủng nấm phân lập được, tiến hành chiết tách ADN tổng số bằng cách lấy hệ sợi nấm mốc, trộn trong 0,5 ml đệm (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS). Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, siêu âm 50% năng lượng 1 phút, nghỉ 1 phút. Bổ sung proteaza K 20 $\mu\text{g/ml}$, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Bổ sung 0,15 ml CH_3COOK . Ly tâm 10000 x g, thu dịch trong, kết tủa ADN bằng isopropanol tỉ lệ 1:1. Sau khi ly tâm ở 13000 x g trong 10 phút ở 4°C thu tủa và rửa tủa bằng EtOH 70%. Sau khi làm khô, tái hòa tan trong 50 μl H_2O PCR. Bảo quản ADN ở -20°C để làm khuôn PCR.

Để khuếch đại gen mã hóa 16S rADN, sử dụng cặp mồi đặc hiệu: ITS1/ITS4, với trình tự sau

ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

SEQ ID NO.2

ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

SEQ ID NO.3

Tiến hành PCR với thành phần bao gồm 5 mM dNTP: 1,5 μl ; 10X đệm Taq: 2,5 μl ; 5 μM ITS1: 1; 5 μM ITS4: 1; ADN khuôn: 1; Taq ADN pol: 0,3 μl ; H_2O : 17,5 μl .

Tổng thể tích phản ứng: 25 μ l. Chu trình nhiệt: (1) 95°C: 5 phút; (2) 95°C: 45 giây; (3) 59°C: 1 phút; (4) 72°C: 4-5 phút, lặp lại từ bước 2 đến 4: 35 chu kỳ; (5) 72°C: 5 phút.

Kết quả giải trình tự được đánh giá bằng thuật toán Clustal W của phần mềm MEGA-X. Cây phả hệ được xây dựng sử dụng thuật toán Maximum Likelihood của phần mềm MEGA-X với model Kimura 2-parameter và giá trị bootstrap là 1000. Các nhánh có giá trị hỗ trợ < 50% sẽ không được hiển thị trên cây phả hệ.

Kết quả giải trình tự đoạn gen ITS của chủng nấm sợi ĐL1 nêu trong SEQ ID NO.1 có kích thước 594 nucleotit. Kết quả so sánh trình tự gen với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotit-nucleotit đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Hoa Kỳ: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, cho thấy chủng nấm sợi ĐL1 phân lập được tương đồng với các chủng nấm thuộc chi *Aspergillus* (Hình 2). Cây phả hệ của chủng ĐL1 với các chủng nấm có độ tương đồng cao trên ngân hàng gen NCBI cho thấy chủng ĐL1 nằm trong nhánh với các chủng thuộc chi *Aspergillus*.

Như vậy, dựa vào các đặc điểm hình thái và kết quả giải trình tự gen ITS của chủng nấm sợi ĐL1, có thể xác định được chủng nấm ĐL1 phân lập được thuộc loài *Aspergillus terreus*. Chủng này được định danh là *Aspergillus terreus* ĐL1.

Chủng *Aspergillus terreus* ĐL1 thu được này được kiểm tra về hoạt tính enzym phosphatase cho thấy có đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm. Khả năng tích lũy P_2O_5 hòa tan đạt tới 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy. Khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm.

Ví dụ 3. Sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đình lăng

Tiến hành tan đông chủng giống nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 có số lưu giữ ĐL01 tại Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Tiếp đó cấy vào môi trường PDA thạch rắn vô trùng, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày thu chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 hoạt hóa.

Cấy chủng giống gốc *Aspergillus terreus* ĐL1 đã hoạt hóa vào môi trường thạch rắn. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 30°C trong 10 ngày. Bào tử được thu nhận và phân tán trong nước muối sinh lý đến mật độ khoảng 10^8 bào tử/ml thu được hỗn hợp bào tử nấm.

Cấy hỗn hợp bào tử nấm theo tỷ lệ 2% khối lượng vào bịch môi trường giá thể rắn. Bịch giá thể này được chuẩn bị trước bao gồm hỗn hợp thóc và bột ngô đã được hấp chín và để nguội, trong đó tỷ lệ thóc/bột ngô là 2/1 (theo khối lượng). Sau khi cấy, tiến hành chuyển bịch môi trường này vào nuôi cấy trong điều kiện tối, nhiệt độ từ 28 đến 35°C. Duy trì độ ẩm giá thể khoảng 60% trong 7 ngày để nấm phát triển hệ sợi và tạo bào tử. Sau khi hệ sợi phát triển và sinh bào tử, tiến hành sấy khô ở nhiệt độ khoảng 45°C đến độ ẩm khoảng 15%. Hỗn hợp được nghiền nhỏ, thu được chế phẩm nấm cộng sinh rễ định lăng dạng bột.

Hỗn hợp được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách pha loãng kiểm tra mật độ và khả năng phân hủy phospho khó tan và khả năng sinh tổng hợp theo phương pháp nêu trên. Kết quả cho thấy bào tử của chủng nấm *Aspergillus terreus* DL1 đạt khoảng 3×10^8 CFU/g và có khả năng phân giải phospho khó tan lên tới 1.255,04 ppm và tổng hợp IAA lên tới 40 ppm.

Ví dụ 4. Đánh giá khả năng cộng sinh của nấm trên rễ định lăng

Chế phẩm thu được từ Ví dụ 3 được thử nghiệm trên vườn trồng cây cây định lăng. Đất xung quanh vùng rễ cây định lăng từ các công thức đối chứng không sử dụng chế phẩm nấm rễ, CT1 sử dụng nấm rễ thương mại chứa các chủng *Aspergillus* sp. và *Bacillus subtilis*, CT2 sử dụng thu được từ Ví dụ 3 chứa *Aspergillus terreus* DL1. Định lăng sau khi trồng vào bầu 5 ngày sẽ được lấy mẫu đất quanh rễ để theo dõi thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm rễ.

Bảng 1 Thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm rễ tại vùng đất từ rễ trồng cây định lăng

Thời gian xuất hiện trở lại của các chủng nấm (ngày)	Đối chứng	CT1	CT2
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i> DL1
5	-	-	+
10	-	+	+
15	+	+	+

Chú thích: + ngày xuất hiện trở lại của chủng nấm
- chủng nấm chưa xuất hiện

Từ kết quả nêu trong bảng trên cho thấy rằng, chủng nấm rễ thuộc nghiên cứu ở công thức ĐC là công thức không sử dụng chế phẩm nấm thì đến ngày thứ 15 sau khi trồng cây giống vào bầu chủng nấm xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây. CT1 là công thức sử dụng chế phẩm nấm thương mại chứa các chủng *Bacillus subtilis* và

Trichoderma sp. thì 10 ngày sau khi trồng cây, 02 chủng nấm trên đã xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây. Cuối cùng là CT2 sử dụng chế phẩm theo giải pháp hữu ích thì sau 5 ngày gieo trồng đầu tiên thì tại vùng đất xung quanh rễ cây đã xuất hiện chủng *Aspergillus terreus* ĐL1 có khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phospho khó tan cộng sinh trên rễ đỉnh lã. Sau 10 ngày trồng cây thì 2 chủng nấm bắt đầu xuất hiện tại vùng đất quanh rễ cây.

Như vậy, có thể thấy rằng việc sử dụng chế phẩm nấm rễ sẽ tăng khả năng suất hiện trở lại sớm hơn của các chủng nấm vùng rễ do mật độ các chủng nấm này trong đất được bổ sung qua chế phẩm cao hơn do vậy thời gian hoạt hóa xuất hiện lại trong vùng đất quanh rễ cây cũng nhanh hơn so với công thức đối chứng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Bằng cách phân lập tuyển chọn được chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 có khả năng sinh tổng hợp IAA và phân giải phospho khó tan trên rễ cây đỉnh lã, giải pháp hữu ích cho thấy hiệu quả trong việc phát triển chế phẩm nấm cho phép cộng sinh trên cây đỉnh lã giúp cân bằng hệ vi sinh trên thực địa tăng được hiệu quả sử dụng phospho và tăng khả năng sinh trưởng của cây trồng.

Chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 phân lập được theo giải pháp hữu ích có tiềm năng phát triển thành chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đỉnh lã có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sự phát triển của cây trồng, đồng thời có khả năng hòa tan phospho khó tan cho cây trồng hấp phụ mở ra hướng phát triển bền vững, an toàn hiệu quả trong nông nghiệp, giúp góp phần phát triển ngành nông nghiệp giảm phụ thuộc vào phân bón hóa học.

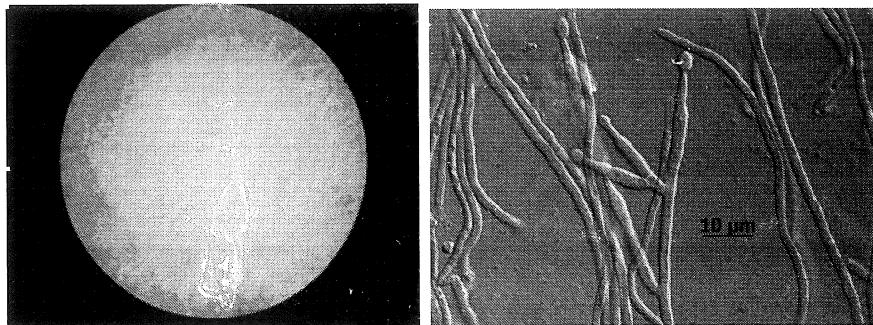
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập, trong đó chủng nấm này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và được lưu giữ đông sâu tại Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội với số lưu giữ ĐL01, khác biệt ở chỗ chủng nấm này:

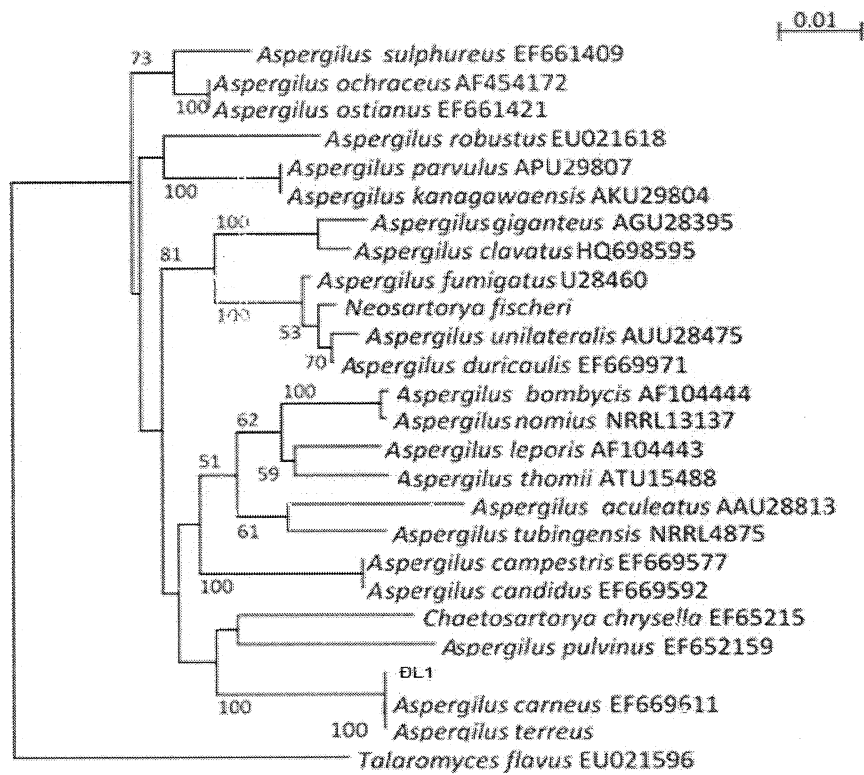
- có khả năng cộng sinh rễ cây đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L.);
- có hoạt tính enzym phosphatase với đường kính vòng phân giải trên môi trường $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lên tới 11 mm khi kiểm tra bằng phương pháp đục lỗ thạch;
- có khả năng phân giải phospho khó tan (P_2O_5) đạt tới nồng độ tích lũy 1.255,04 ppm sau từ 7 đến 10 ngày nuôi cấy; và
- có khả năng tổng hợp IAA khi nuôi cấy ở 30°C trong môi trường PDA lỏng bổ sung tryptophan nồng độ 2 g/l lên tới 40 ppm.

2. Chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng, trong đó chế phẩm này ở dạng bột độ ẩm khoảng 15% bao gồm giá thể thóc/bột ngô tỷ lệ 2/1 (theo khối lượng) chứa bào tử của chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 với lượng ít nhất 10^8 CFU/g và có khả năng phát triển cộng sinh với rễ cây đinh lăng để phân giải phospho khó tan lên tới 1.255,04 ppm và tổng hợp IAA lên tới 40 ppm.

HÌNH 1



HÌNH 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Kinh tế-Kỹ thuật công nghiệp

<120> Chủng nấm *Aspergillus terreus* ĐL1 được phân lập và chế phẩm nấm cộng sinh rễ cây đinh lăng thu được từ quy trình này

<130>

<160> 3

<170>

<210> 1

<211> 644

<212> ADN

<213> *Aspergillus terreus* ĐL1

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 1

GCATATCAAT	AAGCGGAGGA	AAAGAAACCA	ACCGGGATTG	CCTCAGTAAC	GGCGAGTGAA	60
GCGGCAAGAG	CTCAAATTTG	AAAGCTGGCT	CCTTCGGGGT	CCGCATTGTA	ATTTGCAGAG	120
GATGCTTCGG	GTGCAGCCCC	CGTCTAAGTG	CCCTGGAACG	GGCCGTCATA	GAGGGTGAGA	180
ATCCCGTATG	GGGCGGGGTG	TCTGCGTCCG	TGTGAAGCTC	CTTCGACGAG	TCGAGTTGTT	240
TGGGAATGCA	GCTCTAAATG	GGTGGTAAAT	TTCATCTAAA	GCTAAATACT	GGCCGGAGAC	300
CGATAGCGCA	CAAGTAGAGT	GATCGAAAGA	TGAAAAGCAC	TTTGAAAAGA	GAGTTAAACA	360
GCACGTGAAA	TTGTTGAAAG	GGAAGCGCTT	GCAACCAGAC	TCGCTCGCGG	GGTTCAGCCG	420
GGCTTCGGCC	CGGTGTACTT	CCCCGCGGGC	GGGCCAGCGT	CGGTTTGGGC	GGCCGGTCAA	480
AGGCCTCCGG	AATGTAGCGC	CCTTCGGGGC	GCCTTATAGC	CGGGGGTGCA	ATGCGGCCAG	540
CCTGGACCGA	GGAACGCGCT	TCGGCACGTG	TGATGACAGC	TGCGAGTGCG	TGTT	594

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220>

<223> Nhân tạo

<220>

<400> 2

TCCGTAGGTGAACCTGCGG

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi

<220>

<223> Nhân tạo

<220>

<400> 3

TCCTCCGCTTATTGATATGC