



(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)



2-0003785

(51) **C12N 1/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00300

(22) 12/07/2022

(45) 25/11/2024 440

(43) 26/09/2022 414

(73) Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Đặng Thị Cẩm Hà (VN); Nguyễn Thị Lan Anh (VN); Trần Thị Thu Hiền (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM GIỮ ẨM SINH HỌC CHỨA CÁC CHỦNG
VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP HỢP CHẤT POLYME NGOẠI
BÀO VÀ CHẾ PHẨM THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) và chế phẩm thu được từ quy trình này. Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) thu được từ quy trình theo sáng chế được ứng dụng trong quá trình canh tác nông nghiệp, tạo chất giữ ẩm có bản chất sinh học. Chế phẩm này không những giúp đất khô thiếu nước, có độ kết dính kém được cải thiện rõ rệt, kết quả cuối cùng là tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng, góp phần cải tạo đất tăng độ phì nhiêu của đất để phát triển nông nghiệp ở những khu vực chịu nhiều áp lực của các yếu tố không thuận lợi phi sinh học.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm và chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS). Chế phẩm giữ ẩm sinh học theo sáng chế chứa 3 chủng vi khuẩn được phân lập tại Việt Nam thuộc 2 chi *Bacillus* và *Serratia* có khả năng sinh tổng hợp EPS là chất giữ ẩm sinh học tiềm năng cao, giúp tạo điều kiện để vi sinh vật giữ ẩm này được các chất dinh dưỡng và chống lại những áp lực môi trường như nhiễm mặn, khô hạn và các bất lợi khác, qua đó làm tăng tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nước chiếm 70 - 90% trọng lượng tế bào nên có vai trò quan trọng cho cây phát triển thông qua các hoạt động sinh lý, sinh hóa. Nước cung cấp điện tử và proton để khử CO_2 để tạo nên các sản phẩm hữu cơ trong quang hợp, tham gia trực tiếp vào việc oxy hóa nguyên liệu hô hấp để giải phóng năng lượng, tham gia vào các phản ứng thủy phân tinh bột, protein, hòa tan khoáng chất lấy từ đất, vitamin, enzym, v.v. và vận chuyển đến tất cả các tế bào, các mô và cơ quan trong cơ thể. Nhu cầu nước của cây trồng thay đổi theo từng giai đoạn sinh trưởng, phát triển. Đối với đất, nước cũng là nhân tố điều hòa nhiệt độ và không khí, các tính chất cơ lý- cơ hóa của đất như độ chặt, tính kết dính, tính liên kết, tính trương, sự hòa tan các chất dinh dưỡng v.v. thay đổi do đó ảnh hưởng trực tiếp cây trồng.

Chất giữ ẩm là các vật liệu polyme có khả năng trương trong nước mà không bị hòa tan. Hiện nay chúng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực: Đệm thấm mồ hôi, vật liệu giữ nước, phụ gia chống thấm, công nghiệp xây dựng, công nghiệp mỹ phẩm, thực phẩm, bao gói, công nghiệp dược, y tế v.v. và một hướng ứng dụng đặc biệt quan trọng đang rất được quan tâm là làm chất giữ ẩm và cung cấp các nguyên tố vi lượng cho cây trồng. Hiệu quả của biện pháp này đã được khẳng định ở Mỹ, Canada, Trung Quốc từ những năm 80 thế kỷ trước, với việc cải tạo các vùng sa mạc, phủ xanh đồi núi trọc ở Mỹ, bón cho những cánh đồng cà phê ở Braxin, củ cải đường ở

Đức, v.v. kết quả là làm tăng năng suất cây trồng, giảm tỷ lệ chết ở thực vật, giảm sự chăm sóc cần thiết đối với cây trồng, tiết kiệm được thời gian và nước tưới.

Hợp chất polyme ngoại bào (extracellular polymeric substance - EPS) là các thành phần của các màng sinh học (biofilm) và có thể cải thiện khả năng cộng đồng màng sinh học giữ cả nước và các chất dinh dưỡng từ môi trường khi mà chúng bị hạn chế, thúc đẩy trao đổi chất bền vững trong các điều kiện khác thường. Bản chất của EPS là polyme sinh học được tổng hợp chủ yếu chứa polysacarit, protein, enzym, axit nucleic, lipid và những chất khác như axit humic (Wingender et al., 1999a,b; Flemming and Wingender, 2010). Do cấu trúc hóa học và đặc tính lý học của EPS cho vi sinh vật tạo ra nên chất giữ ẩm từ chúng bắt được các chất dinh dưỡng và chống lại những áp lực môi trường như nhiễm mặn, khô hạn và các bất lợi khác. Vi sinh vật sinh tổng hợp EPS bổ sung vào đất có các thành phần giúp chất nhày tăng kéo theo sự giảm hàng loạt các yếu tố bất lợi trong sản xuất nông nghiệp, làm tăng độ phì nhiêu bền vững cho đất, năng suất sản xuất nông nghiệp được cải thiện.

EPS được sinh tổng hợp bởi hàng loạt vi sinh vật, loại polyme ngậm nước cao thành phần của chúng chủ yếu là polysacarit, protein và ADN, sản phẩm của các chất nhầy này là sự xuất hiện rõ chủ yếu bởi các tín hiệu môi trường. Nghiên cứu sinh tổng hợp và vai trò của EPS từ rất nhiều chủng vi sinh vật đã chỉ ra rằng polysacarit trong các chất polyme sinh học này rất khác nhau về thành phần và cấu trúc.

EPS cơ bản tạo ra và cũng cho thể giới vi sinh vật trú ngụ và cung cấp môi trường lý tưởng cho các phản ứng hóa học. Có khả năng bắt các chất dinh dưỡng và chống lại những áp lực môi trường như nhiễm mặn và khô hạn. EPS vi sinh vật có thể tăng cường sự tích tụ của các hạt đất và làm lợi cho thực vật bởi giữ ẩm môi trường và gom các chất dinh dưỡng. Ngoài ra EPS có các đặc tính độc nhất như tương hợp sinh học đó là có khả năng keo hóa và làm dày lên. Vì vậy có khả năng áp dụng được EPS ở qui mô công nghiệp. Mặc dù vậy, hàng nhiều thập niên nghiên cứu về khả năng mở rộng lên qui mô lớn hơn nhưng chỉ có vài loại polyme được sử dụng ở các lĩnh vực công nghiệp khác nhau, đặc biệt trong nông nghiệp.

Trong tổng quan trình bày trên các tác giả đã cung cấp những kiến thức cập nhật về các chức năng sinh thái của các EPS do vi sinh vật tạo ra và áp dụng của chúng trong đất nông nghiệp để cải thiện cấu trúc hạt đất, tụ tập, độ ẩm, giữ chất dinh dưỡng và các yếu tố quan trọng cho cấu trúc đất, sức khỏe và độ phì nhiêu bền vững của đất

(Ohana Y. A. Costa, Jos M. Raaijmakers and Eiko E. Kuramae. 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front Microbiol* 23;9:1636).

Riêng sự tập hợp của đất, EPS tạo ra cũng giúp làm tăng độ thấm của nước, hấp phụ dinh dưỡng bởi rễ của cây cối, đất bền vững, độ phì nhiêu, sinh khối, hàm lượng diệp lục, độ dài của rễ của thân cây và bề mặt của lá do đó cũng giúp giữ các hoạt động trao đổi chất và sinh lý trong áp lực hạn hán. Vi sinh sinh tổng hợp EPS có thể giúp cho sự chịu đựng muối đến cây bởi kết nối các ion natri trong đất và ngăn các loại ion này đến thân, vì vậy làm giảm hấp thụ natri từ đất và làm tăng hấp thụ dinh dưỡng bởi hệ rễ. Màng sinh học tạo ra trong đất giàu muối làm tăng sự tồn tại của tế bào, cải thiện độ phì nhiêu của đất và tăng sinh trưởng và phát triển của cây trồng. EPS tạo ra bởi vi sinh vật đất có thể làm khoáng hóa sinh học các ion kim loại, vì vậy truyền sự chịu đựng kim loại đối với cây cối. Cuối cùng nhiệt độ cao có thể đồng thời tác động đến hiệu suất của sản xuất nông nghiệp bởi EPS làm giảm trao đổi chất của cây cối, sinh trưởng của giống non và nảy mầm của hạt. Vai trò của vi sinh vật tạo ra EPS sinh tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng công trình này trong điều hòa sinh trưởng và phát triển ở cây cối và làm giảm bớt điều kiện chống chịu phi sinh học. Cho nên các tác giả khuyến nghị khai thác vi sinh vật có tiềm năng sinh tổng hợp EPS cho quản lý các chiến lược chống chịu điều kiện không thuận lợi đối với sản xuất nông nghiệp (Neeta Bhagat, Meenu Raghav, Sonali Dubey, and Namita Bedi. 2021. Bacterial Exopolysaccharides: Insight into Their Role in Plant Abiotic Stress Tolerance. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. 31(8): 1045–1059).

Các chủng vi sinh vật có hiệu quả hơn trong chống chịu đối với các bất lợi phi sinh học so sánh với vi khuẩn tạo các chất kích thích sinh trưởng có nguồn gốc từ hệ sinh thái không bị bất lợi. Khi có mặt của các chủng vi sinh vật sinh EPS ảnh hưởng lên sinh trưởng lên thực vật như là vi khuẩn thực sự là các chất kích thích sinh học có tiềm năng tiềm năng để quản lý các chiến lược chống lại tác động của môi trường không thuận lợi cho sinh trưởng và phát triển của cây trồng (Schmid J, Sieber V, Rehm B. 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* 6: 496).

Vai trò của EPS là các loại polyme hòa tan trong nước có cấu trúc chủ yếu từ carbohydrat and protein. Các chất kích thích sinh trưởng sinh học có khả năng được vi sinh vật sinh tổng hợp EPS hoặc như là lớp nang liên kết với thành tế bào như là chất nhớt ngoại bào tiết ra xung quanh tế bào. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sản phẩm EPS tạo thành bởi vi sinh vật được điều khiển bởi tỷ lệ cacbon, cao đến thấp. EPS đóng vai trò trung tâm trong tập hợp của vi sinh vật và tạo màng sinh học. Để cho quan hệ giữa cây cối và vi sinh vật, bước đầu tiên nhất là sự tấn công rễ cây của vi khuẩn trong đất. Số lượng các nghiên cứu đã công bố rằng vi sinh vật ở rễ cây thuộc các chi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* có khả năng liên kết với rễ của cây. Hoạt tính keo hóa của vi sinh vật sinh EPS cũng khẳng định sự bảo vệ của tế bào vi khuẩn khỏi khô hạn. Các chủng vi khuẩn sinh EPS như các đại diện lần lượt là *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter vinelandii*, *Enterobacter cloacae*, *Xanthomonas* sp., và *Streptococcus mutans* tạo ra các chất kích thích sinh trưởng đóng vai trò chủ yếu trong tăng độ phì nhiêu của đất và vì vậy giúp giữ sự bền vững trong sản xuất nông nghiệp (Chandrima Bhattacharyya et al. 2020. Biofertilizers as substitute to commercial agrochemicals in Chapter 11 of Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation. Pesticides and Chemical Fertilizers. Book pp: 263-290).

Công trình này cung cấp cho chúng ta các thông tin và các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* với 3 chủng đã được nghiên cứu. Nói chung các chủng này có khả năng sinh tổng hợp EPS là loại vật liệu bản chất là lớp polyme có bản chất hóa-lý học riêng. Chúng có khả năng bảo vệ các tế bào vi khuẩn khỏi khô hạn, tạo ra màng film sinh học, thực ra là cải thiện các tế bào thay đổi trong các hốc sinh thái chứa khuẩn lạc đặc biệt. Ở hệ rễ của cây, EPS đã được biết đến lợi ích làm cải thiện khả năng chứa, giữ ẩm. Khi nuôi cấy bổ sung các chủng sinh tổng hợp EPS bởi các chủng thuộc chi *Bacillus* spp. vào đất kết quả là tập hợp dưới tác động bởi điều kiện khô cằn ở các giai đoạn nuôi cấy khác nhau. Công trình này cũng chỉ ra rằng khi bị điều kiện bất lợi do nước gây ra ảnh hưởng đến cấu tạo và tỷ lệ của các loại đường trong EPS được tạo ra bởi các chủng nghiên cứu là *Bacillus* spp. chủng HYD-B17, HYTAPB18 và RMPB44 ảnh hưởng đến áp lực chống chịu phi sinh học của các vi sinh vật (Sandhya Vardharajula, Ali Sk Z.2014. Exopolysaccharide production by drought tolerant

Ballilus spp. And effect on soil aggregation under drought stress.J Microbiol Biotech Food Sci/ Vardharajula and Ali Sk Z : 4 (1) 51-57).

Chất nhầy là cơ chất gelatin với trọng lượng phân tử cao được tạo ra bởi hầu hết thực vật có hàng loạt chức năng đối với cây và đất. Các công trình nghiên cứu về EPS và film sinh học cho chúng ta thấy chức năng chính của EPS đã được biết và đòi hỏi đối với hình thành màng film trong môi trường đất cũng cung cấp chất nhầy. Các chất nhầy này góp phần bảo vệ môi trường sống được tối ưu hóa cố định chất dinh dưỡng. Cho nên các tác giả cho rằng vai trò của chất nhầy như màng film được đã bị đánh giá thấp và cần phải được quan tâm ở mô hình khái niệm của bộ rễ cây trồng (Nazari M, Bickel S, Benard P, Mason-Jones K, Carminati A and Dippold MA (2022) Biogels in Soils: Plant Mucilage as a Biofilm Matrix That Shapes the Rhizosphere Microbial Habitat. Front. Plant Sci. 12:798992).

Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu liên quan đến các chủng vi sinh vật tạo EPS. Nuôi cấy chủng *Bacillus velezensis* KY471306 để tạo EPS đã bằng nguồn ri đường. cao nấm men và nhiệt độ nuôi cấy là các chỉ tiêu mang hiệu quả cao nhất chỉ ra rằng glucoza, mannoza và galactoza có trong thành phần của EPS có trọng lượng phân tử $1,14 \times 10^5$ D. Kết quả này đã nhận được khi phân tích bằng các kỹ thuật cập nhật nhất như FTIR, GC/MS (Saad A.M. Moghannem, Mohamed M.S. Farag, Amr M. Shehab, Mohamed S. Azab Exopolysaccharide production from *Bacillusvelezensis* KY471306 using statistical experimental design.2018. Brazil.J.Microb. 4 9: 452–462). Khi nghiên cứu genomon của chủng *Serratia* sp. ISTD04 sinh tổng hợp EPS đã phát hiện thấy các gen tham gia vào các quá trình này gồm 8 cụm giả định chịu trách nhiệm cho tạo ra các sản phẩm lipopolysaccharit, stewartan, emulsan, polysaccharit B, polysaccharit bao và axit-saccharit béo. Chủng *Serratia* sp. ISTD04 đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp EPS có hoạt tính keo tụ và đã có thể loại đến 80% màu cam acridine (acridine orange) và 95% tinh thể violet. Ngoài những khả năng trên nó còn giảm CO₂ cho nên chủng vi khuẩn này có thể khai thác ứng dụng trong tương lai (Manish Kumar, Madan Kumar, Ashok pandey & Indu shekhar thakur.2019. Genomic analysis of carbon dioxide sequestering bacterium for exopolysaccharides production. Scientific Reports 9:4270). Ngoài các chủng vi khuẩn tạo EPS phân lập từ đất khi được bổ sung vào đất giúp đất khô hạn hay bị tác động của các áp lực phi sinh học thì vi sinh vật phân lập từ biển lại tác dụng xấu đến ăn mòn kim loại. Ví dụ như

chủng *Bacillus cereus* GU812900 phân lập từ môi trường biển sinh EPS đã được chứng minh có liên quan đến ăn mòn kim loại (Bragadeeswaran.S, R. Jeevapriya, K. Prabhu, S. Sophia Rani, S. Priyadharsini and T. Balasubramanian. Exopolysaccharide production by *Bacillus cereus* GU812900, a fouling marine bacterium.2011. Centre of Advanced Study in Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Annamalai University, Parangipettai - 608 502, TN, India).

Ngoài tác dụng rất quan trọng trong sản xuất nông nghiệp ở các vùng đất bị áp lực của các yếu tố phi sinh học thì EPS được sinh tổng hợp bởi vi sinh vật cũng đóng vai trò rất lớn trong xử lý nước thải. Quá trình keo tụ sinh học giúp cho xử lý nước an toàn và mang lại hiệu quả trong các công trình xử lý liên quan nước ô nhiễm mặn và nước thải sinh hoạt (Jie Zeng, Jun-Min Gao, You-Peng Chen, PengYan, Yang Dong, Yu Shen, Jin-Song Guo, Ni Zeng & Peng Zhang. Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants. Scientific Reports | 6:26721). Nghiên cứu đã thông tin cho biết từ vùng đất khô cằn và nửa khô các tác giả đã phân lập và xác định các đặc tính sinh học của vi khuẩn sinh EPS bằng những chủng tạo được cả chất kích thích sinh trưởng sinh học. Đồng thời sử dụng hỗn hợp chủng để thử ứng dụng trồng ngô tại loại đất này. Kết quả đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn gram âm *Proteus penneri* (Pp1), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa2) và *Alcaligenes faecalis* (AF3) có khả năng sinh tổng hợp EPS. Áp lực hạn hán làm ảnh hưởng bất lợi lên sự sinh trưởng của mầm ngô giống. Khi hạt ngô được cố định cùng với hỗn hợp các chủng vi khuẩn sinh EPS thì chúng đã cải thiện độ ẩm, sinh khối, rễ, chiều dài của thân và lá của ngô thử nghiệm. Các thành phần khác trong cây ngô ở điều kiện hạn hán trồng cây có bổ sung chế phẩm vi khuẩn sinh EPS thì hàm lượng nước, protein, và đường (thông qua hàm lượng prolin) tăng. Còn hoạt tính enzym chống oxy hóa lại giảm. Chế phẩm vi khuẩn và EPS do chúng sinh tổng hợp đã cho thấy tiềm năng rất lớn để chống hạn hán so với chế phẩm chỉ chứa mỗi vi sinh vật sinh chất kích thích sinh trưởng sinh học (Hafsa Naseem and Asghari Bano. 1014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize Journal of Plant Interactions, 2014 Vol. 9, No. 1, 689–701).

Ở Việt Nam, trước tình hình khô hạn do biến đổi khí hậu, từ những năm 2002 – 2003, PGS. TS Nguyễn Cửu Khoa cùng nhóm nghiên cứu Viện Khoa học vật liệu ứng

dụng, Thành phố Hồ Chí Minh đã nghiên cứu thành công chất giữ ẩm “CH” được tổng hợp trên cơ sở các chất nền gồm axit acrylic, tinh bột, chất tạo liên kết ngang DEG-DAA và chất khơi mào tạo thành sản phẩm. Chất giữ ẩm “CH” được bón vào trong đất có tác dụng hút giữ nước với khối lượng từ 200 – 600 lần vật liệu nền để cung cấp nước từ từ cho cây trồng. Lượng chất giữ ẩm đối với cây ngắn ngày sử dụng CH03 hoặc CH06 với liều lượng khoảng từ 50 – 60 kg/ha. Đối với cây lâu năm và cây công nghiệp sử dụng chất giữ ẩm CH24 hoặc với liều lượng khoảng từ 30 – 50 kg/ha. Hiện chất giữ ẩm CH được sử dụng ở Gia Lai, Bình Phước, Đồng Nai, Ninh Thuận, Bình Thuận, Trà Vinh v.v. cho kết quả khả quan khi sử dụng với các loại cây trồng khác nhau. Chế tạo polyme siêu hấp thụ nước (AMS-1), trong đó sản phẩm polyme AMS-1 siêu hấp thụ nước dùng trong nhiều lĩnh vực như trồng cây trên bãi thải khai thác than tại mỏ Than Hà Tu – Quảng Ninh; trồng cây keo, bông, và một số cây phân xanh trên bãi thải khai thác than tại mỏ than núi Hồng, Thái Nguyên, trồng cây đồng mức chắn sóng biển tại Thừa Thiên Huế, ngoài ra còn áp dụng thành công tại nhiều địa phương trên nhiều loại cây trồng. Các loại cây trồng thử nghiệm hiệu quả tăng rõ rệt (về năng suất, tỷ lệ cây sống thường đạt 100%) so với không sử dụng polyme siêu hấp thụ nước.

Còn các chế phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật cũng được quan tâm nhiều hơn, trong đó phải kể đến Viện Công nghệ Sinh học (Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã nghiên cứu và sản xuất thành công chế phẩm sinh học giữ ẩm cho đất có tên là Lipomycin-M. Thành phần chính là của Lipomycin-M là chủng nấm men *Lipomyces* PT7.1 có khả năng tạo màng nhầy trong điều kiện đất khô hạn, giúp giảm thoát nước, duy trì độ ẩm cho đất trong điều kiện địa hình không có nước tưới thời gian dài, góp phần nâng cao tỷ lệ sống của cây trồng, hỗ trợ tốt cho việc phủ xanh đất trống đồi trọc. Đây được xem là một giải pháp cải tạo đất bền vững cho môi trường sinh thái. Viện Khoa học Kinh tế và Thủy lợi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng vật liệu giữ ẩm trên một số cây trồng ở Tây Nguyên, Tây Bắc đã thu được kết quả tốt, làm tăng năng suất và chất lượng nông sản.

Do chất giữ ẩm bên cạnh tác dụng giữ ẩm, cung cấp nước và độ ẩm phù hợp cho cây trồng phát triển còn có khả năng lưu giữ phân bón và vi lượng - là những dinh dưỡng không thể thiếu đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Ngoài ra là chỗ để các nhóm vi sinh vật chức năng khác có sẵn trong đất có điều kiện sinh trưởng và phát triển. Do đó, ở Việt Nam vẫn cần nhiều thêm chế phẩm là chất giữ ẩm

có nguồn gốc vi sinh vật để phối trộn với mùn hữu cơ (compost), than sinh học (biochar) sử dụng được các nguồn vi sinh vật phân lập được hướng đích tới sản xuất nông nghiệp hữu cơ.

Ở Việt Nam sự đa dạng của vi sinh vật rất lớn, đặc biệt là các vi sinh vật có tiềm năng sinh EPS. Tuy nhiên lĩnh vực nghiên cứu để sản xuất được chế phẩm vi sinh vật sinh chất giữ ẩm sinh học này chưa được quan tâm, đặc biệt là đối với những chủng vi khuẩn hay tổ hợp các chủng vi khuẩn có khả năng sinh EPS có nguồn gốc từ những vùng đất khô cằn. Do đó, việc có thể tận dụng được nguồn vi sinh vật phong phú của Việt Nam trong việc đưa ra các sản phẩm liên quan đến chất giữ ẩm sinh học có một ý nghĩa thực tiễn rất rõ ràng.

Hiện nay, vẫn có nhu cầu rất lớn đối với các chế phẩm giữ ẩm từ hỗn hợp vi khuẩn có nguồn gốc từ đất của các vùng nghèo dinh dưỡng, khô cằn và hạn hán có tiềm năng sinh EPS cao, giúp tận dụng được nguồn nguyên liệu vi sinh dồi dào của Việt Nam, cũng như góp phần phát triển nông nghiệp xanh, bền vững.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để đạt được mục đích nêu trên, khắc phục đất bị khô hạn, nghèo chất hữu cơ làm giảm năng suất sản lượng và chất lượng cây trồng, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm và chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS). Chế phẩm theo sáng chế chứa hỗn hợp 3 chủng vi khuẩn sinh tổng hợp EPS được phân lập từ đất khô cằn ở tỉnh Bình Phước và Bình Thuận, lần lượt là *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07. Đây là các chủng vi khuẩn được phân lập và định danh dựa trên việc xác định một phần gen mã hóa 16S.rARN, không trùng với các chủng đã biết được công bố trước đó, là các chủng mới do các tác giả tự phân lập, sàng lọc và được lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học. Các chủng *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07 được kết hợp với mùn hữu cơ (compost) và than sinh học (biochar) để tạo ra chế phẩm theo sáng chế, chế phẩm này không những giúp đất khô thiếu nước, có độ kết dính kém được cải thiện rõ rệt, kết quả cuối cùng là tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng, góp phần cải tạo đất tăng độ phì nhiêu của đất để phát triển nông nghiệp ở những khu vực chịu nhiều áp lực của các yếu tố không thuận lợi phi sinh học.

Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) theo sáng chế có thành phần như sau (tính theo khối lượng):

Than sinh học: 20%;

Mùn hữu cơ: 60%; và

Dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS: 20%;

Trong đó, dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS là dịch nuôi cấy các chủng *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh các khuẩn lạc BP06, BRBT1.5 và BMTM07 tạo màu nâu đến đen có khả năng sinh chất giữ ẩm sinh học trên môi trường thạch congo đỏ (CRA).

Hình 2 là cây phát sinh chủng loại của 3 chủng BP06, BRBT1.5 và BMTM07.

Hình 3 là biểu đồ thể hiện chiều cao của cây (A) và chiều dài lá (B) của cây keo ở các công thức trồng khác nhau tại các thời điểm khác nhau.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện độ tăng chiều cao của cây (A) và độ tăng chiều dài lá (B) của cây keo ở các công thức trồng khác nhau tại các thời điểm khác nhau.

Hình 5 là hình thực tế thể hiện sự sinh trưởng và phát triển của cây keo ở các công thức khác nhau sau 45 ngày trồng.

Hình 6 là hình thực tế thể hiện sự sinh trưởng và phát triển của cây keo ở các công thức khác nhau sau 80 ngày trồng thông qua độ lớn của bộ rễ.

Hình 7 là hình thực tế thể hiện nốt sần trên cây keo ở các công thức khác nhau sau 80 ngày trồng.

Hình 8 là hình thực tế thể hiện chiều cao của cây keo sau 80 ngày trồng ở các công thức khác nhau (CT1: 45 cm, CT2: 25 cm, CT3: 35 cm, CT4: 30 cm).

Hình 9 là hình ảnh thể hiện EPS sau khi sấy khô ở các công thức khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm và chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS). Chế phẩm theo sáng chế chứa hỗn hợp 3 chủng vi khuẩn sinh tổng hợp EPS được phân lập từ đất khô cằn ở tỉnh Bình Phước và Bình Thuận, lần lượt là *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07. Đây là các chủng vi khuẩn mới do các tác giả tự phân lập, sàng lọc và được

lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Các chủng vi khuẩn được phân lập bằng cách sử dụng môi trường hiếu khí tổng số. Thành phần của môi trường này có thành phần (g/l) như sau: pepton 5; glucoza 1; NaCl 5; cao thịt 3; nuôi lắc với độ pH 6,8, ở 37°C , trong thời gian từ 4-5 ngày. Sử dụng phương pháp thạch đỏ Congo (Congo red agar - CRA) để định tính, để phát hiện các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất giữ ẩm sinh học (EPS), dựa vào sự thay đổi màu sắc của các khuẩn lạc được cấy trên môi trường CRA, được mô tả bởi Freeman et al (Freeman et al., 1989). Các nghiên cứu đã chứng minh rằng phương pháp này rẻ và dễ thực hiện và tiêu chí đánh giá dựa trên phân tích trực quan về màu sắc của khuẩn lạc phát triển trên thạch (Hassan et al., 2011; Liberto et al., 2009). Môi trường thạch công đỏ (CRA) được sử dụng làm môi trường sàng lọc vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS có thành phần như sau (g/l): 30g canh trường đậu nành trypton (Tryptic Soy Broth, NutriSelect® Plus, Sigma-Aldrich, Germany), 0,8 g Congo đỏ (Sigma-Aldrich, Germany), 36 g sacaroza và 16 g aga. Sau thời gian ủ 24, 48, 72 giờ ở 37°C , hình thái của các khuẩn lạc trải qua các màu khác nhau để xác định có phải là chủng có khả năng tạo giữ ẩm sinh học hay không. Các chủng vi khuẩn có khả năng sản xuất giữ ẩm sinh học sẽ tạo thành các khuẩn lạc màu đen, trong khi các chủng không tạo giữ ẩm sinh học sẽ tạo thành khuẩn lạc màu đỏ trên môi trường CRA. Sau khi thực hiện phân lập và sàng lọc, thu được 3 chủng được kí hiệu là BP06, BRBT1.5 và BMTM07 (Hình 1).

Để xác định chính xác 3 chủng vi khuẩn phân lập được, tiến hành phân loại vi khuẩn bằng cách xác định trình tự gen đoạn 16S rARN và so sánh trình tự thu được với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank).

ADN tổng số của các chủng vi khuẩn thu được được tách chiết theo các bước sau:

- Thu sinh khối vi khuẩn vào ống eppendorf bằng cách ly tâm 6000vòng/phút trong 10 phút ở 4°C ;
- Bổ sung dH_2O để rửa sinh khối, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C ;
- Bổ sung 400 μl dung dịch đệm phân giải, vortex đều;
- Bổ sung 50 μl lysozym 10 mg/ml, ủ ở 37°C trong 30-45 phút;

- Bổ sung 20 µl proteinaza K ủ ở 56°C trong 1 giờ;
- Bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 (v:v), vortex, ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C;
- Hút phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf mới;
- Bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C qua đêm;
- Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa;
- Bổ sung etanol 100% tỷ lệ 1:1 (v:v);
- Ly tâm 12000vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa, rửa tiếp bằng etanol 70%;
- Làm khô tủa; và
- Hòa trong TE, bảo quản ở 4°C.
- Sau khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn gen mã hoá 16S rARN bằng kỹ thuật PCR. Đoạn gen mã hóa 16S rARN được khuếch đại bằng cặp mồi 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') và 1492R (5' – TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T – 3') (Baker et al., 2003; Bourne et al., 2005).
- Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1,5%, nhuộm bản gel với EtBr và quan sát dưới ánh sáng của đèn tử ngoại.

Thành phần phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1 - Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích	Nồng độ cuối
Đệm Taq 10X	2,5	1X
dNTPs 2 mM	2,5	0,2 mM
MgSO ₄ 20 mM	2,5	2 mM
Mồi 27F 10 µM	1	0,4 µM
Mồi 1492R 10 µM	1	0,4 µM
Taq Polymeraza 5 U/ µl	0,2	1 U/25 µl
ADN khuôn	1	
ddH ₂ O	14,3	
Tổng thể tích	25 µl	

Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 - Chu kì luân nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/5 phút	1
Biến tính	94°C/1 phút	30
Gắn mồi	55°C/1 phút	
Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút 30 giây	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
	4 °C	Giữ ổn định

Sau đó, trình tự gen mã hoá đoạn 16S rARN thu được sau phản ứng PCR được xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotit tự động ABI3730XL. Trình tự các đoạn gen được xử lý bằng phần mềm FinchTV và so sánh với các chủng được công bố trên GenBank (NCBI database). Phần mềm MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2013) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn này và kết quả thể hiện ở Hình 2.

So sánh với trình tự gen 16S rARN của các chủng vi khuẩn đã được công bố trên GenBank cho thấy chủng vi khuẩn BNTM07, BP06 và BRBT1.5 lần lượt có độ tương đồng cao 98%, 99% và 99% với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Serratia*, chi *Bacillus* và chi *Bacillus*. Trình tự gen mã hóa 16S rARN của chủng BMTM07 có mức tương đồng cao 98% với chủng vi khuẩn *Serratia marcescens* strain RS (MN396719.1), *Serratia nementodiphia* strain NPKC 3 33. Tuy nhiên các chủng có độ tương đồng cao với chủng *Serratia* sp.BNTM07 này lại không sinh EPS giống như chủng của Việt Nam. Trình tự gen mã hóa 16S rARN của các chủng vi khuẩn BP06 lần lượt có độ tương đồng cao 99% với chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* strain DFT-5 (KY750689.1), *Bacillus cereus* strain G và vi khuẩn *Bacillus subtilis* strain GAU8-1, *Bacillus subtilis* strain 7, *Bacillus* sp.PVL01. Còn đối với chủng *Bacillus* sp BRBT1.5 có độ tương đồng tuy cao 99% so với chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* GAU8-1, *Bacillus velenzensis* strain KLT4, *Bacillus subillis* strain RO-14 và *Bacillus subtilis* strain AM2. Tuy nhiên các chủng gần gũi nhất có trình tự tương đồng cao với với 3 chủng phân lập được không sinh EPS với các đặc tính như các chủng phân lập và tạo chế

phẩm giữ ẩm từ đất khô cần phân lập tại Bình Phước và Bình Thuận của Việt Nam (vị trí trên cây phát sinh chủng loài). Vì vậy, các chủng này được đặt tên lần lượt là *Serratia* sp. BNTM07, *Bacillus* sp. BP01 và *Bacillus* sp. BRBT1.5. Các chủng này được lưu giữ trong 50% glyxerol ở -80°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Quy trình sản xuất chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị giống vi khuẩn cấp 1:

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số thạch có thành phần (g/l) như sau: pepton 5; glucoza 1; NaCl 5; cao thịt 3; aga 16; với độ pH 6,8.

Chủng giống trong các ống giống của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp.BNTM07, không tạp nhiễm, bảo quản ở nhiệt độ là 5°C , được cấy chuyển từ ống nghiệm sang 3 đĩa petri riêng biệt chứa môi trường hiếu khí tổng số thạch, nuôi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 ngày, thu khuẩn lạc của mỗi chủng là giống cấp I.

(ii) Thu giống vi khuẩn sinh EPS trên môi trường hiếu khí tổng số lỏng:

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số lỏng có thành phần (g/l) như sau: pepton 3 g, NaCl 5 g, cao thịt 3 g, độ pH = 6,8, khử trùng ở 121°C , 1atm (101325 Pa) trong thời gian 15 phút.

Đưa môi trường vào trong các bình tam giác, các chủng vi khuẩn sinh EPS được cấy vào bình tam giác riêng biệt để nuôi cấy trong điều kiện lắc ở 200 vòng/phút trong thời gian 48 giờ, sau đó thu dịch đặc sau khi ly tâm vô trùng làm giống để nuôi cấy trên môi trường rắn.

(iii) Nuôi cấy trên môi trường rắn:

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy rắn để nuôi 3 chủng vi khuẩn có thành phần tính theo khối lượng gồm cám gạo 25%, bột đậu tương 10%, lõi ngô 10%, bã đậu 40%, than sinh học (biochar) 9%, rỉ đường 3%, KCl 1%, NaNO_3 1% và KH_2PO_4 1%. Cấy giống từng chủng vi khuẩn như đã thu được từ bước (ii) vào môi trường nuôi cấy rắn với độ ẩm 50%, tỷ lệ giống 1% (khối lượng/thể tích), nuôi ở nhiệt độ 37°C .

Sau thời gian mỗi 12 giờ nuôi cấy, kiểm tra độ ẩm môi trường nuôi cấy, để đạt độ ẩm trong khoảng 53-55%, đảo trộn thật đều vật liệu nuôi cấy. Sau 7 ngày nuôi vi khuẩn, thu nhận sinh khối rắn;

Để kiểm tra chất lượng của sinh khối rắn thu được, có thể thực hiện xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp gần đúng có thể nhất MPN/ml (Most probable number), kiểm tra bào tử dưới kính hiển vi quang học sau khi nhuộm.

(iv) Thu nhận sinh khối vi khuẩn sinh EPS:

Sinh khối rắn thu được sau khi nuôi cấy 7 ngày của mỗi chủng vi khuẩn được đổ ra khay riêng, mỗi khay chứa khoảng 2 kg, bóp toại sinh khối ra và đưa vào tủ nuôi có nhiệt độ dưới 37-38 °C để sấy trong thời gian 3 ngày. Sau khi sấy sinh khối có độ ẩm của hỗn hợp vi khuẩn đạt khoảng 10%.

Sản phẩm vi khuẩn sau khi sấy khô đưa vào máy nghiền có kích cỡ lưới nghiền là 0,5mm, thu được sinh khối của 3 chủng vi khuẩn.

Trộn sinh khối của 3 chủng vi khuẩn theo tỉ lệ khối lượng *Bacillus* sp.BP06:*Bacillus* sp. BRBT1.5:*Serratia* sp.BNTM07 là 1:1:1, thu được sinh khối vi khuẩn sinh EPS.

(v) Phối trộn thu chế phẩm:

Phối trộn sinh khối vi khuẩn sinh EPS thu được từ bước (iv) với than sinh học (biochar), mùn hữu cơ (compost) theo tỷ lệ khối lượng than sinh học:mùn hữu cơ:sinh khối vi khuẩn sinh EPS là 1:3:1, thu được chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS).

Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) theo sáng chế có thành phần như sau (tính theo khối lượng):

Than sinh học: 20%;

Mùn hữu cơ: 60%; và

Dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS: 20%;

Trong đó, dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS là dịch nuôi cấy các chủng *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07.

Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp EPS thu được có số lượng vi khuẩn sinh EPS ít nhất là 10^6 MPN/g.

Chế phẩm thu được này có thể được bảo quản lâu dài sau khi đóng gói. Việc đóng gói có thể được thực hiện bằng cách cân chế phẩm thủ được và đựng trong túi zip, túi dứa,... Chế phẩm sau khi đóng gói được cho vào thùng và để vào kho bảo quản ở nhiệt độ $28-32^{\circ}\text{C}$, phòng rộng rãi, thoáng mát, không ẩm ướt để đợi đưa vào sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS)

Các ống giống của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp.BNTM07 được lưu giữ tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học được chuyển sang tủ giữ ở nhiệt độ 5°C để làm chủng giống.

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số thạch có thành phần (g/l) như sau: pepton 5; glucoza 1; NaCl 5; cao thịt 3; aga 16; với độ pH 6,8.

Chủng giống trong các ống giống của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp.BNTM07, không tạp nhiễm, bảo quản ở nhiệt độ là 5°C , được cấy chuyển từ ống nghiệm sang 3 đĩa petri riêng biệt chứa môi trường hiếu khí tổng số thạch, nuôi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 ngày, thu khuẩn lạc của mỗi chủng là giống cấp I.

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số lỏng có thành phần (g/l) như sau: pepton 3 g, NaCl 5 g, cao thịt 3 g, độ pH = 6,8, khử trùng ở 121°C , 1atm (101325 Pa) trong thời gian 15 phút.

Đưa môi trường vào trong các bình tam giác, các chủng vi khuẩn sinh EPS được cấy vào bình tam giác riêng biệt để nuôi cấy trong điều kiện lắc ở 200 vòng/phút trong thời gian 48 giờ, sau đó thu dịch đặc sau khi ly tâm vô trùng làm giống để nuôi cấy trên môi trường rắn. Mật độ vi sinh vật trong dịch nuôi cấy của mỗi chủng đạt $10^9 - 10^{10}$ MPN/ml sản phẩm.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy rắn để nuôi 3 chủng vi khuẩn có thành phần tính theo khối lượng gồm cám gạo 25%, bột đậu tương 10%, lõi ngô 10%, bã đậu 40%, than sinh học (biochar) 9%, rỉ đường 3%, KCl 1%, NaNO_3 1% và KH_2PO_4 1%. Cấy giống từng chủng vi khuẩn như đã thu được vào môi trường nuôi cấy rắn với độ ẩm 50%, tỷ lệ giống 1% (khối lượng), nuôi ở nhiệt độ 37°C .

Sau thời gian mỗi 12 giờ nuôi cấy, kiểm tra độ ẩm môi trường nuôi cấy, để đạt độ ẩm trong khoảng 53-55%, đảo trộn thật đều vật liệu nuôi cấy. Sau 7 ngày nuôi vi khuẩn, thu nhận sinh khối rắn;

Sinh khối rắn thu được sau khi nuôi cấy 7 ngày của mỗi chủng vi khuẩn được đổ ra khay riêng, mỗi khay chứa khoảng 2 kg, bóp toại sinh khối ra và đưa vào tủ nuôi có nhiệt độ dưới $37-38^\circ\text{C}$ để sấy trong thời gian 3 ngày. Sau khi sấy sinh khối có độ ẩm của hỗn hợp vi khuẩn đạt khoảng 10%.

Sản phẩm vi khuẩn sau khi sấy khô đưa vào máy nghiền có kích cỡ lưới nghiền là 0,5mm, thu được sinh khối của 3 chủng vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn đạt $10^{10}-10^{12}$ MPN/g.

Trộn sinh khối của 3 chủng vi khuẩn theo tỉ lệ khối lượng *Bacillus* sp.BP06:*Bacillus* sp. BRBT1.5:*Serratia* sp.BNTM07 là 1:1:1, thu được sinh khối vi khuẩn sinh EPS.

Phối trộn sinh khối vi khuẩn sinh EPS thu được với than sinh học (biochar), mùn hữu cơ (compost) theo tỷ lệ khối lượng than sinh học: mùn hữu cơ: sinh khối vi khuẩn sinh EPS là 1:3:1, thu được chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS). Mật độ vi khuẩn sinh tổng hợp EPS trong chế phẩm đạt khoảng 10^6 MPN/g.

Ví dụ 2: Đánh giá hiệu quả của chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS)

Chế phẩm thu được từ Ví dụ 1 (Chế phẩm EPS) được sử dụng trong thử nghiệm đánh giá hiệu quả.

Thử nghiệm đã được tiến hành trên đối tượng cây keo giống trồng trong đất khô, thiếu dinh dưỡng của Tánh Linh, Bình Thuận.

Đất được xới toại xộp xong chia thành 4 luống với 4 công thức khác nhau. Luống 1 và 2 trồng 200 cây, luống 3 và 4 trồng 140 cây. Công thức CT2 là mẫu đất đối chứng

không bổ sung than sinh học (biochar), mùn hữu cơ (compost) hay chế phẩm EPS, trong khi các công thức CT1, CT3 và CT4 phối trộn gồm than sinh học (biochar), mùn hữu cơ (compost) hay chế phẩm EPS với tỉ lệ khác nhau như trong Bảng 3. Đối với luống CT1, CT3 và CT4 thì trước khi trồng cây, rải 1 lớp hỗn hợp đã phối trộn có thành phần như Bảng 3 trên đất, sau đó đào luống và rải 1 lớp hỗn hợp nữa lên và tưới nước, xé bầu đặt cây xuống và lấp đất lại. Đối với luống CT2 thì chỉ đào luống tưới nước xé bầu và đặt cây lấp đất lại. Sau khi trồng, đánh dấu các ô theo từng công thức.

Bảng 3: Công thức bón chất giữ ẩm vào đất khô cần để trồng cây keo giống

Công thức	Tỷ lệ vật liệu được trộn với đất (%)
CT1	Đất + biochar + compost + sinh khối vi khuẩn sinh EPS = 50:10:30:10 (Tương đương Đất:Chế phẩm EPS = 1:1)
CT2	Đất (đối chứng)
CT3	Đất + biochar + compost = 60:10:30
CT4	Đất + compost = 70:30

Để đánh giá hiệu quả, tiến hành xác định các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây vào thời điểm khác nhau. Các chỉ tiêu sinh trưởng, năng suất (chiều cao cây, chiều dài của lá) được xác định bằng phương pháp đo đếm. Kết quả về chiều cao trung bình của cây, chiều dài trung bình của lá và độ tăng chiều cao trung bình của cây và độ tăng chiều dài trung bình của lá so với cây trồng sau 45 ngày từ các công thức khác nhau được trình bày trong Hình 3. Chiều cao trung bình của cây của các công thức dao động trong khoảng 36-47 cm (Hình 3A), chiều dài của lá từ 10-13 cm (Hình 3B) phụ thuộc vào các công thức khác nhau và các thời điểm đo khác nhau.

Sử dụng CT1 trong trồng keo giống trên đất giúp cây keo có chiều cao cây, chiều dài lá tốt hơn so với công thức đối chứng (CT2), công thức không bổ sung sinh khối vi khuẩn sinh EPS (CT3) và công thức không bổ sung cả sinh khối vi khuẩn sinh EPS và biochar (CT4). Kết quả Hình 4 cho thấy, công thức 1 (CT1) chế phẩm EPS cho thấy độ tăng chiều cao cây và độ tăng chiều dài lá cao nhất sau 45 ngày trồng, trong khi công thức đối chứng (CT2) có độ tăng chiều cao cây và độ tăng chiều dài lá thấp nhất trong các công thức, hầu như các cây không thấy có sự phát triển sau 45 ngày trồng và cây bị chết nhiều nhất (50 cây, chiếm 0,25% tổng số cây được trồng). Ở công

thức 1, chiều dài thân cây tốt, chiều dài lá tốt, số lá nhiều. Chiều cao trung bình của cây và chiều dài trung bình của lá cây lần lượt đạt 47 và 13 cm sau 45 ngày trồng. Cây xanh tốt, cao hơn và lá cây xanh nhất, cây có sức sống tốt so với các công thức còn lại, do đó số cây chết ít nhất (2 cây, chiếm tỉ lệ 0,01% so với tổng số cây được trồng). Ở công thức này không những chiều dài vượt trội mà nốt sần cũng nhiều cây có và số lượng cao nhất so với các công thức còn lại. Rễ cây cũng dài, nhiều và khỏe hơn các công thức khác. Như vậy việc bổ sung chế phẩm EPS vào đất cho hiệu suất trồng cây keo cao hơn so với khi không bổ sung chế phẩm EPS. Hình ảnh thực tế sau 45 ngày của thử nghiệm được thể hiện trên Hình 5 và bảng tổng hợp các thông số sinh trưởng của cây keo giống sau 45 ngày được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Sinh trưởng của cây keo giống sau 45 ngày

Công thức	Chiều cao trung bình của cây			Chiều dài trung bình của lá cây			Nhận xét (các giá trị trung bình)
	16 ngày	30 ngày	45 ngày	16 ngày	30 ngày	45 ngày	
CT1 -Số cây đã trồng: 200 -Số cây chết: 2 (0,01%)	40,4	42,8	47,1	11,2	11,4	13,1	Số cây chết ít nhất. Chiều dài thân, cây, lá dài nhất. Rễ dài nhiều khỏe.
CT2 -Số cây đã trồng: 200 -Số cây chết: 50 (0,25%)	35,8	36,6	38,6	10,1	10,1	10,1	Số cây chết nhiều nhất; Chiều dài thân, cây ngắn, số lá ít. Rễ ít, ngắn nhất.
CT3 -Số cây đã trồng: 140 --Số cây chết: 6	38,4	39,6	42,4	10,1	10,1	11,9	Số cây chết nhiều hơn CT1 và ít hơn nhiều so với CT2 Chiều dài thân,

(0,04%)							cây trung bình, số lá trung bình. Rễ dài nhưng ngắn và ít hơn CT1.
CT4 -Số cây đã trồng: 140 --Số cây chết:10 (0,07%)	36,8	37,8	40,6	10,1	10,4	11,6	Số cây chết nhiều hơn CT1 và CT3; Chiều dài thân, cây trung bình, số lá trung bình. Rễ ngắn hơn CT1 và CT3.

Tiếp tục thực hiện thử nghiệm và xác định các thông số sau 80 ngày, trong đó xác định thêm thông số liên quan đến độ lớn của bộ rễ và số lượng nốt sần, chỉ đếm số lượng nốt sần có đường kính lớn hơn 1-2,5 mm. Kết quả được thể hiện trên các Hình 6, 7, 8 và Bảng 5.

Nhận xét tổng quát sau 80 ngày:

- CT1: Chiều dài thân cây tốt, chiều dài lá tốt, số lá nhiều. Cây xanh tốt, cao hơn và lá cây xanh nhất, cây có sức sống tốt so với các công thức còn lại. Không những chiều dài vượt trội mà nốt sần cũng nhiều cây có và số lượng cao nhất. Rễ dài, nhiều và khỏe. Số lượng nốt sần trung bình 99 sau 80 ngày trồng.

- CT2: Chiều dài thân cây ngắn, số lá ít, số cây chết nhiều. Cây sinh trưởng còi cọc chiều cao ngắn, số lượng lá và rễ kém nhất. Rễ ngắn. Số lượng nốt sần trung bình 15.

- CT3: Chiều dài thân cây trung bình, chiều dài lá và số lá trung bình. Cây sinh trưởng đồng đều hơn. Có xuất hiện nốt sần nhưng không nhiều so với công thức 1. Rễ dài và khỏe hơn công thức 2 và 4. Số lượng nốt sần trung bình 41.

- CT4: Chiều dài thân cây trung bình, chiều dài lá và số lá trung bình. Chưa xuất hiện nốt sần sau 1 tháng 15 ngày. Rễ ngắn hơn công thức 1 và 3. Công thức này cây phát triển kém hơn công thức 1 và 3, tuy nhiên tốt hơn công thức 2. Số lượng nốt sần trung bình sau 80 ngày là 29 .

Bảng 5: Sự sinh trưởng và phát triển của cây keo ở các công thức khác nhau sau 80 ngày trồng

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Số lượng nốt sần	Nhận xét
CT 1	45-46	99	Công thức phối trộn chế phẩm EPS sinh trưởng và phát triển tốt nhất.
CT 2	24-25	15	Công thức chỉ có đất sinh trưởng phát triển kém nhất
CT 3	34-35	41	Công thức phối trộn biochar và compost sinh trưởng và phát triển ở vị trí thứ 2
CT4	29-30	28	Công thức này chỉ có biochar sinh trưởng và phát triển xếp ở vị trí thứ 3.

Sau khi trồng cây keo được 80 ngày, mẫu đất ở các công thức khác nhau đã được thu thập để xác định độ ẩm của đất. Đất được sấy khô ở nhiệt độ (105 – 110 °C) cho đến khối lượng không đổi. Độ ẩm của đất (w) được tính bằng phần trăm (%) theo công thức:

$$W = \frac{m_1 - m_0}{m_0 - m} \times 100\%$$

trong đó: m là khối lượng của cốc nhỏ có nắp, tính bằng gam (g);

m₀ là khối lượng của đất đã được sấy khô đến khối lượng không đổi và cốc nhỏ có nắp, tính bằng gam (g);

m₁ là khối lượng của đất ướt và cốc nhỏ có nắp, tính bằng gam (g).

Lấy 400g đất từ mỗi bốn công thức, đất được thu thập 4 ngày sau khi mưa để xác định độ ẩm ở các công thức trồng cây keo có thành phần khác nhau. Nếu thời tiết ở Bình Thuận khô hạn kéo dài 1 tháng trở lên thì sự chênh lệch về độ ẩm cao hơn từ 1 cho đến 2 lần.

Ngoài ra, cũng thu thập mẫu đất sau khi trồng cây keo được 80 ngày để xác định mật độ vi khuẩn sinh EPS và số lượng vi sinh vật gần đúng nhất có thể (MPN).

Để xác định mật độ vi khuẩn sinh EPS: Mỗi chủng phân lập từ bốn mẫu đất được nuôi cấy trên 1 mL TBS với 3% sucroza trong tủ ấm ở 37°C và 50 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường, rửa 1 lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Để khô 45 phút ở nhiệt độ phòng. Nhỏ 1mL thuốc nhuộm Crystal Violet 0,4%, tiếp tục để trong

45 phút ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ Crystal Violet. Để loại bỏ vết bẩn không dính, rửa nhẹ 4 lần với 3mL H₂O. Để khô ở nhiệt độ phòng trong 45 phút, sau đó thêm 2mL 100% EtOH. Nhẹ nhàng loại bỏ etanol. Kết quả thu được được thể hiện trên Hình 9.

Để xác định số lượng vi sinh vật gần đúng nhất có thể (MPN): Lấy 20 g đất từ bốn công thức vào bình tam giác 250 mL rồi đổ vào đó 90 mL nước muối sinh lý 0,85%. Sau đó cho bốn bình lắc 200 vòng/phút trong 15 phút ở máy lắc LSI-3016R. Pha loãng dịch bằng nước muối sinh lý 0,85% với nồng độ thấp dần từ 10^{-1} đến 10^{-10} tế bào/mL. Lấy 0,5mL dịch pha loãng nuôi trong 4,5mL môi trường hiếu khí tổng số (pepton 10g/L, glucoza 1g/L, NaCl 5g/L, cao thịt 3g/L, độ pH= 7). Mỗi độ pha loãng của các nồng độ lặp lại 3 lần. Thí nghiệm lặp lại hai lần. Tra bảng Mac Crady để suy ra mật độ vi sinh vật.

Kết quả được thể hiện ở Bảng 6, số lượng công thức 1 (CT1) cao nhất đạt 1.8×10^9 MPN/g đất khô, công thức 2 (CT2-đối chứng) số lượng thấp nhất 5.5×10^6 MPN/g đất khô, công thức (CT3) số lượng đạt 6.3×10^6 MPN/g đất khô và công thức 4 (CT4) có số lượng là 6×10^6 MPN/g đất khô. Hàm lượng EPS được tạo thành thể hiện ở Hình 9 và Bảng 6 và trọng lượng lần lượt là 14.54 mg (CT1); 1.93mg (CT2) ; 3.97mg (CT3)và (CT4) 2.79 mg. Nhìn vào kết quả thể hiện ở ví dụ này cho thấy có sự tuyến tính rõ ràng giữa độ ẩm của đất (10.52% (CT1), 5% (CT2), 7,89 % (CT3) và 5.79 (CT4), số lượng vi sinh vật tổng số và hàm lượng EPS được tạo thành ở trong đất.

Qua các kết quả nhận được cũng thể hiện rất rõ ràng vai trò của chế phẩm EPS. Nếu cả 3 sản phẩm được bổ sung theo tỷ lệ ở Bảng 3 thì các số liệu về nốt sần, về độ sinh trưởng phát triển của cây keo càng chứng minh rất rõ hiệp lực tác dụng của các chế phẩm sinh học và hỗ trợ sinh học (biochar) đã mở ra con đường để biến những vùng đất khô cằn thành những vùng đất có thể canh tác được. Cụ thể hơn là khi có độ ẩm ở mức độ nhất định, có dinh dưỡng từ compost, có chỗ ở thật nhiều (biochar) và EPS cũng là giữ ẩm nhưng lại có độ nhày lớn cùng với sự phân hủy theo thời gian cũng tạo nên phân bón cho các vi sinh vật khác ngoài chỗ cư trú. Trong GPHI này sử dụng cây keo có khả năng tạo nốt sần nhưng đối với các loại cây khác không có khả năng nêu trên thì bổ sung chế phẩm từ vi sinh vật có khả năng cố định đạm tự do cùng với các nhóm vi sinh vật chức năng khác thì con đường sản xuất nông nghiệp hữu cơ ở các vùng đất cằn cỗi sẽ khả thi.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6: Độ ẩm, số lượng vi sinh vật, khối lượng EPS từ các công thức trồng cây keo

Công thức	Độ ẩm (%)	Số lượng của VSV (MPN)	Khối lượng EPS (mg)
CT1	10,52	$1,8 \times 10^9$	14,54
CT2	5	$5,5 \times 10^6$	1,93
CT3	7,89	$6,3 \times 10^6$	3,97
CT4	5,79	$6,0 \times 10^6$	2,79

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) thu được từ quy trình theo sáng chế được ứng dụng trong quá trình canh tác nông nghiệp, tạo chất giữ ẩm có bản chất sinh học. Chế phẩm này không những giúp đất khô thiếu nước, có độ kết dính kém được cải thiện rõ rệt, kết quả cuối cùng là tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng, góp phần cải tạo đất tăng độ phì nhiêu của đất để phát triển nông nghiệp ở những khu vực chịu nhiều áp lực của các yếu tố không thuận lợi phi sinh học. Đây cũng là một lợi thế để các vùng có đất đai khô hạn có thể vẫn phát triển nông nghiệp có sản lượng tốt dần lên nếu sử dụng sản phẩm này.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) bao gồm các bước:

(i) Chuẩn bị giống vi khuẩn cấp 1:

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số thạch có thành phần (g/l) như sau: pepton 5; glucoza 1; NaCl 5; cao thịt 3; aga 16; với độ pH 6,8;

Chủng giống trong các ống giống của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp.BNTM07 có khả năng sinh tổng hợp EPS, không tạp nhiễm, bảo quản ở nhiệt độ là 5⁰C, được cấy chuyển từ ống nghiệm sang 3 đĩa petri riêng biệt chứa môi trường hiếu khí tổng số thạch, nuôi ở nhiệt độ 37⁰C trong thời gian 5 ngày, thu khuẩn lạc của mỗi chủng là giống cấp I;

(ii) Thu giống vi khuẩn sinh EPS trên môi trường hiếu khí tổng số lỏng:

Chuẩn bị môi trường hiếu khí tổng số lỏng có thành phần (g/l) như sau: pepton 3 g, NaCl 5 g, cao thịt 3 g, độ pH = 6,8, khử trùng ở 121⁰C, 1atm (101325 Pa) trong thời gian 15 phút;

Đưa môi trường vào trong các bình tam giác, các chủng vi khuẩn sinh EPS được cấy vào bình tam giác riêng biệt để nuôi cấy trong điều kiện lắc 200 vòng/phút trong thời gian 48 giờ, sau đó thu dịch đặc sau khi ly tâm vô trùng làm giống để nuôi cấy trên môi trường rắn;

(iii) Nuôi cấy trên môi trường rắn:

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy rắn để nuôi 3 chủng vi khuẩn có thành phần tính theo khối lượng gồm cám gạo 25%, bột đậu tương 10%, lõi ngô 10%, bã đậu 40%, than sinh học (biochar) 9%, rỉ đường 3%, KCl 1%, NaNO₃ 1% và KH₂PO₄ 1% ;

Cấy giống từng chủng vi khuẩn như đã thu được từ bước (ii) vào môi trường nuôi cấy rắn với độ ẩm 50%, tỷ lệ giống 1% (khối lượng), nuôi ở nhiệt độ 37⁰C.;

Sau thời gian mỗi 12 giờ nuôi cấy, kiểm tra độ ẩm môi trường nuôi cấy, để đạt độ ẩm trong khoảng 53-55%, đảo trộn thật đều vật liệu nuôi cấy. Sau 7 ngày nuôi vi khuẩn, thu nhận sinh khối rắn;

(iv) Thu nhận sinh khối vi khuẩn sinh EPS:

Sinh khối rắn thu được sau khi nuôi cấy 7 ngày của mỗi chủng vi khuẩn được đổ ra khay riêng, mỗi khay chứa khoảng 2 kg, bóp tơi sinh khối ra và đưa vào tủ nuôi có nhiệt độ dưới 37-38 °C để sấy trong thời gian 3 ngày;

Sau khi sấy sinh khối có độ ẩm của hỗn hợp vi khuẩn khoảng 10%.

Sản phẩm vi khuẩn sau khi sấy khô đưa vào máy nghiền có kích cỡ lưới nghiền là 0,5mm, thu được sinh khối của 3 chủng vi khuẩn;

Trộn sinh khối của 3 chủng vi khuẩn theo tỉ lệ khối lượng *Bacillus* sp.BP06: *Bacillus* sp. BRBT1.5:*Serratia* sp.BNTM07 là 1:1:1, thu được sinh khối vi khuẩn sinh EPS;

(v) Phối trộn thu chế phẩm:

Phối trộn sinh khối vi khuẩn sinh EPS thu được từ bước (iv) với than sinh học (biochar), mùn hữu cơ (compost) theo tỷ lệ khối lượng than sinh học : mùn hữu cơ: sinh khối vi khuẩn sinh EPS là 1:3:1, thu được chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS).

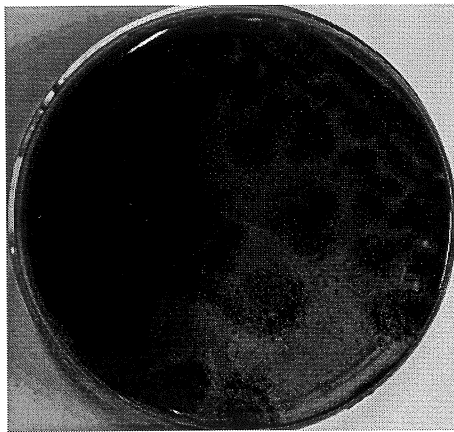
2.Chế phẩm giữ ẩm sinh học chứa các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp hợp chất polyme ngoại bào (Extracellular polymeric substance - EPS) thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có thành phần như sau (tính theo khối lượng):

Than sinh học (biochar): 20%;

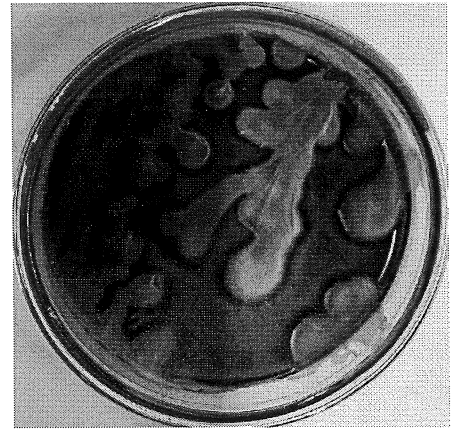
Mùn hữu cơ (compost): 60%; và

Sinh khối vi khuẩn sinh EPS: 20%;

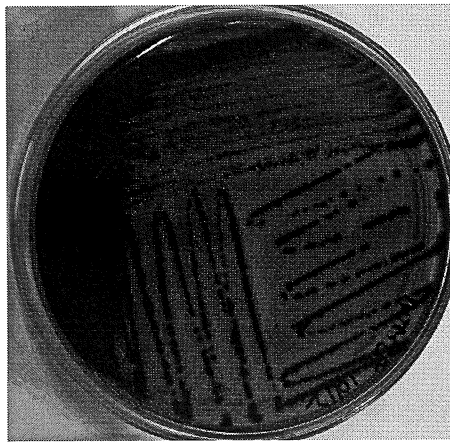
trong đó, sinh khối vi khuẩn sinh EPS là sinh khối của các chủng *Bacillus* sp. BP06, *Bacillus* sp. BRBT1.5 và *Serratia* sp. BMTM07 có khả năng sinh tổng hợp EPS.



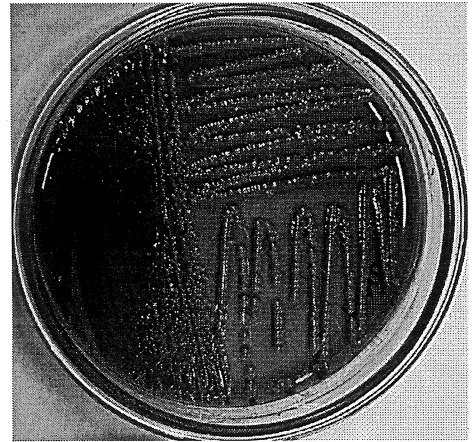
BP06 (Mặt sau)



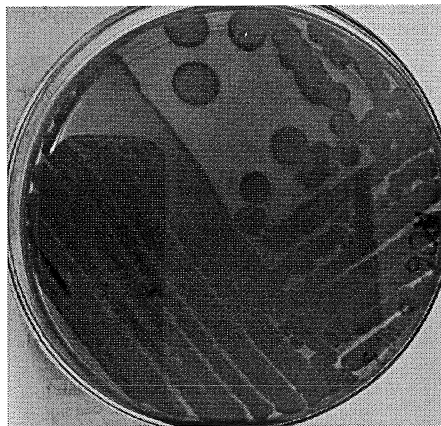
BP06 (Mặt trước)



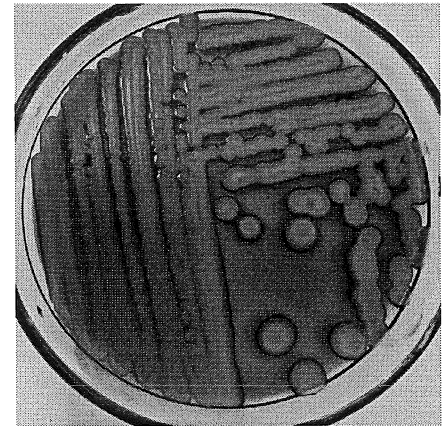
BNTM07 (Mặt sau)



BNM07 (Mặt trước)

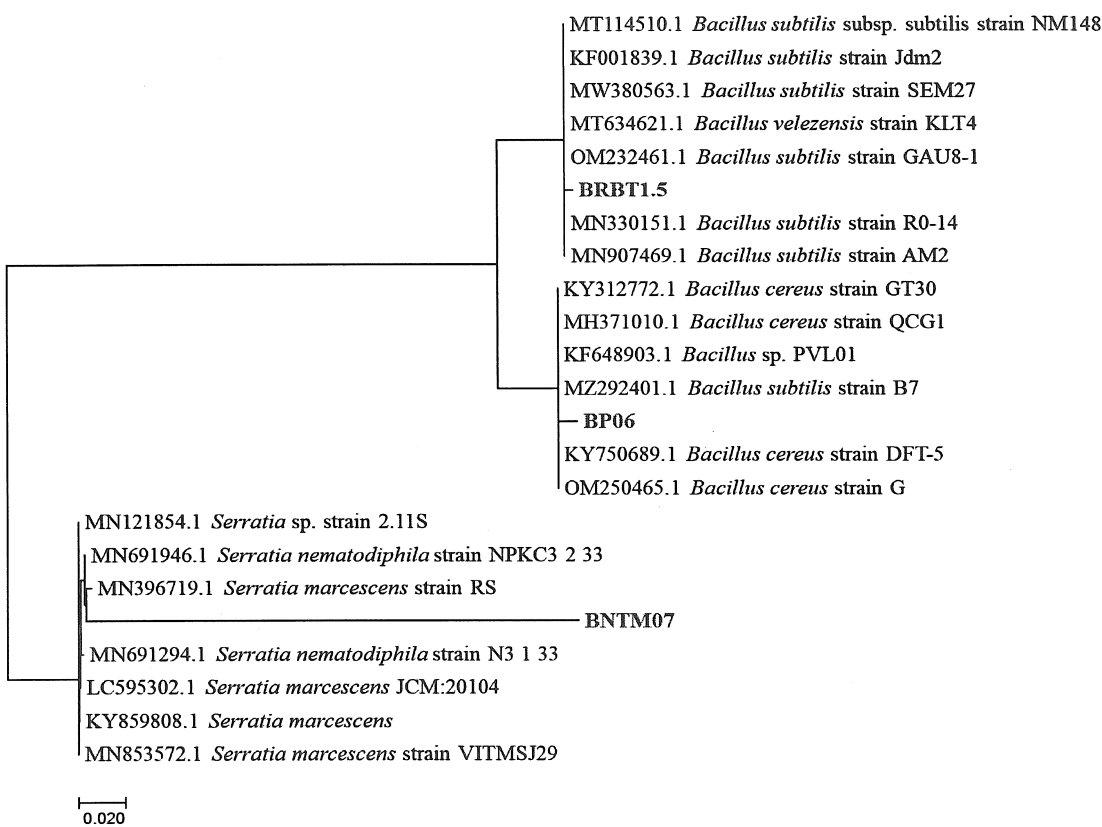


BRBT1.5 (Mặt sau)

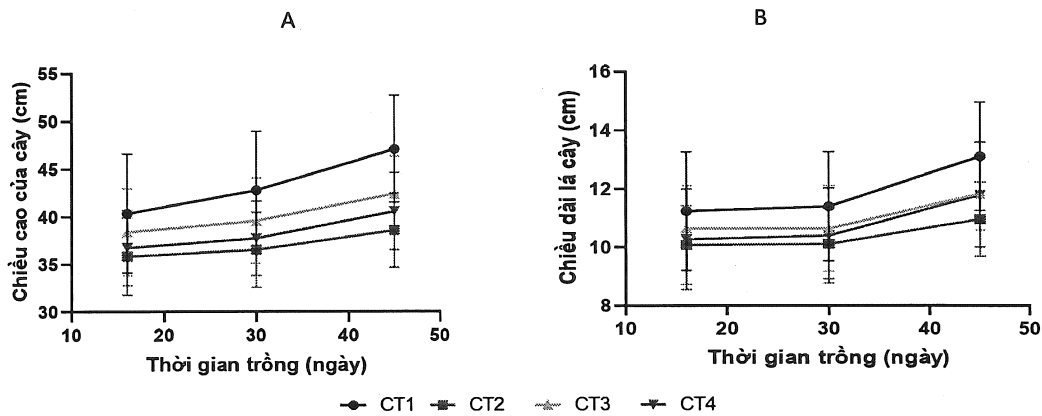


BRBT1.5 (Mặt trước)

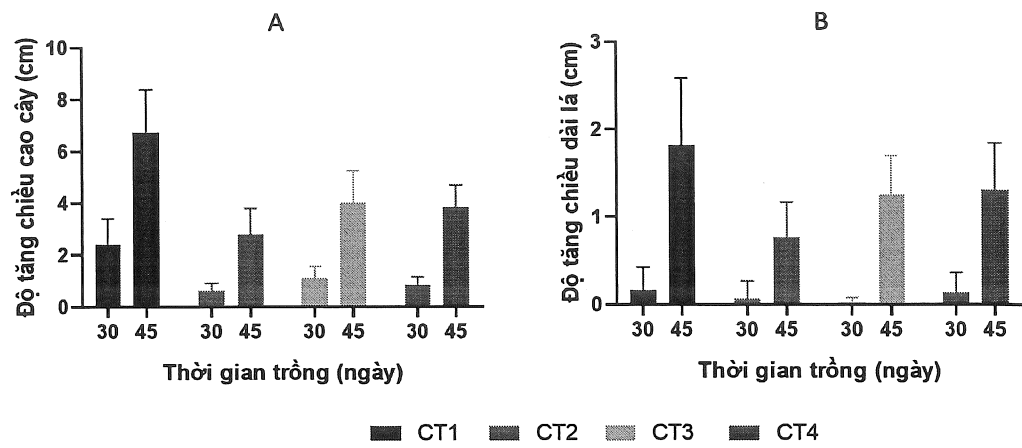
Hình 1



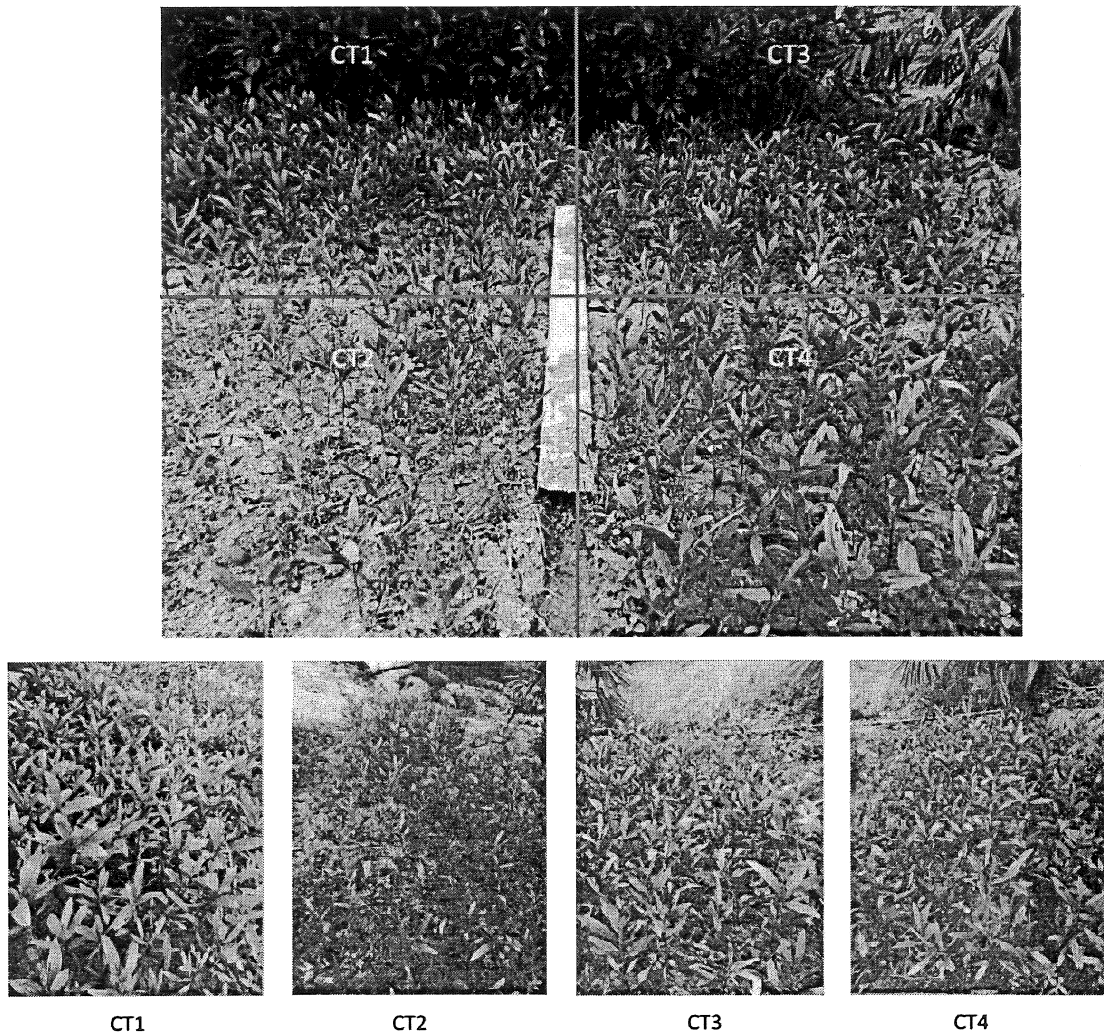
Hình 2



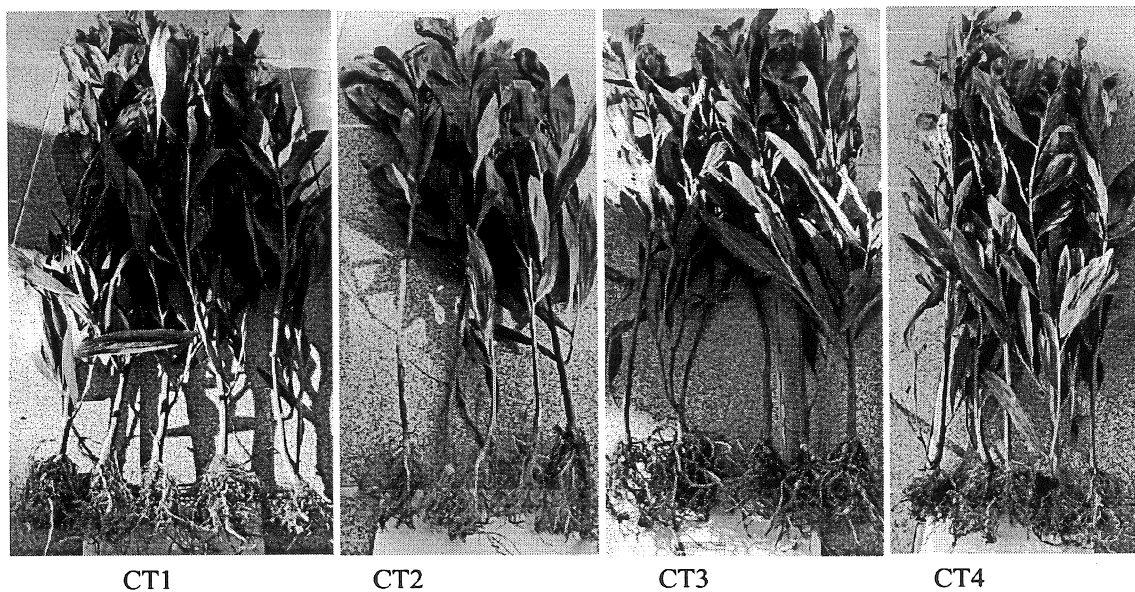
Hình 3



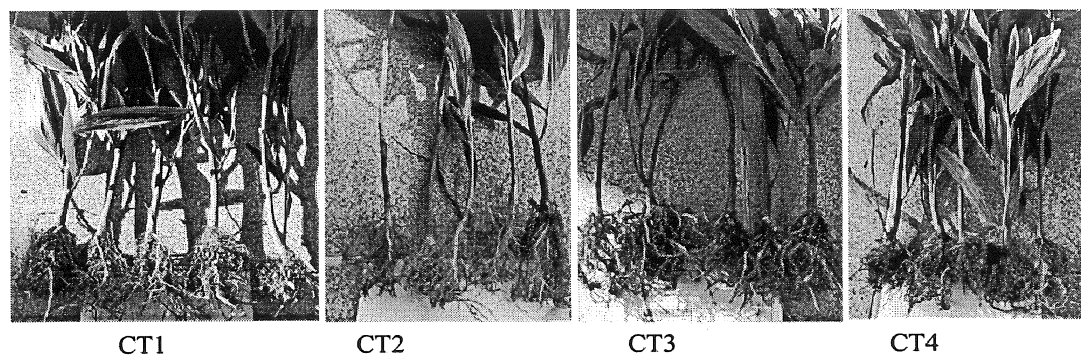
Hình 4



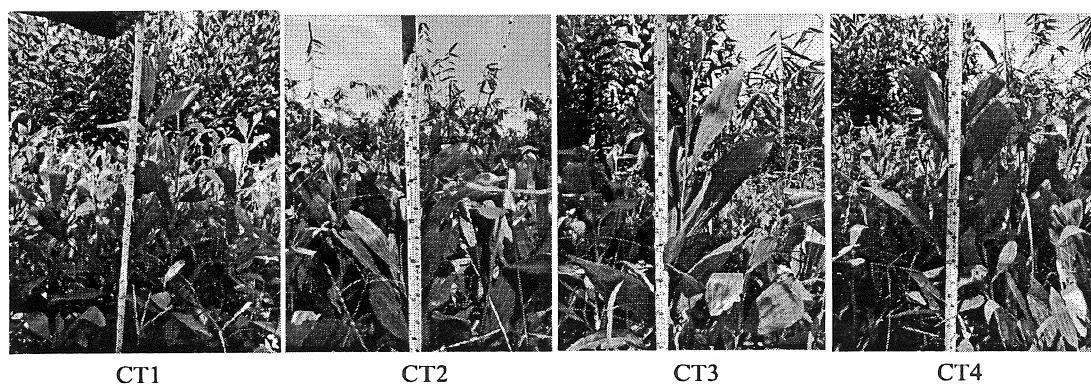
Hình 5



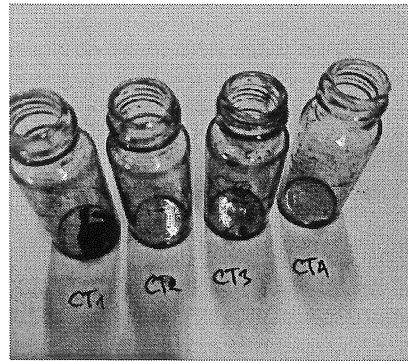
Hình 6



Hình 7



Hình 8



Hình 9