



(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) 
2-0002047

(51)⁷ **C12N 1/14**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00389

(22) 28.10.2016

(45) 25.06.2019 375

(43) 26.12.2016 345

(76) **ĐẶNG THỊ CẨM HÀ (VN)**

Nhà số 5, ngõ 158/43 Nguyễn Khánh Toàn, thành phố Hà Nội

(54) **CHẾ PHẨM VI SINH CHỨA NẤM SỢI THUỘC CÁC CHI THERMOMYCES VÀ
CHAETOMIUM ĐỂ SẢN XUẤT PHÂN HỮU CƠ TỪ PHỤ PHẾ LIỆU NÔNG
NGHIỆP VÀ CHĂN NUÔI**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh chứa nấm sợi thuộc các chi Thermomyces và Chaetomium từ nấm để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi. Chế phẩm này được sản xuất ở dạng lỏng và rắn, chứa 3 chủng nấm Thermomyces sp. FCBT3, Thermomyces sp. FCBT4 và Chaetomium sp. FCBT5.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực vi sinh. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh chứa nấm sợi thuộc các chi *Thermomyces* và *Chaetomium* để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tại Việt Nam số lượng gia súc gia cầm được thống kê lần lượt là 2,6 triệu con trâu, 5,2 triệu con bò, 26,3 triệu con lợn và 314,7 triệu con gà. Số lượng phân chúng thải ra hàng ngày lần lượt là 15 kg, 10 kg, 2kg và 0,2kg. Sản lượng lúa năm 2011 đạt mức 40,78 triệu tấn, năm 2012 tăng gấp 1,2% so với 2011 và đạt 43 triệu tấn. Riêng đồng bằng sông Cửu Long, sản lượng trâu thu gom được lên tới 1,4-1,6 triệu tấn. Tổng sản lượng phế thải sinh khối hàng năm ở nước ta có thể đạt tới 8-11 triệu tấn, vùng Tây Bắc cũng đóng góp 55000-60000 tấn mùn cưa từ việc khai thác và chế biến gỗ. Đặc biệt là chất thải ra từ các nhà máy mía đường. Hiện tại, trong cả nước có đến 10-15% tổng sản lượng bã mía là phụ phế liệu nông nghiệp. Theo thống kê thì mỗi năm Việt Nam sản xuất ra xấp xỉ 40 triệu tấn sinh khối từ phụ phẩm lúa gạo, bao gồm 32 triệu tấn rơm rạ và 8 triệu tấn trâu. Ví dụ ở Cần Thơ 86% lượng rơm rạ không được tận dụng mà chỉ có 12% là được vùi xuống đất làm phân. Trong khi đó, tại Thái Bình, hiện tượng đốt rơm rạ chiếm tới 36%. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, không còn một hộ gia đình nào sử dụng rơm rạ hay trâu trong việc đun nấu.

Sản xuất phân hữu cơ (ủ compost) hiện nay vẫn đang được thực hiện ở qui mô khác nhau. Tất cả các địa phương đều có hộ nông dân hay doanh nghiệp vừa và nhỏ ủ compost mà nguyên liệu đầu vào là phân gia súc gia cầm và phụ phế liệu từ sản xuất lâm nghiệp và nông nghiệp. Phân người ở nông thôn cũng được tận dụng và có hộ nông dân cũng ủ chúng sau khi hổ xị 2 ngăn đầy để tạo phân hữu cơ cung cấp cho sản xuất nông nghiệp. Tuy nhiên cho đến nay người nông dân đã không còn hứng thú với việc làm này. Thay vào đó là họ sử dụng phân hóa học cho tiện.

Còn nguồn sinh khối này là rơm, rạ, thân và lá cây ngô, lạc, đỗ đậu, vỏ cà phê, mùn cưa v.v.. Ngoài ủ compost thì phân gia súc gia cầm cùng với nước giàu hữu cơ được chuyển hóa kỵ khí thu biogas và bã của quá trình này được tận thu để làm ra phân hữu cơ. Một phần sinh khối cũng được sử dụng để nuôi trồng nấm ăn và nấm thuốc thông qua nhiều kỹ thuật và quy trình chuyển hóa khác nhau. Lượng sinh khối cũng được người dân tận dụng để đun nấu, nhưng nguồn sinh khối vô cùng quý giá này chủ yếu vẫn bị đốt và gây ô nhiễm môi trường ngày càng nghiêm trọng sau mùa gặt. Phân gia súc gia cầm chưa có các quy trình chuyển hóa thành phân hữu cơ đạt tiêu chuẩn cho sản xuất nông nghiệp sạch và hữu cơ.

Các quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật của các doanh nghiệp Việt Nam vẫn bán trên thị trường với thành chủ yếu là than bùn và sau khi lên men chưa phân hủy hết các chất độc của than bùn đã trộn vi sinh vật chức năng và NPK hóa học. Tuy nhiên, hiện cả nước vẫn sử dụng loại phân này cho sản xuất đại trà. Khi đánh giá toàn bộ quy trình của doanh nghiệp sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh vật các cơ quan chức năng đã phát hiện thấy chìa khóa và mấu chốt nhất của loại phân này đã không chuẩn xác. Dẫn tới phân bón loại này không có tác dụng cho phát triển nông nghiệp sạch và không đạt tiêu chuẩn để tạo ra sản phẩm hoàn toàn hữu cơ. Các vi sinh vật chức năng như cố định đạm, phân giải lân, kháng vi sinh vật trong than bùn đã không hoạt động tốt trong đất. Vì vậy, độ phì nhiêu của đất không tăng, dẫn tới năng suất chất lượng của sản phẩm không được cải thiện và mùa màng chủ yếu vẫn quyết định hoàn toàn bởi thiên nhiên. Các quy trình sản xuất khác từ phân gia súc gia cầm và phụ phế liệu nông lâm nghiệp cũng đã được thực hiện tại một số cơ sở với qui mô lớn dần. Tuy nhiên, chất lượng đầu ra không ổn định và chưa đáp ứng đầy đủ theo tiêu chí cho sản xuất nông nghiệp sạch và hoàn toàn hữu cơ. Vì độ mùn còn thấp, độ ẩm cao không bảo quản lâu dài được, số lượng vi sinh vật gây bệnh chưa kiểm soát tốt do thời gian pha nóng $>55^{\circ}\text{C}$ chỉ kéo dài được từ 3-6 ngày. Thậm chí, ủ compost rơm rạ bổ sung N,P,K và phân chuồng chỉ đạt được nhiệt độ cao hơn hoặc là 40°C trong thời gian ngắn. Cho nên các loại vi sinh vật gây bệnh, các dư lượng của bảo vệ thực vật, kháng sinh, ký sinh trùng và hạt cỏ v.v., khó có thể bị loại bỏ hoàn toàn. Hàm lượng N và P chưa cao và số

lượng vi sinh vật hữu ích chỉ đạt được khoảng 10^5 - 10^6 CPU/g trong sản phẩm cuối cùng và chúng thường chưa được xác định khả năng sinh các enzym ngoại bào được quan tâm trước tiên như chitinaza, proteaza, CMCaza, lipaza, xylanaza, amylaza v.v.. Các enzym liệt kê trên có vai trò rất quan trọng trong tiếp tục quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ còn tồn tại trong đất để tạo các chất cho cây sinh trưởng và kháng dịch bệnh. Rất nhiều nấm có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh tự nhiên hay các peptit hoạt động giống như kháng sinh nên giúp giảm lượng thuốc bảo vệ thực vật. Một số quy trình sản xuất phân vi sinh vật khác cũng đã bổ sung vi sinh vật chức năng, tuy nhiên vẫn chưa đủ số lượng cũng như các chủng có hoạt tính tốt để tạo nên chất lượng sản phẩm cuối cùng đạt tiêu chuẩn cho sản xuất sạch và tiến tới hữu cơ, hơn thế nữa khó có thể cải tạo đất bền vững khi lượng mùn không đủ.

Tóm lại, một trong các nhu cầu là cần có tập đoàn vi sinh vật ưa nhiệt linh động và ưa nhiệt để bổ sung (giống vi sinh vật bao gồm cả vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm) vào quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật có khả năng phân hủy, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ là sinh khối của phụ phế liệu chăn nuôi và trồng trọt tạo thành phân hữu cơ đạt tiêu chuẩn cho sản xuất hàng hóa sạch và hữu cơ.

Phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông, lâm nghiệp và chăn nuôi được sản xuất tại Việt Nam hiện nay đa số có chất lượng không cao do đặc điểm của nguồn nguyên liệu là phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi chứa các tác nhân có hại như mầm bệnh phức tạp, chất kháng sinh, các chất ô nhiễm nồng độ thấp v.v.. Thông thường, quy trình ủ phân hữu cơ tự nhiên không bổ sung giống vi sinh vật. Trong các quy trình này, quá trình chuyển hóa các hợp chất hữu cơ trong đồng ủ tạo nhiệt độ, đặc biệt là pha nóng kéo dài từ 3-5 ngày với nhiệt độ từ 50 - 65°C có thể giết được vi sinh vật gây bệnh và giúp tăng quá trình chuyển hóa các hợp chất protein, lipid, các hợp chất khó chuyển hóa thuộc lignoxenluloza, chitin, v.v., thành phân hữu cơ. Với mục đích có được sự ổn định trong quá trình sự chuyển hóa để tạo được độ mùn tốt nhất, để sau khi phân hữu cơ chín có thể được bón vào đất để tạo sản phẩm hữu cơ thì việc ủ hoàn toàn tự nhiên không thể đạt được các tiêu chí về phân hữu cơ. Trong khi đó phân gia súc gia cầm còn chứa rất nhiều các chất hữu cơ vòng thơm, chất kích thích sinh trưởng, các chất kháng sinh, các mầm bệnh ngày càng nhiều,

v.v., mà quy trình ủ phân hữu cơ tự nhiên với sự hoạt động của vi sinh vật có sẵn trong nguyên liệu ủ không đủ số lượng cũng như hoạt lực phân hủy và chuyển hóa. Vì vậy cần giống vi sinh vật ưa nhiệt với hoạt tính sinh tổng hợp các enzym ngoại bào, các chất có hoạt tính sinh học và tạo nên nhiệt độ trong quy trình ủ cao làm giống bổ sung.

Bước đầu tiên để nâng cao chất lượng phân hữu cơ thu được, cần phải tìm cách kéo dài pha nóng trong quá trình ủ phân để thúc đẩy quá trình chuyển hóa nhanh các hợp chất hữu cơ trong nguyên liệu nhằm tạo ra các chất hữu hiệu cũng như phân hữu cơ không gây bệnh cho cây trồng khi được bón lại vào đất. Một trong những cách tiếp cận nhanh nhất, hiệu quả và khả thi hơn cả là bổ sung chế phẩm vi sinh (giống) chứa các vi sinh vật ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động có thể sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ cao trong đồng ủ, giúp kéo dài pha nóng trong quá trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật.

Tính đến thời điểm này, đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến vấn đề này. Các nghiên cứu của rất nhiều nhà khoa học trong hàng thế kỷ chỉ ra rằng nhiệt độ để quá trình sinh lý hóa của vi sinh vật xảy ra tốt nhất là dưới 60°C. Trong đồng ủ phân hữu cơ, số lượng vi sinh vật gây bệnh sẽ giảm đáng kể với nhiệt độ không dưới 40°C. Còn khi nhiệt độ đạt trên 82°C thì hoạt tính sinh học của chúng bị dừng lại, có nghĩa là nấm siêu ưa nhiệt cũng không tìm thấy ở loại phân hữu cơ với nhiệt độ cao đến thế. Một thông báo khác chỉ ra rằng, các sinh vật gây bệnh không thể sống sót ở nhiệt độ 55-60 °C trong 30 phút đến 1 giờ. Hầu hết nấm không sinh trưởng được ở 50 °C bởi vì quá nóng, mặc dù nấm ưa nhiệt là nhóm có thể chịu được nhiệt. Cho nên không có nấm ở đồng ủ phân hữu cơ nhiệt độ 60 °C, còn nấm không có ở nhiệt độ trên 70 °C. Tuy nhiên, các kết luận này đã có sự thay đổi khi sử dụng công cụ hiện đại không thông qua nuôi cấy (Joe Jenkins, thermophilic bacteria compositing stages, the sanitization of compost, growing culture, 2011). Các yếu tố đã được biết đến đóng góp vào sự phá hủy vi sinh vật từ thực vật gây bệnh và giun tròn trong quá trình sản xuất phân hữu cơ (Noble and Roberts, 2004) là (1) nhiệt lượng tạo ra trong giai đoạn hoạt động mạnh ở pha nóng của quá trình ủ phân hữu cơ; (2) tạo ra các chất độc như axit hữu cơ và ammonia; (3) hoạt động

của các enzym thủy phân tạo ra trong phân hữu cơ; (4) các cơ chế đối kháng bao gồm sự sinh tổng hợp kháng sinh và kháng các cơ thể ký sinh; (5) đấu tranh giành chất dinh dưỡng giữa chúng; (6) sự mất một cách tự nhiên các dạng của tác nhân gây bệnh theo thời gian; (7) tạo ra các chất mà kích thích giai đoạn nghỉ của tác nhân gây bệnh đến nảy mầm sớm. Trong tất cả các yếu tố thì sự tạo nhiệt ở pha nóng của quá trình ủ phân hữu cơ đóng vai trò chủ đạo để tiêu diệt mầm bệnh. Sự chết đi của các tác nhân gây bệnh ở pha nóng là yếu tố quan trọng nhất để loại bỏ chúng. Cũng đã có nhiều nghiên cứu để tìm ra hỗn hợp chủng loài vi sinh vật hữu ích phù hợp để làm giống vi sinh vật cho sản xuất phân hữu cơ nhưng cũng vẫn chỉ dừng ở việc nghiên cứu. Cho nên cần sự đổi mới trong nâng cao hiệu quả của chuyển hóa sinh khối từ sản xuất nông nghiệp và lâm nghiệp trong giai đoạn cả thế giới cần thực phẩm an toàn và hữu cơ. Việc tạo ra hàng loạt chế phẩm có hiệu suất cao trong chuyển hóa phụ phế liệu nông nghiệp, lâm nghiệp và chăn nuôi thành phân hữu cơ có chất lượng đạt tiêu chuẩn sản xuất theo VietGap, GlobalGap và hoàn toàn hữu cơ tại Việt Nam lúc này là hết sức cần thiết. Hơn nữa, Việt Nam là một nước nhiệt đới với nguồn tài nguyên vi sinh vật phong phú, nhưng hiện vẫn chưa tận dụng được lợi thế này. Ngoài ra, ô nhiễm môi trường bởi chất thải rắn từ chăn nuôi trong đó có phân và nạm đốt phụ phế liệu từ sản xuất lúa, ngô, cỏ dại, v.v., đã làm môi trường ô nhiễm, tạo khí nhà kính và giảm chất lượng sống của cộng đồng. Chính vì vậy tìm ra các giải pháp khoa học từ vi sinh vật ưa nhiệt có nguồn gốc từ Việt Nam để sản xuất phân hữu cơ cung cấp cho quá trình tạo sản phẩm sạch và hữu cơ bền vững với hiệu quả cao hơn bằng thúc đẩy quá trình chuyển hóa được tối đa nguồn nguyên liệu trên là mục đích của giải pháp hữu ích này.

Ngoài 2 chế phẩm từ *Bacillus* và *Streptomyces* ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động vẫn cần có thêm các chế phẩm vi sinh khác nữa chứa các chủng nấm sợi được phân lập từ Việt Nam để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi để phát triển nông nghiệp sạch và hữu cơ. Các đại diện thuộc chi *Bacillus* và *Streptomyces* đóng vai trò quan trọng ở pha nóng thì các chủng vi sinh vật thuộc chi nấm *Thermomyces* và *Chaetomium* luôn có mặt ở giai đoạn sau của pha nóng

cũng đóng vai trò rất lớn trong chuyển hóa sinh khối và phân giải súc gia cầm thành phân bón hữu cơ có chất lượng cao. Hơn thế nữa các loài thuộc 2 chi nấm sợi này tạo nên các chất hoạt động giống kháng sinh và sinh tổng hợp được rất nhiều enzym, trong đó có enzym ngoại bào tham gia vào quá trình chuyển hóa lignoxenluloza. Ngoài ra các enzym được tạo ra cùng hỗn hợp các chất trao đổi chất do quần xã vi sinh vật trong đó có nấm sợi ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động hoạt động ở quá trình sản xuất compost đã được biết đến với vai trò kiểm soát bệnh của cây. Đây là ưu điểm và lợi thế quan trọng nhất cho sản xuất sản phẩm hữu cơ khi thay thế được phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Tuy nhiên cần thêm các vi sinh vật chức năng khác như cố định đạm, phân giải lân và tạo chất giữ ẩm tự nhiên, v.v., cho đất cũng từ vi sinh vật bản địa.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích mô tả chế phẩm vi sinh chứa 3 chủng nấm sợi thuộc chi *Thermomyces* và *Chaetomium* để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi. Sản phẩm này chứa hỗn hợp 2 chủng nấm thuộc chi *Thermomyces* và 1 chủng nấm thuộc chi *Chaetomium* ưa nhiệt linh động, lần lượt là *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và *Chaetomium* sp. FCBT5. Các chủng thuộc giải pháp hữu ích này đều được phân lập từ các đồng phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi từ các đồng ủ phân hữu cơ ở pha nóng (thermophillic phase) hoặc pha phân hữu cơ đã chín (mature phase) của một số tỉnh, thành tại Việt Nam. Chủng giống thuần khiết của 3 chủng nấm sợi được lưu giữ tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế phẩm vi sinh từ nấm sợi để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích được ứng dụng trong quá trình ủ phân hữu cơ với nguyên liệu là phụ phế liệu từ sản xuất nông nghiệp và phân gia súc gia cầm nhằm kéo dài pha nóng từ 20 đến 30 ngày. Kết quả là thu được phân hữu cơ có chất lượng cao, đáp ứng được tiêu chí cho sản xuất sạch và hữu cơ. Hỗn hợp này được sử dụng độc lập hay sử dụng cùng với chế phẩm chứa các chủng vi khuẩn ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động thuộc chi *Bacillus* và các chủng xạ khuẩn ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động thuộc chi *Streptomyces* cho từng hỗn hợp nguyên liệu đầu vào khác nhau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của 3 chủng nấm phân lập được.

Hình 2 thể hiện hình thái bào tử và cuống sinh bào tử của chủng nấm FCBT4 dưới kính hiển vi.

Hình 3 thể hiện cây phát sinh chủng loại của 3 chủng nấm phân lập được.

Hình 4 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi nhiệt độ trong quá trình chuyển hóa và phân hủy sinh khối của ủ compost.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các tác giả giải pháp hữu ích đã tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật hữu ích từ các đồng ủ phân hữu cơ ở pha nóng hoặc ở pha mà phân hữu cơ đã chín ở một số tỉnh, thành của Việt Nam như Hà Nội và nhiều tỉnh thành khác.

Môi trường PDA được dùng làm môi trường phân lập nấm có thành phần như sau: 200 g/l khoai tây, 10 g/l đường glucoza, 18 g/l aga và độ pH là 6,8. Các mẫu thu được từ các đồng ủ tự nhiên phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi ở pha nóng hoặc pha phân hữu cơ đã chín từ một số tỉnh, thành tại Việt Nam như Hà Nội, Quảng Ninh và một số địa phương khác. Mẫu được phân lập ngay bằng cách lắc trong 45-60 phút hỗn hợp của 20 g mẫu trong 180 ml nước muối sinh lý, pha loãng ở nồng độ thích hợp và lấy 100 μ l gọt lên các đĩa thạch chứa môi trường PDA. Sau đó các đĩa thạch được nuôi ở 55°C trong tủ nuôi cấy. Sau 72-96 giờ, các khuẩn lạc nấm với hình thái khác nhau xuất hiện trên các đĩa thạch đã được tách và làm sạch. Xét về hình thái khuẩn lạc trong cùng điều kiện nuôi cấy thì thu được 3 chủng nấm đã được làm sạch với tên là FCBT3, FCBT4 và FCBT5. Đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng nấm phân lập được ở các nhiệt độ khác nhau là 37 °C, 55 °C và 65°C. Hình thái khuẩn lạc của các chủng này được thể hiện trên Hình 1. Khả năng sinh trưởng của 3 chủng trong giải pháp hữu ích này ở nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Đặc tính nhiệt của 3 chủng nấm phân lập được

Tên chủng	Nhiệt độ 37 ⁰ C	Nhiệt độ 55 ⁰ C	Nhiệt độ 65 ⁰ C
FCBT3	+	+	-
FCBT4	+	+	-
FCBT5	+	+	-

Chú thích: (+) *sinh trưởng*; (-) *không sinh trưởng*

Để xác định hoạt tính enzym chitinaza ngoại bào của các chủng nấm, chủng FCBT3 và FCBT4 được nuôi trên môi trường TSH3 lỏng với thành phần gồm 200 g/l dịch chiết khoai tây; 10 g/l đường glucoza; 5 g/l cám gạo, 3 g/l NaNO₃, 1 mM CuSO₄, độ pH là 6,5. Riêng chủng FCBT5 không sinh trưởng tốt trên môi trường lỏng nên đã được nuôi trên môi trường rắn với thành phần gồm cám gạo 70%; lõi ngô 20%; rom 10%, 1 mM CuSO₄ với độ ẩm 65%, nuôi ở nhiệt độ 55⁰C. Hoạt tính các enzym ngoại bào như CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylazang ngoại bào định tính khi sử dụng các cơ chất tương ứng với mỗi loại enzym (CMC, chitin, casein, xylan, tween 80, tinh bột) theo phương pháp đo vòng phân giải khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol 1%, sau 24 giờ ủ. Kết quả xác định hoạt tính được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Khả năng sinh tổng hợp một số enzym ngoại bào 3 chủng nấm

Tên chủng	Chitinaza	CMCaza	Proteinaza	Xylanaza	Amylaza	Lipaza
FCBT3	+	+	+	+	+	+
FCBT4	+	+	+	+	+	+
FCBT5	+	+	+	+	+	+

Chú thích: (+) *có hoạt tính*, (-) *không có hoạt tính*

Để xác định vị trí phân loại và định danh 3 chủng nấm phân lập được, tiến hành giải trình tự gen vùng ITS (ITS1 – 5,8S – ITS2) và so sánh trình tự thu được với dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank).

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

Thu sinh khối nấm từ đĩa nuôi cấy, nghiền sinh khối nấm trong cối sứ đã khử trùng bằng nitor thành bột mịn, thu mẫu vào ống eppendorf, bổ sung 400 µl Lysis

buffer, vortex, bổ sung 20 µl proteaza K ủ ở 65°C trong 30 – 45 phút, bổ sung C:I (24:1) với tỷ lệ 1:1 về thể tích, vortex, ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu phần dịch nổi phía trên sang eppendorf mới, bổ sung isopropanol với tỉ lệ 1:1 về thể tích, ủ ở 4°C trong 2 giờ, ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu tủa. Rửa tiếp bằng 700 µl etanol 70%, ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C làm khô tủa, hòa trong TE, bảo quản ở 4°C.

Sau khi thu được ADN tổng số, thực hiện khuếch đại đoạn gen mã hoá vùng ITS (ITS1 – 5,8S – ITS2) bằng cặp mồi ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') và ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (White *et al.*, 1990)

Thành phần phản ứng PCR được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3 - Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)	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 4.

Bảng 4 - Chu kỳ luân nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94°C/3 phút	1
Biến tính	94°C/45 giây	30
Gắn mồi	53°C/ 45 giây	

Kéo dài chuỗi	72°C /1 phút	
Kéo dài chuỗi	72 °C /7 phút	1
	4 °C	Giữ ổn định

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. Sau đó, trình tự gen vùng ITS thu được sau phản ứng PCR được xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotit tự động ABI3730XL. Trình tự gen được xử lý bằng phần mềm FinchTV và so sánh với các chủng được công bố trên GenBank (NCBI database). Phần mềm MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại của các chủng nấm này.

Quan hệ di truyền của 3 chủng trong giải pháp hữu ích này được phân lập từ compost phụ phế liệu nông nghiệp và phân gia súc gia cầm ở nhiệt độ 55°C thể hiện ở cây phát sinh chủng loài (Hình 3).

Trình tự vùng ITS1-5,8S-ITS2 của chủng nấm FCBT3 và FCBT4 có độ tương đồng 99% với các chủng nấm sợi thuộc loài *Thermomyces lanuginosus*; chủng FCBT5 có độ tương đồng 99% với loài *Chaetomium thermophilum*. Ba chủng nấm này được đặt tên là *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và *Chaetomium* sp. FCBT5, được đăng ký trên GeneBank với mã số lần lượt là KX815293, KX815292 và KX815291.

Các chủng nấm này được bảo quản và lưu giữ trong 50% glycerol ở -80°C hoặc trong dầu khoáng ở nhiệt độ 25 - 30°C tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới dạng thuần khiết về mặt sinh học.

Hai chủng FCBT3 và FCBT4 có hình thái khuẩn lạc trên cùng môi trường và điều kiện nuôi cấy hoàn toàn khác nhau. Nếu xét về vị trí phân loại dựa trên trình tự đoạn ITS cho thấy cả 2 chủng đều thuộc chi *Thermomyces* và cùng loài với nhau là *Thermomyces lanuginosus*. Hai chủng trong giải pháp hữu ích này rất gần gũi với 6 chủng khác cùng loài dựa trên thông tin tra cứu từ GenBank. Hai chủng cũng gần gũi với chủng *Thermomyces* sp. AR (chưa xác định được tên đến

loài). Tất cả các chủng trên cây phát sinh chủng loại tuy có bản chất di truyền xác định bằng giải trình tự gen vùng ITS nhưng chúng đều không có cùng nguồn gốc sinh thái và các đặc tính sinh lý, sinh hóa cùng các đặc tính khác. Ví dụ: chủng FCBT3 gần gũi nhất với *Thermomyces lagnuginosus* ATCC 200065, chủng này đã được giải trình tự cả bộ gen và công trình này thuộc dự án Genozym đại học Concordia, chủng này có khả năng sinh tổng hợp rất nhiều enzym ngoại bào. Trong đó có α -amylaza ở độ pH = 6 và nhiệt độ tối ưu là 50°C. Các enzym khác là chitinaza cũng được sinh tổng hợp bởi chủng này. Còn FCBT4 lại gần gũi nhất với 2 chủng *Thermomyces lagnuginosus* T12 và *Thermomyces sp.* AR. Hai chủng FCBT4 và FCBT3 có quan hệ xa hơn với *Thermomyces lagnuginosus* JFT-102 và *Thermomyces lagnuginosus* chủng RMB. Chủng RMB (tái tổ hợp) có khả năng sinh tổng hợp phytaza chịu được nhiệt độ cao bởi sử dụng môi phytaza từ chủng gốc chính là *Thermomyces lagnuginosus* ATCC 200065. Quan hệ xa hơn nữa với FCBT4 và FCBT3 là *Thermomyces lagnuginosus* FLN6c và *Thermomyces lagnuginosus* chủng QH07 được phân lập từ phân ngựa ở Ấn Độ. Cả 2 chủng trong giải pháp hữu ích này đều có khả năng sinh tổng hợp 6 enzym ngoại bào gồm: CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylaza trên môi trường lỏng với hoạt tính khác nhau.

Đối với chủng FCBT5 thì vị trí phân loại thuộc chi *Chaetomium*. Các đại diện của chi này được quan tâm rất nhiều và được nghiên cứu khá kỹ bởi chúng đa số có khả năng sinh các chất có khả năng kiểm soát bệnh của cây. Riêng *Chaetomium thermophilum* đã được giải trình tự cả bộ gen để phục vụ cho việc tìm kiếm nguyên liệu di truyền cho công nghiệp chuyển hóa lignoxenluloza từ phụ phế liệu nông nghiệp. Các thông tin thu thập được cho thấy đa số chúng được phân lập từ các nguồn rất khác nhau. Chủng FCBT5 trong giải pháp hữu ích này được phân lập từ đồng ủ compost, ở đó nhiệt độ lên tới 72 - 75 °C và trình tự vùng ITS thu được thấy gần gũi nhất với *Chaetomium thermophilum* var. *dissitum* chủng CBS 143.50 đã được phân lập từ các đồng nguyên liệu đầu vào cho công nghiệp sản xuất mía đường. Chủng FCBT5 cũng gần gũi với *Chaetomium thermophilum* chủng GF-1. Chủng này đã được các nhà khoa học sử dụng để làm giống ủ compost

khi phối hợp với loài *Bacillus subtilis* mà vật liệu ủ là cây đã hộc hay cây khô sâu cho rế (*Sophira flavescens*) tạo nên chất lượng compost cao với thời gian chín nhanh và tỷ lệ nảy mầm của hạt kiểm định cao hơn 30% so với ủ không bổ sung giống vi sinh vật trên. Chủng FCBT5 có quan hệ xa hơn với *Chaetomium thermophilum* var. *dissitum* chủng NBRC 31897 được phân lập từ đất ngập nước tại Nhật Bản năm 1985 trên môi trường yến mạch ở 37°C. Chủng FCBT5 có quan hệ di truyền xa hơn với *Chaetomium globosum* chủng E. Tuy chưa tìm được chủng E với các đặc tính chính xác nhưng những gì đã công bố về loài nấm sợi này thấy chúng có ứng dụng rất nhiều để kiểm soát bệnh ở hàng loạt loại cây trồng có giá trị công nghiệp. Chủng *Chaetomium* sp. FCBT5 trong giải pháp hữu ích này cũng sinh tổng hợp các enzym được đánh giá trên môi trường rắn như CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylaza.

Chế phẩm vi sinh từ 2 nấm sợi *Thermomyces* sp. FCBT3 và *Thermomyces* sp. FCBT4 dạng lỏng: để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích chứa dịch nuôi cấy của 2 chủng nấm *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 theo tỷ lệ 1:1 và lên men rắn chủng *Chaetomium* sp. FCBT5 tạo dạng bột để sử dụng cùng với 2 chủng trên, sao cho tỷ lệ 3 chủng là 1:1:1. Mật độ vi sinh vật của mỗi chủng đạt khoảng 10^9 - 10^{10} MPN/ml chế phẩm hay 10^9 - 10^{10} MPN/g chế phẩm khô có độ ẩm dưới 20%. Nuôi cấy 2 chủng nấm *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 trên môi trường lỏng và thu giống cùng bào tử của từng chủng riêng rẽ trong môi trường TSH3 với thành phần gồm 200 g/l dịch chiết khoai tây; 10 g/l đường glucoza; 5 g/l cám gạo, 3 g/l NaNO_3 , 1 mM CuSO_4 , độ pH = 6, ở 55 °C trong thời gian 5-7 ngày. Chủng *Chaetomium* sp. FCBT5 được nuôi trên môi trường rắn với thành phần gồm cám gạo 70%; lõi ngô 20%; rơm 10%, 1 mM CuSO_4 với độ ẩm 65%, ở nhiệt độ 55°C. Thời gian để nấm sợi này có hoạt tính là 9 ngày. Sau đó, trộn lẫn 2 dịch nuôi cấy từ *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và hòa trong nước muối sinh lý giống của *Chaetomium* sp. FCBT5 ở dạng bột để tưới lên đồng ủ hay trộn đều với vật liệu ủ bằng thiết bị cơ giới. Kết quả là ta có chế phẩm theo giải pháp hữu ích tiện lợi cho việc sử dụng. Đây là chế phẩm dạng lỏng (dịch thể) có thể bảo quản ở tủ lạnh thông

thường trong thời gian 3-5 tháng. Riêng chế phẩm ở dạng bột có thể bảo quản 2-3 năm ở nhiệt độ thường ở nơi thoáng mát khi độ ẩm cuối cùng của chế phẩm nhỏ hơn 20 %.

Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh từ nấm sợi để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích có thể được sản xuất ở dạng rắn (bột rắc). Trong đó, chủng giống của 3 chủng nấm *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và *Chaetomium* sp. FCBT5 được lên men rắn để thu chế phẩm theo giải pháp hữu ích. Môi trường lên men rắn, mà sau này đóng vai trò chất mang rắn trong chế phẩm, bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền tới kích thước khoảng 0,3-0,4cm và 70% cám gạo; 20% lõi ngô; 10% rơm và 1mM CuSO₄ với độ ẩm 55- 59%, ở nhiệt độ 55°C. Giống của 3 chủng nấm *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và *Chaetomium* sp. FCBT5 được bổ sung theo tỷ lệ 1:1:1 vào môi trường lên men rắn mô tả ở trên, và tiến hành lên men ở 55°C trong thời gian 7-10 ngày. Đây là thời gian thích hợp để chủng giống sinh trưởng, phát triển và tạo bào tử. Sau 7-10 ngày, khi bào tử đã được tạo thành, môi trường lên men rắn sẽ được sấy ở 50°C cho đến khi độ ẩm xuống 15-19%, thu được chế phẩm vi sinh từ nấm sợi để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích ở dạng rắn (bột rắc). Mật độ nấm sợi của mỗi chủng đạt 10⁹-10¹⁰ MPN/g chế phẩm. Chế phẩm này có thể được bảo quản ở nhiệt độ thường trong thời gian 2-3 năm.

Khi sử dụng, chế phẩm vi sinh từ nấm để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích ở dạng lỏng sẽ được tưới trực tiếp lên đồng ủ còn chế phẩm dạng rắn sẽ được rắc vào đồng ủ hữu cơ theo từng lớp (cứ một lớp nguyên liệu ủ phân hữu cơ, lại rắc một lớp chế phẩm, rồi lại đến một lớp nguyên liệu ủ phân hữu cơ, cuối cùng là một lớp nguyên liệu ủ phân hữu cơ) theo tỷ lệ 0,5 kg-1,5 kg/1m³ nguyên liệu ban đầu. Việc xác định lượng chế phẩm theo giải pháp hữu ích được sử dụng tùy thuộc vào việc sử dụng chế phẩm này riêng biệt hay kết hợp với các chế phẩm tương tự khác. Chế phẩm vi sinh từ nấm để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích ở dạng rắn theo giải pháp hữu ích có thể được sử dụng riêng

lê hoặc kết hợp với các chế phẩm khác, tùy theo nhu cầu của người sử dụng. Các chế phẩm được sử dụng kết hợp này có thể là chế phẩm bất kỳ hữu ích trong việc phân huỷ hữu cơ để sản xuất phân hữu cơ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Thực hiện ủ phân hữu cơ từ thân, lá cây ngô và phân gia súc. Vật liệu là sinh khối nói chung, có thể là rom rạ, cỏ dại (cỏ nển) mọc hoang, v.v., ở nhiều tỉnh có bờ biển có cửa sông với sông suối chảy vào. Tỷ lệ của vật liệu là phụ phế liệu từ ngô là 3 phần bao gồm thân, lá cây ngô là phế liệu nông nghiệp thuộc loại sinh khối của phụ phế liệu nông nghiệp rất khó phân huỷ và khó chuyển hóa thành phân bón hữu cơ vi sinh vật. Cho nên thân và lá ngô chỉ sử dụng để đun nấu và đốt. Thân, lá cây ngô được cắt ngắn tới kích thước từ 2 cm đến 5 cm, sau đó trộn thật đều với 2 phần phân trâu bò tạo thành nguyên liệu là hỗn hợp với sự điều chỉnh độ ẩm tối ưu từ 53- 59%. Nếu độ ẩm của đồng ủ dưới 50% và cao hơn 60% thì hiệu suất chuyển hóa sẽ bị giảm hay tạo mùi hôi thối do sự sinh trưởng của vi sinh vật kỵ khí. Vì quá trình ủ compost là quá trình phân huỷ, chuyển hóa sinh học ở điều kiện hiếu khí nên sản phẩm trung gian và cuối cùng là nhiệt, NH_3 , CO_2 , mùn, các hợp chất dễ tiêu của K, P v.v. Tuy nhiên việc tính toán cân bằng C/N để NH_3 bay hơi ít nhất là rất quan trọng.

Hỗn hợp ủ được đắp thành đồng với độ cao 1,5- 2 m trên nền nhẵn như gạch, bê tông hay lót bạt không thấm nước, có độ dốc khoảng 5-7 độ. Đưa nguyên liệu là thân, lá cây ngô và phân trâu bò vào đồng ủ, rắc chế phẩm dạng bột hay hòa chế phẩm dạng lỏng đều theo lớp (thân, lá ngô – phân trâu bò và chế phẩm) theo tỷ lệ trong nằm khoảng 3:2 và 0,1-0,3% và tưới nước điều chỉnh độ ẩm của đồng ủ trong khoảng 50 - 59%. Nếu đồng ủ có khối lượng $>3\text{m}^3$ phải có ống thông khí là các ống nhựa PVC có bố trí lỗ 0,8cm, các lỗ cách nhau 6cm. Quy trình công nghệ chi tiết hơn sẽ được mô tả tỷ mỉ ở một giải pháp hữu ích khác. Sử dụng giống nấm ưa nhiệt linh động trong giải pháp hữu ích này khi kết hợp với vi khuẩn và xạ khuẩn cho tất cả các quy trình ủ khác nhau kể cả sản xuất compost công nghiệp với sự hỗ trợ của các thiết bị thổi khí, đảo trộn cơ khí và tự động hóa.

Dùng bạt không thấm nước dày kín đồng ủ và để nguyên đồng ủ phân hủy và chuyển hóa từ 2,5- 3 tháng. Trong trường hợp có ống thông khí thì để đầu ống thông khí hở ra ngoài bạt. Sau 1 tháng ủ, tiến hành kiểm tra và đảo trộn những vị trí khô chưa phân hủy với những vị trí đã phân hủy để cả đồng ủ được phân hủy và chín đều. Mỗi tháng lấy mẫu để kiểm tra mức độ phân huỷ và xác định hoạt tính một số enzym ngoại bào trong đồng ủ, đánh giá mật độ vi sinh vật trong đồng ủ và một số chỉ tiêu khác. Quan trọng hơn cả là theo dõi nhiệt độ hàng ngày ở giai đoạn đầu tiên hay ít nhất cũng 2 ngày một lần để vẽ đồ thị. Việc xác định nhiệt độ rất quan trọng vì đây là đánh giá sự khác biệt của việc bổ sung vi sinh vật ưa nhiệt và ủ trong điều kiện đơn giản nhất nhưng chất lượng compost vẫn đảm bảo cho yêu cầu của sản xuất sạch và hữu cơ. Ba chủng nấm sợi thuộc loại ưa nhiệt linh động, vì chúng không sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 65°C. Một số chỉ tiêu như số lượng vi sinh vật ưa nhiệt linh động cùng với các enzym ngoại bào đại diện và độ pH được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Enzym ngoại bào cùng số lượng vi sinh vật ưa nhiệt và độ pH theo thời gian ủ compost từ hỗn hợp thân cây ngô và phân gia súc gia cầm

Chỉ tiêu Thời gian	Độ pH	Enzym ngoại bào	Số lượng vi sinh vật ưa nhiệt (MPN/g khô)
1 tháng	7 – 7,5	CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylaza	$6,7 \times 10^8 - 1,9 \times 10^9$
2 tháng	7,5	CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylaza	$4,6 \times 10^7 - 4,3 \times 10^8$
3 tháng	7,5 – 8,3	CMCaza, chitinaza, proteinaza, xylanaza, lipaza, amylaza	$2,4 \times 10^7 - 1,1 \times 10^8$

Sự thay đổi nhiệt độ trong quá trình chuyển hóa và phân hủy sinh khối của ủ compost thể hiện ở Hình 4.

Sau từ 2,5- 3 tháng, sản phẩm phân hữu cơ đã chín. Các tính chất của phân hữu cơ được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6: Các chỉ số cơ bản của phân hữu cơ được bổ sung bởi hỗn hợp nấm và vi khuẩn, nấm ưa nhiệt và ưa nhiệt linh động trong sáng chế này và 2 sáng chế khác

OM (%)	A.Humic (%)	EC (μ mho/cm)	Nts (%)	Phh (%P ₂ O ₅)	Khk (%K ₂ O)	Cts (%)	Độ pH	VSV gây bệnh
65,8	5,67	1,8x10 ³	1,96	1,02	1,29	25,67	7,5 – 8,3	Không xác định được

Chú thích: OM-hữu cơ tổng số; A.Humic - axit humic; EC-độ dẫn điện; Nts-Nitơ tổng số; Phh-phospho hữu hiệu; Khk- kali hữu hiệu; Cts-cacbon tổng số

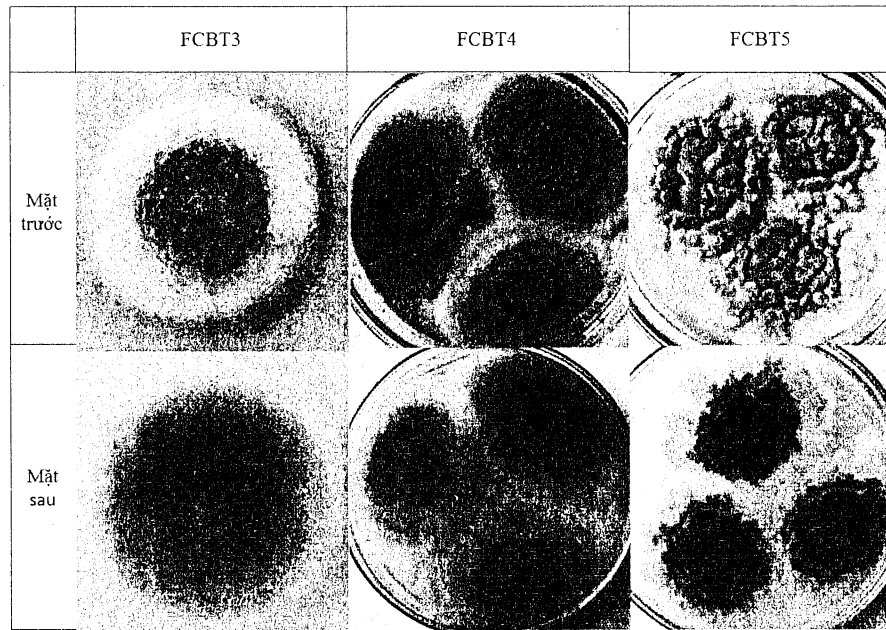
Dựa vào các chỉ tiêu vừa phân tích, có thể thấy phân hữu cơ thu được bằng cách ủ bằng chế phẩm của theo giải pháp hữu ích có chất lượng cao, đáp ứng các tiêu chuẩn về phân hữu để ứng dụng trong các quy trình sản xuất sản phẩm nông nghiệp sạch và hữu cơ.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

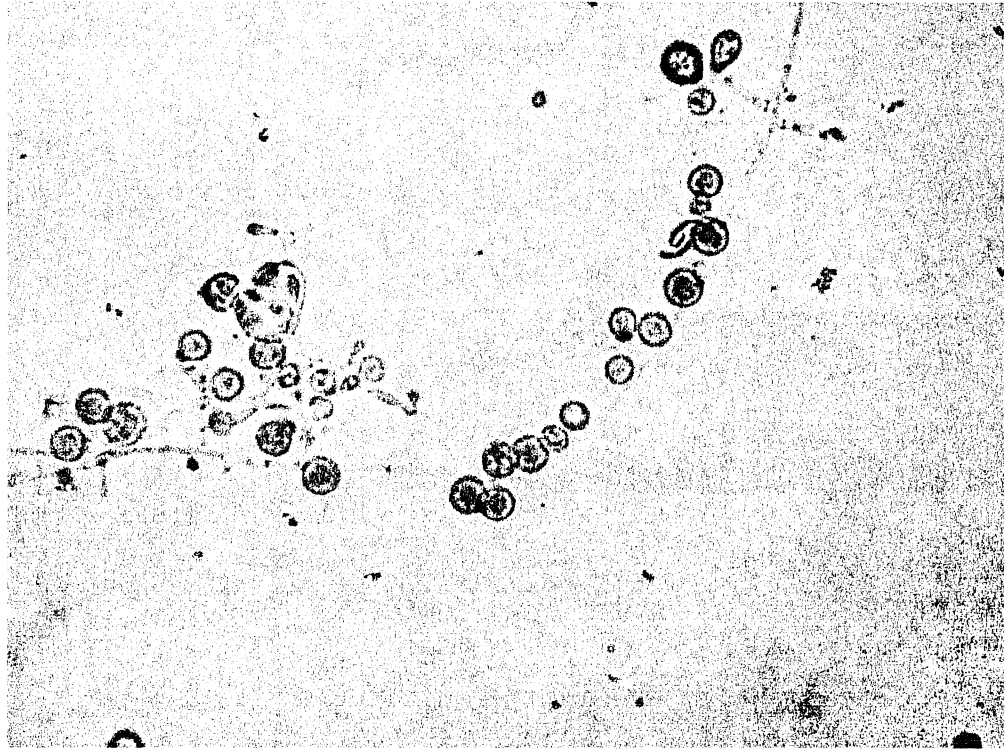
Chế phẩm vi sinh ưa nhiệt linh động từ 3 đại diện thuộc 2 chi nấm sợi *Thermomyces* và *Chaetomium* để sản xuất phân hữu cơ (compost) từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi theo giải pháp hữu ích không những đã sử dụng hiệu quả được nguồn vi sinh vật bản địa tại Việt Nam, mà còn giúp tạo ra được sản phẩm phân hữu cơ chất lượng cao, thích hợp và đạt tiêu chí để ứng dụng trong các quy trình sản xuất sản phẩm nông nghiệp sạch và hữu cơ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

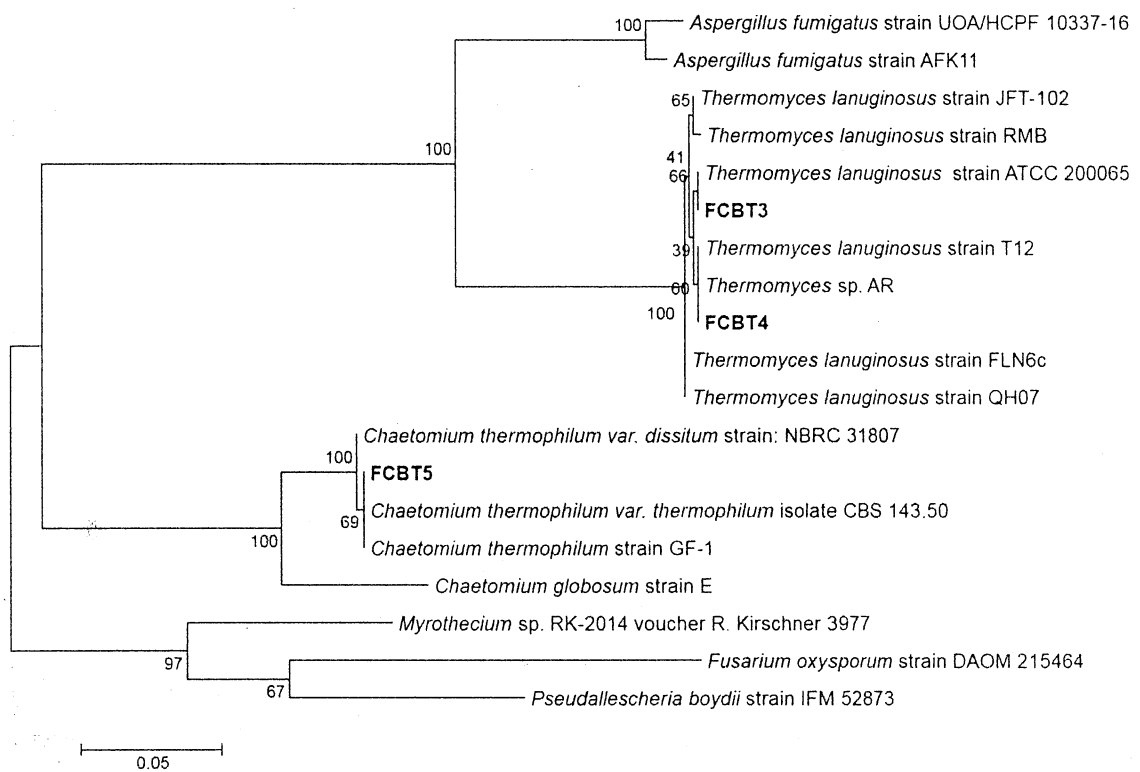
1. Chế phẩm vi sinh dạng lỏng chứa nấm sợi thuộc các chi *Thermomyces* và *Chaetomium* để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi chứa hỗn hợp 2 chủng nấm thuộc chi *Thermomyces* ưa nhiệt linh động là *Thermomyces* sp. FCBT3 và *Thermomyces* sp. FCBT4 và 1 chủng nấm thuộc chi *Chaetomium* là *Chaetomium* sp. FCBT5 theo tỷ lệ 1:1:1, trong đó mật độ mỗi chủng đạt 10^9 - 10^{10} MPN/ml chế phẩm.
2. Chế phẩm vi sinh dạng rắn chứa nấm sợi thuộc các chi *Thermomyces* và *Chaetomium* để sản xuất phân hữu cơ từ phụ phế liệu nông nghiệp và chăn nuôi chứa sinh khối nuôi cấy của 3 chủng nấm *Thermomyces* sp. FCBT3, *Thermomyces* sp. FCBT4 và *Chaetomium* sp. FCBT5 theo tỷ lệ 1:1:1 trên chất mang bao gồm rơm nghiền, thân và lõi ngô nghiền và cám gạo, theo tỷ lệ rơm nghiền:thân và lõi ngô nghiền:cám gạo là 70:20:10, và được bổ sung 1 mM CuSO_4 , trong đó mật độ vi sinh vật của mỗi chủng đạt 10^9 - 10^{10} MPN/g chế phẩm và độ ẩm là 15-19%.



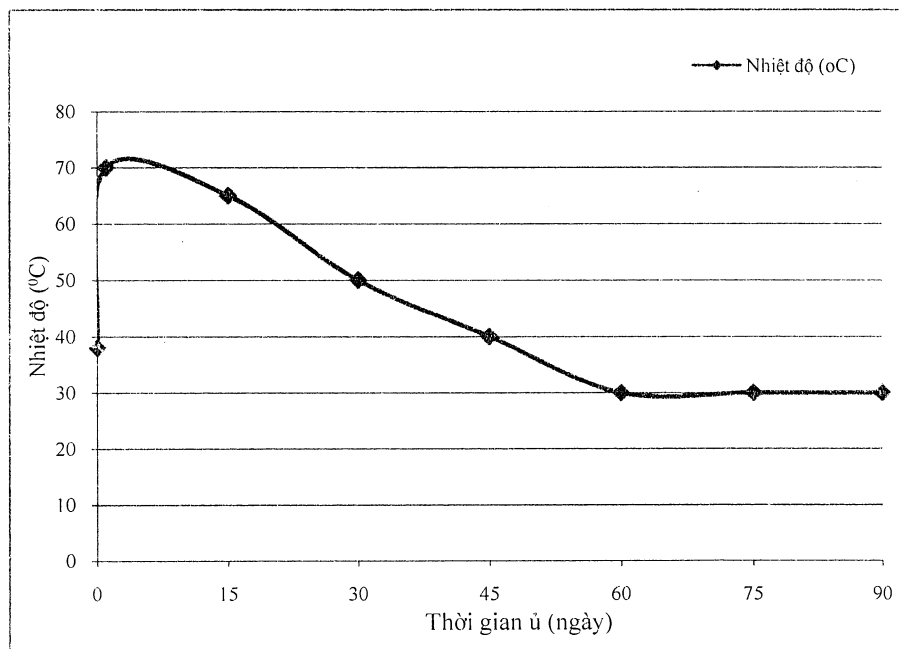
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4