

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC – THỰC PHẨM

GIÁO TRÌNH
MÔN HỌC: SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC
TRONG NÔNG NGHIỆP
NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 761 /QĐ-CĐLTTP-ĐT ngày 17 tháng 08 năm 2017 của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Lương thực - Thực phẩm)



Đà Nẵng, năm 2017

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

LỜI GIỚI THIỆU

Các chế phẩm sinh học ngày càng được quan tâm và được đưa vào sử dụng trong trồng trọt, chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản nhằm mục đích tăng năng suất cây trồng, vật nuôi, tạo ra một nền nông nghiệp sạch, bền vững. Sản xuất chế phẩm sinh học là điều chế, chiết xuất, thu sinh khối từ những thành phần nguyên liệu có sẵn trong tự nhiên, chúng có nguồn gốc từ thực vật (rong, rêu, tảo...), động vật (giun quế, côn trùng...), vi sinh vật... Các sản phẩm này có độ an toàn cao, thân thiện với con người và môi trường, không độc hại cho vật nuôi, cây trồng, thủy sản, xử lý môi trường. Sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp là sử dụng các vi sinh vật có ích và những hoạt chất mà chúng tạo ra giúp cho các đối tượng nông nghiệp nâng cao được khả năng đồng hóa và trao đổi chất, nâng cao tính đề kháng với bệnh tật, tạo ra điều kiện sống hài hòa, cân đối cho cây trồng vật nuôi với thiên nhiên.

Giáo trình “*Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong nông nghiệp*” gồm phần lý thuyết và thực hành tích hợp những kiến thức, kỹ năng, cập nhật những tiến bộ của khoa học kỹ thuật và thực tế sản xuất chế phẩm sinh học trong nước và thế giới. Giáo trình phục vụ cho sinh viên năm cuối các trường đại học, cao đẳng thuộc các ngành Công nghệ sinh học, Công nghệ thực phẩm, Công nghệ sau thu hoạch và những ai quan tâm đến việc sử dụng chế phẩm sinh học đặc biệt là trong nông nghiệp.

Giáo trình gồm 2 phần

Phần I: Lý thuyết: gồm 6 chương

Chương 1: Phân bón vi sinh

Chương 2: Phân hữu cơ sinh học

Chương 3: Các chế phẩm vi sinh bảo vệ thực vật

Chương 4: Chế phẩm kích thích thực vật: GIBERELIN

Chương 5: Chế phẩm probiotic

Chương 6: Các nguồn thức ăn giàu protein dùng làm thức ăn chăn nuôi

Phần II: Thực hành: gồm 5 bài

Bài 1: Xử lý sơ bộ nguyên phụ liệu

Bài 2: Phối trộn và ủ hỗn hợp nguyên phụ liệu

Bài 3: Lên men nguyên phụ liệu

Bài 4: Thu nhận sản phẩm phân hữu cơ sinh học thô

Bài 5: Đóng gói và bảo quản sản phẩm

Giáo trình là cơ sở cho các giáo viên soạn bài giảng để giảng dạy, là tài liệu nghiên cứu và học tập của học sinh, sinh viên ngành “*Công nghệ sinh học*”. Các thông tin trong bộ giáo trình có giá trị hướng dẫn giáo viên thiết kế và tổ chức giảng dạy các môn học một cách hợp lý. Giáo viên có thể vận dụng cho phù hợp với điều kiện và bối cảnh thực tế trong quá trình dạy học.

Để hoàn thiện giáo trình này chúng tôi đã nhận được sự chỉ đạo, hướng dẫn và các ý kiến đóng góp của các nhà khoa học, cán bộ kỹ thuật của các Viện, Trường, cơ sở sản xuất, Ban Giám Hiệu và các thầy cô giáo Trường Cao đẳng Lương thực - Thực phẩm. Chúng tôi xin được gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo các Viện, Trường, các cơ sở sản xuất, các nhà khoa học, các cán bộ kỹ thuật, các thầy cô giáo đã tham gia đóng góp nhiều ý kiến quý báu, tạo điều kiện thuận lợi để hoàn thành cuốn giáo trình này.

Giáo trình “*Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong nông nghiệp*” giới thiệu khái quát về các chế phẩm sinh học dùng trong nông nghiệp và phương pháp sản xuất phân hữu cơ sinh học.

Trong quá trình biên soạn chắc chắn không tránh khỏi những sai sót, chúng tôi mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của các nhà khoa học, các cán bộ kỹ thuật, các đồng nghiệp để giáo trình hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

Đà Nẵng, ngày.....tháng..... năm 2017

Tham gia biên soạn

1. Chủ biên: Phạm Thị Kim Cúc

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU	2
PHẦN I – LÝ THUYẾT	10
CHƯƠNG 1: PHÂN BÓN VI SINH	10
A. Nội dung:	10
1. Phân vi sinh cố định nitơ phân tử từ không khí	10
1.1. Vi sinh vật cố định nitơ phân tử	10
1.2. Sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ	13
2. Phân lân vi sinh (Phân lân sinh học)	16
2.1. Vi sinh vật phân giải lân	16
2.2. Sản xuất các chế phẩm làm phân lân vi sinh	16
3. Chế phẩm vi khuẩn biểu sinh	18
4. Sử dụng phân bón vi sinh vật	19
4.1. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ	19
4.2. Sử dụng phân vi sinh tự do sống hội sinh với cây trồng	20
4.3. Phân vi sinh phân giải lân	20
4.4. Phân vi sinh biểu sinh	21
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	21
C. Ghi nhớ	21
CHƯƠNG 2: PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC	22
A. Nội dung:	22
1. Phân compost	22
1.1. Cơ sở khoa học - công nghệ sản xuất phân hữu cơ sinh học	22
1.2. Phân hủy các hợp chất hữu cơ	22
1.3. Các quá trình hóa sinh – vi sinh trong quá trình ủ	26
1.4. Các chế phẩm vi sinh vật dùng bổ sung trong thời gian ủ	27
1.5. Quá trình tạo mùn	28
2. Công nghệ sản xuất phân hữu cơ sinh học	31
2.1. Sơ đồ	31
2.2. Nguyên liệu	31
2.3. Xử lý nguyên liệu và chuẩn bị môi trường ủ	31
2.4. Ủ	33
2.5. Chế biến phân hữu cơ sinh học từ mùn	36

3. Sử dụng phân bón hữu cơ sinh học	36
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	37
C. Ghi nhớ	37
CHƯƠNG 3: CÁC CHẾ PHẨM VI SINH BẢO VỆ THỰC VẬT.....	38
A. Nội dung:	38
1. Chế phẩm vi khuẩn.....	38
1.1. Vi khuẩn <i>Coccobacillus acridiorum</i>	38
1.2. Vi khuẩn gây bệnh sữa cho ấu trùng bọ hung.....	39
1.3. Vi khuẩn <i>Bacillus cereus</i>	39
1.4. Vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
1.5. Vi khuẩn <i>Serratia marcescens</i>	40
2. Chế phẩm vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
2.1. Đặc điểm của <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
2.2. Cơ chế tác động của tinh thể độc	41
2.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm Bt.....	41
3. Chế phẩm vi nấm diệt côn trùng	45
3.1. Một số đặc điểm của nấm diệt côn trùng	45
3.2. Phân lập và tuyển chọn giống nấm thuần chủng.....	47
3.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm vi nấm.....	48
4. Chế phẩm vi sinh phòng chống bệnh cho cây trồng	50
4.1. Khái niệm chung	50
4.2. Một số bệnh ở cây trồng.....	50
4.3. Các chất kháng sinh và chế phẩm xạ khuẩn.....	51
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	53
C. Ghi nhớ	53
CHƯƠNG 4: CHẾ PHẨM KÍCH THÍCH THỰC VẬT - GIBERELIN.....	55
A. Nội dung:	55
1. Cơ chế sinh tổng hợp gibberelin	55
2. Các giống vi sinh vật có khả năng sinh gibberelin	56
3. Lên men gibberelin.....	56
3.1. Nguyên liệu	56
3.2. Chủng giống	57
3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men.....	57
4. Ứng dụng của gibberelin	58

B. Câu hỏi và bài tập thực hành	60
C. Ghi nhớ	60
CHƯƠNG 5: CHẾ PHẨM PROBIOTIC.....	61
A. Nội dung:	61
1. Probiotic	61
1.1. Khái niệm	61
1.2. Vai trò.....	61
2. Thành phần vi sinh vật trong chế phẩm probiotic.....	63
2.1. Vi khuẩn lactic	63
2.2. Nhóm vi khuẩn Bacillus và các vi khuẩn amon hóa	64
2.3. Vi khuẩn nitrat hóa và phản nitrat hóa	65
2.4. Vi khuẩn khử H ₂ S.....	66
2.5. Nấm men	68
3. Sản xuất chế phẩm probiotic	69
3.1. Nhân giống	69
3.2. Quy trình sản xuất chế phẩm probiotic	69
4. Cách sử dụng chế phẩm	70
4.1. Dạng dịch	70
4.2. Dạng bột	71
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	71
C. Ghi nhớ	71
CHƯƠNG 6: CÁC NGUỒN THỨC ĂN GIÀU PROTEIN DÙNG LÀM THỨC	
ĂN CHĂN NUÔI.....	73
A. Nội dung:	73
1. Các nguồn thức ăn giàu protein	73
1.1. Nguồn gốc động vật	73
1.2. Nguồn gốc thực vật	74
1.3. Vi sinh vật và các phế phẩm ngành công nghệ vi sinh	75
2. Sản xuất các chế phẩm giàu protein làm thức ăn chăn nuôi	76
2.1. Thu sinh khối tảo.....	76
2.2. Thu sinh khối nấm men.....	79
2.3. Sản xuất bột cá nhạt	81
2.4. Sản xuất chế phẩm lysine	81
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	84

C. Ghi nhớ	84
PHẦN II – THỰC HÀNH.....	85
BÀI 1: XỬ LÝ SƠ BỘ NGUYÊN PHỤ LIỆU.....	85
A. Nội dung:	85
1. Chuẩn bị dụng cụ.....	85
1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ.....	85
1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị	87
2. Vận chuyển nguyên phụ liệu về khu vực xử lý.....	89
3. Xử lý sơ bộ nguyên phụ liệu	89
3.1. Xử lý bã thải nấm	89
3.2. Xử lý rơm rạ, thân lá cây họ đậu.....	90
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	90
BÀI 2: PHỐI TRỘN VÀ Ủ HỖN HỢP NGUYÊN PHỤ LIỆU	91
A. Nội dung	91
1. Chuẩn bị dụng cụ.....	91
1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ.....	91
1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị	93
2. Phối trộn nguyên phụ liệu	93
2.1. Cân nguyên phụ liệu.....	93
2.2. Đảo trộn.....	93
3. Làm ẩm khối nguyên phụ liệu.....	94
3.1. Pha nước vôi.....	94
3.2. Tạo ẩm.....	95
4. Đảo trộn.....	95
5. Ủ đồng	95
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	96
C. Ghi nhớ	96
BÀI 3: LÊN MEN NGUYÊN PHỤ LIỆU	97
A. Nội dung	97
1. Chuẩn bị dụng cụ.....	97
1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ.....	97
1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị	97
2. Lên men lần 1	97
2.1. Kiểm tra khối nguyên liệu.....	97

2.2. Bổ sung chế phẩm vi sinh lần 1	98
2.3. Ủ đông	98
2.4. Đảo trộn khối nguyên phụ liệu.....	98
3. Lên men lần 2	99
3.1. Kiểm tra khối nguyên liệu.....	99
3.2. Bổ sung chế phẩm vi sinh lần 2	99
3.3. Ủ đông	99
3.4. Đảo trộn.....	99
4. Những vấn đề thường gặp trong quá trình ủ phân, nguyên nhân và biện pháp khắc phục.....	100
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	100
C. Ghi nhớ	100
BÀI 4: THU NHẬN SẢN PHẨM PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC THÔ.....	101
A. Nội dung	101
1. Chuẩn bị dụng cụ.....	101
1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ.....	101
1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị	101
2. Kiểm tra chất lượng phân hữu cơ sinh học	103
3. Làm khô phân hữu cơ vi sinh.....	103
3.1. Phương pháp phơi tự nhiên	103
3.2. Phương pháp sấy	103
4. Sàng.....	103
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	104
BÀI 5: ĐÓNG GÓI VÀ BẢO QUẢN SẢN PHẨM.....	105
A. Nội dung	105
1. Chuẩn bị dụng cụ.....	105
1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ.....	105
1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị	105
2. Đóng gói sản phẩm.....	107
2.1. Kiểm tra độ ẩm.....	107
2.2. Cân đúng khối lượng.....	107
2.3. Hàn miệng bao	107
3. Bảo quản sản phẩm	107
B. Câu hỏi và bài tập thực hành	108

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔN HỌC	109
-----------------------------------	-----

GIÁO TRÌNH SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC TRONG NÔNG NGHIỆP

Mã môn học: 100409

PHẦN I – LÝ THUYẾT

CHƯƠNG 1: PHÂN BÓN VI SINH

Giới thiệu:

Chương Phân bón vi sinh trang bị cho sinh viên các kiến thức về phân bón vi sinh. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được quy trình sản xuất và cách sử dụng một số loại phân bón vi sinh.

Mục tiêu:

- Phân biệt được các loại phân bón vi sinh;
- Trình bày được quy trình sản xuất các loại phân bón vi sinh;
- Trình bày được các cách sử dụng các loại phân bón vi sinh khác nhau.

A. Nội dung:

1. Phân vi sinh cố định nitơ phân tử từ không khí

1.1. Vi sinh vật cố định nitơ phân tử

Trong khí quyển của hành tinh chúng ta có đến 4 triệu tỷ tấn N_2 phân tử nhưng các sinh vật không sử dụng được nguồn nitơ này, chỉ có một số vi sinh vật mới có thể hấp thụ được. Qua hoạt động sống của vi sinh vật, N_2 phân tử sẽ chuyển thành dạng hợp chất hoặc nitơ vô cơ thành nitơ hữu cơ (các acid amin, protein), quá trình này được gọi là sự cố định nitơ phân tử.

Nhiều loài vi sinh vật có khả năng cố định nitơ phân tử. Chúng bao gồm 3 nhóm chính: nhóm vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh, nhóm vi khuẩn cố định nitơ sống tự do và nhóm vi tảo cố định nitơ. Ngày nay người ta đã biết tới 40 loài tảo lam (vi khuẩn lam) có khả năng cố định nitơ, 1 ha lúa nước có tảo lam có thể cố định được 30 - 35 kg N trong một năm.

1.1.1. Vi khuẩn cố định N_2 sống tự do: thuộc họ *Azotobacteraceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*.

- *Azotobacter*

Azotobacter là vi khuẩn sống tự do, hô hấp hiếu khí, không có bào tử. Tế bào hình trứng, thường sinh chất nhầy ngoại bào. Chúng sinh trưởng nhanh, catalase (+), thích hợp pH trung tính hoặc kiềm yếu. Khi nuôi cấy *Azotobacter* trong môi trường nhân tạo, chúng biểu hiện đặc tính đa hình: khi còn non chúng có dạng trực khuẩn hình que, có tiên mao, có khả năng năng di động. Khi già, *Azotobacter* có khả năng di động, tế bào chuyển thành dạng hình cầu, xung quanh được bao bọc bởi một lớp nhầy. Một

số loại *Azotobacter* có khả năng hình thành nang xác vỡ, tế bào lại sinh trưởng, phát triển. Nang xác là một hình thức tồn tại của *Azotobacter*, nó không phải là bào tử. Một nang xác có thể bao bọc một số tế bào bên trong. Khuẩn lạc của *Azotobacter* lúc non còn có màu trắng đục. Khi già chuyển thành màu lục hoặc màu nâu.

Trong đất, nhất là đất lúa, thường có phổ biến những loài *Azotobacter* sau:

+ *Azotobacter beUerincbii*: không có khả năng di động, có khả năng hình thành nang xác. Khuẩn lạc lúc già có màu vàng hoặc màu nâu sáng, sắc tố không khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter chroococcum*: có khả năng di động lúc còn non, khi già có khả năng hình thành nang xác. Khuẩn lạc lúc già có sắc tố màu nâu hoặc màu đen, không khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter uinelandii*: có khả năng di động và hình thành nang xác. Khuẩn lạc màu huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter agillis*: có khả năng di động, không tạo thành nang xác, khuẩn lạc màu vàng lục huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

Azotobacter có khả năng đồng hóa nhiều loại đường khác nhau, nhất là các sản phẩm phân giải của xenlulose. Bởi vậy, đất có bón phân xanh, rơm rạ, rác rưởi rất tốt cho sự phát triển của *Azotobacter*. Sự phát triển và khả năng cố định nitơ của *Azotobacter* phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng phospho dễ tiêu trong môi trường. Ngoài ra, canxi và các nguyên tố vi lượng như B, Mo, Fe, Mn cũng rất cần thiết đối với *Azotobacter*. Một vài nguyên tố phóng xạ có tác dụng kích thích sinh trưởng đối với *Azotobacter*.

Azotobacter thích hợp nhất với pH = 7,2 - 8,2, song chúng có thể phát triển được pH = 4,5 - 9.0. Chúng thích hợp với nhiệt độ 25 - 30°C.

Azotobacter đã được nghiên cứu để chế tạo phân vi sinh vật bón cho lúa, ở một số nơi chúng thể hiện hiệu quả tốt nhưng không phổ biến bằng phân vi khuẩn nốt sần nitragin. Chế phẩm chế tạo từ *Azotobacter* được gọi là azotobacterin.

- *Clostridium*

Clostridium được phát hiện từ năm 1893, là một loài vi khuẩn kỵ khí sống tự do trong đất. Khác với *Azotobacter*, nó có khả năng hình thành bào tử. Loài phổ biến nhất trong đất là *Clostridium pasteurianum* có hình con thoi do bào tử hình thành lớn hơn kích thước tế bào.

Clostridium có khả năng đồng hóa nhiều nguồn cacbon khác nhau như các loại đường, rượu, tinh bột,... Nó thuộc loại kỵ khí nên các sản phẩm trao đổi chất của nó thường là các loại axit hữu cơ, butanol, etanol, axeton,... Đó là các sản phẩm chưa được oxy hóa hoàn toàn. P, K là 2 nguyên tố rất cần thiết cho sự phát triển và cố định nitơ của *Clostridium*.

Ngoài ra, các nguyên tố vi lượng như Mo, Co, Cu, Mn cũng rất cần thiết đối với *Clostridium*. *Clostridium* có khả năng phát triển ở pH = 4,7 - 8,5. Bào tử của chúng có thể chịu được nhiệt độ cao, có thể sống được 1 giờ ở nhiệt độ 80°C. Một số loài còn có thể chịu được nhiệt độ 100°C trong 30 phút.

Ngoài những giống vi sinh vật cố định nitơ phân tử nói trên, còn vô số những giống khác đều có khả năng cố định nitơ phân tử, chúng có nhiều ý nghĩa trong sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp.

1.1.2. Vi khuẩn cố định N_2 sống cộng sinh

- *Vi khuẩn nốt sần họ đậu*: được phân lập từ rễ cây họ đậu và có tên là *Rhizobium*. Khi cố định trong nốt sần cây họ đậu, các vi khuẩn *Rhizobium* hấp thụ nitơ không khí để cung cấp nitơ vô cơ cho cây và cây đậu cung cấp cho chúng nguồn glucid.

Trong quá trình nuôi cấy, vi khuẩn nốt sần thường có sự thay đổi hình thái. Lúc còn non, đa số các loài có hình que, có khả năng di động bằng đơn mao, chùm mao hoặc chu mao tùy từng loài. Sau đó trở thành dạng giả khuẩn thể (bacteroid) có hình que phân nhánh, mất khả năng di động. Ở dạng này, vi khuẩn nốt sần phình to có hình côn, hình chùy, hình chữ X, V,... và có khả năng cố định nitơ. Khi già, dạng hình que phân nhánh phân cắt tạo thành dạng hình cầu nhỏ.

Vi khuẩn nốt sần thuộc loại hiếu khí, ưa pH trung tính hoặc hơi kiềm, thích hợp với nhiệt độ 28 - 30°C, độ ẩm 60 - 80%. Chúng có khả năng đồng hóa các nguồn cacbon khác nhau như các loại đường đơn, đường kép, axit hữu cơ, glycerin,... Đối với nguồn nitơ, khi cộng sinh với cây đậu, vi khuẩn nốt sần có khả năng sử dụng nitơ không khí. Khi sống tiềm sinh trong đất hoặc được nuôi cấy trên môi trường, chúng mất khả năng cố định nitơ. Lúc đó, chúng đồng hóa các nguồn nitơ sẵn có, nhất là các nguồn amôn và nitrat. Chúng có thể đồng hóa tốt các loại axit amin, một số có thể đồng hóa pepton. Ngoài nguồn dinh dưỡng cacbon và nitơ, vi khuẩn nốt sần còn cần các loại chất khoáng, trong đó quan trọng nhất là phospho. Khi nuôi vi khuẩn nốt sần ở môi trường có sẵn đạm lâu ngày, chúng sẽ mất khả năng xâm nhiễm và hình thành nốt sần. Đó là điều cần chú ý trong việc giữ giống vi khuẩn nốt sần.

Sự hình thành nốt sần và quan hệ cộng sinh của vi khuẩn nốt sần với cây bộ Đậu:

Quan hệ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây bộ Đậu tạo thành một thể sinh lý hoàn chỉnh. Chỉ trong quan hệ cộng sinh này, chúng mới có khả năng sử dụng nitơ của không khí. Khi tách ra, cả cây đậu và vi khuẩn đều không thể sử dụng nitơ tự do, không phải tất cả các cây thuộc bộ Đậu đều có khả năng cộng sinh với vi khuẩn nốt sần mà chỉ khoảng 9% trong chúng.

Khả năng hình thành nốt sần ở cây đậu không những phụ thuộc vào vi khuẩn có trong đất mà còn phụ thuộc vào các điều kiện ngoại cảnh khác nhau. Ví dụ về độ ẩm, chúng thích ứng với độ ẩm từ 40 - 80%, trong đó độ ẩm tối thích là 60 - 70%. Tuy

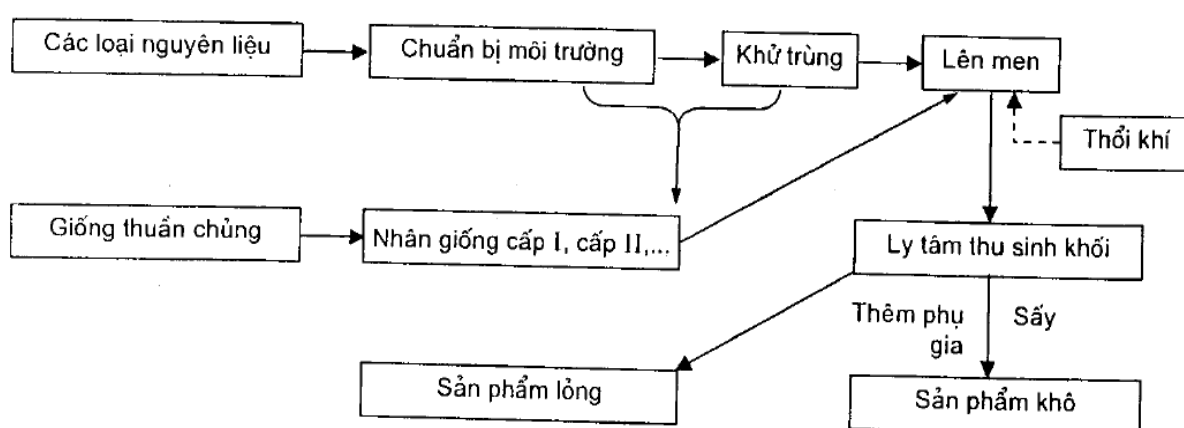
nhiên, cũng có những trường hợp ngoại lệ, ví dụ như cây điền thanh có thể hình thành nốt sần trong điều kiện ngập nước. Độ thoáng khí của đất cũng ảnh hưởng đến sự hình thành và chất lượng nốt sần. Thông thường, nốt sần chỉ hình thành ở phần rễ nông, phần rễ sâu rất ít nốt sần. Nguyên nhân là do tính hiếu khí của vi khuẩn nốt sần, thiếu oxy sẽ làm giảm cường độ trao đổi năng lượng và khả năng xâm nhập vào rễ cây. Đối với cây, thiếu oxy cũng làm giảm sự hình thành sắc tố leghemoglobin. Những nốt sần hữu hiệu có màu hồng chính là màu của sắc tố này.

Nhiệt độ thích hợp nhất với hoạt động của vi khuẩn nốt sần là 24°C, dưới 10°C nốt sần vẫn có thể hình thành nhưng hiệu quả cố định nitơ giảm. Ở nhiệt độ 36°C, cây đậu phát triển tốt nhưng cường độ cố định nitơ lại kém. pH môi trường cũng ảnh hưởng đến sự hình thành và chất lượng nốt sần. Có loại chỉ hình thành nốt sần ở pH = 6,8 - 7,4 có loại có khả năng hình thành nốt sần ở pH rộng hơn, từ 4,6 – 7. Tính đặc hiệu là một đặc điểm quan trọng trong quan hệ cộng sinh với một hoặc vài loài vi khuẩn nốt sần chỉ có khả năng cộng sinh với một hoặc vài loài đậu. Cũng có một số loại vi khuẩn có khả năng hình thành nốt sần ở cây đậu không đặc hiệu với nó nhưng số lượng nốt sần ít và có khả năng cố định nitơ kém. Tuy nhiên, đặc tính này giúp cho vi khuẩn nốt sần có thể tồn tại ở những nơi không có cây đậu đặc hiệu đối với nó. Tính đặc hiệu giữa vi khuẩn và cây đậu được quyết định bởi hệ gen của chúng. Bởi vậy, người ta có thể cải biến tính đặc hiệu bằng các tác nhân đột biến, hoặc có thể dùng kỹ thuật di truyền để cải biến hệ gen quy định tính đặc hiệu cộng sinh.

Vi khuẩn lam: *Anabaena asollae* cộng sinh trong bèo hoa dâu. Toàn bộ lượng nitơ trong protein của bèo là được cố định từ không khí nhờ các vi khuẩn lam sống cộng sinh này.

1.2. Sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ

1.2.1. Quy trình sản xuất



Hình 1.1. Phân vi sinh cố định nitơ

1.2.2. Giống sản xuất

Là giống thuần chủng được phân lập và tuyển chọn từ nguồn tự nhiên, giữ giống trong thạch nghiêng ở điều kiện lạnh trong phòng thí nghiệm. Trước khi sử dụng được cấy chuyển qua ống có môi trường thạch để hoạt hóa giống, sau đó nhân giống

trước khi đưa vào lên men. Có thể nhân giống cấp I, cấp II,... để đảm bảo tiếp chuyển giống có thể gấp 5 - 10 lần qua mỗi lần,

Yêu cầu nhân giống: dịch giống không tạp nhiễm, mật độ từ vài trăm triệu đến hàng tỷ tế bào/ml, thường kết thúc nhân giống ở mỗi cấp tại thời điểm sinh khối phát triển chậm dần khi sắp sửa vào pha cân bằng.

Môi trường nhân giống vi sinh vật cố định Nito tự do

Saccarozo (có thể thay bằng mannit)	15	15 (manitol)	20 (manitol)
K_2HPO_4	0,2	0,5	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2
$CaCl_2$	0,02	$CaSO_4 - 0,1$	$K_2SO_4 - 0,1$
$FeCl_3$ (pha thành dung dịch 10%)	0,05	$NaCl - 0,2$	$NaCl - 0,2$
Muối molipden	Vết	$CaCO_3 - 5,0$	$CaCO_3 - 5$
Nước cho đủ	1 lít	Nước đủ 1 lít	Nước đủ 1 lít
pH	7,2	pH 8,3	pH 8,3

Tùy thuộc vào giống thuần chủng hiếu khí hoặc kỵ khí ta sẽ quyết định nuôi cấy chúng theo phương pháp lên men bề mặt hoặc lên men chìm. Nuôi cấy bề mặt đối với vi khuẩn trên môi trường rắn (hay bán rắn, xốp) đòi hỏi độ ẩm 70 - 80% là khó thông khí (hiếu khí kém) và vi khuẩn không có hệ sợi cơ chất như vi nấm nên rất khó phát triển. Nuôi cấy chìm cần nuôi ở thùng lên men sục khí trong điều kiện vô trùng, nhân giống cấp I có thể thực hiện trong bình tam giác và được đặt trên máy lắc.

1.2.3. Lên men

Lên men trong trường hợp này là nuôi cấy mở rộng vi khuẩn để thu sinh khối chế tạo chế phẩm vi sinh cố định nitơ. Môi trường lên men thường chú trọng nguồn cacbon và nitơ. Nguồn C là các loại đường hoặc manitol hay glyxerol. Nguồn N là nước chiết đậu, nấm men hay dịch thủy phân từ cây hoặc hạt đậu, thêm các nguồn muối khoáng cần thiết.

Nuôi cấy các giống thuần chủng cố định nitơ thường dùng phương pháp lên men chìm. Quá trình lên men cần kiểm soát nhiệt độ, pH, Oxi hòa tan. Đây là quá trình lên men một pha: pha sinh trưởng. Kết thúc lên men khi sinh trưởng đạt ở đầu pha cân bằng, sau đó ly tâm để nhận sinh khối. Lên men công nghiệp ở các bể lên men tới hàng chục mét khối hoặc lớn hơn.

Sinh khối thu được đem trộn với chất mang (thạch cao, đất sét không nghiền nhỏ, đất phù sa khô, nhỏ, hoặc diatomit, than bùn khô,...) và các chất phụ gia, đem sấy khô với nhiệt độ không khí nóng không quá 45°C để đảm bảo các tế bào vi khuẩn sống (qua sấy có thể bị chết một tỷ lệ tế bào nào đó. Mục đích càng giảm tỷ lệ này càng tốt).

Chế phẩm có thể sử dụng ở dạng lỏng, nhưng phải đóng gói kỹ và giữ vệ sinh, hoặc có thêm chất bảo quản. Chế phẩm dạng lỏng thường không giữ được lâu và cần được giữ ở điều kiện lạnh.

Các chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ có nhiều tên gọi khác nhau: Azotobacterin, Rhizobin, Rizogin, Flavobacterin, Nitragin, Niterobacterin, phổ biến hơn cả là Azotobacterin, Nitragim.

*** Azotobacterin**

Azotobacterin là chế phẩm phân bón làm từ vi khuẩn *Azotobacter* sống tự do trong đất và trong vùng rễ của các cây ngũ cốc (lúa, ngô, mạch, cao lương, kê,...), cây mía, hướng dương. Ở vùng rễ của các cây này có rất nhiều vi sinh vật. Chúng ta thấy có các loài thuộc gốc *Azotobacter* và *Azospirillum*. Chúng có khả năng cố định đạm (N.) của không khí nhờ hệ enzym của bản thân xúc tác quá trình chuyển nitơ từ khí quyển thành những hợp chất cho cây có thể tiêu hóa được, cũng như tạo ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật và tăng cường cho cây hấp thu các chất dinh dưỡng khác.

Một số chủng thuộc loài *Azotobacter chroococcum* có hoạt tính cố định nitơ cao và được dùng sản xuất Azotobacterin. Đây là những chủng vi khuẩn không sinh bào tử, hiếu khí. Tế bào trong thời kỳ phân chia thường kéo dài ra hoặc có hình ovan. Kích thước tế bào là 2 - 5 μm . Khi già, xung quanh tế bào tạo thành màng nhầy. Hoạt lực cố định nitơ của chúng được tăng lên khi môi trường có mặt molipden (Mo). Do vậy, môi trường nuôi cấy vi khuẩn cần phải bổ sung kim loại này với tư cách là nguyên tố vi lượng cần thiết.

Nuôi ở nhiệt độ thích hợp là 25 - 27°C trên máy lắc và kết thúc khi sinh khối đạt được ở mức phát triển ổn định. Tách bỏ dịch nuôi cấy bằng ly tâm để thu sinh khối. Sinh khối thu được đem trộn với đất hoặc than bùn đã xử lý, thanh trùng. Cách xử lý đất và than bùn như sau: chọn đất nhiều mùn, có thể là đất phù sa. Than bùn cần phải qua phân hủy sơ bộ bằng axit clohydric rồi trung hòa đưa về trung tính. Nghiền nhỏ những phần thô hoặc tạp chất lớn cần phải loại bỏ qua sàng. Sau đó đất hoặc than bùn được bổ sung 1 - 2% vôi bột hoặc CaCO_3 và 0,1% supephosphat, trộn đều, chia vào các chai hoặc bình nửa lít nút bằng nút bông. Đất hoặc than bùn ở trong bình cần được làm ẩm tới 40 - 60%, đem hấp thanh trùng. Sinh khối được chế thành dịch huyền phù rồi lấy pipet vô trùng hút chuyển vào đất hoặc than bùn đã vô trùng ở trong bình. Mỗi bình tam giác 500 ml, chỉ cần cho vài giọt giống, lắc đều và nuôi tiếp ở tủ ấm.

Giống vi khuẩn có thể nuôi trên môi trường thạch với thành phần dinh dưỡng như đã giới thiệu ở trên. Nhiệt độ nuôi là 20 - 27°C với thời gian là 3 - 5 ngày đến khi trên mặt thạch phủ đều một lớp khối nhầy.

Dùng nước vô trùng để rửa cạo thu sinh khối thành dịch huyền phù giống. Lấy huyền phù giống bằng pipet vô trùng nhỏ vào đất hoặc than bùn vô trùng trong các bình tam giác. Lắc đều và để ở tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn tiếp tục phát triển. Sau khi nuôi cấy, mỗi gam chế phẩm không ít hơn 50 triệu tế bào. Thời gian bảo quản để sử dụng vào khoảng 2 - 3 tháng. Sử dụng chế phẩm cho vào đất canh tác hoặc

xử lý hạt giống bằng cách ngâm hạt với dịch nước hòa với chế phẩm. Bón cho cây theo liều sử dụng là 3 - 6 kg cho 1 ha gieo trồng.

Azotobacterin thích hợp cho các loại cây ngũ cốc cho hạt, có thể tăng sản lượng được 9 - 18 %. Ngoài ra, còn thấy hiệu quả cho cây cà chua, củ cải đường, hoặc củ cải làm thức ăn chăn nuôi, khoai tây.

2. Phân lân vi sinh (Phân lân sinh học)

Phân lân vi sinh hay phân lân sinh học là chế phẩm các vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất phospho khó tan thành dạng dễ tan và cây trồng có thể đồng hóa được

2.1. Vi sinh vật phân giải lân

2.1.1. Nhóm vi sinh vật phân giải lân hữu cơ

Các hợp chất phospho hữu cơ có trong cơ thể động vật, thực vật như phytin, phospholipit, axit nucleic. Trong không bào của tế bào còn thấy dạng vô cơ là orthophosphat làm nhiệm vụ đệm và chất dự trữ. Cây trồng không thể trực tiếp đồng hóa được hợp chất phospho hữu cơ. Các vi sinh vật có thể chuyển hóa các hợp chất hữu cơ này thành các dạng muối phosphat của H_3PO_4 .

Trong số các vi sinh vật phân giải P hữu cơ ta thấy có các loài thuộc giống *Bacillus* (*B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. malaberensis*). *B. megatherium* có khả năng phân hủy hợp chất P hữu cơ và cô vơ. Ngoài ra, còn thấy các chủng vi khuẩn thuộc giống *Serratia*, *Proteus*, *Athrobacter*, các chủng nấm thuộc giống *Aspergillus*, *Penicillium*, *Zhizopus*, *Cunnighamella* và xạ khuẩn *Streptomyces*.

2.1.2. Nhóm vi sinh vật phân giải lân vô cơ

Hợp chất phospho vô cơ (thường gọi là lân vô cơ) thường ở các dạng khoáng như apatit, phosphat sắt, phosphat nhôm. Đây là các hợp chất khó tan và cây trồng không thể đồng hóa trực tiếp được. Để cây trồng sử dụng trực tiếp được, cần phải biến chúng thành dạng dễ tan trong nước.

Nhiều công trình nghiên cứu đã xác định nhiều chủng thuộc các giống vi sinh vật có khả năng phân giải lân vô cơ:

- Vi khuẩn: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Breuibacterium*, *Micrococcus*,...
- Nấm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Zhizopus*, *Sclerotium*,...
- Xạ khuẩn: *Streptomyces*.

2.2. Sản xuất các chế phẩm làm phân lân vi sinh

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân

Nguồn vi sinh vật thường là mẫu đất lấy ở nơi có nhiều chất hữu cơ hoặc vùng rễ cây trồng. Theo phương pháp dịch huyền phù, mẫu được pha loãng cấy vào môi trường thạch vô trùng trong các hộp Petri, sau 6 - 7 ngày, chọn các khuẩn lạc riêng

biệt. Trong môi trường phân lập chủng vi sinh phân hủy lân hữu cơ, người ta thường dùng leucine hoặc axit nucleic làm chất cảm ứng. Trường hợp không có leucine và acid nucleic ta có thể dùng lòng đỏ trứng gà (sau khi luộc chín, lấy lòng đỏ nghiền nhỏ, dùng rượu và acetone kết tủa, cuối cùng dùng rượu hòa tan).

Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải lân hữu cơ

Lơxitin	0,05	MgSO ₄	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	FeSO ₄	Vết
CaCO ₃	5,0	Glucose	10,0
NaCl	0,3	Thạch	15 – 18,0
MnSO ₄	Vết	Nước cho đủ	1 lít

Nuôi các hộp Petri có môi trường đã cấy dịch huyền phù mẫu đất ở 28 - 30°C trong 3 - 4 ngày thấy xuất hiện các khuẩn lạc màu trắng đục hình tròn, có mép nhẵn. Soi tế bào dưới kính hiển vi, nếu thấy tế bào hình que hai đầu hơi tròn, đứng riêng rẽ hoặc kết chuỗi. Đó có thể là vi khuẩn phân giải lân hữu cơ và đây cũng có thể thuộc giống *Bacillus megatherium*.

Môi trường phân lập vi sinh vật phân giải lân vô cơ (có thể dùng môi trường phía trên)

Saccarose	10,0	MnSO ₄	0,03
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	0,03
NaCl	0,3	Ca ₃ (PO ₄) ₂	10,0
KCl	0,3	Thạch	20,0
MgSO ₄	0,3	Nước cho đủ	1 lít

Môi trường sau khi thanh trùng phân vào các hộp Petri, cấy dịch huyền phù mẫu thử trang đều, nuôi ở 28 - 30°C. Sau 5 - 7 ngày xem khuẩn lạc và tế bào. Nếu xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong suốt thì đó là chúng ta cần tìm.

Để kiểm tra, nhỏ dung dịch amoni molipdat (NH₄)₆Mo₇O₂₄.2H₂O vào vòng phân giải, nếu có lân dễ tan sẽ kết hợp với amoni molipdat thành phosphomolipdat có kết tủa màu vàng.

2.2.2. Quá trình lên men theo phương pháp nuôi cấy chìm

Sinh khối thu được có thể thêm chất mang và sấy khô thành chế phẩm vi khuẩn phân giải lân. Chế phẩm phân giải lân hữu cơ làm phân lân vi sinh điển hình là phosphobacterin. Phosphobacterin là chế phẩm phân bón được chế từ vi khuẩn *Bacillus megatherium*. Vi khuẩn hình que nhỏ, kích thước tế bào là (1,8 - 2) x (2,5 - 6) µm. Chúng hiếu khí, tạo thành bào tử và có khả năng kháng hóa rất hữu hiệu các hợp chất phospho hữu cơ, như nucleotide, acid nucleotide, leucine, phytine,... và cung cấp cho cây những hợp chất phospho có thể tiêu hóa được.

Giống thuần chủng có hoạt tính cao phân hủy các hợp chất phospho hữu cơ được nhân giống trên môi trường rỉ đường có thêm cao ngô và muối khoáng trong bình

lắc hoặc bình nuôi có sục khí. Lên men trong bình có khuấy và sục khí đến giai đoạn tế bào vi khuẩn sinh bào tử. Thu sinh khối qua ly tâm, thêm phụ gia rồi sấy khô bằng sấy thăng hoa hoặc sấy phun. Chế phẩm thu được có độ ẩm là 2 - 3%. Mỗi gam chế phẩm cần có ít nhất 200 triệu tế bào sống.

Chế phẩm vi sinh phân giải lân có thể được sản xuất từ nấm mốc. Để có chế phẩm nấm mốc làm phân lân vi sinh, người ta có thể nuôi giống sản xuất theo phương pháp bề mặt trên môi trường xốp đến khi nấm sinh bào tử già thì đem sấy khô ở dưới 40°C, sau đó trộn với chất mang.

3. Chế phẩm vi khuẩn biểu sinh

Các vi khuẩn biểu sinh thường sống trên bề mặt thực vật, như trên lá, thân, rễ cây. Chúng sử dụng chất chiết ra từ cây. Người ta đã chọn những chủng thuộc giống *Pseudomonas* hoặc *Pseudobacterium* có hoạt tính cao, kích thích sinh trưởng bộ rễ, rút ngắn thời gian sinh trưởng và tăng năng suất cây trồng. Có hiệu quả như vậy là do chúng sinh tổng hợp được vitamin nhóm B, heteroauxin làm kích thích sinh trưởng cho cây trồng (và còn nhiều chất có ích khác).

Các chủng vi khuẩn thuộc 2 giống trên không sinh bào tử, mọc tốt trên môi trường có hydratcacbon và dịch chiết từ thực vật.

Sau đây sẽ dẫn ra một môi trường nuôi cấy các vi khuẩn này (g/):

Cám mì (nhưng được dùng qua dịch chiết)	20
Saccarozơ	10
Pepton	2,5
Nước cho tới	1 lít
pH	7

Nhân giống vi khuẩn trong bình lắc, lên men ở trong bình có khuấy và sục khí 2 - 3 ngày ở nhiệt độ 26 - 28°C đến khi sinh khối đạt 4 - 8g/l (tính theo chất khô). Ly tâm thu sinh khối ở dạng nhão có độ ẩm 89 - 92%, trộn với cao lanh khô, vô trùng làm chất độn hút nước theo tỷ lệ 1 : 1, rồi sấy khô tới độ ẩm 7%. Chế phẩm này có 40 - 60% tế bào sống. Nếu sấy thăng hoa cần có chất bảo vệ là đường, gelatin,...

Chế phẩm này dùng cho 1ha gieo trồng không quá 0,5 kg cho tăng năng suất khoảng 10 - 15%, đối với cây có củ tới 20%.

Ngoài các chế phẩm phân bón từ vi khuẩn như giới thiệu ở trên, người ta còn chú ý đến các chế phẩm từ nấm và đặc biệt từ tảo. Tảo *Anabeana* sống hội sinh với bèo dâu là một dạng phân bón sinh học giá trị cao, vì nó có khả năng cố định đạm mạnh mẽ. Sinh khối tảo lam (*Cyanobacteria*) làm chế phẩm khô bón cho ruộng lúa nước đạt hiệu quả lớn, vì tảo này có hoạt tính cố định N₂ cũng rất cao.

Ngoài các loại chế phẩm vi sinh như trên, ngày nay còn sản xuất dạng chế phẩm vi sinh hỗn hợp gồm các loại vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn dị dưỡng có khả năng

khoáng hóa các chất hữu cơ, đề kháng các loại vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng,... làm phân bón sinh học đa năng.

4. Sử dụng phân bón vi sinh vật

Như trên ta đã biết, phân bón vi sinh vật là những chế phẩm vi sinh có mật độ tế bào sống từ vài vạn đến hàng chục triệu (hoặc hơn tùy theo công nghệ chế tạo) CFU/g hoặc ml. Khi được bón cho cây (đưa vào đất hoặc phun lên cây, hoặc có thể ngâm với hạt giống) các tế bào sống này sẽ sinh sôi nảy nở, phát triển. Qua hoạt động sống của chúng ở trong đất, đặc biệt ở vùng rễ sẽ phát huy tác dụng:

- Cố định nitơ phân tử (N_2) của không khí thành NH_3 - nguồn nitơ dễ đồng hóa, hoặc chuyển hóa các hợp chất lân hữu cơ và vô cơ khó hòa tan thành dễ tan, dễ tiêu đối với cây trồng.

- Tăng năng suất cây trồng: Hỗ trợ cho cây tăng sức đề kháng đối với một số bệnh cây.

- Cải tạo đất

Cách sử dụng phân bón vi sinh vật như sau:

Từ chế phẩm gốc pha loãng rồi đem ngâm với hạt giống trước khi gieo hoặc tưới vào đất hay phun lên cây, lá. Cũng có thể đem chế phẩm trộn lẫn với đất bột rồi bón cho cây. Phân vi sinh vật dùng phối hợp với phân chuồng hoặc với phân đạm và phân lân cho năng suất cao hơn và giảm được lượng phân khác khi không dùng phân vi sinh vật.

4.1. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ

- Đối với chế phẩm vi khuẩn nốt sần cộng sinh với cây họ Đậu thường trộn vào hạt giống trước khi gieo hoặc tưới phủ sớm không muộn hơn 20 ngày sau khi cây mọc. Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần cao nhất ở các vùng đất bạc màu, nghèo dinh dưỡng và vùng đất mới trồng cây họ Đậu.

- Đối với chế phẩm vi sinh vật sống tự do ở đất thường được hồ vào hạt, hoặc rắc cây khi còn non, hoặc bón vào đất (bón càng sớm càng tốt).

Bón phân vi sinh vật vào đất thường theo các cách sau đây:

- + Trộn chế phẩm với đất nhỏ tơi rồi đem rắc đều ra đất (với ruộng cạn), tưới khi gieo hạt hoặc ra mặt ruộng (với ruộng nước).

- + Trộn chế phẩm với phân chuồng hoai, rồi ủ. Sau đó đem bón vào luống rồi gieo hạt (ruộng cạn) hoặc rắc đều ra mặt ruộng (ruộng nước).

- + Trộn chế phẩm với phân chuồng hoai đem bón thúc cho cây (bón càng sớm càng tốt).

- + Nếu dùng bèo dâu hoặc tảo cố định nitơ ta có thể dùng chúng vào ruộng nước để chúng phát triển khắp mặt ruộng.

4.2. Sử dụng phân vi sinh vật cố định N_2 sống hội sinh với cây trồng

Các dạng phân vi sinh vật cố định N_2 sống hội sinh với cây trồng thường được sử dụng với nền là phân N : P : K với phân chuồng (hoặc không có phân chuồng).

Thí nghiệm trên lúa, ngô, chè, các cây rau,... đã thu được kết quả như sau:

Đối với lúa, tất cả các thí nghiệm đều tốt hơn so với đối chứng (chỉ dùng phân nền), năng suất hạt tăng 6 - 12%, có nơi đạt 15 - 20%. Có thể giảm 1kg ure cho mỗi sào, năng suất vẫn cao hơn đối chứng.

Với các cây rau (xà lách, rau diếp, khoai tây,...), khi dùng phân vi sinh cố định N, cũng tăng năng suất khoảng 20 - 30% so với đối chứng. Ngoài ra còn làm tăng sức chống chịu sâu bệnh cho rau và giảm lượng nitrat tồn dư trong rau.

Ở Ấn Độ, bón phân vi sinh vật cố định đạm cho lúa, cao lương và bông, đã làm tăng năng suất nông sản phẩm tương ứng là: 11,4; 18,2; và 6,8%. Ở Nga, bón loại phân này đã thu được tăng năng suất cho khoai tây 12,8 tạ/ha, cho cà chua 28,0 tạ/ha, ngô hạt 32,4 tạ/ha, bắp cải 75,2 tạ/ha.

Ngoài tác dụng tăng năng suất, giảm lượng phân bón vô cơ, phân vi sinh vật có thể sinh ra hàng loạt các hoạt chất sinh học có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng, tăng sức đề kháng sâu bệnh.

4.3. Phân vi sinh phân giải lân

Các vi sinh vật (vi khuẩn và xạ khuẩn, nấm mốc) khi được bón vào đất có tác dụng phân giải hợp chất lân hữu cơ và vô cơ khó tan. Số lượng phân lân vô cơ bón vào đất có thể tới 2/3 được chuyển hóa thành dạng khó tiêu hoặc rửa trôi. Khi có mặt vi sinh vật phân giải lân sẽ nâng cao được hiệu suất sử dụng phân lân và phân giải các hợp chất lân có trong đất.

Sử dụng phân lân vi sinh thường được đưa trực tiếp vào đất:

- Trộn chế phẩm với đất nhỏ to đem rắc vào luống trước khi gieo hạt, hoặc rắc đều ra ruộng nước.

- Chế phẩm với phân chuồng hoai, ủ (hoặc trộn) rồi bón đều vào hốc hạt gieo hoặc rắc đều ra mặt ruộng nước. Loại phân này nếu dùng phối hợp với chế phẩm Emina (chế phẩm vi sinh vật hữu ích của Viện Sinh học Nông nghiệp) kết quả còn cao hơn (chưa có số liệu tổng kết).

- Trộn chế phẩm với đất nhỏ to, hoặc phân chuồng hoai rồi đem bón thúc (càng sớm càng tốt).

Hiệu quả phân lân vi sinh:

- Ở Ấn Độ, bón phân lân vi sinh được đánh giá tương đương với 50kg P_2O_5 /ha. Sử dụng phân vi sinh vật phân giải lân cùng quặng phosphat có thể thay thế được 50% lượng lân khoáng cần bón.

- Sử dụng 250g chế phẩm phosphobacterin (vi khuẩn phân giải lân) cho 1 ha gieo trồng với phương pháp xử lý qua hạt cũng có thể tăng năng suất 10 - 20%. Với đất trồng khoai tây và rau quả cần tăng số lượng chế phẩm sử dụng.

4.4. Phân vi sinh biểu sinh

Loại phân này thường dùng ở dạng lỏng (hoặc từ bột pha thành dịch) rồi phun lên lá, đặc biệt thích hợp với các loại rau ăn lá. Nếu được dùng với các loại phân hữu cơ bón lá thì hiệu quả rất rõ rệt.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Kể tên một số loại phân vi sinh?

Câu hỏi 2: Trình bày quy trình sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ.

Câu hỏi 3: Nêu công dụng và cách sử dụng phân vi sinh phân giải lân.

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Quy trình sản xuất các loại phân vi sinh
- Vai trò và cách sử dụng từng loại phân vi sinh

CHƯƠNG 2: PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC

Giới thiệu:

Chương Phân hữu cơ sinh học trang bị cho sinh viên các kiến thức về phân hữu cơ sinh học. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được công nghệ sản xuất và cách sử dụng một số loại phân bón hữu cơ sinh học.

Mục tiêu:

- Trình bày được cơ sở khoa học của công nghệ sản xuất phân hữu cơ sinh học;
- Phân tích được các cơ chế sinh học trong quá trình sản xuất phân hữu cơ sinh học;
- Trình bày và giải thích được quy trình sản xuất phân hữu cơ sinh học.

A. Nội dung:

1. Phân compost

Các hợp chất hữu cơ có trong xác động, thực vật trước hết phải kể đến xenlulose (glucan), hemixenlulose (xylan), đường - bột, pectin, hợp chất xenlulo - lignin, các hợp chất chứa nitơ (axit nucleic, pepton, axit amin), chất béo và các phức của chúng,... Các hợp chất này thường có trong sinh khối thực vật. Nguyên liệu để sản xuất phân hữu cơ sinh học là những phế thải nông, lâm sản, các trại chăn nuôi, các xí nghiệp chế biến thực phẩm, thủy sản,....

1.1. Cơ sở khoa học - công nghệ sản xuất phân hữu cơ sinh học

Sinh khối thực vật chủ yếu là xenlulose và hemixenlulose, ngoài ra còn có các chất đường - bột, protein, pectin và chất béo. Trong phế thải nông lâm nghiệp, trong các xí nghiệp chăn nuôi, lò mổ, rác thải sinh hoạt và đô thị khá phong phú các hợp chất protein. Trong quá trình ủ các hợp chất hữu cơ có phân tử lượng lớn bị các enzym do vi sinh vật sinh ra thủy phân thành những chất có phân tử lượng nhỏ dần, rồi thành các chất khoáng dinh dưỡng cần thiết cho cây trồng. Trong quá trình phân giải này, các sản phẩm trung gian cũng là những chất dinh dưỡng cho các vi sinh vật dị dưỡng hoại sinh. Vi sinh vật phát triển làm tăng tốc độ phân giải các hợp chất hữu cơ, đồng thời cũng làm tăng sinh khối, tăng giá trị, chất lượng của chất mùn tạo thành.

1.2. Phân hủy các hợp chất hữu cơ

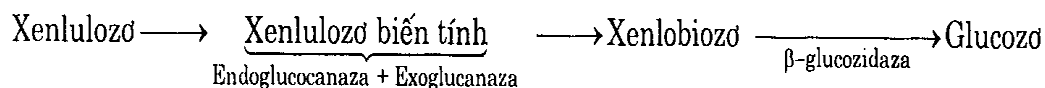
1.2.1. Phân giải các chất hydratcacbon

a. Cellulose (glucan)

Cellulose (glucan) là hợp chất cao phân tử được trùng hợp (polyme hóa) từ các gốc β - D glucose bằng mối liên kết β - 1,4 - glucose nhờ khả năng tự dưỡng dưới ánh sáng Mặt Trời của giới thực vật. Vì vậy, cellulose là hợp chất phổ biến nhất trong tự nhiên.

Hệ vi sinh vật phân hủy xác thực vật chủ yếu là cellulose khá phong phú, gồm có vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc. Chúng có khả năng tiết vào môi trường enzym

thủy phân cellulose là cellulase. Hệ enzym này gồm 3 enzym là endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase. Thủy phân cellulose trong tự nhiên là tác động hiệp đồng của 3 enzym mới cho sản phẩm cuối cùng là glucose.



Nhiều loại vi sinh vật có khả năng sinh cellulase. Đó là các loại nấm mốc mềm, nấm mốc nâu và nấm mốc trắng; nấm ký sinh và vi khuẩn ký sinh trong dạ cỏ của động vật nhai lại; các vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí; các xạ khuẩn.

b. Hemicellulose

Hemicellulose chiếm vị trí thứ hai về khối lượng của các hợp chất hữu cơ phổ biến trong tự nhiên (chủ yếu trong giới thực vật). Thành phần của hemicellulose là các loại đường, trong đó chủ yếu là xylose, vì vậy, nó có tên là xylan. Khối lượng phân tử của xylan ít hơn cellulose rất nhiều, cấu trúc cũng đơn giản và kém bền vững hơn.

Hemicellulose dễ bị phân hủy, khi cùng có mặt với cellulose thì hemicellulose thường bị phân hủy trước và sau đó cũng song song bị enzym thủy phân tác dụng. Với vi sinh vật, trong môi trường có hai chất này làm cơ chất cảm ứng đều có thể sinh ra hai loại enzym thủy phân tương ứng, nhưng enzym hemicellulose thường được tạo thành sớm hơn.

Xylose và mannose là thành phần chủ yếu tạo nên hemicellulose. Xylose và mannose là các loại đường C₅. Cấu tạo hemicellulose ngoài cấu trúc mạch thẳng còn có cấu trúc mạch nhánh. Do vậy, hemicellulase là một phức hệ gồm Endo - 1,4 - β - D - mannase và 1,4 - β - D - xylozidase. Mannase thủy phân xylan thành các oligosaccharide hòa tan trong nước và enzym xylozidase sẽ thủy phân tiếp theo. Sản phẩm cuối cùng là xylose và mannose

Ở đây cũng cần nhấn mạnh một điều là cellulase và hemicellulase là hai phức hệ enzym khác nhau, nhưng chúng có cùng xúc tác tương đồng, đặc biệt là trường hợp phân hủy các xác thực vật, hai enzym này thường tạo thành như cặp song sinh. Trong quá trình phân hủy có những vùng chúng có tác dụng bổ trợ cho nhau hoặc có thể nhận chức năng cho nhau.

Các enzym hemicellulase (xylanase) rất phổ biến trong tự nhiên, chúng được vi sinh vật sinh ra ở đất, nước, trong dạ cỏ động vật,...

c. Tinh bột

Tinh bột là chất dinh dưỡng dự trữ chính ở thực vật, có nhiều ở trong các loại hạt ngũ cốc và củ (khoai lang, khoai tây, sắn,...). Thường tinh bột cấu trúc dạng hình cầu hoặc hình trứng, có lớp vỏ đặc trưng. Tinh bột gồm có 2 glucan: amylose (15 - 17%) - mạch dài, không phân nhánh và amylopectin phân nhánh. Chúng được trùng hợp từ các monomer là D - glucose với các mối liên kết α - 1,4 - và α - 1,6 - glucoside. Amylose hòa tan trong nước nóng, nhưng không trương phồng lên. Chính nó cho màu

xanh khi tác dụng với iot. Amylopectin trương nở trong nước và ở nhiệt độ cao tạo thành hồ tinh bột, khi tác dụng với iot cho màu đỏ huyết dụ hoặc màu đỏ nâu.

Tinh bột dưới tác dụng của enzym amylase sẽ bị thủy phân thành dextrin, đường maltose và glucose. Các enzym amylase thường có trong các hạt và củ nảy mầm, đặc biệt là ở các môi trường nuôi cấy vi sinh vật có tinh bột. Các vi sinh vật có khả năng sinh amylase là nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn.

Các enzym amylase là α - amylase, β - amylase và γ - amylase (glucoamylase).

+ α - amylase thủy phân tinh bột cho các dextrin là sản phẩm chính và một ít đường maltose hoặc glucose, chủ yếu làm loãng hồ tinh bột.

+ β - amylase thủy phân tinh bột cho sản phẩm chính là maltose (đường mạch nha).

+ γ - amylase thủy phân tinh bột thành glucose. Vì vậy, enzym còn có tên là glucoamylase.

Amylase ở thực vật thường chỉ có α và β - amylase; ở nấm mốc có đủ cả 3 enzym, nhưng hơi ít α - amylase; còn ở vi khuẩn giàu α - amylase, nhưng không có (hoặc ít) hai enzym kia.

Như vậy, muốn thủy phân tinh bột thành glucose trông chờ chủ yếu vào enzym của nấm mốc và xạ khuẩn. Trong thực tế, người ta hay dùng phối hợp enzym của vi khuẩn và nấm mốc, hoặc của vi khuẩn, nấm mốc cùng với xạ khuẩn.

* Các chất pectin là hợp chất polymer dạng keo, thuộc loại polysaccharide dị hình, được cấu tạo từ các gốc axit galacturonic với nhau bằng liên kết α - 1,4 - glycozid và một số gốc khác được metyl hóa ở vị trí C₆. Trong thành phần có axit pectinic, axit pectic và protopectin.

Pectin có mặt trong tất cả các mô thực vật bậc cao (khoảng 5%) là thành phần cơ bản của thực vật. Cùng với lignin và cellulose, pectin tham gia vào hình thành bộ khung của thực vật, điều chỉnh độ ẩm và trạng thái của tế bào thực vật.

Pectin có thành phần tan và thành phần không tan trong nước. Loại tan tồn tại chính ở dịch tế bào, loại không tan thấy ở thành tế bào làm tác nhân kết dính giữa các tế bào với nhau.

Pectin bị phân giải bởi enzym pectinase. Enzym này được sản sinh nhờ một số loài vi khuẩn và nhiều loài nấm mốc. Trong xử lý xác thực vật thì nấm đóng vai trò chủ yếu trong việc phân hủy các chất pectin, còn ở điều kiện kỵ khí thì vi khuẩn lại đảm nhận vai trò này.

1.2.2. Phân giải các chất chứa nito

Protein là một trong những thành phần quan trọng của xác động vật, thực vật và vi sinh vật. Protein thường chứa khoảng 15 - 17 % nitrogen (tính theo chất khô). Trong xác động thực vật và các thức ăn giàu protein có nhiều hợp chất hữu cơ có chứa Nitrogen, những hợp chất này có thể được vô cơ hóa do vi sinh vật. Kết quả của các

quá trình phân giải này tạo thành NH_3 dưới dạng muối amôn, do đó sự phân giải này được gọi là quá trình amôn hóa.

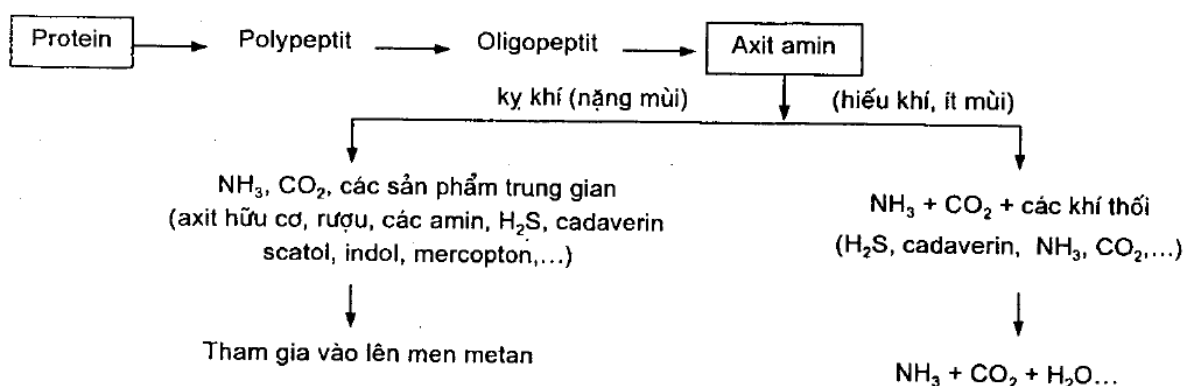
Quá trình amôn hóa là quá trình phân hủy, gây thối rữa các hợp chất hữu cơ có chứa nitrogen do vi sinh vật gây ra. Gồm các quá trình sau :

- Amôn hóa protein.
- Amôn hóa urea và acid uríc.

Protein là hợp chất hữu cơ phức tạp nhất, có mặt trong tất cả các cơ thể sống. Nó cũng có nhiều trong xác các sinh vật, trong các loại thức ăn và nhiều loại vật liệu hàng hóa công nghiệp khác. Quá trình phân giải protein tiến hành thường xuyên trong tự nhiên, đất, nước, trong cả điều kiện yếm khí và hiếu khí.

Quá trình amôn hóa do nhiều loài vi sinh vật gây ra. Các loài vi sinh vật có khả năng hô hấp khác nhau gồm các nhóm vi sinh vật hiếu khí: *Bacillus mycoides* (trực khuẩn đất), *bacillus mesentericus* và *bacillus megatherium*, *bacillus subtilis* và nhóm vi sinh vật yếm khí như: *Clostridium putrificum*, *clostridium sporogenes*. Ngoài ra, còn thấy một số loài nấm tham gia phân hủy protein như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*.

Quá trình amôn hóa được tóm tắt theo sơ đồ sau:



1.2.3. Phân giải lipid (chất béo)

Lipid là hỗn hợp các este của glycerin và axit béo. Glycerin là rượu đa chức, còn gọi là glyxerol. Các axit béo có số nguyên tử cacbon là số chẵn (từ 14 - 22 cacbon). Các axit béo thường gặp có số cacbon là 16 - 18. Các axit béo không no thường chứa một hoặc một số nối đôi trong mạch cacbon.

Lipid có hai nhóm: lipid đơn giản và lipid phức tạp. Lipid đơn giản là dầu mỡ trung tính thường gọi là triglyceride - mỡ động vật hoặc dầu thực vật. Lipid phức tạp ngoài thành phần như lipid đơn giản còn có nitơ, axit phosphoride, axit amin và đường.

Nói chung, chất béo không hòa tan trong nước, khi tác dụng bởi vi sinh vật sinh enzym lipase sẽ bị thủy phân hay bị oxy hóa thành glyxerol và các axit béo. Có rất nhiều chủng loại của vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc có khả năng tiết ra lipase ngoại bào

phân giải được lipid và sử dụng nó như là nguồn dinh dưỡng cacbon, đặc biệt là nguồn cung cấp năng lượng.

1.3. Các quá trình hóa sinh – vi sinh trong quá trình ủ

Trong khối ủ các loại phế thải (chủ yếu từ thực vật) xảy ra hai quá trình vi sinh vật là hiếu khí và kỵ khí. Trong đó quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ của vật liệu ủ như phân trên đã được đề cập đến. Ở đó chúng ta khảo sát các quá trình thủy phân với các hợp chất và enzym thuần khiết, còn trong thực tế, quá trình này xảy ra không hoàn toàn như vậy, vì trong xác thực vật, động vật, đặc biệt là phế thải, rác thải có lẫn nhiều tạp chất, xơ bã khó phân hủy trong đó có lignin nên chỉ có một phần các hợp chất hữu cơ phân hủy tới các sản phẩm cuối cùng, còn lại ở các sản phẩm trung gian của sự phân hủy (phân hủy không hoàn toàn).

1.3.1. Quá trình ủ hiếu khí

Quá trình ủ hiếu khí có sự tham gia của oxy không khí. Ủ hiếu khí thường là đảo trộn định kỳ để khối ủ thoáng khí hoặc san thành những lớp mỏng: nếu ủ ở bể sâu thì phải thổi khí liên tục và cưỡng bức. Nguồn cơ chất là nhiều hợp chất, nên sản phẩm phân giải không bao giờ là một hoặc hai sản phẩm cuối cùng. Sản phẩm trung gian hay sản phẩm cuối cùng (thường là một số, nhất là các loại khí) của quá trình vi sinh vật này có thể lại là cơ chất dinh dưỡng cho quá trình khác tiếp theo.

Đặc điểm của quá trình hiếu khí là cần có oxy của không khí tham gia. Vì vậy, quá trình này chỉ có các vi sinh vật hiếu khí đóng vai trò chủ yếu và sau đó là các vi sinh vật kỵ khí tùy tiện tham gia. Vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm (trừ nấm men) đều tham gia vào quá trình phân giải các chất hữu cơ ở điều kiện hiếu khí. Các giống vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm trong quá trình hiếu khí thấy có:

- Vi khuẩn: *Bacillus*, *Flauobacterium* và *Pseudomonas* khá phổ biến, ngoài ra còn thấy *Achoromobacter*, *Celiulomonas*, *Vibrio*, *Cytophoga*, *Agricoccus*, *Polyngium*,.... Người ta có thấy cổ khuẩn, nhiều loài thuộc nhóm này chịu nhiệt cao.

- Xạ khuẩn có các giống *Micromonospora*, *Proactinomyces*, *Actinomyces*,...

- Nấm có các giống thường gặp là *Aspergillus*, *Penicillium* và *Tricoderma*. Ngoài ra, còn thấy nấm mốc, nấm mùn mềm, nấm mùn nâu, nấm mùn trắng. Các loại nấm mùn có khả năng phân hủy được lignin, nhưng rất chậm.

1.3.2. Quá trình ủ kỵ khí

Trong thực tế, các loại đồng ủ xác động, thực vật khó có điều kiện kỵ khí tuyệt đối. Trong các đồng ủ thường có các khe hở và dù đồng ủ có được phủ kín, kể cả chôn sâu lấp đất kín, vẫn có không khí. Vì vậy, thời gian đầu các đồng ủ, bể ủ thường xảy ra các quá trình vi sinh vật hiếu khí và khi không khí hết, CO₂ sinh ra choáng chỗ môi trường sẽ chuyển sang kỵ khí ở bên trong đồng ủ, còn ở bên ngoài vẫn có thể là hiếu khí.

Trong các quá trình hiếu khí và kỵ khí, các vi sinh vật dị dưỡng hoạt động chủ yếu, phân hủy các chất hữu cơ, biến những chất khó tiêu thành dễ tiêu cho cây trồng. Ngoài ra, còn có vi sinh vật tự dưỡng biến NH_3 thành nitrat (NO_3^-) hợp chất này cây trồng cũng dễ đồng hóa, sau đó nhóm vi khuẩn phản nitrat hóa hoạt động sẽ biến NO_3 thành N_2 bay vào không khí (giai đoạn này sẽ làm giảm giá trị dinh dưỡng của khối mùn). Ngoài các nhóm nitrat hóa, phản nitrat hóa còn có các nhóm vi khuẩn tự dưỡng khử sunfit, khử H_2S cũng nên quan tâm, đặc biệt trong lĩnh vực xử lý ô nhiễm môi trường.

Các vi sinh vật phát triển trong giai đoạn này là nhóm vi hiếu khí, kỵ khí nghiêm ngặt và vẫn có sự có mặt của nhóm vi sinh hiếu khí (bên ngoài của đồng ủ) nhưng tất cả đều thuộc nhóm ưa ấm ($40 - 50^\circ\text{C}$) hay ưa nhiệt độ cao ($>60^\circ\text{C}$).

Những loài nấm ưa nhiệt thường xuất hiện như *Chaetium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Pealomyces* - giả nấm và *Aspergillus fumigatus*.v.v... chúng tham gia vào quá trình phân giải tiếp tục cellulose, hemicellulose trong đồng ủ

Những vi khuẩn xuất hiện ở giai đoạn này như *Pseudomonas denitrificans*, *Bacillus licheniformis*, *Thiobacillus denitrificans*, *Ruminococcus flavefeciens*, *R. albus*, *R. parvum*, *Bacteroides succinigenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Methanobacterium omelianskii*, *Methanosarcina barkerlii*, *Methanopropionicum* .v.v... Những vi khuẩn này bên cạnh khả năng tiết enzyme phân giải glucan và xylan chúng còn có khả năng khử NO_3^- thành N_2 ; SO_4^{2-} thành H_2S ; khử H_2S thành S và biến đổi các chất hữu cơ như acid propionic, acid acetic, acid butyric... thành khí metan CH_4 vì vậy bên cạnh phân hữu cơ người ta còn thu được cả khí đốt trong quá trình ủ phân compost từ rác thải và phân.

1.4. Các chế phẩm vi sinh vật dùng bổ sung trong thời gian ủ

Dựa vào hệ vi sinh vật có mặt và hoạt động trong các bể ủ các bã thực vật mà người ta tạo ra các chế phẩm vi sinh để bổ sung vào các bể ủ hay thiết bị lên men phân giải để đẩy nhanh quá trình phân hủy và nâng cao hiệu quả.

1.4.1. Chế phẩm vi sinh hiếu khí

Nên chọn những chủng vi sinh (vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn) thuần khiết của phòng thí nghiệm rồi nuôi cấy thu sinh khối, sau đó thêm chất mang để thành dạng bột rồi dùng dần.

Vi khuẩn nên chọn những chủng thuộc giống *Bacillus* như: *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. lichenniformis*, *B. thermophilus*...

Nấm mốc thì nên chọn *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Rhizopus* đặc biệt là *Trichoderma viride* và *Cheatonium cellulolyticum*. Qua nghiên cứu người ta thấy rằng những chủng nấm *Trichoderma* ưa ấm và có hoạt tính cellulase rất cao, nhưng *Cha. cellulolyticum* ưa nhiệt có thể phân hủy lignin nhanh gấp 1,5 – 2 lần so với *Trichoderma*.

Xạ khuẩn nên chọn các chủng có mặt khi nhiệt độ môi trường khoảng 65 - 70°C và có thể giữ thuần khiết ở dạng bào tử.

1.4.2. Chế phẩm vi sinh vật kỵ khí

Chế phẩm đơn giản nhất là từ phân trâu, bò tươi vì có nguồn vi sinh vật kỵ khí phong phú. Thường trộn với nguyên liệu ủ theo tỉ lệ 1:10.

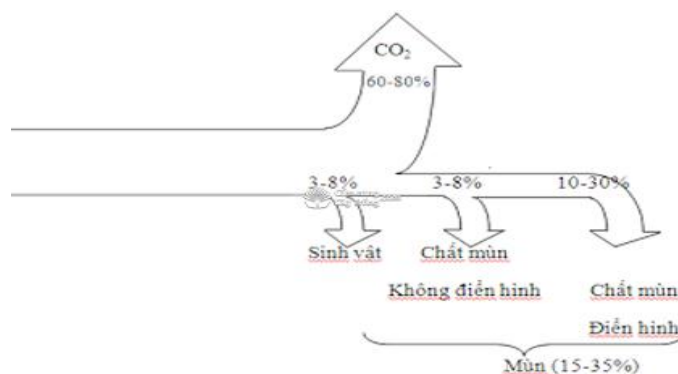
Nguồn thứ hai là dịch rỉ từ các bể chứa phân hay bùn của các bể này.

Nguồn thứ ba là bùn hoạt tính của bể kỵ khí trong dây chuyền xử lý nước thải.

Cũng có thể phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn kỵ khí trước hết là loài thuộc chi *Clostridium*. Công việc này đòi hỏi phải có kỹ thuật cao vì phân lập vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt là rất khó khăn.

1.5. Quá trình tạo mùn

1.5.1. Định nghĩa



Hình 2.1. Con đường tích lũy chất hữu cơ sau 1 năm bón vào đất

Mùn hoá là quá trình phân giải tái tổng hợp các chất hữu cơ tạo thành chất mùn với sự tham gia tích cực của các sinh vật đất.

Mùn là hợp chất hữu cơ cao phân tử phức tạp, chúng là sản phẩm của quá trình mùn hoá các chất hữu cơ thông thường. Người ta cho rằng, mọi thành phần hữu cơ trong đất (protein, lignin, lipid, axit amin, hydratcacbon....) đều có thể là vật chất tham gia hình thành chất mùn đất. Tuy nhiên về bản chất của quá trình hình thành chất mùn vẫn còn có ý kiến khác nhau.

1.5.2. Các quan điểm về sự hình thành mùn

a. Quan điểm hóa học

Những người theo quan điểm hoá học cho rằng quá trình hình thành chất mùn chỉ đơn thuần là các phản ứng hoá học. Đại diện cho quan điểm này như Vacsman, Scheffer.

Theo Vacsman (1936) thì hạt nhân của chất mùn được hình thành do lignin kết hợp với các chất khoáng kiềm trong đất, sau đó các phản ứng oxy hoá sẽ gắn kết thêm các axit hữu cơ khác để hình thành chất mùn. Ngoài ra trong quá trình phân giải các xác hữu cơ, một loại sản phẩm màu đen vô định hình, có thành phần phức tạp được hình thành gọi là chất mùn.

Schefer cho rằng sự hình thành axit humic có thể bằng con đường sinh hoá và cũng có thể bằng con đường hoá học đơn thuần. Bằng con đường hoá học, các axit humic được tạo thành từ các phenol, quinol và các aminoaxit thông qua các phản ứng oxy hoá và trùng hợp.

b. Quan điểm sinh hóa

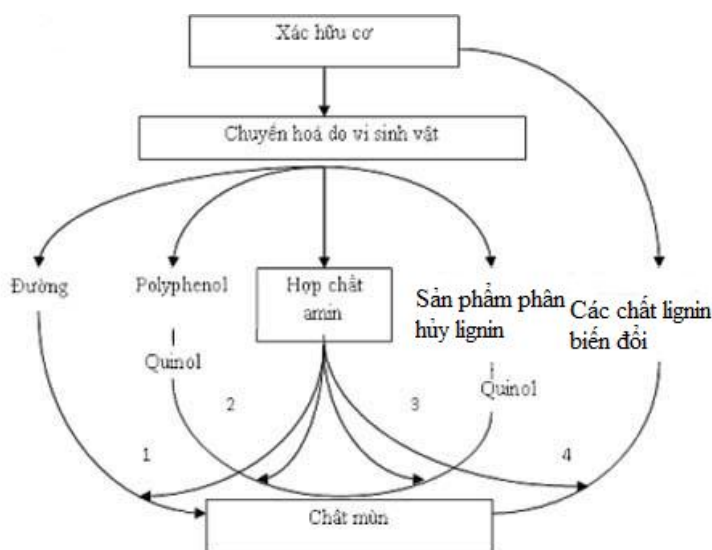
Ngày nay, nhiều bằng chứng cho thấy sự hình thành chất mùn có sự tham gia tích cực của các quá trình sinh hoá, đặc biệt là các vi sinh vật đất. Sự hình thành chất mùn bằng con đường hoá học đơn thuần là rất hạn chế, nó chỉ có thể gặp ở những nơi có điều kiện bất lợi cho các quá trình sinh học như đất quá chua hoặc quá nhiều độc tố. Chúng ức chế các quá trình sinh học xảy ra.

Quan điểm sinh hoá về sự hình thành chất mùn cho rằng chất mùn được hình thành từ sản phẩm phân giải và tái tổng hợp các chất hữu cơ thông thường với sự tham gia tích cực của các phản ứng sinh hoá, đặc biệt là các enzyme do các vi sinh vật tiết ra.

Chiurin là người có nhiều đóng góp trong việc nghiên cứu về mùn đất. Ông cho rằng đặc điểm cơ bản của sự mùn hoá là những phản ứng sinh hoá oxy hoá dần dần những hợp chất cao phân tử có mạch vòng khác nhau, trong đó protein, lignin đóng vai trò quan trọng. Những phản ứng oxy này xảy ra khi phân giải các tàn tích thực vật dưới ảnh hưởng của oxy không khí, men oxydase và các chất xúc tác vô cơ khác.

Những hợp chất cao phân tử trên liên kết lại với nhau rồi trùng hợp thành các chất mùn. Trong quá trình sống của mình, vi sinh vật đất sử dụng các sản phẩm phân giải hữu cơ, những sản phẩm trao đổi chất và tổng hợp các hợp chất amin, hợp chất thơm cũng tham gia cấu tạo nên chất mùn.

1.5.3. Các con đường hình thành mùn



Hình 2.2. Con đường tích lũy chất hữu cơ sau 1 năm bón vào đất

Từ sơ đồ trên cho thấy nguồn gốc các chất tham gia cấu tạo nên chất mùn có thể bao gồm tất cả các chất hữu cơ là sản phẩm phân giải trung gian, sản phẩm tái tổng hợp của các cơ thể sinh vật. Chúng có thể là các chất đường, polyphenol, quinol, các chất amin, các hợp chất lignin,... Trong đó các hợp chất chứa vòng thơm như phenol, polyphenol, quinol, polyquinol, các chất lignin có vai trò quan trọng.

Xét một cách tổng quát, quá trình hình thành chất mùn có thể phân chia thành 3 bước cơ bản như sau:

Bước 1: Từ các xác hữu cơ mà chủ yếu là xác thực vật bị phân huỷ với sự tham gia tích cực của vi sinh vật đất để hình thành các hợp chất hữu cơ là các sản phẩm trung gian như đường, polyphenol, quinol, các chất amin,...

Bước 2: Tác động của các hợp chất trung gian, hoặc bị phân huỷ tiếp tục hoặc liên kết với nhau để hình thành các chất phức tạp hơn.

Bước 3: Trùng hợp và liên kết các hợp chất trung gian trên tạo thành các chất mùn.

Theo Stevenson thì có 4 con đường hình thành chất mùn khác nhau: Sự liên kết trùng ngưng giữa các hợp chất đường với các chất amin (con đường 1); giữa các polyphenol là sản phẩm phân huỷ các xác hữu cơ với các chất amin (con đường 2); giữa các chất là sản phẩm phân huỷ lignin với các hợp chất amin (con đường 3); và các chất lignin biến đổi với các chất amin (con đường 4). Các con đường này đều có sự tham gia của các quá trình sinh học.

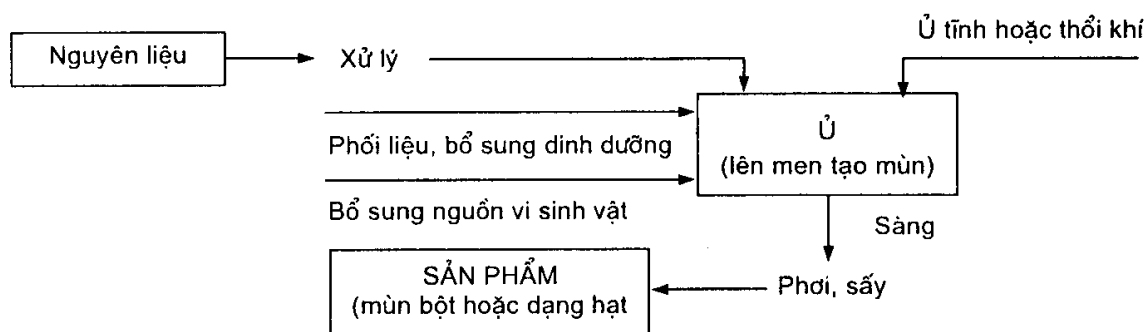
Theo Selman Waksman, chất mùn được hình thành chủ yếu từ các hợp chất lignin (con đường 4) nên còn được gọi là lý thuyết 1 lignin hình thành chất mùn. Theo thuyết này, trước hết các hợp chất lignin bị biến đổi mất dần các nhóm metoxyl (OCH_3). Với sự có mặt của các orthohydroxylphenol và sự oxy hoá các hợp chất béo để hình thành các nhóm cacboxyl (COOH). Các hợp chất lignin này bị biến đổi dần để hình thành các axit mùn. Sự hình thành chất mùn theo con đường 1 là không đáng kể.

Một số tác giả khác lại cho rằng chất mùn đất được hình thành theo con đường 2 và 3 là chính và gọi là học thuyết polyphenol hình thành chất mùn. Theo thuyết này, lignin cũng được xem là nguồn gốc quan trọng trước tiên để hình thành chất mùn. Dưới tác động của các enzym sinh học, lignin bị phân huỷ thành các aldehyt phenol và các axit hữu cơ. Sau đó chúng chuyển thành các hợp chất quinol rồi trùng hợp lại để hình thành chất mùn.

Ngày nay người ta thừa nhận cả 4 con đường hình thành chất mùn đều diễn ra đồng thời. Tuy nhiên tùy theo điều kiện và tính chất cụ thể của từng loại đất mà một con đường nào đó có thể chiếm ưu thế hơn. Thông thường chất mùn hình thành từ các chất lignin biến đổi (con đường 4) chiếm ưu thế ở các đất thoát nước kém; trong khi hình thành từ polyphenol (con đường 2 và 3) lại có ưu thế ở các đất rừng.

2. Công nghệ sản xuất phân hữu cơ sinh học

2.1. Sơ đồ



Hình 2.3. Sơ đồ sản xuất phân hữu cơ sinh học

2.2. Nguyên liệu

Nguyên liệu sản xuất phân mùn hay phân compost chủ yếu từ xác thực vật thân thảo như lá cây, mùn cưa, lõi thân ngô, rơm rạ, lá mía, bã mía, vỏ cà phê, trấu, rác thải sinh hoạt, rác thải đô thị, có thể cả than bùn.

Trong các nguyên liệu là phế thải nông, lâm, công nghiệp và sinh hoạt thì rơm, rạ và rác thải sinh hoạt được sử dụng nhiều nhất trong sản xuất phân bón hữu cơ sinh học (phân compost). Trong rác thải sinh hoạt và đô thị, thành phần các chất hữu cơ dễ phân hủy có thể tới 40 - 50% (trong đó có các loại glucide, protein, lipid. Trong số các glucide có thể có tinh bột, nhưng so với cellulose và hemi cellulose có thể ít hơn ở nguồn thực vật đã dẫn.

Người ta chia ra các loại rác thải sinh hoạt theo khu vực khác nhau: khu vực dân cư, khu vực thương mại, khu vực du lịch, khu vực chế biến nhỏ, khu vực làng nghề...

Khác với rác thải sinh hoạt của các nước phát triển, rác thải sinh hoạt ở các thành phố lớn ở nước ta có thành phần các chất hữu cơ chiếm một tỷ lệ rất lớn. Thành phần này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc chế biến sản xuất phân bón phục vụ cho sản xuất nông, lâm nghiệp.

Các chất hữu cơ có trong rác thải sinh hoạt được quan tâm để tái sử dụng làm phân bón hữu cơ là thành phần của chất thải thực phẩm, các loại động, thực vật bị loại bỏ, trong đó chúng cũng chứa các thành phần hóa học như trong cơ thể vi sinh vật. Trong số đó, quan trọng nhất là các hydratcacbon, protein và lipit. Các loại cellulose và hemicellulose và lignin là các chất khó phân giải và có nhiều trong tất cả các loại thực vật.

Than bùn được tạo thành do xác thực vật được chôn vùi dưới đất trong suốt thời gian dài, có thể đến vài chục năm.

2.3. Xử lý nguyên liệu và chuẩn bị môi trường ủ

2.3.1. Xử lý sơ bộ

Các nguyên liệu đã được giới thiệu ở phần trên. Trước khi ủ, nguyên liệu cần phải xử lý: phân loại, chọn lọc, băm (cắt) nhỏ hoặc xay, nghiền nhỏ, phối trộn, cân bằng dinh dưỡng...

Với rơm rạ, việc phân loại và chọn lọc khá đơn giản: chỉ cần chọn rơm rạ khô (và cũng có thể ẩm hoặc đang bị phân giải), cắt, băm nhỏ thành những đoạn dài từ 3 - 8cm. Với lá mía, thân cây ngô hoặc các loài cây thân thảo, lá rụng,... cũng làm như vậy. Yêu cầu là nguyên liệu không lẫn đất đá và các loại khó hoặc không bị phân hủy như sành sứ, thủy tinh, kim loại, chất dẻo, cao su, gỗ....

Với rác thải sinh hoạt, đô thị, việc phân loại và chọn lọc tương đối phức tạp, cần loại những loại vật liệu khó hoặc không bị phân hủy ra khỏi khối nguyên liệu. Trong các xí nghiệp sản xuất phân bón bằng phương pháp ủ công nghiệp còn được trang bị thiết bị từ tính để hút loại bỏ sắt, tránh phá hỏng thiết bị trong dây chuyền sản xuất cũng như làm giảm chất lượng sản phẩm sau này.

Nguyên liệu càng nhỏ trong quá trình ủ sẽ càng dễ bị phân hủy. Song, trong sản xuất nhỏ ở quy mô gia đình hay nông trại nhỏ thì rơm rạ cỡ nhỏ cũng không cần phải băm nhỏ, cứ để nguyên xếp đồng và đem ủ.

2.3.2. Phối trộn

Các nguyên liệu có thể đem ủ không cần phối trộn (ví dụ: ủ toàn rơm rạ, toàn lá mía, chỉ có mùn cưa, vỏ bào) hoặc phối trộn nhiều loại với nhau. Nếu có than bùn thì nên phối trộn than bùn với các loại nguyên liệu khác. Tỷ lệ phối trộn tùy thuộc vào các loại nguyên liệu có trong sản xuất.

Các nguồn nguyên liệu thực vật thường có hàm lượng C cao và N rất thấp. Muốn cho quần thể vi sinh vật trong khi ủ phát triển và thể hiện hoạt tính cao ta cần phải chú trọng tỷ lệ C:N: P trong khối nguyên liệu khi phối trộn làm môi trường ủ (lên men).

Thông thường tỷ lệ C : N : P = (100 - 200): 5 : 1. Trong đó C : N : trong khoảng 20 - 40, thường lấy con số trung bình là 30. Đảm bảo tỷ lệ này ta sẽ thu được sản phẩm là mùn có tỷ số C: N = 10 (loại mùn có chất lượng cao). Để đảm bảo các tỷ lệ dinh dưỡng này người ta có thể cho vào 1 tấn nguyên liệu 5 kg ure và 3 - 5kg supephosphat hoặc trộn nguyên liệu thô với phân chuồng (trâu, bò hoặc lợn) theo tỷ lệ nguyên liệu thô với phân chuồng là 5 - 10 : 1. Nếu dùng phân chuồng thì phân trâu, bò tươi là tốt hơn cả, vì ngoài nguồn nitơ hữu cơ phân còn cung cấp nguồn vi sinh vật kỵ khí phong phú có hoạt tính phân hủy cellulose rất cao.

2.3.3. Làm ẩm

Sau khi phối trộn, khối nguyên liệu cần được làm ẩm tới độ ẩm là 40 - 60%. Thường tỷ lệ nguyên liệu với nước là 1 : 1. Nếu hàm ẩm dưới 40% vi sinh vật sinh trưởng kém và trên 60% làm sự thông khí của khối nguyên liệu sẽ giảm dẫn đến sự phát triển và hoạt tính phân giải của vi sinh vật kém hiệu quả. Thông thường người ta đem ure, supephosphat hoặc phân chuồng hòa tan vào nước rồi phun hoặc té vào khối

nguyên liệu, trộn đều. Cũng tương tự như vậy, người ta có thể thay các loại bổ sung trên bằng nước thải từ phân gia súc ở các trại chăn nuôi hoặc dịch phân từ các bể tự hoại của các nhà vệ sinh, các bể chứa nhà xí máy,...

2.4. Ủ

Ủ là công đoạn quan trọng nhất trong dây chuyền sản xuất phân bón hữu cơ (phân compost). Đây là quá trình lên men, vi sinh vật phát triển và hoạt động sản sinh ra các enzym thủy phân ngoại bào phân hủy các hợp chất hữu cơ (cellulose, pectin, tinh bột, protein, chất béo,...) thành những chất hợp thành, có khối lượng phân tử thấp trong một phức hợp gọi là mùn.

Quá trình ủ có tác dụng:

Biến các hợp chất khó tiêu thành dễ tiêu và các hợp chất trung gian dễ hợp thành mùn. Mùn có thể coi là kho dự trữ dinh dưỡng và khoáng hóa dần cung cấp cho cây trồng. Trong quá trình ủ, nhiệt độ có thể tăng đến 50 - 70°C hoặc cao hơn, sẽ làm chết các vi sinh vật gây bệnh, trong đó trứng giun, sán cũng bị ung thối và diệt được các mầm sinh nở của côn trùng.

2.4.1. Ủ kỵ khí

Ủ kỵ khí thường ủ nguyên liệu trong các bể hoặc hố, đánh đóng chặt và phủ kín để hạn chế oxy của không khí khuếch tán vào khối ủ. Quá trình phân giải các chất hữu cơ nhờ vi sinh vật không có sự tham gia của oxy không khí.

Quá trình ủ kỵ khí sẽ tạo ra mùn (chất lượng không cao bằng ủ hiếu khí) và một số khí bay ra như CH₄, CO₂ cùng các khí thối khá nặng mùi. Ngoài ra, trong điều kiện kỵ khí sinh khối vi sinh vật tăng so với hiếu khí chỉ bằng 1/4 tính theo khối lượng khô.

Nhược điểm của phương pháp này là thời gian kéo dài, nhiều mùi hôi thối. Mỗi mẻ ủ có thể kéo dài từ 3 đến 6 tháng. Thực ra những đồng ủ hoặc bể ủ không thực hiện được kỵ khí hoàn toàn, vì trong khối nguyên liệu ban đầu có một ít không khí và không khí có tính khuếch tán vào các khe hở. Như vậy, khi mới ủ là hiếu khí, sau đó dần chuyển sang kỵ khí.

Ủ rơm rác làm phân bón theo phương pháp truyền thống thường đem rơm rạ hay lá, rác trộn với phân chuồng theo tỷ lệ (5 - 10) : 1, rồi trộn bùn với rơm trát kín đồng ủ. Sau 3 tháng rở đồng ủ, sàng lấy mùn làm phân bón.

Các hố chôn lấp rác thải sinh hoạt - đô thị cũng là quá trình ủ kỵ khí. Sau vài năm, hoặc tới chục năm, những hố này có thể được đào lên, sàng lọc kỹ ta cũng được loại mùn kỵ khí. Ở thành phố Bắc Giang, có người đã khai thác nguồn mùn này làm phân bón và thu nhập khá cao.

Ngày nay nhiều nông trại đã ủ rơm rạ, lõi, bẹ ngô, lá mía,... cùng với phân chuồng thành đồng trên nền xi măng có rãnh thu gom nước, trên phủ vải bạt nilon kín. Nước rác tiết ra được thu gom được tưới ẩm trở lại cho khối ủ. Trong khi ủ có thể dùng phân chuồng hoặc nước phân làm nguồn vi sinh vật phân giải kỵ khí, đồng thời

làm tăng nguồn N để cân đối tỷ lệ C : N. Cũng có thể dùng chế phẩm vi sinh được tuyển chọn ở các phòng thí nghiệm gồm các chủng vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn kỵ khí và hiếu khí tùy tiện, ưa ấm và ưa nhiệt có hoạt tính phân giải xenlulose và các hợp chất hữu cơ khác. Việc dùng các chế phẩm vi sinh này đã giúp cho quá trình ủ rút ngắn được hàng chục ngày.

Ủ rác thải theo phương pháp kỵ khí cải tiến ở đây khác với ủ truyền thống của nông dân trước đây là độ ẩm có thể thường xuyên được đảm bảo ở khoảng 40 - 60% và được đưa thêm nguồn vi sinh vật hữu hiệu làm tăng cường tốc độ phân hủy các chất hữu cơ.

Qua thực nghiệm thấy rằng, cứ 200 kg nguyên liệu là rác thải ủ kỵ khí cần tới 800 lít nước, sau khi ủ (khoảng 30 - 40 ngày) thu được 50 kg chất rắn dạng mùn và 150 kg khí sinh học (trong đó tới 60 - 65% là metan) dùng làm chất đốt.

Cần phải nhắc lại rằng, ủ kỵ khí cần thời gian dài, chất lượng mùn không cao, sinh ra nhiều khí có mùi hôi thối và ô nhiễm môi trường. Phương pháp này còn hạn chế là khó thực hiện ở quy mô lớn và kiểm soát được các thông số cần thiết. Do vậy, phương pháp không phát huy tác dụng và ứng dụng sản xuất ở quy mô công nghiệp.

2.4.2. Ủ hiếu khí

Nguyên liệu sau khi phối trộn, cân bằng dinh dưỡng và làm ẩm tới 55 - 60% đem ủ có thông khí để cung cấp oxy cho vi sinh vật hiếu khí phát triển và hoạt động

* Ủ rác thành đồng, trong quá trình ủ có đảo trộn:

Đây là phương pháp truyền thống và đã được sử dụng từ lâu. Nguyên liệu được chất thành đồng với chiều cao là 1,5 - 2m, đảo trộn 1 tuần 1 lần. Quá trình đảo trộn kéo dài 4 tuần. Để duy trì độ ẩm là 50 - 60% thỉnh thoảng (khoảng 2 ngày) phải tưới phun nước làm ẩm. Tốt nhất là dưới nền đồng ủ trảng xi măng và có rãnh thu hồi nước. Dùng nước rỉ từ khối ủ làm ẩm trở lại là tốt nhất. Nhiệt độ trong khối ủ trong 4 tuần có đảo trộn duy trì ở 55°C. Tiếp theo là 3 - 4 tuần ủ tĩnh (không đảo trộn).



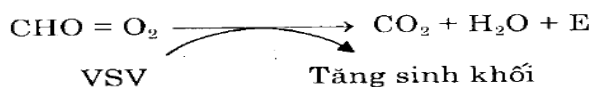
Hình 2.4. Ủ rác thành đồng, có đảo trộn

Trong quá trình ủ, các vi sinh vật, chủ yếu là vi khuẩn, vi nấm và xạ khuẩn, phân giải các chất hữu cơ thành mùn. Ưu điểm của phương pháp này là trình độ công nghệ thấp, dễ thực hiện; nhưng nhược điểm là khó kiểm soát được nhiệt độ, độ ẩm, khí

thời dễ thoát ra ngoài và nước rỉ làm mất vệ sinh, khó ngăn chặn được ruồi nhặng kéo tới và sinh nở.

* Ủ rác thành đồng, thổi khí, nhưng không đảo trộn:

Nguyên liệu đã xử lý và phối trộn được chất đồng cao 2 - 2,5 m, phía dưới và trong đồng có lắp hệ thống phân tán khí. Không khí được cấp qua máy nén khí hoặc hệ thống quạt ly tâm cao áp. Nhờ hệ thống này oxy cung cấp cho nhu cầu của vi sinh vật để chúng sinh trưởng, phát triển và hoạt động phân giải các chất hữu cơ có trong nguyên liệu. Quá trình tạo mùn nhanh hơn, nhiệt độ trong đồng ủ ổn định và không vượt quá 55°C. Quá trình này chuyển hóa một phần chất hữu cơ là các monosaccaride thành CO₂ và nước cùng với năng lượng sinh ra ở dạng năng lượng sinh học, phục vụ cho đời sống vi sinh vật và tỏa nhiệt làm tăng nhiệt độ khối ủ.



Hình 2.5. Ủ rác thành đồng, thổi khí cưỡng bức

Nhiệt độ khối ủ tăng, nhưng có không khí làm thoáng sẽ ổn định ở mức 50 - 55°C. Thông khí cũng làm thoát CO₂ và hơi nước khỏi khối ủ. Thổi khí sẽ làm khối nguyên liệu dễ bị khô, vì vậy cần phun ẩm từ nước rỉ ở các bể ủ hoặc thêm nước mới. Trong quá trình ủ, nhiệt độ ban đầu khoảng 25 - 35°C thích hợp với các chủng vi sinh vật ưa ấm phát triển. Thời kỳ này có sự tham gia của vi khuẩn và nấm mốc, đặc biệt là nấm mốc đóng vai trò khá quan trọng, vì chúng có hoạt tính cellulase khá cao. Khi nhiệt độ tăng đến 45°C, vi sinh vật ưa ấm chết dần nhường chỗ cho vi sinh vật ưa nhiệt (45 - 70°C). Ở thang nhiệt độ sau, hầu hết các loài vi nấm bị chết, chỉ còn một vài loài sống ở trên 50°C, còn vi khuẩn và xạ khuẩn ưa nhiệt hoặc chịu nhiệt phát triển và hoạt động.

Lượng không khí cấp vào bể ủ vừa phải để hạn chế khả năng thoát nhiệt, nên giữ cấp khí ở khoảng 9 m³ không khí cho 1 tấn nguyên liệu ướt trong 1 giờ.

Quá trình ủ có thổi khí thường kéo dài khoảng 3 tuần, đến khi nhiệt độ trong bể ủ không tăng mà lại giảm thì ngừng thổi khí và ủ tĩnh tiếp theo khoảng 3 - 4 tuần để vật liệu ủ "ngấu chín" thành mùn.

2.5. Chế biến phân hữu cơ sinh học từ mùn

Mùn thu được sau quá trình ủ (lên men) được chế biến tiếp theo thành các loại phân bón hữu cơ sinh học (HCSH) để bón cho các loại cây trồng thích hợp:

Nền hữu cơ (mùn) + N, P, K = Phân hữu cơ sinh học.

Loại phân này đảm bảo tỷ lệ chất hữu cơ (OM) > 13% và N ~ 9,5%.

Sau khi phối trộn cần xác định: độ ẩm, pH, chất hữu cơ tổng số, N - tổng số, P - tổng số, P- dễ tiêu, K - tổng số, K - dễ tiêu.

Để chế ra các loại phân HCSH trước hết là dựa vào thành phần của mùn và các loại phân bón hóa học với nhu cầu phân bón của cây trồng, sau đó cân bằng dinh dưỡng và phối trộn

Bảng 2.1. Hàm lượng nguyên tố dinh dưỡng ở một số loại phân bón hoặc nguyên liệu chế phân hữu cơ sinh học

Thành phần, %	Chất hữu cơ (OM)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Phân rác	13,27	0,57	0,44	1,03
Ure		46		
SSP (Phân lân đơn)			16	
DAP (điamônphosphat)		18	46	
Apatit loại 2	3,91		24	

Bảng 2.2. Tỷ lệ hàm lượng (%) N, P, K cần có trong phân hữu cơ sinh học

Đối tượng cây	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Rau sạch	2	2	2
Hoa, cây cảnh	2	2	3
Chè	3	2	4
Cây lương thực	3	2	3
Cây ăn quả	2,5	2	3

3. Sử dụng phân bón hữu cơ sinh học

Phân hữu cơ sinh học được dùng bón cho nhiều loại cây: cây ăn quả, cây lương thực, cây công nghiệp, các loại cây rau, như loại phân bón chủ lực hoặc phối hợp với nền là phân chuồng. Trong bất cứ trường hợp nào phân HCSH đều có hiệu quả: nâng cao độ phì cho đất, làm đất tơi xốp, thoáng khí, giảm rửa trôi các chất dinh dưỡng trong đất, tạo điều kiện cho quần thể vi sinh vật có ích trong đất phát triển và hoạt động mạnh. Qua thực nghiệm, phân HCSH bón cho lúa tăng năng suất 10,8 - 12,97%, với cà chua: 12,1 - 17,2%, cải bắp: 12,1 - 16,5%; chè: 18,5% và chất lượng chè tốt hơn (tăng hàm lượng tanin, chất hòa tan).

Phân HCSH cũng có tác dụng kích thích hạt nảy mầm, kích thích cây ra rễ mạnh, đâm chồi nảy lộc nhanh, lá cây xanh dày, giảm sâu bệnh và tăng sức đề kháng cho cây: Tạo nhiều hoa và đậu quả, tạo nhiều củ (hoặc hạt) và to hơn, chất lượng nông

sản tốt hơn và hình dáng sản phẩm có vẻ đẹp hơn.... và chủ yếu làm tăng năng suất giảm chi phí cũng như giảm lượng phân chuồng và phân bón hóa học cho cây trồng.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Nêu các quá trình sinh lý, sinh hóa diễn ra trong quá trình ủ phân?

Câu hỏi 2: Trình bày quy trình sản xuất phân hữu cơ sinh học.

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Quy trình sản xuất phân hữu cơ sinh học
- Các quá trình hóa sinh - vi sinh trong quá trình ủ phân

CHƯƠNG 3: CÁC CHẾ PHẨM VI SINH BẢO VỆ THỰC VẬT

Giới thiệu:

Chương Các chế phẩm vi sinh bảo vệ thực vật trang bị cho sinh viên các kiến thức về các loại chế phẩm vi sinh dùng để bảo vệ thực vật. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được quy trình sản xuất các chế phẩm vi sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn... trong phòng bệnh cho cây trồng.

Mục tiêu:

- Nêu được các loại chế phẩm vi khuẩn;
- Phân tích và trình bày được quy trình sản xuất chế phẩm Bt;
- Trình bày được đặc điểm và quy trình sản xuất chế phẩm vi nấm;
- Trình bày được các chất kháng sinh và chế phẩm xạ khuẩn trong phòng bệnh cho cây trồng.

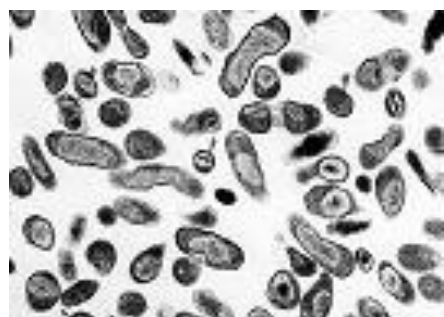
A. Nội dung:

1. Chế phẩm vi khuẩn

Hiện nay người ta thống kê được khoảng 1.500 loài vi sinh vật hoặc sản phẩm của chúng có khả năng phòng trừ sâu bệnh. Trong số này, vi khuẩn và chế phẩm được làm từ vi khuẩn chiếm tỷ lệ nhiều hơn cả. Vi khuẩn có quan hệ với côn trùng rất đa dạng và được chia thành hai nhóm: nhóm sinh bào tử và nhóm không sinh bào tử. Trong những vi khuẩn gây bệnh bắt buộc là những vi khuẩn sinh bào tử và chỉ gây ra một số bệnh ở những côn trùng nhất định. Phổ gây bệnh của nhóm này rất hẹp. Nhóm vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc có phổ nhiễm bệnh rộng hơn, chúng xâm nhập vào mô cơ thể côn trùng miễn cảm với chúng. Trước khi xâm nhập vào xoang máu, vi khuẩn không bắt buộc sinh sản trong ruột côn trùng, chúng có thể phát triển trên môi trường nhân tạo và không chuyên tính với từng nhóm côn trùng riêng biệt.

1.1. Vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum*

Đây là vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng đầu tiên được D' Herelle nghiên cứu và mô tả vào năm 1911 tại Mexico. Vi khuẩn có dạng hình que nhỏ, Gram âm và được gọi tên ban đầu là *C. acridiorum* gây bệnh nhiễm trùng máu cho châu chấu, có thể nuôi trên môi trường nhân tạo. Sản phẩm từ vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum* được áp dụng tương đối thành công ở Mexico, Colombia, Argentina.



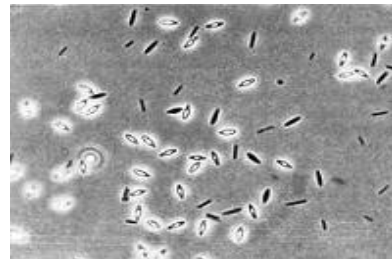
Hình 3.1. *Coccobacillus acridiorum*

Theo hệ thống phân loại hiện đại vi khuẩn có thể là loài *Enterobacter cloacae* var. *acridiorum*.

1.2. Vi khuẩn gây bệnh sữa cho ấu trùng bọ hung

Bệnh sữa được phát hiện đầu tiên ở ấu trùng bọ hung ở Nhật Bản *Popillia Japonica* từ năm 1991, gồm 2 dạng cơ bản là dạng A và B. Vi khuẩn gây nên 2 dạng bệnh này được mô tả với tên *Bacillus popilliae* (dạng bệnh A) và *B. lentimormus* (dạng bệnh B).

Trong 2 loài vi khuẩn này thì loài *B. popilliae* gặp phổ biến hơn, chiếm 88% trường hợp và được chú ý nghiên cứu hơn. Loài *B. popilliae* là vi khuẩn ký sinh bắt buộc, Gram dương; bào tử có tính kháng cao với các điều kiện bất lợi của môi trường, lây nhiễm bệnh cho bọ hung qua đường tiêu hóa.



Hình 3.2. *Bacillus popilliae*

Sau khi xâm nhập vào vật chủ 3 - 4 ngày thì vi khuẩn bắt đầu sinh bào tử, tới ngày thứ 13 - 16 thì bào tử của vi khuẩn đạt tới mức tối đa.

Trên môi trường thức ăn nhân tạo, vi khuẩn không hình thành bào tử, vì vậy phải nuôi nhân vi khuẩn này trên ấu trùng bọ hung Nhật Bản. Sau 20 ngày ủ bệnh, một ấu trùng bọ hung Nhật Bản tích lũy tới 20 tỷ bào tử. Từ các sâu bị bệnh có thể gom vi khuẩn và sản xuất thành chế phẩm dạng bột chứa 100 triệu bào tử trong 1 gam chế phẩm.

1.3. Vi khuẩn *Bacillus cereus*

Là vi khuẩn rất phổ biến trong tự nhiên, Gram dương, hình thành bào tử nhưng không tạo thành tinh thể độc. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này rất khác nhau.



Hình 3.3. *Bacillus cereus*

Người ta cho rằng tính gây bệnh của *Bacillus cereus* chủ yếu liên quan tới sự tạo thành enzym phospholipase và một loại ngoại độc tố như của *Bacillus thuringiensis*.

Từ *B. cereus* chế ra chế phẩm Entobacterin bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường cám mì. Sau 5 ngày nuôi cấy ở 26 - 28°C ta được chế phẩm. Mỗi gam chế phẩm có tới 5 triệu tế bào vi khuẩn, trong số đó có tới 98% tế bào có bào tử. Entobacterin dùng trong nông nghiệp rất có hiệu quả. Nó diệt được 30 loại sâu hại rau quả. Với 2 kg chế phẩm có thể diệt được 97% sâu hại bắp cải trên 1 hecta.

1.4. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Đây là vi khuẩn gây bệnh côn trùng quan trọng nhất, được nghiên cứu sử dụng rộng rãi để trừ nhiều sâu hại trên thế giới (sẽ giới thiệu kỹ ở phần sau).

1.5. Vi khuẩn *Serratia marcescens*

Đây là vi khuẩn hình que, Gram âm, không sinh bào tử, ký sinh không bắt buộc ở côn trùng, gây bệnh cho sâu đục thân ngô, tằm và gây bệnh dịch cho bọ hung *Melolontha*, châu chấu *Melanophis bivittatus*, một số rệp sáp, sâu non, bọ xít.

2. Chế phẩm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

2.1. Đặc điểm của *Bacillus thuringiensis*

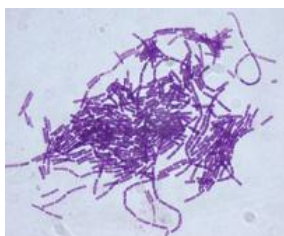
Bacillus thuringiensis thuộc nhóm trực khuẩn, sinh bào tử, hiếu khí hoặc hiếu khí tùy tiện, Gram dương, kích thước tế bào: $(0,8 \div 1,3) + (3 \div 6) \mu\text{m}$, xung quanh tế bào là các tiên mao, nhờ tiên mao tế bào chuyển động được. Tế bào đứng riêng rẽ hoặc xếp thành chuỗi. nhiệt độ sinh trưởng *Bacillus thuringiensis* từ 15 đến 45°C. Khi trưởng thành, tế bào sinh bào tử hình trứng và tinh thể độc hình quả trám có bản chất protein

Nghiên cứu trên kính hiển vi điện tử, Haney O. L. đã chứng minh, tinh thể độc của *Bacillus thuringiensis* có hình hai kim tự tháp úp vào nhau, trên bề mặt có những luồng nổi lên, luồng nọ cách luồng kia khoảng 28 nm. Đến năm 1959, người ta đã biết được cấu trúc siêu phân tử bên trong tinh thể này có dạng hình que, kích thước khoảng $4,7 \times 11,8 \text{ nm}$. Sự tổng hợp tinh thể chỉ xảy ra khoảng 3 giờ trong pha cân bằng sinh trưởng của vi khuẩn. Mỗi bào tử có thể có từ 1 - 3 tinh thể độc. Tinh thể này trong tế bào chiếm tới 30% khối lượng khô của tế bào,

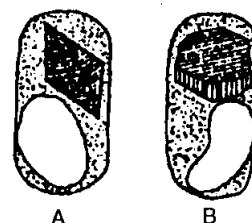
- Bản chất hóa học của tinh thể độc: Tinh thể độc có bản chất protein, trong đó 9 loại axit amin chiếm tỷ lệ cao nhất là axit glutamic và axit asparaginic, kế tiếp là arginin và leucine.

- Hoạt tính của tinh thể độc: Có thể coi tinh thể độc như là tiền độc tố (protoxin), nó được hoạt hóa trong ruột một số loại côn trùng với pH thích hợp và hình thành những phân tử độc có phân tử lượng lớn (5.000 Da).

Độc tố dạng tinh thể bền nhiệt độ hơn so với dạng hòa tan. Ví dụ: tinh thể độc của *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* ở 65°C sau 1 giờ, ở 80°C sau 20 phút vẫn giữ được tính độc, trong khi đó độc tố ở dạng vô định hình thì mất hoàn toàn độc tính. Các loại dung môi hữu cơ như clorofooc, metanol,... làm mất độc tính của tinh thể ở dạng hòa tan nhưng không ảnh hưởng đến độc tính của độc tố dạng tinh thể.



Hình 3.4. *Bacillus thuringiensis*



Hình 3.5. Các dạng tinh thể độc của *B. thuringiensis*

Tuy vậy, pH môi trường quá cao (trên 12) hay quá thấp (thấp hơn 3,3) sẽ làm

cho tinh thể độc mất độc tính, một số hóa chất gây kết tủa protein như HgCl_2 ; axit trichloro - acetic cũng làm mất độc tính của tinh thể độc.

2.2. Cơ chế tác động của tinh thể độc

Côn trùng ăn phải tinh thể độc trong vòng từ 1 - 7 giờ, pH của máu - bạch huyết của sâu sẽ tăng lên làm tê liệt đường ruột, khoang miệng và có khi toàn thân của sâu, làm thay đổi tính thấm của thành ruột, gây tổn thương hệ thống điều hòa trao đổi chất và sâu bị chết. Người ta cho rằng, có hai yếu tố thúc đẩy tinh thể độc gây độc là pH đường ruột của côn trùng và khả năng sản sinh enzyme phân giải protein trong đường ruột của sâu. Tinh thể độc sẽ bị phân giải trong đường ruột của côn trùng khi pH tăng lên trên 8, 9 và khi tinh thể độc bị phân giải nó sẽ thể hiện tính độc. Tuy nhiên, không phải lúc nào pH lên cao trên 8, 9 cũng gây độc cho sâu mà do nhân tố thứ hai, đó là khả năng sinh enzyme protease trong đường ruột của côn trùng, chuyển hóa tiền độc tố thành dạng độc tố đối với cơ thể côn trùng.

* Tùy theo từng loại côn trùng sẽ xuất hiện 3 cơ chế tác dụng của tinh thể độc:

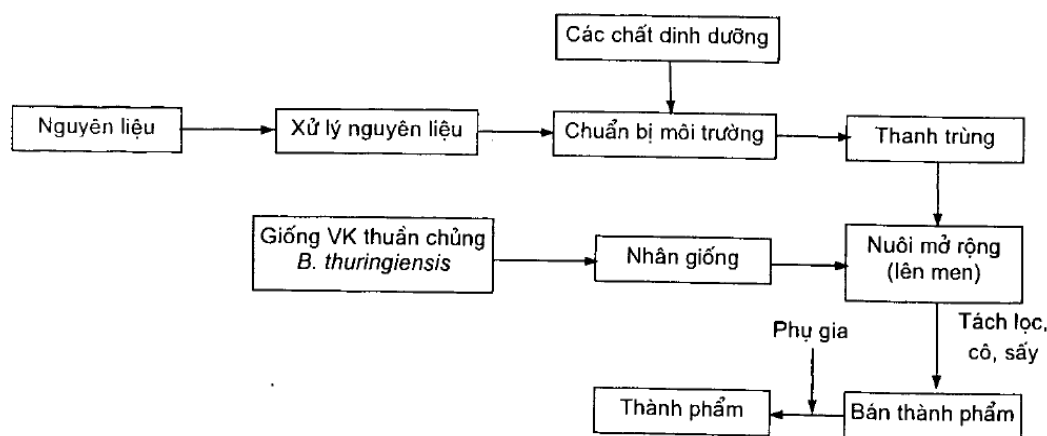
- Sau khi ăn phải tinh thể độc 3 - 20 phút, ruột giữa của côn trùng bị liệt, pH trong máu và của tế bào bạch huyết tăng, pH ruột giữa giảm do chất kiềm của máu thấm vào máu. Các tế bào biểu mô ruột bị phá hủy. Sau 1 giờ toàn bộ cơ thể sâu bị tê liệt.

- Sau khi ăn phải tinh thể độc, sâu ngừng ăn vì ruột bị tê liệt, nhưng pH của máu và bạch huyết không tăng, sau 2 - 4 ngày sâu chết mặc dù sâu non không bị tê liệt hoàn toàn.

- Côn trùng ăn phải tinh thể độc kèm theo bào tử thì sau 3 - 4 ngày sẽ chết, mặc dù không thấy hiện tượng tê liệt

2.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm Bt

Hiện nay khối lượng chế phẩm Bt sản xuất hàng năm trên thế giới là rất lớn. Công nghệ sản xuất được thực hiện trên 2 phương pháp nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm để thu sinh khối tương tự như các quá trình lên men thu sinh khối vi sinh vật khác.



Hình 3.6. Quy trình sản xuất chế phẩm Bt

a. Chọn giống sản xuất

Tiến hành phân lập và tuyển chọn các khuẩn lạc riêng biệt từ mẫu xác loại sâu bị chết (nếu thấy chết hàng loạt thì càng tốt).

Yêu cầu của các giống thuần chủng này là:

- Vi khuẩn phải có mặt trong mọi trường hợp của bệnh ở côn trùng và có thể phân lập lại dòng thuần chủng các vi khuẩn đó trên môi trường nhân tạo.
- Dòng thuần chủng này có thể gây được bệnh tương tự.
- Thử hoạt tính sinh học của dòng thuần chủng đó trên côn trùng trên điều kiện thích hợp thì vi khuẩn tái xuất hiện, nghĩa là phải chứng minh được sự có mặt của vi khuẩn gây bệnh trên cơ thể côn trùng.

Giống thuần chủng thường được giữ ở môi trường dinh dưỡng - thạch trong khoảng nhiệt độ 4 - 10°C, hàng tháng cấy chuyển lại; giữ ở điều kiện đông khô được vài năm.

Trên cơ sở tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sẽ xác định được chủng có hoạt tính cao để đưa vào sản xuất chế phẩm (thuốc) trừ sâu tùy theo đối tượng côn trùng hại cây trồng, kể cả diệt muỗi ở dạng ấu trùng (con lăng quăng ở trong nước).

b. Nguyên liệu và môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Các cơ chất chủ yếu nuôi vi khuẩn này là tinh bột và protein thường chứa trong các sản phẩm nông nghiệp hoặc phế thải khi chế biến nông sản. Đó là bột ngô, bột đậu tương, bột cá, cám gạo, cám mì, khô các loại hạt có dầu (khô đậu tương, khô lạc, khô vừng, khô hạt bông,...), rỉ đường,... Các nguyên liệu này là nguồn C và N cho dinh dưỡng, ngoài ra còn là nguồn chất khoáng và vitamin cho vi sinh vật.

Bảng 3.1. Nguồn nguyên liệu sản xuất chế phẩm Bt ở một số nước

Tên nước	Thành phần môi trường	Tác giả
Mêhicô	Rỉ đường, bột đậu tương, bột ngô, $\text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$	Rodan và cs, 1988
Hàn Quốc	Bột cá, đậu tương, cám đỏ, bã vừng, gạo, cám	Yoo và cs, 1987
Trung Quốc	Cám lúa mì, trấu, khô đậu tương và các loại khô dầu khác, cám lúa mì hoặc bột ngô	Hussey và Tinsley, 1981 – Wangtao, 1988
Nigeria	Bột sắn lên men, ngô, đậu đũa	Ejiofa và Okager, 1989
Brazilin	Phụ phẩm của công nghiệp giấy và gỗ trên tinh bột tan	Moscardi, 1988
Ấn Độ	Bột đậu tương thêm tinh bột tan hoặc rỉ đường	Mumgatti và Rahunathan, 1990

Tùy theo phương pháp nuôi cấy (lên men) bề mặt hay bề sâu (chìm) ta có thể thêm nguồn các chất khoáng và vitamin. Công việc này còn tùy thuộc vào yêu cầu sinh lý của chủng. Cũng trên cơ sở này ta chọn môi trường sao cho thích hợp để sao cho chúng sản sinh trưởng phát triển tốt và đồng thời sản sinh ra nhiều δ - endotoxin.

c. Lên men (nuôi cấy) thu sinh khối vi khuẩn

*** Phương pháp nuôi cấy bề mặt**

Trên bề mặt rắn có độ ẩm là 50 - 65% và môi trường cần có độ xốp thích đáng để không khí dễ khuếch tán vào các khe hở thông thoáng, đồng thời CO₂ tạo thành dễ đi ra ngoài. Vì vậy, phương pháp này hay được gọi là lên men xốp (tuy rằng cách gọi này là không chuẩn xác). Ở phương pháp này, vi khuẩn sẽ mọc trên bề mặt cơ chất là các hạt hoặc sợi, mảnh nguyên liệu và tiếp nhận oxy của không khí để sinh trưởng. Ngoài yếu tố ảnh hưởng là thành phần môi trường, yếu tố độ ẩm cũng rất quan trọng, vì độ ẩm khối nguyên liệu trong môi trường lớn hơn 65% làm cho môi trường kém thông thoáng ảnh hưởng rất nhiều đến sinh trưởng và hoạt động của vi khuẩn, hoặc dưới 30% làm vi khuẩn không phát triển.

Để môi trường nuôi cấy vi khuẩn có độ thông thoáng tốt, các loại nguyên liệu không nên xay nghiền quá nhỏ mà nên xay vỡ thành các mảnh 1 - 3 mm, trộn thêm cám trấu hoặc mùn cưa, mảnh bã bã mía,... Nước làm ẩm môi trường nên điều chỉnh pH về vùng trung tính (6,5 - 7,5), hấp vô khuẩn ở 121°C khoảng 1 giờ. Rồi rải mỏng trên các khay có chiều dày lớp môi trường từ 2 - 4 cm.

Tiếp giống đã qua nhân giống theo tỷ lệ khoảng 10%. Nuôi cấy mở rộng theo phương pháp bề mặt, nhưng nhân giống nên theo phương pháp chìm (cấp I trong bình tam giác trên máy lắc 180 - 220 (vòng/phút) và cấp II, cấp II... trong các bình có sục khí. Yêu cầu nhân giống là: đảm bảo không bị tạp nhiễm, mật độ vi khuẩn đạt tới hàng vài triệu tế bào/ml (hoặc mg).

Các khay đã được phun dịch nhân giống vào môi trường được đặt trong các phòng nuôi cấy có quạt hút và điều chỉnh nhiệt độ ở khoảng nhiệt độ ban đầu là 28 - 35°C, sau 4 - 5 ngày, vi khuẩn phát triển và sinh bào tử cũng như tạo thành tinh thể độc. Trong quá trình nuôi cấy có thể phải lật khối môi trường cho vi khuẩn mọc đều trên dưới, khối môi trường bị khô cần phun nước để làm ẩm hoặc bị nóng nên cần có quạt hút để điều chỉnh.

Sau khi kết thúc nuôi cấy, thu gom môi trường ở các khay và sấy ở không khí nóng 40 - 45° cho đến độ ẩm dưới 10% tạo thành phẩm. Đóng gói trong các bao túi PE kín, hoặc lọ kín và đem lưu hành ở thị trường hoặc sử dụng ngay. Thành phần dạng này nếu giữ được tốt, không bị ẩm thì có thể giữ được hàng năm (nếu tỷ lệ số tế bào sinh bào tử cao trong chế phẩm). Ngày nay, phương pháp nuôi vi khuẩn trên môi trường rắn có nhiều cải tiến; thay vì nuôi trên khay bằng những thùng nuôi có thổi khí, thùng có thể quay làm cho khối môi trường được trộn đều, hoặc nuôi trong các buồng có nhiều giá để khay và có bộ phận phun mù làm không khí luôn luôn có độ ẩm cao và buồng có điều hòa nhiệt độ.

Phương pháp nuôi cấy bề mặt dễ thực hiện, không đòi hỏi trang thiết bị cao, song không đảm bảo sự vô trùng trong quá trình vì rất dễ bị tạp nhiễm, năng suất không cao

* Phương pháp nuôi cấy chìm

Vi khuẩn được nuôi cấy trong các nồi lên men có thể tích đến vài chục mét khối hoặc lớn hơn nữa. Được thổi khí qua hệ máy nén trong điều kiện vô trùng. Thiết bị có thể được trang bị hệ điều khiển tự động hóa việc cấp khí, nhiệt độ, điều chỉnh pH và phá bọt. Thời gian nuôi cấy chỉ khoảng 2 - 3 ngày và mật độ tế bào có thể tới hàng tỷ trong 1ml dịch nuôi cấy.

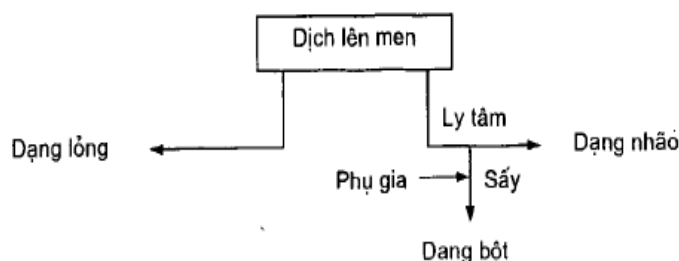
Dịch nuôi cấy có thể đóng chai dùng trực tiếp ở dạng lỏng hoặc qua ly tâm để thu sinh khối rồi bổ sung phụ gia, qua sấy,... hoàn thành phẩm ở dạng bột. Dạng bột là loại chế phẩm đậm đặc, mật độ tế bào rất cao, có chất phụ gia và có thể có chất bảo quản chống thực khuẩn thể, khi dùng pha với nước phun lên cây trồng.

Nuôi cấy chìm đòi hỏi trang thiết bị cao, vốn đầu tư lớn và yêu cầu trình độ công nghệ của người sản xuất cũng rất cao. Các nước phát triển có những nhà máy sản xuất chế phẩm Bt rất lớn, năng suất hàng năm có thể tới hàng trăm, hàng ngàn tấn hoặc hàng chục ngàn tấn.

Ở Peru có một phương pháp nuôi cấy vi khuẩn khá độc đáo: người ta tiêm giống vào những quả dừa, sau khoảng thời gian hơn chục ngày đem đập vỡ quả dừa, thu dịch và đem phun lên cây trồng, đặc biệt hiệu quả là đem dịch này hòa vào các ao hồ trong mùa muối sinh sản ở giai đoạn ấu trùng. Phương pháp này tỏ ra rất hiệu quả trong phòng trừ muỗi sốt rét, muỗi sốt xuất huyết.

d. Hoàn thành chế phẩm từ dịch lên men

Từ dịch lên men chìm ta có thể tiến hành hoàn thành phẩm ở 3 dạng chế phẩm:



Hình 3.7. Các dạng chế phẩm từ dịch lên men

- Với chế phẩm dạng lỏng: dịch lên men sau khi kết thúc được bổ sung các chất phụ gia, chất bảo quản chống thối, chất bám dính rồi đóng chai. Thời gian bảo quản 3 tháng, khi sử dụng đem pha loãng rồi phun lên cây trồng.

- Với chế phẩm dạng nhão: Sau khi ly tâm dịch lên men ta thu được sinh khối ướt có độ ẩm khoảng 85% (có khoảng 20.10 tế bào/g), không cần sấy khô mà trộn với dầu thành dạng nhũ tương. Thời gian bảo quản: 6 tháng.

- Với chế phẩm dạng bột: ly tâm thu được dạng dịch đặc nhão như trên trộn với các chất phụ gia như tinh bột, dextrin, lactose, cao lanh,... rồi đem sấy bằng thiết bị sấy phun hoặc sấy thăng hoa (sấy thăng hoa là tốt nhất, tỷ lệ tế bào chết thấp và đảm bảo hoạt tính). Bột khô được đóng gói trong bao PE hoặc giấy thiếc hay trong lọ kín. Dạng

bột có: Độ ẩm <10%; pH = 7 - 7,5; Mật độ vi khuẩn: 3 - 10.10 CFU/g chế phẩm; Hiệu quả trừ sâu: 70 - 90% sau 7 ngày.

Các chế phẩm Bt có nhược điểm là không nhân được trong vòng thức ăn của sâu non và dùng nhiều lần côn trùng có khả năng kháng thuốc, cụ thể là kháng được ngoại độc tố.

Chế phẩm có hoạt tính không bền, khi bào tử gặp điều kiện thuận lợi sẽ nảy mầm và tính độc của phức hợp tinh thể - bào tử sẽ mất.

3. Chế phẩm vi nấm diệt côn trùng

3.1. Một số đặc điểm của nấm diệt côn trùng

3.1.1. Nấm *Beauveria bassina* (nấm Bạch Cương)

Nấm phát triển thành hệ sợi có màu trắng nên nó còn được gọi là nấm Bạch Cương. Nấm có thể gây bệnh cho tằm và nhiều loại sâu. Trên cơ thể tằm và sâu, nấm này mọc rất nhanh, chả mấy chốc đã phủ kín bề mặt cơ thể. Sợi nấm có dạng phân trắng khi khô biến thành màu vàng sữa. Trên môi trường thạch sợi nấm có màu trắng đến màu kem pha ít màu đỏ, đôi khi pha ít màu lục và sắc tố tiết vào môi trường có màu vàng, màu đỏ nhạt hoặc màu xanh da trời.

Sợi nấm phân nhánh mảnh, có vách ngăn, đường kính sợi là 2 - 5 μm , phát triển dày đặc trên mặt môi trường, về sau xuất hiện chi chít các mống sinh bào tử. Cuống bào tử trần đứng riêng rẽ hoặc tụ thành đám, không phân nhánh hoặc có phân nhánh, hình ống hoặc hình bình, chiều dài không đều nhau. Trên cuống có những mảnh nhỏ mang bào tử trần.

B. bassina sinh sản bằng bào tử trần, đơn bào, bào tử không màu có dạng hình cầu, đường kính 1 - 4 μm hay hình trứng (1,5 - 5,5) x 1,3 μm . Tế bào sinh bào tử trần đơn hoặc trong vòng xoắn, phát sinh từ sợi sinh dưỡng mọc thành từng đám, có cuống phình ra.

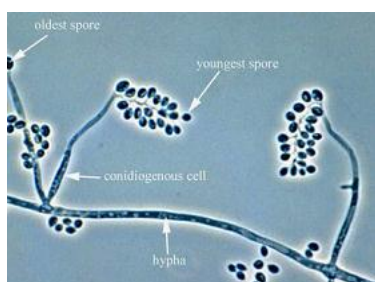
Nấm *B. bassina* diệt được côn trùng nhờ độc tố beauvericin.

Độc tố này có công thức $\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{O}_9\text{N}_3$, là một loại depsipeptit mạch vòng và tên gọi là cyclo (N - metyl - L - phenyl alanin - D - α - hydroxy - izovaleryl) $_3$, có điểm sôi ở 93 - 94°C,

Từ 1 lít dịch lên men tách được 1,5 g và 1 kg môi trường lên men rắn có thể tách được 3,8 g beauvericin.

Quá trình tác động của nấm lên côn trùng như sau: khi phun chế phẩm nấm, những bào tử của nấm sẽ phát tán trong không khí hay bám trên thân, lá cây. Khi gặp cơ thể sâu, bào tử sẽ nảy mầm mọc thành sợi nấm đâm xuyên qua tầng vỏ kitin của sâu và phát triển trong cơ thể của chúng. Sợi nấm mọc rất nhanh trên cơ thể côn trùng. Khi nấm xâm nhập vào côn trùng, côn trùng huy động các tế bào bạch huyết (lymphocyte) đến để chiến đấu chống lại độc tố beauvericin của nấm. Độc tính của độc tố này mạnh, cho nên khi nấm diệt hầu hết các tế bào bạch huyết cũng là lúc côn trùng bị chết.

Cho đến nay, người ta đã xác định được loài nấm này có khả năng ký sinh và gây chết với khoảng 100 loài côn trùng.



Hình 3.8. Sợi nấm và bào tử nấm *Beauveria bassina*



Hình 3.9. Sợi nấm mọc trên cơ thể côn trùng

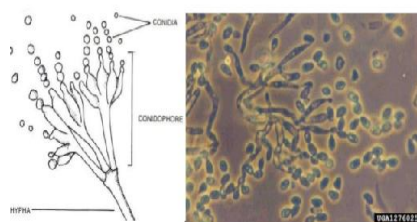
3.1.1. Nấm *Metarhizium anisopliae* (nấm **Lục cường**)

Nấm *Metarhizium anisopliae* có dạng sợi phân nhánh, có vách ngăn ngang, đường kính sợi $d = 3 - 4\mu\text{m}$. Sợi có màu từ trắng đến hồng. Bào tử của nấm là bào tử trần, dạng hình que, có kích thước $3 \times 7,2\mu\text{m}$, có bào tử xám đến xanh ô liu. Bào tử xếp thành chuỗi khá chặt chẽ, dưới kính hiển vi điện tử nhìn như phen giậu và nhìn bằng mắt thường thấy bào tử tạo ra trên bề mặt côn trùng một lớp phấn khá rõ.

Nấm *Metarhizium anisopliae* phát triển trong giới hạn pH 6,9 - 7,4, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của nấm là $25 - 30^\circ\text{C}$. Nếu nhiệt độ tăng lên trên nữa, sợi nấm sẽ sinh hoặc không sinh ra bào tử trần kém. Ngoài ra, muốn nấm sinh bào tử nhiều, cần độ ẩm của không khí khá cao (80 - 90%).

Người ta nghiên cứu khá nhiều về độc tố của nấm *M. anisopliae*. Độc tố diệt sâu bao gồm nhiều ngoại độc tố có tên Destruxin A, B, C và D. Destruxin A và B có thể tách ra từ dịch nuôi cấy nấm *M. anisopliae*. Destruxin A có công thức nguyên là $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_7\text{N}_5$, điểm sôi 188°C . Destruxin B có công thức nguyên là $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7\text{N}_5$, điểm sôi: 1.234°C , là những depsipeptit vòng.

Cơ chế tác động của các độc tố này lên côn trùng như sau: Tương tự như ở nấm Bạch cương, các bào tử khi rơi vào bề mặt côn trùng sau 24 giờ sẽ nảy mầm, tạo ống chui qua vỏ côn trùng, sau đó tiếp tục phân nhánh tạo sợi nấm chằng chịt trên khắp bề mặt của cơ thể côn trùng. Ngoại độc tố tiết ra sẽ tác động lên côn trùng, làm côn trùng chết. Cho đến nay, người ta đã biết có 70 loại côn trùng bị nấm này tiêu diệt.



Sợi nấm và bào tử nấm *Metarhizium anisopliae* **Sợi nấm mọc trên cơ thể côn trùng**

3.2. Phân lập và tuyển chọn giống nấm thuần chủng

Hai loài nấm *Beauveria bassina* và *Metarhizium anisopliae* khá phổ biến trong tự nhiên. Vì vậy, có thể phân lập chúng từ mẫu đất hoặc tốt nhất từ xác côn trùng chết (khi còn ở dạng sâu, kể cả tằm bị bệnh). Ở những nơi thời tiết khắc nghiệt, không có côn trùng, người ta cũng có thể lấy mẫu đất ở những nơi có chất thải hữu cơ, xác thực vật, ở đất trồng các cây được ở đầm lầy, ở đất trầm tích các dòng sông, trong tổ một số loài chim và cả trong rễ cây dâu tây cũng có thể phân lập được những nấm này.

3.2.1. Môi trường phân lập

Mẫu xác sâu bị chết hoặc mẫu đất, hòa nước rồi theo phương pháp pha loãng, gieo cấy trên môi trường thạch trong hộp Petri, nuôi 6 - 7 ngày (có khi tới 10 ngày) ở 28 - 30°C, quan sát và chọn khuẩn lạc thích ứng. Mẫu vật khi hòa tan có thể cấy vào môi trường dinh dưỡng lỏng trong 1 - 2 ngày mới đem pha loãng. Phương pháp này được gọi là nuôi cấy tăng sinh (khối) trước khi phân lập. Muốn hạn chế vi khuẩn phát triển trên môi trường phân lập, người ta có thể bổ sung vào môi trường một trong những chất sau: họ tetracyclin: 2 - 5mg/l; neomicin, polymycin, bacitracin: 50mg/l hoặc cloramphenicon.

Môi trường Sabouraud (g/l):

Glucose hay maltose	:	40 g
Pepton	:	10 g
Agar	:	20 g

Nước máy cho đủ 1 lít

pH 5 - 6

Môi trường này cũng có thể dùng để giữ giống nấm thuần chủng. Để giữ giống nấm, người ta hay giữ ở dạng bào tử: nấm nuôi trên môi trường thạch hoặc môi trường cám, gạo,... tới khi bào tử già. Tách bào tử và giữ ở trong lọ kín, túi kín, trong có các chất hút ẩm, chống bám dính.

Giống thuần chủng cấy trên môi trường thạch để 10 - 14 ngày ở trong phòng, rồi để vào tủ lạnh ở 4 - 10°C, cứ 2 - 3 tháng cấy chuyển lại. Giống đông khô và giống bào tử có thể giữ được vài năm.

Ngoài ra, còn có nhiều môi trường nhân tạo để phân lập nấm từ nhiều nguồn mẫu khác nhau và đã có kết quả. Ví dụ: Yagnuma đã dùng môi trường có nước chiết thân cây ngô để phân lập *Metarhizium anisopliae*; Mehan (Ấn Độ) với môi trường có kitin làm nguồn cacbon để phân lập *Metarhizium anisopliae* từ phân trâu, bò,...

3.2.2. Tuyển chọn giống nấm

Nếu môi trường saccharose và peptone có tỷ lệ thích hợp sẽ ảnh hưởng tốt đến sinh trưởng và sinh bào tử của nấm giống.

Để cho chế phẩm có kitinase hoặc chủng sản có khả năng sinh enzym này khi tiếp xúc với vỏ sâu sợi nấm dễ dàng đâm thủng lớp kitin của vỏ sâu xâm nhập vào bên

trong thân thì môi trường cần có chất kitin. Chất này là chất cảm ứng tạo thành enzym kitinase. Chất này còn ảnh hưởng tốt đến sinh trưởng cũng như sự tạo thành bào tử.

Trong nghiên cứu, dùng biều bì châu chấu làm nguồn kitin cho thêm vào môi trường và đã thu được kết quả mỹ mãn.

Ngoài ra, các chất khoáng đa lượng (K, Mg, P) và các nguyên tố vi lượng (trong đó có molipden - Mo) cũng rất cần cho sinh trưởng và tạo thành bào tử của vi nấm.

Sự hình thành độc tố (sản phẩm thứ cấp) là sự chuyển hóa từ các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp nhờ các quá trình hóa sinh đặc biệt. Độc tố của các vi nấm diệt côn trùng thường được tích lũy vào cuối giai đoạn sinh trưởng của nấm khi các nguồn dinh dưỡng và năng lượng đã cạn. Khả năng này là đặc tính sinh lý khá ổn định đối với từng loài vi nấm diệt côn trùng.

Nhiều nghiên cứu trên côn trùng đã xác định được quá trình sinh trưởng của nấm tiết ra enzym ngoại bào tham gia vào phân hủy các chất hữu cơ ở biều bì, ở các mô và ruột của côn trùng. Trong số này enzym protease đóng vai trò quan trọng. Khả năng phân giải của enzym ngoại bào và khả năng sinh ra các độc tố là cơ sở quan trọng trong cơ chế lây bệnh của nấm diệt côn trùng.

3.3. Công nghệ sản xuất chế phẩm vi nấm

Quá trình công nghệ sản xuất các chế phẩm vi nấm về nguyên lý không khác với quy trình công nghệ sản xuất các chế phẩm vi khuẩn: từ giống thuần chủng giữ ở các bộ sưu tập giống trong phòng thí nghiệm được hoạt hóa, nhân giống qua cấp I, cấp II,... rồi tiếp vào lên men (hay nuôi cấy mở rộng). Sản phẩm của quá trình này là sinh khối sống của các chủng vi nấm với bào tử cùng độc tính có hoạt tính diệt được côn trùng. Các sản phẩm này có thể là dạng bột, dạng hạt gồm các xơ cặn môi trường với sinh khối các chủng sản xuất.

Các phương pháp lên men (nuôi cấy vi nấm) là phương pháp nuôi cấy bề mặt và phương pháp nuôi cấy chìm. Với điều kiện ở nước ta phương pháp nuôi bề mặt có nhiều lợi thế và thích hợp.

3.3.1. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy vi nấm

*** Thành phần môi trường**

Thành phần nuôi cấy cơ bản trước hết là các cơ chất nguồn cacbon. Trong số này gạo là nguyên liệu khá phù hợp. Trên môi trường gạo, *M. anisopliae* cho số bào tử hình thành nhiều gấp 3 lần trên môi trường mảnh đậu tương. Ngoài ra, người ta còn dùng các loại cám trấu, nước dừa, cùi dừa trong thành phần môi trường nuôi vi nấm.

Nhiều công trình nghiên cứu đã xác định môi trường Czapek - Dox cũng phù hợp khi nuôi *M. anisopliae* và gạo là nguồn cacbon khá thích hợp. Vi nấm phát triển tốt trên môi trường được bổ sung kitin làm nguồn cacbon, trường hợp thêm kitin và glucose làm cho nấm cho số lượng bào tử cao hơn. Nguồn N vô cơ vi nấm có thể đồng hóa muối amôni, muối nitrat, nguồn N hữu cơ - protein, peptit, các axit amin cũng

được vi nấm hấp thu và có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng cùng hoạt động sống của nấm

Môi trường rắn nuôi cấy *M. anisopliae* theo phương pháp bề mặt có thành phần % sau đây cho kết quả tới 3.10^{10} bào tử/g chế phẩm: Cám gạo: 50, bột ngô: 20, bột đậu: 20, trấu; 10.

Ngoài hai nguồn C và N người ta còn chú ý đến các nguyên tố khoáng khác, đặc biệt là Co và Zn, cùng nhiều vitamin. Chính vì vậy, cơ chất trong môi trường là cám trấu, gạo tẻ ra thích hợp.

* Độ ẩm

Độ ẩm thích hợp cho bào tử nấm này mầm là 80 - 90%, Độ ẩm không khí buồng nuôi thích hợp cho nuôi cấy bề mặt là 80 - 95%. Độ ẩm của khối môi trường cho nấm sinh trưởng phát triển hệ sợi và sinh bào tử là 50 - 60%, nếu khối môi trường có độ ẩm ngoài khoảng này đều ảnh hưởng không tốt cho hoạt động sống (sinh trưởng và sinh bào tử, cũng như sinh enzym ngoại bào).

* pH

pH thích hợp cho vi nấm diệt côn trùng phát triển trong khoảng 3,5 - 8,0, pH tối thích trong khoảng 5,5 - 6.

* Nhiệt độ

Nhiệt độ là một thông số rất quan trọng trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật ưa ấm nói chung là 25 - 35°C, đối với nấm diệt côn trùng là 28°C.

* Độ thoáng khí

Nuôi cấy bề mặt trên cơ chất rắn cần phải xốp để không khí có thể luồn qua các khe hở trong khối môi trường, đồng thời phải lật lớp môi trường trên khay hoặc nong, nia. Chiều dày lớp môi trường rắn có thể dày tới 10 - 15 cm. Để môi trường có độ xốp thông thoáng người ta thường thêm trấu (hoặc bã mía, vỏ lạc băm nhỏ). Nuôi cấy chìm thổi khí qua hệ nén - lọc khí khá phức tạp để đảm bảo không khí đưa vào các fermenter là khí sạch (gần như là vô trùng tuyệt đối).

Lưu lượng không khí cấp cho lên men thích hợp là (0,3 - 0,7v/V/phút); v: thể tích không khí, V: thể tích môi trường.

3.3.2. Sản phẩm

Sản phẩm sau khi lên men được hoàn thành phẩm ở dạng lỏng, dạng bột mịn hoặc mảnh, đã xử lý tách thu sinh khối và sấy khô, đóng gói kín. Sản phẩm dạng bào tử là tốt nhất và sử dụng cũng thuận tiện nhất.

Đối với chế phẩm dạng bột, người ta phải rất chú ý đến khâu sấy, chủ yếu là sấy phun (thu được chế phẩm có độ ẩm thấp <10% và tỷ lệ bào tử chết là ít).

Chế phẩm dạng bột được pha loãng với nước để mật độ tế bào vào khoảng 10^7 - 10^8 /ml rồi phun vào đất vùng gốc hoặc lên cây. Cũng có thể dùng sản phẩm dạng bột trộn với đất rồi đưa vào đất gieo trồng. Sản phẩm được đánh giá chất lượng theo chỉ

tiêu số bào tử trong 1g (dạng khô) hoặc 1ml (dạng lỏng) và hoạt tính diệt sâu.

Thuốc (chế phẩm) dạng bột trước khi sử dụng thường được hòa với nước theo tỷ lệ được tính toán dựa trên mật độ bào tử của từng loại chế phẩm. Sử dụng chế phẩm vi nấm bằng cách phun lên cây trồng (phun đều vào thân, lá, cành,...). Trước khi phun cần bổ sung vào dịch chế phẩm các chất dính bám như Tween 80, agrat, dầu đậu nành hoặc dầu vừng, ri đường, xà phòng hoặc nước bồ kết,... Nên phun vào lúc trời râm mát, tránh ánh nắng. Thông thường dùng phun dịch pha khoảng 300 - 600 lít/ha. Theo kết quả của Viện Bảo vệ thực vật dùng chế phẩm vi nấm của Viện sản xuất theo phương pháp bề mặt rất có hiệu quả phòng trừ sâu hại cây trồng nông, lâm nghiệp. Trong số này có sâu xanh hại đay, châu chấu hại ngô, mía, rầy nâu hại lúa, sâu róm hại thông, sâu xanh, sâu đo, bọ hại dừa, mối đất hại cà phê và mối nói chung.

4. Chế phẩm vi sinh phòng chống bệnh cho cây trồng

4.1. Khái niệm chung

Phòng chống bệnh hại cây trồng bằng chế phẩm vi sinh dựa trên cơ sở đấu tranh sinh học hay kiểm soát sinh học (biocontrol). Biện pháp này sử dụng một hoặc nhiều loài vi sinh vật để ức chế hoặc diệt các tác nhân gây bệnh (những vi sinh vật gây hại) cho cây trồng có trong đất. Các vi sinh vật có hoạt tính đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh cây trồng được đưa vào đất, đặc biệt ở vùng rễ sẽ phát triển và xâm nhập vào bên trong và trên cây tạo khả năng chống chịu cho cây chủ. Cũng có thể dùng sản phẩm trao đổi chất thứ cấp của vi sinh vật là các chất kháng sinh vào mục đích này. Biện pháp này có thể làm giảm thiểu hoặc giải phóng khỏi đất các nguồn bệnh gây hại cho các loại cây trồng.

4.2. Một số bệnh ở cây trồng

Trong số các vi sinh vật gây bệnh hại cây trồng, khá phổ biến là các bệnh do nấm, do vi khuẩn,... và làm tổn thất cho ngành Nông nghiệp hàng năm tới 37,3 triệu tấn nông sản chính, chiếm 11,6% sản lượng trên toàn thế giới. Trong đó lúa là 9%, ngô 10%, rau 12%, cây ăn quả 16,5%, trong số này, bệnh do nấm gây ra chiếm 83%.

a. Bệnh thối thân, thối rễ

Bệnh thối thân, rễ ở thực vật do nhiều loài nấm ký sinh gây ra là *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Diplodia* sp., *Fusarium* sp., nhưng chủ yếu là *F. oxysporum*. Chỉ riêng tính ở khoai tây, thiệt hại do *Fusarium* sp. gây bệnh thối củ trên đồng ruộng và trong bảo quản lên tới 20% số củ thu hoạch được. Ngoài ra, chúng còn gây ra một số bệnh khác như bệnh mốc hồng và thối thân ở ngô. Nấm *F. oxysporum* còn gây ra bệnh héo mạch dẫn và nhiều bệnh thối thân, thối rễ ở nhiều loại cây rau quả và cây lương thực như lạc, cà chua,... Bệnh héo thân cây còn do *Pseudomonas solanacearum* là loài vi khuẩn Gram (-) ký sinh trên nhiều thực vật, bao gồm nhiều chủng gây bệnh héo rũ trên 35 họ cây trồng khác nhau, rất phổ biến ở nước ta và nhiều nước trên thế giới. Bệnh héo rũ vi khuẩn là loại bệnh gây tắc ống dẫn, sau mấy ngày toàn cây héo rũ, chết khô dần. Tỷ lệ cây bị bệnh tăng rõ rệt vào thời kỳ ra hoa - quả (củ) non, có thể làm

giảm từ 10 - 30% năng suất. Với khoai tây, bệnh làm giảm năng suất từ 10 - 25% tổng số củ.

b. Bệnh đạo ôn

Bệnh thường gặp nhất trên cây lúa và là bệnh có sự phát triển lâu đời nhất trong các bệnh hại lúa. Bệnh phân bố rộng rãi nhất và thường gặp ở 70 nước trên thế giới. Tuy có nhiều tranh cãi về việc đặt tên cho nấm này nhưng về sau theo quy định quốc tế, tên chính thức của loài nấm này đã được đặt là *Pyricularia oryzae*

Quá trình gây bệnh: do sự nảy mầm của bào tử hình thành vòi bám và xâm nhập qua cutin và biểu bì, sợi nấm cũng có thể xâm nhập qua khí khổng,... *P. oryzae* gây ra các đốm bệnh trên lá, đốt và các phần của bông và hạt. Vùng ngoài vết bệnh hình thành do sự xâm nhập các chất độc từ nấm tiết ra (pyricularin) bao gồm các vùng nhạt hòa trộn vào các mô khỏe. Vùng gây chết mô thường là một sọc màu nâu, hẹp nằm trải dài theo phía trong vùng ngoài. Nhiều vết bệnh có thể phát triển trên lá và làm lá bị chết nhanh chóng, hiện tượng đó xảy ra liên tiếp sau khi bẹ lá bị khô hằn và lúa đang đẻ nhánh bị nhiễm bệnh sẽ chết hoàn toàn. Các vùng gần gốc bông thường hay bị bệnh và hiện tượng này thường được gọi là thối (đạo ôn cổ bông) làm gãy hoàn toàn các nhánh bông và gốc cũng bị bệnh. Bệnh đạo ôn phát triển phụ thuộc vào khí hậu từng vùng và bệnh xảy ra do các nòi khác nhau ở vùng khác nhau. Ở vùng ôn đới, thường mưa phùn kéo dài hoặc mưa nhẹ, bệnh đạo ôn trên lá và lúa đẻ nhánh thường gây chết cây hoàn toàn. Ở vùng nhiệt đới, mạ thường hay bị bệnh nhưng sau khi cấy hiếm thấy lúa bị bệnh nặng.

c. Bệnh khô vằn

Bệnh do nấm *Corticium sasaki* (Shirai), hoặc *Rhizoctonia solani* gây ra. Bệnh khô vằn thường gặp ở các nước ôn đới như Nhật Bản, Trung Quốc,... Nhưng bệnh này cũng gây cho lúa, ngô với diện rộng ở nước ta trên 10 năm lại đây. Theo Kazaza, 1970, nấm gây bệnh khô vằn thường xâm nhập vào cây lúa thời kỳ đâm chồi, gây ra các đốm hơi xanh có hình ovan hoặc dạng trứng dài khoảng 10 mm trên bẹ lá, cuối cùng toàn bộ bẹ lá và lá ở phần trên bị tàn lụi.

4.3. Các chất kháng sinh và chế phẩm xạ khuẩn

4.3.1. Các chất kháng sinh

Việc nghiên cứu sử dụng kháng sinh trong BVTV mới chỉ bắt đầu từ những năm 60 của thế kỷ thứ XX, đây là hướng tương đối quan trọng trong việc phòng trừ các vi sinh vật gây bệnh hại cây trồng. Chất kháng sinh là những chất có tính chống lại các vi sinh vật hại, chúng có hoạt tính sinh lý cao có tác động chọn lọc và được các vi sinh vật tiết ra đưa vào môi trường sống trong mối quan hệ đối kháng với các sinh vật khác, trong đó vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn là những vi sinh vật sinh ra nhiều chất kháng sinh nhất. Chất kháng sinh đầu tiên được mọi người biết đến là Penicilin và Streptomycin, cho đến nay nhiều nhà khoa học đã phát hiện ra 2.000 chất kháng sinh dùng chủ yếu trong y học, còn trong BVTV, việc sử dụng kháng sinh mới chỉ ở mức

thăm dò.

Công nghệ sản xuất các thuốc kháng sinh trừ bệnh hại cây đã được nghiên cứu và triển khai ở nhiều nước trên thế giới. Nhìn chung các thuốc kháng sinh trừ bệnh cây cũng đều không độc với cây trồng và nhanh chóng phân hủy, không gây nhiễm độc cho môi trường. So với các thuốc sinh học trừ sâu thì tỷ lệ nghiên cứu về công nghệ sản xuất và sử dụng các thuốc sinh học trừ bệnh cây còn quá ít và như vậy so với khối lượng chung thì tỷ lệ này còn rất thấp. Mặc dù vậy cũng đã có những loài nấm đối kháng được sản xuất và sử dụng rộng rãi ở các nước phát triển trên thế giới.

Chất kháng sinh sử dụng để phòng, chống bệnh cho cây tỏ ra có nhiều ưu việt như có tác dụng nhanh, dễ bị phân hủy và có tác dụng chọn lọc.

Ở Trung Quốc, người ta đã tìm kiếm, tuyển chọn nhiều chủng xạ khuẩn từ đất và nghiên cứu nhiều chất kháng sinh trong phòng chống bệnh cây có hiệu quả cao: CKS "20" chống nấm gây bệnh cho các loại cây ngũ cốc, cây rau; polyoxin chống bệnh đạo ôn; Jangagmixin chống bệnh khô vằn,... Cho đến năm 1991, CKS "120" từ chủng *S. hygroscopicus* var. *beijingensis* phòng, chống cho 330 triệu ha cây trồng và chỉ số bệnh giảm 50 - 98,9% tùy theo từng loại bệnh. Ở Nhật Bản, việc sử dụng xạ khuẩn sinh kháng sinh trong bảo vệ thực vật đã được biết đến từ lâu như Blastisidin S sản xuất từ *S. griseochromogenes*, Kausugamixin từ *S. kasugaensis*, Validamycin từ *S. hygroscopicus* chống bệnh khô vằn rất có hiệu quả. Ở Liên Xô đã nghiên cứu sản xuất và áp dụng nhiều chất kháng sinh phòng, chống bảo vệ cây trồng, trong 37 chất kháng sinh để phòng, trừ nấm *Verticillium dahliae* gây bệnh héo rũ bông, một loại bệnh nguy hiểm, kết quả cho thấy Levorin và Trichotexin có hiệu quả cao nhất. Kết quả cho thấy, kháng sinh nhóm polyen 18 - 45 và 18 - 80 cũng làm giảm từ 70 - 80% bệnh này.

Nếu trước khi gieo hạt giống hoặc cây non trước khi trồng được đem xử lý qua dịch chất kháng sinh sẽ cho hiệu quả phòng chống bệnh cho cây được cao hơn.

4.3.2. Chế phẩm xạ khuẩn

Trong tự nhiên có nhiều loại vi sinh vật có thể kháng lại các vi sinh vật gây bệnh cho cây, nhất là đất được canh tác tốt, đúng kỹ thuật sẽ tạo điều kiện cho vi sinh vật có lợi phát triển cạnh tranh với các vi sinh vật có hại gây bệnh cho cây. Trong số các nhóm vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm bệnh thì xạ khuẩn có tỷ lệ đối kháng cao. Người ta có thể dùng những chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng này để đưa vào đất hoặc phun lên cây trồng. Có tới 40 - 60% các chủng xạ khuẩn sống trong đất có khả năng kháng lại các loại nấm gây bệnh cho cây trồng như nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối rễ, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn ở lúa, nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh khô vằn ở lúa, ngô,...

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học ở nhiều nước đã nghiên cứu tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm gây bệnh thực vật. Theo Kamada, 1974, khi điều tra xạ khuẩn trong đất ở Nhật Bản cho thấy, ở nơi có nhiều xạ khuẩn đối kháng thì ở đó có các dòng *Fusarium* bị biến mất rất nhanh

Thông thường một loại xạ khuẩn đối kháng có thể ức chế một vài loại nấm gây bệnh, nhưng cũng có loài có hoạt phổ kháng khuẩn rộng. Ví dụ: loài *S. laveudulae* var. *huinansis* có hoạt tính ức chế mạnh cả vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm gây bệnh. Những chủng như vậy có ưu thế làm tác nhân chống bệnh cây bằng biện pháp sinh học. Tuy nhiên, khi sử dụng những chủng này phải thận trọng để tránh xạ khuẩn ức chế luôn cả khu hệ vi sinh vật có lợi trong vùng rễ, không phải tất cả các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm in vitro đều thể hiện trong đất (thường từ khoảng 4 - 5%) nhưng chúng có vai trò quan trọng trong việc làm sạch đất khỏi nấm gây bệnh và ngăn ngừa khả năng nhiễm bệnh cho cây. Xạ khuẩn chống nấm, ngoài sự tiết ra chất kháng sinh, chúng còn tác động lên khu hệ vi sinh vật thông qua enzym dung giải. Đây là phức hệ bao gồm nhiều enzym. Ngoài ra xạ khuẩn còn tiết ra các chất kích thích sinh trưởng của thực vật cũng như khu hệ vi sinh vật có lợi trong vùng rễ.

Hơn nữa, xạ khuẩn là vi sinh vật sống hoại sinh, hầu hết các loài không gây bệnh cho người, động vật và cây trồng. Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng cao và tạo chế phẩm kháng sinh kháng nấm áp dụng vào công tác bảo vệ thực vật có tầm quan trọng đặc biệt.

Ngay từ những năm 1930, ở Trung Quốc đã sử dụng xạ khuẩn và các chất trao đổi của chúng để nghiên cứu hạn chế các bệnh thực vật. Từ năm 1950, họ đã chọn được chủng 5406 trong số 400 chủng xạ khuẩn phân lập được từ đất vùng rễ cây bông và cỏ linh lăng ức chế *Rhizoctonia solani* và *Verticilium albo-atrum* gây bệnh thối rễ cây bông non và ứng dụng trong phòng, chống bệnh cho 6 triệu ha bông. Trong 30 năm qua, Trung Quốc đã dùng chế phẩm vi sinh để phòng, chống bệnh và tăng năng suất cây trồng, và từ năm 1979 bắt đầu nghiên cứu thử nghiệm trên 50 vụ với diện tích lớn. Kết quả cho thấy, năng suất tăng từ 5 - 10% và hơn. Chế phẩm phân vi sinh có thể dạng ướt hoặc nước, có thể dùng để ngâm hạt, phun lên lá trộn vào hạt hoặc bón vào rễ cây. Qua thực tế, phân vi sinh, trong đó có xạ khuẩn làm giảm nhiều loại bệnh như đạo ôn ở lúa do *Rhizoctonia solani* gây ra; bệnh đốm lá đen ở khoai lang do *Ceratocytis fibriato* gây ra,... Hệ vi sinh vật trong chế phẩm vi sinh tạo ra chất kháng sinh ức chế vi sinh vật gây bệnh, sinh ra các chất bay hơi có hoạt tính kháng nấm, sinh ra enzym và thúc đẩy hoạt tính enzym trong cây. Thực tế cho thấy hiện nay, con người ngày một sử dụng rộng rãi nhiều chế phẩm kháng sinh và các chủng vi sinh vật đối kháng trong sản xuất nông, lâm nghiệp mang lại hiệu quả kinh tế cao và khắc phục được các yếu tố bất lợi của thuốc hóa học.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Trình bày quy trình sản xuất chế phẩm Bt.

Câu hỏi 2: Trình bày quy trình sản xuất chế phẩm vi nấm.

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Quy trình sản xuất chế phẩm Bt

- Quy trình sản xuất chế phẩm vi nấm.

CHƯƠNG 4: CHẾ PHẨM KÍCH THÍCH THỰC VẬT - GIBERELIN

Giới thiệu:

Chương Chế phẩm kích thích thực vật - GIBERELIN trang bị cho sinh viên các kiến thức về các loại chế phẩm Giberelin dùng làm chất kích thích ở thực vật. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được được các chủng vi sinh vật có khả năng sinh giberelin và quá trình lên men để sản xuất giberelin.

Mục tiêu:

- Trình bày được cơ chế tổng hợp giberelin;
- Liệt kê được các chủng vi sinh vật có khả năng sinh giberelin;
- Trình bày được quá trình lên men giberelin

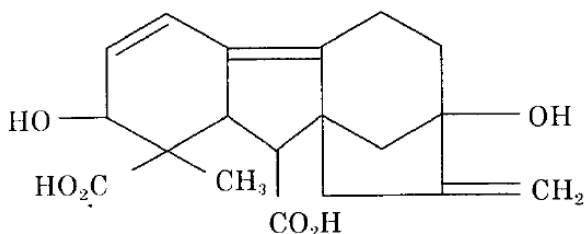
A. Nội dung:

1. Cơ chế sinh tổng hợp giberelin

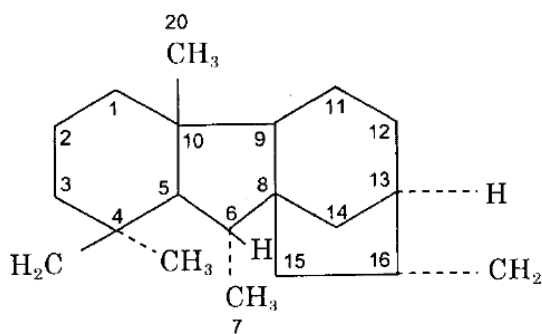
Giberelin một hormone thực vật có tác dụng điều chỉnh sự phát triển ở thực vật và có ảnh hưởng tới một loạt các quá trình phát triển như làm cho thân dài ra, nảy mầm, ngủ, ra hoa, biểu hiện gen, kích thích enzym và tình trạng già yếu của lá cũng như quả v.v.

Những giberelin A₂, A₁₀ - A₁₅, A₂₄ và A₂₅ chỉ tách được nấm ở *F. moniliforme*, những giberelin A₅, A₆, A₈, A₁₆ - A₂₃, A₂₆ - A₃₂ chỉ thấy ở thực vật bậc cao, còn giberelin A₁, A₃, A₄, A₇ và A₉; thấy cả ở nấm *F. moniliforme* và cả ở thực vật bậc cao.

Năm 1954. Cross đã xác định được công thức cấu tạo của giberelin A₃ (axit giberelic) như sau:



Hình 4.1. Công thức cấu tạo của Gibberelin A₃



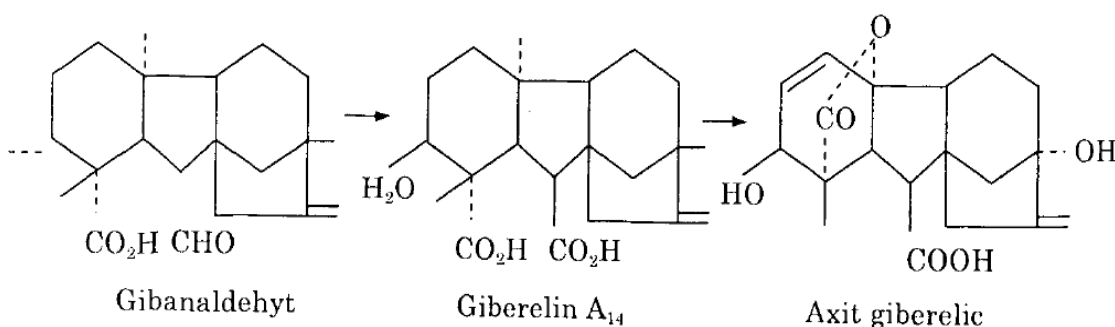
Hình 4.2. Công thức cấu tạo chung của Gibberelin

Ngày nay, người ta đã biết rõ cấu tạo của các chất giberelin. Chúng có cấu tạo gồm những axit cacboxylic 4 vòng rất gần với diterpenoit tự nhiên. Trong công thức,

các vị trí cacbon được đánh số từ C₁ đến C₁₉₋₂₀. Sau đây giới thiệu công thức chung của các giberelin.

Giberelin A₃ được nghiên cứu kỹ nhất. Hầu hết các nhà nghiên cứu trong lĩnh vực này đều làm quen với axit giberelic. Nó là chất kết tinh không màu, không bay hơi, có các nhóm phân cực (cacboxylic, hydroxyl) và không phân cực (metyl, metylen). Axit giberelic hòa tan tốt trong các loại cồn (metanol, etanol, butanol, propanol,...), trong xeton (axeton, xyclopentanon, xyclohexanon,...) và trong các este phức tạp: n-butylaxetat, B-etoxyetylaxetat, 3-metoxibutylaxetat,...) nhưng lại hòa tan kém trong butylaxetat, clorofooc, etesunfuric, đặc biệt kém trong benzen và nước, hầu như không hòa tan trong etepetrol. Những muối của axit giberelic hòa tan trong nước.

Con đường sinh tổng hợp Giberelin như sau:



Hình 4.3. Con đường sinh tổng hợp Giberelin

2. Các giống vi sinh vật có khả năng sinh giberelin

Giberelin được tạo thành chủ yếu do các nấm *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum* và một số nấm khác, giberelin còn tìm thấy ở thực vật bậc cao. Hiện nay giống vi sinh vật được dùng sản xuất các chế phẩm giberelin là các chủng của *Fusarium moniliforme*. Chúng được phân lập từ các cây lúa bị bệnh bakanae, từ ngô và lúa trên các vùng lãnh thổ có khí hậu khác nhau. Ở nước ta đã phân lập được 241 chủng nấm gây bệnh lúa von trên các địa phương thuộc các tỉnh miền Bắc. Từ các chủng trên đã chọn được một số chủng có khả năng tổng hợp giberelin mạnh (hơn 500mg/lít môi trường nuôi cấy). Trong đó đã chọn được chủng F101 có khả năng sinh tổng hợp cao hơn cả. Kết quả tuyển chọn các giống *Fusarium moniliforme* var lactic, *Fusarium moniliforme* var subglutinans (tất cả 164 chủng) và *Fusarium oxysporum* (164 chủng) cho thấy giống *Fusarium moniliforme* có 7% và giống *Fusarium oxysporum* có 2% số 114 chủng có khả năng sinh tổng hợp giberelin.

3. Lên men giberelin

3.1. Nguyên liệu

Môi trường lên men giberelin nổi tiếng là môi trường Rolen - Tom, thành phần môi trường này gồm có (g/l): Saccarose - 40 hoặc 60, tacrat amôn - 7; KH₂PO₄ - 2; MgSO₄.7H₂O - 0,2; K₂HPO₄ - 0,2; hỗn hợp các nguyên tố vi lượng, pH = 5,5. Muromtxev đã dùng môi trường này và bổ sung 0,5% cao ngô làm tăng được hiệu suất

lên men.

Ở Mỹ, năm 1955, nhóm công tác dưới sự hướng dẫn của Stodola đã cho sản xuất thử Gibberelin trong thùng lên men 1.200 lít với môi trường glucose - muối khoáng, pH = 5 - 6, có sục khí, thu được một hỗn hợp gibberelin (chủ yếu là A₁ và A₃). Hiệu suất lên men là 22 mg/l. Ở Anh (Borrow và cộng tác, 1955) dùng môi trường glucose – tatrata cho lên men chìm thu được hiệu suất 180 mg.

3.2. Chứng giống

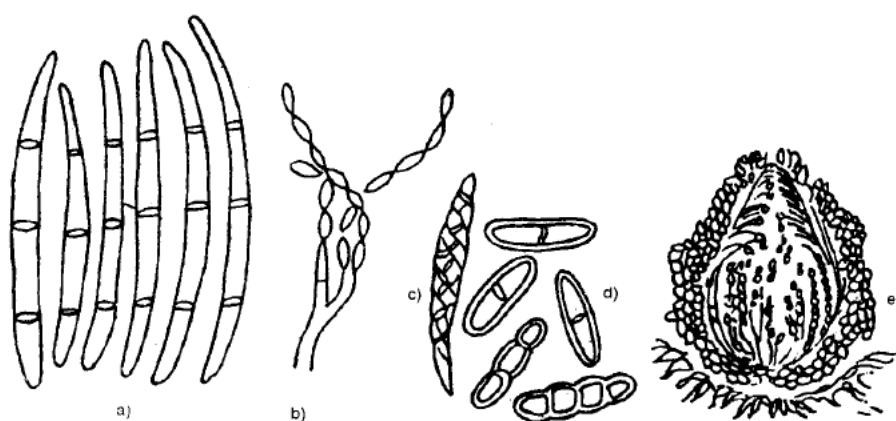
Hiện nay các chủng dùng trong công nghiệp lên men gibberelin đều thuộc giống *Fusarium moniliforme*

Nấm *Fusarium moniliforme* sinh sản bằng đính bào tử. Những đính bào tử của *Fusarium moniliforme* được phân biệt bằng kích thước và số lượng vách ngăn: đính bào tử nhỏ và đính bào tử lớn. Đính bào tử nhỏ của *Fusarium moniliforme* là một tế bào, nhưng đôi khi có 1 - 3 vách ngăn. Đính bào tử lớn có 3 - 5 vách ngăn, đôi khi có tới 6 - 3 vách ngăn. Những chủng *Fusarium moniliforme* trong quá trình nuôi cấy chỉ sinh hệ sợi gọi là "chủng mixen", những chủng sinh đính bào tử gọi là "chủng đính bào tử".

Fusarium moniliforme trong quá trình nuôi cấy chìm có khả năng tích tụ axit amin ngoại bào, đặc biệt là alanin và axit glutamic. Ngoài ra, nấm này có hoạt tính kháng sinh (có thể sinh ra estrogen)..

Đa số những chủng *Fusarium moniliforme* phát triển tốt trên môi trường tổng hợp đơn giản, không cần bổ sung các chất sinh trưởng. Nếu thêm vào môi trường các chất như thiamin, biotin, pirodoxin tác dụng kích thích sinh trưởng nấm

Fusarium moniliforme phát triển tốt trong khoảng pH rộng, nhưng tốt nhất trong vùng 5,0 - 5,4. Nhiệt độ tối thích cho phát triển của nấm này là 26 - 28°C



Hình 4.4. Các dạng bào tử của *Fusarium moniliforme*

a. Đính bào tử lớn, b. Đính bào tử nhỏ, c. Túi, d. Bào tử nang, e. Quả thể chai

3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men

Đầu tiên lên men gibberelin bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt, dùng glycerin hoặc đường glucose làm nguồn cacbon và năng lượng, dùng amôn clorua làm nguồn

nitơ. Hiệu suất lên men theo phương pháp này rất thấp và những công trình này đến nay chỉ có ý nghĩa lịch sử để tham khảo. Song, với điều kiện công nghệ còn thấp như ở nước ta, phương pháp nuôi cấy nấm trên môi trường rắn với cơ chất là cám, gạo, thóc, trấu, mảnh ngô, bột khô dầu.... lại tỏ ra thích hợp. Ngày nay lên men gibberelin bằng phương pháp nuôi cấy chìm cho hiệu suất cao, nhưng thời gian của quá trình tương đối dài,

Các nguồn cacbon thường dùng trong lên men là glucose và saccarose với nồng độ từ 3,5 - 4 đến 20% và hiệu suất lên men có thể đạt được từ 100 - 200 đến 500 - 600g/1. Ngoài ra, trong quá trình lên men còn dùng các loại chất béo để phá bột cũng có thể làm nguồn cacbon dinh dưỡng đối với nấm. Khi bổ sung 0,5 - 1% mỡ cá voi vào mục đích này cũng nâng cao được hiệu suất lên men. Glyxerin, tinh bột, bột đậu tương... cũng được dùng trong lên men và đối với nhiều chủng cho hiệu suất gibberelin cao. Đặc biệt khi dùng dầu thực vật hoặc axit béo nuôi cấy một số chủng cho hiệu suất lên men rất cao (cao hơn cả khi dùng saccarose).

Nguồn nitơ tốt nhất để sinh tổng hợp giborelin trên môi trường đường là amôn tatrát. Chất này vừa là nguồn N đồng thời lại là nguồn C. Những muối amôn của các axit formic, axetic propionic, lactic, oxalic, xucxinic, xitric, clohydric và NaNO_3 , thường cho hiệu suất kém hơn các nguồn nitơ hữu cơ dùng trong lên men gibberelin là cao ngô, bột đậu tương, bột mì và khô hạt bông. Dùng đậu tương 3% cho hiệu quả tốt. Trong trường hợp này pH môi trường đầu tiên cần phải ở vùng axit (pH khoảng 3,5).

4. Ứng dụng của gibberelin

Chế phẩm gibberelin (kể cả chế phẩm thô thu được theo phương pháp bề mặt) được sử dụng vào sản xuất thóc malt. Sử dụng gibberelin tương đối đơn giản, có thể dùng chúng ở dạng bột nhão hoặc ở dạng dung dịch có nồng độ khác nhau (từ 1 - 1.000 ppm/1 hoặc cao hơn). Tác dụng của gibberelin đến các loại cây thân có chỉ vài giờ sau là có thể thấy được, còn đối với những cây thân gỗ phải sau vài tuần.

Cần phải nhấn mạnh rằng, việc sử dụng gibberelin phụ thuộc vào từng giống cây, loại cây, liều lượng sử dụng,... và sẽ cho kết quả dương hoặc kết quả âm. Vì vậy, hiện nay gibberelin mới được ứng dụng vào trồng trọt các loại cây như nho, khoai tây, chanh cam, rau ăn lá, ăn quả, cây cảnh trở hoa và sản xuất thóc malt; còn các cây như lúa, bông đang thử nghiệm, tác dụng âm rất dễ thấy ở cây lúa. Cây lúa bị nhiễm gibberelin hoặc bị nấm bệnh ký sinh sẽ trở thành lúa von, đóng đài ra, cây cao vọt lên, màu sắc thay đổi, không đâm bông trở hạt hoặc đâm bông nhưng kết hạt rất kém.

Ở nước ta đã đề ra phương pháp chống bệnh lúa von bằng cách xử lý thóc giống trong nước ấm (ba sôi hai lạnh) để giết các bào tử hoặc mẫu sợi nấm. Quan sát các nấm bệnh của cây trồng thấy chúng sống ký sinh với bộ rễ, phát triển hệ sợi và mọc dài theo các ống dẫn của rễ. Ở cây ngô, sợi nấm mọc dài trong các ống dẫn dài tới 15 - 25 cm. Trong quá trình sống, nấm tạo thành gibberelin, auxin và các chất có hoạt tính sinh học khác. Các chất này ngấm vào tế bào cây qua bộ rễ. Gibberelin dùng ở dạng chế

phẩm cũng được ngấm vào tế bào và cũng gây ra các hiệu ứng giống như nấm bệnh ký sinh với cây cối tạo thành. Dùng gibberelin ta có thể chọn đúng đối tượng, dùng với các nồng độ thích hợp và theo dõi các điều kiện thao tác xử lý sẽ cho kết quả dương.

Dưới ảnh hưởng của gibberelin cho thấy, các tế bào thực vật và tế bào phân cắt tăng lên, sự biểu hiện tác dụng của chất này là làm thay đổi hình thái của cây và hoạt tính phân bào có to. Gibberelin có ảnh hưởng tới nhiều mặt trao đổi chất trong quá trình sống của thực vật: làm thay đổi hàm lượng hydrat cacbon, hàm lượng các hợp chất nitơ, hoạt tính của nhiều enzym, làm thay đổi cường độ quang hợp. Tuy nhiên, đặc tính và mức độ thay đổi phụ thuộc vào liều lượng chế phẩm được sử dụng, cũng như điều kiện nuôi dưỡng cây. Người ta đã xác định được rằng, các loại cây được xử lý gibberelin đòi hỏi bón nhiều chất dinh dưỡng hơn và chế độ tưới nước cần tăng cường hơn.

Dưới ảnh hưởng của gibberelin, các chất auxin được tạo thành nhiều hơn trong cây cối và nhờ sự đồng tác dụng của hai hợp chất này cho hiệu quả kích thích sinh trưởng cao hơn. Trong trường hợp này gibberelin có thể ức chế một số enzym gây mất hoạt tính của auxin.

Gibberelin kích thích mạnh sinh trưởng của cây chủ yếu ở thân, cành, nhánh, lá và với mức độ ít hơn ở rễ. Sinh trưởng ở thân và cành cây được tăng lên nhờ kéo dài các dóng hoặc tăng số lượng của chúng.

Gibberelin ảnh hưởng không những đến sinh trưởng của cành, mà còn ảnh hưởng đến sự tạo thành cành. Đối với nhiều loại cây, trong một thời gian dài chỉ phát triển rễ chính, còn các cành chính và cành phụ không được tạo thành. Dưới tác dụng của gibberelin, các cây này mọc cành nhánh và phát triển rất mạnh. Đối với những cây non thuộc giống cây hai năm ở xứ lạnh (cà rốt, bắp cải, củ cải đường, cải bẹ trắng,...) được xử lý bằng gibberelin sẽ ra hoa và kết quả ở năm thứ nhất mà không cần phải qua giai đoạn xuân hóa.

Gibberelin thúc đẩy sự phát triển của chanh, cam, đào, mơ và làm tăng lượng quả của anh đào, dâu tây cũng như nhiều cây khác. Ta còn tìm thấy kết quả rất đáng khích lệ của gibberelin trong trồng trọt các loại cây công nghiệp: cây dầu gai, chè, thuốc lá, nho và làm rụng đài ở cây bông. Gibberelin dùng cho giống nho teo hạt, có thể cho tăng năng suất trung bình 75%. Đối với khoai tây được xử lý bằng gibberelin sẽ rút ngắn thời gian tĩn trước khi nảy mầm. Gibberelin còn được dùng rộng rãi trong sản xuất thóc malt: 1 tấn đại mạch chỉ dùng hết 40 - 200mg gibberelin. Đại mạch được xử lý bằng gibberelin có thể rút ngắn thời gian thành mầm (trong quá trình sản xuất thóc malt) từ 8 xuống 5 ngày, nâng cao được hiệu suất, giảm giá thành sản phẩm. Thóc malt sản xuất theo phương pháp này dùng nấu bia không làm thay đổi chất lượng của bia. Việc dùng gibberelin trong sản xuất thóc malt để nấu bia được thông báo ở Nhật Bản từ năm 1940, ở châu Âu từ năm 1958. Ngày nay dùng phổ biến gibberelin trong công nghiệp bia ở nhiều nước như Cộng hoà liên bang Đức, Ba Lan, Hungari, Tiệp Khắc, Nga, Mỹ, Anh,

Nhật Bản,... Theo thống kê ở Ba Lan, dùng chế phẩm này làm tăng hiệu suất và giảm giá thành thóc malt tới 12 - 15%. Ở Anh, 90% chế phẩm gibberelin được dùng vào công nghiệp bia.

Sở dĩ trong khoai tây, các loại hạt giống hoặc một số cây cối có trạng thái tĩnh là do trong các mô của chúng có chứa một lượng axit abscisic cao. Khi được xử lý bằng gibberelin thì lượng axit này giảm xuống, các chồi trở nên hoạt động nhú ra khỏi hạt hoặc khỏi cành hình thành mầm, hoặc thành cành lá non và sau đó cây bước vào trạng thái phát triển.

Gibberelin còn có triển vọng trong nghề trồng hoa. Nó làm cho cây tăng số lượng hoa hoặc cho hoa nở theo thời gian quy định phụ thuộc vào điều kiện xử lý bằng gibberelin. Khi cây được nhiễm gibberelin sẽ kích thích cây đâm nhiều bông và sớm nở hoa, làm thay đổi hình dáng của thân, cành, nhánh và cả kích thước của những bông hoa.

Ngày nay, gibberelin đang được ứng dụng rộng rãi và ngày càng tìm thấy những ứng dụng của nó trong trồng trọt nhằm tăng năng suất cây trồng. Nhưng cũng cần phải nhắc lại ở đây rằng, gibberelin không phải chất kích thích sinh trưởng thực vật vạn năng. Việc ứng dụng nó cần phải thận trọng, có nghiên cứu kỹ và đề ra những quy định trong quy trình sử dụng đối với từng đối tượng.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Trình bày cơ chế tổng hợp gibberelin.

Câu hỏi 2: Trình bày được quá trình lên men gibberelin.

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Cơ chế tổng hợp gibberelin
- Quá trình lên men gibberelin.

CHƯƠNG 5: CHẾ PHẨM PROBIOTIC

Giới thiệu:

Chương Chế phẩm Probiotic trang bị cho sinh viên các kiến thức về chế phẩm probiotic, dùng làm chất kích thích ở thực vật. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được khái niệm và vai trò của probiotic, quy trình sản xuất chế phẩm probiotic.

Mục tiêu:

- Trình bày được khái niệm và vai trò của probiotic
- Phân tích được vai trò của vi sinh vật có trong probiotic;
- Trình bày được quy trình sản xuất chế phẩm probiotic.

A. Nội dung:

1. Probiotic

1.1. Khái niệm

Năm 1989, Parker định nghĩa: Probiotic là những vi sinh vật (chủ yếu là vi khuẩn) có khả năng cộng sinh (hoặc hợp sinh) trong đường ruột có tác dụng cân bằng hệ vi sinh vật trong đó có một số tác dụng hữu ích cho vật chủ. Do vậy, probiotic có nghĩa là phòng ngừa hay dự phòng sinh học.

1.2. Vai trò

a. Trong đường ruột động vật

Khi probiotic được đưa vào đường ruột, các vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm làm sạch đường ruột, cân bằng hệ sinh thái, điều chỉnh môi trường, ức chế các vi sinh vật gây hại hoặc gây bệnh, loại bỏ các quá trình lên men bất lợi do các vi sinh vật có hại này gây nên, làm cho các chức năng của đường ruột được hoạt động tốt hơn.

- Liên quan đến việc làm sạch đường ruột có tác dụng thúc đẩy quá trình lọc máu và lọc các chất độc cần bài tiết.
- Làm tăng cường hệ số tiêu hóa của thức ăn: tăng hệ số hấp thụ và sử dụng các chất dinh dưỡng trong thức ăn.
- Làm bình thường chức năng miễn dịch của cơ thể.
- Làm lành mạnh và hoạt hóa khả năng tự nhiên của tế bào.

Hai tác dụng cuối liên quan đến dịch chiết từ chế phẩm probiotic có hoạt chất sinh học, như axit amin, các enzym, các nucleotit, các axit nucleic, các vitamin, đặc biệt là biotin. Các hoạt chất này có liên quan đến khả năng đổi mới của tế bào của cơ thể, làm tăng kháng thể và khả năng miễn dịch,...cũng có thể làm chậm quá trình lão hóa, làm tăng sức khỏe chống sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh.

Các tác dụng trên đây thường thấy khi sử dụng trộn chế phẩm với thức ăn của vật nuôi, hoặc cho người hay động vật uống các dịch chiết từ chế phẩm. Các chế phẩm này có thể dùng ở dạng dịch hoặc bột (phun hoặc rắc vào môi trường nước hay chuồng

trại) để xử lý môi trường. Các "men tiêu hoá" dùng cho người thuộc dạng này, chủ yếu là các vi khuẩn lactic.

b. Trong bảo vệ môi trường

- Các vi sinh vật của chế phẩm, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Lactic* và nhóm vi khuẩn *Bacillus* có tác dụng ức chế các vi sinh vật gây bệnh đường ruột, đó là *Salmonella*, *Vibrio*, *Shigella* rất rõ. Ngoài ra, axit lactic tạo thành có tác dụng làm sạch ruột, làm cơ chất dinh dưỡng rất tốt cho động vật tiêu hóa. Các hoạt chất kháng sinh do vi khuẩn này sinh ra đều có khả năng ức chế (cùng với vi khuẩn lactic) các vi sinh vật gây hại.

- Nhóm vi khuẩn *Bacillus*: Là các vi khuẩn sống hiếu khí tùy tiện và có khả năng sinh ra các enzym thủy phân ngoại bào. Vì vậy, khi vào môi trường nuôi chúng có thể sinh sản rất mạnh, ngoài khả năng ngăn chặn các vi sinh vật gây bệnh phát triển, chúng còn phân hủy các chất hữu cơ do thức ăn thừa và phân của vật nuôi bài tiết,... để giảm thiểu ô nhiễm.

- Trong quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ ta thấy xuất hiện khí H_2S và các khí thối khác là dẫn xuất của khí này. Trong probiotic có vi khuẩn tía có khả năng sử dụng khí H_2S làm thức ăn, mùi hôi thối giảm đi rõ rệt.

- Đồng thời các nấm men có trong chế phẩm có khả năng lên men rượu từ đường có trong môi trường, tạo mùi thơm, cải thiện mùi cho môi trường và nâng cao hệ số tiêu hóa của thức ăn cho vật nuôi.

- Khi phun chế phẩm vào những chỗ có mùi hôi thối như cống, rãnh, hố xí, đồng rác thải, chuồng trại chăn nuôi, cũng như vật nuôi đều có tác dụng làm mất mùi hoặc giảm mùi rõ rệt, giảm số lượng ruồi nhặng và các loại côn trùng so với trước khi sử dụng chế phẩm.

- Đối với các đồng rác, ngoài tác dụng làm giảm hoặc mất mùi hôi thối còn có hiện tượng thối giảm nhanh là do các vi sinh vật trong chế phẩm tiết ra hệ enzym thủy phân các chất hữu cơ, đó là các nhóm enzym amylase, protease, xenlulase và đặc biệt là xenlulase, hemixenlulase làm tạo mùn nhanh chóng hơn.

- Phun chế phẩm vào kho tàng bảo quản nông sản có tác dụng ngăn chặn được quá trình thối rữa.

d. Chăn nuôi

Probiotic có tác dụng đối với tất cả vật nuôi, gồm các loại gia súc, gia cầm, thủy cầm, thủy sản. Đối với vật nuôi:

- Giúp phát triển hệ vi sinh vật đường ruột bình thường, tăng cường khả năng tiêu hóa và hấp thụ dinh dưỡng từ các loại thức ăn. Đối với gia súc dạ cỏ, chế phẩm này còn giúp cho hệ vi sinh vật dạ cỏ phát triển và hoạt động tốt hơn.

- Làm tăng sức khỏe vật nuôi, tăng sức đề kháng và khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi cho vật nuôi, phòng chống các dịch bệnh thường gặp, nhất là

bệnh la phân trắng.

- Làm cho gia súc, gia cầm cái mắn đẻ hơn.
- Tăng chất lượng thịt, tăng năng suất chăn nuôi.
- Ưc chế và có thể tiêu diệt được các vi sinh vật có hại, làm giảm hoặc làm mất mùi hôi thối ô nhiễm chuồng trại chăn nuôi.
- Cho vật nuôi ăn hoặc uống chế phẩm đều tốt, giảm mùi hôi thối của phân.
- Với môi trường nước nuôi tôm, cá, khi dùng chế phẩm, nước ao đầm có pH thay đổi từ từ hoặc thay đổi không quá đột ngột. Các chỉ số BOD, COD cũng vậy, hàm lượng NH_3 và H_2S thường không quá giới hạn cho phép thì thời gian thay nước sẽ kéo dài hơn. Điều quan trọng hơn cả là vật nuôi khỏe hơn, tăng trọng nhanh hơn và chi phí thức ăn cho một đơn vị tăng trọng giảm.

Vì vậy, dùng chế phẩm probiotic hòa vào thức ăn hay nước uống cho vật nuôi đều có tác dụng dương tính. Dùng dạng dịch pha loãng phun trực tiếp lên cơ thể con vật như chó, lợn,... sẽ mất mùi thối; phun trực tiếp vào bầu vú con cái thì khi cho con bú sẽ tránh bị nhiễm khuẩn có hại.

e. Trong trồng trọt

Chế phẩm probiotic có tác dụng với nhiều loại cây trồng (bao gồm cây lương thực, cây ăn quả, cây rau màu....) và ở mọi giai đoạn sinh trưởng phát triển khác nhau. Tác dụng với cây trồng ta thấy:

- Kích thích sự nảy mầm, ra hoa, kết quả và quá trình chín của quả.
- Cải thiện hệ vi sinh vật đất, ngăn chặn các mầm bệnh.
- Tăng cường khả năng hấp thụ dinh dưỡng của cây trồng.
- Kéo dài được thời gian bảo quản, tăng chất lượng các sản phẩm tươi sống, làm cho hoa trái tươi lâu.
- Chế phẩm probiotic khi được đưa vào đất có thể tái lập quần thể hệ vi sinh vật mới có lợi cho cây trồng, đặc biệt là hệ vi sinh vật vùng rễ. Cây trồng sẽ phát triển tốt ở đất, nơi mà các vi sinh vật có ích chiếm vai trò chủ yếu, giúp cho cây trồng nâng cao được hiệu suất quang hợp và sử dụng phân bón, đặc biệt là phân bón hữu cơ.

2. Thành phần vi sinh vật trong chế phẩm probiotic

2.1. Vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn thân thuộc với con người từ ngàn xưa. Trong tự nhiên, các vi khuẩn lactic phân bố rộng rãi, đặc biệt gặp nhiều trong các sản phẩm muối chua như dưa chua, cà muối, sữa chua,...sản phẩm của vi sinh vật này khi lên men đường là axit lactic.

Các vi khuẩn lactic được gộp chung vào họ *Lactobacteriaceae*. Chúng không đồng nhất về mặt hình thái tế bào (hình que ngắn, dài, hình cầu, đứng riêng rẽ, kết đôi hoặc kết thành chuỗi) nhưng về mặt sinh lý chúng có những đặc điểm tương đối giống

nhau. Tất cả đều có đặc điểm chung là vi khuẩn Gram (+), không sinh bào tử (trừ *Lactobacillus inulinus*) và không chuyển động.

Các vi khuẩn lactic sử dụng năng lượng khi phân giải hydratecacbon và sinh ra axit lactic ở dạng D (-) hoặc L (+) hay hỗn hợp DL. Khác với một số vi khuẩn đường ruột cũng sinh ra axit lactic, các vi khuẩn lactic đều là vi khuẩn lên men lactic bắt buộc không chứa xitocrom và enzym catalase. Chúng là những cơ thể sống kỵ khí và vi hiếu khí.

Các vi khuẩn lactic bao gồm 4 giống (genus) hay chi là: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus* và *Lactobacillus*. Trong số này các loài hoặc chủng thuộc giống *Lactobacillus* là trực khuẩn (tế bào hình que), các vi khuẩn thuộc ba giống còn lại là hình cầu. Kích thước tế bào của chúng thay đổi tùy theo từng loài khác nhau. Hình thái và kích thước tế bào còn phụ thuộc rất nhiều vào thành phần môi trường, thời gian nuôi cấy cũng như sự có mặt của oxy trong môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác,...

Giống *Streptococcus* có tế bào hình cầu hoặc ovan, đường kính khoảng 0,1 μm , xếp thành chuỗi dài hoặc đứng riêng biệt. Tuy nhiên, một số chủng thuộc giống này có hình dáng gần giống với trực khuẩn vì tế bào có kích thước chiều dài lớn hơn chiều rộng (như một số chủng thuộc loài: *Streptococcus lactic*).

Giống *Leuconostoc* có hình dạng hơi dài hoặc ovan, đường kính 0,5 - 0,8 μm và chiều dài khoảng 1, 6 μm đôi khi có dạng hơi tròn (1 - 3 μm), xếp thành chuỗi không tạo thành đám tập trung.

Giống *Lactobacillus* có dạng hình que. Đây là giống vi khuẩn lactic phổ biến nhất, hình dáng thay đổi từ hình que sang hình cầu méo đến hình que dài. Ví dụ: *Lactobacillus plantarum* có hình que, kích thước từ 0,7- 1,1 μm đến 3 - 8 μm , xếp thành chuỗi hoặc đứng riêng lẻ. *Lactobacillus casei* có hình que ngắn hoặc que dài, tế bào mảnh, đôi khi hơi cong, xếp thành từng cặp hoặc chuỗi.

Giống *Pedicoccus* hình cầu, đường kính 0,6 - 1 μm , xếp thành từng đám, cặp đôi hoặc cặp bốn.

2.2. Nhóm vi khuẩn *Bacillus* và các vi khuẩn amon hóa

Các vi khuẩn *Bacillus* là nhóm trực khuẩn sinh bào tử sống hiếu khí tùy tiện nhưng trong điều kiện hiếu khí thì hoạt động mạnh hơn. Chúng rất phổ biến trong tự nhiên. Một số loài của giống này còn thấy trong khoang miệng, trong đường ruột của người và động vật. Tất cả các loài *Bacillus* đều có khả năng phân giải hợp chất hữu cơ chứa nitơ, như protein khá mạnh nhờ sinh ra protease ngoại bào. Ngoài ra, chúng còn có khả năng sinh ra amylase làm loãng tinh bột, biến chất này thành dễ hòa tan và thủy phân tiếp theo thành các dextrin và các loại đường hợp thành. Một số chủng thuộc loài *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*,... có thể có khả năng sinh ra enzym xenlulase và hemixenlulase phân hủy xenlulose, hemixenlulose.

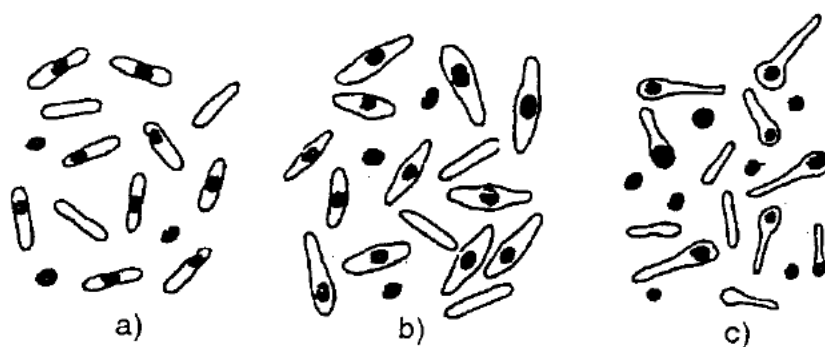
Sản phẩm chính của quá trình amôn hóa là amôniac (NH_3), trong dung dịch,

amôniac ở dạng ion amôn (NH_4^+) và kiềm hóa môi trường (từ trung tính sang kiềm). Do đó, vi khuẩn *Bacillus* còn được gọi là vi khuẩn amôn hóa hay các vi khuẩn gây thối rữa. Protease của vi khuẩn *Bacillus* là protease kiềm được dùng nhiều trong bột giặt, trong rũ lông thuộc da, trong thủy phân protein của thịt, cá.

Ngoài các enzym trên, các vi khuẩn còn có khả năng sinh ra bacteroxin - chất có hoạt tính kháng sinh, như inturim, subtilin từ *Bacillus subtilis*, bacitraxin từ *B. lichenniformis*,... Các chất có hoạt tính này thường không dùng trong y tế nên không xảy ra hiện tượng nhờn thuốc đối với các vi sinh vật gây bệnh, riêng bacitraxin là chất kháng sinh bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để ức chế các vi khuẩn gây bệnh đường ruột và kích thích tiêu hóa cũng như tăng trọng của vật nuôi.

Các vi khuẩn amôn hóa còn thấy ở các giống *Pseudomonas*, *Proteus*, *E. coli*, *Clostridium*., xạ khuẩn, nấm sợi,... Đây là các vi sinh vật dị dưỡng hoại sinh. Trong chế phẩm probiotic, người ta thường sử dụng các chủng thuộc giống *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. licheniformis*,... Các chủng của những loài này rất có ích, không gây bệnh cho người và động vật, đặc biệt là trong đường ruột.

Các đại diện của giống *Bacillus* đóng vai trò quan trọng trong việc vô cơ hóa các hợp chất hữu cơ. Thuộc về giống này là các vi khuẩn hình que với chiều dài khác nhau, thường Gram (+), di động nhờ chu mao và có các đặc điểm sinh lý khác nhau. Các loài thuộc giống *Bacillus* đặc trưng cho trực khuẩn sinh bào tử mà vẫn giữ nguyên hình que khi mang bào tử, trong một số trường hợp chỉ hơi phình to lên một chút. Tùy thuộc vào từng loài vi sinh vật mà bào tử nằm ở chính giữa, nằm ở gần đầu hoặc ở đầu tế bào.



Hình 5.1. Các kiểu bào tử của vi khuẩn

a. *Bacillus*

b. *Clostridium*

c. *Plectridium*

2.3. Vi khuẩn nitrat hóa và phản nitrat hóa

2.3.1. Vi khuẩn nitrat hóa

Trong đất luôn xảy ra sự tạo thành muối amôn do quá trình amôn hóa protide, urê, kitin... sản phẩm của quá trình này được thực vật trực tiếp hấp thụ hoặc được chuyển thành các muối nitrat. Quá trình oxy hóa muối amôn thành nitrat được gọi là quá trình nitrat hóa.

Nhiều loại vi sinh vật khác nhau tham gia vào quá trình nitrat hóa. Trong đó, hoạt động mạnh nhất là những loài sau:

- *Chromobacterium denitrificans*: yếm khí tùy tiện, không tạo bào tử, có khả năng khử nitrat thành N_2 tự do.

- *Achromobacter stutzeri*: Thường tạo thành chuỗi dài, có khả năng gây đông tụ sữa và có khả năng lên men đường tạo thành hơi. Chúng phát triển trên môi trường pepton tạo thành H_2S , còn khi phát triển trong điều kiện yếm khí thì chúng khử nitrat.

- *Pseudomonas fluorescens*: là trực khuẩn không chuyển động, hầu như không tạo thành chuỗi.

2.3.2. Vi khuẩn phản nitrat hóa

Phản nitrat hóa là quá trình khử nitrat thành nitơ phân tử N_2 bay vào không khí. Quá trình này được thực hiện nhờ vi sinh vật chuyên trách là những vi khuẩn phản nitrat hóa. Đồng thời sự oxy hóa nitrat còn xảy ra oxy hóa các chất hữu cơ khác, như đường, rượu, axit hữu cơ thành CO_2 và H_2O . Chất nhận H^+ cuối cùng là NO_3^- . Năng lượng sinh ra khi oxy hóa cơ chất được vi sinh sử dụng cho hoạt động sống của mình. Quá trình phản nitrat có thể xảy ra cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí, nhưng đặc biệt mạnh trong điều kiện thiếu khí (thiếu oxy - anoxi) hoặc vi hiếu khí - kỵ khí. Vì vậy, quá trình này có thể còn xếp vào quá trình chuyển hóa kỵ khí.

Quá trình này được thực hiện bởi nhiều loại vi sinh vật khác nhau. Trong đó, hoạt động mạnh nhất là những loài sau:

- *Chromobacterium denitrificans*: yếm khí tùy tiện, không tạo bào tử, có khả năng khử nitrat thành N_2 tự do.

- *Achromobacter stutzeri*: Thường tạo thành chuỗi dài, có khả năng gây đông tụ sữa và có khả năng lên men đường tạo thành hơi. Chúng phát triển trên môi trường pepton tạo thành H_2S , còn khi phát triển trong điều kiện yếm khí thì chúng khử nitrat.

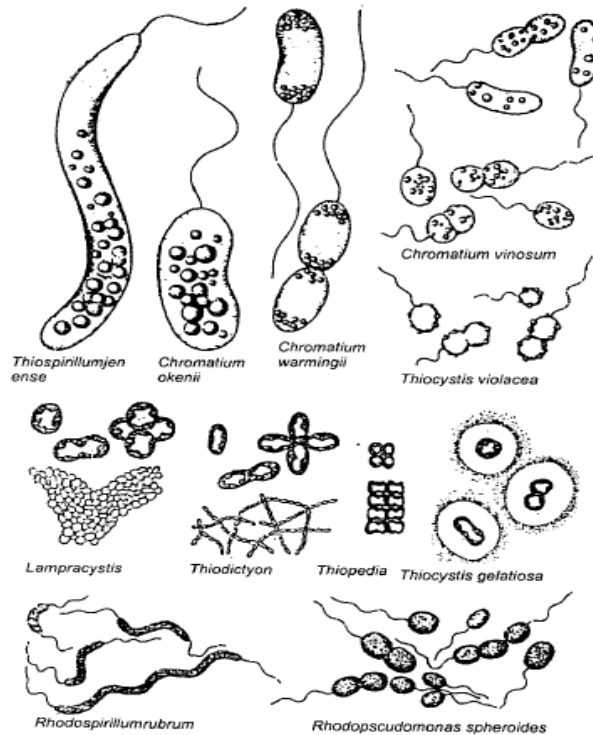
- *Pseudomonas fluorescens*: là trực khuẩn không chuyển động, hầu như không tạo thành chuỗi.

2.4. Vi khuẩn khử H_2S

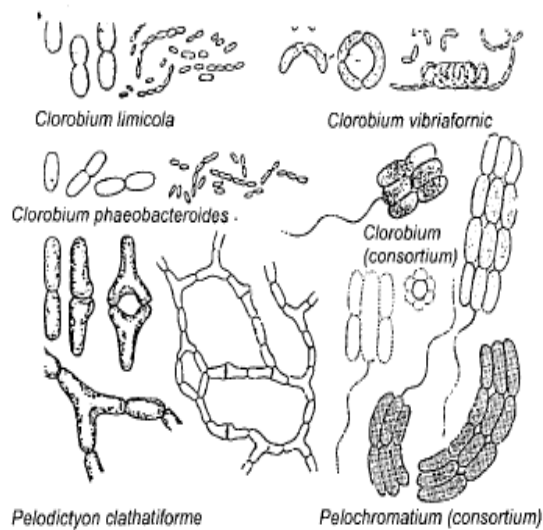
Trong môi trường nước, trong các loại phân động vật, trong các đồng rác thường xuất hiện khí hydrosulfua (H_2S). Đây là loại khí thối và độc. Khí H_2S hình thành từ các con đường: khử sunfat, phân hủy các axit amin có chứa lưu huỳnh trong quá trình amôn hóa. Sự có mặt của khí này làm cho môi trường bị nhiễm độc, mùi khó chịu và các động, thực vật thủy sinh như tôm cá có thể bị chết.

Nhóm vi khuẩn này có khả năng khử H_2S và được gọi là nhóm vi khuẩn tự dưỡng quang năng, sống kỵ khí hoặc kỵ khí tùy tiện trong môi trường có ánh sáng chiếu rọi. Chúng là các vi sinh vật điển hình, rất phổ biến ở nước ngọt cũng như ở nước mặn, thường cư trú nhiều trên bề mặt bùn các ao đầm tù hay có nhiều bùn cặn, các xác động, thực vật. Tuy vậy, phân lập các vi khuẩn này tương đối khó, vì chúng là

các thể tự dưỡng phát triển rất chậm.



Hình 5.2. Một số đại diện vi khuẩn tía lưu huỳnh



Hình 5.2. Vi khuẩn lục có lưu huỳnh

Vi khuẩn khử lưu huỳnh chia làm 3 phân nhóm:

- Vi khuẩn có màu tía (huyết dụ) không có lưu huỳnh trong tế bào - *Athiorhodaceae* (tên cũ) và *Rhodospirillaceae* (tên mới).
- Vi khuẩn có màu tía (huyết dụ) có hạt lưu huỳnh trong tế bào - *Thiorhodaceae* (tên cũ) và *Chromatiaceae* (tên mới).
- Vi khuẩn xanh lục trong tế bào có lưu huỳnh - *Clorobiaceae*.

Chúng là những vi khuẩn Gram (-), đa hình thái và kích thước khác nhau, có loài chuyển động nhờ tiêm mao mọc ở đầu tế bào.

Nói chung, các vi khuẩn đa hình thái, từ hình cầu, hình que ngắn, que dài, hình dấu phẩy, xoắn,... đứng riêng rẽ hoặc kết thành chuỗi.

Vi khuẩn tía lưu huỳnh rất đa hình thái và có giống chuyển động, có giống không chuyển động. Trong quá trình oxy hóa H_2S , lưu huỳnh được tích tụ thành giọt trong tế bào, nhưng cũng có giống không tích tụ ở trong mà ở ngoài tế bào. Một số loài có khí khổng trong tế bào.

Vi khuẩn tía không lưu huỳnh gồm ba giống. Các loài có hình que thuộc về giống *Rhodopseudomonas*. Các loài của giống này là *Rh. viridis*, *Rh. spheroides*, *Rh. capsula*, *Rh. palustris* và *Rh. pelatinosa*. Chúng khác nhau về đặc điểm sinh lý, hình thái và phương thức sinh sản.

Nói chung các tế bào vi khuẩn tự dưỡng quang năng sinh sản bằng cách phân đôi nhưng cũng có loài bằng cách nảy chồi, chúng sống kỵ khí nhưng có nhiều loài thuộc nhóm vi khuẩn tía không lưu huỳnh có thể sống và hoạt động ở điều kiện vi hiếu khí. Sinh trưởng trong điều kiện có ánh sáng, tế bào của chúng có màu đỏ tía (huyết dụ), tím, nâu vàng, nâu hay xanh. Sự khác nhau về màu sắc do khả năng hấp thụ ánh sáng. Khi sinh trưởng trong môi trường có hợp chất lưu huỳnh và được chiếu ánh sáng, vi khuẩn tía lưu huỳnh tích tụ giọt nguyên tố này ở dạng giọt trong tế bào, còn các vi khuẩn tía không lưu huỳnh thì không có hiện tượng này. Đây là đặc tính cơ bản phân loại hai nhóm vi khuẩn tía.

2.5. Nấm men

Nhóm vi sinh vật này được loài người biết đến từ lâu và được sử dụng trong nghề làm bánh mì, nấu rượu, làm bia, ủ rượu vang,... Trong thành phần của tế bào nấm men rất giàu protein, vitamin và khoáng chất. Nấm men là những vi sinh vật kỵ khí tùy tiện, trong điều kiện hiếu khí chúng hô hấp với oxy cho sản phẩm là CO_2 , H_2O và tăng sinh khối, trong điều kiện kỵ khí chúng lên men cho sản phẩm là rượu và CO_2 (đồng thời cũng tăng sinh khối). Sinh khối nấm men trong điều kiện kỵ khí, chỉ bằng khoảng 1/4 và tốc độ sinh trưởng chỉ bằng 1/20 so với điều kiện hiếu khí. Khi lên men, môi trường có mùi thơm của rượu và este làm cải thiện mùi vị của môi trường rất nhiều.

Nấm men chỉ hấp thu các đường đơn, đường đôi và một số oligosaccharide, không đồng hóa được tinh bột. Muốn đồng hóa được tinh bột phải nhờ hệ enzym amylase của nấm mốc, vi khuẩn hoặc xạ khuẩn sống cùng trong quần thể.

Tế bào nấm *Saccharomyces* có hình ovan, sinh sản chủ yếu bằng nảy chồi. Để sản xuất chế phẩm probiotic, người ta hay dùng các chủng thuộc các nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. uini* hoặc *S. pombe*.

- Môi trường phân lập, giữ giống và nuôi cấy mở rộng đối với nấm men thường là môi trường Hansen và môi trường thạch - malt.

3. Sản xuất chế phẩm probiotic

3.1. Nhân giống

Chế phẩm probiotics là hỗn hợp sinh khối sống của các nhóm vi sinh vật có ích (vi khuẩn lactic, vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn nitrat hóa, vi khuẩn tía khử H_2S và nấm men, có thể không có vi khuẩn nitrat hóa). Đặc điểm của chế phẩm là số lượng tế bào sống của vi sinh vật từ vài trăm triệu đến hàng tỷ ($10^8 - 10^9$) trong một đơn vị là mg (chế phẩm dạng bột) hoặc ml (chế phẩm dạng lỏng). Yêu cầu chất lượng là chế phẩm có tỷ lệ tế bào sống phải đạt từ 60 - 70% trở lên, dễ thích nghi với môi trường và sinh trưởng, phát triển bình thường.

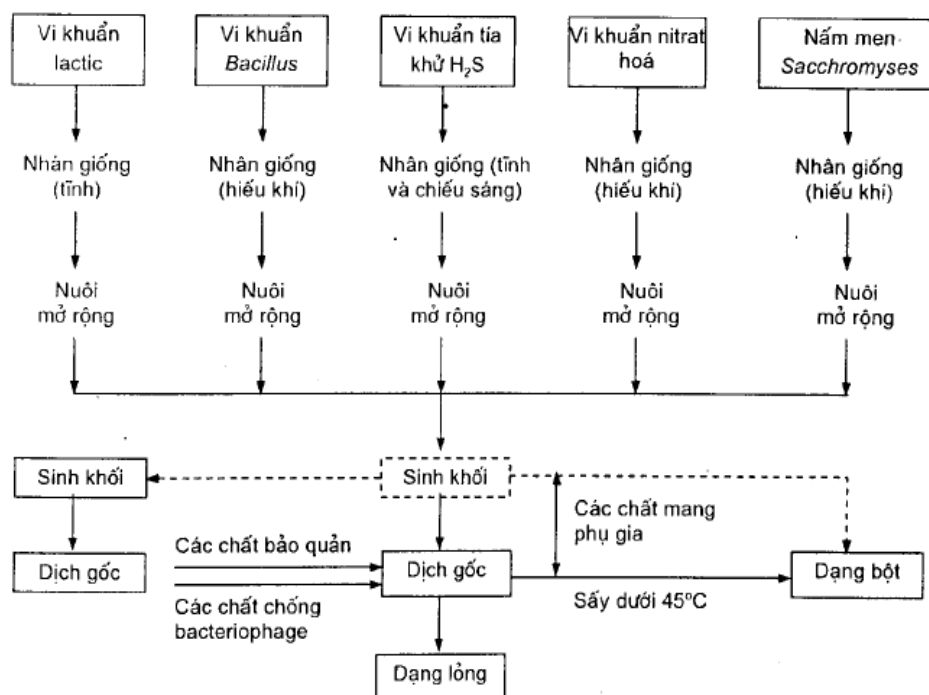
Ngoài ra, các nhóm khi phát triển ở môi trường mới đảm bảo có hoạt tính: vi khuẩn lactic lên men lactic làm môi trường axit hóa, vi khuẩn *Bacillus* sinh ra amylase, protease,...

Chế phẩm được sử dụng ở hai dạng dịch và dạng bột. Quá trình sản xuất chế phẩm theo trình tự như sau:

Giống gốc → nhân giống cấp I, cấp II... → nuôi mở rộng, dịch nuôi cấy của từng nhóm được hỗn hợp với nhau hoặc đem ly tâm ở các thiết bị chuyên dùng có tốc độ cao thu sinh khối để tạo dạng bột.

Các nhóm vi sinh vật được nuôi riêng với môi trường thích hợp. Với môi trường nhân giống thường dùng môi trường giữ giống hoặc môi trường phân lập không có thạch: còn môi trường nuôi mở rộng có thể dùng môi trường cải tiến thay thế một số thành phần đắt tiền bằng thành phần rẻ tiền, dễ kiếm nhưng vẫn đáp ứng được đầy đủ dinh dưỡng và yêu cầu sinh lý của chủng nuôi cấy

3.2. Quy trình sản xuất chế phẩm probiotic



Hình 5.3. Sơ đồ sản xuất chế phẩm probiotic

Chế phẩm thu được là dạng dịch (chế phẩm dịch gốc) và dạng bột có thêm chất mang là các chất phụ gia, có thể là dinh dưỡng làm thức ăn cho vật nuôi, hoặc là chất tăng độ phì cho đất, hoặc tăng hiệu lực cho phân bón (mùn).

Dịch gốc là chất lỏng có màu vàng - màu nâu, mùi thơm dễ chịu, vị chua ngọt, pH > 3,5. Trong dịch này có chứa các nhóm vi sinh vật được nuôi cấy và sống trong dạng nghỉ không hoạt động. Nồng độ sinh khối vi sinh vật trong dịch gốc cần có là từ 10^{16} CFU/ml. Dịch gốc được chứa trong các can, chai nhựa sạch và kín.

Dạng bột của chế phẩm thường có màu sắc của chất mang, cũng có mùi thơm. Sau khi trộn dịch gốc với chất mang, chế phẩm được ủ vài giờ rồi trải mỏng để giảm bớt độ ẩm, hoặc phơi dưới mái tôn (chú ý không để ánh nắng mặt trời chiếu rọi trực tiếp làm chết vi sinh vật) hoặc sấy ở nhiệt độ thấp (nhiệt độ không khí buồng sấy không quá 45°C). Độ ẩm chế phẩm dạng bột không quá 10% được đóng gói trong các bao PE hoặc giấy thiếc dán kín.

Dịch gốc và bột được bảo quản ở những nơi khô, mát (nhiệt độ không quá 30°C). Chế phẩm có thể giữ được hoạt tính sau 90 ngày hoặc 180 ngày (có thể giảm khoảng 25% hoạt tính). Sử dụng chế phẩm tốt nhất sau khi sản xuất trong vòng một tháng.

4. Cách sử dụng chế phẩm

4.1. Dạng dịch

Dịch chế phẩm gốc có pH > 3,5, mùi thơm ngọt, được nhân thành dịch sử dụng. Cách làm như sau:

- Rỉ đường mía 8 – 10 kg hòa với 190 lít nước sạch trong thùng nhựa đã rửa sạch, pH dịch pha cần có là 7 - 7,5 (có thể thêm 30 - 50g ure và 100g superphosphat hòa vào nước, lấy phần dịch, bỏ bã).

- Bổ sung 2 lít chế phẩm gốc.

- Đậy kín thùng, giữ ở nhiệt độ 25 - 35°C trong 4 ngày. pH của dịch chế phẩm sử dụng là 3,5 - 4,0.

Dịch chế phẩm sử dụng được tưới (đổ) hoặc phun xuống ao hồ nuôi cá theo tỷ lệ 1 : 10.000 (1 lít cho 10m³ môi trường nuôi). Sau khi vào môi trường nước, các chủng vi sinh vật trong chế phẩm sẽ thích nghi dần và phát triển, làm ức chế những vi sinh vật gây hại và gây bệnh, phân hủy các phần thức ăn thừa cũng như các hợp chất hữu cơ khác có trong nước và ở đáy, chuyển hóa NH₃, NO₃⁻ và khử H₂S làm giảm hoặc mất độc tính của các hợp chất này trong môi trường nước.

- Có thể dùng dung dịch pha loãng 1 : 2000 cho gia súc uống hàng ngày, sẽ tăng cường sức khỏe cho vật nuôi.

- Phun vào các chất độn và phân gia súc để làm giảm hôi thối, tăng nhanh thời gian ủ phân với chất độn là rơm rạ.

- Dùng ủ chua thức ăn, chăn nuôi gia đình thường dùng rau với tỷ lệ cao trong

chăn nuôi, thức ăn gồm có cám, rau, bèo, nước gạo. Ta dùng dịch chế phẩm này ủ thức ăn cho lợn là rất tốt. Trước đây, chúng ta cũng đã thực hiện ủ thức ăn với nấm men rượu *Saccharomyces* cũng có hiệu quả, song không tốt bằng dùng tập hợp các chủng vi sinh vật của chế phẩm này. Thức ăn sau khi ủ 2 - 3 ngày có pH < 4, mùi thơm dễ chịu và được đưa vào đường tiêu hóa của lợn sẽ phát huy đầy đủ các tác dụng probiotic.

4.2. Dạng bột

Chế phẩm dạng bột có thể sử dụng trực tiếp với thức ăn chăn nuôi. Chế phẩm có chất mang là bột đậu tương (đậu tương trước khi nghiền nhỏ cần phải rang chín) hoặc hạt ngũ cốc nảy mầm dạng bột trộn với thức ăn của tôm. Các loại thức ăn của lợn, gia cầm, thủy cầm, cá không cần phải dùng chất mang là bột đậu tương (có thể dùng cám, thậm chí cả mùn sau khi ủ rơm rạ chưa trộn với các loại phân bón N, P, K). Tỷ lệ trộn 1 - 2% chế phẩm này với thức ăn. :

- Dùng xử lý bể nuôi: Đối với tôm, cá: 5g bột chế phẩm cho 10 lít nước, một tuần một lần. Hai tháng cuối tăng liều gấp đôi.

- Dùng chế phẩm dạng bột nhân thành dạng dịch chế phẩm sử dụng trong dịch rỉ đường 4 - 5% như phần trên dùng nhân từ dịch gốc. Sau 3 - 4 ngày ta thu được dịch sử dụng.

Từ dạng bột có thể nhân lên tiếp thành chế phẩm dạng rắn ẩm (loại chế phẩm này tiếng Nhật gọi là Bokashi - dạng chất hữu cơ đã lên men).

- * Loại dùng cho trồng trọt và có thể dùng cho vật nuôi không dùng trâu mà thay bằng 2 phần cám gạo). Tỷ lệ: phân gia súc hoặc gia cầm: cám gạo: trâu (dịch gốc 1 + rỉ đường 1 + nước 100) = 2: 1:1: Trộn đều, để sao cho hỗn hợp có độ ẩm khoảng 40 - 60%, ủ vài giờ rồi trải mỏng. Lóp hỗn hợp sau khi trải có chiều cao 15 - 20cm, phủ dày bằng bao tải sạch, cho lên men ở 30 - 40°C (không để nhiệt độ vượt quá 50°C), thời gian 3 - 4 ngày.

- * Loại dùng cho thức ăn chăn nuôi:

Cám gạo: 100kg, bột ngô hoặc bột đậu tương: 100 kg, rỉ đường: 200 ml, dịch chế phẩm gốc: 200 ml, nước: 20 - 80 lít.

Trộn đều các thành phần đặc rồi tưới dịch gốc với rỉ đường để hỗn hợp có độ ẩm 40 - 60%. Cách làm như trên và cần sử dụng ngay khi lên men kết thúc. Tỷ lệ sử dụng trộn vào thức ăn 0,5 - 1%.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Nêu khái niệm và vai trò của probiotic.

Câu hỏi 2: Trình bày được quá trình sản xuất probiotic.

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- vai trò của probiotic

- Quy trình sản xuất probiotic.

CHƯƠNG 6: CÁC NGUỒN THỨC ĂN GIÀU PROTEIN DÙNG LÀM THỨC ĂN CHĂN NUÔI

Giới thiệu:

Chương các nguồn thức ăn giàu protein dùng làm thức ăn chăn nuôi trang bị cho sinh viên các kiến thức về các nguồn thức ăn giàu protein. Sau khi học xong bài này người học có thể biết được quy trình sản xuất một số thức ăn giàu protein dùng trong chăn nuôi .

Mục tiêu:

- Liệt kê được các nguồn thức ăn giàu protein;
- Trình bày được quy trình thu sinh khối tảo, nấm men làm nguồn thức ăn chăn nuôi;
- Trình bày được đặc điểm và quy trình sản xuất chế phẩm lysine
- Phân tích được giá trị dinh dưỡng của các loại chế phẩm giàu protein.

A. Nội dung:

1. Các nguồn thức ăn giàu protein

1.1. Nguồn gốc động vật

Nhóm thức ăn này là thịt, cá, trứng, sữa...Protein trong thức ăn nguồn gốc động vật có giá trị cao hơn cả vì chúng có thành phần và tỉ lệ các acid amin cân đối với người và động vật. Thức ăn có nguồn gốc động vật dùng để chăn nuôi gia súc thường là các loại bột sữa, thịt, xương...

Trứng là thực phẩm có giá trị. Nguồn protein của trứng có đủ các acid amin và tỉ lệ của chúng cân đối, ngoài ra trong trứng còn có đủ các chất dinh dưỡng khác. Protein của trứng thường được coi là protein tiêu chuẩn trong chăn nuôi và thường được sử dụng để so sánh giá trị sinh học của protein, acid amin của các loại thức ăn khác

Sữa là nguồn protein dễ tiêu hóa, đặc biệt protein của sữa (casein) có nhiều methionine và lizin, do đó sữa bổ sung vào thức ăn là ngũ cốc rất hiệu quả.

Cá và bột cá: Trong protein của cá, độ cân đối acid amin không bằng trứng nhưng có nhiều methionine và lizin, do đó cá bổ sung vào thức ăn là ngũ cốc rất hiệu quả.

Bột thịt - xương được chế từ lòng, cơ quan phủ tạng, máu cục, thịt phế phẩm, thịt không làm thức ăn cho người được, xương (riêng xương không vượt quá 10%), phôi thai,...

Bột thịt - xương có thành phần giàu các chất dinh dưỡng, nhưng không cố định, thay đổi tùy theo nguyên liệu chế biến.

Xác mắm là phế phẩm của ngành chế biến mắm, giá trị dinh dưỡng kém so với bột cá và bột thịt - xương (protein tới 21,3%; lipit 3,2%; tro 37,5%). Trong xác mắm

còn có muối nên khi bổ sung vào khẩu phần thức ăn không cần phải bổ sung thêm muối. Xác mắm có thể dùng để nuôi lợn, gà (đối với gà cần chú ý hàm lượng NaCl trong xác mắm, nếu quá 2% gà khó hấp thụ). Thủy phân xác mắm bằng axit clohydric ta sẽ thu được dịch hỗn hợp các axit amin (chủ yếu từ protein của xương cá) gần giống như các loại nước chấm. Loại này dùng cho lợn con ăn rất tốt.

1.2. Nguồn gốc thực vật

- Các cây có hạt như lúa, lúa mì, đại mạch, cao lương, ngô,... Đây là những loại hạt lương thực làm thức ăn cơ bản nuôi sống con người và các động vật trên hành tinh của chúng ta. Protein của gạo có giá trị cao nhất trong các loại hạt ngũ cốc, nhưng thêm chút ít treonin và metionin, thì giá trị dinh dưỡng được nâng cao. Vì vậy, ăn gạo với thức ăn là đậu, thịt, cá (trong cá thường thiếu metionin) thì rất tốt. Phối hợp bột cá với các loại đậu thì chúng ta có khẩu phần thức ăn gia súc khá cân đối về axit amin.

- Các cây họ Đậu cung cấp các nguồn protein quan trọng của người và gia súc. Hạt một số loại cây họ Đậu có hàm lượng protein khá cao (25 - 30%). Trong protein của đậu có đủ mặt các axit amin không thay thế với tỷ lệ khá cân đối, chỉ thiếu chút ít metionin. Protein của đậu tương có nhiều globulin, gần với sữa người hơn là sữa bò (trong sữa bò nhiều albumin) nên dễ tiêu hóa hơn sữa bò.

- Các loại hạt và quả có dầu như bông, lanh, hướng dương, dừa, đậu, lạc,... Sau khi ép dầu, khô các loại hạt và quả có dầu là nguồn cung cấp protein rất có giá trị. Nguồn protein dùng cho chăn nuôi trên thế giới chủ yếu từ nguồn này.

- Các loại cây có củ như sắn, khoai lang, khoai tây, khoai sọ, củ từ,... Có hàm lượng protein thấp.

- Các loại rau nghèo protein.

- Các loại rau giàu protein của cây trồng và cây hoang: Người ta đã chiết từ lá một số cây được một sản phẩm protein có giá trị dinh dưỡng cao dùng trong chăn nuôi. Protein lá xanh vốn là thức ăn hàng ngày của các loại động vật ăn cỏ và một phần rau xanh cũng cung cấp protein cho người. Protein trong lá có hàm lượng lizin không thấp, đặc biệt là rau dền, chỉ thiếu chút ít metionin. Bổ sung protein lá xanh vào thức ăn nuôi lợn thì thấy khả năng sử dụng thức ăn tăng lên. Khó khăn cho việc sản xuất protein lá xanh là việc chọn và trồng các loại nguyên liệu và diện tích bị hạn chế.

- Rong tảo: Tảo là nhóm sinh vật phong phú về chủng loại. Có tảo đơn bào, màu xanh, màu đỏ, màu lam, màu lục, mọc ở mặt đất, ở nước ngọt, nước mặn. Tảo giàu các chất protein, vitamin và các chất khoáng. Trong tự nhiên có nhiều loại tảo có hàm lượng protein cao, nhưng chứa độc tố, nên không dùng làm thức ăn cho người và gia súc. Ở nước ta hiện nay đang chú ý nuôi tảo *Chlorella* và *Spirulina* để phục vụ nuôi lợn, gà và cá (cũng chỉ là bước đầu). Ngoài ra, chúng ta còn khai thác tảo biển để làm thạch và làm nộm hoặc dùng cho chăn nuôi. Loại tảo biển quen thuộc là rau câu *Gracillaria*.

1.3. Vi sinh vật và các phế phẩm ngành công nghệ vi sinh

a. Nấm men

Trong tế bào của nấm men có đủ các chất cần thiết cho sự sống, như protein, glucit, lipid, các enzym, và vitamin,... Hàm lượng protein trong đó chiếm 40 - 60%, có khi còn cao hơn nữa. Tốc độ tổng hợp protein nói chung của vi sinh vật và nấm men nói riêng nhanh gấp 10 - 100 ngàn lần so với động vật. Hơn nữa, không một sản phẩm thực vật và động vật nào có một lượng các chất tác dụng đặc hiệu như nấm men. Tuy vậy, các chất đặc hiệu đó của nấm men không phù hợp hoàn toàn với nhu cầu sinh lý của người và động vật.

Nhiều nước trên thế giới thiếu bột cá, thiếu các loại khô dầu (hướng dương, khô lạnh, lạc, bông, đậu tương,...) đều tập trung vào sản xuất nấm men để dùng cho chăn nuôi. Nấm men ngày nay đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp khổng lồ và hiện đại. Sản lượng nấm men làm thức ăn cho gia súc mỗi năm một tăng. Ở Anh đang tập trung vào nghiên cứu sản xuất protein từ sinh vật, trong đó chủ yếu là nấm men để có một loại protein giá rẻ đủ dinh dưỡng làm thức ăn gia súc có thể cạnh tranh với bột cá và đậu tương.

Ở nước ta trong khoảng chục năm gần đây có đề cập đến việc ủ men thức ăn gia súc. Thức ăn ủ men có mùi thơm và chua có thể hợp khẩu vị và kích thích tiêu hóa cho gia súc, còn làm tăng protein và các axit amin trong thức ăn có thể không đáng kể.

b. Phế phẩm của ngành rượu bia

*** Bã rượu**

Trong quá trình lên men rượu từ bột, phải thủy phân bột thành đường nhờ nấm mốc hoặc bằng axit, sau đó cho nấm men rượu lên men biến đường thành rượu. Do đó trong bã rượu sau khi chưng cất còn còn bã các loại nguyên liệu, xác nấm men, xác nấm mốc, trong đó có protein, axit amin, vitamin, chất khoáng của nguyên liệu và nấm men, nấm mốc, cùng ít đường còn lại. Như vậy, trong bã rượu có khá nhiều chất dinh dưỡng và được dùng làm thức ăn gia súc khá tốt.

Bã rượu có hàm lượng nước cao (91 - 95% nước). Có thể dùng bã rượu nguyên hoặc gạn phần cô đặc (có khi sấy khô) để dùng chăn nuôi, còn phần nước cho gia súc uống, hoặc ủ với thức ăn khác, hoặc dùng nuôi nấm men; sản xuất biovit (biomixin - vitamin B₁₂), sản xuất vitamin B₁₂ cho chăn nuôi.

*** Bã bia**

Cặn đại mạch, thóc đại mạch nảy mầm và một vài loại hạt ngũ cốc khác. Trong bã bia có các mảnh hạt chứa nhiều dẫn xuất không nitơ, hầu như toàn bộ lipid và protein của các loại hạt, bột nằm trong bã bia. Bã bia tươi có 75% nước. Trong 100 kg bã bia khô (độ ẩm dưới 12%) có 15,2 kg protein dễ tiêu hóa, trong đó có 350g lizin, 110g triptophan, 160g metionin, 450g arginin, ngoài ra còn có nhiều chất khoáng và vitamin nhóm B. Bã bia dùng làm thức ăn nuôi lợn, bò sữa và cá rất tốt.

* Cặn protein của dịch bia

Trong quá trình làm lạnh, các protein trong dịch bia đông tụ và lắng xuống đáy thùng. Cặn này có vị đắng, nên không thể làm thức ăn gia súc ở dạng nguyên chất, chỉ dùng trộn với các loại thức ăn khác. Trong cặn này có khoảng 80% nước và 7% protein.

* Nấm men bia

Nấm men bia được nằm lại trong các thùng lên men và các hầm chứa sau khi lên men chính, lên men phụ. Nấm men bia có giá trị dinh dưỡng cao. Trong nấm men bia có 51 - 58% protein (theo chất khô), trong đó có đủ mặt các axit amin và tỷ lệ cân đối các axit amin không thể thay thế, nhiều vitamin nhóm B và tiền vitamin D; là ecgosterin. Nấm men bia dùng trong chăn nuôi lợn con, gia cầm và trâu, bò non có tác dụng rất tốt.

2. Sản xuất các chế phẩm giàu protein làm thức ăn chăn nuôi

2.1. Thu sinh khối tảo

2.1.1. Vai trò của tảo

Tảo là cơ thể sinh vật tự dưỡng. Chúng có thể tự tổng hợp được các chất hữu cơ cho cơ thể từ nguồn CO₂ và các nguồn nitơ, phospho vô cơ (chủ yếu là NH₄⁺ và PO₄³⁻) nhờ hệ thống quang hợp. Trong sinh khối tảo giàu protein với các thành phần axit amin khá đầy đủ, giàu vitamin và chất khoáng. Do vậy, sinh khối của tảo là nguồn thức ăn cho các loài thủy sản và các loại vật nuôi rất tốt.

Tảo là vi sinh vật quang hợp do trong tế bào có chứa sắc tố, chủ yếu là diệp lục (chlorophyll). Ngoài ra còn có sắc tố 보조, như phycobiliprotein và carotenoid. Những sắc tố này làm cho tảo luôn luôn có màu, rất thuận lợi cho việc bắt mồi của vật nuôi trong nước. Trong số các carotenoid - carotene giúp cho thịt vật nuôi có màu hồng, lòng đỏ trứng đậm màu, kích thích sinh trưởng,... Trong sinh khối tảo còn có các chất hydratecarbon dưới dạng các chất dự trữ (tinh bột, glycogen), hoặc các chất điều hòa thẩm thấu (glyxerol, trehalose, manitol, sorbitol..).

Để sản xuất được lượng lớn sinh khối tảo cần phải chú ý đến các điều kiện:

- Chọn giống có tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng đạt được mật độ tế bào cao.
- Khả năng chịu mặn.
- Chịu được khuấy đảo mạnh.
- Có khả năng bảo quản được lâu.

Trong các tảo được chú ý nhiều và có khả năng nuôi cấy ở quy mô công nghiệp để thu sinh khối là tảo lục (*Chlorella vulgaris*) và tảo lam (*Spirulina phatenis*, *Synechococcus elongates*, *Coctopedia*)

Trước đây người ta sản xuất nhiều tảo *Chlorella*, nhưng hiện nay do ưu điểm nổi bật của tảo *Spirulina* đã chiếm ưu thế.

2.1.2. Thu sinh khối tảo *Spirulina*

Tảo *Spirulina* có cấu tạo hình sợi đa bào, có hình dạng xoắn lò xo, sống tự nhiên ở nước kiềm giàu NaHCO_3 . Người ta quan tâm nhiều đến tảo này không chỉ vì nó có chứa nhiều protein hơn hẳn *Chlorella* mà còn vì những đặc điểm sau:

- Vòng đời đơn giản, trong điều kiện tối ưu ở phòng thí nghiệm và ở điều kiện bán tự nhiên (tùy thuộc vào thời tiết) vòng đời của tảo này khoảng từ 3 đến 5 ngày. Như vậy có thể thu hoạch tảo quanh năm.

- Tảo sinh trưởng trong môi trường nước, cho phép chúng ta dễ dàng tạo được các điều kiện nuôi cấy tối ưu để thu sinh khối đậm đặc.

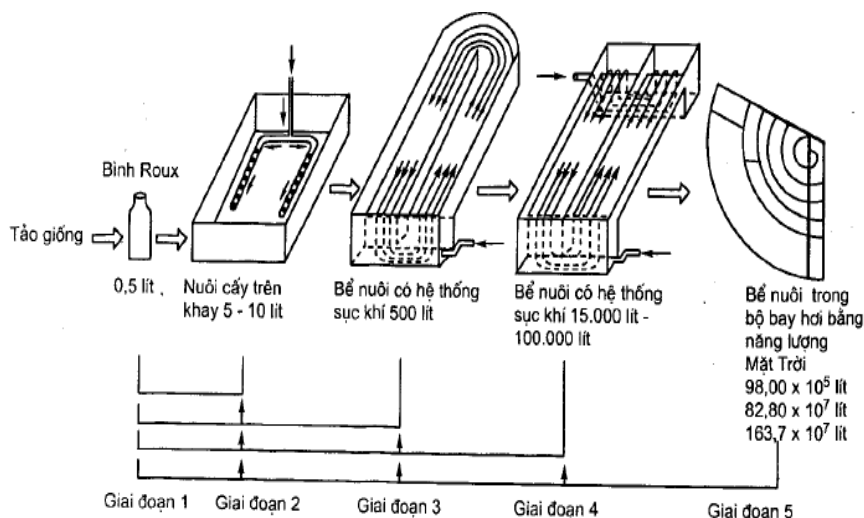
- Tảo có tốc độ sinh trưởng cao.

- Hiệu suất sử dụng năng lượng Mặt Trời cao (tới 3 - 45%, còn đậu tương và lúa chỉ đạt hiệu suất 0,25%). Hiệu suất sử dụng khí cacbonic để làm nguồn cacbon cũng rất cao (80 - 85%), trong khi tảo *Chlorella* chỉ đạt khoảng 30%.

- Năng suất tính trên đơn vị diện tích nuôi trồng rất cao

- Tảo *Spirulina* có xu hướng nổi lên mặt nước và tụ tập sinh khối lớn, hơn nữa kích thước của chúng lớn, trong khi đó *Chlorella* là loại tảo đơn bào, kích thước khoảng 0,0001mm, lúc thu hoạch phải dùng phương pháp ly tâm phức tạp.

Nuôi cấy vi tảo (*Spirulina* và *Chlorella*,...) thường ở các bể hở dựa theo phương pháp nuôi truyền thống ở các ao hồ, đầm vực. Phương pháp này đơn giản, chi phí thấp, song hiệu suất thu được không cao, chất lượng sinh khối không ổn định, dễ bị nhiễm tảo dại và các sinh vật ký sinh làm ức chế tảo nuôi cấy.



Hình 6.1. Quá trình nuôi cấy tảo *Spirulina* (quy mô pilot)

Ngày nay đã có nhiều mẫu bình nuôi cấy vi tảo và triển vọng là các thiết bị nuôi tảo trong tương lai. Đó là các thiết bị kín - bình phản ứng quang hợp gồm các ống nhỏ thu ánh sáng cung cấp dung lượng quang năng tối đa cho tảo nuôi cấy. Các ống nhỏ thu ánh sáng là các ống thủy tinh trong suốt, đều có hai ống lắp song song thành một cặp, đầu được gắn vào colectơ, có thể lắp hệ thống ống nằm ngang hoặc đứng.

Trên thế giới tùy theo tình hình từng nước, người ta tổ chức sản xuất tảo theo nhiều phương thức khác nhau. Có thể sản xuất thủ công ở các ao hồ tự nhiên. Cách nuôi thủ công đơn giản ở Nhật Bản như sau: trộn phân, nước tiểu gia súc, vật nuôi với bã cá, thêm phosphat, canxi, đất, rồi cấy kín, ủ từ 10 đến 20 ngày. Sau đó gạn lấy nước trong, pha thêm 20 - 30 lần nước cho pha loãng để làm môi trường nuôi cấy, có khi thêm ít sắt, lưu huỳnh.

Tại Sosa Texcoco (Mexico), từ 1972 bắt đầu khai thác tảo *Spirulina* ở bể nuôi cấy bán tự nhiên diện tích 10ha. Các cơ sở này phục vụ cho việc sản xuất thử ở quy mô pilot với mức bán công nghiệp nhằm thu những số liệu làm cơ sở cho việc xác định mô hình công nghệ nuôi cấy tảo trên quy mô công nghiệp.

Quy trình công nghệ sản xuất tảo *Spirulina* khô tại nhà máy bán công nghiệp nói trên gồm các khâu sau:

- Làm đặc sơ bộ.
- Lọc bằng trọng lực và chân không.
- Phá vỡ tế bào.
- Sấy khô.
- Nghiền (đối với sản phẩm tảo đã sấy khô bằng máy sấy trống quay hình trụ).
- Đóng gói:

2.1.3. Thu sinh khối tảo *Chlorella*

Nuôi tảo *Chlorella* công nghiệp được tiến hành đầu tiên ở Hoa Kỳ. Tại đây người ta nuôi tảo trong các ống trong suốt bằng chất dẻo hình chữ U dài 21m, đường kính 1,2m với độ cao tối đa của môi trường trong ống là 6,25 cm. Khí CO₂ được bơm vào môi trường. Khối môi trường luôn luôn được tuần hoàn nhờ một bơm khác. Năng lượng Mặt Trời được biến thành nhiệt năng ở trong ống để duy trì nhiệt độ ở 26°C. Phương pháp này lúc thời tiết tốt có thể đạt năng suất 11g/m²/ngày.

Ngày nay nhiều nơi trên thế giới đã áp dụng công nghệ nuôi *Chlorella* ở quy mô công nghiệp ở các ao hồ, thủy vực hoặc các thiết bị bán liên tục. Môi trường nước nuôi tảo *Chlorella vulgaris* trong thủy vực hở có thể là nước thải sản xuất phân đạm được bổ sung nguồn phospho, nuôi ở nhiệt độ 26°C, pH 7,8, chiếu sáng 6000 lux, sục khí với 3% CO₂. Hàm lượng protein trong sinh khối thu được là 40,1 - 49,7% chất khô. Protein có đủ các axit amin không thay thế so với yêu cầu của FAO, trừ isoleucine

Sinh khối của tảo *Chlorella* có thể sử dụng ở chế phẩm thô (mới thu được) ở dạng lỏng huyền phù hoặc dạng khô qua phơi sấy (thường dùng cho chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản) và chế phẩm đã qua chế biến. Chế phẩm qua chế biến loại trừ được độc tính của tảo và các tiểu phần chất béo gây nên những mùi vị khó chịu cho người tiêu dùng. .

Một trong những biện pháp dùng để tách protein ra khỏi hợp phần các chất béo

của tảo là oxy hóa peroxyt những sản phẩm chiết xuất tiếp theo bằng các dung môi hữu cơ (axeton, etanol), trong đó tất cả các thuốc thử đáp ứng được yêu cầu đối với các hệ biệt lập.

Sinh khối *Chlorella* ngoài protein còn chứa một lượng lipid đáng kể và là nguồn phong phú các vitamin hòa tan trong nước, nhưng dưới tác dụng của hydro peroxyt sẽ bị mất hoạt tính sinh học. Để bảo toàn được hợp chất này, sinh khối cần được chiết xuất sơ bộ thành dạng nhão (độ ẩm tới 80%) bằng dung môi hữu cơ. Cũng trong thời gian này, phần chiết sơ bộ cho liên kết với lượng lớn dung môi nhằm để loại nước. Do vậy, gia công sinh khối vì tảo ở đây theo hai sơ đồ; chiết xuất sơ bộ hoặc không chiết xuất sơ bộ.

Chế độ tối thích cho quá trình oxy hóa dạng nhão từ sinh khối *Chlorella* không qua chiết xuất sơ bộ có các thông số như sau: thời gian oxy hóa 7 giờ, nhiệt độ 70°C, nồng độ H₂O₂ 30%. Quá trình oxy hóa *Chlorella* sau khi sấy được hòa tan lại với chiết xuất sơ bộ bằng các dung môi hữu cơ với các thông số: nhiệt độ lần thứ nhất 40°C, thời gian 2 giờ, nhiệt độ oxy hóa là 60°C và thời gian oxy hóa là 3,5 giờ. Sản phẩm thu được có giá trị sinh học nằm giữa protein của thịt bò và protein bột mì, nếu bổ sung 1g triptophan vào 200g chế phẩm này sẽ nâng cao và cân bằng được giá trị dinh dưỡng axit amin cho protein của sản phẩm.

Tại Nhật Bản còn đề xuất các phương pháp công nghệ mới để nuôi tảo là phương pháp nuôi cấy tạp dưỡng (mixotrophic) và phương pháp nuôi cấy dị dưỡng (heterotrophie). Nuôi cấy tạp dưỡng với dịch nước nuôi được chiếu sáng và bổ sung chất hữu cơ (axit axetic). Nuôi cấy dị dưỡng ở trong tối hoàn toàn với bình nuôi tới m², dùng glucose, axit axetic hoặc etanol làm nguồn năng lượng và nguồn cacbon.

2.2. Thu sinh khối nấm men

2.2.1. Nguyên liệu

- Nguyên liệu dùng sản xuất sinh khối nấm men hiện nay chủ yếu là rỉ đường. Đến 90% sinh khối nấm men dùng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi (khoảng 5 - 10%) trên thế giới được sản xuất từ rỉ đường mía và củ cải đường. Thành phần chính của loại nguyên liệu là đường saccharose (3 - 40%). Trong rỉ đường mía, lượng đường khử thường rất cao, tới 30%; còn trong rỉ đường củ cải, hàm lượng đường khử chỉ có khoảng 1%. Rỉ đường mía còn có các chất sinh trưởng như biotin, axit pantoteic, inozit. Tuy nhiên, rỉ đường mía nghèo chất khoáng và các axit amin. Vì vậy, khi dùng rỉ đường mía làm nguồn cacbon trong nuôi cấy nấm men cần phải loại bỏ một phần chất sinh trưởng, đồng thời bổ sung các muối khoáng cần thiết và có thể phải thêm hỗn hợp các axit amin dạng protein thủy phân (dịch nấm men tự phân, dịch thải trong sản xuất nước chấm, dịch bã rượu,...). Trong thời gian bảo quản, rỉ đường bị nhiễm vi sinh vật, nhưng vì nồng độ đường cao chúng không phát triển. Trước khi pha môi trường cần phải xử lý dịch đường: pha loãng 1 : 1; axit hóa tới pH 2,8 - 3,0; gia nhiệt tới 75°C và giữ ít nhất 45 phút để lắng bỏ cặn.

- Dùng ngũ cốc làm nguyên liệu sản xuất sinh khối nấm men rất tốt. Bột hoặc tinh bột các loại dùng vào mục đích này trước tiên phải thủy phân bằng axit hay enzym của mầm mại, hoặc enzym của vi sinh vật để biến polysaccarit (tinh bột) thành dạng đường mà nấm men có thể đồng hóa được.

- Nước thải các nhà máy cellulose theo phương pháp sunfit cũng là nguyên liệu tốt để sản xuất nấm men. Nước thải thường gọi là dịch kiềm - sunfit. Thành phần hydratcacbon của nó chủ yếu là đường pentose - một loại đường chỉ có nấm men, (đặc biệt là giống *Candida*, *Torulopsis*), có thể chuyển hóa tốt.

- Dịch bã rượu là nguồn dinh dưỡng nuôi cấy nấm men rất tốt. Trong dịch này có khoảng 1 - 2% chất khô hòa tan, rất giàu vitamin nhóm B và các axit amin. Nuôi nấm men dùng dịch này pha thêm rỉ đường để môi trường luôn có khoảng 2% đường, ta có thể thu từ 10 — 15 kg men khô từ 1m dịch bã rượu.

- Ngoài ra các nguồn cellulose thực vật (gỗ, rơm, rạ, bã mía, lõi ngô,...) cũng được chú ý nhiều trong sản xuất nấm men

2.2.2. Nuôi cấy nhân giống

Nuôi cấy nhân giống đầu tiên được thực hiện trong phòng thí nghiệm: giống trong ống nghiệm được cấy chuyển vào bình tam giác có chứa môi trường đã được khử trùng, sau đó các bình có giống được chuyển nuôi trên máy lắc với nhiệt độ bình thường 25 - 30°C đến độ tuổi sinh lý thích hợp sẽ cấy vào môi trường nhân giống ở phân xưởng - nhân giống cấp II trong các bình lên men có sục khí đến khi đạt được 3,5 - 4g sinh khối trên 1 lít dịch nuôi. Quá trình kết thúc sau 12 - 15 giờ, có thể phải nhân giống cấp III ở các nồi lên men có thể tích 4 - 5 m³. Tỷ lệ tiếp giống chuyển cấp là 1 : 10. Trong quá trình nhân giống, dùng dung dịch amôniac để duy trì pH, thổi khí liên tục. Từ nồi 4 - 5 m³ sẽ chuyển sang thùng 12 - 15m và tới vài chục mét khối hoặc lớn hơn nữa.

2.2.2. Nuôi men công nghiệp

Là nuôi mở rộng ở phân xưởng không cần vô trùng. Có nhiều nhà máy lắp đặt các nồi lên men kín hoặc hở, thông thường thể tích nuôi các nồi lên men là vài chục mét khối, có thể lên tới 500 m³.

Tiến hành nuôi theo phương pháp bán liên tục cho hiệu quả kinh tế cao: khi đạt lượng sinh khối có dịch nuôi cấy sẽ lấy dần ra và cho thêm môi trường mới vào nồi lên men có hàm lượng đường khoảng 1 - 2%.

Các tế bào của chủng nuôi được tách trước tiên theo phương pháp tạo thành bọt cùng với sinh khối trào ra ngoài rồi đưa đi ly tâm. Bọt và sinh khối trào ra được thu gom lại và đưa đi xử lý bằng phương pháp "tuyển nổi - floation" rồi đưa đi ly tâm qua các máy seperator (ly tâm tách), cô đặc ở chân không.

Sinh khối nấm men thu được ở dạng sệt có 75 - 80% nước, 20 - 25% chất khô trong đó cacbon chiếm 40 - 50%, nitơ 7 - 10% tương ứng với 40 - 60% protein, hydro

5 -7%, oxy 25 - 30%; các nguyên tố vô cơ khác 5 - 10% (phospho và kali chiếm 90 - 95% tổng lượng tro, số còn lại là canxi, magie, nhôm, lưu huỳnh, clo, sắt, ngoài ra còn một lượng nhỏ các nguyên tố mangan, kẽm, molipden, bo, coban,...). Sinh khối được đưa vào sấy ở máy sấy hai trục hoặc sấy phun.

Trong tế bào nấm men (và kể cả tế bào vi khuẩn) có nhiều vitamin nhóm B (trừ vitamin B₁₂), tiamin, riboflavin, axit nicotinic, axit folic, đặc biệt là rất giàu tiền vitamin D₂ (ergosterin). Dưới ánh sáng tử ngoại (cực tím), tiền vitamin D₂ sẽ chuyển thành vitamin D₂. Trước khi đóng gói sản phẩm, sinh khối nấm men được chiếu tia tử ngoại để vitamin hóa sản phẩm.

2.3. Sản xuất bột cá nhạt

Bột cá là loại chế phẩm giàu protein, vitamin và chất khoáng, có thể nói, bột cá là loại thức ăn giàu dinh dưỡng, trong đó rất giàu protein (giàu đạm) đối với các loại vật nuôi. Song, thực tế bột cá nhạt lại được ưa chuộng hơn so với bột cá mặn, vì sản xuất bột cá nhạt ít tốn kém và phạm vi ứng dụng rộng rãi hơn. Bột cá mặn thường chỉ được sử dụng cho thức ăn nuôi lợn, còn đối với gia cầm, thủy cầm và đặc biệt là tôm, cá thì việc ứng dụng chế phẩm này rất hạn chế.

Sản xuất bột cá nhạt theo hai quy trình công nghệ sau:

- Quy trình thứ nhất: ứng dụng lên men lactic vào sản xuất bột cá nhạt

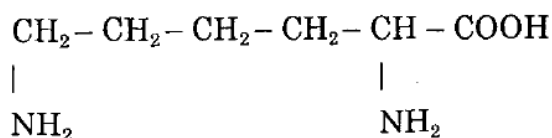
- Quy trình thứ 2: ứng dụng enzym tiêu hóa thủy phân protein của cá.

+ Enzym sử dụng ở đây là hệ enzym tiêu hóa pepsin, tripsin, chimotripsin của đường tiêu hóa của lợn (bộ dạ dày và lòng lợn).

+ Nguyên liệu là những loại cá nhỏ không đủ tiêu chuẩn làm cá thương phẩm (ít mỡ hoặc không mỡ) được rửa sạch. Băm lòng lợn và cá thành những mảnh nhỏ có kích thước 1 - 2cm (tỷ lệ lòng lợn với cá là 1 : 10 - 20), ủ ấm ở nhiệt độ 48 – 52⁰C trong 3 - 5 giờ, sau đó hấp chín, phơi khô hoặc sấy khô, nghiền thu nhỏ ta thu được bột cá nhạt. Loại bột cá này là một chế phẩm giàu protein, các peptit, các nucleotit, các nucleozit, các peptit và axit amin có N-amin tới 40 - 60% N- tổng, dễ tiêu hóa, dùng làm nguyên liệu sản xuất thức ăn cho động vật, đặc biệt là thức ăn cho tôm rất tốt.

2.4. Sản xuất chế phẩm lysine

Lysine là axit amin có hai nhóm amin (NH₃) và một nhóm cacboxyl (-COOH) trong phân tử. Lysine còn được gọi là axit α, β - diamin ronic. Công thức của lysine là như sau:



Lysine là một axit amin không thể thay thế, trong cơ thể động vật không thể tự tổng hợp được, vì vậy nó có ý nghĩa rất lớn trong dinh dưỡng động vật. Axit amin này được chú trọng nghiên cứu và đưa vào sản xuất công nghiệp vi sinh từ những năm

1950.

2.4.1. *Chủng vi khuẩn sinh lysine*

Các chủng vi sinh vật sinh *lysine* được dùng trong sản xuất là các thể đột biến thuộc các giống vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium*. Nhiều chủng axit glutamic được tuyển chọn qua bước làm đột biến và thu được những chủng mới có hoạt lực cao hơn nhiều so với chủng nguyên thủy. Nhưng, một điều rất lý thú là qua khâu đột biến, ta thu được những chủng mới có khả năng sinh tổng hợp lysine cao. Đặc tính của những chủng này là cần biotin với lượng cao hơn nhiều so với chủng nguyên thủy sinh axit glutamic, chịu được ở nồng độ đường lớn tới 20% hoặc cao hơn và đặc biệt là cần một số axit amin cho sinh trưởng, cũng như cho sinh tổng hợp lysine.

2.4.2. *Lên men*

a. Nguyên liệu

Nguồn hydrat cacbon thích hợp cho sinh tổng hợp lysine là glucose, fructose, maltose, và saccharose. Nồng độ đường trong môi trường lên men vào khoảng 10 - 12%... Các nguồn cacbon, như dầu khí, axetate, etanol,.. có nhiều triển vọng trong sản xuất lysine.

Nhiều nguyên liệu thông thường và tương đối thích hợp cho công nghiệp vi sinh vật sản xuất L-lysine là dịch thủy phân các loại bột (ngô, sắn), rỉ đường và cao ngô. Nhưng rỉ đường thường không đồng đều về chất lượng nên trước khi sử dụng lô rỉ đường nào đó cần phải phân tích chất lượng và lên men thử trong phòng thí nghiệm.

Nguồn nitơ dùng ở đây là ure và các muối amôn hoặc amôniac. Tỷ lệ C : N trong môi trường có ý nghĩa khá quan trọng. Nếu giảm N kéo theo giảm hiệu suất sinh lysine. Khi thông khí kém sẽ tích tụ axit lactic. Còn trường hợp giảm tỷ lệ trên tạo thành alanin và giảm lysine.

Nguồn phospho ở dạng muối phosphat kali cung cấp P trong môi trường với nồng độ P thích hợp là 0,008 - 0,02mg/l

Các chất khoáng khác (Mg, Fe, Cu, Mn) cũng cần có trong môi trường $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 - 0,5%; các muối của sắt, đồng, mangan không cần cho thêm vào vì trong cao ngô và rỉ đường thường chứa các ion này.

Trong môi trường dinh dưỡng, muốn cho chủng vi sinh vật sinh trưởng bình thường và tích tụ được nhiều lysine người ta phải thêm homoserin cùng các vitamin như biotin, thiamin. Có thể thay homoserin bằng 2 axit amin là treonin và metionin.

Tất cả các chủng sản xuất lysine đều cần biotin. Trong môi trường nuôi cấy cần tới 20 γ /l (bình thường các chủng sản glutamic và lysine cần lượng biotin tối thích cho sinh trưởng khoảng 15 γ /l). Nếu giảm lượng biotin xuống còn có 1 - 2 γ /l thì khả năng tạo thành lysine giảm 20 - 30 lần, đồng thời hoạt tính tạo thành axit glutamic lại cao lên. Nồng độ biotin cao ở trong môi trường làm màng tế bào dễ dàng cho axit amin

mang tính kiềm (như lysine) đi từ bên trong nội bào ra ngoài môi trường và ngược lại đối với axit amin mang tính axit như axit glutamic.

Trong môi trường dinh dưỡng cần có thiamin (vitamin B₁). Nếu không có vitamin B₁, giống phát triển kém và alanin sẽ được tạo thành thay cho lysine.

Trong công nghiệp thường dùng cao ngô và rỉ đường làm nguồn biotin và thiamin.

b. Nhiệt độ

Nhiệt độ tối thích cho quá trình lên men là 28 - 30°C. Nếu quá 5 - 6°C so với nhiệt độ tối thích sẽ phát triển yếu và ngả sang tự phân, hoặc giảm đi 5 - 6°C thì thời gian sẽ kéo dài, pH tối thích là 7,0 - 7,6, trong lên men ta cố giữ pH trong khoảng 6 - 8,5 bằng bổ sung ure hoặc nước amôniac.

c. Độ thoáng khí

Độ hiếu khí cũng rất, quan trọng trong lên men lysine. Nếu hiếu khí không đủ sẽ dẫn tới tạo thành alanin và axit lactic thay cho lysine. Trong quá trình lên men, cả hai trường hợp hiếu khí cao hoặc thấp so với yêu cầu dẫn tới làm giảm năng suất lên men.

d. Lên men

Quá trình lên men được thực hiện trong các nôi lên men có sục khí và khuấy đều liên tục với thể tích 30, 50, 70 và tới 100 m³

Quá trình lên men là quá trình nuôi cấy hiếu khí và vô trùng. Các chủng giống vi khuẩn sinh lysine là các thể đột biến dị dưỡng homoserin. Các đặc điểm sinh lý của chúng đã được nêu một cách tổng quát ở trên và từ đó hướng cho các kỹ sư sinh học lựa chọn các nguồn nguyên liệu để làm cơ chất dinh dưỡng thích hợp trong thành phần môi trường lên men

Sinh khối tạo thành mạnh trong khoảng 12 - 18 giờ đầu rồi chậm lại. Ở thời điểm này lysine mới bắt đầu được tích tụ trong dịch nuôi cấy. Khoảng thời gian từ 12 - 18 giờ đầu lên men các tế bào của chủng sản to và từ khi tạo thành lysine chúng nhỏ lại. Khi bắt đầu sinh tổng hợp lysine cũng là lúc chủng sản dùng gần hết treonin có trong môi trường. Thời gian lên men khoảng 68 - 72 giờ

2.4.3. Tách và hoàn thiện chế phẩm lysine

Lysine có các dạng chế phẩm: dịch nuôi cấy, dịch cô đặc, bột khô (có và không có chất độn) và lysine tinh thể có độ thuần khiết trên 97%.

Dịch lên men có chứa lysine, sinh khối vi khuẩn, một số thành phần trong nguyên liệu không được vi sinh vật sử dụng, các chất khoáng và một số sản phẩm phụ có thể dùng trực tiếp vào thức ăn chăn nuôi.

Dịch lên men có khoảng 10 - 13% chất khô, nếu để tự nhiên không được lâu, dễ bị thối hỏng, vì vậy cần phải axit hoá bằng axit clohydric tới pH = 5 và bổ sung dịch 25% natri metabisunfit theo liều lượng là 0,4% so với dịch lên men. Sau đó đem cô ở

nồi cô chân không tới khi có nồng độ chất khô là 35 -40%. Quá trình này có thể tổn hao 5 — 10% lysine. Chế phẩm cô đặc này có thể bảo quản 3 — 4 tháng. Trong chế phẩm này có khoảng 15 - 20% lysine ở dạng monoclohydrat, khoảng 10 - 17% protein, tới 4% các axit amin khác, axit folic, axit nicotinic,...

Từ các phẩm cô đặc này, người ta có thể thêm chất độn (bột xương, oxyt canxi, bentonit, cám mì) cô thành viên hoặc tạo thành sợi rồi sấy khô. Dạng này ít hút ẩm. Hoặc chuyển dịch cô đặc vào sấy phun sẽ thu được lysine chế phẩm dạng bột khô có độ ẩm 5 - 6% với hàm lượng lysine khá cao. Nhược điểm của lysine dạng bột này là dễ hút ẩm, nếu đóng gói kín thì có thể bảo quản được lâu.

Các chế phẩm của lysine ở dạng dịch cô đặc, dạng bột khô, dạng viên hoặc sợi có chất độn đều có giá trị dinh dưỡng động vật rất cao, được dùng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi cho hiệu quả kinh tế cao.

Từ dịch lên men có thể thu nhận được chế phẩm lysine ở dạng kết tinh. Trước tiên là ly tâm dịch, loại bỏ cặn và vật thể rắn, dịch sau ly tâm cho hấp phụ ở cột nhựa trao đổi ion catinoit ở dạng amôn. Sau đó rửa cột cẩn thận đến khi nước không có màu và tiến hành nhả hấp phụ bằng dung dịch amôniac 0,5 - 5% đến khi chỉ còn vết lysine, trong dịch phản hấp thụ này có thể tổn thất 10 - 20% lysine.

Đun nóng dịch lysine thu được để đuổi amôniac, rồi hạ pH tới 4,9 - 5 bằng axit clohydric, cô ở nồi cô chân không ở nhiệt độ 60°C tới nồng độ lysine đạt 30 - 50%. Trong khi cô, lysine tác dụng với HCl tạo thành monoclohydrat lysine, làm lạnh tới 10 - 12% và xuất hiện các tinh thể kết tinh. Tinh thể kết tinh lần một này được đem đi sấy khô và đóng gói, dịch nước cái được cô đặc thêm và tận dụng như dịch lysine cô đặc.

Tách tinh thể thu được từ lần kết tinh thứ nhất này có thể cho tiến hành kết tinh lại nhiều lần để làm tinh sạch. Đem tinh thể lysine hòa tan vào trong cồn rồi lại cho kết tinh và làm đi làm lại vài lần, các tinh thể sẽ sạch khỏi tạp chất và các chất màu. Lysine tinh khiết có thể dùng trong thực phẩm, trong y học. Lysine thương phẩm có độ tinh khiết trên 97%, độ ẩm không quá 0,5%, tro - 0,3%. Quá trình kết tinh có thể tổn hao lysine tới 30%.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Câu hỏi 1: Nêu một số nguồn thức ăn giàu protein dùng trong chăn nuôi.

Câu hỏi 2: Trình bày được đặc điểm và quy trình sản xuất chế phẩm lysine

C. Ghi nhớ

Cần chú ý một số nội dung trọng tâm:

- Quy trình thu sinh khối tảo, nấm men làm nguồn thức ăn chăn nuôi.
- Quy trình sản xuất chế phẩm lysine

PHẦN II – THỰC HÀNH

BÀI 1: XỬ LÝ SƠ BỘ NGUYÊN PHỤ LIỆU

Giới thiệu:

Bài Xử lý sơ bộ nguyên phụ liệu trang bị cho sinh viên các kỹ năng lựa chọn dụng cụ, vật tư, nguyên phụ liệu; xử lý bã thải nấm, nguyên phụ liệu đúng yêu cầu kỹ thuật. Sau khi học xong bài này người học có thể xử lý được sơ bộ nguyên phụ liệu để sản xuất phân hữu cơ sinh học.

Mục tiêu:

- Mô tả được các tính chất của nguyên phụ liệu dùng để sản xuất phân hữu cơ sinh học;
- Lựa chọn được dụng cụ, vật tư xử lý sơ bộ bã thải nấm và các phụ liệu;
- Vận chuyển nguyên phụ liệu về khu vực xử lý an toàn, không rơi vãi;
- Xử lý bã thải nấm và các phụ liệu đúng yêu cầu kỹ thuật
- Rèn luyện tính cẩn thận, nghiêm túc, kỷ luật an toàn lao động.

A. Nội dung:

1. Chuẩn bị dụng cụ

1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ

Máy móc, dụng cụ khi xử lý sơ bộ phải đảm bảo các yêu cầu sau đây:

- + Phù hợp, thuận tiện cho thao tác, dễ vệ sinh, khử trùng và bảo dưỡng.
- + Bề mặt của dụng cụ tiếp xúc trực tiếp với nguyên liệu.
- + Thiết bị máy móc phải được bố trí để có thể vận hành đúng với mục đích sử dụng, dễ dàng vệ sinh, bảo dưỡng và thuận lợi cho việc kiểm tra;
- + Các dụng cụ cân đo phải được kiểm tra và hiệu chỉnh định kỳ.
- + Các thiết bị cơ khí, thiết bị sử dụng điện năng, nhiệt năng, thiết bị áp lực phải có quy định bằng văn bản về chế độ vận hành, kiểm tra, bảo dưỡng để đảm bảo an toàn lao động và đảm bảo chất lượng sản phẩm.

1.1.1. Thiết bị

a) Xe đẩy: Có hai loại là xe đẩy 2 bánh và xe đẩy 4 bánh



Hình 1.1. Xe đẩy 2 bánh



Hình 1.2. Xe đẩy 4 bánh

- Xe đẩy 2 bánh thường làm bằng gỗ hoặc bằng sắt, dùng để vận chuyển nguyên liệu, bán thành phẩm hoặc thành phẩm trên các quãng đường ngắn

- Xe đẩy 4 bánh thường làm bằng sắt hoặc bằng inox. Xe đẩy 4 bánh thường dùng trong kho thành phẩm.

b. Cân đồng hồ

Cân đồng hồ có nhiều loại, tùy theo khối lượng cần cân mà chọn loại cân có khối lượng phù hợp như: 0,5 kg; 1 kg; 5 kg; 10 kg; 50 kg; 100 kg.

Cách sử dụng cân đồng hồ			
Bước 1. Đặt cân ở vị trí bằng phẳng, điều chỉnh cân để kim chỉ vị trí 0	Bước 2. Đặt dụng cụ đựng nguyên liệu cần cân lên bàn cân.	Bước 3. Trừ bì khối lượng dụng cụ đựng nguyên liệu.	Bước 4. Cho nguyên liệu cần cân vào dụng cụ đến khối lượng yêu cầu

Hình 1.3. Cách sử dụng cân đồng hồ



a. Cân đồng hồ dùng để cân nguyên liệu có khối lượng lớn



b. Cân đồng hồ dùng để cân các phụ liệu có khối lượng nhỏ

Hình 1.4. Cân đồng hồ loại 150 kg và loại 500 g

1.1.2. Vật tư

a) Dụng cụ

Dụng cụ cần thiết để xử lý sơ bộ nguyên phụ liệu bao gồm: thau nhựa, thùng pha nước vôi, ca nhựa, bình tưới, que khuấy, cào sắt, xẻng, chổi quét...



Hình 1.5. Thau nhựa



Hình 1.6. Thùng nhựa



Hình 1.7. Cuốc xẻng



Hình 1.8. Dao băm

b) Bảo hộ lao động: khẩu trang, găng tay su, ủng, bộ áo quần bảo hộ lao động, mũ, nón



a. Găng tay



b. Ủng



c. Khẩu trang



d. Quần áo bảo hộ



e. Nón

Hình 1.9. Đồ bảo hộ lao động

1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị

1.2.1. Mục đích kiểm tra, vệ sinh thiết bị

Việc kiểm tra, vệ sinh thiết bị có mục đích như sơ đồ hình 1.10

Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị	- Giảm thiểu các nguy cơ hư hỏng không mong muốn của các thiết bị
	- Theo dõi phát hiện kịp thời những sự cố về hệ thống thiết bị nhằm đảm bảo an toàn hệ thống.
	- Xử lý, nâng cấp và thay thế các thiết bị hư hỏng trong quá trình vận hành.
	- Giảm đến mức tối thiểu sự lây nhiễm các mối nguy vi sinh, hóa học và vật lý vào trong sản phẩm.
	- Hạn chế các bề mặt nứt, hư hỏng làm giảm hiệu quả của việc làm sạch thiết bị.
	- Duy trì độ chính xác của các thiết bị, đặc biệt các quá trình tới hạ.

Hình 1.10. Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị

1.2.2. Các bước vệ sinh thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị như máy trộn, băng tải... được vệ sinh định kỳ theo các bước:

* **Bước 1:** Tắt cầu dao điện hoặc rút phích điện

Rút phích điện ra khỏi ổ cắm hoặc đóng cầu dao điện.

Bước 1 này được thực hiện trước khi vệ sinh tất cả các thiết bị nhằm giúp đảm bảo an toàn điện khi vệ sinh.



Hình 1.11. Rút điện

* Bước 2: Xịt rửa thiết bị

- Xịt rửa thiết bị bằng nước sạch
- Xịt rửa bằng xà phòng hoặc hóa chất tẩy rửa để loại bỏ chất bẩn đối với các bộ phận tiếp xúc với thực phẩm
- Xịt rửa lại bằng nước sạch (tùy theo từng thiết bị mà các bước tiến hành sẽ khác nhau).



Hình 1.12. Rửa thiết bị

* Bước 3: Làm khô thiết bị

Dùng khăn hoặc vải lau khô lại thiết bị hoặc để khô một cách tự nhiên.

Đối với thiết bị cân, ... thì phải lau khô, sạch bằng vải (hình 1.18).



Hình 1.13. Vệ sinh máy bằng cách lau khô

Những dụng cụ như sọt, thau nhựa, bình tưới... cũng phải được thường xuyên vệ sinh để đảm bảo vệ sinh trong sản xuất. Tiến hành vệ sinh dụng cụ theo các bước sau:

* Bước 1: Pha dung dịch hóa chất để vệ sinh

- Khi sử dụng xà phòng thì cần pha loãng đến dung dịch có $\text{pH} = 6 \div 8$ để vệ sinh.

* Bước 2: Rửa dụng cụ bằng nước

Tráng qua dụng cụ bằng nước để loại bớt chất bẩn bám trên đó

* Bước 3: Rửa dụng cụ bằng dung dịch tẩy rửa

Nếu sử dụng trực tiếp nước rửa chén thì cho nước rửa vào miếng rửa, sau đó rửa các dụng cụ bằng nước rửa chén hoặc xà phòng để loại bỏ chất bẩn

* Bước 4: Tráng lại bằng nước sạch

Rửa lại dụng cụ bằng nước cho sạch hóa chất dưới vòi nước chảy

* Bước 5: Làm khô dụng cụ

Sắp xếp dụng cụ sau khi rửa vào các giá/kệ và đưa ra ngoài nắng để phơi khô dụng cụ



Hình 1.14. Tráng lại bằng nước sạch



Hình 1.15. Phơi khô dụng cụ

2. Vận chuyển nguyên phụ liệu về khu vực xử lý

Khu vực xử lý nguyên phụ liệu cần có mái che tránh mưa dột, được bao bọc kín xung quanh để tránh chuột cắn rách bao, ruồi nhặng và mùi hôi thoát ra môi trường gây ô nhiễm.

- *Bước 1:* Chuẩn bị xe vận chuyển: xe rùa, xe bò, xe đẩy...
- *Bước 2:* Dùng xẻng xúc nguyên phụ liệu phương tiện vận chuyển hoặc nếu các nguyên phụ liệu được đóng bao trước khi vận chuyển thì ta xếp các bao lên phương tiện vận chuyển
- *Bước 3:* Vận chuyển nguyên phụ liệu về khu vực xử lý



Hình 1.16. Vận chuyển bằng xe rùa



Hình 1.17. Vận chuyển bằng xe bò

3. Xử lý sơ bộ nguyên phụ liệu

3.1. Xử lý bã thải nấm

Bã thải được thu gom và xử lý sơ bộ qua các bước như sau:

* *Thu nhận:* Bã thải sau thu hoạch nấm được thu gom và vận chuyển đến sân bãi của khu xử lý phế thải.



Hình 1.18. Sân bãi thu gom bã thải trồng nấm

* *Phân loại:*

- Chọn những túi giá thể mùn cưa hoặc những phần bã thải còn rắn chắc, chưa bị mục nát, có màu ngả vàng của hệ sợi nấm.

- Loại bỏ những phần bã thải bị nhũn, nhầy nhớt, bị mốc hoặc có mùi chua.

** Làm tơi bã thải:*

- Đối với các túi giá thể mùn cưa:

+ Loại bỏ bao nylon chứa giá thể

+ Bóc bỏ những mảng sinh khối nấm màu trắng bên kết bên ngoài để tránh sự lây nhiễm và tạo mùi khó chịu trong quá trình xử lý sau này, chỉ sử dụng phần mùn cưa bên trong.

+ Dùng cuốc, xẻng đập tơi khối mùn cưa thải.

- Đối với các loại bã thải khác (rơm rạ, bông phế liệu, bã mía,...):

+ Loại bỏ những mảng sinh khối và hệ sợi nấm bên kết trong nguyên liệu

+ Dùng bò cào làm tơi bã thải.

3.2. Xử lý rơm rạ, thân lá cây họ đậu

Rơm rạ, thân lá cây họ đậu được thu gom và xử lý sơ bộ qua các bước sau:

- *Bước 3:* Trải bạt ra trên nền đất sạch

- *Bước 4:* Đổ Rơm rạ, thân lá cây họ đậu đã được phơi khô ra từng đồng riêng biệt lên trên tấm bạt đã trải

- *Bước 5:* Dùng dao băm hoặc rựa băm lá, cành cây thành từng đoạn nhỏ có kích thước từ 3-5 cm

** Xử lý các bao lá cây theo cách bán cơ giới*

- *Bước 3:* Trải bạt ra trên nền đất sạch để thu lá cây sau khi băm.

- *Bước 4:* Khởi động máy để tiến hành băm

- *Bước 5:* Đổ các bao lá cây được tiếp nhận vào máy băm



Hình 1.19. Băm lá cây bằng máy

- *Bước 6:* Kiểm tra lại kích thước của cành lá cây sau khi băm, kích thước từ 3 ÷ 5 cm là đạt yêu cầu và không lẫn rác, đất đá. Nếu kích thước chưa đạt yêu cầu thì tiến hành băm lại lần nữa.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Bài tập 1: Xác định đúng tên các loại thiết bị dùng xử lý nguyên phụ liệu? Cho biết mục đích của các thiết bị đó?

Bài tập 2: Thực hành vận chuyển nguyên phụ liệu về bãi tập kết bằng xe rùa.

Bài tập 3: Thực hành xử lý sơ bộ bã thải nấm.

Bài tập 4: Thực hành xử lý sơ bộ rơm rạ, thân lá cây họ đậu

BÀI 2: PHỐI TRỘN VÀ Ủ HỖN HỢP NGUYÊN PHỤ LIỆU

Giới thiệu:

Bài Phối trộn và ủ hỗn hợp nguyên phụ liệu trang bị cho sinh viên các kỹ năng phối trộn, ủ nguyên phụ liệu đúng yêu cầu kỹ thuật. Sau khi học xong bài này người học có thể phối trộn, ủ hỗn hợp nguyên phụ liệu để sản xuất phân hữu cơ sinh học.

Mục tiêu:

- Nêu được các bước thực hiện phối trộn và ủ nguyên phụ liệu;
- Lựa chọn được dụng cụ, vật tư phối trộn và ủ nguyên phụ liệu;
- Phối trộn nguyên phụ liệu theo đúng công thức;
- Làm ẩm, ủ đồng khối nguyên phụ liệu đúng yêu cầu kỹ thuật.
- Rèn luyện tính cẩn thận, nghiêm túc, kỷ luật an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị dụng cụ

1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ

Máy móc, dụng cụ khi phối trộn và ủ hỗn hợp nguyên phụ liệu phải đảm bảo các yêu cầu sau đây:

- + Phù hợp, thuận tiện cho thao tác, dễ vệ sinh, khử trùng và bảo dưỡng.
- + Bề mặt của dụng cụ tiếp xúc trực tiếp với nguyên liệu.
- + Thiết bị máy móc phải được bố trí để có thể vận hành đúng với mục đích sử dụng, dễ dàng vệ sinh, bảo dưỡng và thuận lợi cho việc kiểm tra;
- + Máy trộn, dụng cụ cân đo phải được kiểm tra và hiệu chỉnh định kỳ.
- + Các thiết bị cơ khí, thiết bị sử dụng điện năng, nhiệt năng, thiết bị áp lực phải có quy định bằng văn bản về chế độ vận hành, kiểm tra, bảo dưỡng để đảm bảo an toàn lao động và đảm bảo chất lượng sản phẩm.

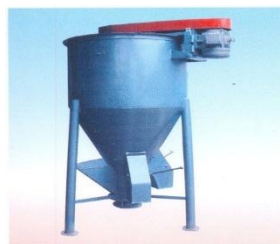
1.1.1. Thiết bị

a. Máy trộn

Máy trộn là một thiết bị dùng để trộn hỗn hợp nguyên phụ liệu thành một hợp chất đồng nhất trong đó độ đồng đều của nguyên phụ liệu là một trong những chỉ tiêu cơ bản để đánh giá chất lượng nguyên phụ liệu và hiệu quả của máy.



Hình 2.1. Máy trộn ngang



Hình 2.2. Máy trộn đứng

Máy trộn có nhiều loại, nhiều kiểu, và được phân loại theo nhiều phương pháp khác nhau.

Hiện nay, phổ biến trong các cơ sở sản xuất phân bón có qui mô lớn thì máy trộn được dùng phổ biến là loại máy trộn kiểu đứng.

b. Nhiệt kế

- Nhiệt kế dùng để đo nhiệt độ trong đồng ủ khi xử lí
- Có 2 loại nhiệt kế phổ biến là nhiệt kế hiển số và nhiệt kế thủy ngân.
- Cách sử dụng nhiệt kế thủy ngân
 - + Cắm nhiệt kế vào đồng ủ nguyên liệu sao cho ngập bầu chứa thủy ngân, để yên khoảng 15 giây.
 - + Đọc nhiệt độ tại vạch thủy ngân dâng lên có màu trắng hoặc vạch màu đỏ (nếu sử dụng nhiệt kế rượu).



Nhiệt kế thủy ngân



Nhiệt kế hiển số

Hình 2.3. Các loại nhiệt kế

c. Ẩm kế

Mục đích: dùng để đo độ ẩm của nguyên liệu, độ ẩm của đồng ủ

- Cách sử dụng ẩm kế:

Cắm đầu điện cực vào khối nguyên liệu trên màn hình ẩm kế sẽ xuất hiện số đo độ ẩm.



Ẩm kế đồng hồ



Ẩm kế điện tử

Hình 2.4. Các loại ẩm kế

c. Cân đồng hồ

Xem lại ở bài thực hành số 1

1.1.2. Vật tư

a. Dụng cụ

Tương tự bài thực hành 1

b. Bảo hộ lao động

Tương tự bài thực hành 1

c. Hóa chất

Vôi bột

1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị

Tương tự như bài thực hành số 1

2. Phối trộn nguyên phụ liệu

2.1. Cân nguyên phụ liệu

- *Bước 1:* Đặt cân ở vị trí bằng phẳng
- *Bước 2:* Điều chỉnh cân sao cho kim đồng hồ chỉ về số 0
- *Bước 3:* Đặt vật liệu chứa lên bàn cân
- *Bước 4:* Cho lượng nguyên phụ liệu lên bàn cân



Hình 2.5. Cân nguyên phụ liệu

Cân lượng nguyên phụ liệu theo đúng tỷ lệ quy định: Bã thải nấm : thân lá cây họ đậu: phân bò là 4:0,5:1. Như vậy cứ một mẻ sản xuất khoảng 400 kg thì cân 400 kg bã thải; 50 kg thân lá, cây họ đậu và 100 kg phân chuồng.

2.2. Đảo trộn

Đảo trộn nhằm mục đích trộn đều các nguyên phụ liệu với nhau theo tỉ lệ thích hợp bã thải nấm : thân lá cây họ đậu: phân bò là 4:0,5:1. Trong điều kiện không có máy trộn, thì phối trộn nguyên phụ liệu theo phương pháp thủ công.

Cách tiến hành:

- *Bước 1:* Mang quần áo, bảo hộ lao động: khẩu trang, ủng, găng tay...
- *Bước 2:* Rửa sạch nền chuẩn bị cho phối trộn
- *Bước 3:* Trải nguyên phụ liệu thành lớp dày 15 - 20 cm



Hình 2.6. Trải bã thải nấm

- *Bước 4:* Trải phân bò ra nền có độ dày khoảng 10 - 15 cm

- *Bước 5:* Trải cành, lá cây đã phơi khô ra nền có độ dày khoảng 10 - 15 cm



Hình 2.7. Trải thân, lá cây ra nền

- *Bước 6:* Đảo trộn khối nguyên phụ liệu bằng xẻng và cào sắt cho đến khi các nguyên phụ liệu đều nhau



Hình 2.8. Đảo trộn khối nguyên phụ liệu

3. Làm ẩm khối nguyên phụ liệu

3.1. Pha nước vôi

* *Bước 1.* Pha nước vôi:

Nước vôi dùng xử lý khối nguyên liệu có pH khoảng 7,5 - 9.

Tiến hành pha nước vôi:

- Mang bảo hộ lao động.
- Cân vôi tôi hoặc vôi sống cho vào trong thau sạch, lượng vôi phụ thuộc vào lượng nguyên liệu cần xử lý.
- Dùng que khuấy cho vôi hoà tan hoàn toàn trong nước



Hình 2.9. Cân vôi sống



Hình 2.10. Hòa tan vôi

- Kiểm tra pH nước vôi bằng giấy đo pH, đảm bảo có pH: 7,5 - 9
- + Nhúng mẫu giấy quỳ vào nước vôi.
- + Đối chiếu màu giấy quỳ trên bảng so màu và đọc kết quả pH của nước vôi
- + Điều chỉnh pH nước vôi theo đúng yêu cầu.

* **Chú ý khi pha nước vôi:**

- Pha đúng pH nước vôi.
- Nếu sử dụng vôi sống để pha vôi tôi: phải cẩn thận để tránh bị bỏng do nước vôi bắn lên người, không nhìn trực tiếp vào thùng nước vôi khi ta đổ vôi sống vào thùng hơi nước vôi

bay lên gây hại cho mắt.

- Trung bình 100 kg bã thải thì cần 40 - 50 lít nước vôi tạo ẩm (tùy độ ẩm khối bã thải)

Lưu ý: Tùy theo độ ẩm khối nguyên liệu có thể bổ sung vôi bột tỉ lệ 1 – 2% so với lượng nguyên phụ liệu

3.2. Tạo ẩm

- Tưới nước vôi đã pha lên lớp nguyên phụ liệu bằng vòi sen, vừa tưới vừa đảo trộn cho lớp nguyên phụ liệu thấm đều.

- Kiểm tra độ ẩm khối nguyên phụ liệu đảm bảo độ ẩm đạt từ 45 - 50%. Kiểm tra độ ẩm bằng cách: vắt một nắm nguyên phụ liệu trong lòng bàn tay, bóp mạnh:

+ Nếu thấy nước rịn ra ở kẽ tay là nguyên phụ liệu dư nước, cần bổ sung thêm nguyên phụ liệu khô.



Hình 2.13. Nguyên phụ liệu thừa nước

+ Nếu thả ra nắm nguyên phụ liệu bị vỡ là nguyên phụ liệu thiếu nước, cần thêm nước vôi



Hình 2.14. Nguyên phụ liệu thiếu nước

+ Nếu không thấy nước rịn ra ở kẽ tay và khi thả ra nắm nguyên phụ liệu không vỡ thì độ ẩm đạt yêu cầu và tiến hành ủ đóng.



Hình 2.15. Nguyên phụ liệu đủ nước

4. Đảo trộn

- Đảo trộn khối nguyên phụ liệu bằng xẻng và cào sắt, tiến hành đảo trộn cho đến khi khối bã thải trộn đều nhau và độ ẩm đồng đều.

5. Ủ đóng

- Dùng xẻng, cào sắt chất nguyên phụ liệu thành đống hình chóp, có kích thước tối thiểu các chiều: 1,5m x 1,5m x 1,5m.

- Đậy kín đống ủ bằng bạt nilon, cố định dưới chân đống ủ không cho hơi nước thoát ra ngoài.

Thời gian ủ đóng khoảng 1 tuần.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Bài tập 1: Xác định đúng tên các loại thiết bị dùng để phối trộn, ủ nguyên phụ liệu?
Cho biết mục đích của các thiết bị đó?

Bài tập 2: Thực hành phối trộn nguyên phụ liệu

Bài tập 3: Thực hành tạo ẩm nguyên phụ liệu

Bài tập 4: Thực hành đảo trộn, ủ đông nguyên phụ liệu

C. Ghi nhớ

- Tỷ lệ các nguyên phụ liệu phối trộn
- Pha nước vôi đúng pH, tạo độ ẩm cho khối nguyên liệu đúng yêu cầu

BÀI 3: LÊN MEN NGUYÊN PHỤ LIỆU

Giới thiệu:

Bài Lên men nguyên phụ liệu trang bị cho sinh viên các kỹ năng kiểm tra khối nguyên phụ liệu, bổ sung chế phẩm, đảo trộn, ủ đồng nguyên phụ liệu đúng yêu cầu kỹ thuật. Sau khi học xong bài này người học có thể lên men hỗn hợp nguyên phụ liệu để sản xuất phân hữu cơ sinh học.

Mục tiêu:

- Trình bày được các bước lên men nguyên phụ liệu;
- Lựa chọn được dụng cụ, vật tư;
- Lên men nguyên phụ liệu đúng quy trình và đảm bảo các yêu cầu kỹ thuật;
- Nhận biết và xử lý được một số sự cố khi ủ phân;
- Rèn luyện tính cẩn thận, nghiêm túc, kỷ luật an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị dụng cụ

1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ

1.1.1. Thiết bị

1.1.2. Vật tư

a. Dụng cụ

Các dụng cụ bao gồm: cuốc, xẻng, cào, chổi... và bảo hộ lao động đã trình bày ở bài 1

b. Hóa chất

Chế phẩm sinh học: Chế phẩm Trichoderma hoặc Emic

1.2. Kiểm tra và vệ sinh thiết bị, dụng cụ

Các bước kiểm tra, vệ sinh thiết bị, dụng cụ đã trình bày ở bài 1

2. Lên men lần 1

Lên men là khâu quan trọng nhất trong kỹ thuật xử lý bã thải. Trong quá trình lên men, vi sinh vật phát triển và hoạt động sản sinh ra các enzym thủy phân ngoại bào phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp (cellulose, pectin,...) thành những chất hữu cơ và vô cơ đơn giản trong một phức hợp gọi là mùn.

2.1. Kiểm tra khối nguyên liệu

Trước khi bổ sung chế phẩm vi sinh, cần phải kiểm tra khối nguyên phụ liệu sau khi xử lý sơ bộ

Bã thải sau khi xử lý sơ bộ phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Độ ẩm đạt 40 - 45%
- Bã thải có màu nâu thẫm đồng đều

- Bã thải mềm, xốp và không có mùi chua.

2.2. Bổ sung chế phẩm vi sinh lần 1

- Bổ sung chế phẩm Trichoderma vào bã thải, cứ 500 kg nguyên phụ liệu (tính theo khối lượng chưa làm ẩm) thì dùng gói 1 kg chế phẩm. Cách tiến hành gồm các bước như sau:

- + Cho 1 kg chế phẩm vào 10 lít nước sạch, hòa tan thành dịch chế phẩm
- + Trải lớp nguyên phụ liệu ra nền sạch, độ dày lớp nguyên phụ liệu là 25 – 30 cm.
- + Tưới dịch chế phẩm lên lớp nguyên phụ liệu bằng vòi sen, tưới đều khắp trên bề mặt cho đến khi dịch thấm xuống phía dưới.
- + Trộn lớp nguyên phụ liệu bằng xẻng, cuốc, trộn đảo 3 - 4 lần cho dịch chế phẩm thấm ướt đều vào nguyên phụ liệu.
- + Đổ thêm nguyên phụ liệu có độ dày khoảng 30 cm, tiếp tục tưới dịch chế phẩm và đảo trộn cho dịch chế phẩm thấm ướt đều.
- + Cứ tiếp tục như vậy cho đến hết lượng nguyên phụ liệu
- + Kiểm tra độ ẩm của khối nguyên phụ liệu đạt 50 - 60 % trước khi ủ đồng.

2.3. Ủ đồng

* Mục đích của quá trình ủ bã thải:

- Biến các hợp chất khó tiêu thành dễ tiêu và các hợp chất trung gian dễ hợp thành mùn.

- Trong quá trình ủ, nhiệt độ có thể tăng lên 60 - 75°C hoặc cao hơn, làm chết các vi sinh vật gây bệnh và diệt được trứng của côn trùng.

* Cách tiến hành

- Rửa sạch nền để khô
- Kiểm tra lại độ ẩm khối nguyên phụ liệu trước khi ủ phải đạt 50 - 60%.
- Dùng xẻng, cào sắt chất bã thải thành đồng hình chóp, khối lượng bã thải ủ đồng tối thiểu 100 kg.
- Dùng bạt nilon quây kín đồng ủ, buộc dây xung quanh cho bạt không bị bung ra.
- Cắm cọc thông khí ở giữa đồng ủ để tạo điều kiện hiếu khí cho vi sinh vật hoạt động và khí thải tạo thành trong quá trình lên men được giải phóng ra ngoài.

2.4. Đảo trộn khối nguyên phụ liệu

Sau thời gian ủ đồng khoảng 7 ngày, chúng ta tiến hành đảo trộn khối nguyên phụ liệu

* Mục đích của việc đảo đồng ủ:

- Giúp cho vi sinh vật phân bố đồng đều trong đồng ủ

- Điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm của khối bã thải đồng đều hơn
- Làm bay hơi các khí thải tạo ra trong quá trình lên men
- Tạo độ thông thoáng cho đồng ủ, giúp cho quá trình phân giải các chất diễn ra mạnh hơn.

*** Cách tiến hành**

- Tháo tấm bạt ra khỏi đồng ủ
- Kiểm tra độ ẩm khối nguyên phụ liệu ở các vị trí khác nhau trên đồng ủ
- Chia đồng ủ thành 4 khối riêng biệt và bổ sung thêm nước nếu độ ẩm khối nguyên phụ liệu dưới 50% và tưới rộng nếu độ ẩm cao hơn 60%.
- Đảo trộn khối nguyên phụ liệu bằng xẻng và cào sắt, tiến hành đảo trộn cho đến khi khối nguyên phụ liệu trộn đều nhau và độ ẩm đồng đều.
- Vun đồng khối nguyên phụ liệu giống đồng ủ ban đầu.
- Đậy kín đồng ủ bằng bạt nylon, cố định tấm bạt dưới chân đồng ủ cho kín không để hơi nước thoát ra ngoài.

3. Lên men lần 2

3.1. Kiểm tra khối nguyên liệu

Sau khi đảo trộn 2 tuần, trước khi bổ sung chế phẩm vi sinh lần 2, cần phải kiểm tra khối nguyên phụ liệu

Khối nguyên phụ liệu sau khi lên men lần 1 phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Độ ẩm đạt 45 - 50%:
- Khối nguyên phụ liệu có màu nâu đậm đồng đều
- Khối nguyên phụ liệu mềm, xốp, phân bố, lá, thân cây bắt đầu hoai và không có mùi chua.

3.2. Bổ sung chế phẩm vi sinh lần 2

Sau thời gian lên men lần 1, chúng ta tiếp tục bổ sung chế phẩm vi sinh lần thứ hai vào khối nguyên phụ liệu để giúp cho quá trình mùn hóa diễn ra triệt để.

- Bổ sung 0,5 kg chế phẩm vi sinh vào 500 kg nguyên phụ liệu (tính theo khối lượng nguyên phụ liệu chưa làm ẩm).
- Cách phối trộn tiến hành tương tự như lần thứ nhất

3.3. Ủ đồng

Cách ủ đồng tương tự như lần 1

3.4. Đảo trộn

- Sau thời gian bổ sung chế phẩm khoảng 7 ngày, chúng ta phải tiến hành đảo trộn khối nguyên phụ liệu, các bước thực hiện tương tự như lần thứ nhất. Chú ý kiểm tra độ ẩm của khối bã thải phải đạt 50 - 60%.

Tổng thời gian lên men của khối nguyên phụ liệu kéo dài khoảng 40 - 50 ngày

thì chúng ta kết thúc quá trình lên men và thu nhận sản phẩm.

4. Những vấn đề thường gặp trong quá trình ủ phân, nguyên nhân và biện pháp khắc phục

Trong quá trình lên men, chúng ta phải thường xuyên theo dõi hoạt động của vi sinh vật và các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình lên men như: nhiệt độ, pH (độ chua), độ ẩm để có biện pháp khắc phục kịp thời các sự cố xảy ra.

Thông thường sau 5 - 6 ngày nhiệt độ đồng ủ đã đạt đến 55°C, đồng ủ rất nóng, có hiện tượng bốc hơi bề mặt. Do vi sinh vật hoạt động mạnh mẽ, chúng sử dụng chất hữu cơ để đồng hóa và phát triển mạnh. Từ ngày 15 đến ngày 20 nhiệt độ có chiều hướng giảm do hệ vi sinh vật giảm. Bởi vì lượng nước bay hơi do sức nóng trong đồng ủ làm cho độ ẩm đồng ủ lúc này chỉ còn 40%, lượng vi sinh vật phân giải cũng giảm do sức nóng của đồng ủ. Do vậy, sau 20 ngày lên men, chúng ta phải tiến hành đảo trộn lại đồng ủ và bổ sung thêm chế phẩm và nước đảm bảo cho đồng ủ đủ độ ẩm và tăng cường khả năng phân giải. Những ngày tiếp sau đó nhiệt độ bắt đầu tăng trở lại khoảng 53 - 55°C và diễn biến nhiệt độ cứ tiếp tục tuần hoàn theo chu trình như vậy.

Trong quá trình lên men, vi sinh vật phân giải chất hữu cơ tạo ra các chất dễ tiêu, trong đó có axit sẽ làm cho khối bã thải bị chua. Vì vậy, chúng ta cần bổ sung vôi bột trong quá trình lên men và đảo trộn để đảm bảo độ chua (pH) thích hợp cho vi sinh vật hoạt động tốt, thời gian phân giải nhanh.

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Bài tập 1: Thực hành lên men lần 1

Bài tập 2: Thực hành lên men lần 2

C. Ghi nhớ

- Tỷ lệ chế phẩm sinh học bổ sung trong 2 lần lên men
- Trình tự các bước lên men

BÀI 4: THU NHẬN SẢN PHẨM PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC THÔ

Giới thiệu:

Bài Thu nhận sản phẩm phân hữu cơ sinh học thô trang bị cho sinh viên các kỹ năng sấy, sàng... phân hữu cơ thô đúng yêu cầu kỹ thuật. Sau khi học xong bài này người học có thể thu nhận phân hữu cơ thô.

Mục tiêu:

- Liệt kê được các phương pháp làm khô phân hữu cơ sinh học;
- Kiểm tra chất lượng phân hữu cơ sinh học đúng yêu cầu kỹ thuật;
- Sử dụng phương pháp làm khô, sàng sản phẩm phân thích hợp
- Rèn luyện tính cẩn thận, nghiêm túc, kỷ luật an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị dụng cụ

1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ

1.1.1. Thiết bị

Thiết bị gồm có: Máy sấy, máy sàng (nếu có), máy đo pH, máy đo độ ẩm.

1.1.2. Vật tư

a. Dụng cụ

Dụng cụ gồm: cuốc, xẻng, cào, chổi tre...

Bảo hộ lao động

1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị

1.2.1. Mục đích kiểm tra, vệ sinh thiết bị

Việc kiểm tra, vệ sinh thiết bị có mục đích như sơ đồ hình 4.1

Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị	- Giảm thiểu các nguy cơ hư hỏng không mong muốn của các thiết bị
	- Theo dõi phát hiện kịp thời những sự cố về hệ thống thiết bị nhằm đảm bảo an toàn hệ thống.
	- Xử lý, nâng cấp và thay thế các thiết bị hư hỏng trong quá trình vận hành.
	- Giảm đến mức tối thiểu sự lây nhiễm các mối nguy vi sinh, hóa học và vật lý vào trong sản phẩm.
	- Hạn chế các bề mặt nứt, hư hỏng làm giảm hiệu quả của việc làm sạch thiết bị.
	- Duy trì độ chính xác của các thiết bị, đặc biệt các quá trình tới hạ.

Hình 4.1. Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị

1.2.2. Các bước vệ sinh thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị như máy trộn, băng tải... được vệ sinh định kỳ theo các bước:

* **Bước 1:** Tắt cầu dao điện hoặc rút phích điện

Rút phích điện ra khỏi ổ cắm hoặc đóng cầu dao điện.

Bước 1 này được thực hiện trước khi vệ sinh tất cả các thiết bị nhằm giúp đảm bảo an toàn điện khi vệ sinh.



Hình 4.2. Rút điện

* **Bước 2:** Xịt rửa thiết bị

- Xịt rửa thiết bị bằng nước sạch
- Xịt rửa bằng xà phòng hoặc hóa chất tẩy rửa để loại bỏ chất bẩn đối với các bộ phận tiếp xúc với thực phẩm
- Xịt rửa lại bằng nước sạch (tùy theo từng thiết bị mà các bước tiến hành sẽ khác nhau).



Hình 4.3. Rửa thiết bị

* **Bước 3:** Làm khô thiết bị

Dùng khăn hoặc vải lau khô lại thiết bị hoặc để khô một cách tự nhiên.

Đối với thiết bị cân, ... thì phải lau khô, sạch bằng vải.

Những dụng cụ như sọt, thau nhựa, bình tưới... cũng phải được thường xuyên vệ sinh để đảm bảo vệ sinh trong sản xuất. Tiến hành vệ sinh dụng cụ theo các bước sau:

* **Bước 1:** Pha dung dịch hóa chất để vệ sinh

- Khi sử dụng xà phòng thì cần pha loãng đến dung dịch có pH = 6 ÷ 8 để vệ sinh.

* **Bước 2:** Rửa dụng cụ bằng nước

Tráng qua dụng cụ bằng nước để loại bớt chất bẩn bám trên đó

* **Bước 3:** Rửa dụng cụ bằng dung dịch tẩy rửa

Nếu sử dụng trực tiếp nước rửa chén thì cho nước rửa vào miếng rửa, sau đó rửa các dụng cụ bằng nước rửa chén hoặc xà phòng để loại bỏ chất bẩn

* **Bước 4:** Tráng lại bằng nước sạch

Rửa lại dụng cụ bằng nước cho sạch hóa chất dưới vòi nước chảy

* **Bước 5:** Làm khô dụng cụ

Sắp xếp dụng cụ sau khi rửa vào các giá/kệ và đưa ra ngoài nắng để phơi khô dụng cụ

2. Kiểm tra chất lượng phân hữu cơ sinh học

Sau thời gian lên men khoảng 50 - 60 ngày, nguyên phụ liệu đã được vi sinh vật phân giải và chuyển hóa thành mùn, chúng ta kết thúc quá trình lên men và thu nhận sản phẩm.



Hình 4.4. Khối nguyên phụ liệu sau khi lên men

*

Yêu cầu chất lượng đối với mùn sau lên men

- + Độ ẩm đạt 40 - 45%
- + Độ pH = 6,5 - 7
- + Mùn tươi xốp, có màu đen đồng đều
- * *Thu nhận phân hữu cơ sinh học*

Tiến hành đảo trộn nhằm làm tơi và đảm bảo độ đồng đều của sinh khối các chủng vi sinh vật trong khối mùn.

3. Làm khô phân hữu cơ vi sinh

3.1. Phương pháp phơi tự nhiên

Trải phân ra nền xi măng khô thành lớp mỏng, phơi phân dưới nắng trong 2 ngày đến khi độ ẩm đạt $\leq 10\%$ thì kết thúc quá trình phơi

3.2. Phương pháp sấy

Phân hữu cơ sinh học là hỗn hợp sinh khối vi sinh vật có ích và các chất hữu cơ, do đó cần phải tiến hành sấy ở nhiệt độ 45°C - 50°C để không làm chết vi sinh vật trong khối mùn.

Cách tiến hành:

- Trải phân hữu cơ lên các khay sấy, tạo một lớp dày khoảng 5cm
- Đưa các khay phân hữu cơ vào thiết bị sấy
- Khởi động bộ phận gia nhiệt không khí, quạt gió để đưa không khí nóng vào buồng sấy.
- Khi phân hữu cơ đạt độ ẩm $\leq 10\%$ thì kết thúc quá trình sấy và thu nhận sản phẩm, thường thời gian sấy khoảng 30 giờ.

4. Sàng



Hình 4.5. Sàng phân hữu cơ

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Bài tập 1: Thực hành làm khô phân hữu cơ thô bằng phương pháp phơi tự nhiên và phương pháp sấy.

Bài tập 2: Thực hành sàng phân hữu cơ thô bằng máy sàng và lưới sàng.

BÀI 5: ĐÓNG GÓI VÀ BẢO QUẢN SẢN PHẨM

Giới thiệu:

Bài Đóng gói và bảo quản sản phẩm trang bị cho sinh viên các kỹ năng lựa chọn được dụng cụ, vật tư để đóng gói và bảo quản sản phẩm; đóng gói, bảo quản sản phẩm phân hữu cơ đúng yêu cầu kỹ thuật. Sau khi học xong bài này người học có thể đóng gói, bảo quản phân hữu cơ sinh học.

Mục tiêu:

- Mô tả được phương pháp bảo quản phân hữu cơ sinh học;
- Lựa chọn được dụng cụ, vật tư để đóng gói và bảo quản sản phẩm;
- Thực hiện thao tác đóng gói đúng yêu cầu kỹ thuật và an toàn lao động;
- Rèn luyện tính cẩn thận, nghiêm túc, kỷ luật an toàn lao động.

A. Nội dung

1. Chuẩn bị dụng cụ

1.1. Lựa chọn thiết bị, dụng cụ

1.1.1. Thiết bị

Máy ghép mí, cân, máy đo độ ẩm

1.1.2. Vật tư

- Dụng cụ: Cào, xẻng, máng xúc
- Bảo hộ lao động
- Bao tời 10 kg, bao nylon dày loại 2 kg, 5 kg:

1.2. Kiểm tra và vệ sinh dụng cụ, thiết bị

1.2.1. Mục đích kiểm tra, vệ sinh thiết bị

Việc kiểm tra, vệ sinh thiết bị có mục đích như sơ đồ hình 5.1

Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị	- Giảm thiểu các nguy cơ hư hỏng không mong muốn của các thiết bị
	- Theo dõi phát hiện kịp thời những sự cố về hệ thống thiết bị nhằm đảm bảo an toàn hệ thống.
	- Xử lý, nâng cấp và thay thế các thiết bị hư hỏng trong quá trình vận hành.
	- Giảm đến mức tối thiểu sự lây nhiễm các mối nguy vi sinh, hóa học và vật lý vào trong sản phẩm.
	- Hạn chế các bề mặt nứt, hư hỏng làm giảm hiệu quả của việc làm sạch thiết bị.
	- Duy trì độ chính xác của các thiết bị, đặc biệt các quá trình tới hạ.

Hình 5.1. Mục đích kiểm tra, bảo dưỡng thiết bị

1.2.2. Các bước vệ sinh thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị như máy trộn, băng tải... được vệ sinh định kỳ theo các bước:

* ***Bước 1:*** Tắt cầu dao điện hoặc rút phích điện

Rút phích điện ra khỏi ổ cắm hoặc đóng cầu dao điện.

Bước 1 này được thực hiện trước khi vệ sinh tất cả các thiết bị nhằm giúp đảm bảo an toàn điện khi vệ sinh.



Hình 5.2. Rút điện

* ***Bước 2:*** Xịt rửa thiết bị

- Xịt rửa thiết bị bằng nước sạch
- Xịt rửa bằng xà phòng hoặc hóa chất tẩy rửa để loại bỏ chất bẩn đối với các bộ phận tiếp xúc với thực phẩm
- Xịt rửa lại bằng nước sạch (tùy theo từng thiết bị mà các bước tiến hành sẽ khác nhau).



Hình 5.3. Rửa thiết bị

* ***Bước 3:*** Làm khô thiết bị

Dùng khăn hoặc vải lau khô lại thiết bị hoặc để khô một cách tự nhiên.

Đối với thiết bị cân, ... thì phải lau khô, sạch bằng vải (hình 1.18).



Hình 5.4. Vệ sinh máy bằng cách lau khô

Những dụng cụ như sọt, thau nhựa, bình tưới... cũng phải được thường xuyên vệ sinh để đảm bảo vệ sinh trong sản xuất. Tiến hành vệ sinh dụng cụ theo các bước sau:

* ***Bước 1:*** Pha dung dịch hóa chất để vệ sinh

- Khi sử dụng xà phòng thì cần pha loãng đến dung dịch có pH = 6 ÷ 8 để vệ sinh.

* ***Bước 2:*** Rửa dụng cụ bằng nước

Tráng qua dụng cụ bằng nước để loại bỏ chất bẩn bám trên đó

* **Bước 3:** Rửa dụng cụ bằng dung dịch tẩy rửa

Nếu sử dụng trực tiếp nước rửa chén thì cho nước rửa vào miếng rửa, sau đó rửa các dụng cụ bằng nước rửa chén hoặc xà phòng để loại bỏ chất bẩn

* **Bước 4:** Tráng lại bằng nước sạch

Rửa lại dụng cụ bằng nước cho sạch hóa chất dưới vòi nước chảy

* **Bước 5:** Làm khô dụng cụ

Sắp xếp dụng cụ sau khi rửa vào các giá/kệ và đưa ra ngoài nắng để phơi khô dụng cụ

2. Đóng gói sản phẩm

2.1. Kiểm tra độ ẩm

+ Kiểm tra độ ẩm của phân hữu cơ $\leq 10\%$

+ Làm nguội phân

2.2. Cân đúng khối lượng

+ Hiệu chỉnh cân

+ Cho phân vào bao bì

+ Cân cho đúng khối lượng yêu cầu 2, 5 kg hoặc 10 kg

2.3. Hàn miệng bao

+ Hàn bao bằng máy hàn bao, đảm bảo độ kín để tránh lây nhiễm và tăng thời gian bảo quản.



Hình 5.5. Phân hữu cơ sinh học

3. Bảo quản sản phẩm

- Chuẩn bị kho bảo quản: Kho phải thoáng, khô, sạch sẽ, không có côn trùng, không có mùi lạ.

- Xếp các bao chế phẩm trên kệ, không xếp trực tiếp xuống nền.

- Thường xuyên kiểm tra nấm mốc, độ kín của bao bì.

- Không khí trong kho ẩm, nóng thì tùy theo thời tiết, mở cửa kho thông gió để giảm nhiệt độ, độ ẩm trong kho.

- Thời gian bảo quản được 6 - 12 tháng.



Hình 5.6. Kho bảo quản phân bón

B. Câu hỏi và bài tập thực hành

Bài tập 1: Thực hành đóng gói sản phẩm phân hữu cơ

Bài tập 2: Thực hành bảo quản sản phẩm phân hữu cơ

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔN HỌC

I. Vị trí, tính chất của môn học:

- *Vị trí:* Sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học trong nông nghiệp là môn học thay thế cho khóa luận tốt nghiệp trong chương trình đào tạo trình độ cao đẳng ngành Công nghệ sinh học, được bố trí vào kỳ cuối và sau các môn học và mô đun của nghề.

- *Tính chất:* Môn học này có 2 phần: phần lý thuyết học và phần thực hành, trang bị cho sinh viên các kiến thức cơ bản về: Phân bón vi sinh, phân hữu cơ sinh học, các chế phẩm vi sinh bảo vệ thực vật, chế phẩm Gibberelin, chế phẩm probiotic, các nguồn thức ăn giàu protein dùng làm thức ăn chăn nuôi; các kỹ năng về xử lý nguyên phụ liệu, phối trộn, ủ, lên men nguyên phụ liệu, thu nhận, đóng gói và bảo quản chế phẩm phân hữu cơ sinh học.

II. Mục tiêu của môn học:

- Về kiến thức:
 - + Liệt kê và phân biệt được các chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp;
 - + Trình bày được vai trò của các yếu tố sinh học trong từng chế phẩm;
 - + Trình bày được nguồn nguyên liệu, quy trình sản xuất một số chế phẩm sinh học;
 - + Giải thích được cơ chế tác động và sự đóng góp của các chế phẩm sinh học trong nông nghiệp;
 - + Xây dựng được quy trình sản xuất phân bón hữu cơ sinh học từ bã thải.
- Về kỹ năng:
 - + Nhận diện các yếu tố sinh học trong chế phẩm sinh học thông qua các hình ảnh;
 - + Chuẩn bị đúng và đầy đủ các loại dụng cụ, máy móc, thiết bị, chế phẩm vi sinh vật, nguyên phụ liệu ủ phân hữu cơ sinh học;
 - + Thực hiện được các thao tác xử lý, phối trộn, lên men hỗn hợp nguyên phụ liệu, thu nhận, đóng gói và bảo quản sản phẩm phân hữu cơ sinh học đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật.
- Về năng lực tự chủ và trách nhiệm:
 - + Có ý thức học tập chăm chỉ, nghiêm túc; thực hiện đầy đủ, đúng thời gian các nội dung của môn học;
 - + Có tinh thần hợp tác trong hoạt động nhóm; thái độ nghiêm túc, trung thực; chú ý an toàn lao động khi thực hành;

III. Tài liệu tham khảo

- [1]. Nguyễn Thị Ngọc Bình (2011), Nghiên cứu chuyển giao kỹ thuật chế biến phân hữu cơ vi sinh từ phế phụ phẩm nông nghiệp phục vụ sản xuất chè an toàn, Báo cáo tổng kết kết quả thực hiện đề tài thuộc Dự án khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc.
- [2]. Hoàng Đức Liên, Tống Ngọc Tuấn (2000), Kỹ thuật và thiết bị xử lý chất thải bảo vệ môi trường, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [3]. Nguyễn Đức Lượng (2003), Công nghệ sinh học môi trường - Tập 2: Xử lý chất thải hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

- [4]. Vũ Thúy Nga (2011), Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm vi sinh để chế biến phế thải chăn nuôi làm phân bón hữu cơ sinh học tại các nông hộ ở Quỳnh Hợp tỉnh Nghệ An, Báo cáo tổng kết kết quả thực hiện đề tài thuộc Dự án khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB, Viện Môi trường Nông nghiệp - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [5]. Lê Văn Tri (2008), Phân phức hợp hữu cơ vi sinh, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [6]. Bộ Công Thương (2015), Sổ tay một số kiến thức về phân bón vô cơ, Hà Nội.