

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I HÀ NỘI

NGUYỄN XUÂN THÀNH - LÊ VĂN HƯNG - PHẠM VĂN TOẢN

Chủ biên và hiệu đính
PGS.TS. NGUYỄN XUÂN THÀNH

Giáo trình

CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT
TRONG SẢN XUẤT NÔNG NGHIỆP VÀ
XỬ LÝ Ô NHÌỄM MÔI TRƯỜNG

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2003

LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ vi sinh vật (Microbial Technology) là một bộ phận quan trọng trong Công nghệ sinh học, là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sống của vi sinh vật, nhằm khai thác chúng tốt nhất vào quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp. Những tiến bộ của công nghệ sinh học vi sinh vật ngày càng xâm nhập sâu trong mọi lĩnh vực hoạt động của con người. Với mục tiêu làm sao cho sự phát triển của công nghệ vi sinh nói riêng và công nghệ sinh học nói chung phải thực sự phục vụ cho ấm no hạnh phúc của toàn nhân loại, nghĩa là phải ngăn chặn thảm họa chiến tranh vũ khí sinh học. Điều này phù hợp với chính sách của Đảng và Nhà nước thể hiện trong nghị quyết 18 CP ngày 11/3/1994 của Thủ tướng chính phủ về “**Phương hướng phát triển công nghệ sinh học Việt Nam đến năm 2010**”.

Giáo trình “**Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường**” được biên soạn với mục đích trang bị cho sinh viên khối Nông - Lâm nghiệp nói chung, đặc biệt là sinh viên các ngành Cây trồng, Nông hoá - Thổ nhưỡng, Bảo vệ thực vật, Làm vườn, Thuỷ nông cải tạo đất và Môi trường... những kiến thức cơ bản về hoạt động sống của vi sinh vật, tính đa dạng của chúng trong tự nhiên và mối quan hệ hữu cơ giữa vi sinh vật với cơ thể sống khác, nhằm cân bằng hệ sinh thái học, tạo ra nhiều cải cho xã hội, phát triển nền nông nghiệp sinh thái sạch, bền vững và chống ô nhiễm môi trường.

Giáo trình gồm 7 chương, được phân công biên soạn như sau:

Chương 1, 2, 3 và 7 PGS. TS. Nguyễn Xuân Thành

Lĩnh vực Công nghệ vi sinh vật rất rộng và rất đa dạng, ở đây mới chỉ đề cập được một phần của công nghệ vi sinh vật trong thâm canh cây trồng, bảo vệ thực vật và xử lý ô nhiễm môi trường.

Trong quá trình biên soạn chắc chắn không tránh khỏi thiếu sót. Rất mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp của các nhà khoa học, các bạn đồng nghiệp và các độc giả để chất lượng giáo trình ngày càng cao hơn.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn.

Tập thể tác giả

Chương một

LỊCH SỬ VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT TRONG NÔNG NGHIỆP

I . KHÁI NIỆM CHUNG

1. Thuật ngữ

* **Công nghệ sinh học** là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của các tác nhân sinh học (ở mức độ cơ thể, tế bào hoặc dưới tế bào) dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều bộ môn khoa học, phục vụ cho việc gia tăng của cải vật chất của xã hội và bảo vệ lợi ích của con người.

Công nghệ sinh học là một lĩnh vực khoa học công nghệ rất rộng, có thể chia công nghệ sinh học thành các ngành sau:

+ **Công nghệ vi sinh vật**: Là ngành công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kỳ diệu của cơ thể vi sinh vật. Nhiệm vụ của công nghệ vi sinh là tạo ra được điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất, phục vụ cho việc làm tăng của cải vật chất của xã hội, đáp ứng nhu cầu cuộc sống của con người và cân bằng sinh thái môi trường.

+ **Công nghệ tế bào**: Các tế bào động, thực vật với bộ máy di truyền đặc trưng cho từng loài giống được tạo điều kiện phát triển trong các môi trường xác định và an toàn. Kỹ thuật nuôi cấy mô được coi là kỹ thuật chủ yếu của công nghệ tế bào.

+ **Công nghệ gen**: Là ngành công nghệ sử dụng các phương pháp thực nghiệm ứng dụng các thành tựu của sinh học phân tử, di truyền học phân tử để tạo nên các tổ hợp tính trạng di truyền mong muốn ở một loài sinh vật. Từ đó giúp điều khiển theo định hướng tính di truyền của sinh vật. **Công nghệ gen được coi là mũi nhọn của công nghệ sinh học, là chìa khóa để giúp mở ra những ứng dụng mới trong công nghệ vi sinh vật.**

2. Nội dung và yêu cầu của môn học

+ Nắm được nguyên lý cơ bản của công nghệ vi sinh vật, về bản chất của từng loại chế phẩm vi sinh vật, quy trình công nghệ, hiệu quả tác dụng và cách sử dụng của từng loại chế phẩm dùng trong lĩnh vực nông nghiệp và xử lý phế thải nông, công nghiệp chống ô nhiễm môi trường.

+ Định hướng trong nghiên cứu về các lĩnh vực của công nghệ vi sinh vật để tạo ra nhiều loại chế phẩm vi sinh vật hữu ích ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp và phục vụ đắc lực cho hoạt động sống của con người.

+ Tuyên truyền và hướng dẫn người dân sử dụng các loại chế phẩm vi sinh vật, nhằm tạo ra nhiều cải vật chất và bảo vệ môi trường sinh thái xanh sạch, phát triển nền nông nghiệp bền vững.

II. LỊCH SỬ CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CHẾ PHẨM VI SINH VẬT

Lịch sử phát triển của công nghệ sinh học (CNSH) đi từ sinh học mô tả đến sinh học thực nghiệm, những bước tiến bộ của khoa học về sự sống gắn liền với sự tiến bộ của vật lý, hoá học, cơ học và cả toán học. Sự gắn bó ấy trước hết là do việc đưa vào ngành sinh học các phương pháp nghiên cứu mới, các thiết bị, công cụ có khả năng giúp con người ngày càng đi những bước sâu hơn vào thế giới vô cùng của sự sống. Các phương pháp hóa học giúp chúng ta tìm hiểu thành phần của cơ thể và vai trò của các đại phân tử. Kính hiển vi điện tử giúp chúng ta nhìn thấy và

chụp ảnh các cấu trúc vi mô của tế bào, và gần đây còn chụp được cả phân tử protein đang hình thành với sự tham gia của các phân tử ARN thông tin trên ribosome. Ảnh chụp chứng minh cho các giả thuyết trước đó và đến nay về cơ bản các quá trình quan trọng nhất của sự sống như di truyền, sinh trưởng phát triển, quang hợp, hô hấp... đều đã được mô tả, lý giải chi tiết ở mức độ phân tử trong hầu hết các sách giáo khoa.

Tất cả mọi tích luỹ về lượng sẽ dẫn đến các bước nhảy vọt về chất. Thập niên 1980 - 1990 và các năm sau đó đang chứng kiến một sự kiện nhảy vọt về chất: đó là sự ra đời và bùng nổ của CNSH hay được gọi là **Cuộc cách mạng CNSH**. Trong nông nghiệp còn gọi là “**Cuộc cách mạng xanh lần thứ hai**”.

CNSH không phải là một môn khoa học như toán, lý, hoá, sinh học phân tử,... mà là một phạm trù sản xuất. Bản thân **Công nghệ gen** không phải là CNSH, mà chỉ là một thành phần chủ chốt và là cơ sở để giúp cho sự tiến bộ nhanh chóng của CNSH.

Các tác nhân dưới tế bào như enzyme cũng có thể tham gia vào quá trình CNSH, nó là một nhánh quan trọng của CNSH. Nông nghiệp và công nghiệp truyền thống không phải là CNSH, vì không sử dụng tổng hợp các thành tựu hiện đại của nhiều bộ môn khoa học, nhưng CNSH có thể đóng góp rất lớn vào nông nghiệp và công nghiệp chế biến để đưa hai ngành sản xuất truyền thống này vào vị trí mới.

CNSH không chỉ tạo ra thêm của cải vật chất, mà còn hướng vào việc bảo vệ và tăng chất lượng cuộc sống con người.

Lịch sử phát triển của vi sinh vật có thể chia ra 3 giai đoạn:

a) Giai đoạn trước khi phát hiện ra thế giới vi sinh vật

Từ xa xưa, năm 372 - 287 trước Công nguyên, nhà triết học cổ Hy Lạp (theo Phrastes) trong tập “Những quan sát về cây cối” đã coi cây họ đậu như một nguồn bồi bổ lại sức lực cho đất. Nhận xét này đã được những người cổ La Mã quan tâm vào những năm 30 trước công nguyên. Họ đã đề nghị luân canh giữa cây hoa thảo với cây họ đậu.

Trước thế kỷ 15, tất cả những sự kiện xảy ra trong tự nhiên và trong cuộc sống con người đều được cho là "do Chúa trời định sẵn hay ma quỷ ám hình". Nhưng con người khi đó cũng đã biết áp dụng một số quy luật tất yếu của thiên nhiên vào trong cuộc sống, như: ủ men nấu rượu, xen canh hoặc luân canh giữa cây hoa thảo với cây họ đậu... Họ không có khái niệm về bản chất của các công nghệ, mà hoàn toàn làm theo kinh nghiệm và cảm tính. Tuy nhiên, Tổ tiên của chúng ta đã rất thành thạo trong việc sử dụng các phương pháp vi sinh vật để chế biến thực phẩm.

b) Giai đoạn phát hiện ra thế giới vi sinh vật

Thế kỷ 17, nhà bác học nổi tiếng người Hà Lan - An Tôn Van Lơ Ven Húc (1632 -1723) đã chế tạo được loại dụng cụ bằng nhiều lớp kính ghép lại với nhau có độ phóng đại 160 lần, đó là kính hiển vi nguyên thuỷ. Bằng loại dụng cụ này An Tôn Van Lơ Ven Húc đã phát hiện ra một thế giới mới đó là thế giới huyền ảo của các loài vi sinh vật. Ông không chỉ là người đầu tiên phát hiện ra thế giới vi sinh vật, mà còn có rất nhiều công trình khoa học cơ bản được ông viết trong tuyển tập “Những bí ẩn của thiên nhiên” năm 1695.

Đầu thế kỷ 19, nhiều công trình khoa học ra đời trong đó phải kể đến các công trình nghiên cứu của nhà bác học nổi tiếng người Pháp - Pasteur (1822 - 1895), tiếp đó là Ivanopkii (1864), Helrigell và Uyn Fac (1886), Vinagratxkii, BeyJerinh, Kôk...Những công trình nghiên cứu của họ là cơ sở cho sự phát triển của công nghệ vi sinh, nhờ đó một loạt các loại chế phẩm vi sinh vật ra đời,... Pasteur đã chỉ ra rằng vi sinh vật đóng vai trò quyết định trong quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu của Pasteur là cơ sở cho sự phát triển của công nghiệp lên men và sản xuất dung môi hữu cơ như: axeton (acetone), ethanol, butanol, izopropanol...

c) Giai đoạn sản xuất và ứng dụng công nghệ vi sinh vật

Cuối thế kỷ 19 đầu thế kỷ 20 Pasteur đã chế thành công Vaccine phòng bệnh dại (1885); năm 1886 Hellrigel và Uyn Fac đã tìm ra cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử; năm 1895 - 1900 tại Anh, Mỹ, Ba Lan và Nga bắt đầu sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ phân tử; năm 1907 ở Mỹ người ta gọi chế phẩm vi sinh vật này là **những chỉ nitơ**; năm 1900 - 1914 nhiều nước trên thế giới triển khai sản xuất chế phẩm vi sinh vật: Canada, Tân Tây Lan, Áo. Theo Fret và cộng sự, thì trong thời gian này có 10 nhà máy xí nghiệp sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ phân tử, trong đó có 9 xí nghiệp ở châu Âu và một xí nghiệp ở Tân Tây Lan. Từ đó nhiều công trình nghiên cứu được công bố. Từ năm 1964 vấn đề cố định nitơ phân tử được coi là một trong hai vấn đề quan trọng nhất của Chương trình sinh học quốc tế (IBP) Nhiều nhà khoa học đã ví "**Mỗi nốt sần ở rễ cây họ đậu là một nhà máy sản xuất phân đạm tí hon**".

Nhờ có Chương trình trên nhiều loại chế phẩm vi sinh vật được ra đời, được áp dụng trong nhiều lĩnh vực nông nghiệp như: Chế phẩm vi sinh vật đồng hoá nitơ phân tử; Chế phẩm vi sinh vật đa chức năng; Chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật; Vaccine phòng chống các loại bệnh cho người, gia súc gia cầm; Chế phẩm vi sinh vật xử lý ô nhiễm môi trường...

Ở Việt Nam, nghiên cứu về chế phẩm vi sinh vật được tiến hành từ những năm đầu của thập kỷ 60 đến sau những năm 80 mới được đưa vào các chương trình khoa học cấp Nhà nước như: "Sinh học phục vụ nông nghiệp" giai đoạn 1982-1990, Chương trình "Công nghệ sinh học" KC.08 giai đoạn 1991-1995, Chương trình "Công nghệ sinh học phục vụ phát triển nông, lâm nghiệp bền vững, bảo vệ môi trường và sức khỏe con người" KHCN.02 giai đoạn 1996-2000 và chương trình "Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ sinh học" giai đoạn sau 2001. Ngoài các chương trình Quốc gia nhiều Bộ, Ngành cũng triển khai nhiều đề tài, dự án về vấn đề này.

III. ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

1. Trong lĩnh vực y tế

Tình hình sức khoẻ của nhân loại hiện đang ở trong tình trạng đáng lo ngại. Hầu như lúc nào cũng có khoảng 1/3 dân số toàn cầu ở trạng thái bất ổn. Công nghệ vi sinh đã đóng góp trong việc tìm kiếm nhiều loại dược phẩm quan trọng, chẩn đoán và điều trị nhiều loại bệnh hiểm nghèo cho con người, gia súc gia cầm.

+ **Vaccine**: Trong quá trình tìm kiếm các biện pháp, thuốc phòng và trị các loại bệnh truyền nhiễm công nghệ vi sinh đã tạo ra vaccine, nhất là vaccine thế hệ mới. Vaccine thế hệ mới có những ưu điểm là: Rất an toàn cho người sử dụng vì không chế từ các vi sinh vật gây bệnh, giá thành hạ vì không nuôi cấy virus trên phôi thai gà hay các tổ chức mô động vật vốn rất phức tạp và tốn kém.

- Vaccine ribosome: Cấu tạo từ ribosome của từng loại vi khuẩn gây bệnh (thương hàn, tả, dịch hạch..), ưu điểm của loại vaccine này là ít độc và có tính miễn dịch cao.

- Vaccine các mảnh của virus: Là vaccine chế tạo từ glycoprotein của vỏ virus gây bệnh như virus cúm...

- Vaccine kỹ thuật gen: Là vaccine chế tạo từ vi khuẩn hay nấm men tái tổ hợp có mang gen mã hóa việc tổng hợp protein kháng nguyên của một virus hay vi khuẩn gây bệnh nào đó.

+ **Insulin**: Việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp ngày càng là một thành công rực rỡ của công nghệ gen. Insulin là một protein được tuyển tụy tiết ra nhằm điều hòa lượng đường trong máu. Thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết quá trình trao đổi chất ở cơ thể dẫn đến tích nhiều đường trong nước tiểu. Để điều trị bệnh này người bệnh phải tiêm insulin. Loại insulin chế từ tuyển tụy của gia súc hay được tổng hợp insulin bằng con đường hóa học. Quá trình tổng hợp rất phức tạp, rất tốn kém.

Năm 1978, H. Boger đã chế insulin thông qua kỹ thuật di truyền trên vi khuẩn *Escherichia coli*, cụ thể người ta đã chuyển gen chi phối tính trạng tạo insulin của người sang cho *Escherichia coli*. Với *Escherichia coli* đã tái tổ hợp gen này, qua nuôi cấy trong nồi lên men có dung tích 1000 lít, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 gam insulin tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8.000 - 10.000 con bò.

+ **Interferon:** Interferon có bản chất protein, là chất giúp cho cơ thể chống lại được nhiều loại bệnh. Để có được interferon người ta phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém. Cũng như insulin, người ta chế interferon thông qua con đường vi sinh vật. Năm 1980, Gilbert đã thành công trong việc chế interferon từ *Escherichia coli*, năm 1981 họ thu nhận interferon từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* cho lượng tăng gấp 10.000 lần so với ở tế bào *Escherichia coli*.

+ **Kích tố sinh trưởng HGH (Human growth hormone)**

HGH được tuyển yên tạo nên, thông thường muốn chế được HGH người ta phải trích từ tuyển yên tử thi, mỗi tử thi cho 4- 6mg HGH, theo tính toán muốn chữa khỏi cho một người lùn phải cần 100 - 150 tử thi.

Năm 1983, sự thành công của công nghệ vi sinh đã giúp con người chế được HGH từ vi sinh vật. Cứ 1 lít dịch lên men *Escherichia coli* thu được lượng HGH tương ứng với 60 tử thi.

+ **Chất kháng sinh**

Kháng sinh chế từ vi sinh vật được con người đầu tư sản xuất từ lâu. Đến nay người ta đã tìm thấy có tới 2500 loại thuốc kháng sinh với cấu trúc phân tử đa dạng trong số đó chủ yếu có nguồn gốc từ vi sinh vật.

2. Trong lĩnh vực nông nghiệp

+ Cải tạo giống cây trồng: Thông qua kỹ thuật di truyền với sự hỗ trợ của vi sinh vật, con người đã tạo ra được giống cây trồng có nhiều tính ưu việt đó là cho năng suất cao, chất lượng nông sản tốt, sức đề kháng sâu bệnh cao ...

+ Sản xuất phân bón vi sinh vật: Phân bón vi sinh vật là sản phẩm chứa một hay nhiều loài vi sinh vật sống đã được tuyển chọn có mật độ đảm bảo các tiêu chuẩn đã ban hành có tác dụng tạo ra các chất dinh dưỡng hoặc các hoạt chất sinh học có tác dụng nâng cao năng suất, chất lượng nông sản hoặc cải tạo đất. Các loại phân bón vi sinh vật có thể kể đến là phân vi sinh vật cố định nitơ - đậm sinh học (Nitragin, Azotobacterin, Azospirillum), phân vi sinh vật phân giải hợp chất phospho khó tan - phân lân vi sinh (Photphobacterin), chế phẩm nấm rễ, chế phẩm tảo lam...

+ Sản xuất phân hữu cơ sinh học, một loại sản phẩm được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học của chúng được chuyển hóa thành mùn.

+ Sản xuất thức ăn chăn nuôi: Một loạt vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các hợp chất cacbon hữu cơ thành protein và các acid amin, vitamin. Có thể lợi dụng khả năng này của vi sinh vật để sản xuất các loại protein đậm đặc làm thức ăn chăn nuôi. Một số vi sinh vật khác có khả năng sản sinh các Probiotic có tác dụng điều hòa hệ thống vi sinh vật trong đường tiêu hóa và người ta đã lợi dụng đặc tính này của vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm probiotic làm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi.

+ Sản xuất chất kích thích sinh trưởng Gibberellin, Aucin từ vi sinh vật.

+ Sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật: Bt., Biospor, Enterobacterin, Bathurin,...

2. Trong lĩnh vực công nghiệp

+ Sản xuất cồn làm nguồn năng lượng thay xăng dầu chạy xe các loại: Công nghệ vi sinh lên men nguyên liệu rẻ tiền như rỉ đường để sản xuất cồn chạy xe thay xăng dầu. Năm 1985 ở Brazil đã sản xuất 1 tỷ lít cồn/năm dùng để chạy xe hơi.

+ Tạo khí sinh học (Biogas): Thường Biogas chứa khoảng 60 - 80% khí methane (CH_4) được sinh ra trong quá trình lên men các phế thải hữu cơ. Nguyên lý của quá trình này là lên men yếm khí của nhóm vi sinh vật yếm khí chịu nhiệt. Trong quá trình phân huỷ chuyển hóa các hợp chất hữu cơ người ta thu được biogas, phần cặn bã còn lại làm phân bón cho cây trồng.

+ Bảo vệ môi trường: Công nghệ vi sinh đã tham gia tích cực trong vấn đề xử lý phế thải công nông nghiệp, rác thải sinh hoạt, nước thải làm sạch môi trường bằng công nghệ vi sinh vật hảo khí, bán hảo khí và yếm khí. Đây là vấn đề nóng hổi, cấp thiết trên toàn cầu hiện nay.

IV. VẤN ĐỀ CNSH ĐỂ PHÁT TRIỂN KINH TẾ XÃ HỘI VÀ TRIỂN VỌNG CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT TRONG THẾ KỶ 21

1. Vấn đề CNSH để phát triển kinh tế xã hội toàn cầu

Trong khoảng 50 năm sau đại chiến lần thứ 2, song song với việc hoàn thiện các quy trình CNSH truyền thống đã có từ trước, một số hướng nghiên cứu và phát triển CNSH đã hình thành và phát triển mạnh mẽ nhờ một loạt những phát minh quan trọng trong ngành sinh học nói chung và sinh học phân tử nói riêng, đó là lần đầu tiên xác định được cấu trúc của protein, xây dựng mô hình cấu trúc đường xoắn kép của phân tử ADN (Watson và Krick, 1953).

* Một số hướng phát triển công nghệ sinh học

Lĩnh vực	Ứng dụng
Nông nghiệp	Tạo chủng vi sinh vật mới để làm giống sản xuất chế phẩm vi sinh vật, áp dụng trong lĩnh vực nông nghiệp (trồng trọt, chăn nuôi, thuỷ hải sản, thuỷ nông cải tạo đất, phân bón, bảo vệ thực vật ...).
Sản xuất hàng hoá	Sản xuất acid hữu cơ (citric acid, itaconic acid, acetic acid...), sử dụng enzyme làm chất tẩy rửa...
Năng lượng	Gia tăng phạm vi sử dụng biogas, xây dựng các dự án sản xuất ethanol dùng làm nhiên liệu.
Kiểm soát môi trường	Hoàn thiện các phương pháp kiểm soát và dự đoán tình trạng môi trường. Tuyển chọn chủng vi sinh vật để xử lý phế thải (rắn + lỏng) làm sạch môi trường.
Công nghiệp thực phẩm	Xây dựng và hoàn thiện các phương pháp chế biến và bảo quản lương thực, thực phẩm mới. Sản xuất chất bổ sung vào thực phẩm, sử dụng protein đơn bào và enzyme trong công nghệ chế biến thực phẩm.
Vật liệu	Hoàn thiện quy trình tuyển khoáng, tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng khai thác kim loại, đá quý hiếm và hoàn thiện các phương pháp kiểm soát quá trình phá huỷ sinh học.
Y tế	Dùng enzyme tạo các bộ cảm biến sinh học trong các thiết bị phân tích y tế. Sử dụng enzyme và tế bào vi sinh vật trong sản xuất các loại thuốc. Sử dụng enzyme và một số chủng vi sinh vật để chẩn đoán và chữa trị bệnh.

2. Triển vọng của CNSH và công nghệ vi sinh vật trong thế kỷ 21

Hàng năm thế giới sản xuất khoảng 150.000 tấn glutamate-Na làm bột ngọt và 15.000 tấn lysine làm chất bổ sung vào thực phẩm và thức ăn gia súc với tổng trị giá chừng 1,5 tỷ USD, chủ yếu được sản xuất tại Nhật Bản.

Người ta sử dụng khả năng biến đổi sinh khối thực vật có hàm lượng protein cao của vi sinh vật để sản xuất SPC (Single Protein Cell) - Protein đơn. Ở Đức đã hoạt động quy trình công nghệ nuôi nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea* và *Candida utilis* để sản xuất thực phẩm giàu protein cho người. Nhiều công ty dầu khí và hoá chất đã tiến hành áp dụng quy trình công nghệ sản xuất SPC từ dầu mỏ, khí methane, rượu methanol và tinh bột. Ở Anh, hàng ICI sử dụng *Methylophilus methylotrophus* trên môi trường methanol sản xuất được khoảng 70.000 tấn/năm. SPC có tên thương phẩm là Pruteen. Ở Liên Xô cũ, hàng năm từ nguồn nguyên liệu carbohydrate và phế liệu nông nghiệp đã sản xuất hơn 1 tỷ tấn SPC dùng trong chăn nuôi. Trong tương lai, hướng nghiên cứu sử dụng AND tái tổ hợp làm gia tăng khả năng đồng hóa đạm của vi sinh vật sản xuất SPC sẽ có nhiều hứa hẹn.

Một số khía cạnh kinh tế của CNSH và CNVS

Chỉ tính riêng ngành sản xuất bia rượu của Anh hàng năm có doanh thu khoảng 15 tỷ USD, hoặc trên thế giới hàng năm sản xuất khoảng 3 tỷ USD thuốc kháng sinh, 1,5 tỷ USD amino acid, hơn 500 triệu USD các chế phẩm. Theo đánh giá chưa đầy đủ, thì năm 2000 tổng doanh thu từ CNSH trên 100 tỷ USD.

Ở Việt Nam, CNSH đã mang lại hàng trăm tỷ đồng/năm. Mặc dù CNSH và CNVS ở nước ta còn nhiều hạn chế, nhưng những năm qua đã thực sự góp phần thúc đẩy phát triển nền nông nghiệp nước nhà theo hướng công nghiệp hoá hiện đại hoá nông nghiệp nông thôn. Phương hướng phát triển kinh tế xã hội ở nước ta đến năm 2010 đã được Đảng và Nhà nước chỉ rõ đó là: “**Cách mạng tin học và cách mạng CNSH giữ vai trò động lực**”.

3. Vai trò của chế phẩm vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp

- Chế phẩm vi sinh vật không gây hại đến sức khỏe của con người, vật nuôi và cây trồng. Không gây ô nhiễm môi trường sinh thái.
 - Chế phẩm vi sinh vật có tác dụng cân bằng hệ vi sinh vật trong môi trường sinh thái.
 - Chế phẩm vi sinh vật không làm chai đất, mà làm tăng độ phì nhiêu của đất.
- Chế phẩm vi sinh vật đồng hóa các chất dinh dưỡng cho cây trồng, góp phần làm tăng năng suất và chất lượng nông sản phẩm.
 - Chế phẩm vi sinh vật có tác dụng tiêu diệt sâu hại và côn trùng gây hại.
 - Chế phẩm vi sinh vật có tác dụng làm tăng sức đề kháng của cây trồng.
- Chế phẩm vi sinh vật phân huỷ, chuyển hoá các chất hữu cơ bền vững, các phế thải sinh hoạt, phế thải nông công nghiệp làm sạch môi trường.

Chương hai

CƠ SỞ HÓA SINH VÀ DI TRUYỀN HỌC CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT

I. PHÂN LOẠI CÁC SẢN PHẨM

Các chất được sản xuất bằng con đường lên men nhờ vi sinh vật rất đa dạng. Để tiện cho nghiên cứu và ứng dụng thì phải tiến hành phân loại sản phẩm lên men công nghiệp dựa vào tiêu chuẩn sinh lý sinh hóa trao đổi chất của vi sinh vật. Chính vì vậy công tác phân loại sản phẩm là việc làm cần thiết của công nghệ vi sinh.

1. Sinh khối (vật chất tế bào)

Việc tổng hợp sinh khối tế bào là quá trình thực hiện để sản xuất protein vi sinh vật. Quá trình này thực chất là quá trình sinh trưởng của vi sinh vật.

Quá trình này đã phát triển những cơ chế điều hòa trao đổi chất đảm bảo một phần lớn đến mức cho phép các chất dinh dưỡng cung cấp sẽ được sử dụng vào quá trình tổng hợp các thành phần của tế bào.

2. Sản phẩm trao đổi chất

+ *Sản phẩm của quá trình lên men*: Lên men là một trong những con đường của quá trình trao đổi năng lượng. Ngoài việc cung cấp năng lượng cho tế bào vi sinh vật, còn cung cấp các sản phẩm có giá trị cho con người như: ethanol, acid acetic, acid lactic, acid propionic, khí methane, các cơ chất giàu hữu cơ khác...

+ *Các chất trao đổi bậc 1*: Là những viên gạch cấu trúc nền vật chất của tế bào, trong số các cao phân tử sinh học thì đây là những chất có phân tử lượng thấp: các amino acid, nucleozide, nucleotide, đường. Ngoài ra, các chất trao đổi bậc 1 còn là sản phẩm của quá trình trao đổi chất trung gian như acid hữu cơ của chu trình Tricarboxylic.

+ *Các chất trao đổi bậc 2*: Là những chất trao đổi có phân tử lượng thấp, không gặp trong cơ thể vi sinh vật. Những chất này không có chức năng chung trong trao đổi chất của tế bào như: các chất kháng sinh, các độc tố, các chất có hoạt chất kích thích sinh trưởng như gibberellin.

+ *Enzyme*: Là những protein xúc tác có sự biến đổi các chất của tế bào. Mỗi tế bào vi sinh vật có khoảng 1000 loại enzyme khác nhau với số phân tử lên đến 10^6 , gồm enzyme nội và enzyme ngoại bào như: amylase, protease, cellulase... trong đó enzyme nội bào chiếm đa số.

3. Các sản phẩm của sự chuyển hóa chất

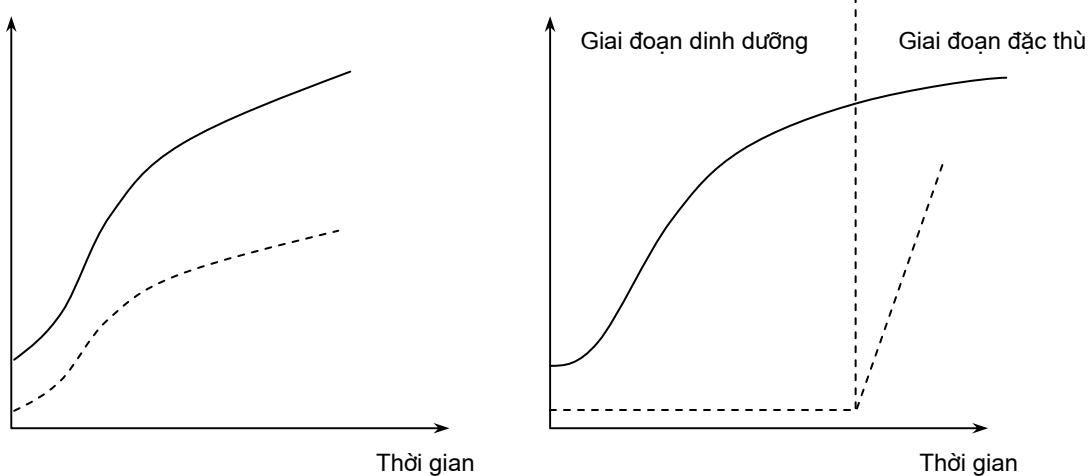
Tiền sản phẩm $\xrightarrow{\text{tế bào vi sinh vật}}$ Sản phẩm

Tế bào vi sinh vật thông qua hệ enzyme của mình đóng vai trò xúc tác cho các phản ứng chuyển hóa các chất. Về mặt lý thuyết những phản ứng này có thể xảy ra nhờ những xúc tác hóa học nào đó. Tuy nhiên các quá trình này đôi khi không thực hiện được ở điều kiện bình thường, mà chỉ thực hiện ở điều kiện đặc biệt (nhiệt độ, áp suất, độ ẩm) thích hợp cho quá trình chuyển hóa, trong trường hợp này người ta chuyển sang sản xuất bằng công nghệ vi sinh vật. Ví dụ từ ethanol chuyển đến acetic acid phải dùng chủng *Acetobacter*, *Acetomonas* để chuyển hóa.

II. MỐI QUAN HỆ GIỮA SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT VÀ SỰ TẠO THÀNH SẢN PHẨM

Trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, quá trình sinh trưởng của vi sinh vật trải qua 3 pha, được biểu diễn bằng đồ thị (hình 1).

Sinh trưởng và tạo sản phẩm



Hình 1: Mối quan hệ giữa sinh trưởng và tạo thành sản phẩm của vi sinh vật

Trong điều kiện nuôi cấy toàn bộ quá trình sinh trưởng của vi sinh vật gắn liền với sự thay đổi theo thời gian. Trong môi trường, các chất dinh dưỡng theo thời gian sẽ giảm, và tương ứng số lượng tế bào vi sinh vật sẽ tăng lên, đồng thời hoạt tính trao đổi chất của tế bào cũng thay đổi. Lúc này các sản phẩm trao đổi chất có thể có vai trò khác nhau đối với tế bào.

Có thể tạm chia sản phẩm ra thành 2 loại sau:

+ Loại sản phẩm mà sự hình thành của nó gắn liền với sinh trưởng của vi sinh vật, như các chất trao đổi bậc 1: Các enzyme, các sản phẩm của quá trình lên men. Sự tổng hợp loại sản phẩm này xảy ra trong thời gian sinh trưởng và còn có thể tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc.

+ Loại sản phẩm mà sự hình thành của chúng không cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật, như các chất trao đổi bậc 2. Sự tổng hợp các chất này xảy ra sau khi sinh trưởng đã kết thúc (ở vào pha tĩnh. Giáo trình vi sinh vật đại cương). Sự tạo thành sản phẩm trong giai đoạn này được gọi là sản xuất hay giai đoạn đặc thù, hoặc giai đoạn dinh dưỡng.

Tuy vậy cũng có nhiều sản phẩm mà sự hình thành của nó không nằm trong hai giai đoạn trên, tạm gọi là dạng trung gian, ví dụ sự hình thành amino acid, mặc dù sản phẩm này được hình thành ở giai đoạn dinh dưỡng, nhưng nó vẫn còn tiếp diễn sau khi sinh trưởng đã kết thúc, vì quá trình tổng hợp các amino acid tiếp diễn trên cơ sở của một sai hỏng về điều hòa trao đổi chất tổng hợp. Từ đó cho thấy, trong công nghệ lên men đòi hỏi nhà sản xuất phải biết sản phẩm của mình cần thu được sinh ra ở giai đoạn nào của quá trình nuôi cấy, đồng thời phải biết tìm mọi biện pháp tối ưu hóa quá trình nuôi cấy để cho hiệu suất tạo sản phẩm cao nhất. Nghĩa là tìm ra điều kiện nuôi cấy đảm bảo cho vi sinh vật đạt trạng thái sinh trưởng, phát triển tối ưu.

Trong công nghệ lên men, đích cuối cùng cần phải đạt là: từ cơ chất ban đầu với một dung tích nồi lên men nhỏ nhất, trong thời gian ngắn, có thể thu hoạch sản phẩm mong muốn với năng suất cao nhất. Như vậy mới giảm được giá thành. Một quy trình công nghệ như vậy mới là hoàn thiện.

III. NHỮNG NGUYÊN TẮC ĐIỀU HÒA TRAO ĐỔI CHẤT

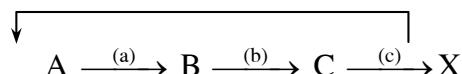
Trong hoạt động sống của mình, vi sinh vật tạo các sản phẩm trao đổi chất và các thành phần cấu tạo nên tế bào chỉ ở mức cần thiết cho sinh trưởng, phát triển, sinh sản duy trì loài. Có nghĩa là trong tự nhiên không có sự sinh sản dư thừa các sản phẩm trao đổi chất bậc 1, 2.

1. Điều hòa hoạt tính enzyme nhờ sự kìm hãm do liên kết ngược

Người ta đã nhận thấy: sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp một chất có khả năng gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp của chính nó.

Sản phẩm cuối cùng dù được vi sinh vật tổng hợp nên hay thu nhận từ môi trường ngoài, khi ở nồng độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật sẽ ảnh hưởng đến enzyme đầu tiên trong chuỗi sinh tổng hợp.

Sơ đồ chuỗi các phản ứng sinh hóa xảy ra để tổng hợp chất (X):



Enzyme đầu tiên (a) là một enzyme dị lập thể, nó có đặc điểm cấu trúc hình không gian khi có mặt sản phẩm cuối cùng nhằm giảm bớt hoạt tính xúc tác của mình. Ở enzyme này, ngoài vị trí gắn với cơ chất A (trung tâm xúc tác), nó còn có một hay nhiều vị trí gắn với sản phẩm cuối cùng X gọi là trung tâm dị lập thể. Trung tâm xúc tác và trung tâm dị lập thể tách biệt nhau về không gian và cấu trúc. Trạng thái hoạt động của enzyme này được đặc trưng ở chỗ nó có khả năng gắn với cơ chất A và nếu bên cạnh cơ chất A còn có sự hiện diện của X ở mức độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật, thì sẽ xảy ra sự bao vây của trung tâm dị lập thể, làm cho trung tâm xúc tác bị biến đổi cấu hình không gian đến mức khiến cho enzyme (a) không thể gắn được với cơ chất A, mà chỉ gắn với X. Như vậy enzyme (a) sẽ không có hiệu lực trong việc chuyển hóa A thành B. Chuỗi sinh tổng hợp X sẽ bị gián đoạn. Khi đó X sẽ bị giảm số lượng. Sự điều hòa này ở mức độ enzyme.

2. Sự cảm ứng và ức chế quá trình tổng hợp enzyme

Trong khi nuôi cấy vi sinh vật có một chất khó đồng hóa, vi sinh vật phải tiết vào môi trường một hoặc vài enzyme tương ứng để phân huỷ cơ chất đó thành cơ chất có thể đồng hóa được. Enzyme được hình thành này được gọi là **enzyme cảm ứng**. Cơ chất kích thích quá trình này được gọi là **chất cảm ứng**.

Sự cảm ứng và ức chế quá trình tổng hợp enzyme ở vi sinh vật đã được **Học thuyết operon** của F. Jacob và J. Monod tìm ra năm 1966.

Học thuyết operon giúp làm sáng tỏ cơ chế điều hòa chương trình làm việc của bộ gen đối với quá trình tổng hợp protein - enzyme.

+ **Nhóm gen cấu trúc:** Nhóm gen này đảm bảo việc mã hóa cấu trúc của các phân tử protein - enzyme. Các gen này thường xếp liền nhau. Trong trường hợp Lac. coli, các gen cấu trúc gồm ba gen ký hiệu là A, B và C.

- Gen A mã hóa thứ tự amino acid của β-galactosidase.

- Gen B mã hóa cấu trúc của enzyme thiam thấu galactoside permease cần thiết cho quá trình vận chuyển lactose vào tế bào.

- Gen C mã hóa cấu trúc của enzyme thiogalactoseacetyltransferase.

Cả ba gen cấu trúc nói trên tạo thành một đơn vị phiên mã.

+ Gen điều khiển (Operator): Là đoạn DNA nằm kề bên nhóm gen cấu trúc, ký hiệu là O. Nhờ tác dụng gắn với chất ức chế, operator làm việc như một “công tắc” phụ trách việc “đóng mở” hoạt động của nhóm gen cấu trúc.

+ Gen khởi động (Promoter): Là DNA nằm kề phía trước operator là nơi gắn enzyme RNA polymerase, enzyme này xúc tác cho quá trình tổng hợp RNA thông tin của nhóm gen cấu trúc. Khi chất ức chế gắn vào operator thì phân tử RNA polymerase bị cản trở, không di chuyển dọc theo mạch khuôn DNA, dẫn đến các gen cấu trúc bị kìm chế và không tạo được protein cũng như enzyme tương ứng. Do vị trí và chức năng như vậy nên được gọi là gen Promoter (gen khởi động).

+ Gen điều hòa (Regulator): Gen này chịu trách nhiệm mã hóa việc tổng hợp nên một protein đặc biệt đóng vai trò chất ức chế. Thường nó chỉ được tổng hợp với một lượng không đáng kể trong tế bào (khoảng 10 - 20 phân tử/tế bào). Đặc điểm của chất ức chế là một protein biến đổi oligomer có hai tâm đặc thù. Hai tâm này làm cho chất ức chế có khả năng hoặc gắn với chất cảm ứng hoặc gắn với operator. Nếu chất ức chế có ái lực lớn với operator, thì thường gắn vào operator.

* Có thể khái quát hóa điều kiện cảm ứng như sau:

- Trên nhiệm sắc thể của tế bào phải có những gen tương ứng với các enzyme sẽ được hình thành.
- Các nguyên liệu xây dựng phân tử enzyme: các amino acid và các hợp phần của nhóm ngoại.
- Năng lượng cần thiết cho việc hình thành các liên kết.
- Chất cảm ứng.

Theo F. Jacob và Monod, thì dù có ba điều kiện trên mà không có chất cảm ứng thì enzyme cảm ứng cũng không được tạo thành. Như vậy để hình thành một enzyme cảm ứng phải hội tụ đủ bốn điều kiện: gen, nguyên liệu xây dựng, năng lượng và chất cảm ứng.

3. Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiềm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự phân giải kiềm chế

Nếu chúng ta ký hiệu X là sản phẩm cuối cùng của một chuỗi sinh tổng hợp, thì thấy rằng X có tác dụng đặc hiệu với chất ức chế (chất do gen điều hòa tổng hợp nén).

Khi môi trường có hiện tượng dư thừa X so với nhu cầu của tế bào, X sẽ gắn với chất ức chế, làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế, làm cho chất ức chế có khả năng gắn với operator (còn gọi là hoạt hóa chất ức chế). Do vậy gọi chất X là chất đồng kìm hãm. Khi chất ức chế gắn với operator sẽ làm ngừng trệ quá trình phiên mã, ức chế operon, dẫn đến enzyme không tổng hợp được, khi đó việc sản xuất X bị gián đoạn. Trong khi đó tế bào vẫn tiếp tục sử dụng chất X, khiến cho chất này bị giảm tới mức không đủ để đáp ứng nhu cầu của tế bào. Lúc ấy sẽ xảy ra quá trình giải phóng sự kiềm chế operon nói trên, vì do thiếu chất X, chất ức chế lúc này sẽ thiếu mất yếu tố hoạt động hóa học, do đó không có khả năng gắn với operator, điều này dẫn đến giải phóng operon, dẫn tới các enzyme được tổng hợp và việc sản xuất X sẽ được tiến hành trở lại. Đó là hiện tượng **giải kiềm chế**.

4. Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiềm chế dị hóa

Trong nuôi cấy vi sinh vật có nhiều nguồn cơ chất, trước hết xảy ra việc tổng hợp các enzyme xúc tác cho sự phân giải cơ chất dễ sử dụng nhất. Sự tổng hợp các enzyme xúc tác phân huỷ các cơ chất khác bị ức chế bởi sự kiềm chế dị hóa. Ví dụ: Trong môi trường nuôi cấy có hai nguồn carbohydrate là: glucose và lactose. Trước tiên vi sinh vật sẽ hình thành các enzyme phân giải

glucose. Sự cảm ứng để tổng hợp enzyme phân giải lactose β - galactosidase bị ức chế bởi sự kiềm chế dị hóa.

Cơ chế kiềm chế dị hóa đã được nghiên cứu khá chi tiết ở vi khuẩn *E. coli* với việc điều hòa tổng hợp enzyme β - galactosidase. Nếu trong trường hợp carbohydrate, glucose là nguồn cơ chất được sử dụng thích hợp nhất, vì vậy khi có mặt glucose thì nhiều enzyme khác của quá trình dị hóa cũng như trao đổi chất trung gian không được tổng hợp. Người ta gọi hiện tượng này là hiệu ứng glucose.

+ Khi môi trường không có glucose, có lactose:

Môi trường không có glucose, sẽ dẫn đến tích luỹ một lượng lớn AMP_v (adenosine monophosphate vòng). Lúc đó AMP_v sẽ phản ứng với một protein nhận ký hiệu là CAP - (catabolite activator protein). Người ta còn gọi hiện tượng này là vùng Promoter bị “chất đầy”. Chính sự chất đầy này là tiền đề cho sự hoạt động của enzyme RNA polymerase, có nghĩa là sẽ thúc đẩy sự được hoạt hóa nhờ sự “chất đầy”.

Đồng thời trong môi trường còn có mặt lactose, lactose sẽ đóng vai trò là một cơ chất cảm ứng, nó sẽ phản ứng với chất ức chế, làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế để tạo phức hệ ức chế - chất cảm ứng. Điều này khiến cho chất ức chế không gắn được với operator. Như vậy Lac-operon sẽ được giải phóng.

+ Khi môi trường có glucose, có lactose:

Trong môi trường nếu ngoài lactose còn được bổ sung glucose, thì lúc ấy hàm lượng AMP_v sẽ bị giảm đi, hậu quả là CAP không tạo được phức hệ với AMP_v, do đó không có sự “chất đầy” ở Promoter. Liên đới RNA polymerase sẽ không được mở đầu hoạt động hoặc nếu được mở cũng rất yếu. Vì vậy ngay cả khi có mặt cơ chất cảm ứng (lactose) cũng không có sự tổng hợp RNA thông tin- có nghĩa không có sự tạo thành enzyme.

+ Khi môi trường không có glucose và không có lactose:

Nếu trong môi trường không có cả hai glucose và lactose, thì chất ức chế sẽ gắn vào operator nên operon vẫn bị phong tỏa. Do đó RNA thông tin không được tổng hợp. Không có sự tổng hợp protein- enzyme.

IV. NHỮNG SAI HÓNG DI TRUYỀN CỦA ĐIỀU HÒA TRAO ĐỔI CHẤT VÀ HIỆN TƯỢNG SIÊU TỔNG HỢP

Những cơ chế điều hòa nói trên đã giúp cho cơ thể vi sinh vật đảm bảo được hoạt động sống của mình tiến hành một cách nhịp nhàng trên cơ sở tiết kiệm nguyên liệu, năng lượng một cách hợp lý.

Tuy nhiên, nếu mọi vi sinh vật đều có hoạt động sống bình thường thì không có lý do gì để quan tâm đặc biệt đến chúng. Trong hoạt động sống của vi sinh vật chúng luôn tiết ra các sản phẩm nào đó, mà những sản phẩm này lại rất cần thiết cho con người. So với nhu cầu cho hoạt động sống của vi sinh vật, những sản phẩm chúng tổng hợp được chắc chắn là dư thừa lượng lớn. Người ta nói: Những cơ thể vi sinh vật này có khả năng siêu tổng hợp một chất nào đó.

Với sự phát triển của khoa học, hiện nay con người đã tạo được rất nhiều chủng giống vi sinh vật có khả năng siêu tổng hợp các chất. Đây là kết quả của quá trình chọn lọc nhân tạo với các phương pháp gây đột biến. Những chủng đột biến này có những sai hỏng di truyền rất đáng được quan tâm.

1. Các chủng đột biến mất đi cơ chế điều hòa hoạt tính enzyme bằng sản phẩm cuối cùng

Lợi dụng cơ chế điều hòa hoạt tính enzyme bằng sản phẩm cuối cùng, người ta dùng đột biến làm hỏng trung tâm dị lập thể của enzyme (a), làm cho nó mất khả năng gắn với chất X nhưng bản thân enzyme (a) vẫn còn hoạt tính xúc tác đối với cơ chất A (xem sơ đồ chuỗi các phản ứng sinh hoá trang 14). Do vậy khi có mặt chất X sản phẩm cuối cùng với số lượng dư thừa so với nhu cầu của vi sinh vật, enzyme (a) vẫn xúc tác chuyển A thành B, dẫn đến chất X - vẫn được tiếp tục tổng hợp.

2. Các chủng đột biến có sự sai hỏng cơ chế điều hòa tổng hợp enzyme

Người ta dùng các chất gây đột biến để làm sai hỏng cơ chế điều hòa tổng hợp enzyme. Cụ thể là đụng chạm đến gen điều hòa (Regulator) - gen chi phối tạo nên chất ức chế, dẫn đến sự sai hỏng của chất ức chế hoặc thậm chí có thể phá huỷ quá trình tổng hợp chất ức chế. Hay có khi đột biến đụng chạm đến gen điều khiển (Operator) làm cho gen này mất khả năng gắn với chất ức chế. Kết quả của tác động trên là ngay cả khi một chất nào đó có nồng độ dư thừa so với nhu cầu của vi sinh vật, các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp của chúng vẫn được hình thành và các chất này vẫn được tiếp tục tổng hợp trong tế bào.

V. Ý NGHĨA CỦA KỸ THUẬT DI TRUYỀN

Để tìm được chủng vi sinh vật theo sự mong muốn, con người đã tìm cách tác động vào các quy luật điều khiển quá trình trao đổi chất của vi sinh vật.

Việc tạo nên những chủng đột biến này dựa trên cơ sở của những hiểu biết về quy luật di truyền và biến dị của vi sinh vật, dựa trên những kinh nghiệm của công tác lai tạo giống.

Những thành công của công nghệ vi sinh cho phép chúng ta chủ động tạo được các DNA tái tổ hợp trong điều kiện *in vitro*. Càng hiểu thêm về sinh học phân tử, di truyền học và công nghệ gen.

Có thể nói rằng ngày nay con người đã có thể chuyển những đoạn gen từ sinh vật này sang sinh vật khác có sự khác biệt rất lớn về di truyền, hay nói cách khác là có thể cắt bỏ hàng rào giữa các loài do tạo hóa gây dựng nên để cản trở sự giao phối khác loài, nhằm bảo tồn tính đặc trưng của loài. Tuy nhiên đây mới chỉ là bước đầu về công nghệ gen.

VI. NHỮNG HIỂU BIẾT VỀ CHUYỂN TẢI GEN

Đây là vấn đề mới và rất phức tạp, chúng ta tìm hiểu khái quát hai vấn đề sau:

- + Những cấu trúc tham gia chuyển tải gen.
- + Quá trình thuần hóa và chuyển tải gen nhờ vi sinh vật.

1. Những cấu trúc tham gia chuyển tải gen gọi là thẻ mang (vector)

Các vector chuyển hóa gen phải thoả mãn những yêu cầu tối thiểu sau:

- Là các đoạn phân tử DNA có khả năng tự sao chép tích cực trong tế bào chủ, tồn tại độc lập trong tế bào không phụ thuộc sự sao chép của bộ gen tế bào chủ.
- Có kích thước nhỏ. Càng nhỏ càng tốt, vì vector có kích thước càng nhỏ thì càng dễ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn khác và càng được sao chép nhanh, có hiệu quả.
- Có trình tự nhận biết duy nhất của các enzyme giới hạn (RE).
- Có khả năng chứa mảnh DNA ngoại lai.

- Có gen đánh dấu, tức là có khả năng biểu hiện ra bên ngoài để dễ nhận biết. Gen đánh dấu được gọi là Marker, người nghiên cứu nhận biết và dễ dàng tách tế bào có chứa gen cần chuyển tải ra khỏi quần thể vi khuẩn.

Ví dụ: Người ta thường dùng gen chi phôi tính trạng đề kháng với chất kháng sinh làm gen đánh dấu. Trong môi trường có chứa kháng sinh, thì chỉ những vi khuẩn có mang gen kháng kháng sinh mới sống sót.

Trong số các cấu trúc được sử dụng tham gia chuyển tải gen có thể kể đến plasmid, phage, cosmid, YAC..., mà phổ biến nhất là plasmid và phage.

+ **Plasmid**: Ở tế bào Prokaryote, cụ thể là vi khuẩn, qua kính hiển vi điện tử có thể quan sát được chất nhân là phân tử DNA nguyên vẹn có dạng vòng tròn hình chiếc nhẫn. Đó là nhiễm sắc thể - nơi chứa nguyên liệu di truyền của tế bào. Cùng với nhiễm sắc thể còn có cấu trúc hình nhẫn nhỏ hơn người ta gọi là plasmid. Đem tách plasmid dưới dạng tinh khiết để tìm hiểu cấu trúc và tính chất của nó, thì thấy plasmid có cấu tạo từ DNA có khả năng tự nhân đôi một cách độc lập và tồn tại một cách độc lập với bộ gen của vi khuẩn. Vì vậy người ta coi plasmid là phần tử di truyền nằm ngoài bộ máy di truyền của vi khuẩn.

Ở nhóm Eukaryote, người ta mới phát hiện ra được plasmid ở nấm men.

Người ta thấy plasmid có hàng loạt đặc điểm riêng là:

- Plasmid tham gia vào cơ chế tái tổ hợp gen nội bào.
- Plasmid có khả năng di chuyển từ một vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.
- Plasmid có khả năng vận chuyển gen.
- Plasmid có khả năng sinh sản cực nhanh và có hoạt tính mạnh.

+ **Bacteriophage (Phage hay thực khuẩn thể)**:

- Phage có kích thước cực kỳ nhỏ qua được màng lọc vi khuẩn.

- Phage thể hiện tính độc đối với vi khuẩn qua chu trình sinh sản gây độc của phage, có khả năng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, định chỉ quá trình trao đổi chất của vi khuẩn và lấy nguyên liệu từ vi khuẩn để xây dựng nên các thành phần của nó kể cả nguyên liệu di truyền. Do vậy hình thành những đoạn DNA tái tổ hợp, bao gồm các đoạn gen của phage và của vi khuẩn.

Qua thực nghiệm cho thấy, việc sử dụng phage làm thể mang có nhiều ưu điểm hơn so với plasmid, vì phage có những đặc điểm giúp sự xâm nhập vào tế bào vi khuẩn hiệu quả hơn nhiều so với sự chuyển plasmid vào vi khuẩn.

Hơn nữa ở phage, kích thước của đoạn DNA nó có thể tiếp nhận lớn hơn nhiều so với sự tiếp nhận của plasmid.

2. Quá trình thuần hóa và chuyển tải gen nhờ vi sinh vật

Thuần hóa gen là quá trình bắt gen phải làm việc theo ý muốn của con người. Quá trình này rất phức tạp, đòi hỏi có những hiểu biết sâu sắc về đặc tính của gen và kỹ thuật phân tử.

Trong kỹ thuật phân tử, thì vai trò của enzyme là quan trọng nhất. Enzyme ở đây gồm nhiều loại: nuclease, ligase, polymerase (DNA polymerase và RNA polymerase).

2.1. Các enzyme phân cắt DNA (RNA) được gọi là nuclease. Các nuclease gồm hai nhóm: endonuclease và exonuclease.

- Endonuclease là những enzyme cắt DNA ở giữa phân tử, còn exonuclease cắt từ hai đầu mút của phân tử DNA. Trong nhóm endonuclease có các enzyme giới hạn (RE - restriction

enzyme), những enzyme này được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm vì nó có đặc tính rất quý, có tính đặc hiệu rất cao, nó chỉ cắt DNA mạch kép ở những chỗ nhất định chứ không linh động.

Những điểm nhận biết của enzyme này thường có trình tự 4 - 6 cặp nucleotide đối xứng đảo ngược nhau được gọi là palindrome. Mỗi RE có trình tự nhận biết đặc trưng.

- Hiện nay người ta đã phát hiện được 500 loại RE, trong số đó có hơn 100 loại RE đã được bán trên thị trường. Mới chỉ phát hiện RE ở các nhóm sinh vật nhân sơ Prokaryote, còn ở nhóm nhân thật chưa phát hiện thấy.

Do đặc tính cơ bản của các RE là có khả năng nhận biết và cắt ở một trình tự xác định trên phân tử DNA, mà người ta chia RE ra thành các loại sau:

Loại I: Khi enzyme nhận biết được trình tự, nó sẽ di chuyển trên phân tử DNA đến cách đó khoảng 1000 - 5000 nucleotide và cắt.

Loại II: Enzyme nhận biết được trình tự và cắt ngay tại vị trí đó.

Loại III: Enzyme nhận biết một trình tự và cắt DNA ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotide.

Trong số 3 loại RE trên, thì loại II được quan tâm và sử dụng nhiều trong lĩnh vực phân tử.

2.2. Các enzyme gắp

Trong nhóm này người ta sử dụng phổ biến các enzyme xúc tác sự hình thành liên kết nối 2 đoạn DNA (DNA ligase) hay RNA (RNA ligase).

+ Trong các ligase thường sử dụng phải kể đến:

- E. coli DNA ligase: Enzyme được trích ly từ trực khuẩn *E. coli* và xúc tác phản ứng nối hai trình tự DNA có đầu so le.

- *T₄* DNA ligase: Có nguồn gốc từ phage *T₄* xâm nhiễm *E. coli*, enzyme này có cùng chức năng với ligase trích từ *E. coli* nói trên, nhưng đặc biệt còn có khả năng nối hai trình tự DNA bằng, nên ligase được chuộng nhất trong kỹ thuật tạo chủng.

- *T₄* RNA ligase: Enzyme được trích ly từ phage *T₄* xâm nhiễm *E. coli*, xúc tác quá trình nối hai trình tự RNA bằng liên kết phosphodiester.

+ Quá trình thuần hóa và chuyển gen có thể chia thành 3 bước sau:

- Thu nhận gen cần chuyển: Có thể thu nhận gen trực tiếp từ bộ gen bằng cách lắc cơ học hay cắt bằng RE, hoặc tổng hợp hóa học theo trình tự nucleotide đã biết của gen hoặc sinh tổng hợp gen từ RNA_m của nó nhờ enzyme phiên mã ngược reverse.

- Tạo vector tái tổ hợp: Sau khi đã có ở dạng thuần khiết người ta gắn nó vào các vector tái tổ hợp. Trước tiên người ta cắt vector và gen bằng cùng một loại RE tại những trình tự nhận biết của nó. Như vậy ở hai đầu đoạn gen cần chuyển và hai đầu vector bị cắt có những đầu dính (trình tự DNA mạch đơn bổ sung nhau), trộn lẫn DNA cần chuyển và vector các đầu dính sẽ bắt cặp với nhau. Dùng ligase để hàn dính lại, người ta có vector tái tổ hợp.

- Chuyển vector vào tế bào nhân, làm clone hóa các gen (tức là nhân bản gen) vừa tạo nên trong tế bào nhân, chọn ra dòng tế bào chứa gen mong muốn. Bước tiếp theo của quá trình chuyển tải gen là chuyển các vector tái tổ hợp đã tạo thành trong điều kiện *in vitro* vào tế bào nhân thích hợp. Đối với vector là plasmid, đây là quá trình biến nạp, được hỗ trợ bằng nhiều cách khác nhau. Đối với vector là phage, nó có khả năng tự động thực hiện tải nạp với hiệu suất cao hơn nhiều. Tuỳ đối tượng nhận gen và yêu cầu cụ thể mà người ta lựa chọn áp dụng phương pháp nào hiệu quả nhất:

Ở vi khuẩn *E. coli*, xử lý tế bào bằng CaCl₂ ở nhiệt độ thấp để làm cho màng tế bào trở nên dễ tiếp nhận plasmid. Ở một số vi khuẩn khác và nấm men phải xử lý để tạo dạng tế bào trần (protoplast) biến nạp mới thực hiện được.

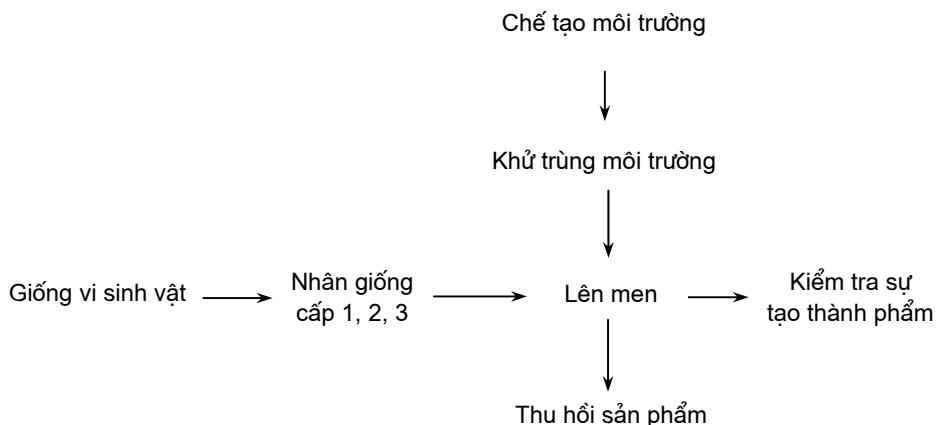
Chương ba

NHỮNG NGUYÊN TẮC CƠ BẢN

CỦA NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

I. QUY TRÌNH LÊN MEN

Quy trình lên men cổ điển được tiến hành theo các giai đoạn sau:



Hình 2: Các bước chính trong quy trình sản xuất công nghệ vi sinh công nghiệp

1. Giống vi sinh vật

Muốn có sản phẩm tốt, ngoài quy trình công nghệ thì khâu giống là quan trọng nhất, nó quyết định chất lượng sản phẩm và giá trị kinh tế của quy trình công nghệ sản xuất.

Trong công nghệ lên men, người ta sử dụng rộng rãi nhiều loại vi sinh vật thuộc nhóm Prokaryote (vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam) và nhóm Eukaryote (nấm men, nấm mốc, tảo).

+ **Tiêu chuẩn của giống.** Chủng vi sinh vật được coi là chủng tốt trong sản xuất phải có tính ưu việt là: Có khả năng sinh tổng hợp tạo sinh khối với hiệu suất cao, đồng thời phải có thêm những đặc điểm sau:

- Có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các nguyên liệu thô, các phế thải...
- Trong quá trình lên men không tạo ra các phẩm phụ không mong muốn của người sản xuất.
- Ít mẫn cảm đối với sự tạp nhiễm do vi sinh vật khác hoặc do phage.
- Sản phẩm sinh khối có thể tách dễ dàng ra khỏi môi trường dinh dưỡng.

Tuy nhiên trong quá trình sản xuất các tiêu chuẩn trên không phải gắn liền với nhau và cùng tồn tại ở một số đối tượng vi sinh vật nào đó. Các vi sinh vật thuộc nhóm Eukaryote có kích thước tế bào lớn thể hình sợi, do đó dễ tách chúng ra khỏi môi trường dinh dưỡng bằng phương pháp lọc ly tâm thường. Nhưng ở chúng thường tồn tại một quy tắc chung là kích thước tế bào tỷ lệ nghịch với hoạt tính trao đổi chất.

Việc chọn chủng cho một quy trình công nghệ là hết sức quan trọng, để chọn được chủng có hoạt tính cao người ta phải tìm cách hoàn thiện genotype của chúng với các phương pháp sau: chọn lọc, lai tạo, gây đột biến trong chất liệu di truyền của tế bào hoặc trong hệ thống điều hòa

trao đổi chất.Ần đây người ta đã sử dụng các phương pháp di truyền hiện đại để tạo các chủng giống có những tính chất mong muốn một cách chủ động, do đó các chủng dùng trong sản xuất ngày càng hoàn hảo hơn, đáp ứng ngày một tốt hơn yêu cầu của con người.

+ Các công việc chủ yếu của công tác giống trong sản xuất

Trong sản xuất, việc hoạt hóa giống và thường xuyên kiểm tra chất lượng của giống là điều hết sức cần thiết và không thể thiếu. Muốn làm tốt khâu này cần phải tiến hành các việc sau:

- Kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lén men.
- Kiểm tra khả năng hồi biến của giống.

Hầu hết các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất là đột biến, do đó phải kiểm tra xem chúng có hồi trở lại giống gốc hay không, bởi hiện tượng này rất hay xảy ra.

- Hoạt hóa giống sau một thời gian sử dụng.

Để hoạt hóa giống người ta thường sử dụng môi trường nuôi cấy giàu các chất kích thích sinh trưởng như cao nấm men, nước chiết cà chua, hỗn hợp vitamin, acid béo.

- Giữ giống bằng phương pháp thích hợp để có thể duy trì những hoạt tính ưu việt của chúng, chống thoái hóa giống, mất hoạt tính.

+ Các phương pháp giữ giống

Hiện nay thường sử dụng 4 phương pháp chính để giữ giống vi sinh vật:

- Bảo quản trên môi trường thạch bằng, định kỳ kiểm tra cấy truyền.

Giống vi sinh vật được giữ trên môi trường thạch nghiêng (đối với các giống vi sinh vật hiếu khí) hoặc trích sâu vào môi trường thạch (đối với vi sinh vật kỵ khí). Các ống giống được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 3- 5°C. Định kỳ để cấy truyền giống, tuỳ từng nhóm vi sinh vật khác nhau mà định kỳ cấy truyền khác nhau, song giới hạn tối đa là 3 tháng.

Để công tác giữ giống được tốt, lâu hơn và đỡ bị tạp hơn, người ta thường phủ lên môi trường đã được cấy giống vi sinh vật một lớp dầu khoáng như paraffin lỏng. Lớp paraffin này sẽ hạn chế được sự tiếp xúc của vi sinh vật đối với oxygen không khí (O_2) và hạn chế sự thoát hơi nước của môi trường thạch, do vậy giống có thể bảo quản được lâu hơn và không bị nhiễm tạp, thoái hóa.

- Giữ giống trong cát hoặc trong đất sét vô trùng.

Do cấu trúc hóa lý cát và sét là những cơ chất tốt mang các tế bào vi sinh vật, chủ yếu là nhóm vi sinh vật có bào tử. Cách làm như sau: Cát và đất được xử lý sạch, sàng lọc qua rây, xử lý pH đạt trung tính, sấy khô và khử trùng. Sau đó bằng thao tác vô trùng trộn bào tử vào cơ chất cát hoặc đất trong các ống nghiệm. Dùng paraffin nóng chảy phết lên nút bông của ống nghiệm để giúp cho ống giống không bị ẩm trở lại.

Ngoài cát và đất, người ta còn giữ giống trong hạt ngũ cốc hay trên silicagen... Phương pháp bảo quản giống trên chủ yếu cho nấm mốc và xạ khuẩn.

- Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông:

Bằng phương pháp này dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của vi sinh vật, đưa chúng vào điều kiện lạnh sâu ở - 25°C đến - 70°C. Người ta trộn vi sinh vật với dung dịch bảo vệ hay còn gọi là dung dịch nhũ hóa như glycerin 15%, huyết thanh ngựa (loại không cho chất bảo quản), dung dịch glycose hoặc lactose 10%... Việc làm lạnh được tiến hành một cách từ từ. Khi độ lạnh đạt - 20°C, nếu tiếp tục làm lạnh thì tốc độ làm lạnh phải đạt 1 - 2°C/phút.

Phương pháp bảo quản này có ưu điểm đó là bảo quản được lâu:

Nếu giữ ở $T^{\circ}\text{C} = - 15^{\circ}\text{C}$ đến $- 20^{\circ}\text{C}$ thì 6 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở $T^{\circ}\text{C} = - 30^{\circ}\text{C}$ thì 9 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở $T^{\circ}\text{C} = -40^{\circ}\text{C}$ thì 12 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở $T^{\circ}\text{C} = -50^{\circ}\text{C}$ thì 3 năm cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở $T^{\circ}\text{C} = -70^{\circ}\text{C}$ thì 10 năm cấy truyền lại 1 lần.

- Giữ giống bằng phương pháp đông khô:

Về nguyên tắc cũng giống như phương pháp lạnh đông, nhưng khác ở chỗ là đưa chất bảo vệ vào như Glutamate 3% hay Lactose 1,2% + pepton 1,2% hay Saccharose 8% + sữa 5% + gelatin 1,5%.

Điều khác biệt với phương pháp lạnh đông là: Để đảm bảo an toàn hơn cho sự sống của tế bào giống, người ta làm thăng hoa phần nước ở trong tế bào và môi trường có chất bảo vệ trong thiết bị đông khô ở áp suất 1.10^{-4}mmHg . Hỗn hợp tế bào giống và dung dịch bảo vệ được chứa trong các ampul thuỷ tinh có $\phi 10 - 15\text{mm}$ được hàn kín để đảm bảo độ khô và chân không cần thiết, những ampul này được bảo quản ở nhiệt độ $3 - 5^{\circ}\text{C}$ hay nhiệt độ trong phòng.

Đây là phương pháp bảo quản tối ưu nhất hiện nay, có thể tối vài chục năm mới phải làm lại. Những năm gần đây người ta đưa ra phương pháp giữ giống bằng ngân hàng gen để giữ giống vi sinh vật quý hiếm, song chi phí rất tốn kém.

2. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào vi sinh vật. Trong quy trình lên men, thì tùy từng chủng giống vi sinh vật khác nhau mà cần nhân theo cơ chất và môi trường nhân khác nhau. Thường có hai dạng giống: tế bào sinh dưỡng và bào tử.

+ Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng

Để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta thường chọn môi trường nhân sinh khối là môi trường đảm bảo cho vi sinh vật tồn tại thích hợp nhất, để với thời gian ngắn nhất cho sinh khối vi sinh vật lớn nhất. Trong trường hợp này thường dùng môi trường dịch thể (nuôi cấy chìm).

+ **Trường hợp giống là bào tử hay conidi:** Thông thường chọn môi trường đặc (nuôi cấy bán rắn: cám gạo, bột bắp, thóc, trấu, mùn cưa..).

Nuôi cấy nấm mốc và xạ khuẩn thường cần thời gian khá dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách: Dùng máy hút (như hút bụi) hay dùng chổi lông mềm quét lên bề mặt của môi trường bán rắn để thu hồi giống.

Bào tử được thu hồi cho vào bình khô có gắn miệng bình bằng paraffin, bảo quản nơi thoáng mát và sử dụng hàng năm.

Trong công nghiệp, người ta thường nhân với lượng lớn sinh khối vi sinh vật bằng các bước như sau:

- Giai đoạn trong phòng thí nghiệm (gọi là nhân giống cấp I)

Đây là giai đoạn cấy giống vi sinh vật thuần khiết từ ống giống, đem nhân ở môi trường dinh dưỡng chuyên tính vô trùng, nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, nhằm đáp ứng đủ lượng giống cần thiết cho bước tiếp theo.

- Giai đoạn ở xưởng (nhân giống sản xuất).

Đây là giai đoạn cần nhân một lượng giống lớn để đáp ứng cho khâu giống trong sản xuất. Từ giống cấp 1; 2; 3 nhân trong nồi lên men hay trong cơ chất đặc (chất mang).

Khi kết thúc mỗi khâu nhân giống cần kiểm tra ngay độ thuần của giống và mật độ tế bào vi sinh vật cần nhân.

3. Lên men

Là giai đoạn nuôi cấy vi sinh vật để chúng tạo sản phẩm hoặc sinh khối vi sinh vật, hoặc là sản phẩm trao đổi chất... Đây là khâu quyết định kết quả của một quy trình lên men.

Để thực hiện lên men, người ta thường sử dụng hai phương pháp là lên men bê mặt và lên men chìm.

3.1. Khái niệm lên men bê mặt

Lên men bê mặt là thực hiện nuôi cấy vi sinh vật trên bê mặt môi trường dịch thể hoặc bán rắn.

+ **Nuôi cấy trên bê mặt dịch thể** (dùng cho nhóm vi sinh vật hiếu khí): Tuỳ từng loại vi sinh vật khác nhau mà chọn môi trường thích hợp khác nhau. Môi trường được pha loãng với nồng độ thích hợp, sau đó bổ sung nguồn nitrogen (N), nguồn khoáng... Khi môi trường cho vào thiết bị lên men phải đảm bảo cho cột môi trường có bê mặt thoáng, rộng. Nuôi cấy theo phương pháp này đơn giản, nhưng đòi hỏi diện tích sử dụng lớn, khó tự động hóa quy trình sản xuất. Hiện nay phương pháp này ít được sử dụng.

+ **Nuôi cấy bê mặt sử dụng môi trường bán rắn**: Có thể dùng vi sinh vật hiếu khí hoặc bán hiếu khí hoặc kỵ khí. Ở phương pháp lên men này nguyên liệu thường dùng là:

- Các loại hạt: thóc, gạo, nếp, đậu tương...
- Các loại mảnh: mảnh sắn, mảnh bắp...
- Các loại phế liệu hữu cơ: bã mía, trấu, cộng rơm rạ, rác thải sinh hoạt...

Các loại nguyên liệu chứa tinh bột trước khi sử dụng phải xử lý bằng cách nấu chín, ngoài các nguyên liệu nói trên người ta phải bổ sung các chất dinh dưỡng vào môi trường để đảm bảo cho dinh dưỡng của vi sinh vật trong quá trình nhân sinh khối (lên men).

Đối với vi sinh vật hiếu khí cần phải có quạt thổi khí vô trùng. Trong lên men bán rắn, ngoài yêu cầu về nguyên liệu thì độ ẩm rất cần thiết cho quá trình lên men. Phải luôn luôn đảm bảo độ ẩm 60 - 75% (độ ẩm không khí 90 - 100%). Phương pháp lên men bán rắn được sử dụng rộng rãi trên thế giới trong các lĩnh vực như:

- Sản xuất kháng sinh dùng trong chăn nuôi.
- Sản xuất enzyme từ nấm mốc.
- Làm tương.
- Đường hóa tinh bột để sản xuất rượu ethanol từ nấm men.

3.2. Khái niệm về lên men chìm

Áp dụng cho cả vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí.

Khi lên men chìm, vi sinh vật được nuôi cấy ở môi trường dịch thể, chúng sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường.

Để thực hiện quá trình lên men chìm, cần qua từng bước sau:

- + Thực hiện quá trình khuấy đảo và sục khí

Quá trình lên men chìm, vi sinh vật phát triển trong các nồi lên men cần được trộn đều để tăng cường diện tiếp xúc giữa tế bào và môi trường dinh dưỡng đồng thời ngăn cản sự kết lỏng của tế bào. Để thực hiện việc này trong các thiết bị lên men người ta lắp hệ thống cánh khuấy, hệ thống này cần cả cho vi sinh vật hảo khí và yếm khí. Đối với vi sinh vật hiếu khí, có tác dụng đảm bảo cung cấp oxy đầy đủ theo yêu cầu của từng loại vi sinh vật. Hệ thống cánh khuấy là một

phần rất quan trọng của thiết bị lên men. Để tăng tác dụng khuấy trộn người ta còn lắp thêm hệ thống sục khí. Không khí trước khi được bơm vào nồi lên men phải xử lý để đảm bảo sạch về cơ học (sạch bụi) và vô trùng (không có vi sinh vật) bằng cách cho đi qua một hệ thống lọc bằng bông thuỷ tinh và khử trùng bằng hơi nóng. Tuỳ từng chủng loại vi sinh vật khác nhau và tuỳ vào giai đoạn lên men khác nhau, mà cần cường độ thông khí khác nhau.

+ Theo dõi sự tạo bọt trong lên men và biện pháp phá bọt

Khi khuấy đảo và sục khí mạnh liên tục trong nồi lên men sẽ tạo ra bọt, nó có khuynh hướng trào ra khỏi nồi lên men và gây nhiễm tạp môi trường lên men, ngoài ra bọt khí còn cản trở sự tiếp xúc giữa vi sinh vật và môi trường dinh dưỡng. Do vậy, trong quá trình lên men người ta cần kiểm soát lượng bọt tạo thành và tìm cách phá huỷ chúng. Để phá bọt người ta thường dùng các chất tự nhiên như: dầu thực vật (dầu lạc), mỡ cá heo... và các chất được tổng hợp theo con đường hóa học.

+ Điều chỉnh pH của môi trường lên men

Mỗi loại vi sinh vật thích hợp với pH nhất định của môi trường nuôi cấy. Trong quá trình lên men vi sinh vật luôn tạo ra các sản phẩm mang tính acid hoặc kiềm làm cho pH môi trường thay đổi. Khi pH môi trường thay đổi sẽ không thích hợp cho hoạt động sống của chính vi sinh vật ấy. Vì vậy việc chủ động điều chỉnh pH môi trường là rất cần thiết trong suốt quá trình sản xuất.

Người ta có thể điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men bằng các dung dịch NaOH, HCl, NH₄OH, urea, hay bổ sung dịch đệm photphate..., nhưng vẫn phải đảm bảo điều kiện vô trùng.

+ Theo dõi và điều chỉnh nhiệt độ của môi trường lên men

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi sinh vật và hiệu quả lên men. Mỗi loại vi sinh vật thích ứng ở nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng tạo sản phẩm.

Quá trình lên men luôn có sự tỏa nhiệt rất mạnh, do đó nhiệt độ trong thiết bị lên men thường tăng vượt quá ngưỡng của nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật. Vì vậy phải thường xuyên giám sát và điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của quá trình lên men. Để làm được việc này người ta thường trang bị hệ thống làm nguội, bằng cách cho nước chảy qua nồi lên men hay cho vào nồi hệ thống ống ruột gà làm nguội.

+ Tiếp thêm nguyên liệu và bổ sung các chất tiền thể

Việc bổ sung nguyên liệu trong quá trình sản xuất là việc làm cần thiết, vì có một số chất không cho phép đưa vào quy trình lên men ngay từ đầu với nồng độ và hàm lượng cao (như đường phải bổ sung nhiều đợt với nồng độ thấp).

Đối với một số quy trình sinh tổng hợp một số chất như vitamin B12, cần phải bổ sung chất tiền thể của vitamin B12 là 5,6 dimethylbenzimidazol sau một thời gian lên men nhất định.

Ngoài việc theo dõi nghiêm ngặt các bước trên, trong quá trình lên men phải lấy mẫu để kiểm tra các chỉ tiêu sau:

- Trạng thái bào của chủng giống dùng trong quá trình lên men và độ tạp khuẩn.
- Kiểm tra sự tiêu hao năng lượng, sự tạo thành sản phẩm trong quá trình lên men.
- Điều cuối cùng cũng là quan trọng nhất đó là xác định thời gian của quá trình lên men.

Tuỳ từng quy trình lên men khác nhau mà thời gian lên men khác nhau. Người sản xuất phải nắm rất chắc thời gian lên men này để thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao nhất.

Lên men chìm là phương pháp được phổ biến rộng nhất trong quy trình lên men công nghiệp, vì có thể kiểm soát được toàn bộ các khâu trong quá trình một cách dễ dàng. So với phương pháp lên men bề mặt, thì lên men chìm có nhiều ưu điểm đó là: ít choán bề mặt (không mất nhiều diện

tích), dễ cơ giới hóa và tự động hóa trong quá trình theo dõi. Tuy nhiên phương pháp lên men chìm đòi hỏi đầu tư nhiều kinh phí cho trang thiết bị. Ngoài ra, nếu một mẻ lên men, vì một lý do nào đó bị xử lý thì không thể xử lý cục bộ được, đa phần phải hủy bỏ cả quá trình lên men, gây tổn thất lớn. Phế liệu của quá trình lên men thải ra phải kèm theo công nghệ xử lý chống ô nhiễm môi trường.

4. Thu hồi sản phẩm

Việc thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của quy trình công nghệ. Vì vậy việc tách, thu hồi sản phẩm phải được tính toán ngay từ khi chọn giống chủng vi sinh vật để lên men, chọn nguyên liệu cũng như môi trường dinh dưỡng.

Khi quá trình lên men kết thúc, người ta tiến hành thu hồi sản phẩm. Các sản phẩm của quá trình tổng hợp vi sinh vật thường được tích luỹ hoặc ở trong tế bào hoặc trong dung dịch nuôi cấy.

* Việc đầu tiên là tách tế bào vi sinh vật ra khỏi pha lỏng của dịch lên men.

- Nếu là các vi sinh vật có cấu tạo hệ sợi như nấm, tảo... dùng phương pháp lọc vớt.

- Nếu là các vi sinh vật đơn bào, có kích thước tế bào nhỏ như nấm men, vi khuẩn... dùng phương pháp ly tâm, thường ly tâm ở tốc độ cao.

* Việc xử lý tiếp theo sau thu hồi sản phẩm phụ thuộc vào mục tiêu của công nghệ. Thông thường người ta hay dùng các phương pháp sau: chiết rút, hấp phụ, kết tủa, kết tinh, sắc khí, điện ly, phân tích quang phổ hấp phụ...

Để tính hiệu quả kinh tế của một quy trình công nghệ cũng như tính khả thi của xí nghiệp (nhà máy) lên men, người ta thường xây dựng thành khu liên hợp các xí nghiệp có mối quan hệ sản xuất gần nhau, hoặc khép kín công nghệ từ A đến Z.

+ **Về vấn đề năng lượng:** Sẽ sử dụng được triệt để hơn nguồn năng lượng trong quá trình lên men. Ví dụ: Một nồi lên men phục vụ cho xí nghiệp này sản xuất, xí nghiệp khác có thể ở giai đoạn chuẩn bị để kế tiếp nhau lên men, ngoài ra có thể sử dụng năng lượng dư thừa để sấy sản phẩm, sưởi ấm các phòng hoặc phân xưởng sản xuất (vào mùa lạnh).

+ **Về vấn đề nguyên liệu:** Do đặc điểm của từng công nghệ và mục tiêu của từng xí nghiệp (nhà máy), mà xí nghiệp này có thể sử dụng phế liệu của xí nghiệp kia làm nguyên liệu đầu vào. Ví dụ: Nhà máy sản xuất acid glutamic cần cao ngô. Người ta xây dựng xí nghiệp sản xuất cao ngô ngay cạnh nhà máy này. Hạt ngô sau khi ngâm lấy nước chiết làm cao ngô, sẽ được sử dụng làm nguyên liệu cho xí nghiệp sản xuất tinh bột...

+ **Vấn đề xử lý nước thải chất thải:** Xử lý ô nhiễm do hoạt động của các nhà máy, xí nghiệp thực phẩm chế biến rau quả, đông lạnh... thường được liên kết chặt với các xí nghiệp xử lý môi trường, tái chế các phế thải vào các mục đích khác nhau. Ví dụ: Xí nghiệp xử lý bùn mía thành phân hữu cơ bón cho cây trồng được xây dựng cạnh nhà máy đường...

II. DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT VÀ NGUYÊN LIỆU NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

Nuôi cấy vi sinh vật ở bất cứ quy mô nào (phòng thí nghiệm, nhân giống cấp 1, 2, 3 hay trong nồi lên men) đều phải đảm bảo đầy đủ các nguyên tố dinh dưỡng cho vi sinh vật hoạt động nhân sinh khôi tạo sản phẩm.

Nguyên tố dinh dưỡng của vi sinh vật đó là: các nguyên tố đa lượng, vi lượng và các vitamin... (xem Giáo trình vi sinh vật đại cương). Tuy vậy trong lên men công nghiệp cũng có chỗ khác biệt đáng lưu ý. Người ta không bổ sung nguyên tố vi lượng ở dạng dung dịch tinh khiết

vào môi trường lên men, mà có sự bổ sung cùng lúc với các nguyên tố đa lượng. Các nguyên tố đa lượng được bổ sung dưới tạp hợp chất (rỉ đường, cao ngô, gạo..).

Thông thường các tạp chất này chứa một lượng các nguyên tố vi lượng cần thiết và đủ để dùng cho vi sinh vật.

1. Các hợp chất cung cấp nguồn cacbon

1.1. Rỉ đường: Có hai loại là rỉ đường mía và rỉ đường củ cải.

+ **Rỉ đường mía:** Là phụ phẩm thu được của công nghiệp ép mía thành đường sau khi đã thu saccharose.

Thu nhận rỉ đường trong quá trình sản xuất đường saccharose:

Đường mía thô gồm hai hợp phần: Các tinh thể đường saccharose và màng bao bọc phía ngoài có chứa đường, các chất phi đường và các chất màu.

Theo quy trình sản xuất đường thô được tinh luyện, ly tâm, lắng trong, làm sạch bằng phương pháp carbonate (lắng trong bằng vôi) cho bão hòa CO_2 , sau đó được đem lọc và sulfite hóa. Tiếp theo, dịch đã làm sạch được cô trong thiết bị chân không thu được dịch đường non I. Dịch này sẽ đem ly tâm cho ra đường trắng. Còn cặn có màu được xử lý 3 lần để thu hồi đường loại II, III và IV. Phần cuối cùng còn lại là rỉ đường (Quy trình sản xuất đường của Cộng hòa liên bang Nga).

Vậy thì có thể nói rỉ đường là hỗn hợp phức tạp, ngoài hàm lượng đường, còn có chứa các hợp chất nitrogen, các vitamin và các hợp chất vô cơ. Ngoài ra trong rỉ đường còn chứa một số chất keo, vi sinh vật tạp nhiễm bất lợi cho quá trình lên men sau này, vì vậy tuỳ theo mục đích sử dụng khác nhau mà người ta cần xử lý rỉ đường trước khi đưa vào sử dụng làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật trong công nghiệp lên men.

- Thành phần rỉ đường: Phụ thuộc vào phương pháp sản xuất đường, điều kiện bảo quản rỉ đường và vào hàm lượng các nguyên tố trong thân cây mía.

Trong rỉ đường mía có: 15 - 20% nước, 80- 85% chất khô hòa tan.

Trong chất khô có các thành phần sau:

Đường tổng số hay đường lên men được chiếm > 50%, trong đó đường saccharose 30 - 35%, đường khử 15 - 20% (glucose, fructose). Đôi khi có cả rafinose cũng như các chất khử không lên men được đó là caramel và melanoidin - sản phẩm ngưng tụ giữa đường và amino acid, các chất khử không lên men chiếm 1,7% khối lượng rỉ đường.

Thành phần chất khô còn lại của rỉ đường chiếm <50%, trong đó 30 - 32% chất hữu cơ (acid aconitic chiếm 5%), 18 - 20% chất vô cơ.

Trong rỉ đường mía chứa khá nhiều vitamin, trong đó đáng lưu ý là biotin (theo tài liệu của Andecofller), hàm lượng vitamin (M/ gr rỉ đường) trong rỉ đường mía như sau:

Thiamine	8,3	Acid folic	0,038
Riboflavine	2,5	Pyridoxine (vitaminB ₆)	6,5
Acid nicotinic	21,4	Biotin	12,0

Khi bảo quản lâu rỉ đường bị tổn thất đường rất lớn, do đó cần lưu tâm đến thời gian bảo quản rỉ đường.

Bảng 1: Thành phần các nguyên tố tro trong rỉ đường mía

Tài liệu	Thành phần (%)								
	K ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	SO ₄	Cl ⁻	Tổng
Mac- Djinnisa	3,5	1,5	0,1	0,2	0,2	0,5	1,6	0,4	8,0

Andercofler & Khiki	3,6	0,5	0,07	0,9	-	-	3,9	-	9,0
---------------------	-----	-----	------	-----	---	---	-----	---	-----

+ Rỉ đường củ cải: Là nước cốt sinh ra trong quá trình sản xuất đường từ củ cải đường. Dịch này được cô đặc có thể dùng lâu dài.

Thành phần của rỉ đường củ cải như sau (%):

Saccharose	48	Đường chuyển hóa khác	1
Rafinose	1	Các acid hữu cơ	2

Trong rỉ đường (củ cải và mía), ngoài thành phần kích thích sinh trưởng còn chứa một số chất mà nếu dùng nó ở nồng độ cao sẽ kìm hãm sinh trưởng của vi sinh vật như SO₂, hydroxymethylfurfural...

1.2. Dịch kiềm sulfite: Là một loại phế phẩm của công nghiệp sản xuất cellulose.

Khi sản xuất một tấn cellulose gỗ cây dễ sễ thải ra ngoài 1000m³ dịch kiềm sulfite. Dịch kiềm sulfite có thành phần: 80% chất khô là đường hexose (glucose, mannose, galactose), ngoài ra trong dịch kiềm sulfite có chứa acid ligninsulfuric, acid này chưa được vi sinh vật sử dụng. Một điều đáng lưu ý là dịch kiềm sulfite có đặc tính hấp thụ nhiều O₂, cho nên khi nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí có thể giảm mức cung cấp O₂ tới 60% so với mức bình thường.

1.3. Tinh bột và cellulose

Tinh bột được sử dụng dưới dạng hạt hoặc bột của khoai, sắn, lúa, đại mạch...

Dạng nguyên liệu này trước khi sử dụng làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật phải qua khâu xử lý và đường hóa. Đối với các chủng vi sinh vật có hệ enzyme amylase phát triển có thể sử dụng trực tiếp tinh bột không thông qua khâu đường hóa.

Cellulose được sử dụng là rơm rạ, giấy, mùn cưa... Tuỳ từng loại vi sinh vật khác nhau mà có biện pháp xử lý nguyên liệu khác nhau sao cho phù hợp.

1.4. Dầu thực vật

Các loại dầu (dầu dừa, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu hạt bông, dầu hướng dương...) được dùng trong nuôi cấy vi sinh vật với vai trò là nguồn dinh dưỡng carbon, ngoài ra còn là chất phá bọt trong quá trình lên men. Khi nuôi cấy vi sinh vật có khả năng tiết ra enzyme lipase, sẽ phân huỷ các chất dầu này thành glycerin và các acid béo.

Lượng chất béo bổ sung vào môi trường phải rất phù hợp với hoạt động sống của vi sinh vật, nếu bổ sung quá nhiều sẽ làm chậm quá trình đồng hóa carbohydrate của vi sinh vật. Cụ thể sẽ làm tăng độ nhớt của môi trường, tạo các hạt nhũ tương của các loại xà bông, đặc biệt khi môi trường có CaCO₃ sẽ dẫn đến hiện tượng giảm oxygen hòa tan, vi sinh vật sẽ phát triển kém ảnh hưởng xấu đến hiệu suất lên men.

Bảng 2: Thành phần hóa học của các loại dầu thực vật
(L.A. Popova và cộng sự, 1961)

Các loại dầu	Acid béo (%)				
	Oleic	Linoleic	Palmitic	Stearic	Arachidic
Dầu lạc	50-70	13-26	6-11	2-6	5-7
Dầu bắp	< 45	< 48	< 7,7	3,6	< 0,4
D.đậu tương	25-36	52-65	6-8	3-5	0,4-10
Dầu bông	30-35	40-45	20-22	2,0	0,1-0,6
Dầu lanh	13-29	15-30	9-11	6-7	-

1.5. Hydrocarbon

Người ta đã biết có nhiều vi sinh vật có khả năng sống được ở mỏ dầu, mỏ khí đốt, ở đáy bể chứa dầu, mặt đường nhựa...

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy n-paraffin là loại nguyên liệu tương đối vạn năng để nuôi cấy vi sinh vật. Theo số liệu của Fuch (1961) có 26 giống vi sinh vật, trong đó 75 loài có khả năng phân huỷ hydrocarbon mạch thẳng. Trong đó, vi khuẩn có khả năng phát triển trên nhiều loại hydrocarbon hơn là nấm men và nấm mốc. Cụ thể nó có thể phát triển trên các dãy alkan mạch thẳng, mạch nhánh, hydrocarbon thơm và khí thiên nhiên như: methane, ethane, propane... Nấm men chỉ phát triển trên n-alkan và alken. Nấm mốc phát triển trên n- alkan còn trên alkan mạch nhánh sinh trưởng kém hơn.

Khả năng sử dụng hydrocarbon của vi sinh vật còn phụ thuộc vào các điều kiện sau:

- Khả năng xâm nhập vào tế bào của hydrocarbon.
- Sự tồn tại hệ thống enzyme cần thiết để chuyển hóa các nguồn carbon này, đặc biệt ở giai đoạn đầu của sự oxy hóa.
- Vi sinh vật phải bền vững với độc tính của hydrocarbon khi nồng độ cao.

2. Các hợp chất cung cấp nguồn nitrogen (nitơ)

Nitơ tham gia vào tất cả các cấu trúc trong tế bào vi sinh vật, giúp tế bào hoàn thiện mọi chức năng của hoạt động sống. Nguồn nitơ là nguồn dinh dưỡng quan trọng không kém nguồn carbon.

Nitơ được cung cấp cho tế bào vi sinh vật dưới nhiều dạng khác nhau:

2.1. Dưới dạng các hợp chất vô cơ và hữu cơ khá thuần khiết như: NH_4^+ , NO_3^- , pespton các loại, các amino acid.

Trong lén men công nghiệp người ta thường sử dụng nguồn nitơ dưới dạng sản phẩm thô gọi là **nguồn nitơ kỹ thuật** bao gồm các loại sau:

+ Dịch thuỷ phân nấm men:

Một trong những lý do con người quan tâm nhiều đến nấm men vì trong tế bào nấm men chứa nhiều chất dinh dưỡng có giá trị, nổi bật là protein và vitamin. Hàm lượng protein của nấm men dao động trong khoảng 40 - 60% chất khô của tế bào. Về tính chất protein của nấm men gần giống protein nguồn gốc của động vật, có chứa khoảng 20 amino acid, trong đó có đủ các amino không thay thế. Thành phần amino acid trong nấm men cân đối hơn so với lúa mì và các hạt ngũ cốc khác; kém chút ít so với trong sữa và bột cá. Vì vậy dịch thuỷ phân nấm men là một loại dịch rất giàu chất bổ dưỡng, gồm amino acid, các peptid, các vitamin, đặc biệt là vitamin thuộc nhóm B.

Người ta sử dụng nấm men thuỷ phân với mục đích bổ sung nguồn nitơ và nguồn các chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Có thể thu nhận nấm men bằng nhiều phương pháp khác nhau: bằng tác động của enzyme; phương pháp tự phân ở 45 - 50°C , pH = 6,2; phương pháp tiêu nguyên sinh chất bằng dung dịch NaCl ở nồng độ cao... Thành phần hóa học của các dịch thuỷ phân nấm men phụ thuộc vào nguyên liệu và quy trình sản xuất.

+ Bột đậu nành: Bột đậu nành sau khi tách lấy dầu là một nguyên liệu lý tưởng dùng trong công nghệ vi sinh. Loại bột này chứa tới 40- 50% protein, 30% carbohydrate, hàm lượng dầu còn lại 1%, lecithin 1,8%.

+ **Cao ngô:** Có dạng lỏng màu nâu thẫm được tạo nên từ nước chiết ngâm ngô thông qua quá trình cô đặc. Thành phần của cao ngô chất khô chiếm 40 - 50% (trong đó chứa: 3 - 5% N, 1-3% đạm amine).

Trong cao ngô còn chứa một ít protein, một số amino acid tự do và các peptid có phân tử lượng thấp.

+ **Khô lạc hay bánh dầu phộng:** Là xác bã thu được sau khi ép lạc lấy dầu. Thành phần giàu protein và một số acid béo. Hàm lượng đạm tổng số và đạm amine gần giống như ở cao ngô.

+ **Nước mắm, nước tương:** Nước mắm, nước tương cũng được sử dụng với vai trò là nguồn nitrogen vì có chứa khá đầy đủ các amino acid cần thiết.

- **Nước mắm:** Là sản phẩm chế biến từ quá trình lên men tự nhiên, phân huỷ protein của cá dưới tác dụng của hệ enzyme protease. Nước mắm có giá trị dinh dưỡng cao, có đầy đủ các amino acid hợp phần của protein. Thành phần: đạm tổng số 15 - 25 g/l, đạm amine chiếm 60 - 70% đạm tổng số.

- **Nước tương:** Là dịch thuỷ phân từ bánh dầu lạc hay dầu đậu nành bằng HCl hoặc thông qua quá trình thuỷ phân bằng enzyme của nấm mốc. Thành phần của nước tương: đạm tổng số: 20 - 25 g/l, đạm amine là 70- 75% đạm tổng số. Dịch amino acid thu được này sẽ thiếu hai amino acid là acid tryptophan và cysteine vì hai amino acid này bị phá huỷ trong môi trường acid. Do vậy, nếu nước tương thu được bằng thuỷ phân bánh dầu do enzyme của nấm mốc sẽ có đầy đủ thành phần amino acid hơn.

3. Các nguyên tố khoáng

Trong công nghệ lên men, người ta nhận thấy vai trò của dinh dưỡng khoáng rất lớn, nó ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của quá trình lên men. Trong số dinh dưỡng khoáng, người ta đặc biệt chú ý đến vai trò của phospho (P).

Khi lên men công nghiệp, người ta thường bổ sung P dưới dạng bột đậu, bột bắp, bã rượu, hay ở dạng phosphate vô cơ. Với các chất khoáng khác như: Mg, Na, Fe... vi sinh vật sẽ nhận từ môi trường dinh dưỡng ở dạng muối vô cơ hoặc có khi ngay cả trong nước pha môi trường dinh dưỡng. Vì vậy khi pha môi trường người ta thường dùng nước máy mà không dùng nước cất. Các nguyên tố vi lượng như: Mn, Mo, Co... thường có mặt trong các nguyên liệu tự nhiên ban đầu khi đưa vào môi trường lên men như dịch trái cây, nước chiết các loại hạt.

Tuy vai trò của các nguyên tố khoáng rất quan trọng, nhưng trong quá trình lên men cũng chỉ cần một lượng thích hợp, nếu vượt quá giới hạn sẽ giảm hiệu quả của quá trình lên men. Vì vậy khi thiết kế nồi lên men, người ta chế tạo từ thép carbon, bên trong nồi còn quét lớp keo bảo vệ.

4. Vitamin và chất kích thích sinh trưởng

Ở quy mô công nghiệp, cũng như các nguyên tố khoáng, người ta thường bổ sung vitamin, các chất kích thích sinh trưởng thông qua việc bổ sung các nguyên liệu lên men. Các nguyên liệu giàu vitamin và chất kích thích sinh trưởng như: cao ngô, rỉ đường, dầu thực vật và các cơ chất khác, không cần thiết phải cho vitamin nguyên chất vào nồi lên men.

Chương bốn

CÁC DẠNG CHẾ PHẨM VI SINH VẬT (VSV) DÙNG TRONG NÔNG NGHIỆP

Hiện nay chế phẩm vi sinh vật được sản xuất theo nhiều hướng khác nhau, nhiều dạng khác nhau phụ thuộc vào điều kiện kinh tế xã hội, khoa học công nghệ, trình độ dân trí và điều kiện tự nhiên của mỗi nước trên thế giới nhưng đều theo mục tiêu: Tiện cho người sử dụng và cho hiệu quả kinh tế cao nhất.

I. CHẾ PHẨM VI KHUẨN

1. Chế phẩm nhân nuôi trên mồi trường thạch hoặc trên cơ chất gelatin

Loại chế phẩm này được sản xuất trong phòng thí nghiệm lớn, dùng mồi trường dinh dưỡng của Fred (1932). Chế phẩm sau khi xuất xưởng thường được đựng trong các chai lọ thuỷ tinh.

Loại chế phẩm VSV này ưu điểm là: khuẩn lạc VSV thường nhìn thấy được, do đó có thể loại bỏ được ngay tạp khuẩn bằng một số hoá chất có sẵn trong phòng thí nghiệm mà không cần phải chuẩn bị các nguyên liệu đắt tiền.

Tuy nhiên loại chế phẩm VSV này còn có nhiều hạn chế đó là: số lượng VSV chuyên tính ít, thời gian bảo quản và sử dụng ngắn, chuyên chở vận chuyển xuống cơ sở sản xuất không tiện do đựng trong chai lọ thuỷ tinh dễ bị vỡ. Mặt khác theo Vincent (1970) thì loại chế phẩm này có độ bám dính trên hạt giống không cao.

2. Chế phẩm VSV dạng dịch thể

Chế phẩm VSV dạng dịch thể được sản xuất trong phòng thí nghiệm hoặc trong nhà máy, xí nghiệp theo quy trình công nghệ lên men. Theo đó cần có hệ thống máy lắc lớn hoặc nồi lên men có hệ thống điều khiển tốc độ khí để tạo sinh khối lớn. Sau đó dịch VSV được đóng vào chai lọ hoặc bình nhựa.

Loại chế phẩm VSV này tiện lợi ở chỗ không cần phải pha hoạc trộn với nước mà có thể trộn luôn vào hạt giống. Cũng có thể ly tâm dịch vi sinh để cô đặc sinh khối qua đó hạ giá thành sản xuất.

Tuy nhiên loại chế phẩm VSV này có những hạn chế đó là: Khi nhiễm vào hạt giống độ sống sót và độ bám dính của VSV trên hạt giống không cao. Chế phẩm phải luôn luôn bảo quản ở trong điều kiện lạnh vì vậy khá tốn kém và không thuận tiện cho vận chuyển. Chi phí sản xuất chế phẩm thường tương đối cao vì dụng cụ chứa đựng đắt tiền. Gần đây một số cơ quan nghiên cứu, triển khai (NifTAL - Hoa kỳ, DOA - Thái Lan, ICRISAT - Ấn Độ...) đã nghiên cứu thành công công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng, trong đó quá trình nhân sinh khối vi sinh vật được gắn liền với việc xử lý sao cho mật độ vi sinh vật sau lên men luôn đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn quy định, nghĩa là đạt mức từ hàng trăm triệu đến hàng tỷ vi sinh vật trong 1ml. Ngoài ra, người ta cũng lợi dụng khả năng sinh bào tử, bào nang của một số vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng, trong đó sau quá trình lên men một số hoá chất chuyển hoá tiềm sinh hoặc một số kỹ thuật bức chế oxy, điện thế oxy hoá khử hoặc điều kiện dinh dưỡng được áp dụng làm cho vi sinh vật chuyển từ dạng sinh dưỡng sang dạng tiềm sinh. Chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng sản xuất theo công nghệ mới đã khắc phục được các nhược điểm của chế

phẩm dịch thể kiếu cũ và đang được áp dụng rộng rãi tại nhiều nước như Mỹ, Nhật, Canada, Úc và Việt Nam.

3. Chế phẩm VSV dạng khô

Năm 1965 Scott và Bumganer đã chế tạo được một loại chế phẩm VSV dạng khô. Cách làm như sau: sinh khối vi sinh vật được cho vào bình sục khí để đuổi hết nước, sau đó ly tâm để tách VSV chuyên tính ra khỏi cơ chất và cho hấp thụ vào chất mang là bột cao lanh, sau đó cho hấp thụ tiếp vào CaSO_4 hoặc NaSO_4 để thu được chế phẩm VSV dạng khô.

Loại chế phẩm VSV dạng khô có ưu điểm là cất trữ, vận chuyển rất tiện lợi, dễ dàng, chế phẩm không bị nhiễm tạp, sử dụng trong thời gian dài (> 1 năm).

Nhưng công nghệ sản xuất loại chế phẩm VSV này phức tạp, tốn kém, do đó hiệu quả kinh tế không cao.

4. Chế phẩm VSV dạng đông khô

Chế phẩm VSV dạng đông khô được sản xuất từ những năm 1940 - 1960 ở Mỹ, Úc, Nga. Để sản xuất loại chế phẩm này sau khi lên men, sinh khối vi sinh vật được đông khô lại ở nhiệt độ rất thấp ($-20 \div -40$ °C).

Loại chế phẩm VSV này có nhiều ưu điểm như ít bị nhiễm tạp ngay cả khi ở nhiệt độ rất cao, độ sống sót của VSV chuyên tính rất cao.

Chế phẩm cũng có hạn chế, đó là tỷ lệ bám dính và độ sống sót của VSV trên hạt thấp (Vincent, 1970) đồng thời sản xuất rất công phu và tốn kém.

5. Chế phẩm VSV dạng bột chất mang

Hiện nay hầu hết các nước trên thế giới đều sản xuất loại chế phẩm VSV trên nền chất mang, trong đó sinh khối vi sinh vật được tẩm nhiễm vào chất mang là các hợp chất hữu cơ hoặc không hữu cơ tự nhiên hoặc tổng hợp có tác dụng làm nơi trú ngụ và bảo vệ vi sinh vật chuyên tính trong chế phẩm từ khi sản xuất đến lúc sử dụng. Chất mang cần có các đặc điểm sau:

- Khả năng hút nước cao (Water holding capacity): 150-200%;
- Hàm lượng cacbon hữu cơ cao, tốt nhất $> 60\%$;
- Không chứa các chất độc hại đối với vi sinh vật tuyển chọn, đất và cây trồng;
- Hàm lượng muối khoáng không vượt quá 1%;
- Kích thước hạt phù hợp với đối tượng sử dụng.

Loại chất mang thường được sử dụng nhiều nhất là than bùn. Ngoài ra có thể sử dụng đất sét, vermiculit, than đá, lignin, đất khoáng, bã mía, lõi ngô nghiên, vỏ trấu, vỏ cà phê, bột polyacrylamid, phân ủ... làm chất mang cho chế phẩm vi sinh vật.

Tại Hà Lan người ta người ta sử dụng chất mang từ than đá, than bùn trộn với thân thực vật nghiên nhão. Ở Liên Xô cũ người ta sử dụng chất mang là đất hữu cơ. Tại một số nước Đông Nam Á người ta sử dụng chất mang từ bột xenlulô, bột bã mía, lõi ngô, rác thải hữu cơ được nghiên nhão. Ở Ấn Độ người ta dùng chất mang bằng bentonit trộn với bột cá. Gần đây, ở Mỹ người ta sử dụng chất mang từ bột polyacrylamid.

Ở Việt Nam chất mang được sử dụng chủ yếu là than bùn. Gần đây một số nhà khoa học đã nghiên cứu chế tạo chất mang từ rác thải hữu cơ, phế thải nông công nghiệp sau khi đã xử lý như: rác thải sinh hoạt, mùn mía, bùn mía, cám trấu, mùn cưa...

Tùy theo điều kiện người ta có thể khử trùng chất mang trước khi nhiễm sinh khối vi sinh vật để tạo ra chế phẩm vi sinh vật trên nền chất mang khử trùng hoặc tạo ra chế phẩm trên nền chất

mang không khử trùng bằng cách phối trộn sinh khối vi sinh vật chất mang sau khi xử lý mà không qua công đoạn khử trùng. Ưu điểm và hạn chế của hai dạng chế phẩm khử trùng và không khử trùng được trình bày trong bảng 3.

Loại chế phẩm trên nền chất mang có ưu điểm là: Quy trình sản xuất đơn giản, dễ làm, không tốn kém nhiều dẫn đến giá thành hạ, nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, mật độ VSV chuyên tính trong chế phẩm cao, chuyên chở dễ, tiện sử dụng, độ bám dính của VSV trên đối tượng sử dụng cao. Tuy nhiên chế phẩm dạng chất mang bột cũng có những nhược điểm như: dễ bị tạp nhiễm bởi vi sinh vật không chuyên tính, chất lượng không ổn định, độ sống sót của VSV trong chế phẩm không cao. Nếu không sử dụng kịp thời, thì chế phẩm có thể bị loại bỏ hàng loạt vì không đảm bảo mật độ vi sinh vật chuyên tính.

Bảng 3: Ưu điểm và hạn chế của chế phẩm vi sinh vật trên nền chất mang khử trùng và không khử trùng

Loại chất mang	Ưu điểm	Hạn chế
Khử trùng	<ul style="list-style-type: none"> - Sử dụng cho quy mô sản xuất trung bình - Có thể pha loãng được qua đó giảm chi phí đầu tư nồi lên men, môi trường và các nhu cầu khác - Có chất lượng cao, thời gian tồn tại của vi sinh vật chuyên tính lâu - Dễ đánh giá và kiểm tra chất lượng - Thuận lợi cho việc sử dụng 	<ul style="list-style-type: none"> - Cần khử trùng chất mang, vì vậy tốn kém và đòi hỏi điều kiện đặc biệt - Cần nhiều nhân công và đầu tư trong quá trình sản xuất - Cần có kỹ thuật và người có kinh nghiệm trong sản xuất
Không khử trùng	<ul style="list-style-type: none"> - Sử dụng cho quy mô sản xuất trung bình và lớn - Kỹ thuật phối trộn đơn giản - Có thể sử dụng mọi loại vật liệu địa phương - Đầu tư ít, không cần kỹ thuật đặc biệt và người có kinh nghiệm trong quá trình sản xuất 	<ul style="list-style-type: none"> - Không pha loãng được sinh khối, do vậy cần phải lên men với số lượng lớn và cần nhiều môi trường - Sản phẩm không bảo quản được lâu - Khó đánh giá và kiểm tra chất lượng

II. CHẾ PHẨM NẤM

1. Chế phẩm sợi nấm

Chế phẩm sợi nấm là loại chế phẩm được sản xuất từ sinh khối sợi của nấm, trong đó nấm chuyên tính được nhân sinh khối theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men xốp (lên men trong giá thể có bổ sung dinh dưỡng - lên men trên môi trường bán rắn). Sau khi sinh khối hệ sợi nấm đạt cao nhất, thu hoạch hệ sợi, rửa sạch và loại bỏ nước bằng cách ly tâm và phơi trong không khí để đạt độ ẩm 40%. Để sản xuất chế phẩm nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhiza) người ta phải nuôi hệ sợi và bào tử nấm trong hệ rễ cây chủ, nghĩa là nhiễm nấm vào đất trồng cây chủ có hệ rễ phát triển như ngô, hay cỏ ba lá, thu hoạch hệ rễ cây chủ cùng đất trồng và sử dụng chúng như một loại chế phẩm. Sản phẩm dạng này phải được bảo quản trong điều kiện lạnh cho tới khi sử dụng. Ưu điểm của sản phẩm là dễ làm, ít tốn kém, song không bảo quản được lâu, có nguy cơ tạp nhiễm cao và hiệu lực không ổn định.

2. Chế phẩm bào tử

Để sản xuất chế phẩm bào tử người ta nhân sinh khối nấm trong môi trường xốp đến khi bào tử nấm hình thành và chín, thu hồi sinh khối nấm cùng giá thể sau đó phơi khô và nghiền mịn. Đối với một số nấm rễ lớn người ta có thể sản xuất chế phẩm bào tử bằng cách nuôi trồng nấm, thu hái quả thể nấm, làm khô ở nhiệt độ phù hợp ($<35^{\circ}\text{C}$), nghiền mịn cùng với chất mang và tạo sản phẩm dưới dạng bột hoặc viên. Ưu điểm của chế phẩm dạng này là có thể bảo quản được lâu, ít tạp nhiễm, chế phẩm có hiệu lực cao, ổn định. Để tránh tạp nhiễm từ bên ngoài các thao

tác nuôi, trồng, thu hoạch và chế biến phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng, người sản xuất cần phải có kinh nghiệm và các trang thiết bị đắt tiền.

III. CHẾ PHẨM VIRUS

1. Chế phẩm dạng lỏng

Sinh khối virus trong cơ thể ký chủ được thu hồi bằng cách giết ký chủ, nghiền nhỏ, ly tâm loại cặn bã và bổ sung các chất phụ gia (chất chống thối, chất bám dính...), đóng chai và đưa đi sử dụng. Sản phẩm loại này dễ làm, song thời gian sử dụng ngắn, dễ tạp nhiễm.

2. Chế phẩm dạng bột khô

Sau khi bổ sung chất phụ gia như chế phẩm dạng lỏng, dịch virus được làm khô cùng với chất mang rồi đóng gói và mang đi sử dụng. Chế phẩm virus dạng bột có thể bảo quản được lâu hơn chế phẩm dạng lỏng.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG CHẾ PHẨM VSV TRONG TRỒNG TRỌT VÀ BẢO VỆ THỰC VẬT

Tùy theo mục đích, đối tượng sử dụng và đặc điểm của từng loại chế phẩm mà phương pháp sử dụng khác nhau. Đối với các chế phẩm vi sinh vật phục vụ trong trồng trọt và bảo vệ thực vật thường sử dụng các phương pháp sau:

1. Phương pháp nhiễm vào hạt giống

Ở một số nước trên thế giới có nền nông nghiệp phát triển, thì chế phẩm vi sinh vật làm phân bón hoặc phòng bệnh hại được nhiễm trực tiếp vào hạt thông qua quá trình xử lý hạt giống ở quy mô công nghiệp. Nghĩa là ngay sau khi xử lý hạt giống, người ta bọc luôn một lớp chế phẩm VSV bên ngoài hạt. Công việc này được thực hiện trong các nhà máy, xí nghiệp xử lý hạt giống, sau đó hạt giống đã nhiễm vi sinh vật được giao cho các nông trường hoặc trang trại để gieo trồng.

Ở một số nước, trong đó có Việt Nam, chế phẩm VSV được hoà vào nước sạch (nếu chế phẩm dạng khô hoặc dạng chất mang) tạo thành dung dịch, sau đó trộn đều với hạt giống trước khi gieo. Để tăng độ bám dính của vi sinh vật vào bề mặt hạt giống có thể bổ sung các chất keo vào dung dịch trước khi trộn với hạt giống; hoặc trộn hỗn hợp hạt giống + vi sinh + bột mịn (đất, phân chuồng hoai mục, bột đá vôi..) để tạo ra lớp vỏ bọc kín hạt giống. Công việc trộn có thể thực hiện ngay tại ngoài đồng, khi đó nới trộn phải là chỗ râm mát, tránh ánh nắng trực tiếp. Trộn xong đem gieo ngay trong thời gian ngắn nhất.

Phương pháp nhiễm trực tiếp vào hạt giống cho hiệu quả cao nhất, nhưng đòi hỏi kỹ thuật cao để tránh làm hạt giống bị sảy sét và mất sức nảy mầm. Đối với hạt giống đã được xử lý thuốc trừ sâu, diệt nấm hoá học không nên sử dụng phương pháp này, vì hoá chất độc hại sẽ tiêu diệt vi sinh vật chuyên tính.

2. Phương pháp hổ re cây

Ngâm rễ cây còn non vào dung dịch chế phẩm VSV (nếu chế phẩm dạng chất mang, thì phải hoà vào nước sạch) trong thời gian 6 - 24 giờ tùy loại chế phẩm và loại cây trồng. Cần tiến hành ở nơi râm mát, tránh ánh nắng trực tiếp.

Chú ý: Chỉ ngâm bộ rễ vào chế phẩm để VSV hữu ích nhiễm vào rễ cây.

Phương pháp này cho hiệu quả rất cao, nhưng mất nhiều thời gian và không tiện lợi cho người sử dụng. Phương pháp này không áp dụng đối với các loại cây rễ cọc, cây ăn quả.

3. Bón chế phẩm VSV vào đất

Theo phương pháp này có nhiều cách bón chế phẩm VSV:

- + Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhở tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo, trồng (nếu là ruộng cạn); hoặc rải đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).
 - + Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng hoai, sau đó rải đều như bón phân.
 - + Trộn chế phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng hoai, sau đó đem bón thúc sớm cho cây (càng bón sớm càng tốt).

4. Phun, tưới chế phẩm VSV lên cây hoặc vào đất

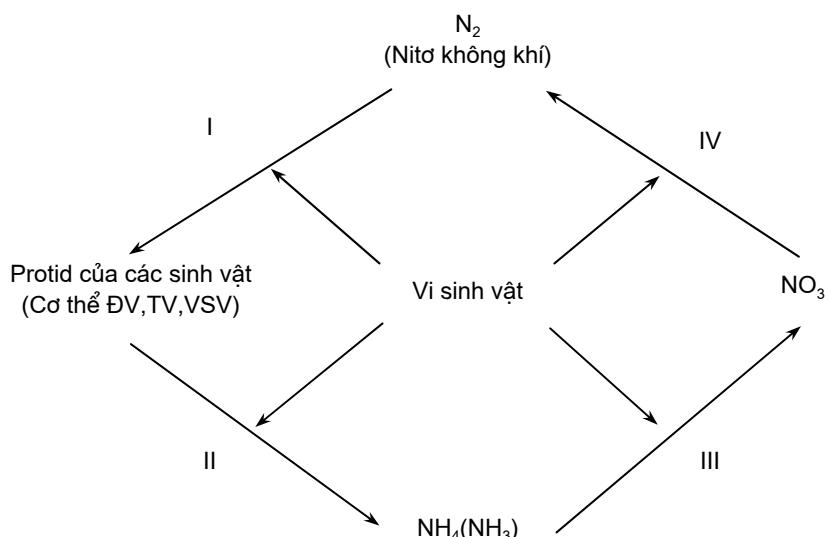
Theo phương pháp này, dùng chế phẩm hoà vào nước sạch, tưới hoặc phun trực tiếp vào cây hay vào đất. Đối với chế phẩm phân bón vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh nên tưới phủ sớm ngay khi cây còn non vì vi khuẩn nốt sần cần xâm nhiễm vào rễ non để hình thành nốt sần. Các chế phẩm vi sinh vật bảo vệ thực vật được dùng chủ yếu bằng phương pháp này. Tuy nhiên khi sử dụng phương pháp tưới phun phải cần lượng chế phẩm lớn hơn so với các phương pháp khác.

Chương năm

CHẾ PHẨM VI SINH VẬT LÀM PHÂN BÓN VÀ CẢI TẠO ĐẤT

A. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ (Phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm sinh học)

I. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ



Hình 3: Vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| I. Quá trình cố định nitơ phân tử | III. Quá trình nitrat hóa |
| II. Quá trình amôn hóa | IV. Quá trình phản nitrat hóa |

Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không chỉ đối với cây trồng, mà ngay cả đối với vi sinh vật. Nguồn dự trữ nitơ trong tự nhiên rất lớn, chỉ tính riêng trong không khí nitơ chiếm khoảng 78,16% thể tích. Người ta ước tính trong bầu không khí bao trùm lên một ha đất đai chứa khoảng 8 triệu tấn nitơ, lượng nitơ này có thể cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng hàng chục triệu năm nếu như cây trồng đồng hoá được chúng.

Trong cơ thể các loại sinh vật trên trái đất chứa khoảng $10 - 25 \cdot 10^9$ tấn nitơ. Trong các vật trั̂m tích chứa khoảng $4 \cdot 10^{15}$ tỷ tấn nitơ. Nhưng tất cả nguồn nitơ trên cây trồng đều không tự đồng hoá được mà phải nhờ vi sinh vật. Thông qua hoạt động sống của các loài vi sinh vật, nitơ nằm trong các dạng khác nhau được chuyển hoá thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng.

Hàng năm cây trồng lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitơ. Bằng cách bón phân người trả lại cho đất được khoảng $> 40\%$, lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitơ do hoạt động sống của vi sinh vật. Vì vậy việc nghiên cứu, sử dụng nguồn đạm sinh học này được xem là một giải pháp quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt trong sự phát triển nền nông nghiệp bền vững của thế kỷ 21 này. Người ta gọi quá trình chuyển hoá nitơ phân tử trong không khí thành đạm là **quá trình cố định nitơ phân tử**.

II. QUÁ TRÌNH CỐ ĐỊNH NITO PHÂN TỬ VÀ CƠ CHẾ

Quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình đồng hoá nitơ của không khí thành đạm amôn dưới tác dụng của một số nhóm vi sinh vật có hoạt tính Nitrogenaza.

Bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử được Hellrigel và Uynfac tìm ra năm 1886. Có hai nhóm VSV tham gia đó là: (1) nhóm sinh vật sống tự do và hội sinh và (2) nhóm vi sinh vật cộng sinh.

1. Quá trình cố định nitơ phân tử nhờ vi sinh vật sống tự do và hội sinh

Là quá trình đồng hoá nitơ của không khí dưới tác dụng của các chủng giống VSV sống tự do và hội sinh.

Thuộc về nhóm này có tới hàng nghìn chủng VSV khác nhau, trong đó phải kể đến một số VSV sau:

1) Vi khuẩn Azotobacter. Năm 1901, nhà bác học Beyjeirinh đã phân lập được từ đất một loài VSV có khả năng cố định nitơ phân tử cao ông đặt tên cho loài VSV này là *Azotobacter*. Vi khuẩn *Azotobacter* khi nuôi cấy ở môi trường nhân tạo thường biểu hiện tính đa hình, khi còn non có tiên mao, có khả năng di động được nhờ tiên mao (Flagellum). Là vi khuẩn hình cầu (song cầu khuẩn), gram âm không sinh nha bào, hảo khí, có kích thước tế bào dao động 1,5 - 5,5 μ m, khuẩn lạc dạng S màu trắng trong, lồi, nhày. Khi già khuẩn lạc có màu vàng lục hoặc màu nâu thẫm, tế bào được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác, gấp điều kiện thuận lợi nang xác này sẽ nứt ra và tạo thành các tế bào mới.

Vi khuẩn *Azotobacter* thích ứng ở pH 7,2 ÷ 8,2, ở nhiệt độ 28 ÷ 30°C, độ ẩm 40 ÷ 60%. *Azotobacter* đồng hoá tốt các loại đường đơn và đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường gluco nó có khả năng đồng hoá được 8 - 18 mg N. Ngoài ra *Azotobacter* còn có khả năng tiết ra một số vitamin thuộc nhóm B như B₁, B₆..., một số acid hữu cơ như: acid nicotinic, acid pantotenic, biotin, auxin. Các loại chất kháng sinh thuộc nhóm Anixomyxin.

Thuộc về giống *Azotobacter* có rất nhiều loài khác nhau: *Azotobacter chrococcum*; *Azotobacter acidum*; *Azotobacter araxii*; *Azotobacter nigricans*; *Azotobacter galophilum*; *Azotobacter unicapsulare*...

2) Vi khuẩn Beijerinskii. Năm 1893 nhà bác học Ấn Độ Stacke đã phân lập được một loài vi khuẩn ở ruộng lúa nước pH rất chua có khả năng cố định nitơ phân tử, ông đặt tên là vi khuẩn *Beijerinskii*. Vi khuẩn *Beijerinskii* có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que, gram âm không sinh nha bào, hảo khí, một số loài có tiên mao có khả năng di động được. Kích thước tế bào dao động 0,5 - 2,0 × 1,0 - 4,5 μ m, khuẩn lạc thuộc nhóm S, rất nhày, lồi không màu hoặc màu nâu tối khi già, không tạo nang xác.

Vi khuẩn *Beijerinskii* có khả năng đồng hoá tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường gluco nó có khả năng cố định được 5 - 10 mgN.

Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijerinskii* có tính chống chịu cao với acid, nó có thể phát triển ở môi trường pH = 3, nhưng vẫn phát triển ở pH trung tính hoặc kiềm yếu, vi khuẩn *Beijerinskii* thích hợp ở độ ẩm 70 - 80% ở nhiệt độ 25 ÷ 28°C. Vi khuẩn *Beijerinskii* phân bố rộng trong tự nhiên, nhất là ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới.

3) Vi khuẩn Clostridium. Năm 1939 nhà bác học người Nga Vinogradskii đã phân lập tuyển chọn được một loài vi khuẩn yếm khí, có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho loài vi khuẩn này là vi khuẩn *Clostridium*. Đây là loài trực khuẩn gram dương, sinh nha bào, khi sinh nha bào nó kéo méo tế bào. Kích thước tế bào dao động 0,7 ÷ 1,3 × 2,5 ÷ 7,5 μ m, khuẩn lạc thuộc nhóm

S, màu trắng đục, lồi nhày. Vi khuẩn *Clostridium* ít mẫn cảm với môi trường, nhất là môi trường thừa P, K, Ca và có tính ổn định với pH, nó có thể phát triển ở pH 4,5 ÷ 9, độ ẩm thích hợp 60 - 80%, nhiệt độ 25 - 30°C. Vi khuẩn *Clostridium* đồng hoá tốt tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ, cứ 1 gam đường gluco thì đồng hoá được 5 - 12 mgN.

Vi khuẩn *Clostridium* có rất nhiều loài khác nhau: *Clostridium butyrium*; *Clostridium beijerinckii*; *Clostridium pectinovorum*...

2.2. Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh

Là quá trình đồng hóa nitơ trong không khí dưới tác dụng của các loài vi sinh vật cộng sinh với cây bộ đậu có hoạt tính Nitrogenaza.

Mối quan hệ đặc biệt này được gọi là mối quan hệ cộng sinh, trong tự nhiên thường gặp nhiều mối quan hệ cộng sinh khác nhau như: Mối cộng sinh giữa nấm và tảo (địa y); mối quan hệ giữa vi khuẩn nốt sần với cây họ đậu...

Từ xa xưa con người đã biết áp dụng những quy luật tất yếu này vào trong sản xuất, họ đã biết trồng luân canh hoặc xen canh giữa cây họ đậu với cây hoa thảo để thu được năng suất cây trồng cao và bồi bổ độ phì cho đất.

Năm 372 - 287 trước Công nguyên, nhà triết học cổ Hy Lạp (theo Pharates) trong tập “Những quan sát về cây cối” đã coi cây họ đậu như vật bồi bổ lại sức lực cho đất. Ở Việt Nam, trong cuốn “Vân đài loại ngữ” (1773) Lê Quý Đôn đã đề cập đến phép làm ruộng: “Thứ nhất là trồng đậu xanh thứ hai là trồng đậu nhỏ và vững”.

Năm 1886, Hellriegel và Uynfac đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Họ đã chứng minh được khả năng của cây họ đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần (VKNS) sống ở vùng rễ cây họ đậu. Họ đặt tên cho loài VSV này là *Bacillus radicicola*. Năm 1889, Pramovskii đã đổi tên VSV này là *Bacterium radicicola*. Cuối năm 1889 Frank đề nghị đổi tên là *Rhizobium*.

Vi khuẩn *Rhizobium* là loại trực khuẩn gram âm không sinh nha bào, hảo khí. Kích thước tế bào dao động $0,5 \div 1,2 \times 2,0 \div 3,5 \mu\text{m}$, khuẩn lạc thuộc nhóm S, nhày lồi, màu trắng trong hoặc trắng đục, kích thước khuẩn lạc dao động $2,3 \div 4,5 \text{ mm}$ sau một tuần nuôi trên môi trường thạch bằng. Vi khuẩn *Rhizobium* có tiên mao, có khả năng di động được, chúng thích hợp ở pH từ $6,5 \div 7,5$, nhiệt độ $25 \div 28^\circ\text{C}$, độ ẩm $50 \div 70\%$. Khi già có một số loài tạo được nang xác, khuẩn lạc sẽ chuyển sang màu nâu nhạt. Vi khuẩn *Rhizobium* gồm nhiều loài khác nhau: *Rh. leguminosarum*; *Rh. phaseoli*; *Rh. trifolii*; *Rh. lupini*; *Rh. japonicum*; *Rh. meliloti*; *Rh. cicer*; *Rh. simplese*; *Rh. vigna*; *Rh. robinii*; *Rh. lotus*...

Hiện nay người ta tạm chia VKNS thành 4 nhóm lớn:

+ *Sinorhizobium fredy* là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra axit, hay là chúng làm axit hóa môi trường.

+ *Bradyrhizobium* là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra chất kiềm, hay là chúng làm kiềm hóa môi trường.

+ *Agrobacterium* và *Phyllobacterium*, hai giống này là VKNS nhưng không cộng sinh ở cây họ đậu, mà cộng sinh ở rễ-thân-kẽ lá cây rừng và những cây thuỷ hải sản. Hai giống này không có ý nghĩa nhiều trong nông nghiệp.

2.3. Các VSV cố định nitơ phân tử khác

Ngoài những giống VSV 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.

*** Vi khuẩn:**

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí: *Azotomonas insolita*; *Azotomonas fluorescens*; *Pseudomonas azotogenis*; *Azospirillum*...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí không bắt buộc: *Klebsiella pneumoniae*; *Aerobacter aerogenes*...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử ky khí quang hợp: *Rhodospirillum rubrum*; *Chromatium* sp.; *Chlorobium* sp.; *Rhodomicrobium* sp.,...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử ky khí không quang hợp: *Desulfovibrio desulfuricans*; *Methanobacterium* sp.

* **Xạ khuẩn:** Một số loài thuộc giống: *Streptomyces*; *Actinomyces*; *Frankia*; *Nocardia*; *Actinopolyspora*; *Actinosynoema*...

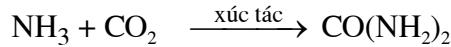
* **Nấm:** *Thodotorula*...

* **Tảo - Vi khuẩn lam:** *Glococapsa* sp.; *Lyngbyaps*; *Plectonema*; *Boyryanum*; *Anabaena azollae*; *Anabaena ambigua*; *Anabaena cycadae*; *Anabaena cylindrica*; *Anabaena farnilissima*; *Calothrix brevissima*; *Calothrix elenkii*; *Nostoccaloicola commune*; *Nostoccaloicola cycadae*; *Nostoccaloicola entophytum*; *Nostoccaloicola muscorum*; *Nostoccaloicola paludosum*...

Hình 4: Hình thái của một số chủng giống vi sinh vật cố định nitơ phân tử

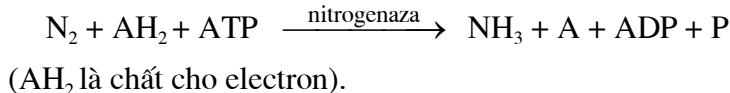
3. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử

Trong một thời gian dài, cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử là một bí ẩn đầy hấp dẫn của tự nhiên. Trong khi con người phải sử dụng những điều kiện kỹ thuật rất cao, rất tốn kém ($400 \div 500^{\circ}\text{C}$, $200 \div 1000\text{atm}$ với những chất xúc tác rất đắt tiền) để phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ để có phân đạm hoá học, bằng cách tổng hợp từ:

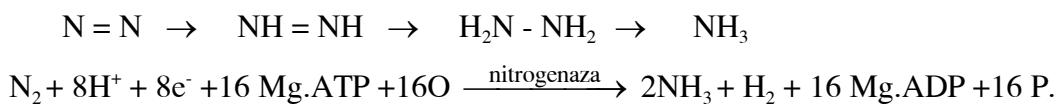


Trong khi đó VSV với sự trợ giúp của hoạt tính Nitrogenaza lại phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ một cách dễ dàng ngay trong điều kiện rất bình thường về nhiệt độ và áp suất. Phân tử nitơ có năng lượng là $9,4 \times 10^5 \text{ J/mol}$.

Có thể nói quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình khử N_2 thành NH_3 có xúc tác của enzyme nitrogenaza, khi có mặt của ATP.



Năm 1992 các nhà khoa học đã hoàn thiện được cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử như sau:



Nitrogenaza được cấu tạo bởi hai phần:

- F_c - protein có trọng lượng phân tử lượng khoảng $6 \cdot 10^4$.
- M_o - F_c - protein có trọng lượng phân tử lượng khoảng $2,2 \cdot 10^5$.

4. Phân vi sinh vật cố định nitơ phân tử (đạm sinh học)

Vài thập kỷ nay, ở Việt Nam chế phẩm VSV và phân VSV cố định nitơ đã được nhiều người dân biết đến, những loại chế phẩm này đã thực sự góp phần làm tăng năng suất cây trồng và tăng chất lượng nông sản và thúc đẩy phát triển nền nông nghiệp bền vững ở nước ta.

4.1. Định nghĩa

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ (Biological nitrogen fixing fertilizer) (tên thường gọi: phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống (tự do, hội sinh, cộng sinh, ký khí hoặc hiếu khí) đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng; tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

4.2. Quy trình sản xuất

4.2.1. Phân lập tuyển chọn chủng VSVCĐN

Muốn có chế phẩm VSVCĐN tốt phải có chủng VSV có cường độ cố định nitơ cao, sức cạnh tranh lớn, thích ứng ở pH rộng, phát huy được ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Vì vậy công tác phân lập tuyển chọn chủng VSVCĐN và đánh giá đặc tính sinh học của các chủng khuẩn là việc làm không thể thiếu được trong quy trình sản xuất chế phẩm VSVCĐN.

Thông thường đánh giá một số chỉ tiêu sau: Thời gian mọc; kích thước khuẩn lạc và kích thước tế bào VSV; điều kiện sinh trưởng phát triển (nhu cầu dinh dưỡng, nhu cầu oxy, pH và nhiệt độ thích hợp); khả năng cạnh tranh và cường độ cố định nitơ phân tử. Chủng giống vi sinh vật sau khi tuyển chọn được bảo quản phù hợp với yêu cầu của từng loài và sử dụng cho sản xuất chế phẩm dưới dạng chủng giống gốc. Quy trình sản xuất chế phẩm VSVCĐN được tóm tắt trong (hình 5).

4.2.2. Nhân sinh khối

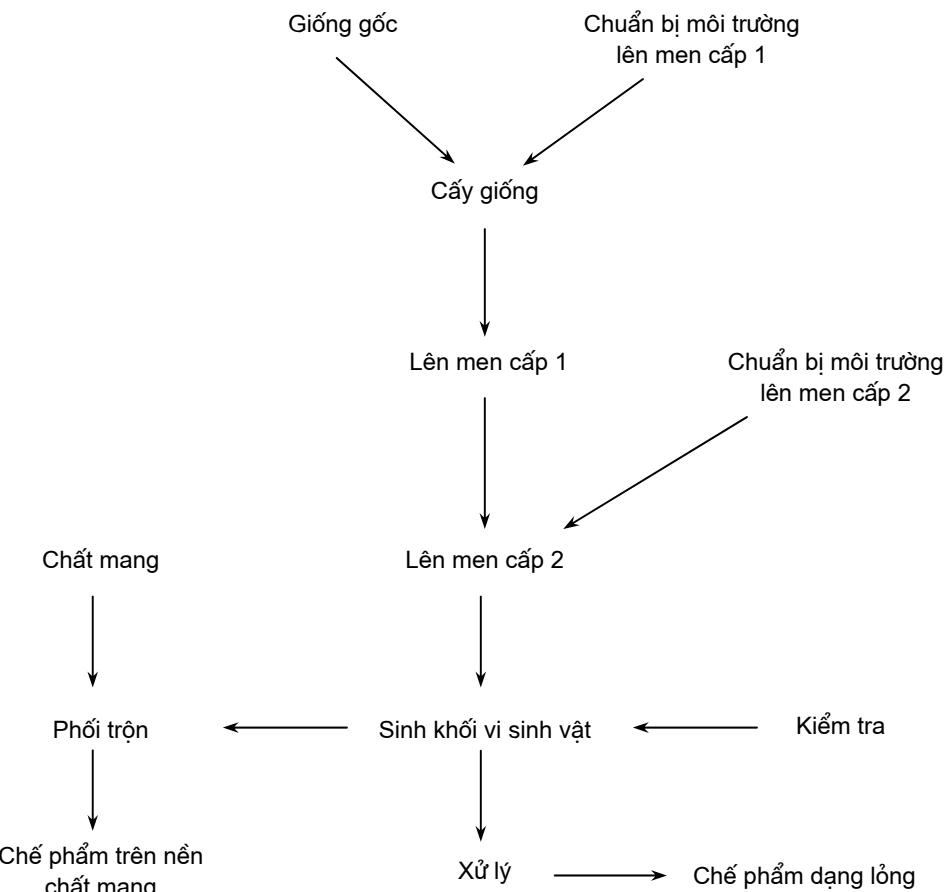
Từ chủng vi sinh vật tuyển chọn người ta tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men xốp. Sinh khối vi sinh vật cố định nitơ được nhân qua cấp 1, 2, 3 trong các điều kiện phù hợp với từng chủng loại vi sinh vật và mục đích sản xuất. Các sản phẩm phân vi sinh vật sản xuất từ vi khuẩn được tạo ra chủ yếu bằng phương pháp lên men chìm (Submerged culture). Các công đoạn chính trong sản xuất được tóm tắt theo sơ đồ 1. Trong sản xuất công nghiệp môi trường dinh dưỡng chuẩn không được sử dụng vì giá thành quá cao. Các nhà sản xuất đã phải tìm môi trường thay thế từ các nguồn vật liệu sẵn có đó là: Tinh bột ngọt, sắn, rỉ mít, nước chiết ngọt, thay cho nguồn dinh dưỡng cacbon, nước chiết men, nước chiết đậu tương, amoniac thay cho nguồn dinh dưỡng nitơ. Walter thuộc công ty W.R. Grace (Hoa Kỳ) (1996) đã tổng kết được một số môi trường tổng hợp trong sản xuất phân vi sinh vật từ vi khuẩn. Thành phần môi trường phù hợp với từng đối tượng vi khuẩn được trình bày trong (bảng 3).

Trong quá trình sản xuất việc kiểm tra và điều chỉnh các yếu tố môi trường (pH, liều lượng, tốc độ khí, áp suất, nhiệt độ...) là hết sức cần thiết. Các yếu tố này theo Walter (1996) nên được điều chỉnh tự động. Các hệ thống lên men hiện nay đã được trang bị hiện đại có công suất từ hàng chục đến hàng trăm ngàn lít.

Trên cơ sở nghiên cứu, khảo sát tình hình thực tế ở một số quốc gia gần đây, Viện cố định nitơ sinh học (NifTAL - Hoa Kỳ) và Trung tâm cố định nitơ (Úc) đã nghiên cứu và chế tạo thành công nồi lên men đơn giản để tạo ra sinh khối vi khuẩn có thể sử dụng trong điều kiện bán công nghiệp ở các nước phát triển. Nồi lên men đơn giản kiểu này đang được sử dụng tại Thái Lan, Ấn Độ và một số quốc gia khác trong đó có Việt Nam.

4.2.3. Xử lý sinh khối, tạo sản phẩm

Sinh khối vi sinh vật được phối trộn với chất mang vô trùng (hoặc không vô trùng) để tạo ra chế phẩm trên nền chất mang vô trùng (hoặc không vô trùng), hay được bổ sung các chất phụ gia, chất dinh dưỡng, bảo quản để tạo ra chế phẩm dạng lỏng hoặc cô đặc, làm khô để tạo ra chế phẩm dạng đông khô hoặc khô.



Hình 5: Quy trình sản xuất phân vi khuẩn (Bacterial soil inoculant)

Để đảm bảo chất lượng trong quá trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật nói chung và chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ nói riêng cần thiết phải kiểm tra chất lượng ở các công đoạn sản xuất sau:

- Giống gốc và lén men cấp 1;
- Lựa chọn chất mang và chuẩn hoá chất mang;
- Lén men sinh khối;
- Xử lý và phơi trộn sinh khối;
- Đóng gói và bảo quản.

Bảng 4: Môi trường tổng hợp sử dụng trong sản xuất phân vi khuẩn

Loại vi khuẩn	Thành phần môi trường	Tác giả
Pseudomonas	Nước thuỷ phân đậu, thịt	Bashan (1986)
Azospirillum	10g/l glycerol	
Bacillus subtilis	50 g/l nước thuỷ phân tinh bột 20g/l Casein 3,3 g/l Na ₂ HPO ₄	Atkinson and Mavitune (1993)
Rhizobium	20g/l nước chiết men 10g/l Manitol	Somasegara (1985)

4.2.4. Công tác kiểm tra chất lượng và yêu cầu chất lượng đối với chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ

Yêu cầu chất lượng đối với chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ nói riêng và phân bón vi sinh vật nói chung là phải có hiệu quả đối với đất và cây trồng, nghĩa là có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng phát triển của cây trồng, đến năng suất hoặc chất lượng nông phẩm hoặc độ phì của đất. Mật độ vi sinh vật chuyên tính trong sản phẩm phải bảo đảm các tiêu chuẩn ban hành. Tuỳ theo điều kiện của từng quốc gia, mật độ vi sinh vật chuyên tính trong 1 gam hoặc mililit chế phẩm dao động $10.000.000 \div 1.000.000.000$ đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và $100.000 \div 1.000.000$ đối với chế phẩm trên nền chất mang không khử trùng. Theo tiêu chuẩn Việt Nam mật độ vi sinh vật chuyên tính trong chế phẩm phải đạt 10^8 đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và 10^5 đối với chế phẩm trên nền chất mang không khử trùng. Tuỳ theo yêu cầu của từng nơi, người ta còn đưa thêm các tiêu chuẩn kỹ thuật khác đối với từng loại chế phẩm cụ thể như khả năng cố định nitơ trong môi trường chứa 10g đường (đối với Azotobacter) hoặc khả năng tạo nốt sần trên cây chủ đối với vi khuẩn nốt sần...

4.3. Phương pháp sử dụng chế phẩm VSVCĐN

Có rất nhiều cách bón chế phẩm VSVCĐN khác nhau, dựa vào từng loại cây trồng khác nhau sao cho hiệu quả cao nhất.

+ Đối với chế phẩm VSVCĐN tự do thường được hồ vào hạt hoặc rễ cây khi còn non, hay bón trực tiếp vào đất. Nhưng nhìn chung bón càng sớm càng tốt.

+ Đối với chế phẩm VSVCĐN cộng sinh thường được trộn vào hạt giống trước khi gieo hạt hoặc tưới phủ sớm không muộn quá 20 ngày sau khi cây mọc.

4.3.1. Bón chế phẩm VSVCĐN vào đất

Theo phương pháp này có nhiều cách bón chế phẩm VSVCĐN :

+ Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhão tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi reo hạt trên ruộng cạn; hoặc rắc đều ra mặt ruộng ruộng nước.

+ Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng hoai, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); hoặc rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Người ta có thể trộn chế phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng hoai, sau đó đem bón thúc sớm cho cây (càng bón sớm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích vào đất.

4.3.2. Phương pháp phun chế phẩm VSVCĐN lên cây hoặc vào đất

Theo phương pháp này, khi cây đã nẩy mầm, dùng chế phẩm hoà vào nước sạch tưới trực tiếp vào cây hay vào đất (người ta thường gọi là phương pháp tưới phủ sớm).

Có rất nhiều tên gọi chế phẩm VSVCĐN khác nhau: Nitragin; Riđafo; Rhizobin; Rizolu; Azotobacterin; Flavobacterin; Azogin; Enterobacterin...

4.4. Hiệu quả của chế phẩm VSVCĐN

4.4.1. Phân vi khuẩn nốt sần

Cố định nitơ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây bộ đậu hàng năm cung cấp thêm cho đất và cây trồng $40 \div 552 \text{ kgN/ha}$. Kết quả nghiên cứu của Viện cây trồng nhiệt đới Cộng hoà liên bang Nga cho thấy : cứ 3 năm trồng cây đậu đỗ làm giàu cho đất 300 - 600 kg N/ha; cho 13-15 tấn mùn; cải thiện quá trình khoáng hoá trong đất và đẩy ra từ keo đất 60 - 80 kg P₂O₅/ha; 80 - 120 kg K₂O/ha. Bón chế phẩm VSVCĐN làm giàu cho đất 50 - 120 kg N/ha/năm. Có thể thay thế được 20 - 60 kg đạm Urê/ha, giảm tỷ lệ sâu bệnh từ 25 đến 50% so với không bón phân VSV.

Trong hơn 20 năm qua các công trình nghiên cứu và thử nghiệm phân vi khuẩn nốt sần tại Việt Nam cho thấy: phân vi khuẩn nốt sần có tác dụng nâng cao năng suất lạc vỏ 13,8 - 17,5% ở các tỉnh phía Bắc và miền Trung và 22% ở các tỉnh miền Nam. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sử dụng phân vi khuẩn nốt sần kết hợp với lượng đạm khoáng tương đương 30 - 40 kgN/ha mang lại hiệu quả kinh tế cao, năng suất lạc trong trường hợp này có thể đạt tương đương như khi bón 60 và 90 kgN/ha. Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần thể hiện đặc biệt rõ nét trên vùng đất nghèo dinh dưỡng và vùng đất mới trồng cây bộ đậu. Lợi nhuận do phân vi khuẩn nốt sần được xác định đạt 442.000VNĐ/ha với tỷ lệ lãi suất/1đồng chi phí đạt 9,8 lần (Ngô Thế Dân và Ctv., 2001).

Bảng 5: Khả năng cố định nitơ của một số cây bộ đậu chính trên đồng ruộng^(*)

Cây bộ đậu		Lượng đạm cố định (kg/N/ha/năm)
Lạc	<i>Arachis hypogaea</i>	72-124
Đậu lông	<i>Calopogonium mucunoides</i>	370-450
Đậu răng ngựa	<i>Vicia faba</i>	45-552
Đậu sắng	<i>Cajanus cajan</i>	168-280
Đậu Cowpea	<i>Vigna unguiculata</i>	73-354
Đậu giá (đậu xanh)	<i>Vigna mungo</i>	63-342
Đậu nành	<i>Glycine max</i>	60-168
Chick pea	<i>Cicer arrietinum</i>	103
Lentil	<i>Lens esculenta</i>	88-114

Đậu Hà Lan	<i>Pisum sativum</i>	52-77
Đậu hoè	<i>Phaseolus vulgaris</i>	40-70

(*) Nguồn: FAO, 1984.

Bảng 5a: Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần tại một số vùng trồng lạc ở miền Bắc^(*)

Loại đất	Điều kiện thí nghiệm	Năng suất lạc vỏ (tạ/ha)		Hiệu lực của phân VKNS (tạ/ha)	So với đối chứng (%)
		Đối chứng	Phân VKNS		
Bạc màu	P60, K60, N20-30, 5 tấn p.chuồng	19,72	22,72	3,0	115,2
Phù sa sông Hồng	P60, K60, N30, 5 tấn p. chuồng	23,1	26,31	3,21	113,8
Đất đồi Feralit	P60, K60, N20-30, 5 tấn p. chuồng	15,76	18,53	3,76	117,5

(*) Nguồn: Ngô Thế Dân và Ctv., 2000.

Bảng 5b: Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần tại một số vùng trồng lạc ở miền Nam^(*)

Hệ thống đất canh tác	Điều kiện thí nghiệm	Năng suất lạc vỏ (tạ/ha)		Hiệu lực của phân VKNS (tạ/ha)	So với đối chứng (%)
		Đối chứng	Phân VKNS		
Đất mới	P60, K60, N30, 5 tấn phân chuồng, 5 tấn vôi	15,6	17,8	2,2	114
Luân canh lúa - lạc	P60, K60, N30, 5 tấn phân chuồng, 5 tấn vôi	5,0	6,6	1,6	131
Luân canh lúa - lạc	P60, K60, N30, 5 tấn phân chuồng, 1 tấn vôi	6,1	6,5	0,4	106
Luân canh rau - lạc	100 kg SA, 70kg KCl, 150 kg tro dừa	14,1	16,95	2,85	120
Luân canh rau - lạc	P60, K40, N20, 500kg vôi	14,7	16,3	1,7	111
Luân canh rau - lạc	40kg Ure, 300kg lân, 400kg vôi, 3 tấn phân chuồng	—	—		138
Luân canh lúa (rau) - lạc	P60, K40, N30, 3 tấn phân chuồng, 100kg vôi	22,0	24,6	2,6	112

(*) Nguồn: Ngô Thế Dân và Ctv., 2000.

Bảng 6: So sánh hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần với các liều lượng đạm khoáng khác nhau^(*)

Công thức bón	Tổng số quả (quả/cây)	Số quả chắc (quả/cây)	Năng suất (tạ/ha)
Nền + 30N	15,5	7,0	18,61
Nền + 30N + VKNS	16,9	7,5	20,50
Nền + 60N	16,9	7,2	18,50
Nền + 90N	18,2	6,9	19,11

Nền: P60 + K60 + 8 tấn phân chuồng + 400kg vôi.

(*) Nguồn: Ngô Thế Dân và Ctv., 2000).

Đối với đậu tương và các cây bộ đậu khác phân vi khuẩn nốt sần cũng có tác dụng tương tự. Kết quả khảo nghiệm phân vi khuẩn nốt sần tại Thuận Thành - Bắc Ninh năm 2000 cho thấy năng suất hạt đậu tương bình quân ở công thức đối chứng (không bón phân hữu cơ vi sinh) là

52,15 kg/1 sào, trong khi đó ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đạt 58,42 kg/sào, tăng 6,26 kg, tương đương với 12%. Trong 20 hộ được thử nghiệm, thì có 5 hộ cho năng suất tăng từ 7 đến 10%, 1 hộ cho năng suất tăng trên 25% và 14 hộ cho năng suất tăng từ 10 đến 15%. Lãi suất do sử dụng chế phẩm vi khuẩn nốt sần đối với đậu xanh đạt 4,0-11,0đ/1đ chi phí trong vụ xuân và 1,4-3,3đ/1đ chi phí trong vụ hè.

Bảng 7: Hiệu quả kinh tế của phân VKNS đối với đậu xanh^(*)

Loại đất	Vụ xuân		Vụ hè	
	Hiệu quả do VKNS	Lãi suất/đồng chế phẩm	Hiệu quả do VKNS	Lãi suất/đồng chế phẩm
P _s ^h (5 vụ)	435 000	9,7	100 000	2,2
P _s ^m (3 vụ)	180 000	4,0	70 000	1,6
B hb (3 vụ)	495 000	11,0	150 000	3,3
C biển (3 vụ)	185 000	4,1	65 000	1,4
BQ (14 vụ)	325 000	7,2	95 000	2,1

(*) Nguồn: Đề tài cấp nhà nước KC 08-01.

Vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh cũng được sử dụng cho các cây trồng lâm nghiệp. Kết quả nghiên cứu khả năng sử dụng *Frankia* cho cây lâm nghiệp tại Việt Nam trong thời gian gần đây cho thấy: cây phi lao được nhiễm chế phẩm đã tăng chiều cao từ 6,23 - 20,66%; tăng trọng lượng tươi 20,19 - 76,24% và trọng lượng khô 22,29 - 81,59% (bảng 8).

Bảng 8: Ảnh hưởng của *Frankia* đến sinh trưởng phát triển của phi lao^()**

Loại chế phẩm	Tỷ lệ cộng sinh (%)	Cao cây (cm)	Trọng lượng cây (g/cây)	
			Tươi	Khô
ĐC	0	87,45 a	15,70 a	5,16 a
Fr 1	68,4	105,52 d	27,67 c	9,37 c
Fr 2	55,2	93,90 b	18,98 ab	6,83 abc
Fr 3	63,7	98,25 c	25,68 bc	8,46 bc
Fr 4	61,5	95,79 bc	23,10 abc	7,66 abc
Fr 5	50,1	92,90 b	18,87 ab	6,31 ab

Trên cùng một cột các giá trị theo sau cùng một chữ cái không có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%.

(**) Nguồn: Đề tài KHCN.02.06.

4.4.2. Phân vi sinh vật cố định nitơ khác

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ hội sinh và tự do có tác dụng tốt đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Tại Ấn Độ, sử dụng phân vi sinh vật cố định nitơ cho lúa, cao lương và bông làm tăng năng suất trung bình 11,4%, 18,2% và 6,8% đã mang lại lợi nhuận 1015 rupi, 1149 rupi và 343 rupi/ha. Tại Liên bang Nga, bón chế phẩm VSVCĐN năng suất nông sản tăng: khoai tây 12,8 tạ/ha; cà chua 28,0 tạ/ha; ngô hạt 22,4 tạ/ha và bắp cải 75,2 tạ/ha.

Ở Việt Nam các thử nghiệm sử dụng phân vi sinh vật cố định nitơ hội sinh (Azogin) ở 15 tỉnh miền Bắc, miền Trung và miền Nam trên diện tích hàng chục ngàn hecta cho thấy: trong cùng điều kiện sản xuất, ruộng lúa được bón phân VSVCĐN đều tốt hơn so với đối chứng, biểu hiện: bộ lá phát triển tốt hơn; tỷ lệ nhánh hữu hiệu, số bông/khóm nhiều hơn đối chứng. Năng suất hạt

tăng so với đối chứng 6 - 12%, nhiều nơi đạt 15 - 20%. Những ruộng bón phân VSVCĐN giảm bớt 1kg đạm urê cho mỗi sào năng suất vẫn tăng so với đối chứng. Đối với rau (xà lách, rau diếp, khoai tây...), bón phân VSVCĐN cũng làm tăng sản lượng thu hoạch 20 - 30%. Việc bón phân VSVCĐN còn làm tăng khả năng chống chịu của cây và giảm lượng nitrat tồn dư trong rau. Hiệu quả kinh tế do sử dụng phân VSVCĐN là rõ rệt. Nếu đầu tư 1 đồng cho việc sử dụng phân vi sinh cho cây lúa, lãi suất thu về từ 16,2 đến 19,1 đồng.

Bảng 9: Hiệu quả sử dụng phân vi sinh vật đối với một số cây trồng^(*)

Đất và cây trồng	Công thức bón phân	Năng suất (tạ/ha)	tăng so với đối chứng (%)
Lúa trên đất phù sa sông Hồng	Nền (NPK: 90.90.60 + 8t P/c).	51,60	–
	80% nền + phân VKCĐN	53,73	4,0
	Nền + phân VKCĐN	57,86	12,0
Lúa trên đất bạc màu Hà Bắc	Nền (NPK: 90.90.60 + 8t P/c).	37,76	–
	80% nền + phân VKCĐN	39,86	6,0
	Nền + phân VKCĐN	44,59	18,0
Ngô trên đất phù sa sông Hồng	Nền (NPK: 180.120.90 + 8t P/c)	41,45	–
	80% nền + phân VKCĐN	41,73	1,0
	Nền + phân VKCĐN	46,85	13,0
Ngô trên đất bạc màu Hà Bắc	Nền (NPK: 180.120.90 + 8t P/c)	36,98	–
	80% nền + phân VKCĐN	37,42	1,0
	Nền + phân VKCĐN	39,88	8,0
Chè trên đất đỏ vàng Thái Nguyên	Nền (NPK: 120.90.60)	142,90	–
	80% nền + phân VKCĐN	155,34	9,0
	Nền + phân VKCĐN	178,21	25,0

(*) Nguồn: Đề tài KHCN.02.06.

Bón phân vi sinh vật cố định nitơ cho cây trồng có thể thay thế một phần phân đạm khoáng. Số liệu nghiên cứu của các đề tài khoa học cấp Nhà nước KC.08.01 giai đoạn 1991-1995 và KHCN.02.06 giai đoạn 1996-2000 cho biết lượng phân đạm khoáng có thể tiết kiệm được như sau:

- Đất phù sa sông Hồng: vụ xuân 14,26 kgN/ha; vụ hè 10,80kgN/ha.
- Đất phù sa sông Mã: vụ xuân 15,28 kgN/ha; vụ hè 12,12kgN/ha.
- Đất bạc màu: vụ xuân 22,40 kgN/ha; vụ hè 16,60 kgN/ha.
- Đất cát ven biển: vụ xuân 17,46 kgN/ha; vụ hè 17,06 kgN/ha.

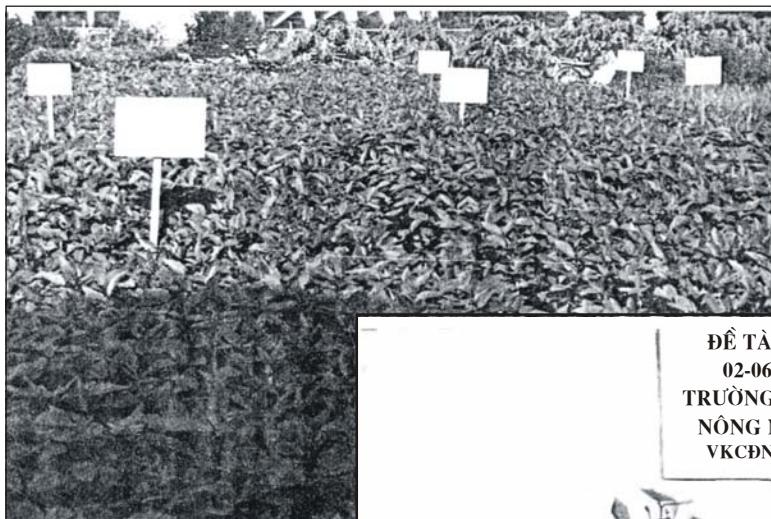
Bảng 10: Tác dụng của phân vi sinh trong việc chống chịu bệnh ở khoai tây^(*)

Công thức	Bệnh héo xanh VK (%)	Bệnh thối đen VK (%)	Bệnh lở cổ rễ do nấm (%)	Năng suất (tấn/ha)
Nền	3	10	12	18,00
Nền + 10%N	3	10	14	18,70
Nền + Klebsiella	2	6	7	18,90
Nền + Myzorin	2	5	6	19,35

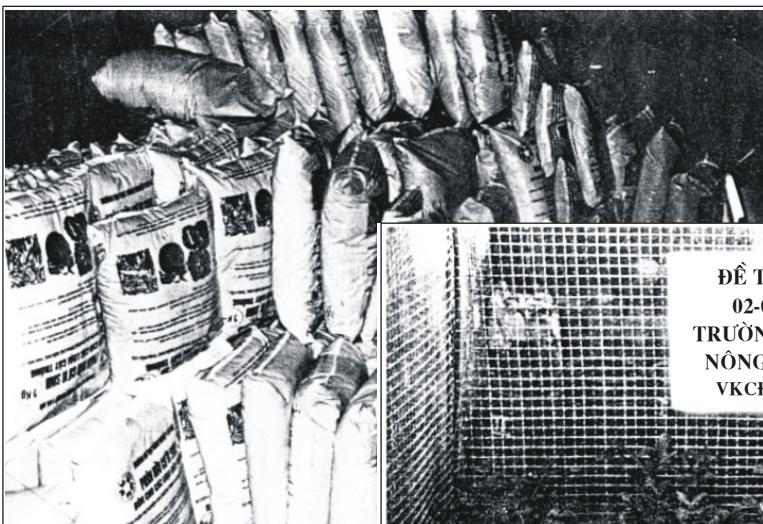
Nền + Pseudomonas	2	5	6	19,98
Nền + Azotobacter	1	5	6	19,60

(*) Nguồn: Đề tài KC.08.01.

Ngoài tác dụng nâng cao hiệu quả sử dụng và góp phần tiết kiệm một phần đáng kể phân bón vô cơ, thông qua các hoạt chất sinh học của chúng phân VSV còn có tác dụng điều hoà, kích thích quá trình sinh tổng hợp của cây trồng, đồng thời nâng cao sức đề kháng của cây trồng đối với một số sâu bệnh hại. Kết quả nghiên cứu trên cây khoai tây cho thấy VSV có tác dụng làm giảm đáng kể tỷ lệ sâu bệnh.



Hình 6: Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây đậu tương



Hình 7: Phân hữu cơ vi sinh đa chức năng và hiệu quả của loại phân này bón cho cây lạc



B. PHÂN VI SINH VẬT PHÂN GIẢI PHOSPHAT KHÓ TAN (Phân lân vi sinh)

I. QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ PHOSPHO

1. Các dạng phospho (lân) và vòng tuần hoàn của phospho

Lân là một trong những yếu tố quan trọng đối với cây trồng. Lân dễ tiêu trong đất thường không đáp ứng được nhu cầu của cây nhất là những cây trồng có năng suất cao. Bón phân lân và tăng cường độ hoà tan các dạng lân khó tiêu là biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Bón phân hữu cơ, vùi xác động vật vào đất ở mức độ nhất định là biện pháp tăng hàm lượng lân cho đất.

1.1. Lân hữu cơ

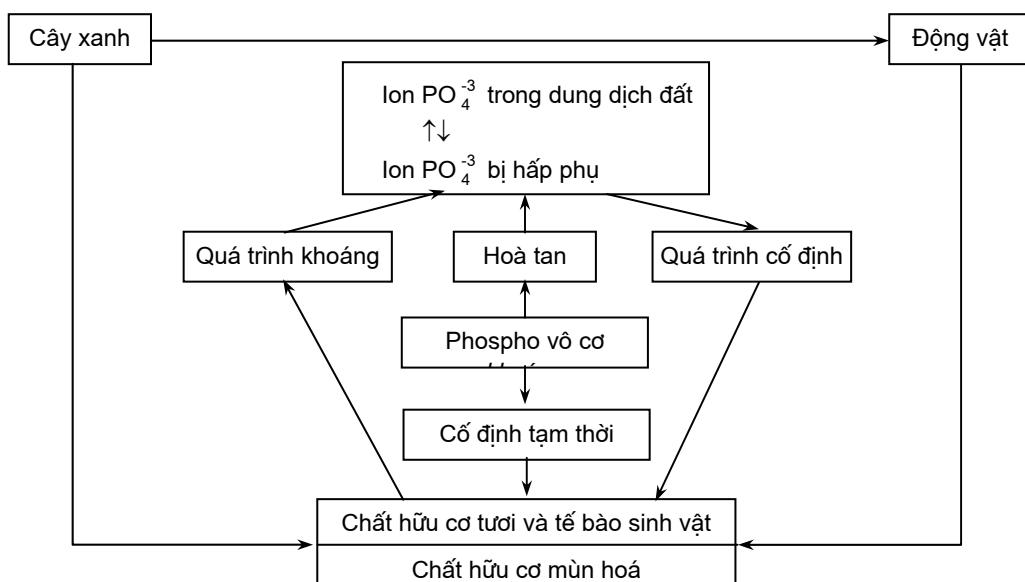
Lân hữu cơ có trong cơ thể động vật, thực vật, vi sinh vật thường gặp ở các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipit, axit nucleic. Trong không bào người ta còn thấy lân vô cơ ở dạng otoxophosphate làm nhiệm vụ đệm và chất dự trữ. Cây trồng, vi sinh vật không thể trực tiếp đồng hóa lân hữu cơ. Muốn đồng hóa chúng phải được chuyển hóa thành dạng muối H_3PO_4 .

1.2. Lân vô cơ

Lân vô cơ thường ở trong các dạng khoáng như apatit, phosphoric, phosphat sắt, phosphat nhôm... Muốn cây trồng sử dụng được phải qua chế biến, để trở thành dạng dễ tan.

Cũng như các yếu tố khác, P luôn luôn tuân hoà chuyển hoá. Nhờ vi sinh vật lân hữu cơ được vô cơ hóa biến thành muối của axit phosphoric. Các dạng lân này một phần được sử dụng, biến thành lân hữu cơ, một phần bị cố định dưới dạng lân khó tan như $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$. Những dạng khó tan này trong những môi trường có pH thích hợp sẽ chuyển hóa thành dạng dễ tan. Vi sinh vật giữ vai trò quan trọng trong quá trình này.

1.3. Vòng tuần hoàn phospho trong tự nhiên



Hình 8: Vòng tuần hoàn phospho trong tự nhiên

2. Sự chuyển hóa lân vô cơ

2.1. Thí nghiệm

Từ năm 1900 đã có nhiều nhà khoa học nghiên cứu vấn đề này. J. Stokelasa dùng đất đã tiệt trùng bón bột apatit và cấy vi khuẩn. Ông dùng *Bacillus megatherium*, *Bac. mycoides* và *Bacillus butyricus*. Sau khi cấy vi khuẩn và bón cho lúa mạch thấy có tăng năng suất.

Các chất dinh dưỡng khác đều ở dạng hoà tan. Còn P thì ở dạng không tan như phosphat bicanxi hay $Ca_3(PO_4)_2$.

Thí nghiệm theo 2 công thức:

- (1) Tiệt trùng các chậu sau đó gieo hạt với 1% đất không tiệt trùng;
- (2) Tiệt trùng các chậu và gieo hạt.

Ở công thức (1) cây đồng hoá P mạnh và cây phát triển tốt hơn. Điều đó chứng tỏ rằng ở đây có sự tác động của vi sinh vật trong quá trình phân giải các hợp chất lân khó tan.

Nhiều vi khuẩn như *P. seudomonas fluorescens*, vi khuẩn nitrat hoá, một số vi khuẩn hệ rễ, nấm, xạ khuẩn... cũng có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và bột apatit.

Ngoài ra trong quá trình lên men butyric, lên men lactic, quá trình lên men dấm, trong phân chuồng cũng có thể xúc tiến quá trình hoà tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Vi khuẩn vùng rễ phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mạnh.

Ở hệ rễ lúa mì thường có 30% vi khuẩn có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và lượng lân phân giải so với đối chứng tăng 6-18 lần.

2.2. *Vi sinh vật phân giải*

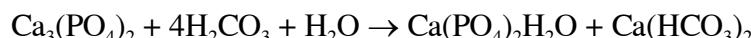
Vi khuẩn phân giải những hợp chất lân vô cơ khó tan thường gấp các giống: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*...

Bên cạnh các vi khuẩn và xạ khuẩn thì nấm cũng có tác dụng trong quá trình hoà tan hợp chất lân khó tan: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Sclerotium*.

2.3. *Cơ chế hoà tan phospho*

Đại đa số nghiên cứu đều cho rằng sự phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ có liên quan mật thiết với sự sản sinh axit trong quá trình sống của vi sinh vật. Trong đó axit cacbonic rất quan trọng. Chính H_2CO_3 làm cho $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải.

Quá trình phân giải theo phương trình sau:



Trong đất, vi khuẩn nitrat hoá và vi khuẩn chuyển hoá S cũng có tác dụng quan trọng trong việc phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Quá trình hoà tan các hợp chất lân khó tan có thể theo cơ chế: Lân khó tan được tạm thời đồng hoá vi sinh vật, sau đó lân được giải phóng khỏi vi sinh vật dưới dạng có thể đồng hoá cho cây trồng.

3. *Điều kiện ngoại cảnh*

+ *Độ pH*: Nhìn chung pH ảnh hưởng không nhiều đến vi sinh vật phân giải lân. Tuy nhiên ở pH 7,8 - 7,9 ảnh hưởng tốt đến sự phát triển của hệ vi sinh vật phân giải lân.

+ *Độ ẩm*: Ở những nơi ngập nước, hàm lượng axit hữu cơ cao (do hoạt động của vi sinh vật) làm tăng quá trình phân giải lân hữu cơ khó tan.

+ *Hợp chất hữu cơ*: Hàm lượng chất hữu cơ mùn hoá không ảnh hưởng đến quá trình phân giải lân. Hợp chất hữu cơ tươi làm tăng sự sinh trưởng của hệ vi sinh vật, dẫn đến tăng quá trình hoà tan hợp chất lân khó tan.

+ *Hệ rễ*: Hệ rễ cây trồng kích thích sự sinh trưởng phát triển của vi sinh vật. Do đó sự phân giải hợp chất lân khó tan cũng được tăng cường.

4. *Sự chuyển hoá lân hữu cơ*

4.1. *Các dạng lân hữu cơ thường gặp trong đất*

Trong đất các dạng lân hữu cơ thường gặp là: Phytin, axit nucleic, nucleoprotein, phospholipit.

a) Phytin và các chất họ hàng

Phytin là muối Ca và Mg của axit phytic. Trong đất những chất có họ hàng với phytin là inositol, inositolmonophosphat, inositoltriphosphat. Tất cả đều có nguồn gốc thực vật. Phytin và những chất có cùng họ hàng chiếm trung bình từ 40-80% phospho hữu cơ trong đất.

b) Axit nucleic và nucleoprotein

Những axit nucleic và nucleoprotein trong đất đều có nguồn gốc thực vật hoặc thực vật và nhất là vi sinh vật. Hàm lượng của chúng trong đất khoảng < 10%.

c) *Phospholipit*: Sự kết hợp giữa lipit và phosphat không nhiều trong đất.

4.2. Vi sinh vật

Giống Bacillus: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. malaberensis*.

B. megaterium không những có khả năng phân giải hợp chất lân vô cơ mà còn có khả năng phân giải hợp chất lân hữu cơ. Người ta còn dùng *B. megaterium* làm phân vi sinh vật.

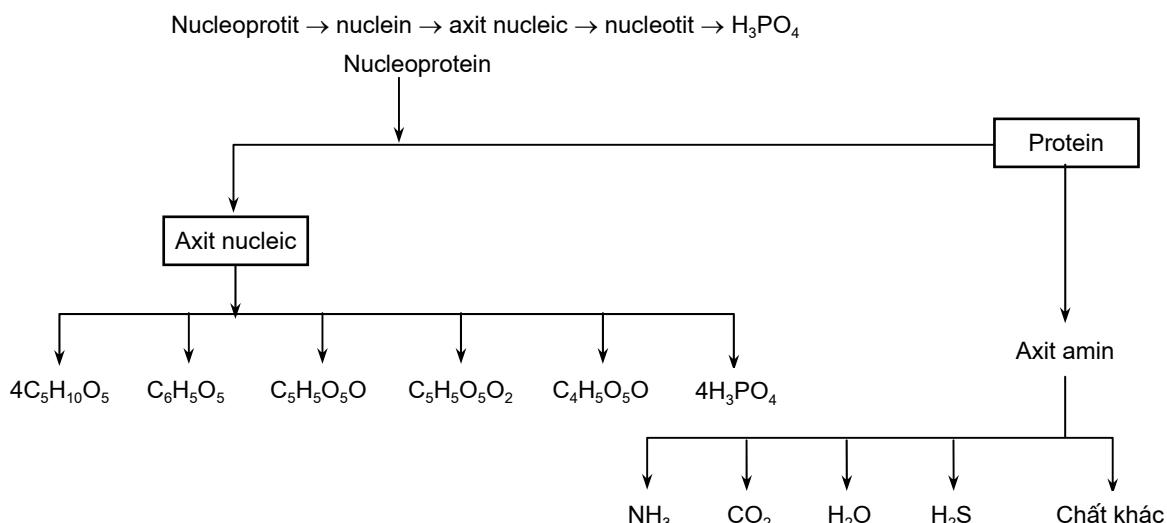
Ngoài ra còn các giống *Serratia*, *Proteus*, *Arthrobacter*...

Nám: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*...

Xa khuẩn: *Streptomyces*.

4.3. Cơ chế phân giải

Nhiều vi sinh vật đất có men dephosphorylaza phân giải phytin theo phản ứng sau:



II. PHÂN VI SINH VẬT PHÂN GIẢI PHOSPHAT KHÓ TAN (PHÂN LÂN VI SINH)

1. Định nghĩa

Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan là sản phẩm có chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật còn sống đạt tiêu chuẩn đã ban hành có khả năng chuyển hoá các hợp chất phospho khó tan thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông phẩm. Phân lân vi sinh vật không gây hại đến sức khoẻ của người, động thực vật và không ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái.

2. Quy trình sản xuất

2.1. Phân lập tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân (VSVPGL)

Người ta thường phân lập tuyển chọn chủng VSV-PGL từ đất hoặc từ vùng rễ cây trồng trên các loại đất hay cơ chất giàu hữu cơ theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường đặc Pikovskaya. Khi đó các chủng vi sinh vật phân giải lân sẽ tạo vòng phân giải, tức là vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc. Vòng phân giải được hình thành nhờ khả năng hòa tan hợp chất phospho không tan được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Căn cứ vào đường kính vòng phân giải, thời gian hình thành và độ trong của vòng phân giải người ta có thể đánh giá định tính khả năng phân giải mạnh hay yếu của các chủng vi sinh vật phân lập. Để đánh giá chính xác mức độ phân giải các hợp chất phospho khó tan của vi sinh vật, người ta phải xác định định lượng hoạt tính phân giải của chúng bằng cách phân tích hàm lượng lân dễ tan trong môi trường nuôi cấy có chứa loại phosphat không tan. Tỷ lệ (%) giữa hàm lượng lân tan và lân tổng số trong môi trường được gọi là hiệu quả phân giải. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh vật người ta cố gắng tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ nhiều loại hợp chất phospho và vô cơ khác nhau. Chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hợp chất phospho cao chưa hẳn là có ảnh hưởng tốt đến cây trồng. Vì ngoài hoạt tính phân giải lân, nhiều chủng vi sinh vật còn có các hoạt tính sinh học khác gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Do vậy sau khi đánh giá khả năng phân giải lân, các chủng vi sinh vật dùng để sản xuất phân lân vi sinh cần được đánh giá ảnh hưởng đến đối tượng cây trồng sử dụng. Chỉ sử dụng chủng vi sinh vật vừa có hoạt tính phân giải lân cao vừa không gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng và môi trường sinh thái.

Ngoài những chỉ tiêu quan trọng trên, còn phải đánh giá đặc tính sinh học như khi chọn chủng VSVCĐN đó là: thời gian mọc; kích thước tế bào, khuẩn lạc; khả năng thích ứng ở pH; khả năng cạnh tranh...

2.2. Nhân sinh khối, xử lý sinh khối, tạo sản phẩm

Từ các chủng giống vi sinh được lựa chọn (chủng gốc) người ta tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật, xử lý sinh khối vi sinh vật và tạo sản phẩm phân lân vi sinh. Các công đoạn sản xuất phân lân vi sinh được tiến hành tương tự như trong quy trình sản xuất phân bón vi sinh vật cố định nitơ. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh từ vi khuẩn người ta sử dụng phương pháp lên men chìm trong các nồi lên men và sản xuất phân lân vi sinh từ nấm người ta sử dụng phương pháp lên men xốp. Sản phẩm tạo ra của phương pháp lên men xốp là chế phẩm dạng sợi hoặc chế phẩm bào tử. Chế phẩm lân vi sinh vật có thể được sử dụng như một loại phân bón vi sinh vật hoặc được bổ sung vào phân hữu cơ dưới dạng chế phẩm vi sinh vật làm giàu phân ủ, qua đó nâng cao chất lượng của phân ủ. Tại Việt Nam, trong sản xuất phân lân vi sinh vật trên nền chất mang không khử trùng các nhà sản xuất thường sử dụng bột quặng photphorit bổ sung vào chất mang. Việc làm này tận dụng được nguồn quặng tự nhiên sẵn có của địa phương làm phân bón qua đó giảm chi phí trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên để phân bón có hiệu quả cần phải kiểm tra đánh giá khả năng phân giải quặng của chủng vi sinh vật sử dụng và khả năng tồn tại của chúng trong chất mang được bổ sung quặng.

2.3. Yêu cầu chất lượng và công tác kiểm tra chất lượng

Yêu cầu chất lượng đối với phân lân vi sinh cũng tương tự như yêu cầu chất lượng đối với phân vi sinh vật cố định nitơ, nghĩa là phân lân vi sinh vật được coi là có chất lượng tốt khi có chứa một hay nhiều loài VSV có hoạt tính phân giải lân cao, có ảnh hưởng tốt đến cây trồng với mật độ 10^8 - 10^9 VSV/g hay mililit phân bón đối với loại phân bón trên nền chất mang khử trùng và 10^6 VSV/gam hay mililit đối với phân bón trên nền chất mang không khử trùng. Để phân bón vi sinh vật có chất lượng cao cần tiến hành kiểm tra chất lượng sản phẩm tạo ra sau mỗi công đoạn sản xuất tương tự như công tác kiểm tra chất lượng trong sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ.

3. Phương pháp bón phân lân vi sinh

Phân lân vi sinh thường được bón trực tiếp vào đất, người ta ít dùng loại phân này để trộn vào hạt. Có nhiều cách bón khác nhau:

- + Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhão tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).
- + Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng hoai, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).
- + Có thể trộn chế phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng hoai, sau đó đem bón thúc sớm cho cây (càng bón sớm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích vào đất.

4. Hiệu quả của phân lân vi sinh

Hàm lượng lân trong hầu hết các loại đất đều rất thấp, vì vậy việc bón lân cho đất nhằm nâng cao năng suất cây trồng là việc làm cần thiết. Người ta cũng biết rằng khoảng 2/3 lượng lân được bón bị đất hấp phụ trở thành dạng cây trồng không sử dụng được hoặc bị rửa trôi. Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan không chỉ có tác dụng nâng cao hiệu quả của phân bón lân khoáng nhờ hoạt tính phân giải và chuyển hoá của các chủng vi sinh vật mà còn có tác dụng tận dụng nguồn photphat địa phương có hàm lượng lân thấp, không đủ điều kiện sản xuất phân lân khoáng ở quy mô công nghiệp. Nhiều công trình nghiên cứu ở châu Âu và Mỹ cũng như ở các nước châu Á đều cho thấy hiệu quả to lớn của phân vi sinh vật phân giải lân. Tại Ấn Độ, vi sinh vật phân giải lân được đánh giá có tác dụng tương đương với 50 kg P₂O₅/ha. Sử dụng vi sinh vật phân giải lân cùng quặng phosphat có thể thay thế được 50% lượng lân khoáng cần bón mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Các kết quả nghiên cứu ở Liên Xô, Canada cũng cho các kết quả tương tự. Sản phẩm Phosphobacterin và PB 500 đã được sản xuất trên quy mô công nghiệp ở 2 quốc gia này. Hiện nay Trung Quốc và Ấn Độ là hai quốc gia đang đẩy mạnh chương trình phát triển và ứng dụng công nghệ sản xuất phân lân vi sinh vật ở quy mô lớn với diện tích sử dụng hàng chục triệu ha. Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu gần đây cho biết một gói chế phẩm vi sinh vật phân giải lân (50g) sử dụng cho cà phê trên vùng đất đỏ Bazan có tác dụng tương đương với 34,3 kg P₂O₅/ha. Bón phân lân vi sinh có tác dụng làm tăng số lượng VSVPGL trong đất, dẫn đến tăng cường độ phân giải lân khó tan trong đất 23 - 35%. Cây trồng phát triển tốt hơn, thân lá cây mập hơn, to hơn, bản lá dày hơn, tăng sức đề kháng sâu bệnh, tăng năng suất đậu tương 5 - 11%, lúa 4,7-15% so với đối chứng.

C. PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC

I. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC (COMPOST)

Phân hữu cơ sinh học là loại sản phẩm phân bón được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học được chuyển hóa thành mùn.

Nguyên liệu sản xuất phân hữu cơ sinh học là phế thải của người, động vật, gia súc, gia cầm bao gồm: phế thải chế biến thuỷ hải, súc sản, tồn dư cây trồng nông, lâm nghiệp (thân lá, rễ, cành cây), phế thải sinh hoạt, phế thải đô thị, phế thải chế biến nông, lâm sản và than bùn. Thông thường tồn dư của các cây ngũ cốc chứa 0,5% nitơ, 0,6% P₂O₅ và 1,5% K₂O. Tồn dư các cây bộ đậu chứa hàm lượng nitơ cao hơn nhiều so với cây ngũ cốc. Từ các nguyên liệu hữu cơ trên người

nông dân từ xa xưa đã biết ủ và chế biến thành phân chuồng, phân rác bón cho đất và cây trồng. Trước đây phân rác, phân chuồng là nguồn phân bón chính được sử dụng cho mọi loại hình canh tác ở nước ta. Theo Nguyễn Văn Bộ (1994) tiềm năng phân rác ở Việt Nam khoảng 61-62 triệu tấn và với lượng bón khoang 8,7 tấn/ha sẽ cung cấp một lượng dinh dưỡng tương đương với 34,8kg nitơ, 21,8kg P₂O₅ và 26,1 kg K₂O /ha/năm. Phân chuồng, phân rác là một loại phân hữu cơ sinh học được chế biến bằng cách tận dụng vi sinh vật sẵn có trong nguyên liệu. Với phương pháp chế biến truyền thống để tạo được phân hữu cơ đảm bảo độ hoai chín cần thiết, thời gian ủ kéo dài từ 4 đến 6 tháng. Ứng dụng công nghệ vi sinh vật chế biến phân hữu cơ sinh học không chỉ rút ngắn thời gian ủ mà còn nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm tạo ra.

II. PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC VỚI SỰ TRỢ GIÚP CỦA CHẾ PHẨM VI SINH VẬT

Vi sinh vật trợ giúp quá trình chế biến phân ủ là các vi sinh vật lựa chọn có khả năng thúc đẩy nhanh quá trình chuyển hoá phế thải hữu cơ thành phân bón. Thông thường là các loại vi sinh vật chuyển hoá xenlulo và ligno xenlulo, đó là các loài *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paeceilomyces* sp., *Trichurus spiralis*, *Chetomium* sp.,.. Để chế biến, các phế thải hữu cơ được cắt ngắn khoảng 5 - 8cm làm ẩm và đưa vào các hố ủ có bổ sung 5 kg ure, 5 kg lân supe (hoặc nung chảy) cho 1 tấn nguyên liệu. 750ml sinh khối vi sinh vật sau 10 ngày nuôi cấy được hoà vào 30 lít nước và trộn đều với khối nguyên liệu. Độ ẩm cuối cùng của khối nguyên liệu được điều chỉnh bằng nước sạch để đạt 60%. Để đảm bảo oxy cho vi sinh vật hoạt động và quá trình chế biến được nhanh chóng nên đảo trộn khối ủ 20 ngày 1 lần. Thời gian chế biến kéo dài khoảng 1 đến 4 tháng tùy thành phần của loại nguyên liệu.

III. PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC CÓ BỔ SUNG VI SINH VẬT TRỢ LỰC VÀ LÀM GIÀU DINH DƯỠNG (PHÂN HỮU CƠ VI SINH VẬT)

Phân hữu cơ sinh học dạng này được chế biến tương tự như như mục 2, sau đó khi nhiệt độ khối ủ ổn định ở mức 30°C người ta bổ sung vi sinh vật có ích khác vào khối ủ. Đó là vi khuẩn cố định nitơ tự do (*Azotobacter*), vi khuẩn hoặc nấm sợi phân giải photphat khó tan (*Bacillus polymixta*, *Pseudomonas striata*, *Apergillus awamori*...). Ngoài ra có thể bổ sung 1% quặng phosphat vào khối ủ cùng với sinh khối vi sinh vật. Sản phẩm phân hữu cơ sinh học loại này không chỉ có hàm lượng mùn tổng số mà còn có hàm lượng nitơ tổng số cao hơn loại phân hữu cơ chế biến bằng phương pháp truyền thống 40-45%. Hiệu quả phân bón dạng này đã được tổng kết tại một số quốc gia châu Á. Kỹ thuật chế biến phân ủ từ phế thải hữu cơ được trình bày kỹ hơn trong phần công nghệ vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường.

Bảng 11: Hiệu quả của phân hữu cơ sinh học đối với lúa ở một số quốc gia châu Á

Tên quốc gia	Tỷ lệ% tăng năng suất
Trung Quốc	25,2-32,6
Triều Tiên	8-12
Thái Lan	2,5-29,5
Ấn Độ	9,9

Xu thế hiện nay phát triển CNVSV là tạo ra một loại chế phẩm có nhiều công dụng, thuận lợi cho người sử dụng. Ở Việt Nam nói riêng và nhiều nước trên thế giới nói chung đã sản xuất chế phẩm VSV vừa có tác dụng đồng hóa nitơ không khí vừa có tác dụng phân huỷ chuyển hoá lân khó tan trong môi trường để cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, hoặc là sản xuất ra một loại chế

phẩm VSV vừa có cả hai tác dụng trên, ngoài ra còn có khả năng tiêu diệt sâu bệnh và côn trùng có hại. Những loại chế phẩm như vậy được gọi là chế phẩm VSV hay phân VSV đa chức năng.

D. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CẢI TẠO ĐẤT

Đất có tính đệm và lọc vì vậy có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự phân tán của các chất ô nhiễm. Tuy nhiên với sự phát triển của công nghiệp hoá học và các ngành công nghiệp như: khai khoáng, chế tạo máy, công nghiệp sơn... sự phát tán của các chất ô nhiễm đã vượt quá khả năng tự cân bằng của đất gây nên hiện tượng tích tụ và làm ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái. Trong số các chất gây ô nhiễm đất trồng người ta quan tâm nhiều đến các kim loại nặng, các thuốc hoá học bảo vệ thực vật hữu cơ. Tái sinh đất ô nhiễm bằng phương pháp sinh học không chỉ giải quyết về mặt môi trường mà còn có tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Chúng ta đều biết, các acid hữu cơ có thể hoà tan và làm linh động hơn các hợp chất kim loại nặng không tan. Trong tự nhiên một số vi sinh vật vùng rễ cây trồng có khả năng sản sinh ra các acid hữu cơ và tạo phức với kim loại nặng hoặc các kim loại độc hại với cây trồng (nhôm, sắt...), một số khác có khả năng phân huỷ hợp chất hoá học nguồn gốc hữu cơ. Công nghệ vi sinh vật trong cải tạo đất bị ô nhiễm là sử dụng các loại vi sinh vật có khả năng phân giải hoặc chuyển hoá các chất gây ô nhiễm trong đất qua đó tạo lại cho đất sức sống mới. Ngoài ra, các vi sinh vật sử dụng còn có khả năng phân huỷ các phế thải hữu cơ cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây trồng, đồng thời giúp cây chống lại các tác nhân gây bệnh nguồn gốc từ đất, tạo ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật làm ổn định cấu trúc đất ở vùng rễ cây trồng. Các vi sinh vật thường dùng trong cải tạo đất thoái hoá, đất có vấn đề do ô nhiễm có thể kể đến là nấm rễ nội cộng sinh (VAM-Vascular Abuscular Mycorhiza) và vi khuẩn Pseudomonas. Sản phẩm Agrobacter sản xuất ở Đức từ 2 loại vi sinh vật trên đã được nghiên cứu thử nghiệm sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới. Kết quả cho thấy có thể khôi phục vùng đất phèn mặn, vùng đất bị ô nhiễm kim loại nặng hay các vùng cát đang bị sa mạc hoá bằng chế phẩm vi sinh này. Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật để tái sinh, phục hồi đất có vấn đề và nâng cao độ phì của đất đang được đẩy mạnh ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam.

Chương sáu

CHẾ PHẨM SINH VẬT DÙNG TRONG BẢO VỆ THỰC VẬT

Để đáp ứng nhu cầu về lương thực, thực phẩm cung cấp cho con người ngày một tăng, quá trình sản xuất nông nghiệp ngày càng được phát triển. Đồng thời với quá trình phát triển sản xuất thì sự xuất hiện của dịch hại là nguyên nhân gây bất ổn đến năng suất và chất lượng nông sản, gây thiệt hại tới 20 - 30% sản lượng, đôi khi còn cao hơn. Để phòng chống dịch hại bảo vệ cây trồng con người đã sử dụng các biện pháp khác nhau: biện pháp thủ công, biện pháp vật lý, biện pháp hoá học, biện pháp sinh học... Trong thời gian qua biện pháp hoá học được coi là biện pháp tích cực cho hiệu quả cao, nhanh, đơn giản, dễ sử dụng. Nhưng biện pháp này cũng bộc lộ nhiều tồn tại.

Mặt trái của thuốc hoá học thể hiện ở chỗ nếu sử dụng thuốc không hợp lý, không đúng, sử dụng lâu dài sẽ kéo theo hàng loạt các vấn đề như: ảnh hưởng tới sức khoẻ người và động vật, tăng khả năng hình thành tính kháng thuốc của sâu bệnh, tiêu diệt hệ thiên địch, phá vỡ cân bằng sinh học, gây ra nhiều vụ dịch hại mới, gây hậu quả xấu tới môi trường... Chính vì những hạn chế này mà nhiều tác giả đã đề nghị cần thay đổi quan điểm trong phòng chống và kiểm soát dịch hại, đặc biệt là cần giảm số lượng thuốc hoá học.

Hiện nay hướng nghiên cứu chính trong kiểm soát dịch hại là biện pháp quản lý tổng hợp dịch hại (IPM), trong đó biện pháp sinh học là biện pháp quan trọng. Các sinh vật như: *virus*, vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, tuyến trùng, ong, nhện, ... được ứng dụng rất rộng rãi trong việc hạn chế tác hại của các sinh vật gây hại cho cây trồng.

I. VIRUS GÂY BỆNH CHO CÔN TRÙNG

1. Khái quát về *virus* gây bệnh cho côn trùng

Virus gây bệnh côn trùng là một nhóm vi sinh vật có nhiều triển vọng trong công tác phòng chống côn trùng hại cây trồng. *Virus* có kích thước nhỏ chỉ có khả năng sống, phát triển ở trong các mô, tế bào sống mà không thể nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng nhân tạo. *Virus* gây bệnh côn trùng có đặc điểm nổi bật khác với các nhóm *virus* khác là: khả năng chuyên tính rất hẹp, chỉ gây bệnh ở những mô nhất định của vật chủ. *Virus* côn trùng có vỏ protein (vỏ capsid) bao bọc phần lõi là acid nucleic *virus* tạo nên các thể vùi đa điện hay dạng hạt. Tuy vậy, không phải tất cả *virus* gây bệnh côn trùng đều tạo thành thể vùi. Vì vậy, người ta chia *virus* gây bệnh côn trùng thành hai nhóm lớn, đó là:

- *Virus* tạo thành thể vùi bao gồm *virus* đa điện ở nhân (NPV), *virus* đa điện ở dịch tế bào (CPV), *virus* hạt (GV), *virus* thuộc nhóm *Entomopoxvirus* (EPV).

- *Virus* không tạo thành thể vùi như *Iridovirus*, *Densovirus*, *Baculovirus*.

Hiện nay người ta đã mô tả được hơn 700 bệnh *virus* trên 800 loài côn trùng. Các *virus* gây bệnh côn trùng được xếp thành 7 họ sau: *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Picaviridae*, *Poxviridae* và *Rhabdoviridae*. Hai họ *Baculoviridae* và *Reoviridae* có nhiều loài là những tác nhân rất triển vọng trong việc phát triển BPSH trừ sâu hại.

Họ *Baculoviridae*: rất nhiều loài *virus* gây bệnh côn trùng đã phát hiện được thuộc họ này. Khoảng hơn 500/700 *virus* gây bệnh cho côn trùng đã biết hiện nay là thuộc họ *Baculoviridae*,

trong đó quan trọng là những loài *virus* đa diện ở nhân và *virus* hạt. Nhiều loài đã được nghiên cứu sử dụng để trừ sâu hại.

Họ *Reoviridae* với điển hình là các *virus* đa diện ở dịch tế bào.

2. Những nhóm virus chính gây bệnh côn trùng

2.1. Nhóm Virus đa diện ở nhân (NPV)

Nhóm NPV gồm những *virus* gây bệnh côn trùng thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi là hình khối đa diện và chúng ký sinh trong nhân tế bào vật chủ. Thể vùi của NPV ở tằm gồm 17 loại axit amin. Trong thể vùi chứa nhiều virion hình que.

Sâu bị bệnh do NPV trở nên ít hoạt động, ngừng ăn; cơ thể chúng có màu sắc sáng hơn sâu khoẻ; căng phồng, trương phù, chứa toàn nước. Khi có tác động cơ giới lên bề mặt cơ thể dễ dàng bị phá vỡ và giải phóng dịch *virus*. Các sâu bị chết bệnh do NPV đều bị treo ngược trên cây. Nếu sâu bị chết do NPV ở tế bào thành ruột thì phần đầu lại bám chặt vào các bộ phận của cây.

NPV có tính chuyên hoá rất cao đứng thứ 2 sau GV. Thường NPV của loài côn trùng nào thì gây bệnh cho loài đó. Riêng NPV của sâu xanh *Baculovirus heliothis* thì có thể gây bệnh cho 7 loài sâu xanh *Heliothis* trên thế giới. Một số NPV khác có thể gây bệnh cho 2 hoặc vài loài côn trùng. Các *virus* NPV thường ký sinh trong tế bào hạ bì, thể mõ, khí quản, dịch huyết tương và biểu mô ruột giữa. NPV có thể gây bệnh cho côn trùng thuộc 7 bộ: cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vẩy, cánh mạch, cánh thẳng và cánh nửa.

2.2. Nhóm virus hạt (GV)

GV *virus* thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi dạng hạt. Mỗi thể vùi chỉ chứa có một virion, hiếm khi chứa hai virion. Virion của *virus* hạt cũng có dạng que.

Sâu bị bệnh do GV thường còi, chậm lớn, cơ thể phân đốt rất rõ ràng, tăng biểu bì cơ thể trở nên sáng màu, đôi khi có phớt màu hồng, huyết tương có màu trắng sữa. *Virus* hạt có tính chuyên hoá cao nhất trong các *virus* gây bệnh côn trùng. *Virus* hạt gây bệnh cho sâu xám mùa đông *Agrotis segetum* mà không gây bệnh cho các loài sâu xám khác gần gũi với sâu xám mùa đông. *Virus* hạt chỉ gây bệnh cho côn trùng thuộc bộ cánh vẩy. Chưa thấy côn trùng thuộc bộ khác bị bệnh do GV. *Virus* hạt thường xâm nhiễm mô mõ, lớp hạ bì và huyết tương. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của GV ở 9 loài côn trùng.

2.3. Nhóm virus đa diện ở dịch tế bào (CPV)

Virus đa diện ở dịch tế bào thuộc họ *Reoviridae* ký sinh trong chất dịch tế bào ở các tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. *Virus* CPV cũng tạo thành thể vùi. Trong thể vùi của CPV chứa các virion hình cầu gồm 2 sợi ARN. Sâu bị nhiễm CPV sẽ chậm lớn, đôi khi đau quá so với cơ thể. Ở giai đoạn cuối của sự phát triển bệnh lý, màu sắc cơ thể sâu có màu sáng giống như phấn trắng, đặc biệt là ở mặt bụng cơ thể. Nếu sâu non tuổi lớn bị nhiễm CPV thì đến pha trưởng thành sẽ bị chết với tỷ lệ khá cao. Côn trùng bị nhiễm CPV thường tạo thành khối u.

Bệnh do CPV được phát hiện ở côn trùng thuộc 5 bộ: cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vẩy, cánh mạch. *Virus* CPV có phổ ký chủ rộng, sự lan truyền của bệnh tăng lên còn nhờ qua nhiều ký chủ khác loài. Các mẫu CPV phân lập từ các ký chủ khác nhau thì có tính độc khác nhau. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của CPV ở 12 loài côn trùng. Nhóm CPV ít được sử dụng trong BPSH hơn so với NPV và GV.

3. Phương thức lây nhiễm và khả năng tồn tại trong tự nhiên của virus gây bệnh côn trùng

Phần lớn các thể vùi của NPV, GV, CPV được giải phóng từ cơ thể sâu bị bệnh đã rơi xuống đất hoặc bám trên các bộ phận của thực vật tạo thành những nguồn virus lan truyền bệnh. Những thể vùi của virus cùng thức ăn xâm nhập vào ruột côn trùng. Tại ruột côn trùng, dưới tác động của các men tiêu hoá, thể vùi bị hòa tan và giải phóng các virion. Qua biểu mô ruột giữa virion xâm nhập vào dịch máu, tiếp xúc với các tế bào và xâm nhập vào bên trong các tế bào để sinh sản và gây bệnh cho vật chủ. Chu kỳ phát triển của virus gây bệnh tằm nghệ (NPV) gồm 3 giai đoạn:

- *Giai đoạn tiềm ẩn*: kéo dài không quá 12 giờ. Đây là giai đoạn xâm nhiễm của acid nucleic virus vào bên trong từng tế bào: các virion đính vào các vị trí thích hợp trên màng của nhân tế bào.

- *Giai đoạn tăng trưởng*: kéo dài từ 16 - 48 giờ. Đây là giai đoạn tăng trưởng nhanh của virus. Trong tế bào vật chủ xuất hiện quá trình tổng hợp protein và acid nucleic virus dưới sự điều khiển của acid nucleic virus để hình thành những cấu trúc giống như dạng lưới, sau 32 giờ thì trong nhân tế bào vật chủ chứa các acid nucleic virus dạng trần.

- *Giai đoạn cuối*: ở giai đoạn này xảy ra sự tạo thành hạt virus do có sự lắp ráp phần lõi acid nucleic virus với phần vỏ capsid protein để tạo thành các virion. Các virion này hoàn thiện dần và tạo thành hạt virus hoàn chỉnh. Virus hoàn chỉnh được giải phóng ra khỏi tế bào bằng cách phá huỷ màng tế bào trên nhiều vị trí và nhanh chóng giải phóng các hạt virus làm cho tế bào ký chủ bị tiêu diệt, còn một số loài khác sẽ giải phóng từ từ khỏi tế bào chủ.

Thời kỳ ủ bệnh của các côn trùng bị nhiễm virus thường kéo dài từ 3 đến 12 ngày hoặc hơn, phụ thuộc vào tuổi của vật chủ, nhiệt độ, ẩm độ và nhiều điều kiện khác của môi trường.

Việc lây truyền nguồn bệnh virus ở côn trùng xảy ra theo hai hướng:

+ *Lây truyền ngang*: nguồn bệnh lây lan giữa các cá thể trong cùng một thế hệ trong điều kiện bệnh phát thành dịch, nguồn virus có thể bám bên ngoài vỏ trứng của vật chủ. Khi nở, ấu trùng gặm vỏ trứng chui ra và bị nhiễm nguồn bệnh.

+ *Lây truyền dọc*: là sự truyền nguồn bệnh qua trứng (qua phôi). Không chỉ có virus NPV, GV mới truyền qua trứng, mà cả virus không tạo thành thể vùi (*Iridoviridae*) cũng có thể truyền qua trứng.

Ngoài ra trong một số trường hợp virus có thể xâm nhiễm trực tiếp vào dịch máu qua các vết thương trên cơ thể (qua vết chọc đẻ trứng của ong ký sinh, lỗ xâm nhiễm của một số ấu trùng ký sinh vào bên trong vật chủ).

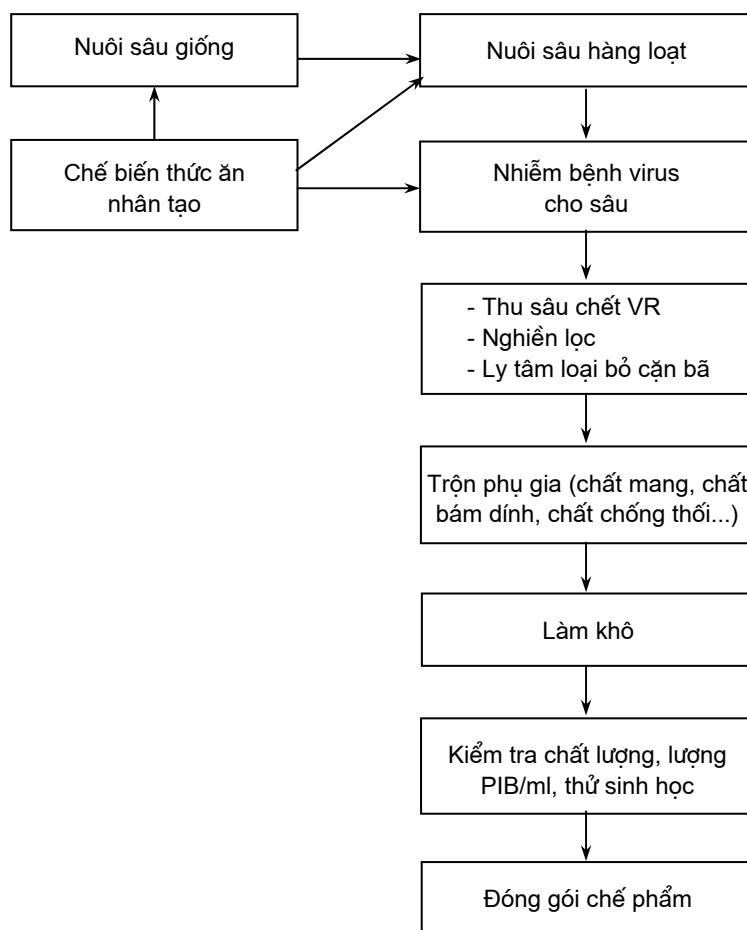
Trong quần thể tự nhiên của côn trùng thường quan sát thấy sự nhiễm bệnh hỗn hợp của 2 loài virus trở lên như nhiễm hỗn hợp giữa NPV và GV trên sâu xám mùa đông hoặc NPV với CPV. Tác động qua lại giữa các virus trong sự nhiễm bệnh hỗn hợp biểu hiện 3 kiểu: đồng tác động, tác động không phụ thuộc vào nhau và tác động gây nhiễu cho nhau. Khi có hiện tượng đồng tác động của virus trong cùng một vật chủ sẽ làm tăng tỷ lệ chết của vật chủ, rút ngắn thời gian để gây chết 50% số lượng vật chủ. Điều này rất có ý nghĩa trong biện pháp sinh học. Hiện tượng tác động nhiễu làm giảm hiệu lực gây bệnh của virus và hiệu quả sử dụng virus trừ sâu hại trong trường hợp này rất thấp. Vì vậy, khi sản xuất chế phẩm virus cần loại trừ những virus có tác động nhiễu. Chế phẩm NPV không được dùng khi trong quần thể tự nhiên có bệnh virus do CPV, vì giữa 2 nhóm này thường có tác động nhiễu.

Các thể vùi của virus có thể bảo vệ các virion chống lại các tác động của môi trường. Đây là điều kiện để virus có thể vùi tồn tại lâu trong nhiều năm ở ngoài tự nhiên. Thí dụ, thể vùi của NPV gây bệnh tằm nghệ không hoà tan trong cồn, axeton và các dung môi hữu cơ khác, không thối trong thời gian bảo quản lâu dài. Thể vùi đa diện của virus gây bệnh cho ong xέ hại cây vân sam Picea có thể bảo tồn sức sống trong xác chết khô của vật chủ ở điều kiện 4-5°C trong 10 năm. Có những thể vùi có thể tồn tại trên lớp đất canh tác khoảng 5 năm, một số trường hợp tới 25 năm.

4. Một số chế phẩm virus trừ sâu

Quy trình sản xuất

Quy trình sản xuất chế phẩm virus phòng trừ sâu hại được tóm tắt trong sơ đồ hình 9.



Hình 9. Quy trình sản xuất chế phẩm NPV dạng bột

Chế phẩm virus trừ sâu ở Việt Nam hiện đang được nghiên cứu sản xuất là nhóm virus đa diện nhân (NPV). Để sản xuất được các virus này đòi phải có lượng lớn sâu hại là vật chủ của chúng. Do đó công nghệ sản xuất chế phẩm virus trừ sâu bao gồm 2 khâu quan trọng là: công nghệ sản xuất hàng loạt sâu vật chủ và quá trình tạo sinh khối virus.

Để sản xuất ra số lượng lớn sâu vật chủ người ta đã tiến hành nghiên cứu chế tạo thức ăn cho sâu vật chủ. Trên cơ sở các nghiên cứu môi trường thức ăn nuôi sâu bán tổng hợp các nhà khoa học Việt Nam đã xây dựng thành công quy trình công nghệ sản xuất hàng loạt sâu vật chủ và tạo chế phẩm virus phòng trừ một số sâu hại như sâu xanh, sâu khoang, sâu keo da láng.

Virus được nhiễm vào cơ thể sâu vật chủ và phát triển trong đó đến khi đạt sinh khối lớn nhất người ta tiến hành giết sâu vật chủ và xử lý sinh khối *virus*. Sản phẩm tạo ra có thể là chế phẩm dạng nước hoặc dạng bột khô.

3.2. Các chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm NPV dạng bột

Chế phẩm NPV cần bảo đảm các yêu cầu kỹ thuật thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12: Yêu cầu chất lượng đối với NPV

TT	Các chỉ tiêu	Đơn vị tính
1	Kích thước hạt	78μm
2	Độ thuỷ phân	7%
3	Độ bám dính đồng đều	85 - 90%
4	Độ pH	7
5	Lượng PIB/mg chế phẩm	$1,5 \times 10^7$

2.3. Một số chế phẩm NPV

+ *Chế phẩm Virus NPV sâu xanh* sản xuất theo quy trình công nghệ trên được thử nghiệm và áp dụng trên đồng ruộng trừ sâu xanh trên bông và thuốc lá ở Sơn La, Hà Nội, Đồng Nai, Sông Bé, Ninh Thuận, v.v... đều cho kết quả phòng trừ tốt và bảo vệ được năng suất cây trồng. Chế phẩm *virus* sâu xanh cùng với OMD là những tác nhân sinh học quan trọng trong hệ thống phòng trừ tổng hợp (PTTH) sâu hại bông. Chế phẩm có giá thành cao và người nông dân chưa quen sử dụng nên phạm vi áp dụng còn hạn chế.

+ *Chế phẩm Virus NPV sâu đỗ xanh đay*: Cho đến nay chưa tìm được môi trường thức ăn nhân tạo nuôi sâu này. Do đó để có sâu vật chủ nhân *virus* phải nuôi bằng thức ăn tự nhiên. Vì vậy, chế phẩm *virus* sâu đỗ xanh đay được sản xuất bằng phương pháp thủ công như sau: dùng nguồn NPV của sâu đỗ xanh đay phun lên đồng đay nơi có nhiều sâu, thu gom sâu chết bệnh lại để nghiên lọc lấy dịch *virus*. Sau đó lại đem phun lên đồng đay. Cứ như vậy có thể tạo ra chế phẩm *virus* tại chỗ để trừ sâu đỗ xanh đay. Việc sản xuất và sử dụng chế phẩm *virus* sâu đỗ xanh đay tại chỗ là một biện pháp có triển vọng vì rẻ tiền, có hiệu quả kinh tế nên người nông dân vùng trồng đay có thể chấp nhận được.

+ *Chế phẩm virus NPV sâu róm thông*: Chế phẩm *virus* phòng trừ sâu róm thông cũng bằng phương pháp thủ công như sản xuất chế phẩm *virus* sâu đỗ xanh đay. Hiệu quả diệt sâu róm thông của chế phẩm *virus* đạt 55,2 - 83,3%. Chế phẩm này được áp dụng thành công trừ sâu róm thông ở Thanh Hoá. Sử dụng chế phẩm *virus* sâu róm thông đã hạn chế sử dụng thuốc hoá học và tỷ lệ ký sinh tự nhiên của một số ong ký sinh sâu róm thông tăng lên.

Ngoài các chế phẩm kể trên còn có chế phẩm *virus* NPV sâu keo da láng cũng được sản xuất theo phương pháp thủ công. Chế phẩm này được sử dụng rộng rãi ở Ninh Thuận, Lâm Đồng mang lại hiệu quả kinh tế xã hội cao.

II. VI KHUẨN GÂY BỆNH CHO CÔN TRÙNG VÀ CHUỘT

1. Khái quát chung về vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng và chuột

Vi khuẩn có ở khắp nơi trên trái đất, có thể xâm nhập vào tất cả các phần cơ thể của mọi sinh vật nói chung và của côn trùng nói riêng. Chúng có thể ở khoang miệng, ruột, hệ thống hô hấp, cơ quan sinh dục,... Vi khuẩn có quan hệ với côn trùng rất đa dạng và được chia thành nhóm vi

khuẩn hình thành bào tử và không hình thành bào tử. Vi khuẩn hình thành bào tử bao gồm tất cả vi khuẩn gây bệnh bắt buộc và phần lớn các loài gây bệnh không bắt buộc. Phần lớn các loài gây bệnh không bắt buộc có (hoặc tạo thành) tinh thể độc. Vi khuẩn không hình thành bào tử bao gồm một loài gây bệnh hoàn toàn không bắt buộc và tất cả những loài vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng. Những vi khuẩn gây bệnh bắt buộc là vi khuẩn luôn liên quan với một loại bệnh nhất định ở côn trùng. Trong tự nhiên, vi khuẩn gây bệnh bắt buộc thường chỉ thích nghi với một phô ký chủ hép. Vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc có thể làm tổn hại hoặc xâm nhiễm vào những mô của cơ thể côn trùng mẫn cảm với chúng, nhưng không thể xếp chúng vào nhóm vi khuẩn gây bệnh bắt buộc. Trước khi xâm nhập vào xoang máu vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc thường sinh sản trong ruột côn trùng. Vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh, bình thường không sinh sản ở trong ruột côn trùng, nhưng chúng có thể xâm nhập vào xoang máu. Những vi khuẩn này phát triển được trên môi trường thức ăn nhân tạo, không chuyên tính với từng nhóm côn trùng riêng biệt.

Vi khuẩn sử dụng trong BPSH trừ dịch hại thuộc bộ *Eubacteriales*, đặc biệt là thuộc họ *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Bacillaceae* và một số giống thuộc họ *Pseudomonadeceae* (bộ *Pseudomonadales*).

Họ *Pseudomonadeceae* gồm các loại vi khuẩn hình que, gram âm, không hình thành bào tử. Các loài *Pseudomonas aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*,... là những vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng.

Họ *Enterobacteriaceae* gồm các loài vi khuẩn sống ở ruột côn trùng. Chúng có dạng hình que, gram âm, không hình thành bào tử. Phát triển tốt trên môi trường dinh dưỡng bình thường. Vi khuẩn thuộc họ này có loài là ký sinh bắt buộc, không bắt buộc và hoại sinh.

Họ *Bacillaceae* gồm vi khuẩn hình thành bào tử, gram dương, hình que. Có ý nghĩa trong BPSH là các loài thuộc giống *Bacillus*, *Clostridium*.

2. Một số vi khuẩn được nghiên cứu ứng dụng trong phòng chống côn trùng và chuột hại

2.1. 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 phát triển trên môi trường nhân tạo. Sản phẩm từ vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum* được áp dụng tương đối thành công ở Mexico, Colombia, Argentia. Theo hệ thống phân loại hiện đại vi khuẩn có thể là loài *Enterobacter cloacae var. acridiorum*.

2.2. Vi khuẩn gây bệnh sữa cho áu trùng bọ hung

Bệnh sữa được phát hiện đầu tiên ở áu trùng bọ hung ở Nhật Bản *Popillia japonica* từ năm 1921 gồm 2 dạng cơ bản là dạng A và B. Vi khuẩn gây nên 2 dạng bệnh này được mô tả với tên *Bacillus popolliae* (dạng bệnh A) và *B. lentinormus* (dạng bệnh B). Trong 2 loài vi khuẩn này thì loài *B. popolliae* phổ biến hơn chiếm 88% trường hợp và được chú ý nghiên cứu hơn. Loài *B. popolliae* 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 hoá. 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 luỹ 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.

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

2.4. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Đây là vi khuẩn gây bệnh côn trùng quan trọng nhất được nghiên cứu sử dụng rộng rãi để trừ sâu hại trên thế giới. Vi khuẩn *B. thuringiensis* hình que, gram dương, hình thành bào tử và tinh thể độc tố. Tính độc hay tính diệt sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* phụ thuộc vào các độc tố do vi khuẩn sinh ra trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Theo Kreig, Langenbrusch (1981) có gần 525 loài thuộc 13 bộ côn trùng đã ghi nhận bị nhiễm vi khuẩn *B. thuringiensis*, trong đó nhiều nhất là ở bộ cánh vẩy (có 318 loài), sau đó là bộ hai cánh (59 loài), bộ cánh màng (57 loài), bộ cánh cứng (34 loài); các bộ khác có từ 1-12 loài bị nhiễm vi khuẩn này.

B. thuringiensis sinh ra 4 loại độc tố, đó là: Ngoại độc tố α (α -exotoxin), ngoại độc tố β (β -exotoxin), ngoại độc tố γ (γ -exotoxin), nội độc tố δ (δ - endotoxin). Trong 4 loại độc tố này, người ta chú ý nhiều đến nội độc tố vì nó quyết định hoạt tính diệt côn trùng của vi khuẩn.

+ Ngoại độc tố alpha (α - exotoxin) (phospholipaza C)

Năm 1953, lần đầu tiên Toumanoff phát hiện thấy vi khuẩn *B.t* var. *elesti* sản sinh enzyme lexithinaza. Tác động độc của enzyme này liên quan đến sự phân huỷ mang tính cảm ứng của Phospholipit trong mô của côn trùng, làm côn trùng bị chết. Enzyme này đầu tiên liên kết với tế bào ruột của côn trùng, sau đó tách ra và được hoạt hoá bởi một chất không bền nhiệt. Chất này có trọng lượng phân tử thấp, có thể là lipit. Độc tố này đặc biệt chỉ có tác động với loài ong xέ (*Tenthre dimidae*) có pH đường ruột phù hợp với tác động của enzyme đã phát hiện ra chất này và xác định đó là men Lexithinaza C (Còn gọi là phospholipaza C). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự liên quan của men này với hoạt tính trừ sâu và đã cho biết rằng men này tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể côn trùng. Ngoại độc tố alpha hoà tan trong nước, không bền vững khi ở nhiệt độ cao, do đó còn gọi là ngoại độc tố không chịu nhiệt.

+ **Ngoại độc tố beta (β - exotoxin):** Độc tố này được Halt và Arkawwa (1959) tìm ra khi nuôi ấu trùng ruồi nhà bằng thức ăn có chứa *B. thuringiensis*. Độc tố này có thể tách được từ môi trường nuôi cấy *B. thuringiensis*. Thành phần của ngoại độc tố beta gồm adenin, riboza và phospho với tỷ lệ 1:1:1. Ngoại độc tố beta hoà tan trong nước, bền vững ở nhiệt độ cao, có thể chịu được ở nhiệt độ 120-121°C trong 10 - 15 phút, vì thế gọi là ngoại độc tố chịu nhiệt. Ngoại độc tố beta còn gọi là Thuringiensis. Không phải tất cả các chủng đều tạo thành ngoại độc tố beta. Một số *B.t.* không sinh tinh thể độc nhưng có thể sinh ra ngoại độc tố β. Hoạt tính của ngoại độc tố β bắt đầu xuất hiện trong giai đoạn vi khuẩn phát triển mạnh, trước khi hình thành bào tử. Ngoại độc tố β là một Nucleotit có trọng lượng phân tử thấp (707-850), có các adenin, riboza, phospho với tỷ lệ bằng nhau. Tác động độc của nó là kìm hãm nucleotidaza và ARN- polymeraza phụ thuộc ADN, các enzyme này gắn với ATP và dẫn tới việc ngừng tổng hợp ARNt. Ngoại độc tố β còn có tác dụng cộng hưởng với nội độc tố δ, sau khi nội độc tố có tác dụng gây giập vỡ, phá huỷ hoàn toàn biểu mô ruột giữa của côn trùng mãn cảm, ngoại độc tố nhanh chóng xâm nhập vào huyết tương và máu, tới các cơ quan gây thay đổi sinh lý và dẫn tới cái chết nhanh đối với ấu

trùng. Ngoại độc tố β rất có hiệu quả trong việc chống sâu non của côn trùng mẫn cảm. Nó gây trì trệ trong việc chuyển hoá lột xác và có tác động đối với con trưởng thành phát triển từ các ấu trùng đã ăn phải độc tố dưới ngưỡng gây chết.

+ **Nội độc tố (δ - endotoxin):** Nội độc tố này ở dạng tinh thể chứa trong vi khuẩn cùng với bào tử của vi khuẩn. Mỗi tế bào vi khuẩn hình thành bào tử ở một đầu và tinh thể nội độc tố ở đầu kia. Sau khi thành tế bào vi khuẩn tiêu huỷ thì tinh thể độc tố và bào tử được tự do trong môi trường nuôi cấy và lắng đọng cùng với nhau. Trong quá trình hình thành bào tử thì tinh thể nội độc tố cũng được hình thành. Sự hình thành các tinh thể nội độc tố liên quan với sự hình thành bào tử chỉ ở giai đoạn đầu của quá trình sinh bào tử. Sau đó việc hình thành bào tử và tinh thể nội độc tố xảy ra độc lập với nhau (Nishimura, Nichiisutsuji - Uwo, 1980).

Những kết quả nghiên cứu gần đây của Rn. Gaixin, Feng Xichang và Feng Weixiong (1983) cho thấy các tinh thể nội độc tố khác nhau về hình dạng và theo hình dạng có thể chia chúng thành 5 loại sau: dạng nhị tháp, dạng hình cầu, dạng hình vuông, dạng không ổn định và dạng hình lõm. Còn Tôan thì thông báo rằng vi khuẩn *B.thuringiensis var. Kurstaki* tạo thành 2 dạng tinh thể là dạng nhị tháp và dạng hình lập phương (Kandybin, 1989).

Tinh thể nội độc tố delta không chỉ khác nhau về hình dạng và còn khác nhau về phân tử lượng. Theo phân tử lượng, các tinh thể chia thành 3 nhóm: nhóm có phân tử lượng là 140.000 - 160.000; 60.000 - 130.000 và 40.000 - 50.000.

* Cơ chế tác động của vi khuẩn *B. thuringiensis* lên côn trùng:

Tác động diệt sâu của vi khuẩn *B. thuringiensis* là tổng hợp. Theo đặc điểm của cách xâm nhiễm và sự gây tổn thương đầu tiên cho côn trùng thì xếp *B. thuringiensis* thuộc nhóm vi sinh vật có tác động đường ruột. Đường nhiễm trùng là cơ quan tiêu hoá. Chỗ phá huỷ của vi khuẩn là ruột giữa của côn trùng.

Yếu tố chính gây chết sâu có trong các chế phẩm *B. thuringiensis* là các tinh thể nội độc tố delta. Các tinh thể nội độc tố được côn trùng ăn cùng với thức ăn. Trong ruột côn trùng, dưới tác động của hệ men các tinh thể nội độc tố được phân giải sinh ra độc tố. Thành phần các độc tố được tạo thành trong ruột côn trùng phụ thuộc vào bộ men ở dịch ruột côn trùng. Bộ men này không giống nhau ở các loài côn trùng khác nhau. Do đó, có sự khác nhau về tính mẫn cảm của các loài côn trùng với cùng một dòng vi khuẩn *B. thuringiensis*. Với sự phân huỷ tinh thể nội độc tố sẽ tạo thành các độc tố và khi các độc tố này tác động lên màng bao chất dinh dưỡng và biểu mô của ruột giữa thì quá trình bệnh lý bắt đầu. Các tế bào biểu mô bắt đầu trương và trổ nén mủn. Đầu tiên là các tế bào hình trụ bị tổn thương. Những thay đổi trong màng tế bào ghi nhận được chỉ 15 phút sau khi côn trùng ăn phải thức ăn có vi khuẩn *B. thuringiensis*. Sau 2-3 giờ trong các tế bào hình trụ, hình chén đã tạo thành các vết nứt, các tế bào bị nhăn nheo và vỡ ra. Sự phá vỡ trao đổi chất ở các tế bào biểu mô ruột giữa dẫn đến các ion lọt từ khoang ruột sang dịch máu. Chứng liệt và chết xảy ra do không cân bằng ion trong dịch máu. Đồng thời các bào tử vi khuẩn từ ruột xâm nhiễm vào dịch máu và sinh sản nhanh gây nhiễm trùng máu. Đối với các côn trùng có tính mẫn cảm cao với *B. thuringiensis* như tằm (*Bombyx mori*) thì bào tử chỉ đóng vai trò nhỏ bé hoặc không có vai trò trong tác động của *B. thuringiensis* lên côn trùng. Bởi vì ở trường hợp này không đủ thời gian để bào tử mọc mầm và xâm nhiễm thì côn trùng đã chết do nội độc tố (Sundara Babu, 1985).

2.5. Vi khuẩn *Serratia marcescens*

Đây là một vi khuẩn hình que, gram âm, không hình thành bào tử, ký sinh không bắt buộc trên côn trùng. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này được ghi nhận trong tài liệu từ năm 1886 (Masera, 1936). Vi khuẩn *S. marcescens* đã gây dịch cho bọ hung *Melolontha melolontha*,

tầm và được sử dụng thành công trừ sâu đục thân ngô. Vi khuẩn có tính gây bệnh cao cho châu chấu *Melanoplus bivittatus*, một số rệp sáp *Pseudococcus*, sâu non *Pieris brassicae*, *Lymantria dispar*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Agrotis segertum*, bọ xít *Eurygaster*...

2.6. Vi khuẩn *Salmonella enteridis*

Đây là vi khuẩn gây bệnh thương hàn ở chuột và một số loài gặm nhấm khác. Vi khuẩn *S. enteridis* là ký sinh bắt buộc, gram âm, không hình thành bào tử. Vi khuẩn *S. enteridis* phân lập được từ xác chết của chuột trong các trận dịch từ năm 1893 đến 1897 ở Nga và năm 1893 ở Pháp. Năm 1950, Prokhorov đã phân lập được một chủng mới gây bệnh cho chuột, ký hiệu là №5170. Vi khuẩn này có tính chọn lọc rất cao thể hiện ngay với từng loài gặm nhấm, chúng không nguy hiểm cho người và động vật nuôi trong nhà (ngựa, trâu bò, lợn, gà, vịt, ngỗng, chó, mèo...). Tính độc của vi khuẩn *S. enteridis* thay đổi do liên tục cấy truyền trên môi trường thức ăn nhân tạo cũng như trong bảo quản dài hạn trên các môi trường đó. Đặc biệt tính độc sẽ giảm nhanh khi môi trường bị acid hoá.

3. Một số chế phẩm vi khuẩn phòng trừ sâu bệnh

3.1. Chế phẩm B.t.

Sản xuất Bt. được thực hiện bằng cả hai phương pháp lên men chìm và lên men xốp.

Trong công nghệ lên men xốp thường dùng những hạt cơ chất rắn, có thể hoặc không có khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng trên bề mặt. Các hạt cơ chất rắn này có thể đóng vai trò là nguồn chất dinh dưỡng, ví dụ: cám lúa mỳ, bột ngô, bánh hạt bông loại dầu... hoặc nó có thể chỉ đơn giản đóng vai trò như chất mang vô cơ. Sản xuất Bt. ở quy mô lớn bằng phương pháp lên men xốp thường gặp nhiều khó khăn như cung cấp khí cho môi trường, ngăn chặn sự tạp nhiễm, điều chỉnh sự lên men và thu hoạch. Phương pháp lên men xốp thường có sản lượng thấp so với lên men chìm vì vậy nó không phải là phương pháp thực tế để sản xuất chế phẩm thương mại.

Trong phương pháp lên men chìm, việc nghiên cứu tìm ra môi trường dinh dưỡng tối ưu là rất cần thiết. Việc sản sinh ra nội độc tố δ của vi khuẩn không những chỉ thay đổi theo serotyp mà còn phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy. Có chủng phù hợp với một loại môi trường này, cho hoạt tính rất cao, nhưng chủng khác cũng nuôi cấy trong môi trường đó lại cho hoạt tính thấp. Vì vậy ngoài việc tìm kiếm môi trường dinh dưỡng tối ưu và các chất tăng cường quá trình trao đổi chất người ta còn phải quan tâm tới các thông số trong quá trình lên men: nhiệt độ, pH, độ oxy hòa tan, tốc độ thông khí... để xác định thời gian thu hoạch tối ưu. Một số nghiên cứu cho biết vi khuẩn Bt. bị thực khuẩn thể (*Bacteriophage*) xâm nhiễm làm hỏng mẻ cấy, phá huỷ tế bào khi đang sinh trưởng mạnh. Hậu quả là chế phẩm diệt côn trùng có hiệu suất thấp.

Sinh khối (bào tử và tinh thể độc) tạo ra trong quá trình lên men được tách ra nhờ ly tâm, được làm khô bằng phương pháp lạnh đông hoặc ly tâm vắt. Cuối cùng, sản phẩm được đóng thành gói sau khi đã trộn với các chất phụ gia khác. Đối với chế phẩm dạng bột khô (tiện lợi và phổ biến nhất) có thể dùng các chất độn như tinh bột, lactoza, hoạt thạch, cao lanh... Để tăng thêm độ dính của chế phẩm, người ta dùng một số chất như bột mỳ, dextrin, casein...

Chế phẩm Bt. có thể ở dạng sữa như thuốc sữa Thuricide 90 TS khá ổn định và bền lâu. Trong quá trình sản xuất có thể tách bào tử và tinh thể (ly tâm sinh khối) không cần sấy khô mà đưa ngay vào nhũ tương (nước chứa dầu).

Ngoài phương pháp ly tâm, người ta còn dùng phương pháp acid hoá dịch nuôi đến pH 6,0 - 6,2, sau đó chuyển sang giai đoạn tách. Sau khi tách nhận được dạng bột nhão độ ẩm 85% với hiệu suất 100kg/m^3 dịch nuôi với lượng bào tử $20.10^3/\text{g}$. Dịch nuôi cấy đã tách vi khuẩn có thể sử dụng lại một lần nữa, nhưng không lặp lại nhiều lần vì nó tích luỹ nhiều chất ức chế sinh trưởng,

tuy nhiên có thể dùng làm nguyên liệu sản xuất nấm men chăn nuôi. Điều này đảm bảo việc rút gọn khối lượng trong quá trình công nghiệp, giảm lượng nước thải, tăng giá trị kinh tế của quá trình. Giai đoạn cuối tách để giải phóng bào tử và tinh thể khỏi màng tế bào, người ta đưa vào thiết bị đặc biệt, chuyên dùng, trộn với bột nhão trong 30 phút để trộn đều cho bào tử và tinh thể đồng nhất. Sau đó đưa bột nhão vào sản xuất chế phẩm, thành phẩm có thể ở dạng bột nhão hoặc dạng khô. Để sản xuất loại nhão người ta trộn sinh khối bào tử và tinh thể độc với CMC (Cacboxymethyl celulose), phân tử CMC hấp thụ tinh thể và bào tử. Sản phẩm này ở dạng dung dịch nhão, không làm cho bào tử chết. Sản xuất dạng này có tính ưu việt như giảm năng lượng và thời gian để tiến hành sấy. Dạng khô được sấy trong máy sấy phun đều, độ ẩm 10% và trộn với cao lanh.

Tổng số bào tử và tinh thể độc có thể liên quan đến hoạt tính diệt côn trùng. Do vậy phương pháp hiện nay là tiến hành đếm số lượng bào tử sống trong các chế phẩm Bt., so sánh số lượng bào tử với hoạt tính diệt côn trùng bằng thử nghiệm sinh học. Số lượng nội độc tố δ được xác định và biểu thị bằng đơn vị quốc tế (IU) dựa trên tiêu chuẩn quốc tế E-61.

Nghiên cứu về thuốc trừ sâu vi sinh vật Bt. chỉ mới được bắt đầu gần đây ở các nước đang phát triển, nơi mà việc sử dụng Bt. còn rất ít so với thuốc trừ sâu hoá học. Mặc dù việc sử dụng Bt. ở hầu hết các nước đang phát triển phụ thuộc vào việc nhập khẩu, tuy nhiên một số nước đã nghiên cứu và sản xuất Bt. của họ: Trung Quốc và Ai Cập là hai nước tiên phong trong việc này. Ở Ai Cập người ta đã tiến hành ghép gen sinh độc tố vào vi khuẩn cố định đạm và sản phẩm tạo ra vừa có khả năng diệt trừ *Spodoptera littoralis* vừa có khả năng cố định nitơ. Sản xuất Bt. ở Ai Cập được tổ chức ở quy mô pilot trong nồi lén men với dung tích 5m³ đặt tại nhà máy đường rượu ở Hwandia, Giza.

Ở Trung Quốc sản xuất quy mô lớn được thực hiện bằng cả hai phương pháp lén men chìm trong thùng và lén men xốp. Cám lúa mì, bột ngô, đậu tương, bánh hạt bông loại dâu, cám lạc là thành phần chính trong môi trường sử dụng sản xuất Bt.. Trong một nhà máy nhỏ ở Hồ Bắc, sản lượng Bt. tăng từ 26 tấn năm 1983 đến 90 tấn năm 1984, 160 tấn năm 1985, 260 tấn năm 1986, 360 tấn năm 1987, 472 tấn năm 1988, 732 tấn năm 1989 đến 900 tấn năm 1990. Bt. ngày nay được sử dụng rộng rãi ở 30 tỉnh để diệt trừ côn trùng gây dịch khác nhau cho nông nghiệp và công nghiệp, diệt trừ các nhân tố gây bệnh cho người. Tổng sản lượng Bt. ước tính năm 1990 là 1.500 tấn, một phần sản phẩm Bt. địa phương được xuất khẩu sang Thái Lan và Đông Nam Á. Ở Trung Quốc, hiện nay Bt. được sản xuất hàng loạt với những phương pháp khá đơn giản thích hợp cho nông dân và một số công nghệ đã trở nên phổ biến. Hơn 8 triệu hecta đã canh tác được bảo vệ bằng thuốc trừ sâu vi sinh Bt..

Việc sử dụng Bt. ở các nước đang phát triển vẫn còn bị hạn chế vì các lý do kinh tế, do vậy người ta muốn sản xuất Bt. địa phương với giá thành thấp, nhưng hoạt tính diệt sâu cao. Các môi trường lén men khác nhau gồm cả sản phẩm phụ của công nghiệp và nông nghiệp đã được sử dụng để sản xuất Bt. ở một số nước đang phát triển như Mehicô, Hàn Quốc, Nigeria, Brazil và Ấn Độ.

Bảng 14: Thành phần môi trường lén men được sử dụng để sản xuất *Bacillus thuringiensis* ở một số nước đang phát triển (Salama, 1993)

Tên nước	Thành phần môi trường	Tác giả
----------	-----------------------	---------

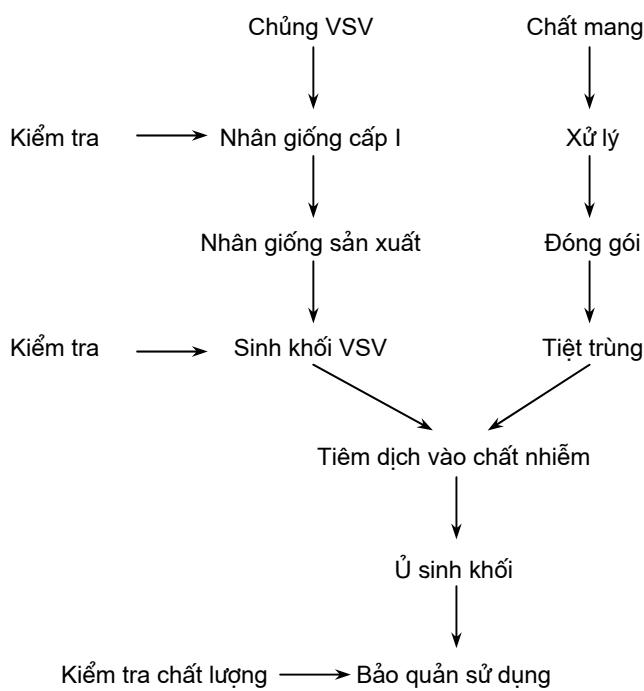
Mêhicô	Rỉ đường, bột đậu tương, bột ngô, $\text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$	Roldan và Cs, 1998
Hàn Quốc	Bột cá, đậu tương, cám đỏ, bã vừng, gạo, cám.	Yoon và Cs, 1987
Trung Quốc	Cám lúa mỳ, trấu, bột chanh, bánh đậu tương loại dầu hoặc bánh hạt bông loại dầu, cám lúa mỳ hoặc bột ngô.	Hussey, 1981 - Wang Tao, 1998
Nigigeria	Bột sắn lén men, ngô, đậu đũa.	Ejiofar & Okager, 1989
Brazil	Phụ phẩm của công nghiệp giấy và gỗ thêm tinh bột tan.	Moscardi, 1988
Ấn Độ	Bột chanh hoặc bột đậu tương thêm tinh bột tan hoặc rỉ đường.	Mummgatti Raghunathan, 1990

Từ năm 1970 ở Việt Nam bắt đầu nghiên cứu sản xuất Bt.. Viện Công nghiệp thực phẩm, Viện bảo vệ thực vật, Đại học khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội, Trung tâm vi sinh, Tổng công ty hoá chất... đang sản xuất loại chế phẩm này trên quy mô công nghiệp với chủng *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. Bước đầu các chế phẩm Bt. đã được đưa vào sử dụng trừ một số sâu hại như sâu tơ, sâu xanh bướm trắng, v.v...

3.2. Chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột

Chế phẩm vi sinh vật diệt chuột của Liên Xô (cũ) Bacterodensid là sản phẩm được sản xuất từ vi khuẩn *Salmonella enteriditis* Isatchenko có tác dụng gây bệnh và làm chết các loại chuột nhà, chuột đồng, chuột cống, chuột đen... Chế phẩm đã được sử dụng rộng rãi tại Liên Xô (cũ), Mông Cổ và Cu Ba, mang lại hiệu quả phòng trừ chuột cao. Tại Việt Nam chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột mang tên BIORAT (công ty BIOFARM - Cu Ba), MIROCA (Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam), Bả diệt chuột sinh học (Viện Bảo vệ thực vật) đã được thử nghiệm trên các đối tượng chuột của Việt Nam. Kết quả cho thấy các chế phẩm có tác dụng tốt trong việc gây ốm và làm chết các loại chuột, lại không gây ảnh hưởng xấu đến gia súc, gia cầm. Sản phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột đã được đăng ký vào danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và được ứng dụng rộng rãi tại nhiều địa phương trong cả nước.

Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột được tóm tắt trong hình 10.



Hình 10. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột

Các công đoạn chính của việc sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột bao gồm:

+ *Tuyển chọn và bảo quản chủng giống vi khuẩn*:

Từ mẫu bệnh tích của chuột ăn chế phẩm vi khuẩn được phân lập theo sơ đồ hình 11.



Hình 11. Sơ đồ phân lập tuyển chọn vi khuẩn gây bệnh cho chuột

Vi khuẩn sau khi phân lập có thể bảo quản trên thạch nghiêng dưới điều kiện lạnh trong thời gian 3-4 tuần, bảo quản trong môi trường lòng trứng trắng ở điều kiện lạnh trong thời gian 6-12 tháng và bảo quản trong điều kiện đông khô trong thời gian 3-5 năm. Để duy trì hoạt tính của vi khuẩn cần thiết phải thường xuyên đưa vi khuẩn vào cơ thể chuột và tái phân lập từ mẫu bệnh tích.

+ *Nhân sinh khối vi khuẩn*

Điều kiện nhân sinh khối *S. enteriditis* Isatchenko được xác định :

Môi trường nuôi cấy: nước chiết đậu 20% + 3g pepton

Nhiệt độ nhân sinh khối: 30- 32°C

pH môi trường: 7,0

Thời gian nhân sinh khối: 36 - 48h

Mức độ cấp khí: 5 lít/phút/bình 20 lít môi trường

Sau thời gian lên men 36 giờ mật độ vi khuẩn có thể đạt $10^9 \div 10^{10}$ vi khuẩn/ml.

+ *Lựa chọn và tạo chất mang phù hợp*

Chất mang cho chế phẩm phải bảo đảm sao cho vi khuẩn có thể tồn tại tốt, không gây ảnh hưởng xấu đến môi trường khi sử dụng và phải là nguồn thức ăn mà chuột ưa thích. Tại Liên Xô (cũ) chất mang được lựa chọn là hạt mạch cho chế phẩm dạng hạt và bột xương cho chế phẩm dạng bột. Tại Việt Nam, qua quá trình nghiên cứu: thóc đồ được lựa chọn là nguyên liệu làm chất mang cho chế phẩm. Thóc đồ có ưu điểm: săn chắc, dễ chế biến, có sức hấp dẫn chuột cao, bảo đảm cho vi khuẩn sinh trưởng phát triển tốt và tồn tại trong thời gian dài. Sản phẩm tạo ra từ nền thóc đồ bảo đảm mật độ 10^9 CFU/g sau 3 tháng sản xuất.

III. NẤM GÂY BỆNH CÔN TRÙNG

1. Khái quát chung về nấm gây bệnh cho côn trùng

Cũng như vi khuẩn, nhiều loại nấm có quan hệ cộng sinh hoặc hoại sinh với côn trùng, trong đó có nhiều loài nấm thực sự là ký sinh, gây hiện tượng bệnh lý và dẫn đến huỷ diệt côn trùng. Nấm gây bệnh cho côn trùng có ý nghĩa rất lớn vì có thể gây chết thường xuyên với tỷ lệ chết cao cho nhiều loài côn trùng hại và là những tác nhân điều hoà tự nhiên rất hiệu quả. Côn trùng chết do nấm rất dễ nhận biết bằng mắt thường, vì các sợi nấm mọc qua vỏ cơ thể và bao phủ toàn bộ bề mặt ngoài của cơ thể côn trùng. Cơ thể côn trùng bị chết do nấm không bị tan rã, mà thường giữ nguyên hình dạng ban đầu, toàn bộ bên trong cơ thể chứa đầy sợi nấm.

Hầu hết các loại nấm gây bệnh cho côn trùng đều xâm nhập vào cơ thể vật chủ không qua đường miệng, mà qua lớp vỏ cơ thể, nghĩa là phải có sự tiếp xúc của nấm với bề mặt cơ thể vật chủ. Bào tử nấm bám vào bề mặt cơ thể vật chủ, trong điều kiện đủ độ ẩm bào tử mọc mầm và xâm nhiễm vào bên trong cơ thể côn trùng qua lớp chitin nhờ áp lực cơ giới hoặc hoạt động men của nấm. Nấm tiết ra loại men làm mềm lớp vỏ chitin và tạo thành một lỗ thủng tại nơi bào tử mọc mầm, qua lỗ thủng đó mầm bào tử xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng. Do khả năng xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng qua lớp vỏ cơ thể nên nấm có thể ký sinh được côn trùng chích hút và cả những pha phát triển của côn trùng như trứng, nhộng mà các vi sinh vật khác không ký sinh được.

Nấm cũng có thể xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng qua đường miệng. Từ miệng, bào tử đi tới ruột và qua thành ruột xâm nhiễm vào các tế bào nội quan để gây bệnh. Xâm nhập kiểu này chủ yếu là bào tử của các loài nấm ở nước. Dưới tác động của độc tố do bào tử nấm tiết ra có thể dẫn tới hiện tượng ngừng nhu động ruột của vật chủ. Thí dụ, trường hợp bào tử nấm *Aspergillus* trong ruột ong mật. Bào tử nấm còn có thể xâm nhập qua lỗ thở hoặc cơ quan sinh dục để vào bên trong cơ thể côn trùng, nhưng rất ít.

Sự xâm nhiễm và phát triển của nấm trong cơ thể côn trùng là một quá trình phức tạp, gồm ba giai đoạn chính sau đây:

+ *Giai đoạn xâm nhập*: từ khi bào tử nấm mọc mầm đến lúc hoàn thành việc xâm nhập vào trong xoang cơ thể côn trùng.

+ *Giai đoạn phát triển của nấm trong cơ thể côn trùng đến khi côn trùng chết*: đây là giai đoạn sống ký sinh của nấm. Trong giai đoạn này nấm thường tạo ra rất nhiều những sợi nấm ngắn. Những sợi nấm này được phân tán khắp cơ thể theo dịch máu. Về phía vật chủ có phản ứng tự vệ như sự thực bào, xuất hiện tế bào bạch huyết... Phản ứng tự vệ này chỉ trong một thời gian ngắn kìm hãm sự xâm nhập của nấm vào các nội quan. Khi các sợi nấm xâm nhập vào tất cả các bộ phận thì chúng đồng thời gây chết vật chủ.

+ *Giai đoạn sinh trưởng phát triển của nấm sau khi vật chủ chết*: đây là giai đoạn hoại sinh của nấm ký sinh côn trùng. Trong giai đoạn này nấm hình thành các bào tử hoặc conidi, hoặc nấm mọc thành sợi ra bên ngoài bề mặt cơ thể vật chủ. Sau đó các bào tử được tạo thành trên lớp sợi nấm ở bề mặt cơ thể vật chủ.

Các nấm gây bệnh cho côn trùng chỉ sinh trưởng phát triển để hoàn thành một chu kỳ sống của chúng: từ mọc mầm bào tử đến hình thành bào tử mới. Nấm gây bệnh côn trùng có tính chuyên tính hẹp, chỉ ký sinh một vật chủ hoặc một giai đoạn nhất định của vật chủ, nhiều trường hợp chúng là ký sinh có tính chuyên hoá thức ăn rộng, có thể ký sinh nhiều loài côn trùng thuộc các giống, họ, bộ khác nhau.

Nấm gây bệnh cho côn trùng thuộc nhiều nhóm nấm khác nhau: từ nhóm nấm nguyên thuỷ sống dưới nước đến nhóm nấm bậc cao sống trên cạn. Nấm gây bệnh cho côn trùng có mặt ở trong cả 4 lớp nấm:

Nấm bậc thấp *Phycomycetes*, nấm túi *Ascomycetes*, nấm đẩm *Basidiomycetes* và nấm bất toàn *Deuteromycetes*.

- Lớp nấm bậc thấp *Phycomycetes*: Trong lớp nấm này, các loài ký sinh trên côn trùng tập trung ở ba bộ: *Chytridiales*, *Blastocladiales* và *Entomophthorales*. Đặc biệt có những họ nấm gồm tất cả các loài đều là ký sinh trên côn trùng như *Entomophthoraceae* và *Coelomomycetaceae*. Những giống nấm ký sinh côn trùng quan trọng của lớp nấm bậc thấp là: *Coelosporidum*, *Chytridiopsis* (bộ *Chytridiales*), *Coelomonyces* (bộ *Blastocladiales*) và *Entomophthora* (bộ *Entomophthorales*).

- **Lớp nấm túi *Ascomycetes***: Trong lớp nấm túi có bộ *Laboulbiniales* là những nấm ngoại ký sinh côn trùng có chuyên tính cao, còn các loài nấm túi khác đều là nội ký sinh của côn trùng. Những giống nấm quan trọng gây bệnh cho côn trùng là: *Cordyceps*, *Aschersonia* (bộ *Hypocreales*).

- **Lớp nấm đẩm *Basidiomycetes***: Trong lớp nấm đẩm chỉ ở 2 giống có các loài gây bệnh trên côn trùng. Đó là giống *Septobasidium* và *Uredinella*.

- **Lớp nấm bất toàn *Deuteromycetes***: Phần lớn các loài nấm bất toàn ký sinh côn trùng đều thuộc bộ *Moniliales*. Những giống *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Spicaria*, *Metarhizium*, *Cephalosporium* và *Sorosporella* chứa các loài khi xâm nhiễm vào côn trùng đã tạo thành độc tố và gây chết vật chủ trong khoảng thời gian nhất định.

2. Một số nấm chính gây bệnh côn trùng

2.1. Nấm xanh *Metarhizium anisopliae*

Nấm này được Metschnikov phát hiện đầu tiên vào năm 1878 trên bọ hung hại lúa mì bị bệnh. Nấm xanh thường gây bệnh cho côn trùng sống trong đất, thuộc hệ vi sinh vật đất trong tự nhiên. Conidi của nấm xanh sau 24 giờ tiếp xúc với bề mặt cơ thể côn trùng thì bắt đầu mọc mầm và xâm nhập vào bên trong. Trong cơ thể côn trùng sợi nấm phát triển xâm nhập vào các bộ phận nội quan. Sau khi vật chủ chết, sợi nấm mọc ra ngoài cơ thể côn trùng tạo thành lớp nấm màu trắng hơi hồng nhạt. Trên đó tạo thành các conidi màu xanh xám. Quá trình phát triển của bệnh trong cơ thể côn trùng là 4-6 ngày tùy thuộc loài và tuổi vật chủ cũng như nguồn bệnh ban đầu. Vào giai đoạn cuối cùng của quá trình phát triển bệnh lý thì côn trùng chết.

Nấm *M. anisopliae* có 2 dạng: *M. anisopliae var. major* có bào tử dài và *M. anisopliae var. anisopliae* có bào tử ngắn. Nấm xanh sinh ra các độc tố *destruxin A* và *B*.

Nấm xanh ký sinh trên 200 loài côn trùng, thuộc các bộ: Orthoptera (11 loài), Dermaptera (1 loài), Hemiptera (21 loài), Lepidoptera (27 loài), Diptera (4 loài), Hymenoptera (6 loài) và Coleoptera (134 loài). Nấm xanh có thể nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo.

Nhiều loài trong chi *Metarhizium* có khả năng diệt côn trùng thuộc Elaleridae và Curculionidae (Coleoptera), ấu trùng muỗi *Aedes aegypti*. *Anopheles stephensi* và *Clex pipiens* thuộc Diptera, côn trùng hại lúa *Scotinophara coarctata* thuộc họ Heminoptera, châu chấu *Schistocerca gragaria* thuộc họ Testigolidae, loài mối *Nasutitermes exitiosus* (Hill) thuộc họ Termitidae.

M. anisopliae với bào tử dạng trụ và khuẩn lạc xanh đen hoặc đôi khi màu tối hoặc hồng vỏ quế. Khuẩn lạc mọc chậm, trên môi trường OA sau 10 ngày nuôi cấy ở 20°C có đường kính 2cm. *M. anisopliae* có hai thứ (varieties) với các đặc điểm: Bào tử túi nhỏ là *M. anisopliae* var. *anisopliae* với kích thước bào tử túi 3,5-(5,0) - 8,0(-9,0) × 2,5 - 3,5 (- 4,5)µm. Bào tử túi lớn là *M. anisopliae* var. *major* với bào tử túi dài là 10,0 - 14,0(-180) µm. Để phân biệt hai thứ này, đã có những nghiên cứu về huyết thanh học khác nhau của *M. anisopliae* var. *anisopliae* và *M. anisopliae* var. *major*, *M. anisopliae*.

M. anisopliae là chủng gây bệnh mạnh nhất cho côn trùng thuộc bộ Coleoptera. Hơn 204 loài côn trùng thuộc họ Elaridae và Curculionidae bị nhiễm bệnh bởi *M. anisopliae*. Nấm này phân bố rộng trong tự nhiên.

Đã có nhiều nghiên cứu về sự phân bố của chúng: Nepal, New Zealand, New Caledonia (IMI), Bahamas, Mỹ, Canada, Bắc Ireland, Italia, Turkey, Liên Xô (cũ) (IMI). Ở những nơi không có côn trùng cũng phân lập được *M. anisopliae*: nang của Mematod (*Heteroderas chachatii* và *Globodera rostochensis*), các hạt ngoài đồng và trong đất trồng ở Canada, đất trồng chuối ở Honduras, đất trồng dâu ở Brazil, đất đồng cỏ ở New Zeland (IMI). Ngay ở những nơi có thời tiết khắc nghiệt của nước Đức, ở đất rừng sau khi đốt cháy, trong chất thải hữu cơ (chuẩn bị ô nhiễm), trầm tích của sông (IMI), đất đầm lầy trồng cây được, tổ của một số loài chim và rễ của dâu tây... cũng đều phân lập được *M. anisopliae*.

Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của *M. anisopliae*:

- Không thể sinh trưởng tốt trên nền cơ chất không có kitin.
- Sống được ở nhiệt độ thấp (8°C), biên độ của độ ẩm rộng, ở nơi tích luỹ nhiều CO₂ và thiếu O₂ chúng có thể sống sót tới 445 ngày. Khi hoại sinh trong đất, bào tử dính bị ức chế nảy mầm bởi khu hệ nấm đất, trong đó có chủng *Aeromonas* (thí nghiệm *in vitro*).
- Ở dưới 10°C và trên 35°C thì sự hình thành bào tử không thể xảy ra.
- Nhiệt độ tốt nhất cho sự nảy mầm bào tử là 25 - 30°C và chết ở 49°C trong 10 phút.
- Nhiệt độ tốt nhất cho sự sinh trưởng là 25°C và pH 3,3 - 8,5.
- *M. anisopliae* có khả năng phân giải tinh bột, cellulosa và kitin (lông và da côn trùng).

2.2. Nấm bạch cương Beauveria bassiana

Bệnh do nấm này được nghiên cứu tương đối sớm. Cuối thế kỷ XIX ở Hoa Kỳ đã dùng nấm *B. bassiana* để trừ một loại bọ xít cánh trắng. Nấm *B. bassiana* có trong đất ít hơn nấm *M. anisopliae*. Sau khi tiếp xúc với bề mặt cơ thể vật chủ, conidi của nấm *B. bassiana* bắt đầu mọc mầm và xâm nhập vào bên trong cơ thể vật chủ. Quá trình này bắt đầu từ sau khi vật chủ bị nhiễm conidi khoảng 10 giờ và có thể kéo dài vài ngày. Sau khi xâm nhập vào trong cơ thể vật chủ, nấm bắt đầu sinh trưởng và phát triển. Nấm tiêu diệt dần các tế bào bạch huyết khi bị tấn công trong giai đoạn đầu xâm nhiễm cơ thể ký chủ. Khi nấm tiêu diệt hết tế bào bạch huyết thì côn trùng vật chủ chết. Nấm tiếp tục sinh trưởng phát triển. Lượng sợi nấm bên trong cơ thể vật chủ ngày càng tăng và xác côn trùng càng trở nên rắn lại. Khi gấp độ ẩm thuận lợi, các sợi nấm mọc ra ngoài bề mặt cơ thể vật chủ và tạo thành conidi mới.

Côn trùng bị nhiễm *B. bassiana* ở điều kiện 25°C sẽ chết sau 6 -7 ngày. Nấm *B. bassiana* tiết ra độc tố Beauvericin. Nấm *B. bassiana* có phổ ký chủ khá rộng. Chỉ riêng vùng Bắc châu Mỹ đã

ghi nhận được 175 loài côn trùng là ký chủ của nấm này. Nấm *B. bassiana* có thể nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo.

2.3. Nấm châu chấu *Entomophaga grylli*

Nấm *E. grylli* chuyên tính trên các loài châu chấu, có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Sau dịch do nấm này gây ra, quần thể châu chấu giảm đi 80 - 90%. Nó cũng có thể gây thành dịch lớn cho nhiều loài côn trùng cánh thẳng.

Trong quá trình phát triển của bệnh, nấm *E. grylli* phân huỷ toàn bộ các mô của cơ thể vật chủ. Sợi nấm xâm nhập vào tất cả các bộ phận, kể cả chân côn trùng, chỉ trừ trứng và buồng trứng là không bị nấm xâm nhập. Châu chấu bị bệnh thường bò lên phía ngọn cây cỏ bám chắc và chết ở đó với tư thế đầu hướng lên phía trên. Xác chết này tồn tại trên ngọn cỏ khá lâu. Sau khi côn trùng chết, trên bề mặt xác chết tạo thành conidi. Châu chấu khoẻ tụ tập quanh xác chết sau một đêm là bị nhiễm conidi của nấm này. Nấm *E. grylli* khó nuôi cấy trên quy mô lớn, vì các loài nấm *Entomophaga* nói chung không nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo, mà chỉ nuôi cấy qua vật chủ sống. Các conidi của nấm này tồn tại lâu trong điều kiện tự nhiên.

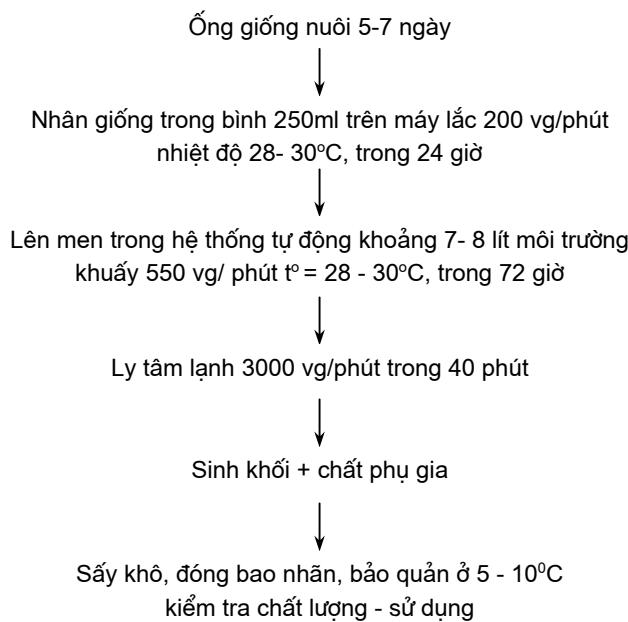
3. Quy trình sản xuất chế phẩm diệt sâu hại từ nấm

3.1. Phân lập tuyển chọn chủng giống nấm

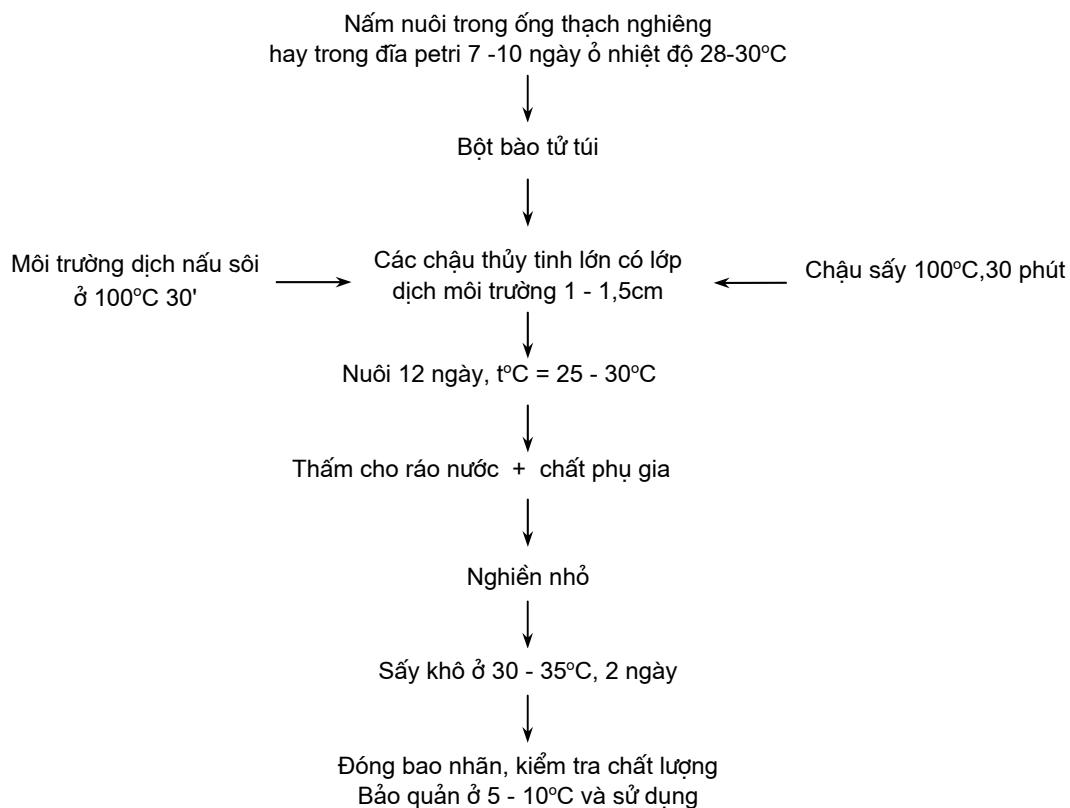
Môi trường phân lập tuyển chọn nấm thường chứa: glucoza, pepton, oxagall, chloramphenicol và actidione. Các chất kháng sinh được bổ sung vào môi trường nhằm ức chế vi khuẩn. Để bào tử được hình thành tốt nhất, nguồn cacbon phù hợp nhất là saccarose asparagine hoặc glyxin. Trong sản xuất công nghiệp người ta chọn môi trường chứa glucoza hoặc saccarose có bổ sung cao ngô, cao men hay cao đậu tương. Tỷ lệ C/N được coi là tối ưu khi đạt 10/1.

3.2. Các phương pháp lên men

a) *Lên men chìm*: Bằng phương pháp lên men chìm chúng ta có thể dễ dàng thu được sinh khối, bào tử, tinh thể độc và các sản phẩm khác như chất kháng sinh, các độc tố ở dạng hòa tan trong môi trường dinh dưỡng của vi sinh vật diệt sâu hại và côn trùng gây hại. Lên men chìm thu được nhiều sản phẩm. Đồng thời việc sản xuất bằng phương pháp lên men chìm dễ áp dụng cơ khí hóa, tự động hóa, diện tích mặt bằng không lớn.



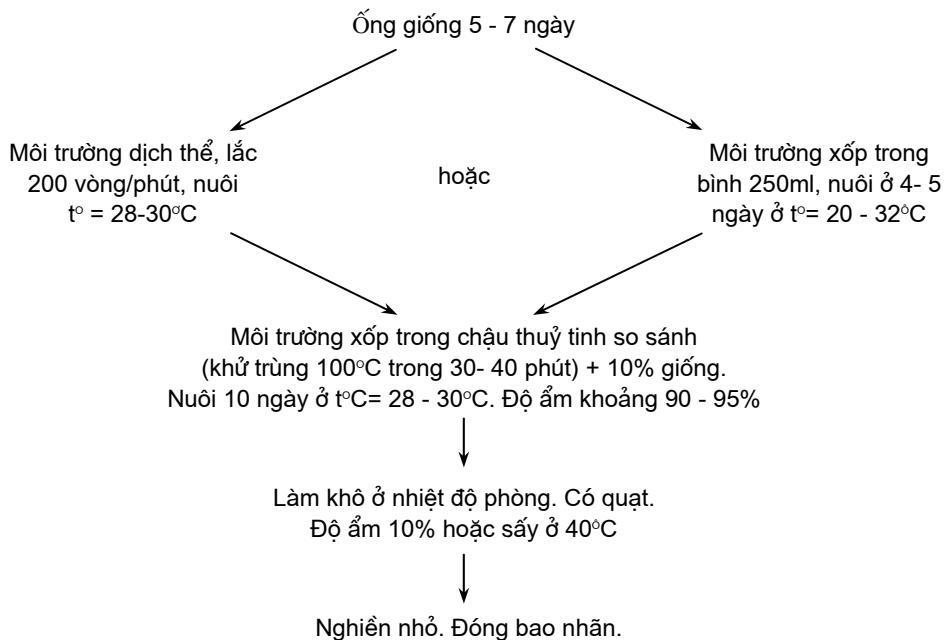
Hình 12. Quy trình lên men chìm tạo chế phẩm nấm diệt sâu



Hình 13. Quy trình lên men bê mặt không vô trùng tạo chế phẩm nấm
diệt sâu và côn trùng có hại

b) *Lên men bê mặt không vô trùng:* Trong điều kiện thiếu trang thiết bị người ta có thể lên men bê mặt không vô trùng để thu được chế phẩm diệt sâu và côn trùng có hại từ một số chủng nấm. Nhằm hạn chế sự nhiễm tạp của vi sinh vật lạ trong quá trình nuôi cấy, môi trường nuôi cấy được đun sôi ở 100°C trong 30 phút, sau khi môi trường nguội, người ta bổ sung kháng sinh (Streptomycin) với nồng độ 0,01% (hình 13).

c) *Lên men xốp*: Có thể sử dụng phương pháp lên men xốp tạo chế phẩm vi sinh vật diệt sâu, côn trùng có hại từ vi nấm, trong đó sau khi bổ sung dịch dinh dưỡng vào các cơ chất lựa chọn khác nhau như bột đậu nành, bã đậu phụ, cám, gạo, lúa, mày ngô,... người ta tiến hành nhiễm giống nấm và cho lên men. Khi sinh khối nấm đạt cực đại tiến hành thu hồi sinh khối, xử lý và tạo sản phẩm chứa cả bào tử và hệ sợi nấm. Các chủng nấm có khả năng diệt côn trùng, sâu hại thường được nhân sinh khối bằng phương pháp lên men xốp là: *B. bassiana*; *M. anisopliae*.



Hình14. Quy trình 1 Bảo quản ở 5 - 10°C trong tối và sử dụng. sâu và côn trùng gây hại

4. Hiệu quả phòng trừ sâu hại bằng chế phẩm nấm

Nấm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria* được nghiên cứu sản xuất để trừ một số sâu hại quan trọng trong nông nghiệp. Hiệu lực của chế phẩm đã thử đối với rầy nâu, sâu đỗ đay, châu chấu xanh, châu chấu ở điều kiện trong phòng thí nghiệm và nhà lưới. Chế phẩm có tác dụng giảm tỷ lệ rầy nâu 55,2 - 58,8%, rầy lưng trắng 64 - 92%, rầy xanh 75 - 96% và sâu đỗ xanh hại đay 43,9 - 64,2%. Hiệu lực diệt các loài rầy hại lúa trên đồng ruộng của nấm *B. bassiana* biến động từ 33 - 75% tùy theo vụ và năm khác nhau. Hiệu lực của nấm kéo dài 3-4 tuần sau khi phun nấm, vì vậy chỉ cần phun nấm một lần trong một vụ là đủ để quản lý các loài rầy hại lúa trong vụ. Dùng nấm *B. bassiana* để quản lý các loài rầy hại lúa đã làm tăng năng suất từ 19 tới 95% so với đối chứng (tùy theo từng vụ và từng năm). Nấm *B. bassiana* không gây ảnh hưởng gì cho lúa và cũng không gây hại đối với các thiên địch của sâu, rầy hại lúa.

Nấm *M. anisopliae* có khả năng gây bệnh làm chết 84,6% châu chấu *Nomadacris succincta* sau 10 ngày xử lý và nấm *M. flavoviride* gây chết 100% châu chấu thí nghiệm sau 7 ngày. Chế phẩm nấm diệt châu chấu được tiến hành ở Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai cho kết quả tương đối tốt, nhưng không đồng đều.

IV. NGUYÊN SINH ĐỘNG VẬT KÝ SINH CÔN TRÙNG

1. Khái quát về nguyên sinh động vật ký sinh côn trùng

Côn trùng là động vật chủ trung gian đối với phần lớn các nguyên sinh động vật ký sinh. Người ta cho rằng: nguyên sinh động vật ít có khả năng dùng để tạo ra những thuốc trừ sâu sinh học với tác động nhanh trong thời gian ngắn, nhưng sẽ đóng vai trò quan trọng trong hệ thống

PTTH sâu hại nhờ sự tác động yếu của chúng mà quần thể côn trùng hại có thể giảm bớt đi một phần, hoặc côn trùng vật chủ sẽ trở nên mẫn cảm hơn đối với các tác nhân sinh học khác (*virus*, *vi khuẩn*, ...), hoặc với thuốc hóa học trừ sâu (do đó khi cần có thể dùng thuốc hóa học ở liều lượng thấp hơn bình thường). BPSH trừ sâu hại chủ yếu quan tâm tới những loài nguyên sinh động vật có tác động làm giảm sức sinh sản và sức sống của côn trùng vật chủ. Nguyên sinh động vật gây bệnh côn trùng bao gồm:

- **Lớp trùng roi *Flagellata*:** Những loài ký sinh côn trùng thuộc họ Trypanosomatidae đặc biệt là 4 giống *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia* và *Blastocrithidia*. Loài trùng roi *Leptomonas pyrrhocoris* gây bệnh cho bọ xít *Pyrrhocoris apterus*, sâu hại sáp ong *Galleria mellonella*, bọ cánh cứng *Tenebrio molitor*, ruồi *Calliphora sp.* Loài *Leptomonas pyraustae* ký sinh sâu đục thân ngô. Các loài thuộc giống *Herpetomonas* thường ký sinh côn trùng bộ hai cánh, cánh vẩy và cánh màng.

- **Lớp trùng chân giã *Sarcodina*:** Phân lớn trùng amip ký sinh côn trùng thuộc họ Amoebidae và Endamoebidae. Loài *Malamoeba locustae* (họ Amoebidae) ký sinh ở ống Manpigi và biểu mô ruột của hơn 40 loài châu chấu. Kết quả nghiên cứu cho thấy loài trùng amip *M. locustae* có thể sử dụng trừ các loài châu chấu hại cây trồng.

- **Lớp trùng bào tử *Aporozoa*:** Gồm nhiều loài gây bệnh cho côn trùng, thường ký sinh trong tế bào. Côn trùng bị nhiễm nặng sẽ chết. Các nguyên sinh động vật thuộc nhóm này đều có giai đoạn ngủ nghỉ được gọi là bào tử, có khả năng chống chịu khá đối với tác động của các yếu tố môi trường. Đây là điều kiện tốt cho trùng bào tử tồn tại ở ngoài cơ thể vật chủ để lây lan bệnh. Lớp trùng bào tử gồm có:

+ Đại diện của bộ phụ *Eugregarinaria* (thuộc bộ *Gregarinomorpha*) là những ký sinh thông thường của côn trùng hại thực vật hoặc côn trùng trong kho, thuộc giống *Gregarina* (*G. cuneata*, *G. polymorpha*, *G. steini*) ký sinh bọ cánh cứng *Tenebrio molitor*, loài *G. vizri* ký sinh bọ *Zabrus tnenbrioides*, loài *G. typographi* ký sinh mọt *Ips typographus*. Các loài trùng bào tử thuộc bộ phụ *Schizogrega-rinaria* của bộ *Gregarinomorpha* là ký sinh rất nguy hiểm cho côn trùng. Thí dụ: *Mattesia dispora* ký sinh sâu *Ephestia kuhniella*; *M. trogodermae*, *B. thuringiensis* ký sinh mọt cứng đốt *Trogoderma granarium*.

+ Bộ trùng *Coccidiomorpha* có giống *Adelina* ký sinh trong cơ thể côn trùng. Loài *Adelina tribolii* ký sinh mọt *Tribolium castaneum* và *T. confusum*. Loài *A. mesnili* ký sinh sâu *Ephestia kuhniella*, *Tineola biselliella* và *Plodia interpunctella*. Loài *A. melolonthae* ký sinh bọ hung *Melolontha melolontha*.

+ Bộ trùng bào tử nhỏ *Microsporidia* có nhiều loài gây bệnh cho côn trùng và có ý nghĩa thực tiễn trong BPSH trừ sâu hại. Chúng ký sinh bên trong các tế bào vật chủ, phá huỷ nhiều loại mô trong cơ thể côn trùng bị bệnh. Người ta đã biết và mô tả khoảng 200 loài trùng bào tử nhỏ ký sinh côn trùng.

Trùng bào tử nhỏ ký sinh ở nhiều nhóm côn trùng nhưng chưa gặp ký sinh ở côn trùng chích hút thực vật và côn trùng BMAT. Một số loài trùng bào tử nhỏ rất chuyên tính như *Nosema apis*, *N. bombycis*. Một số khác thì lại đa thực như loài *Plistophora schubergi* ký sinh ở 20 loài cánh vẩy thuộc 5 họ.

Đặc điểm quan trọng của bộ trùng *Microsporidia* là tạo thành những bào tử nhỏ. Sự lây nhiễm cho vật chủ là nhờ những bào tử này. Số lượng bào tử trong 1 túi bào tử phụ thuộc vào loài hoặc giống nguyên sinh động vật. Các loài thuộc giống *Nosema* có một bào tử trong một túi bào tử. Loài *Nosema bombycis* và *N. apis* là những tác nhân gây bệnh rất nguy hiểm cho tằm và ong

mật (tương ứng). Loài *N. locustae* là ký sinh của một số chấu và được nghiên cứu để trừ chấu.

- **Lớp thảo trùng Ciliophora:** Nhiều loài thảo trùng ký sinh côn trùng, nhưng chỉ một số ít có khả năng gây bệnh cho côn trùng. Thảo trùng gây bệnh chủ yếu cho côn trùng sống trong nước: áu trùng muỗi thuộc họ *Chironomidae* và *Culicidae*. Trong một áu trùng muỗi *Chironomus plumosus* bị nhiễm nặng có thể có 100.000 - 200.000 cá thể thảo trùng loài *Tetrahymena chironomi*.

2. Khả năng sử dụng nguyên sinh động vật trừ sâu hại

Trong số tất cả các nguyên sinh động vật ký sinh côn trùng thì chỉ có trùng bào tử cỡ nhỏ Microsporidia là có khả năng để phát triển BPSH trừ côn trùng hại. Trùng bào tử nhỏ lây truyền của theo 3 cách chính: qua miệng, qua vết thương ở vỏ cơ thể vào trong dịch máu và qua trứng.

Để có nguồn nguyên sinh động vật dùng bổ sung vào môi trường sống của côn trùng, có thể nhân nuôi trùng amip *Melamoeba locustae* trên loài muỗi *Melanoplus differentialis*. Sản xuất bào tử của trùng *Mattesia grandis* và *Glugea gasit* trên bọ voi hại bông *Anthonomus grandis*; sản xuất bào tử của trùng *Nomesa serbica*, *N. lymantriae*, *N. muscularis* trên sâu róm *Lymantria dispar*. *Nosema locustae* được sản xuất thành một chế phẩm trừ côn trùng có hiệu quả cao.

V. TUYẾN TRÙNG KÝ SINH CÔN TRÙNG (Nematode)

1. Đặc điểm tuyến trùng ký sinh côn trùng

Theo Poinar, 1975 có khoảng 1000 loài của 19 bộ côn trùng là ký chủ của tuyến trùng. Tuyến trùng ký sinh côn trùng có kích thước cơ thể rất khác nhau như loài có thân dài tới 30cm thuộc họ Mermithidae, loài có thân ngắn nhất đạt 0,2mm thuộc giống *Neoaplectana*. Có 3 nhóm tuyến trùng lớn là :

- Tuyến trùng sống trong ống tiêu hoá của côn trùng;
- Tuyến trùng bán ký sinh;
- Tuyến trùng ký sinh bắt buộc.

2. Một số tuyến trùng ký sinh côn trùng

+ Tuyến trùng bán ký sinh là loại côn trùng sống ký sinh và hoại sinh. Ấu trùng tuyến trùng có thể xâm nhập vào cơ thể qua đường lỗ thở hoặc đường miệng hoặc theo thức ăn. Cùng với vi khuẩn tuyến trùng phát triển thế hệ đầu tiên gây chết côn trùng và sử dụng xác chết của vật chủ làm thức ăn. Tuyến trùng chỉ có một họ Steinernematidae gồm có hai giống : *Steinernema* và *Neoaplectana*.

+ Tuyến trùng ký sinh bắt buộc không gây chết vật chủ:

Chu kỳ phát triển của tuyến trùng trùng với chu kỳ phát triển của ký chủ trứng của tuyến trùng qua thực quản vào ruột giữa của côn trùng và phát triển, ở đó áu trùng tuổi 1 xuất hiện và chuyển xuống ruột sau để tiếp tục phát triển. Tuyến trùng cái đẻ trứng, trứng được thả ra ngoài cùng với phân của vật chủ

+ Tuyến trùng ký sinh bắt buộc và gây chết ký chủ:

Nhóm này gồm tuyến trùng ký sinh trong khoang cơ thể côn trùng, ở đó tuyến trùng hoàn thành toàn bộ chu kỳ phát triển. Chúng sử dụng vật chủ làm nguồn dinh dưỡng cho bản thân chúng và gây chết ký chủ. Tuyến trùng nhóm này thuộc các họ Mermithidae và Tetradonematidae.

Tuyến trùng họ *Mermithidae* có chu kỳ phát triển dài một năm, gồm 5 giai đoạn: phát triển phôi, trước ký sinh, ký sinh, sau ký sinh và trưởng thành. Tuyến trùng họ này ký sinh ở nhện và nhuyễn thể. Có ý nghĩa nhất trong phòng chống côn trùng hại là 2 giống: *Mermis* và *Hexameris*. Loài *Mermis elegans* ký sinh bộ cánh thẳng. *M. terricola* ký sinh ấu trùng bộ cánh vẩy. Loài *Hexameris albicans* ký sinh nhiều sâu hại.

3. Sử dụng tuyến trùng trừ côn trùng hại

Thí nghiệm ngoài đồng đầu tiên từ những năm 1930 dùng tuyến trùng loài *Neoaplectana glaseri* để trừ bọ hung Nhật Bản *Popillia japonica*. Sau thí nghiệm mật độ ấu trùng bọ hung giảm từ 40 - 60%. Thí nghiệm sử dụng dòng dd-136 của tuyến trùng *Neoaplectana carpocapsae* để trừ sâu đục quả táo tây, sâu xanh *Heliothis virescens* cho hiệu quả diệt sâu non là 60%, nhưng hiệu quả lại không rõ ràng đối với một số sâu khác. Dùng *N. carpocapsae* trừ ruồi *Delia platura* trên thuốc lá cho hiệu quả bằng dùng thuốc hoá học. Sử dụng *N. carpocapsae* trừ ruồi hại bắp cải *Delia brassicae* cho hiệu quả không bằng dùng thuốc hoá học. Sử dụng *N. carpocapsae* trừ sâu xanh hại ngô *Heliothis zea* cho hiệu quả diệt sâu cao nhưng không ngăn chặn được tác hại do sâu gây ra. Tuyến trùng có thể sử dụng cùng với một số thuốc hoá học (trừ nấm, trừ cỏ,...) và với chế phẩm sinh học khác.

Ngoài các vi sinh vật nêu trên người ta cũng quan tâm đến Ricketxia, một loại vi sinh vật có kích thước nhỏ gần như virus phát triển bên trong tế bào. Thành tế bào Ricketxia giống với thành tế bào vi khuẩn điển hình. Tế bào Ricketxia chứa cả ARN và ADN. Trong côn trùng, các loài Ricketxia chỉ sinh trưởng và phát triển ở trong dịch tế bào, nhưng trong cơ thể nhện nhỏ các Ricketxia có thể sống ở trong nhân tế bào.

Các loài Ricketxia có ý nghĩa trong BPSH thuộc 2 giống: *Enterella*, *Rickettsiella*.

Các loài *Enterella* chỉ sống ở bên trong tế bào biểu mô ruột của vật chủ. Các loài *Rickettsiella* chủ yếu ký sinh trong thể mỡ và tế bào máu và có thể gây ra sự nhiễm trùng chung. Các loài *Rickettsiella* tìm thấy ký sinh ở côn trùng cánh cứng, hai cánh, cánh thẳng. Thí dụ *R. popilliae* ký sinh *Popillia japonica* và *R. melolonthae* ký sinh *M. melolontha*.

Sự lây nhiễm bệnh do Ricketxia xảy ra theo hướng ngang (truyền giữa các cá thể cùng loài với nhau) và hướng dọc (truyền từ đời này cho đời sau qua trứng). Các loài Ricketxia là nhóm tác nhân sinh học có tiềm năng để trừ côn trùng hại.

VI. VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG VỚI CÁC SINH VẬT GÂY BỆNH CÂY

Hiện tượng đối kháng rất phổ biến trong tự nhiên, nhất là đối với các vi sinh vật đất. Vi sinh vật đối kháng thường tiết ra các kháng sinh, men hoặc các chất có hoạt tính sinh học cao thường độc hại đối với vật gây bệnh cây. Hoặc vi sinh vật đối kháng cạnh tranh sử dụng điều kiện sống của vật gây bệnh.

1. Nấm đối kháng với vật gây bệnh cây

Nấm đối kháng có thể kìm hãm sinh trưởng phát triển của các nấm gây bệnh cây. Dưới đây là một số nấm đối kháng thường gặp:

Các nấm *Penicillium oxalicum*, *P. frequentans*, *P. vermiculatum*, *P. nigricans*, *P. chrysogenum* là những loài đối kháng của nấm *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Verticillium alboatrum* (Martin et al., 1985). Cơ chế tác động của nấm *Penicillium* chưa được biết rõ ràng.

Trichoderma là nhóm nấm đối kháng được nhiều nước nghiên cứu để trừ bệnh hại cây. Những loài phổ biến là: *T. hamatum*, *T. harzianum*. Các nấm *Trichoderma* có thể kìm hãm nấm

gây bệnh cây thông qua các cơ chế tiết kháng sinh, men đặc trưng và có thể ký sinh trên các nấm gây bệnh cây. Hiện tượng ký sinh của nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh cây được gọi là hiện tượng "giao thoa sợi nấm". Trước tiên sợi nấm của *Trichoderma* vây quanh sợi nấm gây bệnh, sau đó các sợi nấm *Trichoderma* thắt chặt lấy các sợi nấm gây bệnh, cuối cùng nấm *Trichoderma* xuyên qua sợi nấm gây bệnh làm thủng màng ngoài của nấm gây bệnh, gây nên sự phân huỷ các chất nguyên sinh trong sợi nấm gây bệnh cây.

Nấm *Aspergillus niger* đối kháng với các nấm *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solanica*, *Alternaria alternata*. Nấm *Aureobasidium pollulans* và *Sporobolomyces roseus* là đối kháng với nấm *Septoria nodorum*. Nấm *Cercospora kikuchii* đối kháng nấm *Diaporthe phaseolorum var. sojae*.

2. Vi khuẩn đối kháng với vật gây bệnh cây

Vi khuẩn đối kháng được nghiên cứu nhiều để trừ vi sinh vật gây bệnh cây ở trong đất. Vi khuẩn *Agrobacterium radiobacter* dòng K-84 là loài đối kháng của vi khuẩn gây bệnh *Agrobacterium tumefaciens*. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* đối kháng với nhiều loại nấm gây bệnh cây. Các vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* là những loài đối kháng với nấm *Rhizoctonia solani*. Có nhiều loài vi khuẩn giống *Streptomyces* đối kháng với vật gây bệnh cho cây trồng.

3. Virus đối kháng với vật gây bệnh cây

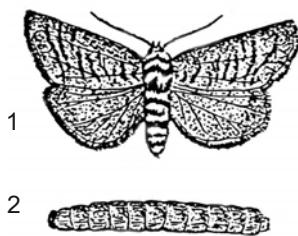
Có một số virus gây bệnh cây có tính đối kháng với nấm gây bệnh cây. Thí dụ, virut gây đốm lá thuốc lá đối kháng với nấm *Colletotrichum lagenarium* gây bệnh thán thư dưa chuột. Virus gây khóm dưa chuột và virus đốm vòng đen cà chua có tính đối kháng với nấm *Cladosporium cucumerium*. Sự ức chế của các virus đối với nấm bệnh có thể đạt tới 85% .

4. Vi sinh vật trong phòng trừ sinh học cỏ dại

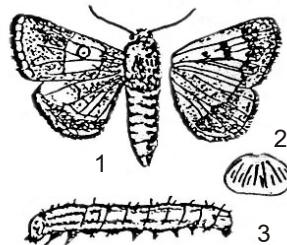
Nguồn bệnh: Thân lá bị bệnh của cỏ lồng vực (*Echinochloa crus galli*) và cỏ đuôi phượng (*Leptochloa chinensis*) được tiệt trùng bề mặt bởi dung dịch $HgCl_2$ 0,1% và nuôi trong môi trường PDA, xác định tên nấm diệt cỏ lồng vực là *Cochliobolus lunatus* và nấm diệt cỏ đuôi phượng là *Setosphaeria rostrata*.

Kết quả thí nghiệm trong chậu và ngoài đồng ruộng trong những năm qua cho thấy: phun 1 x 10^{12} bào tử /ha lúc cỏ có từ 1-3 lá đã diệt được hai loài cỏ hòa thảo quan trọng này trên ruộng lúa. Kỹ thuật này đã được phép đưa ra khu vực hóa tại vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

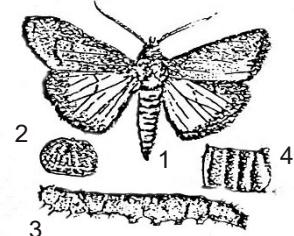
BPSH trừ dịch hại trên thế giới đã và đang đạt được kết quả tốt trong nhiều lĩnh vực phòng chống dịch hại cây trồng. Những nghiên cứu về BPSH trừ dịch hại ở nước ta chưa được tiến hành mạnh mẽ, kết quả đạt được còn rất ít so với thế giới và với yêu cầu thực tiễn bảo vệ môi trường hiện nay. Tiềm năng thiên nhiên về nguồn tác nhân sinh học là phong phú, đa dạng. Nhiệm vụ nặng nề của các nhà nghiên cứu BVTN là phải nghiên cứu khai thác nguồn tác nhân sinh học đó phục vụ cho đất nước.



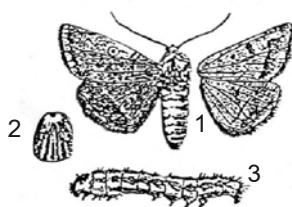
Ngài đêm hại xu hào, bắp cải
(*Barathra brassicae*)
1. Bướm; 2. Ấu trùng



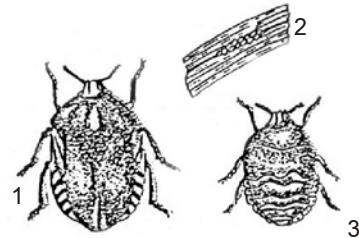
Sâu xanh hại ớt
(*Heliothis assulta*)
1. Bướm; 2. Trứng; 3. Ấu trùng;



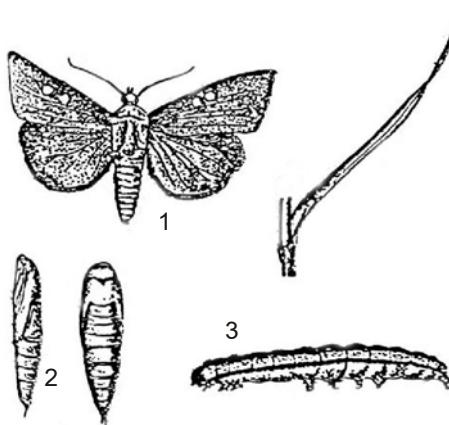
Sâu xám hại rau
(*Agrotis epsilon*)
1. Bướm; 2. Trứng; 3. Ấu trùng



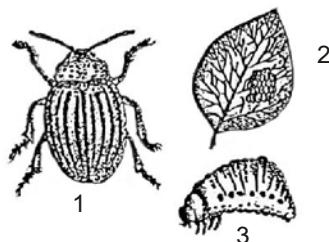
Sâu xanh hại bông
(*Heliothis armigera*)
1. Bướm; 2. Trứng; 3. Ấu trùng



Bọ xít rùa
(*Eurygaster integriceps*)
1. Rệp; 2. Khối trứng; 3. Ấu trùng

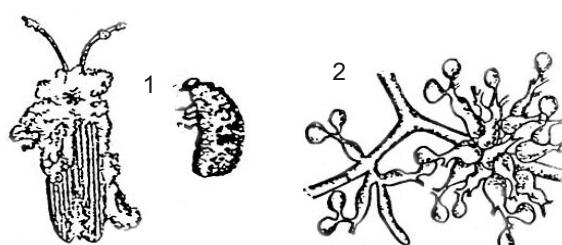


Sâu ăn bắp
(*Leucania separata*)
1. Bướm; 2. Nhộng; 3. Ấu trùng



Bọ lá khoai tây
(*Leptinotarsa decemlineata*)
1. Bọ; 2. Khối trứng; 3. Ấu trùng

Hình 15. Một số sâu bệnh hại cây trồng - đối tượng diệt trừ của chế phẩm VSV



Nấm bạch dương diệt sâu
(*Beauveria bassiana*)
1. Sợi nấm trên cơ thể côn trùng
2. Bào tử trần và cuống bào tử

Chương bảy

CHẾ PHẨM VI SINH VẬT DÙNG TRONG XỬ LÝ VÀ CẢI TẠO MÔI TRƯỜNG

Hiện nay rác thải sinh hoạt, phế thải và nước thải trong chế biến, sản xuất nông công nghiệp là một cản trở rất lớn trong sự phát triển mạnh mẽ của toàn xã hội. Phế thải không chỉ làm ô nhiễm môi trường sinh thái, ô nhiễm nguồn nước, ô nhiễm đất, gây độc hại đến sức khỏe con người, vật nuôi và cây trồng mà còn làm mất đi cảnh quan văn hóa đô thị và nông nghiệp nông thôn.

Vấn đề ô nhiễm môi sinh ngày càng trở lên trầm trọng trên phạm vi toàn cầu. Việc sử dụng quá mức thuốc bảo vệ thực vật, phân hoá học chẳng những gây hậu quả nặng nề đối với đất đai và sức khoẻ cộng đồng, mà còn là quá lãng phí vì cây trồng chỉ có khả năng sử dụng được 40-50% lượng phân hoá học bón vào đất, do đó lại càng gây ô nhiễm môi trường nặng nề hơn.

A. NGUỒN GỐC PHẾ THẢI VÀ BIỆN PHÁP XỬ LÝ

I. NGUỒN GỐC PHẾ THẢI

* **Phế thải là gì?** Phế thải là sản phẩm loại bỏ được thải ra trong quá trình hoạt động, sản xuất, chế biến của con người.

Phế thải có nhiều nguồn khác nhau: Rác thải sinh hoạt; rác thải đô thị; tàn dư thực vật; phế thải do quá trình sản xuất, chế biến nông công nghiệp; phế thải từ các nhà máy công nghiệp như: nhà máy giấy, khai thác chế biến than, nhà máy đường, nhà máy thuốc lá, nhà máy bia, nước giải khát, các lò mổ, các nhà máy xí nghiệp chế biến rau quả đồ hộp...

Việt Nam là nước nông nghiệp có nguồn phế thải sau thu hoạch rất lớn, rất đa dạng. Chương trình 1 triệu tấn đường đã để lại hàng chục vạn tấn bã mía, mùn mía và tàn dư phế thải từ sản xuất, chế biến mía ra đường. Ngành công nghiệp chế biến xuất khẩu cà phê đã thải ra môi trường hơn 20 vạn tấn vỏ/năm. Trên đồng ruộng, nương rẫy hàng năm để lại hàng triệu tấn phế thải là rơm rạ, lõi ngô, cây sắn, thân lá thực vật... Ngoài ra còn có tới hàng triệu tấn rác thải sinh hoạt. Tất cả nguồn phế thải này một phần bị đốt, còn lại trở thành rác thải, phế thải gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường và nguồn nước, trong khi đất đai lại thiếu trầm trọng nguồn dinh dưỡng cho cây và hàng năm chúng ta phải bỏ ra hàng triệu đôla để mua phân hoá học ở nước ngoài.

Phế thải được xếp thành 3 nhóm sau:

- + Phế thải hữu cơ.
- + Phế thải rắn.
- + Phế thải lỏng.

II. BIỆN PHÁP XỬ LÝ PHẾ THẢI

Nhìn chung có 4 biện pháp xử lý phế thải sau:

1. Biện pháp chôn lấp

Chôn lấp là phương pháp xử lý lâu đời, cổ điển và đơn giản nhất. Phương pháp này đòi hỏi nhiều diện tích đất, và thời gian xử lý lâu, có mùi hôi thối, sinh ra các khí độc như CH_4 , H_2S , NH_3 rò rỉ, làm ô nhiễm đất, ô nhiễm nguồn nước. Ở nhiều nước để chống rò rỉ người ta xây bể

lớn, nhưng rất tốn kém và thời gian sử dụng bể không được lâu. Biện pháp này ngày càng bộc lộ nhiều khuyết.

2. Biện pháp đốt

Đây là biện pháp tạm thời khi lượng phế thải quá nhiều. Biện pháp này gây ô nhiễm môi trường không khí rất nghiêm trọng, gây hiệu ứng nhà kính và các loại bệnh đường hô hấp, mặt khác biện pháp này rất tốn nguyên liệu đốt.

3. Biện pháp thải ra hồ sông ngòi và đổ ra biển

Đây là biện pháp rất nguy hiểm, gây ô nhiễm không khí, nguồn nước, tiêu diệt sinh vật sống dưới nước, gây ô nhiễm toàn cầu.

4. Biện pháp sinh học

Hiện nay, biện pháp sinh học để xử lý phế thải là biện pháp tối ưu nhất, đang được tất cả các nước sử dụng.

Biện pháp sinh học là dùng công nghệ vi sinh vật để phân huỷ phế thải. Muốn thực hiện được biện pháp này, điều quan trọng nhất là phải phân loại được phế thải, vì trong phế thải còn nhiều phế liệu khó phân giải như: túi polyetylen, vỏ chai lọ bằng thuỷ tinh và nhựa, các loại phế liệu rắn bền phân giải lâu.

B. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT XỬ LÝ PHẾ THẢI HỮU CƠ TỪ RÁC THẢI SINH HOẠT, PHẾ THẢI NÔNG NGHIỆP SAU THU HOẠCH

I. XỬ LÝ RÁC THẢI SINH HOẠT, RÁC THẢI ĐÔ THỊ BẰNG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

1. Thành phần của rác thải sinh hoạt

Khác với rác thải công nghiệp, rác thải sinh hoạt là một tập hợp không đồng nhất. Tính không đồng nhất biểu hiện ngay ở sự không kiểm soát được của các nguyên liệu ban đầu dùng cho sinh hoạt và thương mại. Sự không đồng nhất này tạo ra một số đặc tính rất khác biệt trong các thành phần của rác thải sinh hoạt.

Một trong những đặc điểm rõ nhất ở phế thải đô thị Việt Nam là thành phần các chất hữu cơ chiếm tỷ lệ rất cao 55- 65%. Trong phế thải đô thị các cấu tử phi hữu cơ (kim loại, thuỷ tinh, rác xây dựng...) chiếm khoảng 12-15%. Phần còn lại là các cấu tử khác. Cơ cấu thành phần cơ học trên của phế thải đô thị không phải là những tỷ lệ bất biến, mà có biến động theo các tháng trong năm và thay đổi theo mức sống của cộng đồng.

Ở các nước phát triển, do mức sống của người dân cao cho nên tỷ lệ thành phần hữu cơ trong rác thải sinh hoạt thường chỉ chiếm 35-40%. So với thế giới thì rác thải đô thị Việt Nam có tỷ lệ hữu cơ cao hơn rất nhiều nên việc xử lý rác thải sinh hoạt ở Việt Nam bằng công nghệ vi sinh vật để sản xuất phân hữu cơ vi sinh là rất thuận lợi.

Trong các cấu tử hữu cơ của rác sinh hoạt, thành phần hóa học của chúng chủ yếu là: C, H, O, N, S và các chất tro (bảng 15).

Bảng 15: Thành phần của các cấu tử hữu cơ rác đô thị^(*)

Cấu tử hữu cơ	Thành phần (%)
---------------	----------------

	C	H	O	N	S	Tro
Thực phẩm	48,0	6,4	37,6	2,6	0,4	5,0
Giày	43,5	6,0	44,0	0,3	0,2	6,0
Carton	44,0	5,9	44,6	0,3	0,2	5,0
Chất dẻo	60,0	7,2	22,8	-	-	10,0
Vải	55,0	6,6	31,2	1,6	0,15	-
Cao su	78,0	10,0	-	2,0	-	10,0
Da	60,0	8,0	11,6	10,0	0,4	10,0
Gỗ	49,5	6,0	42,7	0,2	0,1	1,5

(*) Nguồn : Đề tài cấp Nhà nước KHCN 02 - 04.

Từ bảng trên cho thấy: Rác thải đô thị nếu để phân huỷ một cách vô tổ chức thì môi trường, đặc biệt là nguồn nước sẽ bị ô nhiễm một cách trầm trọng. Ngược lại, nếu được xử lý tốt sẽ tạo ra nguồn hữu cơ là nguồn dinh dưỡng khổng lồ trả lại cho đất, cung cấp dinh dưỡng cho cây, tạo ra được sự cân bằng về sinh thái.

1.1. Xenluloza trong rác thải sinh hoạt, phế thải nông nghiệp

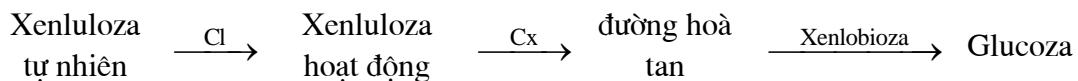
Xenlulo là thành phần chủ yếu trong tế bào thực vật, chiếm tới 50% tổng số hydratcacbon trên trái đất. Trong vách tế bào thực vật, xenlulo tồn tại trong mối liên kết chặt với các polisaccharit khác: Hemixenluloza, pectin và lignin tạo thành liên kết bền vững. Hàm lượng xenluloza trong các chất khác nhau rất khác nhau, trong giấy là 61%, trấu là 31%.

Trong các phé liêu, xenluloza thường có mặt ở các dạng sau:

- Phế liệu nông nghiệp: rơm rạ, lá cây, vỏ lạc, vỏ trấu, lõi thân ngô...
 - Phế liệu công nghiệp thực phẩm: vỏ và xơ quả, bã mía, bã cà phê, bã sắn...
 - Phế liệu trong công nghiệp chế biến gỗ: rễ cây, mùn cưa, gỗ vụn...
 - Các chất thải gia đình: rác, giấy loại...

Cơ chế phân huỷ xenluloza:

Năm 1950, Reese và Ctv. lần đầu tiên đã đưa ra cơ chế phân giải xenluloza



Trong đó: Cx tương ứng với exoglucanza.

C1 tương ứng với endogluanaza.

Theo Reese thì C1 là “tiền nhân tố thuỷ phân” hay là enzyme không đặc hiệu, nó làm trương xenluloza tự nhiên thành các chuỗi xenluloza hoạt động có mạch ngắn hơn và bị enzyme Cx tiếp tục phân cắt tạo thành các đường tan và cuối cùng thành glucoza. Những VSV phát triển trên hợp chất chứa xenluloza đã tiết ra các loại enzyme này để phân huỷ chuyển hoá xenluloza.

1.2. Hemixenluloza trong rác thải, phế thải nông nghiệp

Hemixenluloza có khối lượng không nhỏ, chỉ đứng sau xenluloza trong tế bào thực vật, chúng được phân bố ở vách tế bào. Hemixenluloza có bản chất là polysacarit bao gồm khoảng 150 gốc đường liên kết với nhau bằng câu nối β -1,4 glucozit; β -1,6 glucozit và thường tạo thành mạch nhánh ngắn có phân nhánh.

Cơ chế phân giải hemixenluloza:

Phân lõn hemixenluloza có tính chất tương đồng với xenluloza, tuy nhiên hemixenluloza có phân tử lượng nhỏ hơn và cấu trúc đơn giản hơn. Như vậy Hemixenluloza kém bền vững hơn do đó dễ phân giải hơn xenluloza. Vì sinh vật phân giải hemixenluloza nhanh hơn là xenluloza.

1.3. Lignin trong rác thải sinh hoạt, phế thải nông nghiệp

Lignin là những hợp chất có thành phần cấu trúc rất phức tạp, là chất cao phân tử được tạo thành do phản ứng ngưng tụ từ 3 loại rượu chủ yếu là trans-P-cumarynic; trans-connyferynic; trans-cynaprylic. Lignin khác với xenluloza và hemixenluloza ở chỗ hàm lượng carbon tương đối nhiều, cấu trúc của lignin còn có nhóm methoxyl ($-OCH_3$) liên kết với nhau bằng liên kết ($C - C$) hay ($C - O$) trong đó phổ biến là liên kết aryl-glycerin; aryl-aryl và diaryl etc. Lignin dễ bị phân giải tùng phần dưới tác dụng của $Na_2S_2O_3$, H_2SO_3 , CaS_2O_3 ...

Cơ chế phân giải lignin:

Nhiều công trình kết luận có tới 15 enzyme tham gia vào quá trình phân giải lignin. Ligninaza không thuỷ phân lignin thành các tiểu phân hòa tan như quá trình phân giải xenluloza. Nhưng trong đó có 3 enzyme chủ chốt là:

- + Lignin pezoxidaza.
- + Mangan pezoxidaza.
- + Laccaza.

2. Vi sinh vật phân giải rác thải sinh hoạt, phế thải nông nghiệp

2.1. Vi sinh vật phân giải hợp chất hữu cơ chứa xenluloza

Trong tự nhiên vi sinh vật phân giải xenluloza vô cùng phong phú bao gồm: Vi khuẩn; nấm; xạ khuẩn; nguyên sinh động vật...

+ Vi khuẩn: Là nhóm vi sinh vật lớn nhất và cũng được nghiên cứu nhiều nhất. Từ thế kỷ 19 các nhà khoa học đã phát hiện thấy một số loại vi khuẩn ký khí có khả năng phân giải xenluloza. Những năm đầu thế kỷ 20 người ta lại phân lập được các vi khuẩn hiếu khí cũng có khả năng này. Trong các vi khuẩn hiếu khí phân giải xenluloza, thì niêm vi khuẩn có vai trò lớn nhất chủ yếu là các giống *Cytophaga*, *Sporocytophaga* và *Sorangium*. Niêm vi khuẩn nhận được năng lượng khi oxy hoá các sản phẩm của sự phân giải xenluloza thành CO_2 và H_2O . Ngoài ra còn thấy giống *Cellvibrio* cũng có khả năng phân giải xenluloza. Trong điều kiện ký khí, các vi sinh vật ưa ẩm, ưa nhiệt thuộc giống *Clostridium* và *Bacillus* tiến hành phân giải xenluloza thành glucoza và xenlobioza, chúng sử dụng năng lượng từ các loại đường đơn và nguồn carbon cũng thường kèm theo việc tạo nên các acid hữu cơ, CO_2 và H_2 .

Trong dạ dày của động vật ăn cỏ tồn tại hệ vi sinh vật để phân giải xenluloza đó là: *Ruminococcus*; *Flavifaciens*; *Butyrivibrio*; *Bacteroides*. Ngoài ra còn có: *Cellulomonas*; *Bacillus*; *Acetobacter* cũng phân giải mạnh xenluloza.

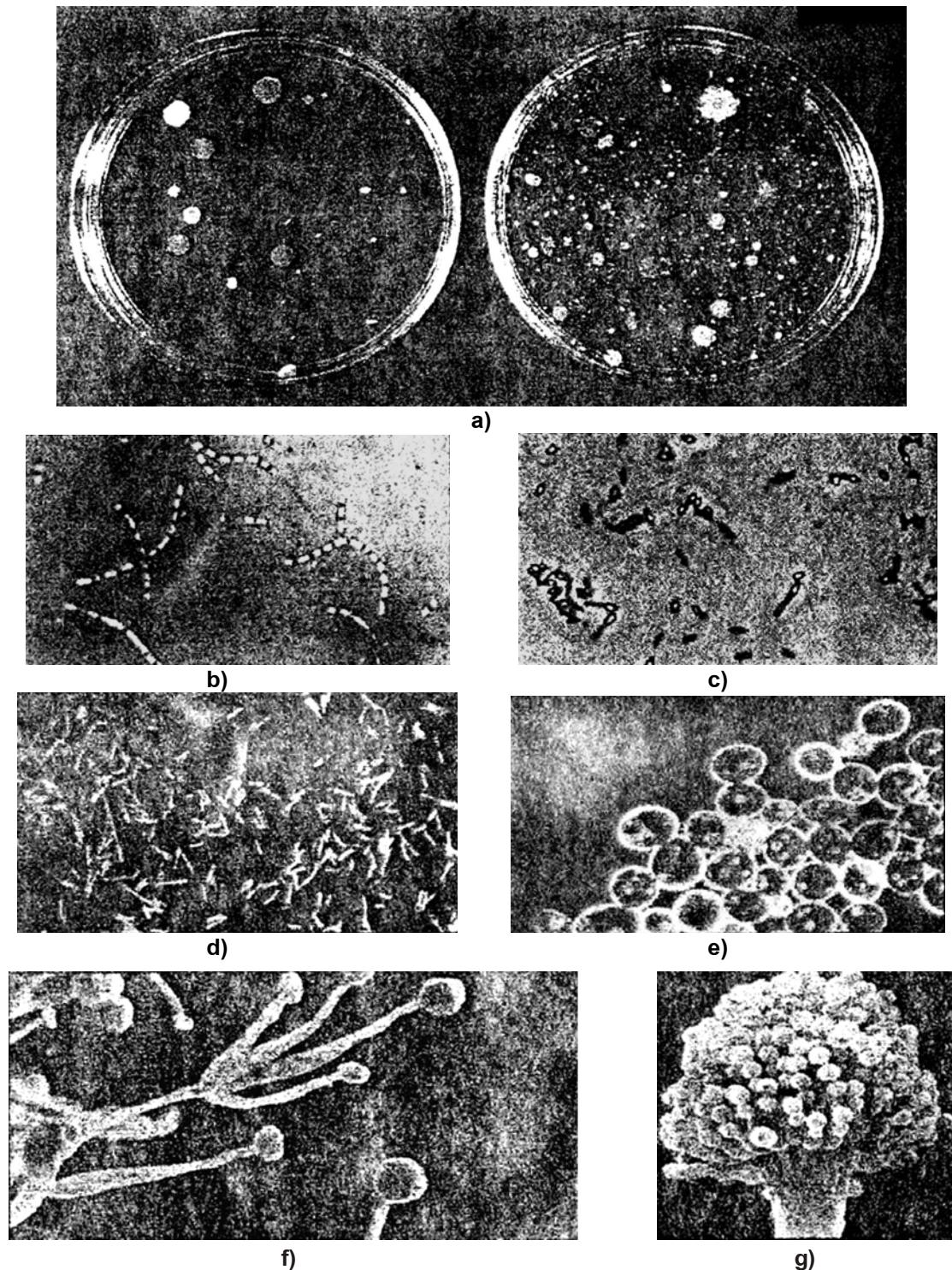
Nhiều tác giả còn phân lập tuyển chọn trong đống ủ phế thải có *Clostririum*.

Pseudomonas chứa phức hệ enzyme xenluloza. *Acteromobacter*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga* và *Sorangium*, *Sporocytophaga*.

+ Nấm sợi: Nấm sợi phân giải xenluloza mạnh hơn vi khuẩn vì chúng tiết vào môi trường lượng enzyme ngoại bào nhiều hơn vi khuẩn. Vi khuẩn thường thường tiết vào môi trường phức hệ xenluloza không hoàn chỉnh chỉ thuỷ phân được cơ chất đã cải tiến như giấy lọc và CMC, còn nấm tiết vào môi trường hệ thống xenluloza hoàn chỉnh nên có thể thuỷ phân xenluloza hoàn toàn. Các loại nấm phân huỷ mạnh xenluloza là: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Phanerochate*, *Sporotrichum*, *Sclerotium*.

Nấm ưa nhiệt, chúng có thể tổng hợp các enzyme bền nhiệt hơn, chúng sinh trưởng và phân giải nhanh xenluloza. Nấm có thể phát triển ở pH = 3,5 - 6,6.

Nguồn carbon giúp cho nấm phân giải mạnh xenluloza. Trong phế thải chứa nhiều nitrat cũng khích thích nấm phân giải xenluloza, nguồn nitơ hữu cơ cũng giúp cho nấm phân giải xenluloza mạnh hơn.



Hình 16. Chủng VSV để xử lý phế thải hữu cơ

- | | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------------|
| a. Khuẩn lạc của vi khuẩn | b. Cầu khuẩn | c. Trực khuẩn Gram dương |
| d. Trực khuẩn Gram âm | e. Nấm men | f. Nấm mốc bậc thấp |
| | g. Nấm mốc bậc cao | |

Người ta đã tìm thấy trong đống ủ phế thải có nhiều loại nấm như:

Aspergillus, Alternaria, Chaetomium, Coprinus, Fomes, Fusarium, Myrothecium, Penicillium, Polyporus, Rhizoctonia, Rhizopus, Trichoderma...

+ **Xạ khuẩn:** Xạ khuẩn có tác dụng phân giải phế thải khá mạnh. Người ta chia xạ khuẩn thành 2 nhóm: Xạ khuẩn ưa ẩm, chúng phát triển mạnh ở nhiệt độ 28 - 30°C, và xạ khuẩn ưa nhiệt, chúng có thể phát triển mạnh ở nhiệt độ 60 - 70°C.

Trong đống ủ phế thải người ta tìm thấy nhiều loại xạ khuẩn đó là: *Actinomyces, Streptomyces, Frankia, Nocardia, Actinopolyspora, Actinosynoema, Dermatophilus, Pseudonocardia, Cellulomonas*.

2.2. Vi sinh vật phân giải hemixenluloza

Vi sinh vật phân giải hemixenluloza thường có trong dạ dày của động vật nhai lại như trâu bò. Chủ yếu là các giống sau: *Ruminococcus, Bacillus, Bacteroides, Butyvibrio, Clostridium*. Nhiều loại nấm sợi như: *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma*.

2.3. Vi sinh vật phân giải Lignin

Vi sinh vật phân giải lignin là những giống có khả năng tiết ra enzyme ligninaza, gồm có: Nấm *Basidiomycetes, Acomycetes*, nấm bất hoàn. Vi khuẩn gồm: *Pseudomonas, Xanthomonas, Acinebacter*. Xạ khuẩn: *Streptomyces*.

3. Quy trình xử lý rác thải hữu cơ

3.1. Các phương pháp xử lý phế thải bằng công nghệ vi sinh vật

+ Phương pháp sản xuất khí sinh học (Bioga) - Ủ yếm khí:

Cơ sở của phương pháp này là nhờ sự hoạt động của vi sinh vật mà các chất khó tan (xenluloza, lignin, hemixeluloza và các chất cao phân tử khác) được chuyển thành chất dễ tan. Sau đó lại được chuyển hóa tiếp thành các chất khí trong đó chủ yếu là метan.

Ưu điểm của phương pháp này là có thể thu được một loạt các chất khí, có thể cháy được và cho nhiệt lượng cao sử dụng làm chất đốt, không ô nhiễm môi trường. Phế thải sau khi lên men được chuyển hóa thành phân hữu cơ có hàm lượng dinh dưỡng cao để bón cho cây trồng. Tuy nhiên phương pháp này có những nhược điểm sau: Khó lấy các chất thải sau khi lên men; là quá trình kỹ khí bắt buộc vì vậy việc thiết kế bể ủ rất phức tạp, vốn đầu tư lớn; năng suất thấp do sự sinh trưởng của vi khuẩn sinh metan có mặt trong rác chậm; gặp nhiều khó khăn trong khâu tuyển chọn nguyên liệu.

+ Phương pháp ủ phế thải thành đống, lên men tự nhiên có đảo trộn:

Rác được chất thành đống có chiều cao từ 1,5 - 2,0m đảo trộn mỗi tuần một lần. Nhiệt độ đống ủ là 55 - 60°C, độ ẩm 50 - 70%. Sau 3 - 4 tuần tiếp không đảo trộn. Phương pháp này đơn giản, nhưng mất vệ sinh, gây ô nhiễm nguồn nước và không khí.

+ Phương pháp ủ phế thải thành đống không đảo trộn và có thổi khí:

Phế thải được chất thành đống cao từ 1,5 - 2,0m. Phía dưới được lắp đặt một hệ thống phân phối khí. Nhờ có quá trình thổi khí cưỡng bức, mà các quá trình chuyển hóa được nhanh hơn, nhiệt độ ổn định, ít ô nhiễm môi trường.

+ Phương pháp lên men trong các thiết bị chứa:

Phế thải được cho vào các thiết bị chứa có dung tích khác nhau để lên men. Lượng khí và nước thải sinh ra trong quá trình lên men được kiểm soát chặt chẽ. Các vi sinh vật đã được tuyển chọn bổ sung cho hệ vi sinh vật tự nhiên trong đống ủ, nhờ đó mà quá trình xảy ra nhanh và dễ kiểm soát, ít ô nhiễm hơn.

+ Phương pháp lên men trong lò quay:

Phế thải được thu gom, phân loại và đập nhỏ bằng búa đưa vào lò quay nghiêng với độ ẩm từ 50- 60%. Trong khi quay phế thải được đảo trộn do vậy không phải thổi khí. Rác sau khi lên men lại được ủ chín thành đống trong vòng 20-30 ngày.

+ Phương pháp xử lý rác thải hữu cơ công nghiệp:

Đặc điểm chung của kiểu ủ rác công nghiệp này là mức tự động hoá cao do đó rác được phân huỷ rất tốt, nhưng lại đòi trình độ khoa học công nghệ cao, chi phí tốn kém nên chưa phù hợp với trình độ và khả năng đầu tư của các nước đang phát triển.

+ Phương pháp ủ rác thải hữu cơ làm phân ủ:

Rác thải hay than bùn được tái chế thành sản phẩm cung cấp cho nông nghiệp. Cơ sở chế biến phân ủ đặt ở trung tâm do đó giảm được chi phí vận chuyển. Dễ dàng thu gom các nguyên liệu để tái chế và có thể xử lý được nước thải mùi cống. Các nguyên tắc trong sản xuất phân ủ từ rác thải đô thị và rác thải sinh hoạt, phế thải nông công nghiệp đều có thể xử lý được theo phương pháp này.

Phương pháp này còn có một số hạn chế sau: Vốn chi phí vận hành tương đối lớn, diện tích sử dụng khá lớn, phân loại và tuyển chọn rác mất nhiều công.

II. XỬ LÝ CHẤT THẢI RẮN BẰNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chất thải rắn có thể xử lý bằng phương pháp sinh học là các chất thải có thành phần hữu cơ cao như: Rác thải đô thị, phế thải nông công nghiệp, chất thải rắn của các ngành chế biến nông sản và thực phẩm.

1. Chất thải của ngành công nghiệp mía đường và các giải pháp xử lý

Bên cạnh sản phẩm chính đó là đường, ngành công nghiệp mía đường đã thải ra một lượng lớn các chất thải tồn đọng ở các dạng khác nhau về thành phần và tính chất hoá lý.

1.1. Lá và ngọn mía

Là phế thải chính của những vùng trồng mía. Lá và ngọn mía chiếm một khối lượng rất lớn từ 25 - 30% tổng sản lượng của cây mía.

Trong lá mía hàm lượng C 40 - 47%; H 7 - 7,3%; O 40- 41%; N 1 - 2%. Thành phần hoá học của ngọn mía: N 0,9%; hemixenluloza 20%; xenluloza 38%; lignin 7,0%; silic 1,8%. 3 thành phần chính là xenluloza, hemixenluloza, lignin trong lá và ngọn mía tạo thành cấu trúc bền đó là ligno - xenluloza, cấu trúc này quyết định cơ bản tính chất hóa lý của lá và ngọn mía.

1.2. Bã mía

Là chất thải của công đoạn ép mía, bã mía chiếm 25 - 30% so với khối lượng đem ép, có thành phần hóa học như sau: Xenluloza 46%; hemixenluloza 24,5%; lignin 20%; chất béo 3,4%, tro 2,4% và silic 2,0%.

1.3. Bùn lọc

Là chất thải rắn của công đoạn làm trong nước mía thô sau khi ép mía, có thành phần hóa học như sau: Chất béo 5 - 14%; xơ 15 - 30%; đường 5 - 15%; SiO₂ 4 -10%; CaO 1- 4%; P₂O₅ 1 - 3% và MgO 0,5 - 1,5%.

1.4. Một số nghiên cứu bước đầu về xử lý phế thải ngành mía đường

+ Xử lý lá mía, ngọn mía:

Trong những năm gần đây, việc tái sử dụng lá và ngọn mía để thay thế phân chuồng bón cho cây mía đã được nhiều nhà khoa học quan tâm.

Vũ Hữu Yêm, Trần Công Hạnh (1995 - 1997) đã nghiên cứu hiệu quả kinh tế của việc vùi lá, ngọn mía kết hợp NPK. Kết quả cho thấy: Mía nẩy mầm đẻ nhánh sớm hơn, tỷ lệ nẩy mầm cho cao hơn so với ở công thức bón NPK. Tiết kiệm được 876.000đ/ha, điều quan trọng là thay thế được lượng phân chuồng thiếu hụt hiện nay cho cây mía. Mặc dù có ưu điểm như trên, nhưng quá trình phân huỷ các chất xơ sợi trong lá, ngọn mía rất chậm. Để khắc phục vấn đề này, Nguyễn Xuân Thành và Nguyễn Đình Mạnh (2001) đã xử lý lá, ngọn mía được thu gom tại đồng ruộng bằng chế phẩm vi sinh vật, sau khi xử lý đã được đánh thành đống ủ trên đồng ruộng với thời gian 45 - 60 ngày, sau đó đem bón lót cho mía. Đây là phương pháp xử lý rất tiện lợi, cho hiệu quả kinh tế cao, được người trồng mía tán đồng.

+ Xử lý bã mía - phế thải thô của nhà máy đường

Bã mía được thải ra trong khâu ép thô là chất thải chứa nhiều chất xơ rất khó phân giải, khối lượng thải lớn nhất của công đoạn làm đường. Người ta thường dùng bã mía này làm chất đốt phục vụ cho khâu trưng cất đường, nhưng do khối lượng quá lớn sử dụng làm chất đốt không hết phải thải ra môi trường. Vài năm gần đây người ta đã sử dụng nguồn phế thải này để làm giá thể nuôi nấm ăn bằng cách trộn 1/2 - 1/3 bã mía với các hợp chất giàu hữu cơ. Một số cơ sở sản xuất trộn bã mía với đất có bổ sung các chất dinh dưỡng để làm bầu ươm cây giống.

Trường Đại học Nông nghiệp (1999 - 2001) đã giúp một số nhà máy đường xử lý bã mía bằng công nghệ vi sinh vật theo phương pháp ủ bán hảo khí. Sau 2 tháng đem tái chế thành phân hữu cơ bón cho cây mía.

+ Bùn mía: Đây là phế thải cuối cùng của khâu lọc nước mía, khối lượng phế thải này không nhỏ. Một số năm gần đây người ta dùng men vi sinh vật để phân huỷ những chất còn lại trong bùn mía và dùng những chủng vi sinh vật hữu ích có bổ sung lượng NPK làm phân hữu cơ vi sinh vật bón cho cây trồng. Phương pháp này được người nông dân chấp nhận vì giá thành rẻ và cho hiệu quả khá cao trên đồng ruộng.

1.5. Một số kết quả bước đầu xử lý phế thải hữu cơ và bã mía

[Đề tài cấp Nhà nước KHCN 04-04; cấp Bộ B99, 2000-32-46; B2001- 32- 09 (1999 - 2001)].

+ **Chất lượng của chế phẩm vi sinh vật (VSV) để xử lý phế thải mùn mía và rác thải hữu cơ**

Số liệu bảng 16 cho thấy: Chế phẩm VSV có độ ẩm 35,6%; pH_{KCl} 6,6; độ xốp 68,0%; mật độ VSV trong chế phẩm đạt từ $4,8 \cdot 10^7$ đến $6,7 \cdot 10^9$ tế bào/1g, tùy từng chủng loại. Trong chế phẩm có chứa 6 nhóm VSV chính, mật độ sống sót của 6 nhóm VSV này đều đạt cao hơn so với TCVN - 1996.

Bảng 16: Chất lượng của chế phẩm VSV

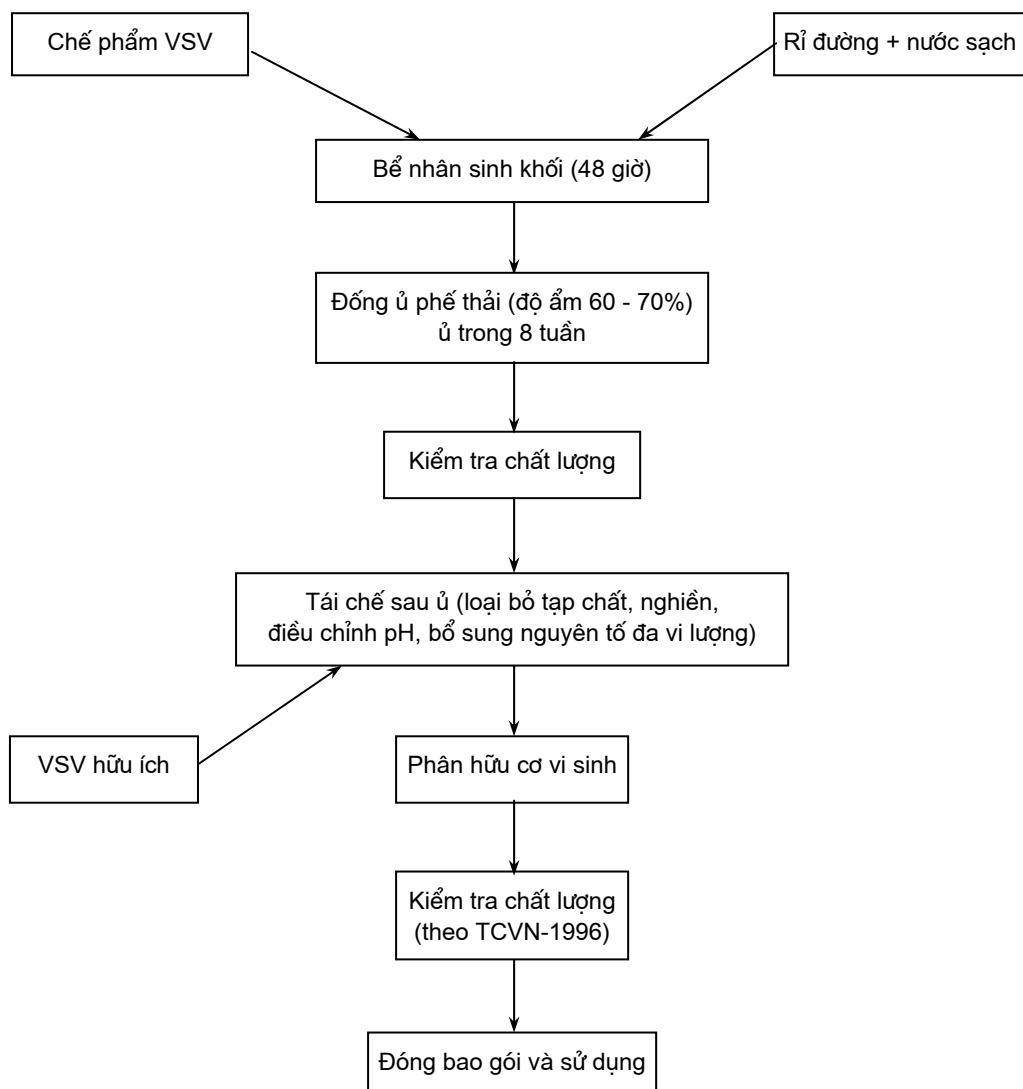
Chỉ tiêu	Kết quả kiểm tra
Độ ẩm (%)	35,6
pH _{KCl}	6,6
Độ xốp (%)	68,0
Vi khuẩn cố định nitơ phân tử (tế bào/1g)	$6,7 \cdot 10^9$

Vi khuẩn phân giải lân (tế bào/1g)	$4,8 \cdot 10^7$
Vi khuẩn phân giải xenluloza (tế bào/1g)	$1,2 \cdot 10^8$
Nấm men (bào tử/1g)	$7,6 \cdot 10^8$
Nấm mốc (bào tử/1g)	$3,1 \cdot 10^8$
Xạ khuẩn (bào tử/1g)	$4,9 \cdot 10^7$

Trong thời gian nghiên cứu đã thử nghiệm ủ phế thải theo 2 phương pháp sau:

- Xử lý VSV vào đống ủ có đảo trộn (hảo khí và bán hảo khí). Theo phương pháp này thì chế phẩm VSV được hòa vào nước và phun đều cho đống ủ, lượng nước cần phun được tính toán sao cho đống ủ có độ ẩm từ 60-70%. Đống ủ đánh thành luống chạy dài dọc theo sân ủ có mái che, kích thước $2,0 \times 1,5\text{m}$ (rộng \times cao). Cứ 15 ngày đảo trộn một lần có xử lý chế phẩm vi sinh vật.

- Xử lý VSV vào bể ủ không đảo trộn (kiểu yếm khí). Phế thải được đưa vào bể từng lớp, mỗi lớp dày khoảng 30cm phun dịch VSV, đến khi đầy bể thì lấy bùn ao trát kín trên bê mặt của bể ủ. Quy trình xử lý được trình bày ở sơ đồ 17:



Hình 17. Quy trình xử lý chế phẩm VSV vào đống ủ phế thải

+ Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đến quá trình phân giải phế thải trong đống ủ

Số liệu bảng 14 cho thấy:

- *Về pH*: Cả 2 loại rác thải sinh hoạt và mùn mía đều có pH kiềm yếu (7,6 - 8,6). Trong quá trình ủ pH tăng chút ít (pH = 8,0 - 8,1) do hoạt động sống của VSV đã làm kiềm hóa môi trường.

- *Về độ ẩm*: Đống ủ có độ ẩm sau 15 ngày đạt 65%, sau 2 tháng ủ giảm xuống chỉ còn 30-35%. Ở công thức xử lý chế phẩm VSV độ ẩm luôn luôn cao hơn ở công thức đối chứng, nguyên nhân là do nhu cầu về nước cho hoạt động sống của VSV trong quá trình ủ.

- *Về nhiệt độ*: Nhiệt độ đạt cực đại sau 15 ngày ủ, đạt 40 - 45°C ở công thức đối chứng và 68 - 72°C ở công thức có xử lý VSV. Nhiệt độ giảm mạnh sau 2 tháng ủ, chỉ còn 28 - 30°C.

- *Về độ xốp*: Độ xốp tăng dần theo thời gian ủ, ở công thức có xử lý VSV độ xốp luôn luôn cao hơn so với công thức đối chứng. Nguyên nhân do quá trình phân giải chuyển hoá mạnh của VSV làm cho độ tơi xốp tăng, sau 2 tháng ủ độ xốp đạt 71 -73%.

Bảng 17: Kết quả phân tích phế thải trong quá trình ủ

Chỉ tiêu	Loại phế thải	Rác thải hữu cơ						Mùn mía					
		15 ngày		30 ngày		60 ngày		15 ngày		30 ngày		60 ngày	
		ĐC	T/N	ĐC	T/N	ĐC	T/N	ĐC	T/N	ĐC	T/N	ĐC	T/N
pH _{KCl}		7,8	7,9	7,7	8,1	7,5	8,2	7,6	7,7	7,6	7,8	7,7	8,0
Độ ẩm (%)		65	60	51	40	35	30	65	62	45	35	30	25
Nhiệt độ (°C)		45	72	31	42	28	28	40	68	35	40	30	29
Độ xốp (%)		49	58	55	65	58	71	52	59	56	65	58	73
OM (%)		21	23	22	25	23	27	17	19	20	25	21	26
P ₂ O ₅ (%)		0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7	0,5	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9
K ₂ O (%)		0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
P ₂ O ₅ dt (mg/100g)		120	215	140	316	180	400	150	180	160	200	180	250
K ₂ Otrđ (mg/100g)		47	62	58	88	68	110	65	79	68	75	90	130
VCTS (.10 ⁷ tế bào)		25	46	29	72	31	98	15	41	21	51	32	87
Nấm (.10 ⁶ bào tử)		21	34	43	67	24	33	31	48	52	75	36	52
XK (.10 ⁴ tế bào)		4	6	8	14	10	22	2	3	6	9	4	15
V.k xenlulo (.10 ⁵)		7	11	15	30	16	38	5	8	9	15	10	21
VKPGL (.10 ⁵ TB)		9	16	9	23	16	36	4	12	6	18	11	22

- *Về các chỉ tiêu dinh dưỡng trong đống ủ*: Hàm lượng các chất dinh dưỡng trong đống ủ tăng dần theo thời gian ủ, nhất là các chất dinh dưỡng dễ tiêu. Ở công thức có xử lý VSV hàm lượng các chất dinh dưỡng luôn luôn cao hơn ở công thức đối chứng, ở đống ủ rác thải sinh hoạt có hàm lượng dinh dưỡng cao hơn ở đống ủ mùn mía.

Sau 2 tháng ủ cho thấy: OM% 26-27; P₂O₅% 0,7-0,9; K₂O% 0,5; P₂O₅ dẽ tiêu 250-400 mg/100g; K₂O trao đổi 110-130mg/100g.

- Về *mật độ VSV trong đóng ủ*: Ở công thức xử lý VSV cho số lượng của 5 nhóm VSV được phân tích luôn luôn cao hơn ở công thức đối chứng và đạt cao nhất sau 2 tháng ủ. Riêng nấm, tổng số đạt cực đạt chỉ sau 1 tháng ủ. Cụ thể là: VKTS đạt $87-98.10^7$ tế bào/1g; nấm tổng số đạt $67-75.10^6$ bào tử/1g; xạ khuẩn đạt $15-22.10^4$ tế bào/1g; vi khuẩn phân giải xenlulo đạt $21-38.10^5$ tế bào/1g; vi khuẩn phân giải lân đạt $22-36.10^5$ tế bào/1g phế thải.

+ Chất lượng của phân hữu cơ VSV tái chế từ phế thải sau ủ

Bảng 18: Chất lượng của phân hữu cơ VSV sản xuất từ phế thải

Nguồn gốc phế thải Chỉ tiêu	Rác thải sinh hoạt	Mùn mía
pH _{KCl}	7,2	7,5
Độ ẩm (%)	25	24
Độ xốp (%)	68	72
OM (%)	21,5	18,1
N (%)	1,2	1,0
P ₂ O ₅ (%)	3,3	3,0
K ₂ O (%)	2,6	2,4
P ₂ O ₅ dt (mg/100g)	500	400
K ₂ O trđ (mg/100g)	310	320
VKTS (.10 ⁸ tế bào/1g)	53	42
VKCĐN (.10 ⁶ tế bào/1g)	120	96
VKPGL(.10 ⁶ tế bào/1g)	9,2	7,1

Sản phẩm sau xử lý phế thải bằng chế phẩm VSV đã tái chế để sản xuất phân hữu cơ vi sinh theo quy trình của ĐHNNI (Kết quả của đề tài B 99-32-46). Số liệu ở bảng 18 cho thấy: pH_{KCl} của phân đạt trung tính (7,2-7,5); độ ẩm 24-25%; độ xốp 68-72%; OM tổng số 18,1-21,5%; N tổng số 1,0-1,2%; P₂O₅ 3,0-3,4%; K₂O 2,4-2,6%; P₂O₅ dẽ tiêu 400-500 mg/100g; K₂O trao đổi 300-320mg/100g; VKTS 42-53.10⁸ tế bào/1g; VKCĐN 0,9-1,2.10⁸ tế bào/1g; VKPGL 7,1-9,2.10⁶ tế bào/1g. Chất lượng của phân hữu cơ vi sinh đạt TCVN.

2. Phế thải công nghiệp chế biến cà phê và các giải pháp xử lý

2.1. Phế thải rắn từ vỏ cà phê

Từ những năm 80 trở lại đây, trên thế giới mà nhất là ở những nước sản xuất cà phê xuất khẩu, việc nghiên cứu các biện pháp sinh học để xử lý phế thải cà phê được nhiều người quan tâm. Theo số liệu của C. Hajipakkos cho thấy nước thải từ các nhà máy chế biến cà phê có hàm lượng BOD và COD rất cao (tương ứng 3.000kg/ngày và 4.000 mg/lít, đôi khi có thể cao hơn 9.000 mg/lít). Chất rắn lơ lửng là 1.500 mg/lít, gấp 3 lần hàm lượng cho phép, ngoài ra còn có các chất dầu, mỡ với nồng độ cao gấp 2 lần bình thường (Nguồn KHCN04- 04. 2000).

Các nhà khoa học đã dùng một số chủng giống vi sinh vật yếm khí có khả năng phân giải vỏ cà phê (các chất xenluloza, lignin...) như nấm: *Chladomyces*, *Penicilium*, *Trichderma*, *Fusarium oxysporum*; vi khuẩn: *Sporocytophaga methanogenes*; *Rudbeckia hirta L.* để xử lý đống ủ vỏ cà phê. Kết quả rất khả quan, sau 2 - 3 tháng ủ tỷ lệ xenluloza trong vỏ cà phê giảm 60 - 80% so với đống ủ đối chứng.

Ở Việt Nam có trên 350.000ha cà phê và sản lượng cà phê trung bình là 3.000 tấn/năm khô/năm với lượng vỏ cà phê khô khoảng 200.000 tấn/năm, mà thành phần của nó chủ yếu là ligno-celluloza, một hợp chất rất khó phân giải trong điều kiện tự nhiên. Những năm qua tuy đã dùng vỏ cà phê để làm giá thể nuôi trồng nấm ăn, nhưng phân rất lớn vẫn thải ra môi trường gây ô nhiễm nặng. Hiện nay các nhà khoa học đang thử nghiệm xử lý phế thải này bằng công nghệ vi sinh vật và tái chế thành phân hữu cơ bón cho cây trồng.

2.2. Một số kết quả bước đầu về xử lý phế thải vỏ cà phê bằng vi sinh vật

[Kết quả của đề tài Nhà nước KHCN 04-04 (1998 - 2000)].

Phế thải cà phê được xử lý theo 3 kiểu:

- a) Ủ thành đống lớn không có vách ngăn ở ngoài trời, phun chế phẩm VSV.
- b) Xử lý trong các hố ủ có vách ngăn ở trong nhà, phun chế phẩm VSV.
- c) Đổi chứng (để tự nhiên ngoài trời không phun chế phẩm VSV).

+ Kết quả thử nghiệm cho thấy:

Ở trường hợp (a) ủ ngoài trời sau 4 tháng quá trình mùn hóa được 80%.

Ở trường hợp (b) ủ trong nhà sau 3 tháng quá trình mùn hóa được 80%.

Ở trường hợp (c) để tự nhiên ngoài trời sau 1 năm quá trình mùn hóa mới đạt được 80%.

* Tái chế phế thải sau xử lý làm phân bón cho cây trồng:

Sau khi ủ 3 - 4 tháng, vỏ cà phê được phối trộn với NPK, vi lượng và vi sinh vật hữu hiệu thành phân hữu cơ vi sinh bón cho cây trồng.

Bón loại phân này cho cà phê; cao su; mía; ngô cho thấy:

+ Mía: làm tăng số nhánh hữu hiệu, tăng năng suất thực thu 4 - 16% so với công thức đối chứng.

+ Ngô: tăng số hạt/hàng, tăng số cây 2 bắp, tăng năng suất thực thu 12 - 25% so với công thức đối chứng.

+ Cà phê: giảm tỷ lệ quả rụng đáng kể, tăng năng suất 11 - 19% so với công thức đối chứng.

+ Cao su: tăng tỷ lệ mủ sau một lần cạo mủ.

* Lãi suất tăng khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh vật là: 5,35% đối với cây mía; 5,63% đối với cây ngô; 4,3% đối với cây bông; 5,97% đối với cây cà phê và 1,59% đối với cây cao su.

C. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT XỬ LÝ NƯỚC THẢI CHỐNG Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG

I. NGUỒN NƯỚC THẢI

Nước thải từ nhiều nguồn khác nhau: Nước thải sinh hoạt; nước thải từ các nhà máy công nghiệp (Nhà máy giấy, nhà máy dệt, nhà máy hoá chất, các nhà máy khai thác quặng, than, nhà

máy đường, nhà máy bia...); nhà máy chế biến thực phẩm (các lò giết mổ, đông lạnh, đồ hộp xuất khẩu, hoa quả...).

Theo thống kê của Trung tâm Môi trường vệ sinh thuỷ sản: cứ 100 nghìn tấn nguyên liệu chế biến thuỷ hải sản xuất khẩu thì có 50 nghìn tấn phế thải rắn, 10 nghìn tấn thịt vụn kèm với 3 triệu mét khối nước thải, ngoài ra còn nhiều hoá chất độc hại được thải ra môi trường trong quá trình chế biến sản xuất (Dự án TTM.TS 1998).

Chỉ tính riêng vùng Đồng bằng sông Hồng, tổng sản lượng thịt hơi đạt 450 - 480 nghìn tấn, sản lượng thuỷ sản đạt 161 nghìn tấn, sản lượng rau quả đạt hàng trăm nghìn tấn (nguồn TS. Vũ Năng Dũng - NXBNN, 2001).

Theo tài liệu của nhà máy giấy Bãi Bằng - Phú Thọ, thì cứ sản xuất được 1000 tấn giấy phải thải ra 25 - 30 triệu m³ nước từ các cửa thải khác nhau: Nước thải rửa gỗ, nước thải rửa do quá trình thuỷ phân và chưng cất, nước thải rửa trong quá trình tẩy bột kiềm, nước thải rửa trong quá trình trung hoà, nước thải rửa lò than... Trong các loại nước thải này chứa rất nhiều độc tố như: các hợp chất hữu cơ, hợp chất clo, sulfat, CaO, các axit dư thừa, các ion kim loại nặng độc hại (Hg, Cd, Pb, Clo dư, NaOCl), sạn, cát gỗ vụn ...

Nước thải được phân làm 2 loại chính sau:

1. Nước thải sinh hoạt

Là nguồn nước thải của các khu dân cư tập trung từ sinh hoạt của con người (ăn uống, tắm giặt, phân thải, nước tiểu của người) và gia súc gia cầm hàng ngày được thải ra vào các hệ thống cống rãnh của khu dân cư. Trong nước thải loại này chứa nhiều phân rác, các hợp chất hữu cơ và các muối hòa tan, đặc biệt là chứa nhiều loại vi sinh vật gây bệnh, các loại trứng giun, sán....Đây là loại nước thải phổ biến và số lượng rất lớn. Mức độ ô nhiễm của nó phụ thuộc vào trình độ văn minh, trình độ dân trí của từng khu dân cư, từng quốc gia.

2. Nước thải công nghiệp

Là nước thải của một nhà máy hay khu công nghiệp tập trung với các loại hình sản xuất rất khác nhau, vì vậy trong nước thải công nghiệp rất đa dạng, rất nhiều chủng loại hợp chất khác nhau và độ độc hại gây ô nhiễm môi trường cũng rất khác nhau.

+ Các nhà máy chế biến thực phẩm như đường, rượu bia, đồ hộp, lò giết mổ gia súc gia cầm...

+ Các nhà máy sản xuất nguyên vật liệu như giấy, xà phòng, công nghiệp dệt, công nghiệp hóa dầu, sản xuất các loại hóa chất...

Ở nước thải công nghiệp, ngoài chứa hàm lượng cao các hợp chất hữu cơ như protein, các dạng carbohydrate, dầu mỡ (từ các công nghệ chế biến thực phẩm), hemicellulose, lignin (công nghiệp sản xuất giấy), còn có các hợp chất hóa học khó phân huỷ như các hợp chất vòng thơm có N, các alkyl benzensulfonate (công nghiệp sản xuất bột giặt), các loại dung môi, các kim loại nặng như Pb, Hg, As...

Nhìn chung nước thải công nghiệp so với nước thải sinh hoạt có các chỉ số BOD (nhu cầu oxygen sinh hóa) và COD (nhu cầu oxygen hóa học) cao hơn rất nhiều. Nước thải công nghiệp có độ ô nhiễm cao hơn so với nước thải sinh hoạt.

Theo Luật Bảo vệ môi trường, mỗi nhà máy, xí nghiệp phải có công trình xử lý nước thải trước khi xả ra hệ thống thoát nước chung. Thực tế hiện nay cho thấy, quy định nói trên chưa được thực hiện nghiêm túc nên dẫn tới ô nhiễm hệ thống nước mặt, nước ngầm, ô nhiễm môi trường sinh thái khá trầm trọng ở nhiều nơi trên đất nước ta.

II. KHU HỆ VI SINH VẬT VÀ CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH TRONG NƯỚC THẢI

1. Khu hệ vi sinh vật trong nước thải

Mỗi loại nước thải có hệ vi sinh vật đặc trưng. Nước thải sinh hoạt do chứa nhiều chất hữu cơ giàu dinh dưỡng dễ phân giải nên chứa nhiều vi khuẩn, thông thường từ vài triệu đến vài chục triệu tế bào trong 1ml.

- Vi khuẩn gây thối: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Enterobacter cloacae*...

- Đại diện cho nhóm vi khuẩn phân giải đường, Cellulose, urea: *Bac. cellosae*, *Bac. mesentericus*, *Clostridium*, *Micrococcus urea*, *Cytophaga* sp...

- Các vi khuẩn gây bệnh đường ruột: Nhóm *Coliform*, là vi sinh vật chỉ thị cho mức độ ô nhiễm phân trong nước ở mức độ cao, có thể dao động từ vài chục nghìn đến vài trăm nghìn tế bào/ml nước thải.

Trong nước thải hữu cơ vi sinh vật hình ống giữ vai trò quan trọng, phải kể đến vi khuẩn *Sphaerptilus natans*, thường hay bị nhầm với nấm nước thải, nó phủ lên bề mặt tế bào một lớp nước cực bẩn, thường tạo thành các sợi hoặc các búi, khi bị vỡ ra sẽ trôi nổi đầy trên mặt nước. Nhóm này thường phát triển mạnh ở nước nhiều oxygen. Ngoài ra vi khuẩn *Sphaerptilus natans* thường thấy ở các nhà máy thải ra nhiều xenlulo và nhà máy chế biến thực phẩm. Bên cạnh vi khuẩn, người ta còn gặp nhiều loại nấm, nhất là nấm men *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Leptomitus lacteus*, *Fusarium aqueducteum*...

Ngoài ra còn có vi khuẩn oxy hóa lưu huỳnh như: *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*; vi khuẩn phản nitrat hóa: *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*.

Trong nước thải chứa dầu người ta tìm thấy vi khuẩn phân giải hydrocarbon: *Pseudomonas*, *Nocardia*...

Trong nước thải còn có tập đoàn tảo khá phong phú, chúng thuộc tảo silic: *Bacillariophyta*, tảo lục: *Chlorophyta*, tảo giáp: *Pyrrophyta*.

2. Các tác nhân gây bệnh trong nước thải

Ngoài những nhóm sinh lý khác nhau của vi sinh vật có trong nước thải như đã nói ở trên, người ta còn đặc biệt quan tâm đến sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt ở những vùng có hệ thống vệ sinh chưa hợp lý.

Các vi sinh vật gây bệnh thường không sống lâu trong nước thải vì đây không phải là môi trường thích hợp, nhưng chúng tồn tại trong một thời gian nhất định tuỳ từng loài để gây bệnh truyền nhiễm cho người và động, thực vật. Trong số những vi sinh vật gây bệnh nguy hiểm phải kể đến một số sau:

+ Vi khuẩn gây bệnh thương hàn (*Salmonella dyenteria*), vi khuẩn này sống được trong nước tuỳ thuộc vào chất dinh dưỡng và nhiệt độ của nguồn nước. Thông thường sống được trong vòng 20 - 25 ngày vào mùa hè và 60 - 70 ngày vào mùa đông.

+ Vi khuẩn gây bệnh kiết lỵ (*Shigella*), sống tối đa 10 - 15 ngày ở nhiệt độ 20 - 22°C trong nước thải, ở nhiệt độ càng thấp chúng càng sống lâu hơn.

+ Xoắn khuẩn (*Leptospira*), gây nên những chứng bệnh sưng gan, sưng thận và tê liệt hệ thần kinh trung ương. Chúng có thể sống 30 - 33 ngày trong nước thải ở nhiệt độ 25°C.

+ Vi khuẩn đường ruột (*E. coli*), có thể sống trong nước bẩn 9 - 14 ngày ở nhiệt độ 20 - 22°C.

+ Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*), sống tối đa được 3 tuần trong nước thải ở nhiệt độ 20 - 25°C.

+ Phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholera*), sống tối đa 13 - 15 ngày trong nước thải.

+ Các virus (*Adenovirus, Echo, Coxsackie*), sống tối đa 15 ngày.

Các vi khuẩn gây bệnh trên phân tán chậm trong đất khô, trong nước phân tán theo chiều ngang cũng ít (khoảng 1m), trong khi đó ảnh hưởng theo chiều sâu khá nhiều (khoảng 3m).

III. VAI TRÒ LÀM SẠCH NƯỚC THẢI CỦA VI SINH VẬT

Trước khi đi vào các biện pháp xử lý nước thải, một hiện tượng rất được quan tâm trong tự nhiên đó là quá trình tự làm sạch nguồn nước thải do các yếu tố sinh học, mà trong đó vi sinh vật đóng vai trò chủ chốt.

Các ao hồ, sông, ngòi, biển luôn trong tình trạng bẩn với mức độ khác nhau do rác thải và nước thải của con người. Nhờ quá trình tự làm sạch mà các chất bẩn thường xuyên được loại ra khỏi môi trường nước.

Quá trình tự làm sạch nước thải nhờ các quá trình vật lý hóa học là sự sa lắng và oxy hóa giữ một vai trò quan trọng, song đóng vai trò quyết định vẫn là quá trình sinh học. Tham gia vào quá trình tự làm sạch có rất nhiều chủng, giống sinh vật, từ các loại cá, chim, đến các nguyên sinh động vật và vi sinh vật.

Tại chỗ nước thải đổ ra thường tụ tập nhiều loài chim, cá, chúng sử dụng các phế thải từ đồ ăn và rác làm thức ăn; tiếp sau đó là các động vật bậc thấp như ấu trùng của côn trùng, giun và nguyên sinh động vật, chúng sử dụng các hạt thức ăn cực nhỏ làm nguồn dinh dưỡng. Song vai trò của vi khuẩn và nấm men có tính quyết định quá trình tự làm sạch này, chúng đã phân huỷ chuyển hóa các chất hữu cơ thành các chất đơn giản hơn và cuối cùng là các muối vô cơ, CO_2 . Nói cách khác là trong điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật, chúng có khả năng khoáng hóa một cách hoàn toàn nhiều chất bẩn hữu cơ để làm sạch nước.

Bên cạnh vi khuẩn, nấm men còn có nấm mốc và tảo đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa các chất bẩn gây ô nhiễm môi trường khác. Trong nước thải, thông qua hoạt động sống của mình tảo cung cấp oxygen cho môi trường, ngoài ra còn tiết vào môi trường chất kháng sinh là vũ khí lợi hại để tiêu diệt mầm bệnh có trong nước thải, nhất là khu hệ vi sinh vật gây bệnh đường ruột. Tảo còn gây cản trở sự phát triển của một số vi sinh vật gây bệnh khác, cạnh tranh nguồn dinh dưỡng của chúng; tảo còn tiết ra một số chất kích thích cho sự phát triển của vi sinh vật hữu ích trong môi trường nước thải. Trong nước thải, vai trò rất to lớn của tảo còn là ở khả năng hấp thụ các kim loại nặng như: Pb, Cd, As, Cu... và các tia phóng xạ.

Thông thường protein, đường, tinh bột, được phân giải nhanh nhất, còn xylan, lignin, mõi, sáp bị phân giải chậm hơn nhiều và sự phân giải xảy ra không hoàn toàn, vì vậy hệ vi sinh vật cũng thay đổi theo quá trình phân giải và thành phần các hợp chất chứa trong nước thải đó để làm sạch môi trường nước.

Cường độ tự làm sạch nước thải còn phụ thuộc vào một số yếu tố sau:

+ Cường độ làm sạch thường cao ở những nơi có dòng chảy mạnh do có sự trao đổi khí giữa nước và môi trường không khí xảy ra mạnh. Khi đó mặt nước có oxygen mạnh. Ngược lại ở

những thuỷ vực thiếu sự chuyển động của nước như ao tù thì nước thải bị ứ đọng, thiếu oxygen, sự phân giải các chất bẩn kém. Quá trình tự làm sạch bị cản trở.

+ Cường độ tự làm sạch nước thải cũng thay đổi theo mùa: mùa hè cường độ xảy ra mạnh hơn vào mùa đông, ánh sáng chiếu nhiều thì cường độ tự làm sạch xảy ra mạnh hơn là ít có ánh sáng.

+ Cường độ tự làm sạch nước thải ở vùng nhiệt đới xảy ra mạnh hơn ở vùng ôn đới, vùng hàn đới.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Hiện nay xử lý nước thải có các phương pháp chủ yếu sau:

1. Xây dựng trạm xử lý nước thải

Muốn xây dựng được trạm xử lý nước thải phải dựa vào những chỉ tiêu sau :

1.1. Lưu lượng nước thải

+ Tính toán lưu lượng nước thải sinh hoạt

- Lưu lượng trung bình ngày và đêm được tính theo công thức sau:

$$Q_{tb.ngd}^{sh} = \frac{n_1 \cdot N}{1000} \quad (m^3/ngđ)$$

Trong đó: n_1 - tiêu chuẩn cấp nước trung bình người/ngày

N - dân số thực tế ở khu vực

- Lưu lượng trung bình giờ trong ngày:

$$Q_{tb.h}^{sh} = \frac{n_1 \cdot N}{24.100} \quad (m^3/h)$$

- Lưu lượng trung bình giây:

$$q_{tb.sec}^{sh} = \frac{n_1 \cdot N}{86400} \quad (l/s)$$

- Lưu lượng lớn nhất giờ:

$$Q_{max.h}^{sh} = Q_{tb.h}^{sh} \cdot K_{ch} \quad (m^3/h)$$

K_{ch} - hệ số không điều hoà của nước thải sinh hoạt, ở đây $K = 1,4$.

- Lưu lượng lớn nhất giây:

$$q_{max.sec}^{sh} = q_{tb.sec}^{sh} \cdot K_{ch} \quad (l/s)$$

+ Lưu lượng nước thải công nghiệp.

- Lưu lượng trung bình ngày đêm:

$$Q_{tb.ngd}^{cn} = 24.000 \quad (m^3/ngđ). \quad Trung \text{ } bình \text{ } 1000 \text{ } m^3/h$$

- Lưu lượng trung bình giờ trong ngày:

$$Q_{tb.h}^{cn} = \frac{Q_{tb.ngd}^{cn}}{24} = 1000 \quad (m^3/h)$$

- Lưu lượng lớn nhất giờ:

$$Q_{max.h}^{cn} = Q_{tb.h}^{cn} \cdot K_{cn} = 1000 \cdot 2,5 = 2500 \quad (m^3 / h)$$

K_{cn} - hệ số không điều hòa chung của nước thải công nghiệp ($K= 2,5$).

- Lưu lượng trung bình giây:

$$q_{tb.sec}^{cn} = \frac{Q_{tb.h}^{cn}}{3,6} = \frac{1000}{3,6} = 277,8 \text{ (l/s)}$$

- Lưu lượng lớn nhất giây:

$$q_{max.sec}^{cn} = \frac{Q_{max.h}^{cn}}{3,6} = \frac{2500}{3,6} = 700 \text{ (l/s)}$$

+ Lưu lượng nước thải tổng số:

$$Q_{tb.ngd}^{sh.cn} = Q_{tb.ngd}^{sh} + Q_{tb.ngd}^{cn} = \frac{n_1 \cdot N}{1000} + Q_{tb.ngd}^{cn}$$

1.2. Nồng độ bẩn của nước thải

+ Nồng độ bẩn của nước thải sinh hoạt:

- Hàm lượng các chất lơ lửng trong nước thải

$$C = \frac{a_1}{n_1} = \frac{65 \cdot 1000}{200} = 325 \text{ (mg/l)}$$

a_1 - Hàm lượng chất lơ lửng của người thải ra trong một ngày đêm. Theo 20TCN51-84, thì $a_1= 65 \text{ g/người/ngày đêm.}$

n_1 - Tiêu chuẩn cấp nước TCVN. $n_1 = 200 \text{ lít/người/ngày đêm.}$

- Hàm lượng chất hữu cơ theo BOD trong nước thải sinh hoạt

$$L = \frac{a_2}{n_1} = \frac{40 \cdot 1000}{200} = 200 \text{ mg/lít}$$

+ Nồng độ bẩn của nước thải sinh hoạt:

Được tính bằng các chỉ tiêu: BOD, Cặn (SS), pH

- Hàm lượng lơ lửng của hỗn hợp nước thải được tính:

$$C^{hh} = \frac{C^{sh} \cdot Q^{sh} \cdot C^{cn} \cdot Q^{cn}}{Q^{sh} + Q^{cn}}$$

- Hàm lượng chất hữu cơ theo BOD của hỗn hợp nước thải:

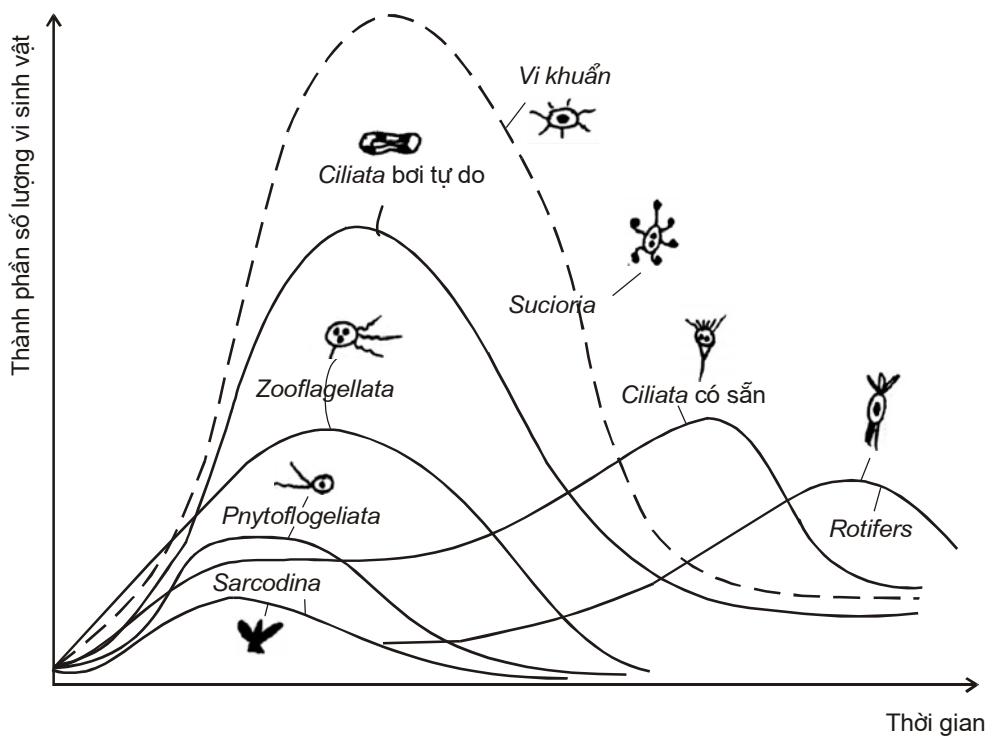
$$C_{BOD}^{hh} = \frac{L^{sh} \cdot Q^{sh} \cdot L^{cn} \cdot Q^{cn}}{Q^{sh} + Q^{cn}}$$

1.3. Tính dân số tương ứng với chất lơ lửng và BOD

$$N = N_1 + N_2 = \frac{C^{cn} \cdot Q_{tb.ngd}^{cn}}{a_1} + \frac{L^{cn} \cdot Q^{cn}}{a_2}$$

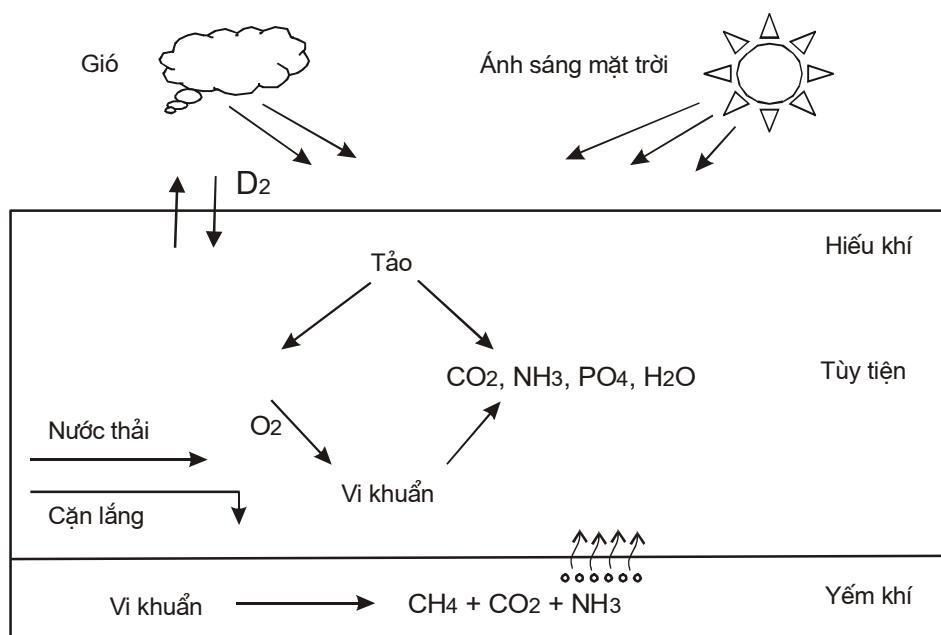
a_2 - hàm lượng chất hữu cơ theo BOD của người thải ra trong một ngày đêm. Theo 20TCN51-84 $a_2 = 40 \text{ mg/lít.}$

1.4. Một số sơ đồ biểu diễn xử lý nước thải dưới tác động của môi trường và vi sinh vật

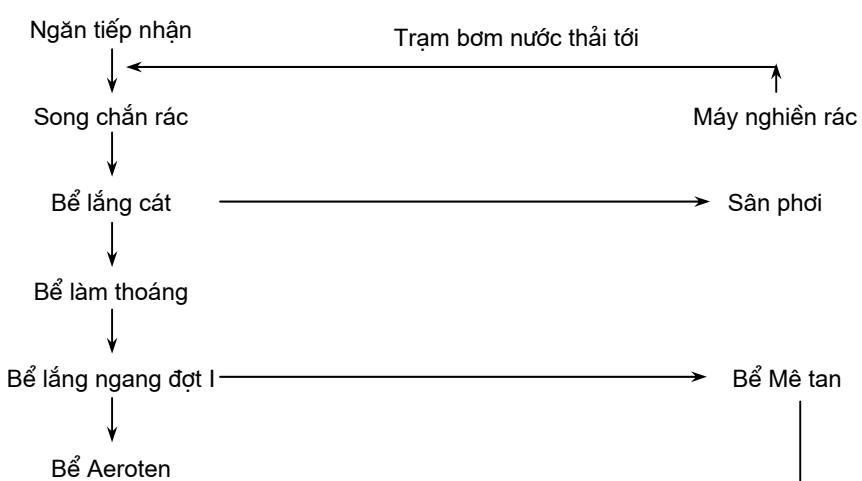


Hình 18. Sự sinh trưởng của các vi sinh vật khi xử lý nước thải chứa chất hữu cơ

Sơ đồ hoạt động oxy hóa



Hình 19. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt và công nghiệp bằng bể lắng



Hình 20. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt và công nông nghiệp

2. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

2.1. Khái niệm về xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

Trong các biện pháp xử lý nước thải, biện pháp sinh học được quan tâm nhiều nhất và cũng cho hiệu quả cao nhất. So với biện pháp vật lý và hóa học thì biện pháp sinh học chiếm vai trò quan trọng về quy mô cũng như giá thành đầu tư, do chi phí cho một đơn vị khối lượng chất khử là ít nhất. Đặc biệt xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học sẽ không gây tái ô nhiễm môi trường - một nhược điểm của biện pháp hóa học hay mắc phải.

Biện pháp sinh học là sử dụng đặc điểm rất quý của vi sinh vật, đặc điểm này đã thu hút và thuyết phục được các nhà khoa học và các nhà đầu tư, đó là khả năng đồng hóa được nhiều nguồn cơ chất khác nhau của vi sinh vật: tinh bột, xenlulo, các nguồn dầu mỏ và dẫn xuất của nó đến các hợp chất cao phân tử như priotein, lipid, các kim loại nặng như: chì, thuỷ ngân, arsen...

Thực chất của phương pháp sinh học là nhờ hoạt động sống của vi sinh vật (sử dụng các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng có trong nước thải làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng) để biến đổi các hợp chất hữu cơ cao phân tử trong nước thải thành các hợp chất đơn giản hơn. Trong quá trình dinh dưỡng này vi sinh vật sẽ nhận được các chất làm nguyên liệu để xây dựng cơ thể do vậy sinh khối vi sinh vật tăng lên.

Biện pháp sinh học có thể làm sạch hoàn toàn các loại nước thải công nghiệp chứa các chất bẩn hòa tan hoặc phân tán nhỏ. Do vậy biện pháp này thường dùng sau khi loại bỏ các tạp chất phân tán thoát ra khỏi nước thải. Đối với nước thải chứa các tạp chất vô cơ thì biện pháp này dùng để khử các muối sulfate, muối ammonium, muối nitrat là những chất chưa bị oxy hóa hoàn toàn.

2.2. Điều kiện để xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học có nhiều ưu điểm và được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên việc áp dụng biện pháp này cần những điều kiện nhất định sau: thành phần các hợp chất hữu cơ trong nước thải phải là những chất dễ bị oxy hóa, nồng độ các chất độc hại và các kim loại nặng phải nằm trong giới hạn cho phép. Chính vì vậy khi xử lý nước thải cần điều chỉnh nồng độ các chất này sao cho phù hợp.

Ngoài ra, các điều kiện môi trường như lượng O₂, pH, nhiệt độ của nước thải...cũng phải nằm trong giới hạn nhất định để bảo đảm sự sinh trưởng, phát triển bình thường của các vi sinh vật tham gia trong quá trình xử lý nước thải (bảng 19).

Bảng 19: Nồng độ giới hạn cho phép của các chất trong nước thải để xử lý theo biện pháp sinh học

Tên chất	C cp*	Tên chất	C cp*
Acid acrylic	100	Mỡ bôi trơn	100
Rượu amylic	3	Acid butyric	500
Aniline	100	Đồng (ion)	0,4
Acetaldehyde	750	Metacrylamide	300
Acid benzoic	150	Rượu metylic	200
Benzene	100	Acid monochloacetic	100
Vanadium (ion)	5	Arsen (ion)	0,2
Vinyl acetate	250	Nickel (ion)	1
Vinilinden chlorua	1000	Sản phẩm của dầu	100
Hydroquinol	15	Pyridine	400
Acid dichloacetic	100	Triethylamine	85
Dichlocyclohexane	12	Trinitrotoluene	12
Diethylamine	100	Triphenylphosphate	10
Diethyleneglycol	300	Phenol	1000
Caprolactan	100	Formaldehyde	160
Rezorcin	100	Chlobenzene	10
Amon rodanua	500	Toluene	200
Chì (ion)	1	Sulphanole	10
Acid stearic	300	Antimon (ion)	0,2
Sulfur (theo H ₂ S)	20	Crezol	100
Kerosene (dầu lửa)	500	Tributylphosphate	100
Lactonitryl	160		

* Ghi chú : C cp* là nồng độ giới hạn cho phép của các chất (g/m³ nước thải).

2.3. Thành phần và cấu trúc các loại vi sinh vật tham gia xử lý nước thải

Yếu tố quan trọng nhất của biện pháp sinh học để xử lý nước thải là sử dụng bùn hoạt tính (activated sludge) hoặc màng vi sinh vật.

Bùn hoạt tính hoặc màng vi sinh vật là tập hợp các loại vi sinh vật khác nhau. Bùn hoạt tính là bông màu vàng nâu dẽ láng, có kích thước 3- 150 µm. Những bông này bao gồm các vi sinh vật sống và cơ chất rắn (40%). Những vi sinh vật sống bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, một số nguyên sinh động vật, dòi, giun...

Màng sinh vật phát triển ở bề mặt các hạt vật liệu lọc có dạng nhầy dày từ 1- 3 mm hoặc lớn hơn. Màu của nó thay đổi theo thành phần của nước thải, từ vàng sáng đến nâu tối. Màng sinh vật cũng bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và nguyên sinh động vật khác. Trong quá trình xử lý, nước thải sau khi qua bể lọc sinh vật có mang theo các hạt của màng sinh vật với các hình dạng khác nhau, kích thước từ 15 - 30 µm có màu vàng xám và nâu.

Muốn đưa bùn hoạt tính vào các thiết bị xử lý, cần thực hiện một quá trình gọi là "khởi động" là quá trình làm cho loại bùn gốc ban đầu (thường kém về khả năng láng và hoạt tính) được nuôi dưỡng để trở thành loại bùn có hoạt tính cao và có tính kết dính tốt. Có thể gọi đó là quá trình "hoạt hóa" bùn hoạt tính. Cuối thời kỳ "khởi động" bùn sẽ có dạng hạt. Các hạt này có độ bền cơ học khác nhau, có mức độ vỡ ra khác nhau khi chịu tác động khuấy trộn. Sự tạo hạt của bùn ở dạng này hay dạng khác phụ thuộc vào tính chất và nồng độ của bùn gốc, chất lượng môi trường cho thêm vào để hoạt hóa bùn, phương thức hoạt hóa và cuối cùng là thành phần các chất có trong nước thải.

Loại bùn gốc tốt nhất lấy ở các thiết bị xử lý nước thải đang hoạt động. Nếu không có loại này thì có thể lấy loại bùn chưa thích nghi như từ các bể xử lý theo kiểu tự hoại, bùn cống rãnh, kênh rạch ô nhiễm nhiều, bùn phân lợn, phân bò đã phân huỷ... Các vi sinh vật chứa trong bùn này nghèo về số lượng, nhưng đa dạng về chủng loại.

2.4. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện tự nhiên

Cơ sở khoa học của biện pháp này là dựa vào khả năng tự làm sạch của đất và nước dưới tác động của các tác nhân sinh học có trong tự nhiên, nghĩa là thông qua hoạt động tổng hợp của các tác nhân từ động vật, thực vật đến vi sinh vật để làm biến đổi nguồn nước thải bị nhiễm bẩn bởi các hợp chất hữu cơ và vô cơ. Từ đó tiến tới giảm được các chỉ số COD và BOD của nước thải xuống tối mức cho phép khiến các nguồn nước này có thể sử dụng để tưới cho cây trồng hay dùng để nuôi các loại thuỷ sản.

Biện pháp xử lý này thường áp dụng đối với các loại nước thải công nghiệp có độ nhiễm bẩn không cao hoặc nước thải sinh hoạt.

Việc xử lý nước thải này được thực hiện bằng các cánh đồng tưới, bãi lọc hoặc hồ sinh học. Diễn biến của quá trình xử lý như sau:

Cho nước thải chảy qua khu ruộng đang canh tác hoặc những cánh đồng không canh tác được ngăn bờ tạo thành những ô thửa, hay cho chảy vào các ao hồ có sắn. Nước thải ở trong các thuỷ vực này sẽ thẩm qua các lớp đất bề mặt, cặn sẽ được giữ lại ở đáy ruộng hay đáy hồ, ao. Trong quá trình tồn lưu nước ở đây, dưới tác dụng của các vi sinh vật cùng các loại tảo, thực vật sẽ xảy ra quá trình oxy hóa sinh học, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn, thậm chí có thể được khoáng hóa hoàn toàn. Như vậy, sự có mặt của oxy không khí trong các mao quản của đất hoặc oxy được thải ra do hoạt động quang hợp của tảo và thực vật sẽ là yếu tố quan trọng cần cho quá trình oxy hóa nguồn nước thải. Càng xuống lớp đất ở dưới sâu lượng oxy càng ít, vì vậy ảnh hưởng xấu đến quá trình oxy hóa làm cho quá trình này giảm dần. Đến độ sâu nhất định, thì chỉ còn nhóm vi sinh vật yếm khí khử nitrat trong nước thải.

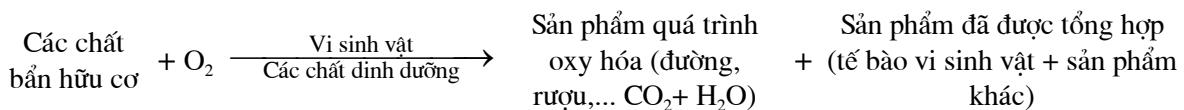
Ở quá trình xử lý này, nguồn nước thải đã qua xử lý được sử dụng tưới cho cây trồng hoặc nuôi trồng thuỷ sản. Tuỳ theo phương pháp xử lý khác nhau mà nguồn nước thải sau xử lý được sử dụng khác nhau:

Ví dụ: Nếu xả nước thải ra đồng ruộng hay khu đất ở ngoài đồng, thì sau khi xử lý thường được sử dụng nguồn nước này vào tưới cho cây trồng, còn nếu xả vào ao, hồ thì sau khi xử lý nước sẽ dùng để nuôi trồng thuỷ sản (tôm, cá...).

2.5. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện nhân tạo

+ Xử lý hiếu khí:

Nguyên lý chung của quá trình xử lý sinh học hiếu khí: Khi nước thải tiếp xúc với bùn hoạt tính, các chất thải có trong môi trường như các chất hữu cơ hòa tan, các chất keo và phân tán nhỏ sẽ được chuyển hóa bằng cách hấp thụ và keo tụ sinh học trên bề mặt các tế bào vi sinh vật. Tiếp đó là giai đoạn khuếch tán và hấp thụ các chất bẩn từ mặt ngoài của tế bào vào trong tế bào qua màng bán thấm (màng nguyên sinh), các chất vào trong tế bào dưới tác dụng của hệ enzyme nội bào sẽ được phân huỷ. Quá trình phân huỷ các chất bẩn hữu cơ xảy ra trong tế bào chất của tế bào sống là các phản ứng oxy hóa khử, có thể biểu diễn ở dạng sau:



Sự oxy hóa các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng trong tế bào vi sinh vật nhờ vào quá trình hô hấp, nhờ năng lượng do vi sinh vật khai thác được trong quá trình hô hấp mà chúng có thể tổng hợp các chất để phục vụ cho quá trình sinh trưởng, phát triển. Kết quả là số lượng tế bào vi sinh vật không ngừng tăng lên. Quá trình này liên tục xảy ra và nồng độ các chất xung quanh tế bào giảm dần. Các thành phần thức ăn mới từ môi trường bên ngoài (nước thải) lại khuếch tán và bổ sung thay thế vào. Thông thường quá trình khuếch tán các chất trong môi trường xảy ra chậm hơn quá trình hấp thụ qua màng tế bào, do vậy nồng độ các chất dinh dưỡng xung quanh tế bào giờ cũng thấp hơn nơi xa tế bào. Đối với các sản phẩm của tế bào tiết ra thì ngược lại, nhiều hơn so với nơi xa tế bào.

* *Yếu tố môi trường ảnh hưởng đến quá trình xử lý nước thải*

Để tạo điều kiện cho quá trình xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện hiếu khí cần điều chỉnh các yếu tố môi trường sau:

+ Oxy (O_2): Trong các công trình xử lý hiếu khí O_2 là thành phần cực kỳ quan trọng của môi trường, vì vậy cần đảm bảo đủ O_2 liên tục trong suốt quá trình xử lý nước thải và hàm lượng O_2 hòa tan trong nước ra khỏi bể lắng đợt hai không nhỏ hơn 2 mg/lít.

+ Nồng độ các chất bẩn hữu cơ phải thấp hơn ngưỡng cho phép. Nếu nồng độ các chất bẩn hữu cơ vượt quá ngưỡng cho phép sẽ ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của vi sinh vật, vì vậy khi đưa nước thải vào các công trình xử lý cần kiểm tra các chỉ số BOD, COD của nước thải. Hai chỉ số này phải có nồng độ nhỏ hơn 500mg/lít. Nếu dùng bể aeroten, thì BOD_{tp} không được quá 1000mg/lít, nếu chỉ số BOD_{tp} vượt quá giới hạn cho phép thì cần lấy nước ít ô nhiễm hoặc không bị ô nhiễm để pha loãng.

+ Nồng độ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật: Để vi sinh vật tham gia phân giải nước thải một cách có hiệu quả, thì cần phải cung cấp cho chúng đầy đủ các chất dinh dưỡng. Lượng chất dinh dưỡng cho vi sinh vật không được thấp hơn giá trị trong bảng 20.

Bảng 20: Nồng độ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật để xử lý nước thải
(theo M.X. Moxitrep, 1982)

BOD_{tp} của nước thải (mg/lít)	Nồng độ nitrogen trong muối ammonium(mg/l)	Nồng độ phospho trong P_2O_5 (mg/l)
< 500	15	3
500 - 1000	25	8

Ngoài nguồn nitơ và phospho có nhu cầu như đã nêu ở bảng trên, các nguyên tố dinh dưỡng khoáng khác như K, Ca, S...thường đã có trong nước thải do đó không cần phải bổ sung.

Nếu thiếu nitơ thì ngoài việc làm chậm quá trình oxy hóa, còn làm cho bùn hoạt tính khó lắng và dễ trôi theo nước ra khỏi bể lắng.

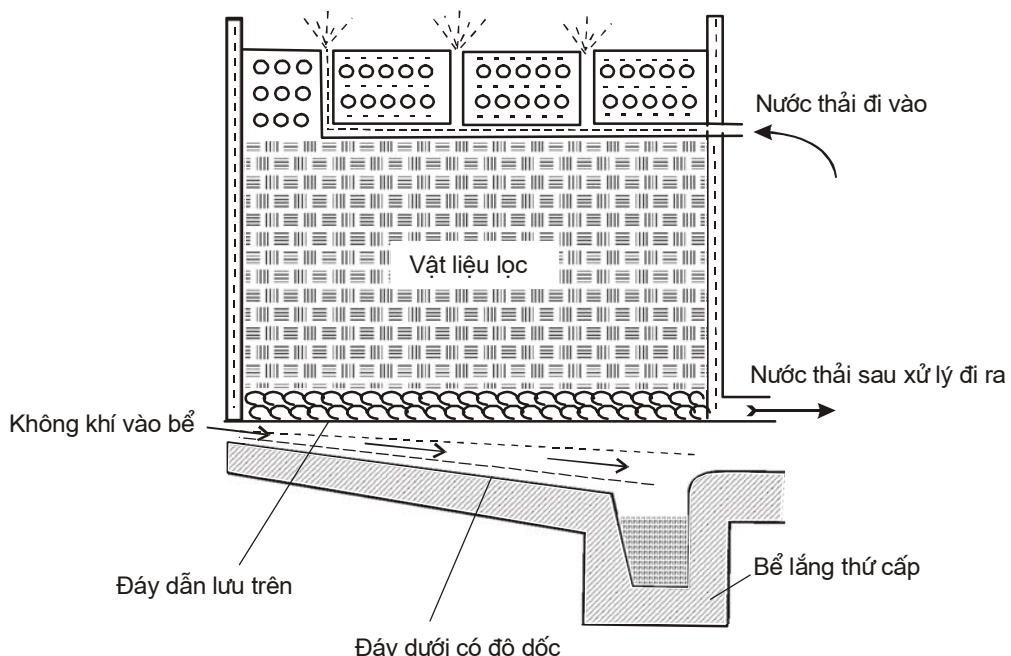
Để xác định sơ bộ lượng các chất dinh dưỡng cần thiết đối với nhiều loại nước thải công nghiệp, có thể chọn tỷ lệ sau:

$$\text{BOD}_{\text{tp}} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$$

Ngoài ra các yếu tố khác của môi trường xử lý như pH, nhiệt độ cũng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hoạt động sống của vi sinh vật trong các thiết bị xử lý. Thực tế cho thấy pH tối ưu trong bể xử lý hiếu khí là 6,5 - 8,6; nhiệt độ ở 6 - 37°C.

* Để xử lý nước thải theo biện pháp hiếu khí, thường được sử dụng hai loại công trình là: bể lọc sinh học (biofilter) và bể sục khí (aeroten)

- Bể lọc sinh học (biofilter): Là thiết bị xử lý nước thải dựa trên nguyên tắc lọc với sự tham gia của vi sinh vật. Thiết bị này làm bằng bê tông có dạng hình tròn hay hình chữ nhật có hai đáy (hình 21). Đáy trên gọi là đáy dẫn lưu, được cấu tạo bằng bê tông cốt thép có lỗ thủng với tổng diện tích lỗ thủng nhỏ hơn 5 - 6% diện tích của đáy. Đáy dưới được xây kín, có độ dốc nhất định để nước dễ dàng chảy về một phía và thông với bể lắng thứ cấp, là nơi chứa nước thải sau khi đã xử lý xong. Ở bể này nước được lưu lại một thời gian ngắn để lắng cặn trước khi hòa vào hệ thống thoát của cơ sở. Chiều cao của bể lọc hay của cột nguyên liệu sẽ phụ thuộc vào thành phần của nước thải cũng như khả năng oxy hóa của màng sinh vật. Lưu lượng dòng chảy của nước thải phụ thuộc vào khả năng oxy hóa của màng sinh vật.



Hình 21. Bể lọc nước thải sinh học

Để tạo điều kiện hiếu khí cho quá trình xử lý, từ phía dưới của đáy dẫn lưu người ta cho không khí đi lên qua vật liệu lọc hoặc tẩm mang bằng thông khí tự nhiên hay thổi khí bằng quạt.

Vật liệu dùng trong bể lọc là các loại đá cuội, đá dăm và xỉ than đá (theo phương pháp cổ điển). Để tăng diện tích tiếp xúc giữa vi sinh vật và nước thải, đồng thời tránh tình trạng tắc nghẽn dòng chảy trong thiết bị lọc sinh học, người ta thay các vật liệu lọc bằng những tấm mang làm bằng vật liệu nhẹ, xốp có cấu tạo dạng ống hoặc dạng miếng, chúng được thiết kế sao cho có nhiều nếp gấp để tăng diện tích bề mặt.

Nước thải có chứa vi sinh vật tham gia xử lý được tưới từ trên xuống lớp vật liệu lọc hay tấm mang theo nguyên tắc chênh lệch thể nồng. Khi dòng nước thải chảy qua vật liệu lọc hay tấm mang, vi sinh vật sẽ phát triển tạo thành màng sinh vật bám vào khắp bề mặt của nguyên liệu lọc cùng tấm mang và khu trú ở đây. Như vậy nước thải theo dòng chảy từ trên xuống sẽ tiếp xúc với màng sinh vật. Khi đó sẽ xảy ra quá trình oxy hóa các chất bẩn có trong nước thải, để cuối cùng

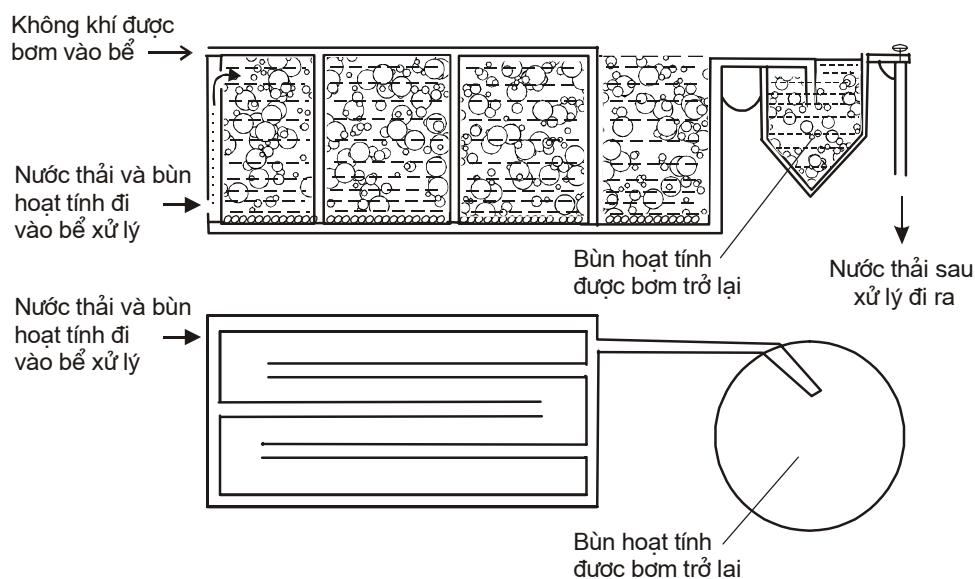
khi đến bể lắng thứ cấp, nước thải sẽ có chỉ số BOD_5 giảm đi rất nhiều so với nước thải chưa xử lý.

Trong quá trình vận hành của bể lọc sinh vật, sự sinh trưởng và chết của màng sinh vật xảy ra không ngừng. Khi màng sinh vật bị chết sẽ bị tách khỏi nơi bám và bị cuốn theo dòng nước chảy ra khỏi bể lọc, cuối cùng sẽ được lắng đọng ở bể lắng thứ cấp cùng với cặn bùn.

Hiệu quả của hệ thống bể lọc sinh học rất cao, nếu hoạt động tốt có thể làm giảm 90% chỉ số BOD_5 của nước thải.

- Bể sục khí (Aeroten)

Bể sục khí là hệ thống bể ô xy hóa (hình 22) có dạng hình chữ nhật được ngăn ra làm nhiều buồng (3 - 4 buồng) nối với bể lắng. Giống như ở bể lọc sinh học, quá trình xử lý nước thải ở bể sục khí được tiến hành nhờ hoạt động của hệ vi sinh vật ở bùn hoạt tính. Nhưng quá trình sục khí này được thực hiện trong điều kiện có thông khí mạnh nhờ hệ thống sục khí từ dưới đáy bể lên. Cường độ thông khí $5m^3/m^2/giờ$, bảo đảm oxy tối đa cho quá trình oxy hóa. Ở bể oxy hóa, bùn hoạt tính lấy từ bùn gốc sau khi qua giai đoạn khởi động hay lấy từ bể lắng cặn chuyển vào. Ở đây bùn hoạt tính gấp oxy của không khí được bơm vào bể sẽ tiến hành quá trình oxy hóa và khoáng hóa các chất bẩn trong nước thải một cách khá triệt để. Sau khi chảy suốt qua các buồng của bể oxy hóa, nước thải sẽ chảy vào bể lắng. Ở đây cũng xảy ra quá trình lắng cặn xuống đáy bể, phần nước ở trên là nước đã được xử lý sẽ được dẫn ra ngoài. Trong quá trình vận hành, ở bể oxy hóa, theo thời gian lượng bùn hoạt tính sẽ tăng lên, đồng thời cũng tích luỹ nhiều tế bào vi sinh vật già cỗi khiến hoạt tính của bùn giảm - “bùn bị già”. Vì vậy khi cho bùn hoạt tính thu ở bể lắng trở lại bể ôxy hóa, không nhất thiết cho toàn bộ số bùn có trong bể lắng, mà chỉ cho một phần để bảo đảm nồng độ bùn hoạt tính là 2- 4 g/lít.



Hình 22. Bể sục khí

Xử lý nước thải bằng bể aeroten phức tạp hơn và đòi hỏi nhiều công sức hơn so với ở bể lọc sinh học. Người ta phải theo dõi liên tục để kịp thời điều chỉnh các chỉ số sau:

- Nồng độ bùn hoạt tính.
- Chế độ thông khí.
- Nồng độ các chất bẩn trong nước thải.
- Nồng độ các chất dinh dưỡng cho vi sinh vật.

+ Xử lý khí

Quy trình xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện khí là quy trình phân huỷ sinh học yếm khí các hợp chất hữu cơ chứa trong nước thải để tạo thành khí CH_4 và các sản phẩm vô cơ kể cả CO_2 , NH_3 .

Quy trình này có những ưu điểm sau:

- Nhu cầu về năng lượng không nhiều.
- Ngoài vai trò xử lý nước thải, bảo vệ môi trường, quy trình còn tạo được nguồn năng lượng mới là khí sinh học, trong đó CH_4 chiếm tỷ lệ 70 - 75%.
- Cũng như xử lý sinh học hiếu khí, ở quy trình này, bùn hoạt tính được sử dụng làm tác nhân gây biến đổi thành phần của nước thải. Bùn hoạt tính được sử dụng ở đây có lượng dư thấp, có tính ổn định khá cao, để duy trì hoạt động của bùn không đòi hỏi cung cấp nhiều chất dinh dưỡng, bùn có thể tồn trữ trong thời gian dài.
- Về mặt thiết bị: Công trình có cấu tạo khá đơn giản, có thể làm bằng vật liệu tại chỗ với giá thành không cao.

Bên cạnh những ưu điểm trên, biện pháp xử lý sinh học yếm khí còn bộc lộ những tồn tại sau:

- + Quy trình nhạy cảm với các chất độc hại, với sự thay đổi bất thường về tải trọng của công trình, vì vậy khi sử dụng cần có sự theo dõi sát sao các yếu tố của môi trường.
- + Xử lý nước thải chưa triệt để, nên bước cuối cùng là phải xử lý hiếu khí. Cho tới nay những công trình nghiên cứu xử lý khí còn ít, thiếu những hiểu biết về vi sinh vật tham gia vào quy trình khí này. Hiện nay biện pháp này hay còn ở quy mô Pilot có khối tích 6m^3 , 30m^3 , 200m^3 ...cho đến quy mô lớn. Đến nay trên thế giới đã có trên vài chục nhà máy xử lý nước thải theo kiểu này, nhất là ở Hà Lan, Hoa Kỳ, Thụy Sĩ, Cộng hòa liên bang Đức.

* Các quá trình chuyển hóa chủ yếu trong khí

+ Quá trình thuỷ phân (hydrolysis): Muốn hấp thụ được các chất hữu cơ trong nước thải, vi sinh vật phải thực hiện các công đoạn chuyển hóa các chất này. Việc đầu tiên là phải thuỷ phân các chất có phân tử lượng cao thành các polymer có phân tử lượng thấp và monomer để có khả năng hấp thụ qua màng tế bào vi sinh vật. Để thực hiện quá trình thuỷ phân các vi sinh vật phải tiết ra hệ enzyme như proteinase, lipase, cellulase... Sau thuỷ phân, các sản phẩm sẽ được tạo thành như các amino acid, đường, rượu, các acid béo mạch dài...

Quá trình thuỷ phân xảy ra khá chậm, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nhiệt độ, pH, cấu trúc của các chất hữu cơ cần phân giải.

+ Quá trình acid hóa (Acidogenesis): Các sản phẩm của quá trình thuỷ phân sẽ được tiếp tục phân giải dưới tác động của vi sinh vật lên men acid để tạo thành acid béo dễ bay hơi như acid acetic, acid formic, acid propionic. Ngoài ra còn có một số dạng khác như rượu, methanol, ethanol, aceton, NH_3 , CO_2 .

+ Quá trình acetate hóa (Acetogenesis): Các acid là sản phẩm của quá trình trên lại được tiếp tục thuỷ phân để tạo lượng acid acetic cao hơn. Sản phẩm của quá trình phụ thuộc vào áp suất riêng phần của H_2 trong môi trường. Áp suất riêng phần của H_2 được giữ $<10^3\text{ atm}$ để vi sinh vật có thể biến đổi H_2 thành CH_4 theo phản ứng sau:



Thực tế cho thấy khi áp suất riêng phần của H_2 lớn thì sản phẩm của quá trình này chứa nhiều acid béo trung gian như acid propionic, acid butyric... Do vậy làm chậm quá trình tạo methane.

+ Quá trình methane hóa (Methanogenesis): Đó là giai đoạn cuối cùng của quá trình phân huỷ các sản phẩm hữu cơ đơn giản của các giai đoạn trước để tạo CH_4 , CO_2 nhờ các vi khuẩn lên men methane. Gồm có 2 nhóm sau:

- Nhóm biến đổi acetate: Nhóm này có tốc độ phát triển chậm, đòi hỏi công trình phải lưu các chất thải trong thời gian dài.

- Nhóm biến đổi hydrogen: Nhóm này có tốc độ phát triển nhanh hơn nhiều, do đó có khả năng giữ áp suất riêng phần của H_2 thấp, tạo điều kiện tốt cho quá trình biến đổi acetate từ các acid béo.

* *Yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân huỷ khí khí:*

- Oxygen: Trong xử lý nước thải khí oxygen được coi là độc tố đối với vi sinh vật. Do đó lý tưởng nhất là tạo điều kiện khí tuyệt đối trong bể xử lý.

- Chất dinh dưỡng: Chất dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát triển, sinh trưởng của vi sinh vật, liên quan trực tiếp đến quá trình phân huỷ các hợp chất hữu cơ trong nước thải. Cũng như các vi sinh vật khác, vi sinh vật khí khí đòi hỏi các chất dinh dưỡng chính bao gồm các hợp chất carbon, nitrogen, photphate... để hình thành các enzyme thực hiện quá trình phân huỷ các hợp chất trong nước thải. Việc cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết sẽ tạo cho bùn có tính lắng tốt và hoạt tính cao, hoạt động tốt trong quá trình xử lý.

- Nhiệt độ: Nhóm vi sinh vật khí khí có 3 vùng nhiệt độ thích hợp cho sự phân huỷ các hợp chất hữu cơ và ở mỗi nhiệt độ thích hợp cho một nhóm vi sinh vật khí khí khác nhau.

+ Vùng nhiệt độ cao: 45 - 65°C

+ Vùng nhiệt độ trung bình: 20 - 45°C

+ Vùng nhiệt độ thấp: < 20°C

Hai vùng nhiệt độ đầu thích hợp cho nhóm vi sinh vật lên men methane, ở vùng nhiệt độ này lượng methane được tạo thành cao. Đối với vùng nhiệt độ cao, để duy trì nhiệt độ này cần thiết phải cung cấp thêm năng lượng, điều này sẽ gây tổn kém cho quá trình sản xuất, tính hiệu quả kinh tế của công trình sẽ bị hạn chế.

Ở nước ta, nhiệt độ trung bình từ 20- 32°C thích hợp cho nhóm vi sinh vật ở vùng nhiệt độ trung bình phát triển.

- pH: Trong quy trình xử lý khí khí, pH của môi trường ảnh hưởng đến tốc độ phân huỷ các chất hữu cơ, cụ thể là ảnh hưởng đến 4 quá trình chuyển hóa cơ bản của sự phân huỷ khí khí. Ở quá trình xử lý người ta nhận thấy các quá trình chuyển hóa cơ bản chịu ảnh hưởng trực tiếp lẫn nhau, khi một trong các quá trình này bị cản trở hoặc thúc đẩy sẽ ảnh hưởng đến quá trình xảy ra tiếp theo, do đó sẽ làm tốc độ phân huỷ các chất xảy ra chậm lại hoặc nhanh hơn. Ví dụ: Khi nhiệt độ thay đổi hoặc khi thành phần nước thải thay đổi (do có sự nạp mới vào công trình), thì nhóm vi sinh vật acid hóa thích nghi hơn so với nhóm vi sinh vật sinh methane. Khi pH giảm mạnh ($pH < 6$) sẽ làm giảm quá trình sinh khí CH_4 . Hơn nữa khi pH giảm, các acid trung gian tích luỹ nhiều, làm các phản ứng phân huỷ khó thực hiện và dẫn đến dừng quá trình acetate hóa... pH tối ưu trong quá trình phân huỷ khí khí là 6,5 - 8,5.

- Các độc tố: Qua tìm hiểu đặc tính sinh lý các vi sinh vật tham gia xử lý nước thải bằng phương pháp khí khí, người ta thấy:

+ Một số hợp chất như: CCl_4 , $CHCl_3$, CH_2Cl_2 ... và các ion tự do của các kim loại nặng có nồng độ 1mg/lít sẽ thể hiện tính độc đối với các vi sinh vật khí khí.

+ Các hợp chất như formaldehyde, SO_2 , H_2S với nồng độ 50- 400mg/ lít sẽ gây độc hại với vi sinh vật khí khí trong công trình xử lý.

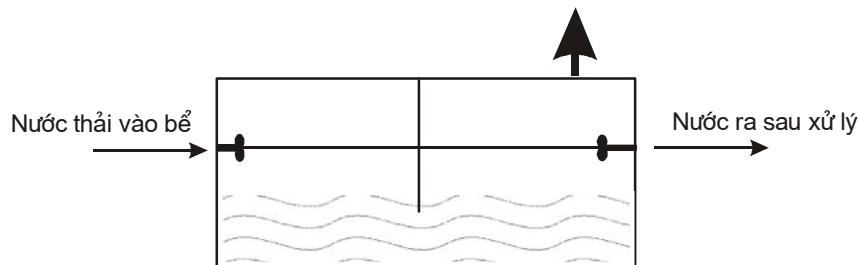
+ S^{2-} được coi là tác nhân gây úc chế quá trình tạo methane. Do S^{2-} làm kết tủa các nguyên tố vi lượng như Fe, Ni, Co, Mo... cho nên hạn chế sự phát triển của vi sinh vật, đồng thời các

electron được giải phóng ra từ quá trình oxy hóa các chất hữu cơ sử dụng cho quá trình sulfate hóa và làm giảm quá trình sinh methane.

+ Các hợp chất như NH_4^+ ở nồng độ 1,5- 2mg/lít gây ức chế quá trình lên men khí khí.

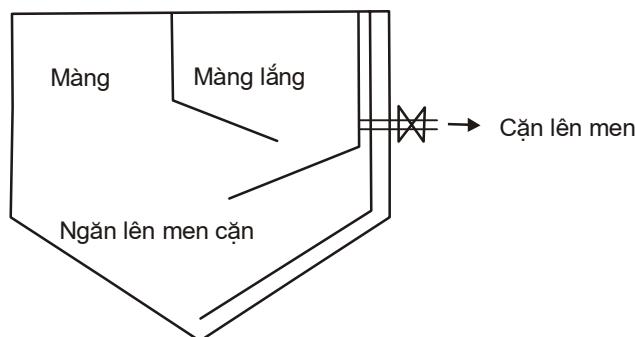
* Các dạng công trình xử lý khí khí:

- Bể tự hoại (hình 23): là loại công trình xử lý nước thải loại nhỏ dùng cho từng hộ gia đình. Loại công trình này thực hiện hai chức năng: lắng và chuyển hóa cặn lắng của nước thải (chủ yếu là nước thải từ các nhà vệ sinh) bằng quá trình phân giải khí khí.



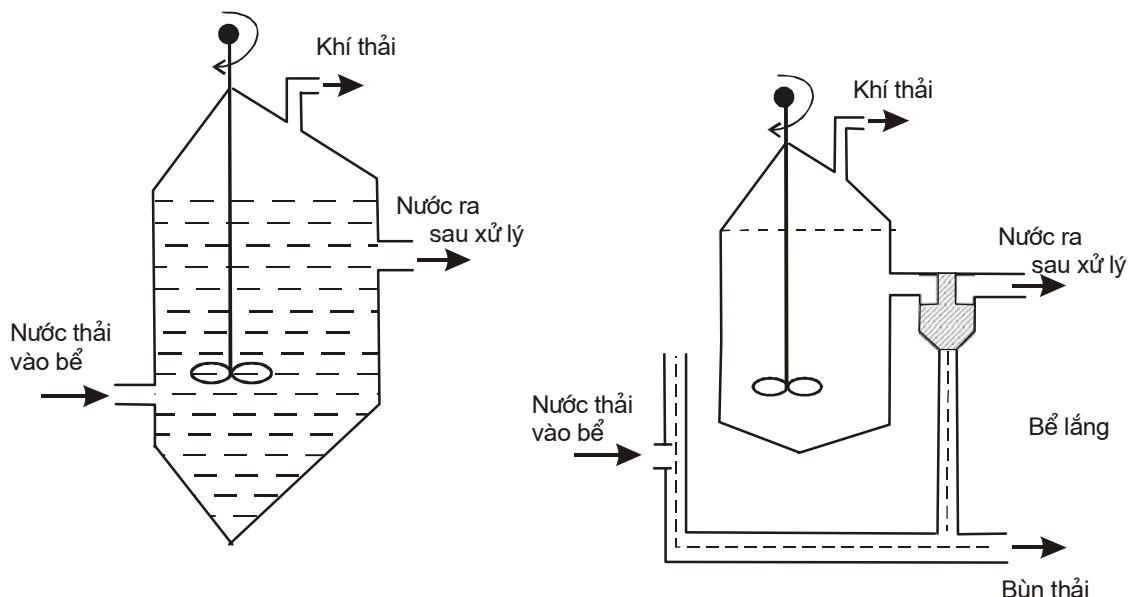
Hình 23. Bể tự hoại

- Bể lắng hai vỏ: có nguyên tắc hoạt động và thực hiện hai chức năng tương tự như bể tự hoại, nhưng ở quy mô lớn hơn, công suất xử lý nước thải lớn hơn.



Hình 24. Bể lắng hai vỏ

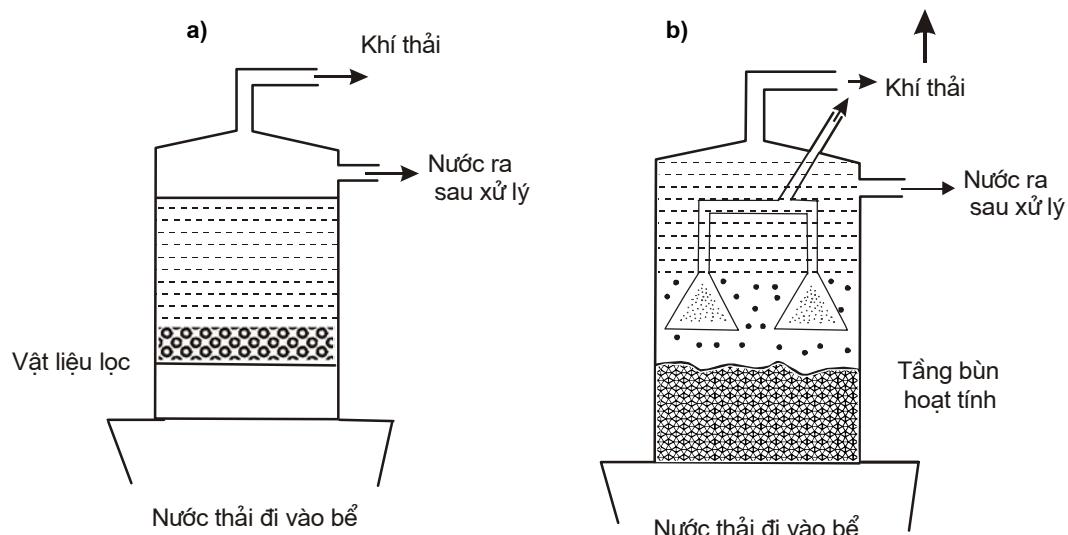
- Bể methane cổ điển: Bể này được ứng dụng để xử lý cặn lắng (từ bể lắng) và bùn hoạt tính dư của trạm xử lý nước thải. Hầu hết các trạm xử lý nước thải thành phố đều áp dụng kiểu bể này.



Hình số 25. Bể lọc methane cổ điển

- Bể lọc khí AF (Aerobic Filter)

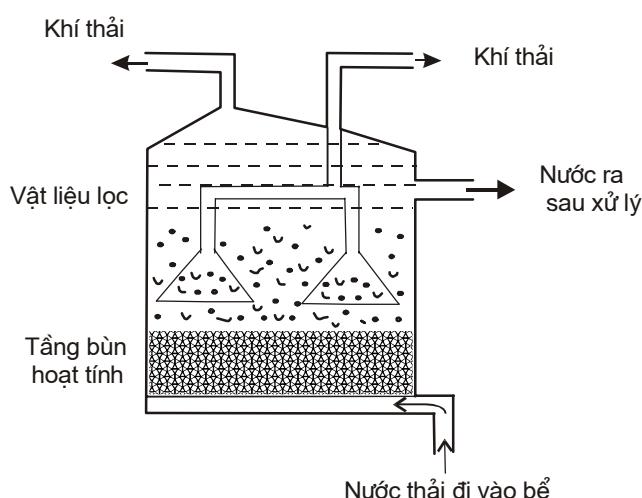
Nguyên tắc loại hình này trên là quá trình xử lý nước thải qua vật liệu lọc để vi sinh vật ký khí dính bám vào và thực hiện quá trình chuyển hóa sinh hóa các hợp chất hữu cơ chứa trong nước thải, đồng thời tránh được sự rửa trôi của màng vi sinh vật (hình 26).



Hình 26. Bể lọc khí AF

- Bể lọc khí sinh học với dòng chảy ngược qua bông bùn hoạt tính UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (hình 27).

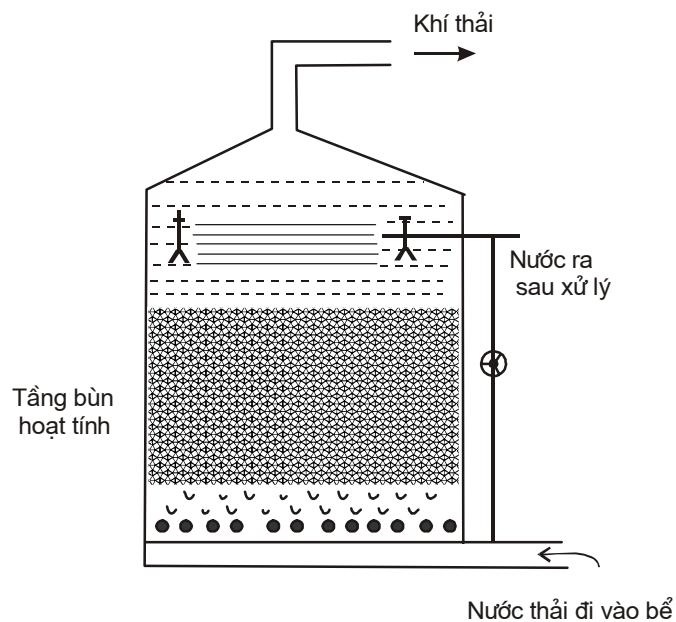
Loại công trình này không có vật liệu đỡ (vật liệu lọc) như ở bể lọc khí AF. Ở đây các vi sinh vật ký khí liên kết và tập hợp lại thành đám lớn dạng hạt và có vai trò chủ yếu để chuyển hóa các hợp chất hữu cơ. Chúng đủ nặng để tránh hiện tượng rửa trôi ra khỏi công trình. Bể UASB có cấu tạo gồm hai ngăn: ngăn lắng và ngăn phân huỷ. Bằng biện pháp thiết kế khá đặc biệt của ngăn lắng cùng với tính lắng cao của bùn hoạt tính đã giải quyết được vấn đề lưu lại nồng độ sinh khối bùn cao trong bể và giảm được thời gian lưu nước.



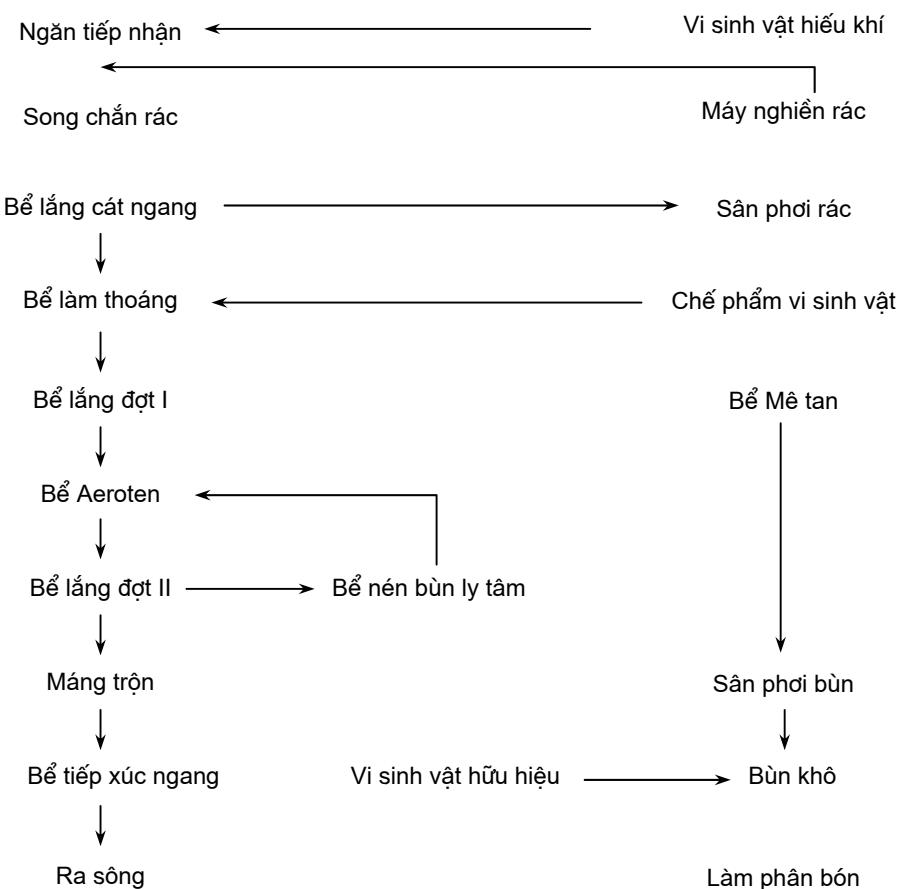
Hình 27. Bể xử lý sinh học khí với dòng chảy ngược

+ Ngoài các công trình xử lý nước thải được nêu trên, người ta còn phối kết hợp giữa công trình UASB với công trình AF (hình 28) và nhiều công trình khác. Như xây dựng công trình xử lý

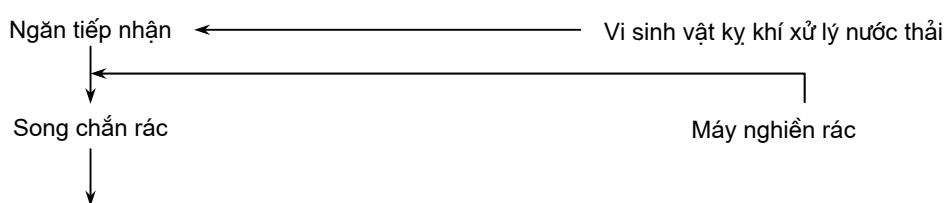
nước thải qua các hình chụp bằng phương pháp hiếu khí; xây dựng công trình xử lý nước thải qua các hình chụp bằng phương pháp xâm bể chìm dưới đất...

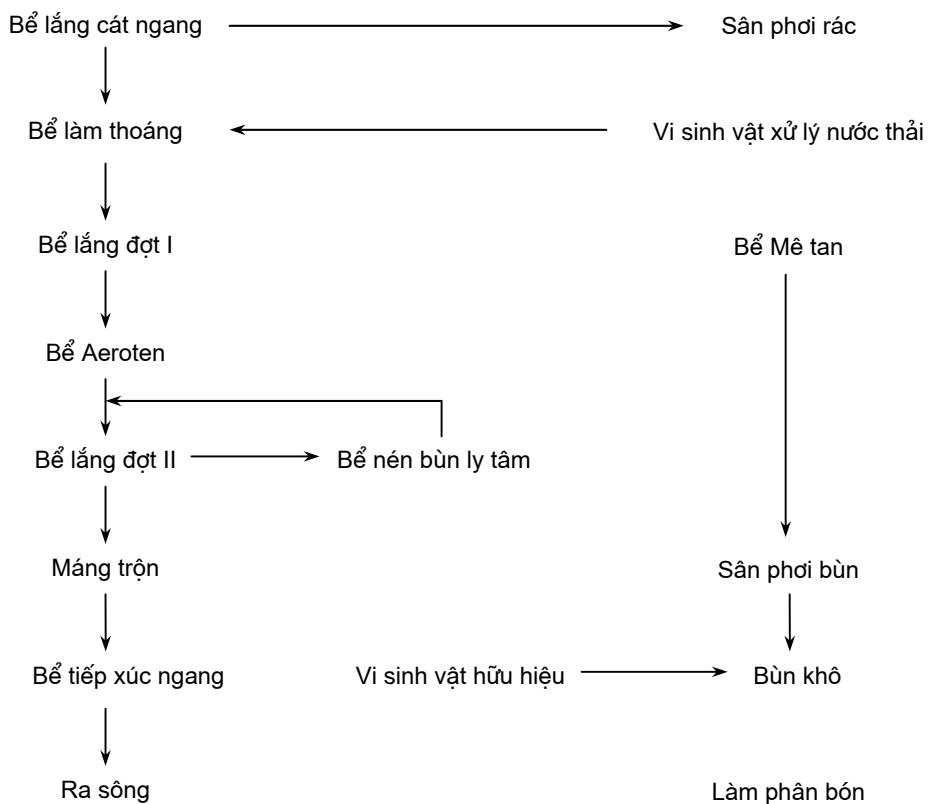


Hình 28. Công trình phối kết hợp UASB và AF



Hình 29. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt và công nghiệp bằng công nghệ vi sinh vật





Hình 30. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt và công nông nghiệp bằng công nghệ vi sinh vật

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ánh và Ngô Tự Thành. Vi sinh vật học của các nguồn nước. Dịch từ G. Rheinheimer. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật. Hà Nội, 1985.
2. Đường Hồng Dật và các tác giả. Giáo trình vi sinh vật trồng trọt. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, 1979.
3. Mai Hồ Dịch. Ứng dụng hệ thống cố định đạm trong việc cải tạo đất. Dịch từ Hamdi - Y.A. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội, 1992.
4. Nguyễn Lan Dũng. Vi sinh vật đất và sự chuyển hóa các hợp chất cacbon và nitơ trong đất. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, 1984.
5. Nguyễn Lan Dũng. Sử dụng vi sinh vật để phòng trừ sâu hại cây trồng. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, 1985.
6. Ngô Thế Dân, Nguyễn Kim Vũ. Vi khuẩn nốt sần. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1979.
7. Nguyễn Đường và các tác giả. Giáo trình vi sinh vật đại cương (dùng cho các trường Đại học). Nhà xuất bản Bộ đại học và trung học chuyên nghiệp, 1990.
8. Nguyễn Đường, Nguyễn Xuân Thành. Giáo trình sinh học đất. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, 1999.
9. Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn. Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 2000.
10. Nguyễn Văn Lâm. Biện pháp sinh học phòng chống dịch hại nông nghiệp. Nhà xuất bản nông nghiệp. Hà Nội, 1995.
11. Trần Thị Thanh. Công nghệ vi sinh. Nhà xuất bản Giáo dục, 2000.
12. Nguyễn Vĩnh Phước. Vi sinh vật thú y - tập II, III. Nhà xuất bản Bộ đại học và trung học chuyên nghiệp, 1976.
13. Lê Lương Tề và các tác giả. Giáo trình bệnh cây. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, 1977.
14. Dự án xử lý nước thải khu vực bắc Thăng Long Hà Nội, Hà Nội, 2001.
15. Các báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước: 52 D-01- 04; KC 08- 01; KC 08- 20; KC 02- 04; KHCN 02- 06; KHCN 02-04; B 99- 32- 46; B 001- 32- 09.
16. E. Berezova. Ứng dụng phân vi sinh vật. Nhà xuất bản Khoa học, năm 1957.
17. L. M. Goroxinskii. Phân vi sinh vật chất bổ sung làm tăng năng suất cây trồng. Nhà xuất bản “Bông lúa”. 1965.
18. E. H. Mixustin. Giáo trình vi sinh vật đại cương. Nhà xuất bản Mockova “Bông lúa”. 1981.
19. V. L. Kretovik. Cố định đạm sinh học. Nhà xuất bản “Bông lúa”. 1983.

20. B. L. Kretovik, Licova. Quá trình đồng hóa nitơ phân tử. Nhà xuất bản Kiev. 1983.
21. M.I. Protocob. Vi sinh vật trong bảo vệ thực vật. NXB. Tasken.1982.
22. Burges, H.D. and Hussey, N.W, 1971. Microbial cotrol of insects and mites London-New York.
23. Bergey-Manual of Determination of Bacteria, Accademic press Inc, London and New Yourk, 1970.
24. Boehinger Mannheim GmbH, Biochemica: The DiG System Users guide for filter Hybridization, 1993.
25. Cazozzi, N.B, Kramer, V.C, Warren, G.W, Evola,1991, Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Reaction Product Profiles. Applied and Environmental Microbiology, p. 3057-3061.
26. Chilcott, C.N. and Wigley, P.J, 1992, Isolation and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Soil and Insect Habityats in New Zealand. Journal of Invertebrate Phathology 61, p. 244-247.
27. Choi, S.K, B.T. Koo, S. Shin, S.H.Park, J.I.im, 1995. Screening of nested mutants of ADN sequencing by direct electrophoresis of bacterial cultures. Anal. Biochem.230: 182-183.
28. Ferre, J. M.d.Real, J.Van Rie, S.Jansens, and M.Peferoen, 1991, Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgud membrance receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8119-5123.
29. Kiryat Sde - Boker. Physical & Chemical Processes for Water & WasteWater Treatment & Reuse. Hanoi, Vietnam, December 2000.
30. WCB. McGraW- Hill. Mic robiology, Daniel Lim, vollum N₀ 1,2, 1998.
31. Cari. P. SWanson, Timothy Merz and Willam.J.Cytogenetics (second edition) Prentice - Hall of India Private Limited, 1990.
32. Dennis E. Ohman. E xpe riment in gene manipulation. University of California at Berkeley, 1989.
33. E. JaWetz, J.L. Melnick and E.A. Adelberg. RevieW of medicalmic robiology (seventeenth edition) A Publishing Division of Prentice Hall. 1987.
34. I. EdWard Alcamo. Fundamentals of microbiology, Third Edition The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc, 1991.
35. Smith, C.A. Wood, E. J. Molecular biology and biotechnology. First Editon Avon: Chapman Hall limited, 1991.

MỤC LỤC

	Trang
Lời nói đầu	3
<u>Chuong một: Lịch sử và triển vong của Công nghệ sinh học và công nghệ vi sinh vật trong nông nghiệp</u>	Error! Bookmark not defined.
I. Khái niệm chung	Error! Bookmark not defined.
II. Lịch sử của công nghệ sinh học và chế phẩm vi sinh vật	Error! Bookmark not defined.
III. Ứng dụng của công nghệ vi sinh vật	Error! Bookmark not defined.
IV. Vấn đề CNSH để phát triển kinh tế xã hội và triển vọng của công nghệ vi sinh vật trong thế kỷ 21	Error! Bookmark not defined.
<u>Chuong hai: Cơ sở hóa sinh và di truyền học của công nghệ sinh học vi sinh vật</u>	Error! Bookmark not defined.
I. Phân loại các sản phẩm	Error! Bookmark not defined.
II. Mối quan hệ giữa sinh trưởng của vi sinh vật và sự tạo thành sản phẩm	Error! Bookmark not defined.
III. Những nguyên tắc điều hòa trao đổi chất	Error! Bookmark not defined.
IV. Những sai hỏng di truyền của điều hòa trao đổi chất và hiện tượng siêu tổng hợp	Error! Bookmark not defined.
V. Ý nghĩa của kỹ thuật di truyền	Error! Bookmark not defined.
VI. Những hiểu biết về chuyển tải gen	Error! Bookmark not defined.
<u>Chuong ba: Những nguyên tắc cơ bản của nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp</u>	Error! Bookmark not defined.
I. Quy trình lên men	Error! Bookmark not defined.
II. Dinh dưỡng của vi sinh vật và nguyên liệu nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp	Error! Bookmark not defined.
<u>Chuong bốn: Các dạng chế phẩm vi sinh vật (VSV) dùng trong nông nghiệp</u>	Error! Bookmark not defined.
I. Chế phẩm vi khuẩn	Error! Bookmark not defined.
II. Chế phẩm nấm	Error! Bookmark not defined.
III. Chế phẩm virut	Error! Bookmark not defined.
IV. Các phương pháp sử dụng chế phẩm VSV trong trồng trot và bảo vệ thực vật	Error! Bookmark not defined.
<u>Chuong năm: Chế phẩm vi sinh vật làm phân bón và cải tạo đất</u>	Error! Bookmark not defined.
A. Chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ phân tử (Phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm sinh học)	Error! Bookmark not defined.
I. Khái niệm chung về quá trình cố định nitơ phân tử	Error! Bookmark not defined.
II. Quá trình cố định nitơ phân tử và cơ chế	Error! Bookmark not defined.
B. Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan (Phân lân vi sinh)	Error! Bookmark not defined.

<u>I. Quá trình phân giải phosphat khó tan</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan (phân lân vi sinh)</u>	Error! Bookmark not defined.7
<u>C. Phân hữu cơ sinh học</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>I. Khái niêm chung về phân hữu cơ sinh học (compost)</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Phân hữu cơ sinh học với sự trợ giúp của chế phẩm vi sinh vật</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>III. Phân hữu cơ sinh học có bổ sung vi sinh vật trợ lực và làm giàu dinh dưỡng (Phân hữu cơ vi sinh vật)</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>D. Chế phẩm vi sinh vật cải tạo đất</u>	Error! Bookmark not defined.
<u><i>Chương sáu: Chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật</i></u>	Error! Bookmark not defined.
<u>I. Virus gây bệnh cho côn trùng</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng và chuột</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>III. Nấm gây bệnh côn trùng</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>IV. Nguyên sinh động vật ký sinh côn trùng</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>V. Vi sinh vật đối kháng với các sinh vật gây bệnh cây</u>	Error! Bookmark not defined.
<u><i>Chương bảy: Chế phẩm vi sinh vật dùng trong xử lý và cải tạo môi trường</i></u>	Error! Bookmark not defined.
<u>A. Nguồn gốc phế thải và biện pháp xử lý</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>I. Nguồn gốc phế thải</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Biện pháp xử lý phế thải</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>B. Chế phẩm vi sinh vật xử lý phế thải hữu cơ từ rác thải sinh hoạt, phế thải nông nghiệp sau thu hoạch</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>I. Xử lý rác thải sinh hoạt, rác thải đô thị bằng công nghệ vi sinh vật</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Xử lý chất thải rắn bằng công nghệ sinh học</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>C. Chế phẩm vi sinh vật xử lý nước thải chống ô nhiễm môi trường</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>I. Nguồn nước thải</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>II. Khu vực vi sinh vật và các tác nhân gây bệnh trong nước thải</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>III. Vai trò làm sạch nước thải của vi sinh vật</u>	Error! Bookmark not defined.
<u>IV. Các phương pháp xử lý nước thải.</u>	Error! Bookmark not defined.

Chịu trách nhiệm xuất bản

LÊ VĂN THỊNH

Phụ trách bản thảo

LÊ VIỆT LIÊN

Trình bày bìa

NGUYỄN HỮU HỒNG

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

D14 Phố ng Mai, số nhà, Huyện Néi

ĐT : 8523887 - 8524506 - 8521940

FAX : (04) 5760748

CHI NHÁNH NXB NÔNG NGHIỆP

58 Nguyễn Bỉnh Khiêm, Quận 1, TP Hồ Chí Minh

ĐT : 8297157 - 8294521

Mã số $\frac{63-630}{NN-2003}$ - 274/393 - 2003

In 300 bản, khổ 19 × 27 cm tại Xưởng in Trung tâm TT&TV Trường ĐHNN I Hà Nội. Giấy
trích ngang số 274/393 CXB cấp ngày 11/4/2003. In xong và nộp lưu chiểu quý II/2003.