



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

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

(11)



2-0002467

(51)⁷ **C12P 1/00; C05F 11/00**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00093

(22) 14/04/2015

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/08/2015 329A

(73) Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trần Đình Mẫn (VN); Nguyễn Thị Thu (VN); Đỗ Thị Gấm (VN); Phạm Thanh Hà (VN); Nguyễn Thế Trang (VN).

(54) **CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CHỨC NĂNG DÙNG CHO CÂY CHÈ**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè (tên gọi là CHE - HTD 02) bao gồm 5 chủng vi sinh được phân lập từ đất trồng chè gồm các chủng: *Azotobacter chroococcum* Ab-C 11.1; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5; *Azospirillum lipoferum* As-C1.3; *Bacillus megaterium* VL-C12.1 và *Aspergillus awamori* ML-C2.6, được phối trộn và nuôi ủ trong môi trường nuôi cấy xốp vô trùng theo tỷ lệ khối lượng 1% dịch nuôi cấy mỗi chủng vi sinh có mật độ vi sinh vật $\geq 10^7$ CFU/g và 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nông nghiệp, cụ thể là đề cập đến chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè (tên viết tắt là CHE-HTD 02) theo hướng phát triển bền vững.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Chế phẩm vi sinh sử dụng cho cây trồng là sản phẩm chứa các vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn có mật độ phù hợp với tiêu chuẩn ban hành, thông qua các hoạt động sống của chúng giúp chuyển hóa các chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được (N, P, K, S, Fe,...) hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông sản. Chế phẩm vi sinh phải đảm bảo không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

Phân bón vi sinh có nhiều ưu điểm so với phân bón hóa học, ngoài tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng, tiết kiệm phân vô cơ, giảm chi phí sản xuất thì phân vi sinh còn góp phần quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và phát triển bền vững.

Việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất phân vi sinh đang được coi là tiềm năng để nâng cao năng suất cây trồng bởi có chứa các vi sinh vật sống mà khi sử dụng cho hạt giống, bề mặt cây, rễ cây làm cho cây sinh trưởng mạnh mẽ bằng cách tăng lượng dinh dưỡng.

Sử dụng phân hữu cơ vi sinh làm tăng năng suất cây trồng, chất lượng sản phẩm tốt hơn, giảm ô nhiễm của hàm lượng nitrat, góp phần đáp ứng yêu cầu cho một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững, xanh sạch và an toàn. Trong canh tác cây chè ở nước ta có nhiều loại phân bón đã được sử dụng, trong đó có cả các chế phẩm vi sinh vật như phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh của Tổng Công ty Sông Gianh (gồm các chủng vi sinh vật như *Bacillus*, *Azotobacter*, *Aspergillus sp*), phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm của Tập đoàn Quế Lâm (gồm chủng vi sinh vật phân giải lân, phân giải xenluloza và cố định đạm), chế phẩm vi sinh FUSA – USA và phân bón vi sinh EMZ-FUSA USA (bao gồm rất nhiều vi sinh vật khác nhau như *Aerobic Bacter*, *Anaerobic Bacter*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces* và các enzym của chúng) nhập khẩu từ Mỹ v.v.. Các loại chế phẩm vi sinh vật này được sản xuất đại trà và sử dụng chung cho nhiều loại cây trồng. Vì vậy, nhiều chủng vi sinh trong các chế phẩm này không thích hợp cho sự sinh

trưởng của cây chè. Do đó khi được sử dụng để bón cho cây chè, hiệu quả đạt được không cao.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để khắc phục các nhược điểm nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè gồm các vi sinh vật chức năng thích hợp cho sự tăng trưởng của cây chè và được phân lập từ chính đất trồng chè. Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè bao gồm các thành phần theo khối lượng như sau:

- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter* sp. Ab-C11.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter* sp. Ac-C2.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus* sp. ML-C2.6 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus* sp. VL-C12.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum* sp. As-C1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 95% hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang là môi trường xốp vô trùng có chứa 1% nước đường nồng độ 25%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Giải pháp hữu ích sẽ được trình bày chi tiết và rõ ràng hơn sau đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

- Hình 1 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng vi khuẩn *Azotobacter* sp. Ab-C11.1
- Hình 2 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5
- Hình 3 là hình ảnh phân loại chủng *Azospirillum* sp. As- C1.3 dựa trên kit chuẩn API 20^E
- Hình 4 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.3
- Hình 5 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Bacillus* sp. VL-C12.1
- Hình 6 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Aspergillus* ML-C2.6
- Hình 7 là hình vẽ thể hiện sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè trên môi trường xốp vô trùng
- Hình 8 là biểu đồ thể hiện năng suất thực thu (kg chè tươi/ha) của 11 tháng theo dõi năm 2013
- Hình 9 là biểu đồ thể hiện năng suất thực thu (kg chè tươi/ha) của 7 tháng theo dõi năm 2014

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

1. Phân lập và lựa chọn các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật được sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây chè theo phương pháp của giải pháp hữu ích được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè, vì vậy rất phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây chè. Các chủng vi sinh vật này có chức năng cố định đạm, sinh chất kích thích sinh trưởng và phân giải lân. Sử dụng các chủng vi sinh vật có các đặc tính này giúp cải thiện độ phì của đất, tăng chất dinh dưỡng và tăng khả năng giữ ẩm cho đất.

Năm chủng vi sinh vật (*Azotobacter* sp. Ab-C11.1, *Acetobacter* sp. Ac-C2.5, *Azospirillum* sp. As- C1.3, *Bacillus* sp. VL-C12.1, *Aspergillus* ML-C2.6) có hoạt tính phân giải lân, cố định đạm và sinh các chất kích thích sinh trưởng cao được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè theo giải pháp hữu ích dựa trên các bước sau:

- Kiểm tra hoạt tính của vi khuẩn cố định đạm;
- Kiểm tra hoạt tính của vi sinh vật phân giải lân trên môi trường thạch và trong môi trường dịch thể;
- Kiểm tra khả năng sinh chất điều hòa sinh trưởng thực vật axit indol axetic (AIA) thô của chủng tuyển chọn;
- Phân loại vi sinh vật dựa trên các đặc điểm hình thái;
- Phân loại vi sinh vật dựa trên các đặc điểm sinh lí;
- Phân loại vi sinh vật dựa trên các đặc điểm sinh hóa;
- Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S ARN, phân loại vi nấm dựa trên trình tự gen 28S ARN.

+ Đặc điểm phân loại của các chủng vi sinh vật này như sau:

Chủng *Azotobacter* sp. Ab-C11.1

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái:

Các chủng sẽ được phân loại sơ bộ theo hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tế bào. Đặc điểm hình thái của chủng được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của chủng *Azotobacter* sp. Ab-C11.1

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên Ashby	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Azotobacter</i> sp. Ab-C11.1	Khuẩn lạc non màu trắng đục, lỏng. Khi già màu nâu đen, nhầy, đàn hồi. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Đường kính 3-8 mm.	Tế bào hình que kích thước 2 x 3,1 µm. Hình dạng tế bào thay đổi theo thời gian và điều kiện sinh trưởng. Khi còn non có dạng tròn, 2-3 tế bào dính liền nhau, có tiên mao, khi già tế bào có vỏ dày và tạo thành nang xác.	-	-

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lí, sinh hóa:

Bảng 2. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azotobacter* sp. Ab-C11.1

TT	Đặc điểm	Ab-C11.1
1	Hiếu khí	+
2	Vi hiếu khí	-
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Phép thử oxidaza	+
6	Khả năng đồng hóa tinh bột, rhamnoza, disacarit, dextrin	+
7	Khả năng đồng hóa lactoza, manitol, natribenzoat	-
8	Sinh trưởng trên rượu	+
9	Sinh trưởng trên axit hữu cơ	+
10	Axit hóa các nguồn sucroza, lactoza, mannitol, maltoza, fructoza, sorbitol, glucoza	+
11	Axit hóa nguồn galactoza	-
12	Tạo H ₂ S	+
13	Hoạt tính ureaza	+
14	Khử nitrat	+
15	Sinh enterotoxin	-
16	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25 - 30°C
17	pH cho sinh trưởng	6,5 - 8

Dựa trên một số đặc điểm hình thái (Bảng 1), sinh lí, sinh hóa (bảng 2) nhận thấy chủng Ab-C11.1 có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. chroococcum* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey, 1994).

Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S ARN:

Để khẳng định đặc điểm phân loại và xác định vị trí phân loại của các chủng, đã tiến hành giải trình tự gen 16S của các chủng nghiên cứu. Mức độ tương đồng nucleotid của 3 chủng được so sánh với các chủng đã được công bố trong Genbank (Hình 1).

Kết quả giải trình tự gen và xác định vị trí phân loại chủng *Azotobacter* cũng cho kết quả trùng với kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh lí, sinh hóa, có trình tự tương đồng với vi khuẩn *A. chroococcum*, với mức độ tương đồng 99,2%.

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn được phân lập và nghiên cứu có tên phân loại là *A. chroococcum* Ab-C11.1.

Chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5:

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Acetobacter</i> sp. Ac-C2.5	Khuẩn lạc tròn, nhỏ màu vàng. Đường kính 2-3 mm, phần giữa khuẩn lạc lõng lên, dày hơn và sẫm màu hơn các phần xung quanh, không sinh sắc tố.	Tế bào hình que thẳng, đứng đơn, đôi hoặc chuỗi, kích thước 0,7 x 1,1 μ m. Có tiên mao.	-	-

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lí, sinh hóa:

Bảng 4. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5

TT	Đặc điểm	Ac-C2.5
1	Hiếu khí bắt buộc, sinh trưởng nhanh	+
2	Cố định nitơ trong điều kiện vi hiếu khí	+
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng oxy hoá	-
6	Sinh axit từ glucoza, etanol	+
7	Sinh axit từ D-mannitol, D-sorbitol, I-propanol	-
8	Khả năng đồng hóa etanol, glycerol, D-galactoza, D-xyloza, maltoza, fructoza, glucoza, sucroza.	+
9	Khả năng đồng hóa natri axetat	-
10	Khả năng đồng hóa D-arabinoza	-
11	Khả năng đồng hóa D-sorbitol	+
12	Khả năng đồng hóa D-mannitol	+
13	Khả năng đồng hóa metanol (1%), mannoza, đextrin, tinh bột	-
14	Sinh trưởng trên môi trường chứa 30% glucoza hoặc sucroza	+
15	Tạo H ₂ S	-
16	Sinh enterotoxin	-
17	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25-30°C
18	pH cho sinh trưởng	5,5

Dựa trên một số đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5 (bảng 4) nhận thấy chủng vi khuẩn có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. diazotrophicus* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey, 1994). Để khẳng định thêm, đã tiếp tục xác định trình tự gen 16S của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S RNA:

Kết quả giải trình tự gen của chủng *Acetobacter* sp. Ac-C2.5 (Hình 2), so sánh với trình tự các chủng được công bố trong Genbank cũng khẳng định chủng này là *A. diazotrophicus* với mức độ tương đồng 99-100%.

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng vi khuẩn được phân lập và nghiên cứu có tên phân loại là *A. diazotrophicus* Ac-C2.5.

Chủng *Azospirillum* sp. As-C1.3

Phân loại theo đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Đặc điểm hình thái của chủng *Azospirillum* sp. As- C1.3

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Azospirillum</i> sp. As-C1.3	Khuẩn lạc tròn đều, bóng, mép phẳng, màu hồng nhạt, đường kính 1,2 mm.	Tế bào hình que thẳng, đầu hơi cong, kích thước 2 x 3,1 μ m.	-	-

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào cho thấy chủng đều mang những đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn thuộc chi *Azospirillum*.

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lí, sinh hóa:

Trong số những vi khuẩn rễ cố định N, *Azospirillum* được đánh giá là một trong những ứng cử viên tiềm năng cho sản xuất phân vi sinh do có các hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật như vừa có khả năng cố định N, phân giải P lại vừa có khả năng sinh các phytohormon auxin, cytokinin, zeatin, cơ chất điều hòa hoặc siderophore. Cho đến nay có tổng số khoảng 15 loài đã được miêu tả trong chi *Azospirillum*.

Đặc điểm sinh hóa của các chủng được xác định dựa trên kit chuẩn API 20NE (Hình 3). Các đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azospirillum* sp. As-C1.3 được mô tả ở bảng 6.

Bảng 6. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azospirillum* sp. As-C1.3

TT	Đặc điểm	As-C1.3
1	Hiếu khí	+
2	Cố định nitơ trong điều kiện vi hiếu khí	+

3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng oxy hoá	-
6	Thủy phân gelatin	-
7	Sinh axit từ D-glucoza	
8	Khả năng đồng hóa D-fructoza, glycerol, D-gluconat, 2-ketogluconat, axit malic, D-riboza, D-sorbitol, D-xyloza.	+
9	Khả năng đồng hóa N-axetylglucosamiza, L-arabitol, celobioza, D-arabinoza, inositol, maltoza, L-rhamnoza, sucroza, L-xyloza, D-glucoza, D-mannitol,	-
10	Khả năng đồng hóa D-riboza, D-mannoza, L-arabinoza, D-arabitol, D-fructoza, D-galactoza	-
11	Khả năng đồng hóa D-lactoza	+
12	Khử nitrat	+
13	Hoạt tính ureaza	+
14	Thủy phân gelatin	-
15	Sinh indol	+
16	Sinh enterotoxin	-
17	Sinh H ₂ S	-
18	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	28 - 37 ⁰ C
19	pH cho sinh trưởng	6 - 7,5

Dựa trên một số đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa của vi khuẩn *Azospirillum* nhận thấy chủng As-C1.3 có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. lipoferum* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey 1994).

Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S RNA:

Từ ADN tổng số, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đã thu được gene mã hoá 16S rARN của chủng. Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S của chủng thu được một băng rất đặc hiệu. Kích thước phân tử vào khoảng ~ 1,5 kb tương đương với tính toán lí thuyết.

Sản phẩm PCR sau tinh sạch được dùng trực tiếp để xác định trình tự nucleotit của gene 16S rARN. Sử dụng đoạn mồi đã gắn huỳnh quang của bộ hoá chất chuẩn, phân tích trên máy xác định trình tự ADN tự động, xử lí bằng chương trình PC/GENE. Truy cập ngân hàng gene để tìm những loài đã đăng ký có trình tự tương đồng.

Kết quả giải trình tự gen của chủng (Hình 4) so sánh với trình tự các chủng được công bố trong Genbank cho thấy chủng As-C1.3 có quan hệ gần với loài *A. lipoferum* với mức độ tương đồng 99,5%.

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng được phân lập và nghiên cứu có tên phân loại là *A. lipoferum* As-C1.3

Chủng *Bacillus* sp. VL-C12.1

Phân loại theo đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Đặc điểm hình thái của chủng *Bacillus* sp. VL-C12.1

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Bacillus</i> sp. VL-C12.1	Khuẩn lạc tròn, có viền nhăn, non màu trắng, già màu vàng, đường kính 4,5 mm.	Tế bào hình que dài, kích thước 1,2-1,5 x 2-5 μ m, đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn. Có tiên mao.	+	+

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lí (bảng 8):

Bảng 8. Đặc điểm sinh lí của chủng *Bacillus* sp. VL-C12.1

TT	Đặc điểm	VL-C12.1
1	Hiếu khí bắt buộc	+
2	Vi hiếu khí	+
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng lên men	+
6	Sinh enterotoxin	-
7	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	30°C
8	pH cho sinh trưởng	6 - 7

Để định tên đến loài, đã tiếp tục đánh giá các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn được phân lập và nghiên cứu.

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh hóa:

Chủng VL-CF 7.3 thuộc loại trực khuẩn Gram (+) và có nhiều đặc điểm giống vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (bảng 9).

Bảng 9. Đặc điểm sinh hóa của chủng *Bacillus* phân giải lân VL-C12.1

TT	Đặc điểm	VL-C12.1	TT	Đặc điểm	VL-C12.1
1	Sinh β -galactosidaza	+	7	Sinh Ureaza	-
2	Arginin dihydrolaza	+	8	TDA	-
3	Lysin decarboxylaza	-	9	Sinh Indole	-
4	Ornithin decarboxylaza	+	10	V-P	-
5	Sử dụng xitrat	-	11	Gelatinaza	-

6	Sinh H ₂ S	-	12	Nitrat	+
---	-----------------------	---	----	--------	---

Sử dụng thêm kit chuẩn API 50CHB để đánh giá khả năng lên men trên các nguồn cơ chất khác nhau của chủng vi khuẩn này. API 50CHB là kit dùng để nhận diện vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và các chi gần với *Bacillus* về mặt di truyền dựa trên khả năng sử dụng các nguồn cơ chất. Việc phân loại được thực hiện dựa trên khả năng lên men 49 cơ chất. Trong suốt quá trình nuôi cấy, chủng vi khuẩn sử dụng cơ chất, lên men tạo thành axit làm giảm pH, được nhận biết bằng sự đổi màu chất chỉ thị. Kết quả được trình bày ở bảng 10.

Bảng 10. Khả năng lên men sinh axit từ các nguồn cơ chất của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân giải lân VL-C12.1 dựa trên kit chuẩn API 50CHB

TT	Đặc điểm	VL-C12.1	TT	Đặc điểm	VL-C12.1
1	Glycerol	+	26	Salixin	+
2	Erythritol	-	27	Xenlobioza	+
3	D-Arabinosa	-	28	Maltoza	+
4	L- Arabinosa	+	29	Lactoza	+
5	Riboza	+	30	Melibioza	+
6	D-Xyloza	+	31	Sucroza	+
7	L-Xyloza	-	32	Trehaloza	+
8	Adonitol	-	33	Inulin	+
9	β -metylxylosit	-	34	Melezitoza	+
10	Galactoza	+	35	D-raffinoza	+
11	D-glucoza	+	36	Tinh bột	+
12	D-fructoza	+	37	Glycogen	+
13	D-mantoza	-	38	Xylitol	+
14	L-sorboza	-	39	β -gentiobioza	+
15	Rhamnoza	-	40	D-turanoza	+
16	Dulcitol	-	41	D-lyxoza	-
17	Inositol	+	42	D-tagatoza	-
18	Mannitol	+	43	D-fucoza	-
19	Sorbitol	+	44	L-fucoza	-
20	α -metyl-D-mannosit	-	45	D- Arabitol	+
21	α -metyl-D-glucosit	+	46	L- Arabitol	-
22	N-axetylglucosamiza	+	47	Gluconat	-
23	Amygdalin	+	48	2-Ketogluconat	-

24	Arbutin	+	49	5-Ketogluconat	-
25	Aesculin	+			

Kết quả xác định được đối chiếu với dữ liệu phần mềm cho thấy chủng VL-C12.1 có các đặc điểm sinh hoá gần nhất với *B. megaterium*, chỉ số xác định id $\geq 86,3$ %. (% id - mức độ gần gũi liên quan với những đơn vị phân loại khác của cơ sở dữ liệu $\geq 80,0$ % được cho là xác định chấp nhận được).

Phân loại vi khuẩn phân giải lân dựa trên trình tự gene 16S rARN:

Trình tự của đoạn gene 16S rARN của chủng VL-C12.1 được so sánh với chủng có mức độ tương đồng cao nhất trong ngân hàng gene. Để biết mối quan hệ di truyền giữa các chủng được phân tích, cây phả hệ (Hình 5) dựa trên phân tích phân đoạn gene 16S rARN đã được thiết lập theo chương trình điện toán MEGA 2.1. Kết quả phân tích cho thấy chủng VL-C12.1 thể hiện mức độ sai khác về nucleotit của đoạn gene 16S rARN rất ít, chỉ sai khác ở 1 vị trí, mức độ tương đồng với *B. megaterium* AB256830 rất cao tới 99,5%.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá, kit chuẩn API 20NE, trình tự gene 16S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey, chủng VL-C12.1 được phân loại là *B. megaterium*.

** Chủng Aspergillus sp. ML-C2.6*

Phân loại nấm mốc dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí:

Sau 2-5 ngày nuôi cấy tiến hành khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc non. Sau 5-12 ngày nuôi cấy khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc trưởng thành, đồng thời quan sát cách sắp xếp của bộ máy mang bào tử và của bào tử ở tiêu bản vi học. Đặc điểm chung của cả 3 chủng nấm sợi được nghiên cứu là trụ nấm tách biệt và có hyalin. Các bào tử có nguồn gốc xuất phát từ các tế bào chân đáy trên trụ đỡ và kết thúc bằng một túi nấm ở đầu. Khuẩn ty tăng trưởng ở ngọn, có vách ngăn, phân nhánh, không màu, màu nhạt hoặc trở nâu. Vừa có khả năng sinh sản sinh dưỡng (từ khuẩn ty), lại vừa có khả năng sinh sản vô tính (bằng bào tử trần). Đặc điểm sinh lí: Hiếu khí, chịu nhiệt độ cao, chịu axit. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm mốc được thể hiện ở bảng 11.

Bảng 11. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, khuẩn ty và bào tử của chủng

Aspergillus sp. ML-C2.6

Chủng	ML-C2.6
Hình thái khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên Czapek chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	- Khuẩn lạc tốc độ mọc trung bình, kích thước 4,6-5,8 cm - Có hình thành giọt tiết màu trắng trong - Màu sắc: Mặt phải sợi nấm màu trắng, tâm có các hạt bào tử tập trung màu đen, mặt trái màu vàng - Sắc tố không khuếch tán vào môi trường
Hình thái bào	- Bông hình cầu, tỏa tia khi non và tạo thành các cột với những

tử dưới kính hiển vi	chuỗi bào tử rất dài khi già. Kích thước 50-200 μm . - Bề mặt cuống ráp, có nhiều gai mịn, đều, không có màu. Kích thước (380-800) x (12-18) μm . - Bọng hình cầu. Kích thước 35-50 μm . Vùng sinh sản khắp mặt bọng. - Thê bình 2 tầng và 1 tầng, cả 2 loại thê bình trên cùng 1 bông. Lớp 1 hình trụ, kích thước (10-20) x (3,75-5) μm . Lớp 2 hình chai, kích thước (5-7,5) x (3,75-5) μm . - Bào tử đỉnh hình cầu, màu đen, bề mặt có gai, kích thước (3-5) μm .
Nhiệt độ opt	25 - 30°C
Có khả năng đồng hóa	Glucosa, sucroza, maltoza, mannoza, tinh bột tan
Sinh enzym	Endo- β -1,4-glucanaza, amylaza, xellulaza, xylanaza, pectinaza
Sinh axit	+

Căn cứ vào kết quả khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc, có thể nhận thấy các chủng nấm mốc đều mang các đặc điểm đặc trưng của chi nấm mốc *Aspergillus*.

Dựa trên một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc và các đặc điểm vi học của các chủng nghiên cứu kết hợp với khóa phân loại vi nấm của Samson (1994) nhận thấy chủng ML-C2.6 có đặc điểm giống với nấm sợi thuộc loài *A. awamori*.

Để định danh chính xác các loài nấm mốc, đã tiếp tục phân loại sâu hơn dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử.

Phân loại vi nấm dựa trên trình tự gen 28S RNA:

Trình tự của đoạn gene 28S rARN của 3 chủng vi nấm ML-C2.6 được so sánh với chủng có mức độ tương đồng cao nhất trong ngân hàng gene.

Cây phả hệ (Hình 6) dựa trên phân tích phân đoạn gene 28S rARN đã được thiết lập theo chương trình điện toán MEGA 2.1. Kết quả phân tích cho thấy chủng ML-C2.6 tương đồng với loài *A. awamori* tới 100%.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá, trình tự gene 28S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi nấm của Raper & Thom (1965), chủng nấm mốc được phân loại là *A. awamori* ML-C2.6

+ Độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật phân lập từ đất trồng chè

Độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật sử dụng trong đời sống có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Theo hướng dẫn số 90/679/EWG của cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học, nhóm tác nhân sinh học vi sinh vật được phân làm 4 cấp độ an toàn, trong đó chỉ các vi sinh vật ở cấp độ 1 được ứng dụng trong sản xuất. Kết quả xác định mức độ an toàn của các chủng vi sinh vật được tập hợp trong bảng 12.

Bảng 12. Đánh giá cấp độ an toàn của các chủng vi sinh vật đã được phân loại

TT	Ký hiệu chủng	Tên vi sinh vật	Mức độ an toàn
1	Ab-C11.1	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Cấp độ 1
2	Ac-C2.5	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Cấp độ 1
3	As-C1.3	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Cấp độ 1
4	VL-C12.1	<i>Bacillus megaterium</i>	Cấp độ 1
5	ML-C2.6	<i>Aspergillus awamori</i>	Cấp độ 1

Cả 5 chủng vi sinh vật đều được xếp vào mức độ an toàn cấp 1 vì vậy có thể ứng dụng các chủng vi sinh vật hữu ích này cho sản xuất phân vi sinh đa chức năng trong điều kiện bình thường.

2. Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè

Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè (CHE-HTD 02) theo giải pháp hữu ích được thực hiện theo các nguyên tắc sau đây:

- Chế phẩm được nuôi cấy trên môi trường xốp vô trùng. Chất mang được dùng là than bùn có kèm theo một số phụ gia như cám, trấu, đất, CaCO_3 ... Chế phẩm chứa trong túi polyetylen, bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng;

- Các chủng vi sinh vật đã được thử khả năng đối kháng trên thạch đĩa và trong chế phẩm. Các chủng đồng thời sống hoà hợp với nhau trên môi trường xốp vô trùng, vì vậy các chủng này được lựa chọn để đưa vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chức năng;

- Trong các loại chế phẩm vi sinh vật chủng giống có ý nghĩa quyết định đối với chất lượng của sản phẩm. Vì vậy các chủng giống phải tuyển chọn sao cho có hoạt tính sinh học cao, có khả năng cạnh tranh để sinh trưởng và hoạt động tốt trong các môi trường sinh thái đất. Đồng thời các chủng phải giữ được hoạt tính qua thời gian bảo quản thì mới đảm bảo có quy trình công nghệ sản xuất ổn định;

- Chế phẩm được tối ưu hoá thành phần và điều kiện nuôi cấy để đạt mật độ từ 10^7 CFU/g trở lên sau 1 tuần cấy vào và các chủng đều sinh trưởng và phát triển tốt trong chế phẩm. Chế phẩm có thể bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng (đạt mật độ theo tiêu chuẩn ngành Nông nghiệp TCN 6167-1997). Hoạt tính sinh học của các chủng cũng không bị mất đi sau thời gian bảo quản.

Phương pháp sản xuất chế phẩm CHE-HTD 02 (Hình 7):

Hình 7 thể hiện sơ đồ quy trình công nghệ của phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè (chế phẩm CHE-HTD 02) theo giải pháp hữu ích. Phương pháp được đề xuất bao gồm các công đoạn sau:

(1). Chuẩn bị dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật bằng cách: lấy các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết (gồm 5 chủng vi sinh vật: *Azotobacter chroococcum* Ab-

C11.1; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5; *Azospirillum lipoferum* As-C1.3; *Bacillus megaterium* VL-C12.1; *Aspergillus awamori* ML-C2.6) từ môi trường thạch nghiêng và nhân giống trên môi trường dịch thể bằng cách nuôi cấy lắc với tốc độ 200 vòng/ phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cho mỗi loại vi sinh vật, khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ml thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp.

(2). Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp (hỗn hợp chất mang) bằng cách: phối trộn cao lanh, than bùn, trấu nghiền, cám, bột sắn, đường kính, vôi bột, nước + chất dinh dưỡng đa vi lượng (gồm K_2HPO_4 , $MgSO_4$ và NaCl phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1:1). Khử trùng hỗn hợp chất mang ở nhiệt độ 125°C, áp suất 1,25 at, thời gian 150 phút.

(3). Phối trộn các thành phần để tạo chế phẩm vi sinh vật chức năng CHE-HTD 02 bằng cách: Phối trộn 1% dịch nuôi mỗi loại vào môi trường xốp vô trùng để môi trường đạt độ ẩm khoảng 30%.

(4). Tiến hành lên men xốp trong 1 tuần ở nhiệt độ phòng (nhiệt độ 25-30°C).

(5). Kiểm tra mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm. Mật độ vi sinh vật khi mới cấy đạt 10^6 đến 10^7 tế bào trong 1g chế phẩm. Sau 7-10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10^7 CFU/g trở lên (TCVN).

(6). Bảo quản: bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời cho đến khi sử dụng. Các chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè thu được từ phương pháp nêu trên chứa:

- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococcum* Ab-C11.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum lipoferum* As-C1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus megaterium* VL-C12.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus awamori* ML-C2.6 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 95% hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang là môi trường xốp vô trùng có chứa 1% nước đường nồng độ 25%.

Chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm vi sinh vật chức năng cho cây chè (CHE-HTD 02)

Chế phẩm được tối ưu hoá thành phần và điều kiện nuôi cấy để đạt mật độ từ 10^9 CFU/g trở lên sau 1 tuần cấy vào và đã được theo dõi biến động mật độ vi sinh vật theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Bảng 13: Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đa chức năng cho cây chè theo thời gian (CFU/g trọng lượng khô)

Chủng VSV	Mật độ VSV trong chế phẩm (x 10 ⁹ CFU/g)						
	1 tuần	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
<i>Azotobacter</i>	0,5	1,2	1,3	1,2	1,1	1,0	0,8
<i>Azospirillum</i>	1,7	6,5	4,5	3,7	2,5	1,7	1,2
<i>Acetobacter</i>	0,8	3,7	3,1	2,7	2,1	1,8	1,3
VSV phân giải lân tổng số	1,8	8,5	6,2	5,5	4,6	3,5	2,2

Khi nghiên cứu khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm, chúng tôi nhận thấy các chủng vi sinh vật trong chế phẩm đều sinh trưởng và phát triển tốt. Chế phẩm có thể bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng (đạt mật độ theo tiêu chuẩn ngành nông nghiệp TCN 6167-1997), hoạt tính sinh học của các chủng cũng không bị mất đi sau thời gian bảo quản.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất 1000 kg chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây cà phê (chế phẩm CHE-HTD 02)

Sản xuất 1000kg chế phẩm CHE-HTD 02 theo giải pháp hữu ích như được mô tả ở Hình 7.

Chuẩn bị 50 kg dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật

Để sản xuất 1000 kg chế phẩm thì cần 10kg dịch nuôi của mỗi loại vi sinh vật. Lấy các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết, gồm 5 chủng vi sinh vật: *Azotobacter chroococcum* Ab-C11.1, *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5, *Azospirillum lipoferum* As-C1.3, *Bacillus megaterium* VL-C12.1 và *Aspergillus awamori* ML-C2.6 từ môi trường thạch nghiêng cho vào nhân giống trên môi trường dịch thể. Các bình giống được nuôi cấy trong hệ thống lên men (sử dụng hệ thống lên men 20 lít) tuần hoàn khí liên tục ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cho mỗi loại vi sinh vật, khi mật độ tế bào đạt khoảng 10⁷-10⁹ CFU/ml thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp.

Chuẩn bị 950 kg môi trường nuôi cấy xốp

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp (hỗn hợp chất mang) bằng cách: phối trộn cao lanh, than bùn, trấu nghiền, cám, bột sắn, đường kính, vôi bột, nước + chất dinh dưỡng đa vi lượng (gồm K₂HPO₄, MgSO₄ và NaCl phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1:1). Môi trường nuôi cấy xốp vô trùng là hỗn hợp chất mang được phối trộn từ các thành phần theo tỷ lệ % khối lượng như sau:

Bảng 14. Thành phần của 950 kg môi trường xốp

TT	Thành phần	Tỷ lệ %	Số lượng cụ thể trong sản xuất 1000 kg môi trường xốp
1	Cao lanh	35 - 40%	380 kg
2	Than bùn	20 - 25 %	230 kg
3	Trấu nghiền	8 - 10%	100 kg
4	Cám	5 - 6%	55 kg
5	Bột sắn	5 - 6%	55 kg
6	Vôi bột	0,5 - 0,6%	6 kg
7	Chất dinh dưỡng đa vi lượng (gồm K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ và NaCl phối trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1:1)	18,5 - 18,6%	164 kg
8	Nước đường (nồng độ 25%)	0,8 - 1%	10 kg
9	Nước máy		Bổ sung nước đến khi đạt độ ẩm 30%

Môi trường xốp sau khi phối trộn để qua đêm cho vật liệu hút ẩm đều và đồng nhất, khử trùng hỗn hợp chất mang ở nhiệt độ 125°C, áp suất 1,25 at, thời gian 150 phút.

Phối trộn các thành phần

Để sản xuất 1000 kg chế phẩm vi sinh chức năng CAFE-HTD 01, các thành phần được phối trộn theo tỷ lệ cụ thể như sau:

- 10 kg dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococcum* Ab-C11.1 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Azospirillum lipoferum* As-C1.3 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Bacillus megaterium* VL-C12.1 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Aspergillus awamori* ML-C2.6 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g dịch nuôi; và
- 950 kg hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang là môi trường xốp vô trùng có chứa khoảng 1% nước đường nồng độ 25%.

Lên men trong môi trường xốp trong 1 tuần ở nhiệt độ phòng (nhiệt độ 25-30°C).

Kiểm tra mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm. Mật độ vi sinh vật khi mới cấy đạt 10^6 đến 10^7 tế bào trong 1g chế phẩm. Sau 7-10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10^7 CFU/g trở lên (TCVN).

Đóng gói và bảo quản: chế phẩm được đóng gói trong các túi Polyetylen và được bảo quản ở nhiệt độ phòng, ở nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời cho đến khi sử dụng. Các chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Ví dụ 2: Thử nghiệm chế phẩm vi sinh vật chức năng CHE-HTD 02 trong canh tác cây chè theo hướng phát triển bền vững

Để đánh giá tác dụng của chế phẩm vi sinh vật đa chức năng CHE –HTD 02, chế phẩm này đã sử dụng vào quá trình canh tác cây chè theo hướng phát triển bền vững tại Tây Nguyên. Thí nghiệm bao gồm các công thức như sau:

- Công thức Đối chứng (ĐC): Bón phân và chăm sóc theo quy trình chăm sóc do cây chè do sở Nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Lâm Đồng ban hành.

- Công thức Thí nghiệm (TN): Giảm 25% lượng phân hóa học; sử dụng chế phẩm CHE-HTD 02, chế phẩm vi sinh từ xử lý phế thải và thuốc trừ sâu thảo mộc Anisaf SH-01.

Thí nghiệm được triển khai tại: Đồi 3, Khu C1, Thị trấn Lộc Thắng, Huyện Bảo Lâm, Lâm Đồng. Thời gian thực hiện thí nghiệm từ năm 2013-2014. Diện tích Mô hình thí nghiệm là 4 ha; Mô hình đối chứng là 1 ha.

Lượng phân bón và chế phẩm sử dụng trong các mô hình được mô tả ở bảng 15.

Bảng 15. Sử dụng chế phẩm CHE-HTD 02 nhằm giảm bón phân trong canh tác chè (Áp dụng cho cây chè đang trong thời kỳ kinh doanh, tính trên 1ha)

	Nguyên vật liệu	Mô hình thí nghiệm		Mô hình Đối chứng		Lượng bón/ tổng số	Cách bón	So sánh MH thí nghiệm và đối chứng
		<i>Phân nguyên chất</i>	<i>Phân thương phẩm</i>	<i>Phân nguyên chất</i>	<i>Phân thương phẩm</i>			
Cuối tháng 4 - đầu tháng 5	Phân hữu cơ (bón lót) 24 tấn/ha, 3 năm/lần		Phế thải đồng ruộng + vixura		Phân chuồng + Trichodesma	100%	Rạch sâu 15-20 cm, giữa hàng, lấp kín	
	Chế phẩm Vixura phân hủy phế thải đồng ruộng		48 kg		0			
	Chế phẩm Trichodesma		30		100 kg			
	Chế phẩm vi sinh đa chức năng cho chè		30		0			Thêm
	Phân hữu cơ sinh học Sông Gianh (kg/ha)		1.750		2.500	100%		Giảm 30 %
	P ₂ O ₅ (Super lân) kg	136	848	181	1.130	100%	Rạch sâu 6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tháng	N kg/ha (urê)	75	162	100	216	16,6%	Rạch sâu	Giảm 25%

6	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	25	42	33	56	16,4%	6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tháng 7	N kg/ha (urê)	75	162	100	216	16,6%	Rạch sâu	Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	25	42	33	56	16,4%	6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tháng 8	N kg/ha (urê)	75	162	100	216	16,6%	Rạch sâu	Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	25	42	33	56	16,4%	6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tháng 9	N kg/ha (urê)	75	162	100	216	16,6%	sâu 6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	25	42	33	56	16,4%		Giảm 25%
Tháng 10	N kg/ha (urê)	75	162	100	216	16,6%	Rạch sâu	Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	25	42	33	56	16,4%	6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tháng 11	N kg/ha (urê)	75	165	100	220	16,6%	Rạch sâu	Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	27	45	38	60	18%	6-8 cm, lấp kín	Giảm 25%
Tổng cộng	Phân hữu cơ sinh học Sông Gianh (kg/ha)		1.750		2.500			Giảm 30 %
	Phân hữu cơ (bón lót)		24 tấn/ha		24 tấn/ha			
	N kg/ha (urê)	450	975	600	1300			Giảm 25%
	P ₂ O ₅ kg/ha (super lân)	136	848	181	1130			Giảm 25%
	K ₂ O kg /ha (clorua kali)	152	255	203	340			Giảm 25%
	Anisaf SH – 01 (lít)		110 lít		0			Thêm
	Chế phẩm Vixura phân hủy phế thải đồng ruộng		48 kg		0			Thêm
	Chế phẩm Trichodesma		30		100kg			Giảm 70%
	Chế phẩm vi sinh chức năng cho cây chè (kg/ha)		30					Thêm

Bảng 16: Quy trình tưới thuốc Anisaf SH-01 trong mô hình thử nghiệm trên cây chè

Thời gian tác động	Nguyên vật liệu	Lượng tưới năm 2013 (lit/ha)	Lượng tưới năm 2014 (lit/ha)
Tháng 6	Anisaf SH-01 (lít)	30	20
Tháng 8	Anisaf SH-01 (lít)	30	20
Tháng 10	Anisaf SH-01 (lít)	30	15
Tháng 12	Anisaf SH-01 (lít)	20	15
Tổng cộng	Anisaf SH – 01 (lít)	110	70

Sinh trưởng của cây chè

Mật độ búp chè/m² được trình bày tại bảng 17.

Bảng 17. Mật độ búp chè (số lượng búp/m²)

Tháng	Mô hình thí nghiệm	Mô hình Đối chứng
2	226	199,6
3	252	182,4
4	281,6	228,4
5	301,2	270,4
6	311,2	274
7	282,8	248,8
8	271,6	239,6

Kết quả theo dõi về mật độ búp chè trong mô hình thí nghiệm ở các tháng theo dõi đều cao hơn so với mô hình Đối chứng.

Chiều dài đợt chè (cm): chiều dài đợt chè được tính từ búp non đến lá thứ 4-5, các kết quả thu được trình bày ở bảng 18.

Bảng 18. Chiều dài đợt chè trong các công thức thí nghiệm

Tháng	Mô hình thí nghiệm	Mô hình Đối chứng
2	30,1	30,6
3	30,2	30,3
4	29,0	29,8
5	30,1	30,4
6	32,3	31,3
7	32,2	33,2
8	33,0	33,0

Chiều dài đợt chè giữa mô hình thí nghiệm và mô hình đối chứng ở các tháng theo dõi là tương đương nhau.

Trọng lượng trung bình của 30 đợt chè (g)

Kết quả theo dõi về trọng lượng của 30 đợt chè ở các mô hình được trình bày tại bảng 19, cho thấy:

Bảng 19. Trọng lượng trung bình của 30 đợt chè (g)

Tháng	Mô hình thí nghiệm	Mô hình Đối chứng
2	142,2	138
3	148,5	140,1
4	147,9	141,0
5	149,3	146,4
6	149,4	146,8
7	145,4	145,6
8	143,7	143,7

Từ tháng 2 đến tháng 6 trọng lượng trung bình của 30 đợt chè ở mô hình thí nghiệm cao hơn so với mô hình đối chứng; còn ở tháng 7 và 8 thì trọng lượng trung bình của 30 đợt chè ở các mô hình là tương đương nhau.

Nhận xét chung: Mô hình thí nghiệm có mật độ búp chè và trọng lượng đợt chè cao hơn so với mô hình đối chứng; lá chè ở mô hình thí nghiệm cũng xanh và bóng hơn, đồng đều hơn so với mô hình đối chứng.

Năng suất chè của mô hình theo dõi:

Kết quả theo dõi về năng suất chè của mô hình thí nghiệm trong năm 2013 và 2014 cho thấy, năng suất của mô hình thí nghiệm luôn cao hơn mô hình đối chứng. Cụ thể như sau:

- Năm 2013 (hình 8): trong 11 tháng theo dõi của năm 2013, tổng năng suất thực thu (kg chè tươi/ha) của Mô hình thí nghiệm là: 19.234,88 kg/ha cao hơn 31 % so với mô hình đối chứng (mô hình đối chứng thu được: 14.676 kg/ha)

- Năm 2014 (hình 9): trong 7 tháng theo dõi của năm 2014, tổng năng suất thực thu (kg chè tươi/ha) của Mô hình thí nghiệm là: 16.837,21 kg/ha cao hơn 19,8 % so với mô hình đối chứng (mô hình đối chứng thu được: 14.052 kg/ha).

Nhận xét về tình hình sâu bệnh hại

- Trong năm 2013, các mô hình thí nghiệm theo dõi chỉ bị bọ xít muỗi gây hại chè là chủ yếu; còn các loại sâu gây hại khác như nhện đỏ, rầy xanh, bọ cánh tơ đều ở ngưỡng mật độ thấp. Cả 2 mô hình đều bị bọ xít muỗi gây hại bắt đầu từ tháng 2 và cao điểm gây hại ở mô hình TN (tỷ lệ búp bị hại là 15,5%) và Mô hình ĐC (tỷ lệ búp bị hại là 25,8%) là vào tháng 7. Đến tháng 11, 12 thì bọ xít muỗi gây hại ở cả 2 Mô hình đã giảm hẳn, tỷ lệ gây hại còn không đáng kể (nằm trong ngưỡng an toàn).

- Trong năm 2014, các mô hình theo dõi chỉ bị nhện đỏ gây hại là chủ yếu; trong đó cao điểm gây hại là vào tháng 3; ở Mô hình TN (mật độ nhện đỏ/lá là 26,6); Mô

hình ĐC (mật độ nhện đỏ/lá là 38,1); nhưng đến tháng 4 thì mật độ nhện đỏ gây hại đã giảm hẳn và giảm rõ nhất là ở Mô hình TN.

Chất lượng chè của mô hình thí nghiệm sau thu hoạch:

-Hàm lượng chất hòa tan và hàm lượng Tanin

Kết quả đánh giá chất lượng các mẫu chè thu được từ các mô hình thí nghiệm cho thấy, hàm lượng chất khô và hàm lượng tanin có trong chè ở mô hình thí nghiệm (TN) cao hơn so với chè của mô hình đối chứng (bảng 20).

Bảng 20. Hàm lượng chất hòa tan, tanin của các mẫu chè thu được từ các mô hình

Chỉ tiêu đánh giá	Đơn vị	Mô hình thí nghiệm (TN)	Mô hình Đối chứng
Hàm lượng chất hòa tan	%	36,4	32,45
Hàm lượng tanin	%	14,1	11,25

- Dư lượng các thuốc BVTV hóa học và kim loại nặng của các mẫu chè

Từ các mẫu chè thu được ở các mô hình, đã tiến hành định lượng hàm lượng một số thuốc BVTV hóa học và hàm lượng các chất kim loại nặng, kết quả thu được trình bày tại bảng 21.

Bảng 21. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và hàm lượng kim loại nặng các mẫu chè của các mô hình thí nghiệm sau thu hoạch

Chỉ tiêu đánh giá	Đơn vị	Mô hình thí nghiệm (TN)	Đối chứng Đối chứng (ĐC)
Hàm lượng thủy ngân (Hg)	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,005$)	Không phát hiện ($LOD=0,005$)
Hàm lượng asen (As)	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,005$)	Không phát hiện ($LOD=0,005$)
Hàm lượng chì (Pb)	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,01$)	Không phát hiện ($LOD=0,01$)
Hàm lượng cadimi (Cd)	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,005$)	Không phát hiện ($LOD=0,005$)
Imidachloprid	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)
Cartap	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)
Thiamethoxam	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)
Acetamiprid	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)
Matrine	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)
Pyridaben	mg/kg	Không phát hiện ($LOD=0,02$)	Không phát hiện ($LOD=0,02$)

LOD –là giới hạn phát hiện

Các mẫu chè mô hình thí nghiệm (TN) cũng như các mô hình đối đối chứng đều không phát hiện thấy dư lượng thuốc trừ sâu và kim loại nặng.

Như vậy, ở mô hình thí nghiệm khi giảm 25% lượng phân bón hóa học thay bằng phân bón sinh học, chế phẩm vi sinh chức năng CHE-HTD 02 và chế phẩm Vixura phân hủy phế thải đồng ruộng và sử dụng thuốc trừ sâu thảo mộc Anisaf SH-01 để phun phòng trừ sâu bệnh thì nhận thấy: cây chè trong mô hình thí nghiệm sinh trưởng phát triển tốt, lá chè xanh và bóng hơn, năng suất cao hơn trên 19,8% so với mô hình đối chứng, môi trường sinh thái đồng ruộng được cải thiện, chất lượng nông sản đạt vệ sinh an toàn thực phẩm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

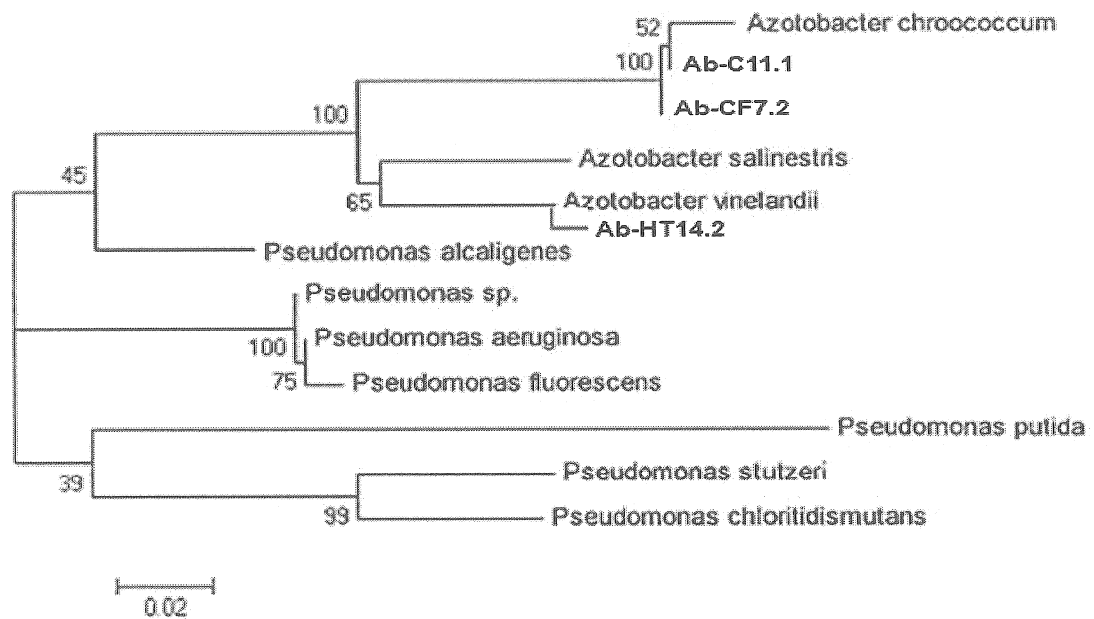
Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè theo giải pháp hữu ích được dùng cho cây chè theo hướng phát triển bền vững với khả năng cải tạo đất, phù hợp với chế độ sinh trưởng của cây chè, giúp giảm lượng phân hóa học, tăng năng suất cây trồng.

Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè theo giải pháp hữu ích thu được từ phương pháp dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

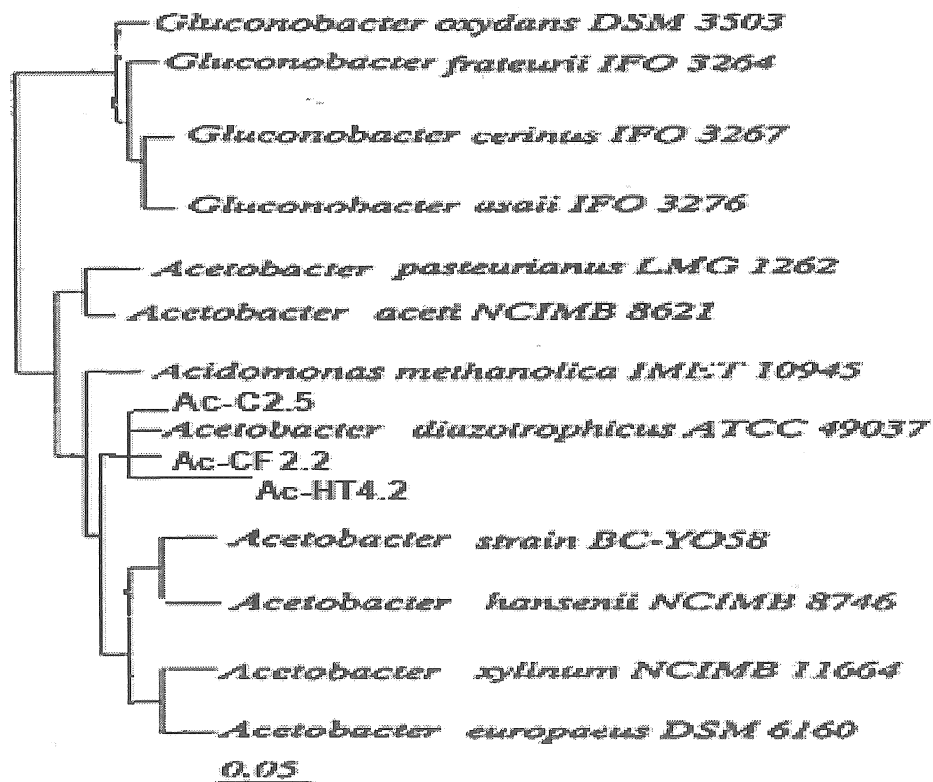
Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây chè, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần với tỷ lệ phần trăm theo khối lượng như sau:

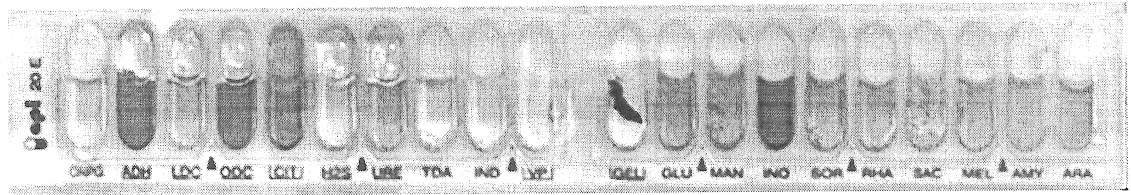
- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococcum* Ab-C11.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-C2.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum lipoferum* As-C1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus megaterium* VL-C12.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus awamori* ML-C2.6 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng chè có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 95% hỗn hợp chất mang, trong đó hỗn hợp chất mang là môi trường xốp vô trùng có chứa 1% nước đường nồng độ 25%.



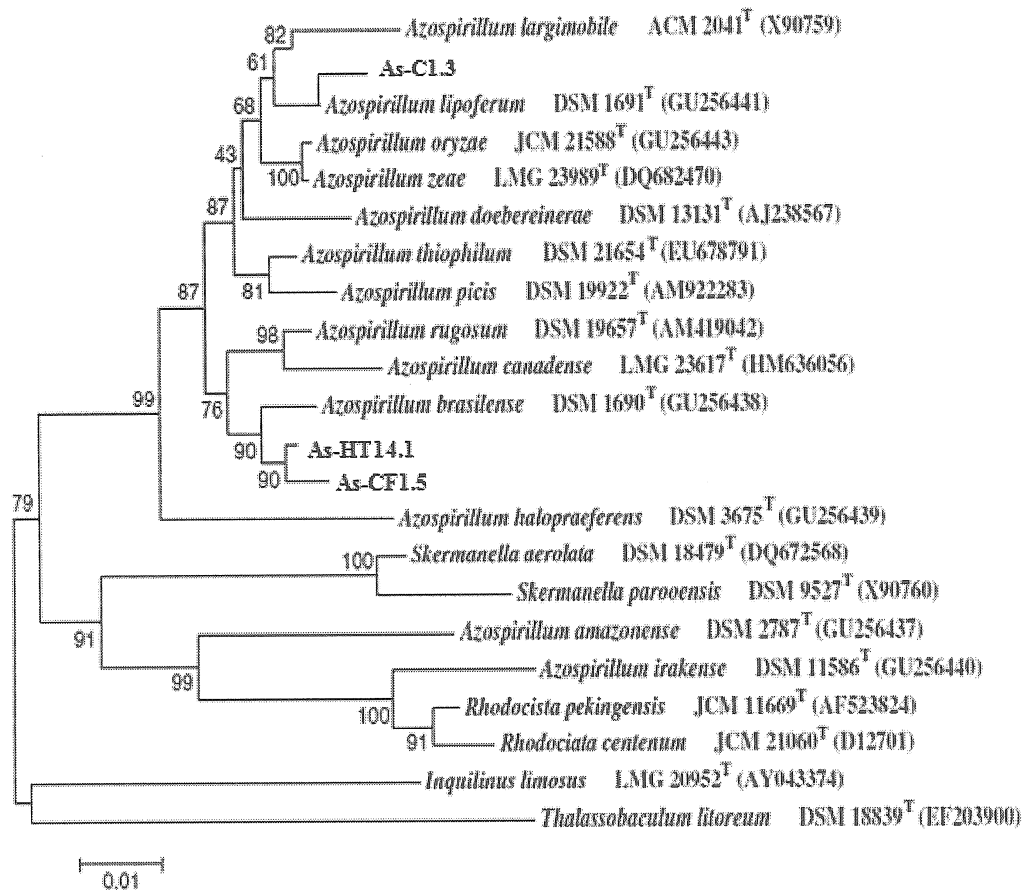
Hình 1



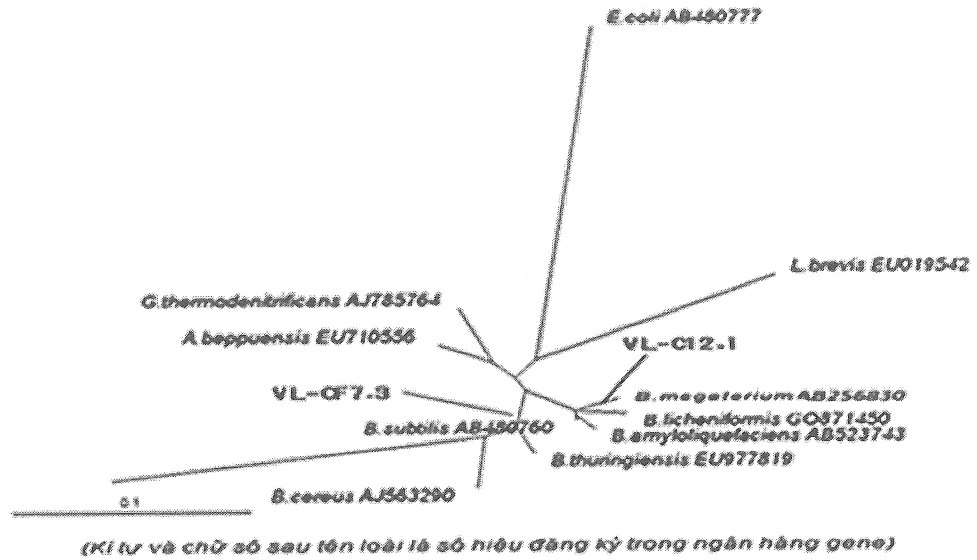
Hình 2



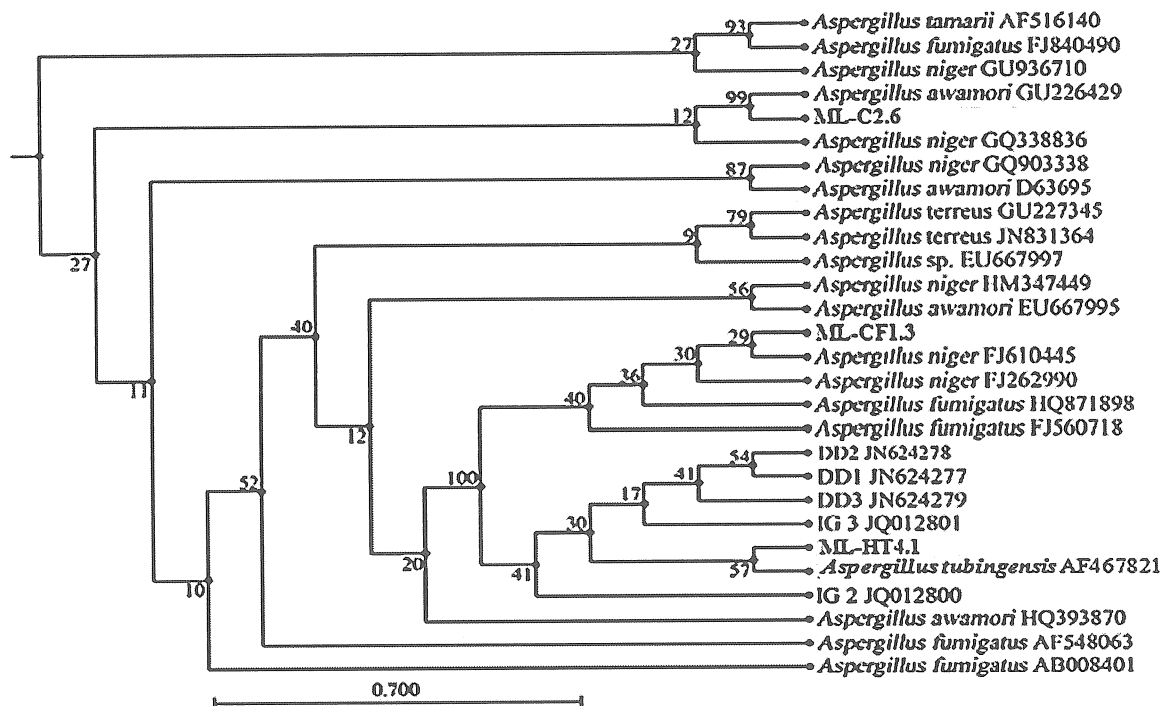
Hình 3



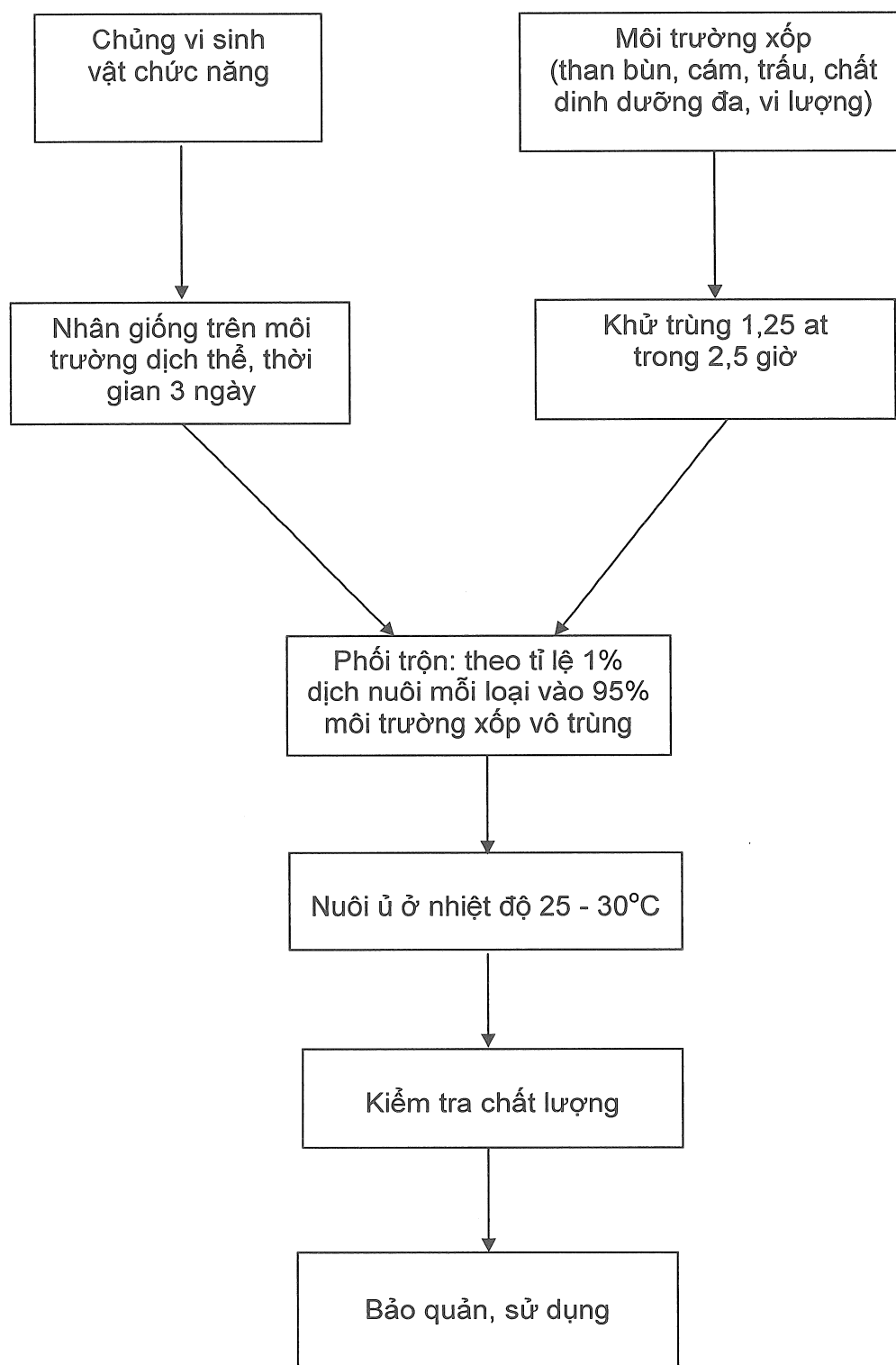
Hình 4



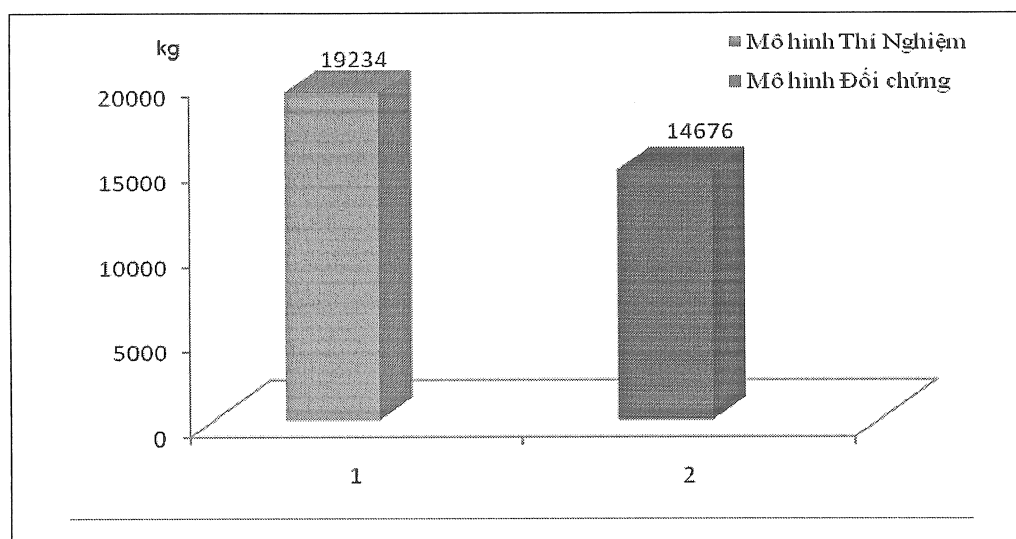
Hình 5



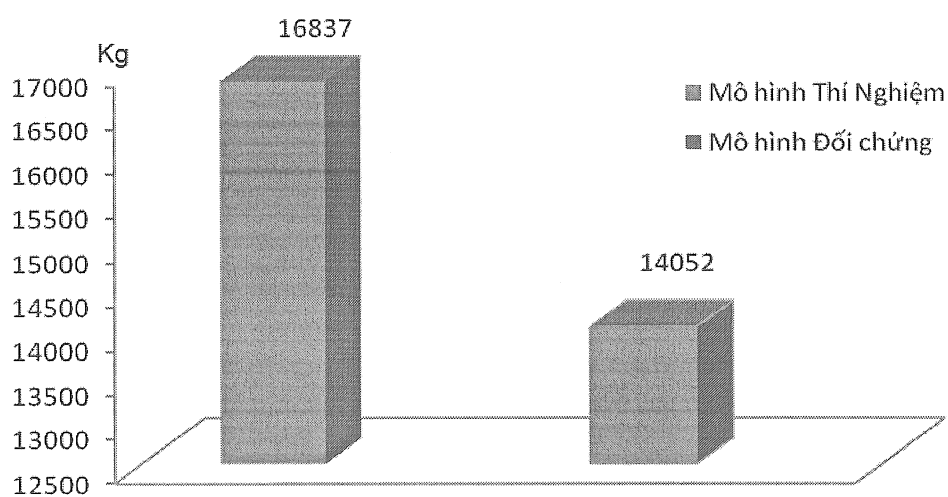
Hình 6



Hình 7



Hình 8



Hình 9