



(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)



**2-0002468**

(51)<sup>7</sup> **C12P 1/00; C05F 11/00**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00086

(22) 07/04/2015

(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); Hà Việt Sơn (VN).

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

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây cà phê (tên gọi là CAFE - HTD 01) bao gồm 5 chủng vi sinh được phân lập từ đất trồng cà phê gồm các chủng: *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2; *Azospirillum brasilense* As-CF1.5; *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 và *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3, 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 cà phê (tên viết tắt là CAFE-HTD 01) để sử dụng trong canh tác cây cà phê theo hướng phát triển bền vững.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Phân bón vi sinh 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. Phân vi sinh phải đảm bảo không gây ảnh hưởng xấu đến động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

Vi sinh vật được tuyển chọn cho việc sản xuất phân bón vi sinh là những vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu quả đối với đất và cây trồng.

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 của một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững, xanh sạch và an toàn.

Trong canh tác cây cà phê 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, phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm của Tập đoàn Quế Lâm, chế phẩm vi sinh FUSA – USA nhập khẩu từ Mỹ v.v.. Tuy nhiên, các 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 cà phê do đó khi được sử dụng để bón cho cây cà phê, hiệu quả đạt được không cao. Hiện nay, trên thị trường ở nước ta chưa có loại phân vi sinh nào chuyên dùng cho cây cà phê đặc biệt là có chứa các chủng vi sinh vật bản địa như các chủng phân giải lân, cố định đạm được phân lập từ chính đất trồng cà phê.

### 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 cà phê gồm đầy đủ các vi sinh vật chức năng thích hợp cho sự tăng trưởng của cây cà phê và được phân lập từ chính đất trồng cà phê. Chế phẩm vi sinh vật chức năng bao gồm các thành phần theo khối lượng như sau:

- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum brasilense* As-CF1.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê 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 *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2.
- Hình 2 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2.
- Hình 3 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5.
- Hình 4 là ảnh phân loại chủng VL-CF 7.3 dựa trên kit chuẩn API 50CHB;
- Hình 5 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng VL-CF7.3;
- Hình 6 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Aspergillus* ML-CF1.3
- Hình 7 là hình vẽ thể hiện sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa dùng cho cà phê trên môi trường xốp thanh trùng;
- Hình 8 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ đậu quả cà phê ở các công thức thí nghiệm
- Hình 9 là biểu đồ thể hiện số quả /3 đốt gần thân cà phê của các công thức thí nghiệm.
- Hình 10 là hình thái khuẩn lạc *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2 trên Ashby
- Hình 11 là hình thái khuẩn lạc của chủng *Acetobacter* sp. AC-CF 2.2 trên LGI
- Hình 12 là hình thái khuẩn lạc của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5 trên LGI
- Hình 13 là hình thái khuẩn lạc của chủng *Bacillus* sp. VL-CF 7.3
- Hình 14 là hình thái khuẩn lạc của chủng *Aspergillus tubingensis* ML-CF 1.3

### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

##### a. Nguồn gốc:

Phân lập từ đất trồng cây cà phê

##### b. Tên chủng:

*Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2; *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2; *Azospirillum* sp. As-CF 1.5; *Bacillus* sp. VL-CF 7.3; *Aspergillus* sp. ML-CF 1.3

##### c. Chức năng:

Các chủng vi sinh vật 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.

##### d. Đặc điểm phân loại:

Chủng *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2

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. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2 được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của chủng *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2

| Chủng                            | Hình thái khuẩn lạc trên Ashby                                                                                                           | Hình thái tế bào dưới kính hiển vi                                                                                                                                          | Gram | Bào tử |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|
| <i>Azotobacter</i> sp. Ab-CF 7.2 | Khuẩn lạc non màu trắng đục, lỏng, già màu nâu nhạt, nhầy, đàn hồi. Sắc tố không khuếch tán vào môi trường. Đường kính 2-5 mm (Hình 10). | Tế bào hình que kích thước 2 x 3 µm. Khi còn non có dạng tròn, 2 tế bào thường dính liền nhau thành hình số 8, có tiên mao, khi già tế bào có vỏ dày và tạo thành nang xác. | -    | -      |

Kết quả quan sát đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2 được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2

| TT | Đặc điểm         | Ab-CF7.2 |
|----|------------------|----------|
| 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, đextrin                            | +         |
| 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 glactoza                                                             | -         |
| 12 | Tạo H <sub>2</sub> 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-CF7.2 có đặc điểm giống với VK thuộc loài *A. chroococcum* (Khóa phân loại VK 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, chúng tôi đã giải trình tự gen 16S của các chủng nghiên cứu. Mức độ tương đồng nucleotit 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 VK *A. chroococcum*, với mức độ tương đồng 98,8%.

Như vậy dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng VK được nghiên cứu có tên phân loại là *A. chroococcum* Ab-CF7.2.

Chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2 được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2

| Chủng                               | Hình thái khuẩn lạc trên<br>LGI                                                                              | Hình thái tế bào<br>dưới kính hiển vi                                      | Gram | Bào<br>tử |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------|-----------|
| <i>Acetobacter</i><br>sp. Ac-CF 2.2 | Khuẩn lạc vàng, tròn nhỏ<br>đều đặn, đường kính 1,5<br>mm, bề mặt trơn bóng,<br>không sinh sắc tố (Hình 11). | Tế bào hình elip,<br>đứng đơn, kích<br>thước 0,8 x 1,2 µm.<br>Có tiên mao. | -    | -         |

Kết quả quan sát đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2 được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2

| TT | Đặc điểm                                                                                        | Ac-CF 2.2 |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1  | Hiếu khí bắt buộc, sinh trưởng nhanh                                                            | +         |
| 2  | Cố định nitơ trong điều kiện hiếu khí                                                           | +         |
| 3  | Khả năng di động                                                                                | +         |
| 4  | Phép thử catalaza                                                                               | +         |
| 5  | Khả năng oxyhoá                                                                                 | -         |
| 6  | Sinh axit từ glucoza, etanol                                                                    | +         |
| 7  | Sinh axit từ D-mannitol, D-sorbitol, I-propanol                                                 | -         |
| 8  | Khả năng đồng hóa etanol, glyxerol, 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 <sub>2</sub> S                                                                            | -         |
| 16 | Sinh enterotoxin                                                                                | -         |
| 17 | Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng                                                                 | 20-30°C   |
| 18 | pH cho sinh trưởng                                                                              | 5         |

Dựa trên một số đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2 (bảng 4) nhận thấy chủng VK có đặc điểm giống với VK thuộc loài *A. diazotrophicus*

(Khóa phân loại VK của Bergey). Để khẳng định thêm chúng tôi tiếp tục xác định trình tự gen 16S của các chủng VK nghiên cứu.

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

Kết quả giải trình tự gen của chủng *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2 (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 VK được nghiên cứu có tên phân loại là *A. diazotrophicus* Ac-CF 2.2.

Chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5

Phân loại theo đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5 được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Đặc điểm hình thái của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5

| Chủng                             | Hình thái khuẩn lạc trên LGI                                                | Hình thái tế bào dưới kính hiển vi                                                            | Gram | Bào tử |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|
| <i>Azospirillum</i> sp. As-CF 1.5 | Khuẩn lạc tròn đều, nhẵn, mép phẳng, màu hồng, đường kính 1,5 mm (Hình 12). | Tế bào có dạng que, đầu xoắn, kích thước 2,1 x 3,7 $\mu$ m. Trên môi trường dịch có tiên mao. | -    | -      |

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

Kết quả quan sát đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5 được thể hiện ở bảng 6.

Đặc điểm sinh hóa của chủng được xác định dựa trên kit chuẩn API 20NE

Bảng 6. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của chủng *Azospirillum* sp. As-CF 1.5

| TT | Đặc điểm                           | As-CF 1.5 |
|----|------------------------------------|-----------|
| 1  | Hiếu khí                           | +         |
| 2  | Cố định nitơ trong đ/k 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, glyxerol, D-gluconat, 2-ketogluconat, axit malic, D-riboza, D-sorbitol, D-xyloza                                     | +                      |
| 9  | Khả năng đồng hóa N-axetylglucosamin, L-arabitol, xenobioza, 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 <sub>2</sub> S                                                                                                                              | -                      |
| 18 | Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng                                                                                                                    | 22 - 37 <sup>0</sup> C |
| 19 | pH cho sinh trưởng                                                                                                                                 | 6 - 7                  |

Dựa trên một số đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa của VK *Azospirillum* nhận thấy chủng As-CF1.5 có đặc điểm giống với VK thuộc loài *A. brasilense* (Khóa phân loại VK của Bergey 1994).

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

Trong số những VK 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*.

Từ ADN tổng số, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi chúng tôi đã thu được gene mã hoá 16S rARN của chủng. Kết quả điện di đồ cho thấy sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S của chủng thu được 1 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 3) so sánh với trình tự các chủng được công bố trong Genbank cho thấy chủng As-CF1.5 có quan hệ gần với loài *A. brasilense* (mức độ tương đồng 97,8%).

Như vậy dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hóa và trình tự gen 16S rRNA, chủng nghiên cứu có tên phân loại là *A. brasiliense* As-CF1.5

Chủng *Bacillus* sp. VL-CF 7.3

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 VK được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Đặc điểm hình thái của chủng *Bacillus* sp. VL-CF 7.3

| Chủng                         | Hình thái khuẩn lạc trên LGI                                                                               | Hình thái tế bào dưới kính hiển vi                                                                                       | Gram | Bào tử |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|
| <i>Bacillus</i> sp. VL-CF 7.3 | Khuẩn lạc tròn, rìa răng cưa không đều, màu vàng xám, khi già nhẵn, màu hơi nâu, đường kính 3mm (Hình 13). | Tế bào hình que nhỏ, hai đầu tròn, kích thước 0,7-0,8 x 1,8-2,5 $\mu$ m, đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn. Có tiêm mao. | +    | +      |

Kết quả quan sát đặc điểm sinh lí các chủng *Bacillus* sp. VL-CF 7.3 được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Đặc điểm sinh lí của chủng *Bacillus* sp. VL-CF 7.3

| TT | Đặc điểm                        | VL-CF 7.3 |
|----|---------------------------------|-----------|
| 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 | 37°C      |
| 8  | pH cho sinh trưởng              | 7,0 - 7,4 |

Để định tên đến loài chúng tôi tiếp tục đánh giá các phản ứng sinh hóa của các chủng VK 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 VK thuộc chi *Bacillus* nên được phân loại theo kit sinh hóa API 50CHB, kết quả được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân giải lân VL-CF 7.3 dựa trên kit chuẩn API 20E

| TT | Đặc điểm                    | VL-CF 7.3 | TT | Đặc điểm             | VL-CF 7.3 |
|----|-----------------------------|-----------|----|----------------------|-----------|
| 1  | Sinh $\beta$ -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 | Hoạt tính gelatinaza | +         |
| 6  | Sinh H <sub>2</sub> 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 VK này. API 50CHB là kit dùng để nhận diện VK thuộc chi *Bacillus* và các chi gần với *Bacillus* về mặt di truyền dựa trên khả năng sử dụng các nguồn cơ chất. Phân loại được thực hiện dựa trên khả năng lên men 49 loại đường. Trong suốt quá trình nuôi cấy, chủng VK sử dụng cơ chất, lên men tạo thành axit làm giảm pH, được nhận biết bằng sự đổi màu chất chỉ thị (hình 4). Kết quả được trình bày ở bảng 10.

Bảng 10. Khả năng lên men sinh axit từ các nguồn cơ chất của chủng VK *Bacillus* phân giải lân VL-CF 7.3 dựa trên kit chuẩn API 50CHB

| TT | Đặc điểm              | VL-CF 7.3 | TT | Đặc điểm    | VL-CF 7.3 |
|----|-----------------------|-----------|----|-------------|-----------|
| 1  | Glyxerol              | ±         | 26 | Salixin     | -         |
| 2  | Erythritol            | -         | 27 | Xenlobioza  | +         |
| 3  | D-arabinoza           | -         | 28 | Maltoza     | -         |
| 4  | L- arabinoza          | ±         | 29 | Lactoza     | -         |
| 5  | Riboza                | -         | 30 | Melibioza   | +         |
| 6  | D-xyloza              | -         | 31 | Sucroza     | +         |
| 7  | L-xyloza              | -         | 32 | Trehaloza   | -         |
| 8  | Adonitol              | -         | 33 | Inulin      | -         |
| 9  | $\beta$ -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 | $\beta$ -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 | $\alpha$ -metyl-D-mannosit | - | 45 | D- arabitol          | - |
| 21 | $\alpha$ -metyl-D-glucosit | + | 46 | L- arabitol          | - |
| 22 | N-axetylglucosamin         | - | 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-CF7.3 có các đặc điểm sinh hoá gần nhất với *B. subtilis*, chỉ số xác định id  $\geq 90,8$  %. (% id - mức độ gần gũi liên quan với những đơn vị phân loại khác của cơ sở dữ liệu  $\geq 90,0$  % được cho là xác định tốt).

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

Trình tự của đoạn gene 16S rARN của chủng VL-CF 7.3 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 đoạn gene 16S rARN đã được thiết lập theo chương trình điện toán MEGA 2.1.

Kết quả phân tích cho thấy chủng VL-CF 7.3 có trình tự gần nhất với chủng *B. subtilis* AB480760, với mức độ tương đồng 99,2%.

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 VK của Bergey chủng VL-CF 7.3 được phân loại là *B. Subtilis*.

Chủng *Aspergillus* sp. ML-CF 1.3

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

thức 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. Kết quả quan sát 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-CF 1.3

| Chủng                                                                                 | ML-CF 1.3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hình thái khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên Czapek chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Khuẩn lạc tốc độ mọc nhanh, kích thước 5-5,5 cm</li> <li>- Khuẩn lạc ăn sâu, bám chặt vào môi trường, bề mặt nhẵn nheo, rìa trắng.</li> <li>- Không hình thành giọt tiết</li> <li>- Màu sắc: Mặt phải sợi nấm màu trắng, ở giữa có các hạt bào tử dày màu đen, mặt trái màu trắng.</li> <li>- Sắc tố không khuếch tán vào môi trường</li> </ul> (Hình 14)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hình thái bào tử dưới kính hiển vi                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bông hình cầu, tỏa tia rất đều khi non và xé rách tạo dạng cột khi già. Kích thước 150-200 <math>\mu\text{m}</math>.</li> <li>- Cuống không màu, bề mặt cuống nhẵn, có màu nâu gần sát bông. Cuống có đặc trưng dài vượt trội trong số các loài thuộc chi <i>Aspergillus</i>. Kích thước (1200-1950) x (11-112,5)</li> <li>- Bông hình cầu, kích thước 17-30 <math>\mu\text{m}</math>. Vùng sinh sản khắp mặt bông.</li> <li>- Thể bình một tầng là chủ yếu. Đặc biệt bông lớn 2 thể bình, bông nhỏ 1 thể bình, đôi khi có cả 2 loại thể bình trên cùng 1 bông. Thể bình 1 tầng hình chai, kích thước (7-8,75) x (3,75-5). Thể bình 2 tầng: Lớp 1 hình trụ dài, kích thước (7,5-11) x (3,75-7,5) <math>\mu\text{m}</math>. Lớp 2 hình chai, kích thước 12,5 x (3,75-7,5) <math>\mu\text{m}</math>.</li> <li>- Bào tử đính hình cầu, màu đen, bề mặt có gai mịn, khi già gai trở nên xù xì.</li> <li>- Bào tử có kích thước lớn (5-7) <math>\mu\text{m}</math>.</li> </ul> |
| Nhiệt độ opt                                                                          | 25 - 30°C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Có khả năng đồng hóa                                                                  | Arabinoza, maltoza, sucroza, xyloza, glucoza, mannitol, tinh bột tan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Khả năng sinh enzym                                                                   | Amylaza, proteaza, pectinaza                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sinh axit                                                                             | +                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

Căn cứ vào kết quả khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc 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-CF1.3 có đặc điểm giống với nấm sợi thuộc loài *A. tubingensis*.

Chúng tôi tiếp tục phân loại sâu hơn dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử để định danh chính xác các loài nấm mốc.

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

Trình tự của đoạn gene 28S rARN của 3 chủng vi nấm ML-CF1.3 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-CF1.3 có trình tự gần nhất với chủng *A. tubingensis* CBS134456C với mức độ tương đồng 99%. 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. tubingensis* ML-CF1.3

e. Độ an toàn sinh học của các chủng VSV:

Độ an toàn sinh học của các chủng VSV 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 VSV ở cấp độ 1 được ứng dụng trong sản xuất.

Kết quả xác định mức độ an toàn của các chủng VSV được tập hợp trong bảng 12. Cả 5 chủng VSV đều được xếp vào mức độ an toàn cấp 1 vì vậy có thể ứng dụng các chủng VSV hữu ích này cho sản xuất phân vi sinh đa chức năng trong điều kiện bình thường.

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-CF 7.2     | <i>Azotobacter chroococum</i>     | Cấp độ 1       |
| 2  | Ac-CF2.2      | <i>Acetobacter diazotrophicus</i> | Cấp độ 1       |
| 3  | As-CF1.5      | <i>Azospirillum brasilense</i>    | Cấp độ 1       |
| 4  | VL-CF7.3.     | <i>Bacillus subtilis</i>          | Cấp độ 1       |
| 5  | ML-CF1.3      | <i>Aspergillus tubingensis</i>    | Cấp độ 1       |

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

Các chủng vi sinh vật được chọn từ bộ sưu tập giống vi sinh vật được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ vật liệu sinh học của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### Phương pháp sản xuất chế phẩm CAFE-HTD 01 (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 cà phê (chế phẩm CAFE-HTD 01) 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 chroococum* Ab-CF 7.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2; *Azospirillum brasilense* As-CF1.5; *Bacillus subtilis* VL-CF7.3; *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3) 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 CAFE-HTD 01 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 cà phê thu được theo phương pháp như trên chứa:

- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum brasilense* As-CF1.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê 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%.

Chế phẩm được sản xuất theo nguyên tắc 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,  $\text{CaCO}_3$  v.v.. Các chủng VSV 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 thanh trùng, vì vậy các chủng này được lựa chọn để đưa vào sản xuất chế phẩm VSV đa chức năng. Trong các loại chế phẩm VSV 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 chứa trong túi polyethylen, bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng (đạt mật độ theo tiêu chuẩn ngành Nông nghiệp TCN 6167-1997), tránh ánh sáng trực tiếp. Hoạt tính sinh học của các chủng cũng không bị mất đi sau thời gian bảo quản.

Chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm vi sinh vật chức năng cho cây cà phê

Chế phẩm được tối ưu hoá thành phần và điều kiện nuôi cấy để mật độ vi sinh đạt từ  $10^7$  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. Kết quả xác định số lượng vi sinh vật trong chế phẩm theo thời gian bảo quản được trình bày ở bảng 13.

Khi nghiên cứu khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm chúng tôi nhận thấy chúng 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.

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

| Chủng VSV           | Mật độ VSV trong chế phẩm ( $\times 10^9$ CFU/g) |         |         |         |         |         |         |
|---------------------|--------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                     | 1 tuần                                           | 1 tháng | 2 tháng | 3 tháng | 4 tháng | 5 tháng | 6 tháng |
| <i>Azotobacter</i>  | 0,35                                             | 1,1     | 1,2     | 1,25    | 1,1     | 1,05    | 0,85    |
| <i>Azospirillum</i> | 1,3                                              | 5,5     | 3,5     | 3,5     | 2,1     | 1,5     | 1,2     |

|                              |      |      |     |     |     |     |     |
|------------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Acetobacter</i>           | 0,85 | 2,75 | 3,2 | 2,1 | 1,7 | 1,6 | 1,2 |
| VSV phân giải<br>lên tổng số | 1,9  | 7,5  | 5,5 | 5,6 | 4,2 | 3,5 | 1,2 |

### 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 CAFE-HTD 01)

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 chroococum* Ab-CF 7.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2; *Azospirillum brasilense* As-CF1.5; *Bacillus subtilis* VL-CF7.3; *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3 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  $10^7$ - $10^9$  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  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$  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 nuôi cấy 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 $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ 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 chroococum* Ab-CF 7.2 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Azospirillum brasilense* As-CF1.5 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g dịch nuôi;
- 10 kg dịch nuôi cấy *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3 có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g dịch nuôi; và
- 950 kg hỗn hợp chất mang (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 CAFE-HTD 01 trong canh tác cà phê theo hướng phát triển bền vững

Để đánh giá tác dụng của chế phẩm vi sinh vật chức năng CAFE-HTD 01, chế phẩm này đã được sử dụng vào quá trình canh tác cây cà phê theo hướng phát triển bền vững tại Tây Nguyên. Thí nghiệm bao gồm các công thức như sau:

- Công thức Đối chứng: Sử dụng phân bón cho cây cà phê theo tập quán canh tác thông thường của nông dân;
- Công thức Thí nghiệm 1: Bón phân và chăm sóc theo quy trình của ngành nông nghiệp 10TCN 478-2001 và cẩm nang khuyến nông của sở nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk.
- Công thức Thí nghiệm 2: Giảm 25% lượng phân hóa học; sử dụng VSVCN CAFE-HTD 01, chế phẩm vi sinh xử lý phế thải và thuốc trừ sâu thảo mộc Anisaf SH-01. Điểm mấu chốt của thí nghiệm 2 là giảm phân bón hóa học thay bằng chế phẩm

VSVN CAFE-HTD 01, chế phẩm vi sinh xử lý phế thải; sử dụng thuốc trừ sâu thảo mộc Anisaf SH-01 phun dự phòng nhằm hạn chế sâu bệnh và giảm thuốc hóa học.

Thí nghiệm được triển khai tại xã EaKao và xã Hòa Thắng, thành phố Buôn Ma Thuột, thời gian thực hiện thí nghiệm từ năm 2013-2014. Diện tích công thức thí nghiệm 1 là 1ha; công thức thí nghiệm 2 là 4ha, công thức đối chứng là 1ha.

Lượng phân bón và chế phẩm sử dụng trong các thí nghiệm canh tác cà phê được mô tả ở bảng 15.

Bảng 15. Sử dụng chế phẩm VSVN CAFE-HTD 01 nhằm giảm bón phân trong canh tác cà phê (Áp dụng cho cây cà phê đang trong thời kỳ kinh doanh, tính trên 1ha)

| Thời gian tác động | Nguyên vật liệu (Tính theo lượng phân thương phẩm) | Thí nghiệm 2                                 | Thí nghiệm 1                | So sánh giữa thí nghiệm 1 và Thí Nghiệm 2 |
|--------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| Tháng 2            | Phân hữu cơ vi sinh EAKMAT                         | 750kg                                        | 1.500 kg                    | Giảm 50%                                  |
| Tháng 3            | Phân SA                                            | 187,5 kg                                     | 250 kg                      | Giảm 25%                                  |
| Tháng 5            | N (Urê)                                            | 100 kg                                       | 135 kg                      | Giảm 25%                                  |
|                    | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Lân nung chảy)      | 412 kg                                       | 550 kg                      | Giảm 25%                                  |
|                    | K <sub>2</sub> O (Kaliclorua)                      | 90 kg                                        | 120 kg                      | Giảm 25%                                  |
|                    | Phân hữu cơ (bón lót) 15 m <sup>3</sup> /ha        | Ủ phế thải đồng ruộng + Vixura + Trichodesma | Ủ phân chuồng + Trichodesma |                                           |
|                    | Chế phẩm vixura                                    | 30 kg                                        | 0                           | Thêm 30kg                                 |
|                    | Chế phẩm Trichodesma                               | 37                                           | 75 kg ủ với phân chuồng     | Giảm 50%                                  |
|                    | Chế phẩm VSVN CAFE-HTD 01                          | 30 kg                                        |                             | Thêm 30 kg                                |
| Tháng 7            | N (Urê)                                            | 135 kg                                       | 180 kg                      | Giảm 25%                                  |
|                    | K <sub>2</sub> O (Kaliclorua)                      | 90 kg                                        | 120 kg                      | Giảm 25%                                  |
| Tháng 9            | N (Urê)                                            | 100 kg                                       | 135 kg                      | Giảm 25%                                  |
|                    | K <sub>2</sub> O (Kaliclorua)                      | 120 kg                                       | 160 kg                      | Giảm 25%                                  |
| Tổng cộng          | Phân hữu cơ VS Eakmat                              | 750 kg                                       | 1.500 kg                    | Giảm 50%                                  |
|                    | Phân hữu cơ (bón lót)                              | 15 m <sup>3</sup> /ha                        |                             |                                           |
|                    | SA (kg/ha)                                         | 187,5 kg                                     | 250kg                       | Giảm 25%                                  |
|                    | Urê (kg/ha)                                        | 335 kg                                       | 450kg                       | Giảm 25%                                  |
|                    | Lân nung chảy (kg/ha)                              | 412kg                                        | 550kg                       | Giảm 25%                                  |
|                    | Kaliclorua (kg/ha)                                 | 300 kg                                       | 400kg                       | Giảm 25%                                  |
|                    | Chế phẩm VSVN CAFE-HTD 01 (kg/ha)                  | 30 kg                                        | 0                           | Thêm                                      |

|  |                                              |       |       |          |
|--|----------------------------------------------|-------|-------|----------|
|  | Chế phẩm vixura phân hủy phế thải đồng ruộng | 30 kg | 0     | Thêm     |
|  | Chế phẩm Trichodesma                         | 37    | 75 kg | Giảm 50% |

Bảng 16. Quy trình tưới thuốc Anisaf SH-01 trong mô hình thử nghiệm cà phê

| Thời gian tác động | Nguyên vật liệu      | Lượng tưới năm 2013 (lit/ha) | Lượng tưới năm 2014 (lit/ha) | Tưới duy trì hàng năm (lit/ha) |
|--------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Tháng 2            | Anisaf SH-01 (lít)   | 35                           | 25                           | 20                             |
| Tháng 5            | Anisaf SH-01 (lít)   | 35                           | 25                           | 20                             |
| Tháng 6            | Anisaf SH-01 (lít)   | 30                           | 24                           | 20                             |
| Tháng 8            | Anisaf SH-01 (lít)   | 30                           | 20                           | 15                             |
| Tháng 9            | Anisaf SH-01 (lít)   | 30                           | 20                           | 15                             |
| Tổng cộng          | Anisaf SH – 01 (lít) | 160                          | 114                          | 90                             |

Sự sinh trưởng và phát triển của cây cà phê của mô hình thí nghiệm:

\*Số cặp lá mới mọc/cành: Đã tiến hành theo dõi số cặp lá mới mọc ra trên đoạn cành dài 50cm (tính từ đỉnh sinh trưởng của cành vào thân) của các cây cà phê ở các thí nghiệm nghiên cứu; mỗi cây cà phê chọn 4 cành có sự sinh trưởng tương đối đồng đều nhau và ở 4 hướng khác nhau để theo dõi (bảng 17).

Bảng 17: Trung bình số cặp lá mới mọc/cành qua các tháng theo dõi

| Thời gian theo dõi | Trung bình số cặp lá/cành |       |       | Trung bình số cặp mới mọc /cành |      |      |
|--------------------|---------------------------|-------|-------|---------------------------------|------|------|
|                    | ĐC                        | TN1   | TN2   | ĐC                              | TN1  | TN2  |
| 3/2013             | 6,49                      | 6,58  | 8,02  |                                 |      |      |
| 5/2013             | 9,85                      | 10,49 | 11,85 | 3,36                            | 3,91 | 3,83 |
| 7/2013             | 11,35                     | 12,62 | 14,53 | 4,86                            | 6,04 | 6,51 |
| 9/2013             | 11,83                     | 12,22 | 14,98 | 5,34                            | 6,24 | 6,96 |

Kết quả bảng 17 cho thấy:

- Số cặp lá mới mọc/cành ở công thức thí nghiệm 1 và 2 luôn cao hơn công thức đối chứng qua các tháng theo dõi.
- Số cặp lá mới mọc ra/cành tăng nhiều nhất vào tháng 5-7.
- Nhận xét về màu sắc lá: ở công thức thí nghiệm 2 cây cà phê có lá xanh, bóng và mượt hơn so với công thức thí nghiệm 1 và công thức đối chứng.

\* Sự tăng trưởng chiều dài cành: Tiến hành đo chiều dài cành (cm) tính từ đỉnh sinh trưởng vào thân cây của 30 cây cà phê ở mỗi công thức thí nghiệm; mỗi cây đo trên 4 cành ở 4 hướng khác nhau; sự tăng trưởng của chiều dài cành được tính như sau: Sự

tăng trưởng chiều dài cành = Chiều dài cành tại tháng theo dõi - Chiều dài cành của tháng trước (bảng 18).

Bảng 18: Sự tăng trưởng chiều dài cành qua các tháng theo dõi

| Thời gian theo dõi | Chiều dài cành (cm) |       |       | Sự tăng trưởng chiều dài cành (cm) |       |       |
|--------------------|---------------------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|
|                    | ĐC                  | TN1   | TN2   | ĐC                                 | TN1   | TN2   |
| 3/2013             | 70,21               | 63,25 | 72,71 |                                    |       |       |
| 4/2013             | 73,2                | 67,46 | 77,94 | 2,99                               | 4,21  | 5,23  |
| 5/2013             | 74,93               | 70,48 | 82,33 | 4,72                               | 7,23  | 9,6   |
| 6/2013             | 77,67               | 73,54 | 85,74 | 7,46                               | 10,29 | 13,03 |
| 7/2013             | 81,83               | 76,38 | 88,44 | 11,62                              | 13,13 | 15,73 |
| 8/2013             | 82,79               | 78,65 | 90,02 | 12,58                              | 15,4  | 17,31 |
| 9/2013             | 83,22               | 79,75 | 91,07 | 13,01                              | 16,5  | 18,36 |

Kết quả bảng 18 cho thấy:

- Sự tăng trưởng chiều dài cành ở công thức thí nghiệm 2 luôn cao hơn công thức thí nghiệm 1 và công thức đối chứng qua các tháng theo dõi.

\* Các yếu tố cấu thành năng suất

Chúng tôi đã tiến hành theo dõi các chỉ tiêu như: tỷ lệ đậu quả, số đốt mang quả/cành, số quả/3 đốt gần thân của cây cà phê tại các công thức thí nghiệm vào thời kỳ ra hoa, thời kỳ quả non và quả chắc (thời gian cụ thể là tháng 3-8 hàng năm), các kết quả thu được như sau:

- Tỷ lệ đậu quả (hình 8): Các kết quả thu được cho thấy tỷ lệ đậu quả ở công thức thí nghiệm 2 và công thức đối chứng cao hơn công thức thí nghiệm 1.

- Số đốt mang quả/cành (bảng 19):

Bảng 19: Số đốt mang quả /cành qua các tháng theo dõi

| Thời gian theo dõi | Số đốt mang quả/cành |      |      |
|--------------------|----------------------|------|------|
|                    | ĐC                   | TN1  | TN2  |
| 4/2013             | 9,33                 | 6,55 | 8,92 |
| 5/2013             | 9,12                 | 6,40 | 8,67 |
| 6/2013             | 8,98                 | 6,20 | 8,62 |
| 7/2013             | 8,72                 | 5,98 | 8,47 |
| 8/2013             | 8,58                 | 5,62 | 8,68 |

Kết quả ở bảng 19 cho thấy: công thức thí nghiệm 2 và công thức đối chứng có số đốt mang quả/cành cao hơn công thức thí nghiệm 1.

- Số quả /3 đốt gần thân: Kết quả ở hình 9 cho thấy công thức thí nghiệm 1 và 2 có số quả/3 đốt gần thân (theo dõi ở thời kỳ quả chắc) cao hơn so với công thức đối chứng.

\* Năng suất thực thu tại các công thức thí nghiệm

Bảng 20: Năng suất thực thu năm 2013 & 2014 tại các công thức thí nghiệm

| TT                                           | ĐC         | TN1                               | TN2                            |
|----------------------------------------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Năng suất thực thu năm 2013                  | 2,8 tấn/ha | 3,15 tấn/ha                       | 3,2 tấn/ha                     |
| So sánh NS giữa MH thí nghiệm với MH đại trà |            | Hơn: 0,315 tấn<br>Tăng hơn: 12,5% | Hơn: 0,4 tấn<br>Tăng hơn 14,2% |
| Năng suất thực thu năm 2014                  | 2,5 tấn/ha | 2,8 tấn/ha                        | 3,05 tấn/ha                    |
| So sánh NS giữa MH thí nghiệm với MH đại trà |            | Hơn: 0,3 tấn<br>Tăng hơn: 12%     | Hơn: 0,55 tấn<br>Tăng hơn 22%  |

Kết quả ở bảng 20 cho thấy: Công thức thí nghiệm 2 có năng suất thực thu cao nhất, sau đó là đến công thức thí nghiệm 1 và thấp nhất là ở công thức đối chứng. Năng suất ở công thức thí nghiệm 2 tăng so với công thức đối chứng là: 0,4 tấn/ha (tăng hơn 14,2%) năm 2013 và 0,55 tấn/ha (tăng hơn 22%) năm 2014.

**Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

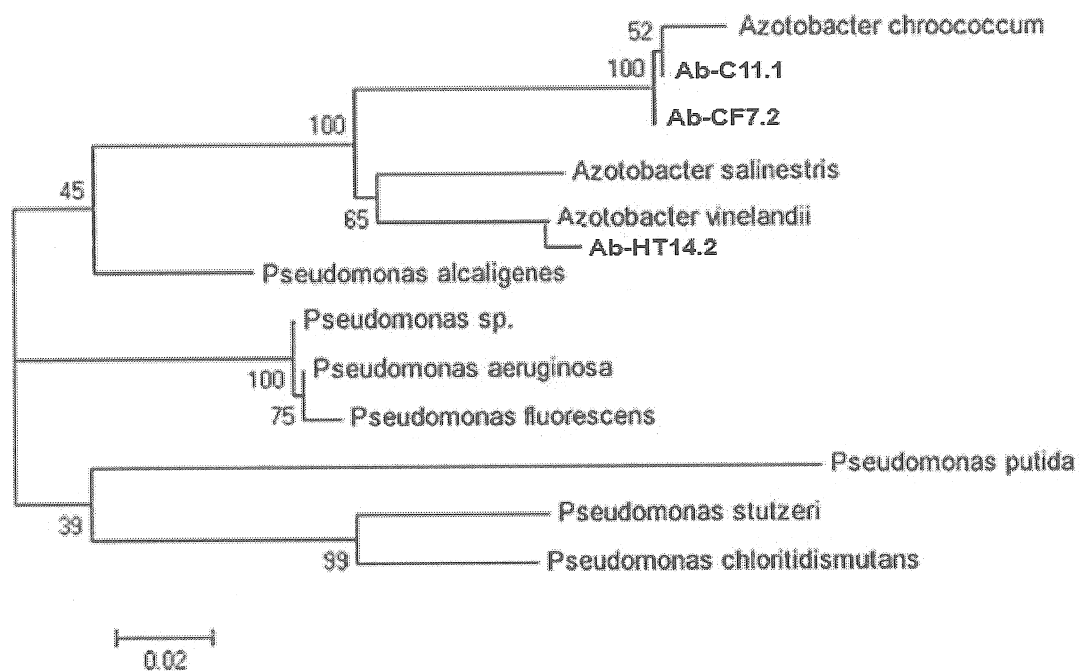
Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây cà phê theo giải pháp hữu ích được dùng cho cây cà phê theo hướng phát triển bền vững với khả năng cải tạo đất, phù hợp với chế độ sinh trưởng của cây cà phê, giúp giảm lượng phân hóa học, tăng năng suất cây trồng.

Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây cà phê 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.

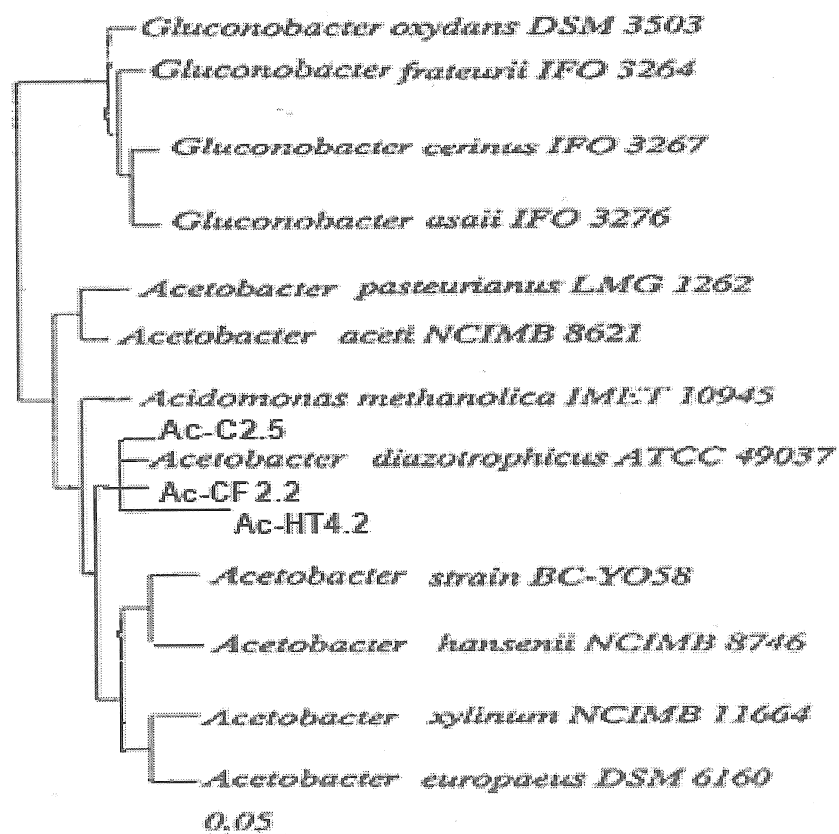
### Yêu cầu bảo hộ

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

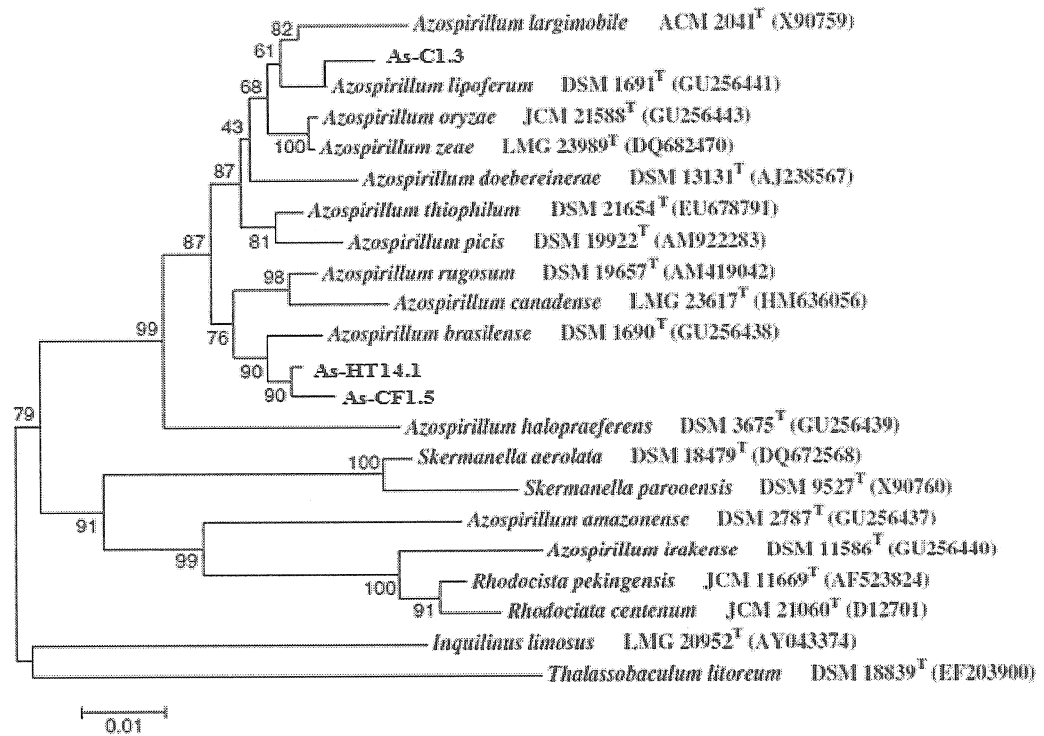
- 1% dịch nuôi cấy *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Azospirillum brasilense* As-CF1.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn  $10^7$  CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê 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%.



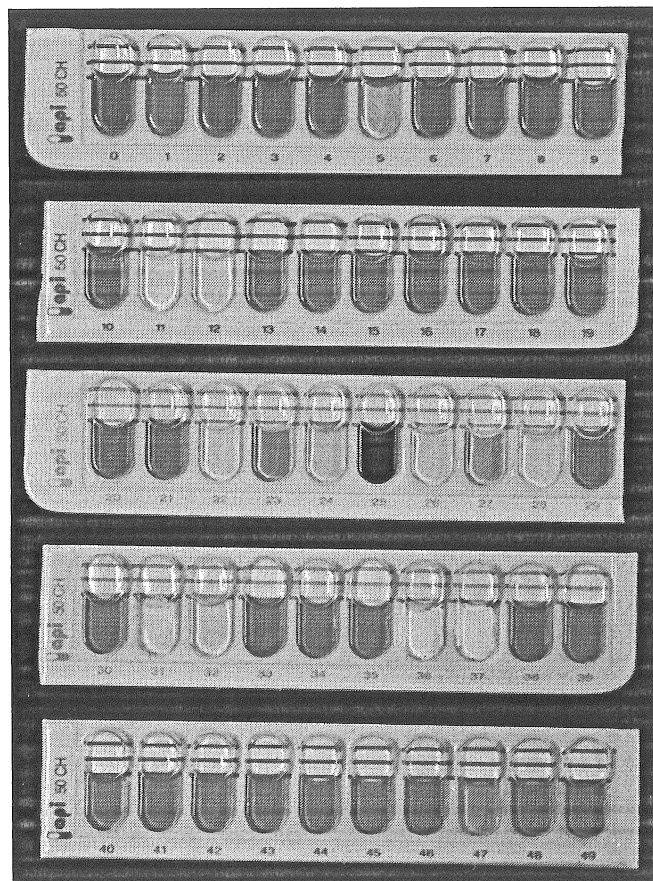
Hình 1



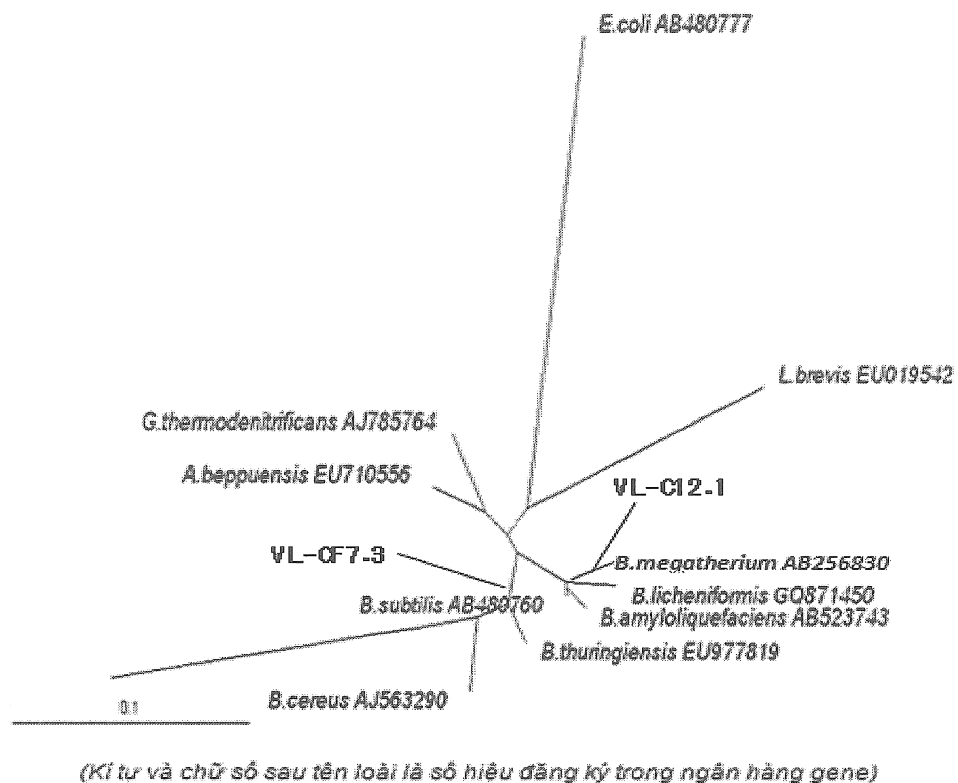
Hình 2



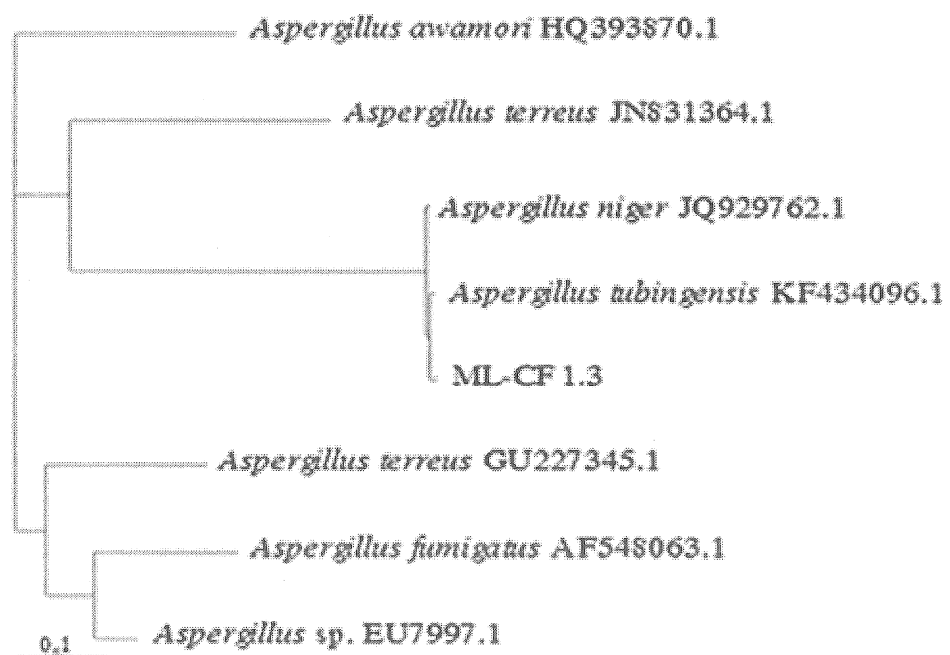
Hình 3



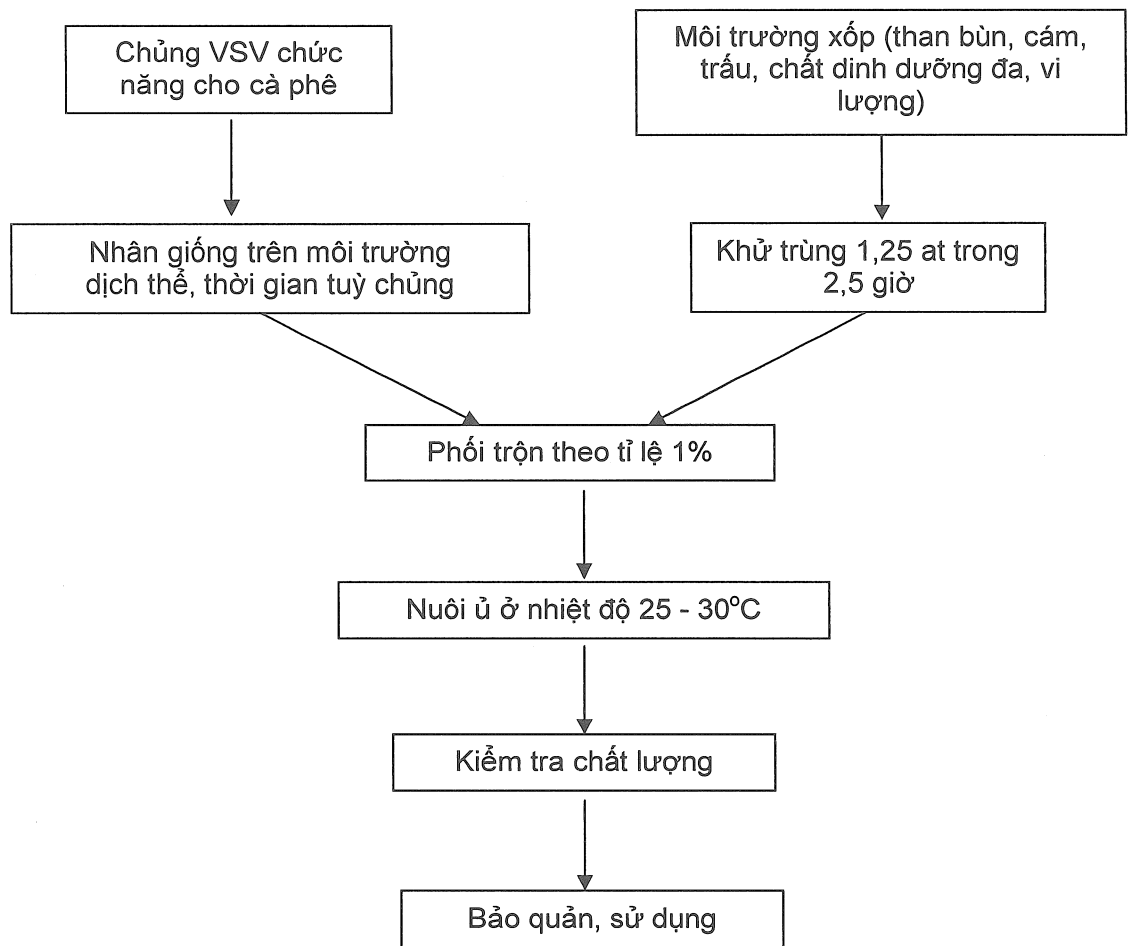
Hình 4



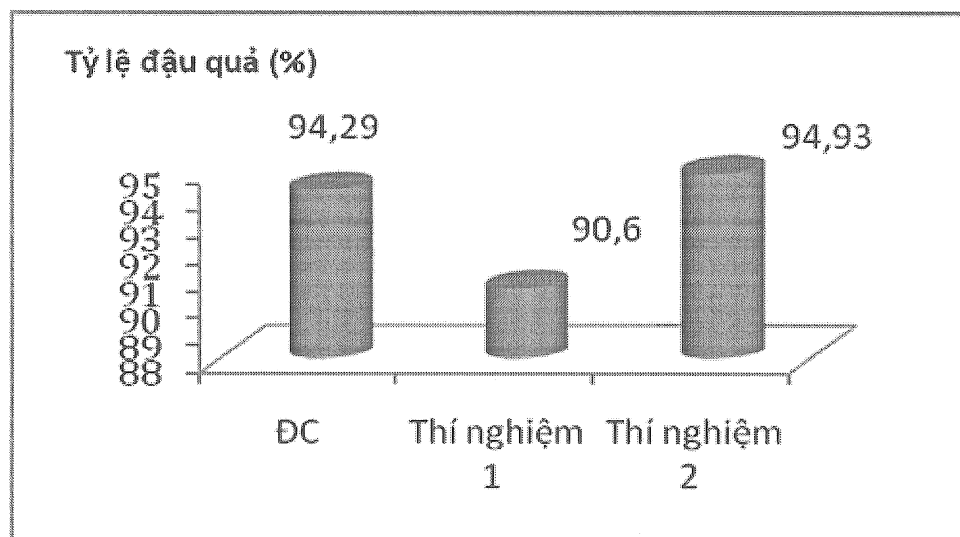
Hình 5



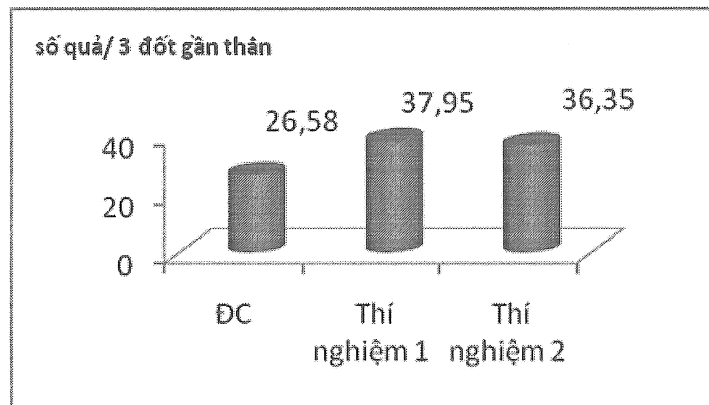
Hình 6



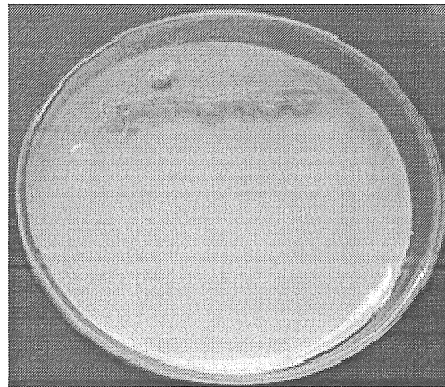
Hình 7



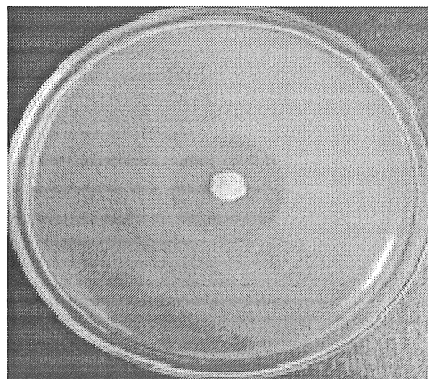
Hình 8



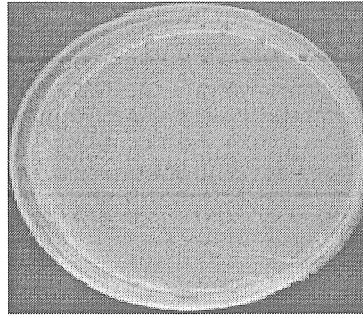
Hình 9



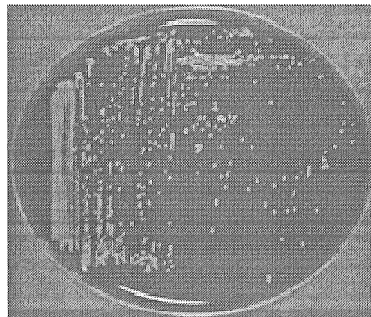
Hình 10



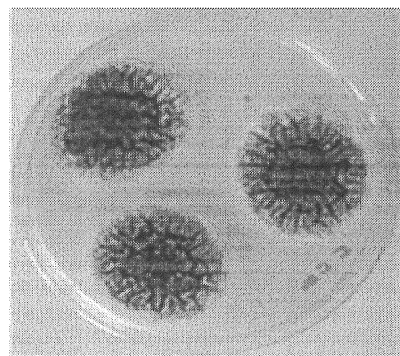
Hình 11



Hình 12



Hình 13



Hình 14