



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0032331

(51)⁷ C05F 11/08; A01N 63/00; A61K 9/16

(13) B

(21) 1-2015-02457

(22) 07/07/2015

(45) 25/06/2022 411

(43) 27/06/2016 339A

(73) DOVERFIELD EXPORTS-UAE (AE)

Post Box No. 9074, Saif Zone, Sharjah, UAE

(72) Francis Couture (CA); Muhammad Arshad (PK).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN BÓN ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG, VÀ CHẾ PHẨM CHỨA VI KHUẨN THỨC ĐẨY SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÂY TRỒNG ĐỂ BỔ SUNG VÀO PHÂN BÓN LÓT

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất phân bón được tăng cường. Theo quy trình này đưa dạng tiềm tàng của vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng vào phân bón lót. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập nói chung là đến phân bón được tăng cường và các phương pháp sản xuất phân bón này, đặc biệt là phân khoáng được tăng cường bằng vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (plant growth promoting bacteria -PGPB).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự tăng trưởng của cây trồng cần các dưỡng chất như là phospho (P), nitơ (N), kali (K), canxi (Ca), magie (Mg), lưu huỳnh (S), bo (B), đồng (Cu), sắt (Fe), mangan (Mn), molybden (Mo), và kẽm (Zn). Trong nền nông nghiệp hiện đại, các dưỡng chất này thường được đưa vào trong đất dưới dạng phân tổng hợp/phân khoáng. Tuy nhiên, các phân khoáng đối mặt với vấn đề là hiệu quả sử dụng với cây trồng kém khi được bón vào đất. Ví dụ, lên đến 60% phân nitơ bón vào đất có thể bị thất thoát do sự bay hơi dưới dạng NH_3 , do sự khử NO_3 , hoặc do sự khử nitơ. Tương tự, đối với phân phospho, lên đến 70-80% lượng phân bón vào đất có thể bị cố định hoặc bị kết tủa trong tầng đất và không thể hấp thụ dễ dàng bởi cây trồng.

Trong những năm gần đây, những loại vi sinh vật nhất định cải thiện sự tăng trưởng của cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau đã được công bố. Các vi sinh vật này thường được gọi là vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (PGPB). PGPB tăng cường sự tăng trưởng của cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm cố định nitơ trong khí quyển, hòa tan các khoáng chất chứa dưỡng chất như là phospho, sản sinh ra hormon thực vật, và sản sinh ra đại thực bào chứa sắt, ACC deaminaza, chitinaza, và/hoặc sự ức chế bệnh. Ví dụ, vi khuẩn thuộc các nhóm *Bacillus*, và *Pseudomonas* hữu ích trong việc hòa tan phospho. Vi khuẩn nhất định cung cấp N_2 trong khí quyển cho cây trồng thông qua các mối quan hệ cộng sinh (ví dụ, vi khuẩn nốt sần rhizobia -cây họ đậu) hoặc mối quan hệ hội sinh (ví dụ, *Azotobacter*, *Azospirillum* & *Clostridium*).

Chế phẩm hoặc sản phẩm dạng lỏng dựa trên chất mang hữu cơ chứa PGPB đang sống thường được đề cập đến như là phân sinh học. Phân sinh học có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các vi sinh vật có ích đã được kiểm thử được phân lập từ môi trường tự nhiên, được tinh sạch và được nhân rộng với sự có mặt của cơ chất đặc hiệu để duy trì mật độ cao của quần thể vi khuẩn. Các phân sinh học này được sử dụng để xử lý hạt giống, ủ với rế hoặc để bón vào đất nhằm tăng cường quần thể vi khuẩn đã chọn lọc ở vùng rế sau đó cải thiện sự tăng trưởng của cây trồng. Tuy nhiên, phân sinh học không được sử dụng rộng rãi do một số giới hạn hoặc hạn chế. Một trong những hạn chế là PGPB thường cần phải được đưa vào qua sự ủ với hạt giống hoặc hoặc sự tưới phân hạt giống, cả hai đều tốn kém về mặt kinh tế và tốn kém về sức lao động. Một hạn chế khác là PGPB hoặc phân sinh học thường có thời hạn sử dụng giới hạn và có thể mất hiệu lực nhanh chóng sau khi được tạo ra. Hơn nữa, việc cất giữ PGPB hoặc phân sinh học thường yêu cầu các điều kiện đặc biệt, làm giới hạn việc sử dụng chúng.

Do đó, đòi hỏi phải có các phân bón khắc phục các giới hạn và hạn chế nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất phân khoáng hiệu quả cao thông qua sự tăng cường bằng vi khuẩn đặc hiệu thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (PGPB), trong đó sự có mặt của PGPB mới trong phân khoáng làm tăng cường hiệu quả sử dụng phân bón. Các phân bón được tăng cường bằng PGPB này có độ bền cao và duy trì hiệu lực của chúng trong quá trình vận chuyển hoặc cất giữ dưới các điều kiện thông thường.

Sáng chế cũng đưa ra phương pháp tạo ra hỗn hợp khoáng chất và phân sinh học để sử dụng hiệu quả cả hai. Phương pháp này bao gồm các bước nuôi cấy các dòng vi khuẩn chọn lọc, điều chỉnh dịch nuôi cấy vi sinh vật này đến nhiệt độ trong khoảng từ 25°C đến 45°C và giá trị độ pH là trong khoảng từ 3,8 đến 9, và thấm dịch nuôi cấy vi sinh vật này vào phân bón lót, ví dụ, phân khoáng.

Theo một khía cạnh của phương án thuộc sáng chế, dịch nuôi cấy vi sinh vật này thu được bằng cách xác định vi khuẩn được bao gồm trong dịch nuôi cấy vi sinh vật, tinh sạch vi khuẩn này, và lên men vi khuẩn này trong dịch nuôi cấy vi sinh vật nêu trên để đạt đến nồng độ xác định trước. Vi khuẩn này có thể chứa enzym 1-aminocyclopropan-1-

carboxylat (ACC) deaminaza, hoặc tăng cường sự hòa tan phospho (có nghĩa là, sự hòa tan P), hoặc tăng cường hiệu quả sử dụng các dưỡng chất được giải phóng ra từ phân khoáng. Bằng cách phơi nhiễm dịch nuôi cấy vi khuẩn đã nêu với những thay đổi đột ngột về nhiệt độ và/hoặc giá trị độ pH của dịch nuôi cấy vi sinh vật, vi khuẩn trong dịch nuôi cấy vi sinh vật này được chuyển dạng sang trạng thái tiềm tàng (có nghĩa là, trạng thái bị động). Tuy nhiên, vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng này có thể được tái hoạt hóa khi được cung cấp các điều kiện thích hợp, có thể là một cách tự nhiên như là khi có mặt của các dịch tiết từ rễ của cây trồng hoặc bằng sự thao tác của con người như là trong phòng thí nghiệm hoặc trong nhà máy.

Theo một khía cạnh của sáng chế, vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng có thể được tạo ra bằng cách phơi nhiễm vi khuẩn này với nhiệt độ được kiểm soát ở độ axit nhất định. Ví dụ, môi trường cho vi khuẩn sinh trưởng có thể được điều chỉnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng 13°C đến 18°C và độ pH nằm trong khoảng 5 đến 7.

Theo một phương án của sáng chế, phân bón được tăng cường bằng PGPB chứa phân bón lót và vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng làm tăng sự hấp thu các dưỡng chất ở cây trồng thông qua các cơ chế như là sự hòa tan P, hoạt động của ACC deaminaza và/hoặc giải phóng chậm các dưỡng chất dẫn đến sự thất thoát ít hơn hoặc sự không tan/sự cố định tương đối là thấp. Phân bón lót này có thể là phân khoáng bao gồm phospho, nitơ, kali, canxi, magie, lưu huỳnh, bo, đồng, sắt, mangan, molybden, kẽm, và hỗn hợp của chúng.

Vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng có thể được đưa vào phân lót này bằng cách thấm PGPB vào trong phân bón lót. Khi phân bón được thấm này được bón vào đất, PGPB ở trạng thái tiềm tàng được tái hoạt hóa khi có mặt dịch tiết từ rễ cây trồng. Mặt khác, phân bón được tăng cường bằng PGPB này chứa vi khuẩn PGPB ở trạng thái tiềm tàng có thể được tái hoạt hóa trong các điều kiện được kiểm soát trong một cơ sở sản xuất như là phòng thí nghiệm.

Sáng chế đề xuất các phương án để tăng cường phân khoáng bằng PGPB ở pha tiềm tàng mang các đặc điểm thúc đẩy sự sinh trưởng như là sự hòa tan P và/hoặc hoạt tính ACC deaminaza. Phân được tăng cường bằng PGPB này, được bón vào đất thông qua các phương pháp tiêu chuẩn, cải thiện sự tăng trưởng của cây trồng bằng cách tăng cường tính sinh khả dụng của dưỡng chất cũng như thúc đẩy sự tăng trưởng rễ mở rộng.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Nội dung sáng chế có thể được hiểu nhanh chóng bằng cách xem xét phần Mô tả chi tiết sáng chế dưới đây kết hợp với sơ đồ kèm theo.

Sơ đồ (Fig. 1) này làm sáng tỏ phương pháp sản xuất phân bón được tăng cường bằng PGPB theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được thể hiện chi tiết thành các phương án, ví dụ của các phương án này được minh họa trong sơ đồ kèm theo, trong đó các số tham chiếu tương tự nhau dùng để chỉ các yếu tố tương tự nhau qua một số quan điểm. Về vấn đề này, phương án theo sáng chế có thể có các dạng khác nhau và không nên được hiểu là chỉ giới hạn trong phần mô tả được đề cập ở đây. Do đó, các phương án này chủ yếu được mô tả dưới đây, bằng cách đề cập đến các fig., để giải thích các khía cạnh của sáng chế. Các thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ với mục đích mô tả và không nhằm giới hạn phạm vi sáng chế. Thuật ngữ “bao gồm” và/hoặc “chứa” được sử dụng để xác định sự có mặt của các yếu tố, các bước, quy trình (quá trình), và/hoặc các thành phần đã được đề cập trong bản mô tả, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc sự bổ sung của một hoặc nhiều yếu tố, bước, quy trình (quá trình), và/hoặc thành phần khác. Thuật ngữ “thứ nhất”, “thứ hai”, và tương tự có thể được sử dụng để mô tả nhiều yếu tố khác nhau, nhưng không chỉ giới hạn ở các yếu tố này. Các thuật ngữ này chỉ được sử dụng để phân biệt yếu tố này với yếu tố khác.

Trong phần mô tả sau đây, tất cả các số được bộc lộ ở đây là các giá trị xấp xỉ, trừ khi có từ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” được sử dụng cùng với các số này. Giá trị của một số có thể khác nhau 1%, 2%, 5%, 7%, 8%, 10%, 15% hoặc 20%. Do đó, khi một số có giá trị N được bộc lộ, số bất kỳ có giá trị $N \pm 1\%$, $N \pm 2\%$, $N \pm 3\%$, $N \pm 5\%$, $N \pm 7\%$, $N \pm 8\%$, $N \pm 10\%$, $N \pm 15\%$ hoặc $N \pm 20\%$ cũng được bộc lộ, trong đó “+” dùng để chỉ cộng hoặc trừ. Khi một miền số với giới hạn dưới, RL, và giới hạn trên, RU, được bộc lộ, số bất kỳ rơi trong miền này cũng được bộc lộ. Cụ thể là, các số dưới đây bên trong miền này được bộc lộ trong bản mô tả: $R = RL + k \cdot (RU - RL)$, trong đó k là miền biến đổi từ 1% đến 100% với giá trị tăng mặc định là 1%, có nghĩa là, k là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, ..., 50%, 51%, 52%, ..., 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%. Hơn nữa, miền số bất kỳ được xác định bằng hai số R được nêu trên cũng được bộc lộ trong bản mô tả.

Sơ đồ thể hiện phương pháp sản xuất phân bón hiệu quả cao thông qua sự tăng cường bằng PGPB theo một phương án của sáng chế. Thứ nhất, một hoặc nhiều chủng vi khuẩn hữu ích với sự tăng trưởng của cây trồng được xác định thông qua quy trình sàng lọc và kiểm thử nghiêm ngặt. Các chủng vi khuẩn đại diện được chọn từ PGPB. Ví dụ, vi khuẩn trong các nhóm *Bacillus* và *Pseudomonas* là có khả năng hòa tan phospho. Vi khuẩn sống tự do có khả năng cố định nitơ bao gồm *Cyanobacteria* (có nghĩa là, nhóm tảo lam) và một số trong các chi *Clostridium*, *Azotobacter*, hoặc *Azospirillum*.

Các chủng PGPB đã chọn được tinh sạch bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn và được chuyển thành dịch nuôi cấy gốc. Dịch nuôi cấy gốc này sau đó là đối tượng cho một hoặc nhiều bước lên men để tăng mật độ quần thể vi khuẩn. Sự lên men có thể được thực hiện trong hệ thống phản ứng sinh học. Các điều kiện mà trong điều kiện đó sự lên men được diễn ra bao gồm loại chất dinh dưỡng được thêm vào môi trường này, nhiệt độ của nó, giá trị độ pH của nó, tốc độ chuyển động lắc, thời gian ủ, tốc độ sục khí, v.v. Dịch nuôi cấy vi khuẩn thu được sau bước lên men có mật độ vi khuẩn cao, ví dụ, khoảng 10^7 tế bào đến khoảng 10^9 tế bào/ml. Bước lên men này không ảnh hưởng đến các đặc điểm thúc đẩy tăng trưởng, bao gồm khả năng hòa tan P và hoạt tính ACC deaminaza của dịch nuôi cấy gốc.

Trong bước tiếp theo, vi khuẩn trong dịch nuôi cấy vi sinh vật này được chuyển sang trạng thái tiềm tàng bằng cách điều chỉnh nhiệt độ (có nghĩa là, thay đổi nhiệt độ đột ngột) và/hoặc điều chỉnh giá trị độ pH của dịch nuôi cấy vi sinh vật (có nghĩa là, thay đổi độ pH đột ngột). Ví dụ, nhiệt độ của dịch nuôi cấy vi sinh vật được điều chỉnh đến giá trị trong khoảng từ 13°C đến 25°C, tốt hơn nếu là trong khoảng từ 13°C đến 18°C. Giá trị độ pH của dịch nuôi cấy vi sinh vật này được điều chỉnh đến giá trị trong khoảng từ 3,8 đến 9, hoặc tốt hơn nếu là trong khoảng từ 5 đến 7. Do đó, vi khuẩn trong dịch nuôi cấy vi khuẩn này tạm thời ở trạng thái tiềm tàng hoặc bất hoạt/bị động.

Trong sáng chế, dịch nuôi cấy vi sinh vật gốc trải qua quá trình lên men được kiểm soát để tăng mật độ quần thể và để tăng cường các đặc điểm thúc đẩy tăng trưởng, bao gồm các khả năng hòa tan P và hoạt tính ACC deaminaza. Quá trình lên men được kiểm soát này bao gồm các đại lượng thay đổi thích hợp như là chất dinh dưỡng, nhiệt độ, độ pH, điều kiện chuyển động lắc, điều kiện ủ, và điều kiện sục khí, đòi hỏi một chuỗi các bước lên men.

Phân bón được tăng cường bằng PGBP này có thể được vận chuyển và cất giữ cách dễ dàng. Nếu phân bón được tăng cường này được bón vào đất, ví dụ, trong vùng rễ, PGPB ở trạng thái tiềm tàng mà phân bón này mang theo có thể được tái hoạt hóa bằng dịch tiết được giải phóng từ rễ của cây trồng. Mặt khác, PGPB ở trạng thái tiềm tàng có thể tái hoạt hóa tại cơ sở sản xuất (ví dụ, phòng thí nghiệm) trong các điều kiện nuôi cấy thuận lợi.

Sau đó, dịch nuôi cấy vi sinh vật chứa PGPB ở trạng thái tiềm tàng này được bổ sung vào phân bón lót. Phân bón lót thích hợp có thể là phân khoáng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân điamoni phosphat (DAP), phân đơn siêu phosphat (SSP), phân ure, phân canxi amoni nitrat (CAN), v.v. Dịch nuôi cấy vi sinh vật này có thể được phun lên (hoặc theo cách khác trộn với) phân bón lót này sao cho bề mặt của phân bón được bao phủ bằng dịch nuôi cấy vi sinh vật nêu trên. Mặt khác, dịch nuôi cấy vi sinh vật đã nêu có thể được bổ sung vào phân bón lót trong một máy trộn. Do đó, việc trộn phân bón lót với PGPB ở trạng thái tiềm tàng sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ để tạo ra phân bón được tăng cường bằng PGBP theo sáng chế.

Do đó, phân bón được tăng cường bằng PGPB được tạo thành có thể chứa cả phân khoáng cũng như PGPB, có tác dụng hiệp đồng lên sự tăng trưởng của cây trồng và năng suất cây trồng. Hơn nữa, sự thay đổi nhiệt độ đột ngột và sự thay đổi độ pH đột ngột có thể được thực hiện đồng thời hoặc theo trình tự để chuyển dịch nuôi cấy vi khuẩn có nồng độ cao sang pha tiềm tàng.

Do PGPB trong phân bón được tăng cường này ở pha tiềm tàng, chúng có thể tồn tại khi đối mặt với thời gian cất giữ lâu dài và các điều kiện bất lợi trong suốt quá trình vận chuyển. Do đó, phân bón được tăng cường này là thích hợp với việc quảng đường xa và thời gian cất giữ lâu dài. PGPB ở trạng thái tiềm tàng có thể được tái hoạt hóa để hồi phục hoạt tính ACC deaminaza và khả năng hòa tan P bằng cách phơi nhiễm với dịch tiết rễ hoặc bằng cách xử lý trong các điều kiện thuận lợi được kiểm soát, như là trong phòng thí nghiệm. Phân bón được tăng cường theo sáng chế hỗ trợ việc thực hiện an ninh lương thực bằng cách cải thiện hiệu quả sử dụng phân bón cũng như thúc đẩy năng suất cây trồng dựa trên các tác động hiệp đồng tích cực của PGPB đặc hiệu và phân khoáng.

Sự sản xuất phân bón được tăng cường bằng PGPB và hiệu quả của nó có thể được hiểu rõ hơn qua các ví dụ được mô tả trong các phần sau.

Ví dụ 1 – Xác định PGPB trong phân bón được tăng cường PGPB

Trong ví dụ này, PGPB được phân lập từ phân bón được tăng cường bằng PGPB và kết quả được so sánh với mẫu đối chứng (có nghĩa là, phân khoáng lót không chứa PGPB). Thứ nhất, chuẩn bị dung dịch muối đệm phosphate (PBS). Thứ hai, chuẩn bị dung dịch chứa dịch chiết trypton đậu tương (TSB) và sau đó hấp khử trùng. Sau đó, làm mát dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng. Thứ ba, chuẩn bị mẫu dung dịch chứa dịch nuôi cấy theo sáng chế và mẫu dịch nuôi cấy so sánh để thử nghiệm. Cuối cùng, bổ sung riêng các mẫu theo sáng chế và các mẫu so sánh vào trong dung dịch muối đệm phosphate và ủ trong thời gian 72 giờ. Trãi dung dịch thu được tương ứng lên các đĩa thạch aga TSB. Ủ các đĩa này ở nhiệt độ 30° C. Sau thời gian 24-48 giờ, quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn trong mỗi đĩa và xác định số lượng vi khuẩn. Mẫu từ phân bón được tăng cường bằng PGPB tạo ra khoảng mật độ vi khuẩn trong khoảng từ 10^3 đến 10^9 tế bào/ml.

Ví dụ 2- Thử nghiệm sinh học

Các thử nghiệm sinh học được sử dụng để xác định định tính các đặc điểm thúc đẩy sự tăng trưởng. Các thử nghiệm sinh học được xem xét các phương pháp hiệu quả và đơn giản nhất để ghi lại sự tác động của PGPB lên sự thúc đẩy tăng trưởng của cây trồng dưới các điều kiện được kiểm soát. Các thử nghiệm sinh học nhất định có tính đặc hiệu cao và có thể được hoàn thành trong ít ngày.

Để thực hiện thử nghiệm sinh học, các đĩa petri hoặc bình leonard được hấp khử trùng và giấy vô khuẩn được chèn lên chúng trong các điều kiện vô trùng. Nước khử trùng được sử dụng để làm ướt giấy và bề mặt các hạt giống được khử trùng của cây trồng được chọn lọc được cuộn trong giấy này và được ủ trong khoang sinh trưởng trong bóng tối. Khi hạt nảy mầm, 1ml dịch nuôi cấy thử nghiệm được chuẩn bị từ PGPB được áp dụng lên một nửa số hạt giống trong khi nửa số hạt giống còn lại được xử lý bằng 1ml dung dịch thử nghiệm được hấp khử trùng. Sau đó các hạt giống được sinh trưởng trong các điều kiện được kiểm soát trong khoang sinh trưởng. Sự sinh trưởng khác nhau trong trường hợp của các hạt giống được xử lý bằng tế bào đang sống so với các tế bào đã chết được lấy để làm tiềm năng của PGPB thúc đẩy sự sinh trưởng.

Ví dụ 3 – Xác định đặc điểm thúc đẩy sinh trưởng của PGPB

Khả năng hòa tan phospho được đo bằng cách sử dụng dụng cụ đo màu. Hoạt tính ACC deaminaza được xác định định lượng bằng cách đo lượng α -ketobutyrate tạo ra khi enzym ACC deaminaza phân cắt ammoniac cho ACC.

Mặc dù sáng chế được mô tả tương ứng với các phương án, nhiều sự cải biến có thể được tạo ra trong phạm vi của sáng chế. Do đó, các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này được dự định để minh họa, nhưng không giới hạn, phạm vi sáng chế, phạm vi được nêu trong phần Yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phân bón được tăng cường, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- a) tạo ra phân bón lót;
 - b) đưa dạng tiềm tàng của vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (plant growth promoting bacteria -PGBP) vào phân bón lót;
 - c) tái hoạt hóa dạng tiềm tàng của vi khuẩn này,
- trong đó dạng hoạt động của vi khuẩn này chứa enzym 1- aminoxyclopropan- 1- carboxylat (ACC) deaminaza; và

trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn này được tạo ra bằng cách lên men vi khuẩn này sau một hoặc một vài bước lên men sử dụng môi trường đặc hiệu để thúc đẩy sự tăng số lượng, hoạt tính và sự sống sót trên phân khoáng – lên men từ 25°C đến khoảng 45°C để thúc đẩy sự tăng số lượng và hoạt tính, dạng tiềm tàng thu được bằng cách sử dụng giá trị pH khoảng 3,8 đến khoảng 9, bao gồm cả quản lý độ pH và sau đó cho vi khuẩn này tiếp xúc với nhiệt độ khoảng 13°C đến khoảng 18°C và độ pH khoảng 3,9 đến khoảng 9 bao gồm cả quản lý độ pH để duy trì vi khuẩn này ở trạng thái tiềm tàng để bảo quản cho việc áp dụng sau này.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó, dạng tiềm tàng của vi khuẩn được tạo ra bằng cách cho vi khuẩn này tiếp xúc với nhiệt độ nằm trong khoảng 13°C đến khoảng 18°C và độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7.

3. Quy trình theo điểm 1, trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn được tái hoạt hóa trong khi có mặt dịch tiết từ rễ của cây trồng hoặc bằng quy trình trong cơ sở thí nghiệm.

4. Quy trình theo điểm 1, trong đó phân bón lót là phân khoáng được chọn từ phân điamoni phosphat (DAP), phân đơn siêu phosphat (SSP), phân ure, phân kali clorua (MOP) hoặc phân mono amoni phosphat (MAP), hoặc phân canxi amoni nitrat (CAN).

5. Quy trình theo điểm 4, trong đó phân khoáng đã nêu chứa các hạt và dạng tiềm tàng của vi khuẩn được tẩm lên các hạt này.

6. Quy trình theo điểm 1, trong đó vi khuẩn đã được tái hoạt hóa được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cyanobacteria*, *Clostridium*, *Azotobacter*, hoặc *Azospirillum*.

7. Chế phẩm chứa vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (plant growth promoting bacteria-PGPB) để bổ sung vào phân bón lót, chứa:

dạng tiềm tàng của PGPB chứa enzym ACC deaminaza; và

trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn này được tạo ra bằng cách lên men vi khuẩn này sau một hoặc một vài bước lên men sử dụng môi trường đặc hiệu để thúc đẩy sự tăng số lượng, hoạt tính và sự sống sót trên phân khoáng – lên men từ 25°C đến khoảng 45°C để thúc đẩy sự tăng số lượng và hoạt tính, dạng tiềm tàng thu được bằng cách sử dụng giá trị pH khoảng 3,8 đến khoảng 9, bao gồm cả quản lý độ pH và sau đó cho vi khuẩn này tiếp xúc với nhiệt độ khoảng 13°C đến khoảng 18°C và độ pH khoảng 3,9 đến khoảng 9 bao gồm cả quản lý độ pH để duy trì vi khuẩn này ở trạng thái tiềm tàng để bảo quản cho việc áp dụng sau này.

8. Chế phẩm chứa PGPB theo điểm 7, trong đó chế phẩm này là chế phẩm dạng dịch chiết lỏng.

9. Chế phẩm chứa PGPB theo điểm 7, trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn này có khả năng tái hoạt hóa khi tiếp xúc với dịch tiết từ rễ của cây trồng.

10. Phương pháp sản xuất phân bón được tăng cường, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu dịch nuôi cấy vi sinh vật chứa vi khuẩn;
- b) điều chỉnh dịch nuôi cấy vi sinh vật trong quá trình lên men đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 45°C và giá trị độ pH là nằm trong khoảng 3,8 đến 9 để đạt đến nồng độ vi khuẩn được xác định trước; và chuyển dịch nuôi cấy vi sinh vật này thành trạng thái tiềm tàng bằng cách điều chỉnh nhiệt độ nằm trong khoảng từ 13 đến 25°C;
- c) trộn dịch nuôi cấy vi sinh vật tiềm tàng đã nêu với phân bón lót,

trong đó vi khuẩn trong dịch nuôi cấy vi sinh vật đã nêu chứa enzym ACC deaminaza;

trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn này được tạo ra bằng cách lên men vi khuẩn này sau một hoặc một vài bước lên men sử dụng môi trường đặc hiệu để thúc đẩy sự tăng số lượng, hoạt tính và sự sống sót trên phân khoáng – lên men từ 25°C đến khoảng 45°C để thúc đẩy sự tăng số lượng và hoạt tính, dạng tiềm tàng thu được bằng cách sử dụng giá trị

pH khoảng 3,8 đến khoảng 9, bao gồm cả quản lý độ pH và sau đó cho vi khuẩn này tiếp xúc với nhiệt độ khoảng 13°C đến khoảng 18°C và độ pH khoảng 3,9 đến khoảng 9 bao gồm cả quản lý độ pH để duy trì vi khuẩn này ở trạng thái tiềm tàng để bảo quản cho việc áp dụng sau này.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó nhiệt độ và giá trị độ pH của dịch nuôi cấy vi sinh vật đã nêu được điều chỉnh sao cho vi khuẩn này bị chuyển sang trạng thái tiềm tàng.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó nhiệt độ để chuyển dịch nuôi cấy vi sinh vật đã nêu thành trạng thái tiềm tàng được điều chỉnh tốt hơn là đến khoảng từ 13 đến 18°C.

13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó giá trị độ pH của dịch nuôi cấy vi sinh vật được điều chỉnh đến khoảng 5 đến 7.

14. Phương pháp theo điểm 10, trong đó vi khuẩn này được chọn từ vi khuẩn trong nhóm *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cyanobacteria*, *Clostridium*, hoặc *Azotobacter*, hoặc *Azospirillum*.

15. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phân bón lót đã nêu là phân khoáng.

16. Phương pháp theo điểm 10, trong đó dịch nuôi cấy vi sinh vật này được thu thông qua các bước: xác định vi khuẩn được bao gồm trong dịch nuôi cấy vi sinh vật; tinh sạch vi khuẩn này; và lên men vi khuẩn trong dịch nuôi cấy vi sinh vật này để đạt đến mật độ được xác định trước.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó mật độ được xác định trước là khoảng 10^7 tế bào đến khoảng 10^9 tế bào/ml dịch nuôi cấy vi sinh vật.

18. Phương pháp theo điểm 13, phương pháp này bao gồm thêm bước hoạt hóa vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng khi có mặt dịch tiết từ rễ của cây trồng.

19. Phương pháp cải thiện sự tăng trưởng của cây trồng, bao gồm các bước: trồng cây trên đất; và bón phân được tăng cường thông qua việc bón trên mặt đất, bón cạnh rễ của cây trồng, bón rải, bón lót, hoặc tưới phân bón, trong đó phân bón được tăng cường này chứa dạng tiềm tàng của vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng được đưa vào phân khoáng bón lót,

trong đó dạng tiềm tàng của vi khuẩn này được tạo ra bằng cách lên men vi khuẩn này sau một hoặc một vài bước lên men sử dụng môi trường đặc hiệu để thúc đẩy sự tăng số lượng, hoạt tính và sự sống sót trên phân khoáng – lên men từ 25°C đến khoảng 45°C để thúc đẩy sự tăng số lượng và hoạt tính, dạng tiềm tàng thu được bằng cách sử dụng giá trị pH khoảng 3,8 đến khoảng 9, bao gồm cả quản lý độ pH và sau đó cho vi khuẩn này tiếp xúc với nhiệt độ khoảng 13°C đến khoảng 18°C và độ pH khoảng 3,9 đến khoảng 9 bao gồm cả quản lý độ pH để duy trì vi khuẩn này ở trạng thái tiềm tàng để bảo quản cho việc áp dụng sau này.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó vi khuẩn ở trạng thái tiềm tàng chứa enzym ACC deaminaza.

Fig. 1