



(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)



2-0003031

(51) **C05F 11/00; C12N 11/00; C12N 1/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00250

(22) 08/07/2020

(67) 1-2020-03954

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/09/2020 390A

(73) Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Nhà 1h, Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) **TRẦN THỊ NHƯ HẰNG (VN); LÊ MAI HƯƠNG (VN); TRẦN THỊ HỒNG HÀ (VN); HOÀNG KIM CHI (VN); LÊ HỮU CƯỜNG (VN); TRẦN HỒ QUANG (VN).**

(54) **CHẾ PHẨM VI SINH VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh chứa các sinh khối bào tử của các vi sinh vật thuộc nhóm nấm rễ bao gồm *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 và vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 được phân lập từ các nguồn trong nước. Chế phẩm này có tác dụng làm tăng năng suất cây trồng đồng thời làm giảm dư lượng thuốc trừ sâu trong đất canh tác, ví dụ như tăng năng suất và làm giảm dư lượng thuốc trừ sâu trong đất canh tác đối với cây rau cải xanh (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) và cây chè (*Camelia sinensis*) tại Việt Nam.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng, cụ thể sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh chứa các sinh khối bào tử của các vi sinh vật thuộc nhóm nấm rễ bao gồm *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 và vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 cũng như một số thành phần khác. Chế phẩm vi sinh theo sáng chế có hiệu quả làm tăng năng suất một số cây trồng đồng thời phân hủy thuốc trừ sâu phospho hữu cơ (organophosphorus pesticides, OP) tồn dư trong đất canh tác. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phân bón là một thành phần quan trọng không thể thiếu trong lĩnh vực trồng trọt nói chung, giúp cung cấp dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng sinh trưởng, phát triển tốt, đạt năng suất, chất lượng cao hoặc làm tăng độ phì nhiêu của đất. Căn cứ vào nguồn gốc, hiện nay phân bón được chia làm 3 loại: Phân hóa học, phân hữu cơ và phân vi sinh. Phân vi sinh là phân bón có chứa các loài vi sinh vật cố định đạm, chuyển hóa lân hoặc phân giải chất hữu cơ. Hiện nay trên thế giới, phân bón vi sinh đang được chú trọng nghiên cứu, bởi việc sử dụng phân bón này sẽ giúp khắc phục được tình trạng ô nhiễm và mất cân bằng sinh thái đất (do phân hóa học), giảm phát thải khí gây hiệu ứng nhà kính và gây biến đổi khí hậu toàn cầu (do phân hữu cơ).

Nấm rễ cộng sinh (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) là nhóm các vi nấm đặc biệt sống trên phần rễ và đất vùng rễ của thực vật. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, khoảng 90% các loài thực vật hiện biết trong tự nhiên đều có mối quan hệ cộng sinh với AMF có ích. Giữa AMF và cây chủ có mối quan hệ vô cùng khăng khít: chúng nhận từ cây chủ đường và một số dinh dưỡng thiết yếu, bù lại, chúng có thể sinh tổng hợp một số chất kháng sinh giúp cây chủ tăng cường sức chống chịu trước nhiều tác nhân gây bệnh, cũng như giúp cây chủ tăng cường hấp thu nước, chất dinh dưỡng từ đất. AMF giúp làm tăng bề mặt hấp thụ của rễ cây từ 100 đến 1000 lần nhờ những sợi nấm nhỏ vươn dài và nối liền với rễ cây. Ngoài ra, chúng còn có thể sinh ra các enzym làm hòa tan các chất dinh dưỡng khó hấp thu trong đất như ni tơ, phot pho, sắt, v.v., giúp cây chủ dễ dàng thu nhận dinh dưỡng

và tăng cường trao đổi chất. Đặc biệt, AMF còn có tác dụng sản sinh ra các chất kích thích sinh trưởng, tăng khả năng chịu hạn, chịu mặn, chống chịu sâu bệnh hại trong đất. Vì vậy, hiện nay trên thế giới, AMF đang được quan tâm khai thác phục vụ sản xuất trồng trọt. Mặt khác, danh sách các chủng vi sinh vật trong các sản phẩm phân bón vi sinh hiện nay đang để lại một khoảng trống khá lớn cho các AMF ở cả dạng đơn chủng và dạng đa chủng hiệp đồng. Đặc biệt, dạng kết hợp đa chủng vi sinh của AMF chỉ mới được một số nghiên cứu đề cập tới từ năm 2015 và được tập trung nghiên cứu sản xuất trong những năm gần đây (từ năm 2018). Cụ thể, một số vi khuẩn hữu hiệu thuộc chi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* và *Rhizobium* đã được bổ sung vào chế phẩm chứa bào tử AMF để tăng cường hoạt tính kích thích sinh trưởng, sức chống chịu và chuyển hóa dinh dưỡng cho cây trồng, giúp đạt năng suất vượt trội. Vì vậy, các chế phẩm AMF ở dạng kết hợp với vi khuẩn hữu hiệu nhằm làm tăng năng suất mùa vụ là một xu hướng mới trong lĩnh vực tạo phân bón sinh học an toàn và hiệu quả.

Trên thế giới, AMF đã và đang được sử dụng để tạo chế phẩm sinh học bón cho cây trồng, các chế phẩm này có thể tồn tại ở dạng dịch thể hoặc dạng bột. Một số chế phẩm vi sinh từ AMF đang được lưu hành trên thị trường thế giới hiện nay có thể kể đến: Chế phẩm “Symbiont VAM” của hãng T.Stanes & Company Limited (Úc) có chứa thành phần chính là chủng nấm rễ thuộc loài *Glomus fasciculatum* với hàm lượng 1000 bào tử trong mỗi g chế phẩm, bón cho các cây nông nghiệp như lúa, cà chua, ngô, dưa, súp lơ, v.v.. Chế phẩm “Nature's Solution Mycorrhizae” của Environment Celebration Institute (California, USA). Thành phần chính gồm 6 chủng nấm rễ thuộc *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. dussii*, *G. clarum*, *G. deserticola*, và *G. microaggregatum* với hàm lượng của mỗi chủng nấm là 180 bào tử trong 1 g chế phẩm. Chế phẩm dạng bột này có thể được dùng cho mọi loại cây trồng. Chế phẩm “Endo Mycorrhizae” của hãng Sustainable Agricultural Technologies Inc. (USA). Thành phần chính gồm 4 chủng nấm rễ thuộc *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. aggregatum*, và *G. etunicatum* với hàm lượng 1×10^5 bào tử trong mỗi lb (tương đương 0,45 kg) chế phẩm. Tuy nhiên, các chế phẩm nêu trên có giá bán trên thị trường khá cao, khoảng 18,95 USD cho mỗi hộp chế phẩm “Nature's Solution Mycorrhizae” (0,45kg) hoặc 37 USD cho mỗi gói chế phẩm “Endo Mycorrhizae” (0,9kg).

Một vấn đề khác mà nông nghiệp hiện đại đang đối mặt là tình trạng sử dụng thuốc bảo vệ thực vật: Thuốc bảo vệ thực vật đã và đang gây nên những hệ quả xấu cho sức khỏe

con người cũng như gây suy thoái môi trường sống nghiêm trọng, tuy nhiên các hóa chất này lại có vai trò không thể thay thế trong mục tiêu đảm bảo chất lượng mùa vụ nông sản nói chung.

Cụ thể, thuốc trừ sâu phospho hữu cơ được sử dụng phổ biến trong nông nghiệp hiện nay, tuy nhiên hệ lụy của loại thuốc trừ sâu này đang đặt ra rất nhiều vấn đề cho ngành nông nghiệp như gây độc cho người sử dụng, ảnh hưởng tới môi trường và đất canh tác khi mà tồn dư của loại thuốc trừ sâu này trên nông sản và đất canh tác rất cao.

Các sản phẩm phân bón sinh học có thành phần AMF nói trên đã được ứng dụng rộng và có hiệu quả cao trên nhiều loại cây trồng, nhưng thực tế chưa có chế phẩm nào được ứng dụng theo hướng mục tiêu kép là vừa làm tăng năng suất và chất lượng cây trồng, vừa giúp xử lý các chất bảo vệ thực vật.

Do đó, có nhu cầu về việc phát triển các chế phẩm vi sinh hiệu quả không chỉ với việc tăng năng suất cây trồng mà còn có tác dụng xử lý môi trường, đặc biệt là thuốc trừ sâu phospho hữu cơ, để góp phần giải quyết được nút thắt trong phát triển sản xuất nông sản sạch.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm vi sinh có hiệu quả làm tăng năng suất một số cây trồng đồng thời phân hủy thuốc trừ sâu phospho hữu cơ tồn dư trong đất canh tác để đáp ứng nhu cầu nêu trên.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh có hiệu quả làm tăng năng suất cây trồng đồng thời phân hủy thuốc trừ sâu phospho hữu cơ chứa các thành phần sau:

- hỗn hợp sinh khối bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 trên chất mang với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 8 đến 12% trọng lượng;
- sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 30 đến 40% trọng lượng;
- than bùn khô với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 55 đến 60% trọng lượng;
- hạt polyacrylamit với tỷ lệ nằm khoảng từ 1,5 đến 2% trọng lượng.

trong đó chất mang đối với các sinh khối vi sinh vật là hỗn hợp của cám gạo, bột đậu tương, glucoza, canxi cacbonat và khoáng chất với tỷ lệ theo trọng lượng như sau:

- cám gạo: 50%;
- bột đậu tương: 20%;
- glucoza: 15%;
- canxi cacbonat: 10%;
- khoáng chất: 5%.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh, trong đó quy trình này bao gồm các bước như sau:

(i) sản xuất hỗn hợp bào tử của các chủng nấm rễ: nhân giống riêng rẽ bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 trên cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 4 tháng, tiếp đó bào tử các chủng nấm rễ thu được được phối trộn với nhau cùng với chất mang theo tỉ lệ bào tử chủng *Gigaspora* sp. CPNR1: bào tử chủng *Glomus* sp. CPNR2: bào tử chủng *Scutellospora* sp. CPNR3: chất mang là 1:1:1:1 theo trọng lượng để thu được hỗn hợp bào tử;

(ii) sản xuất sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3: nhân giống chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên môi trường lỏng Luria-Bertani ở nhiệt độ 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 48 đến 60 giờ, tiếp đó trộn sinh khối lên men thu được với chất mang theo tỷ lệ thể tích:trọng lượng là 1:1 và làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến khi đạt độ ẩm 10% để thu được sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang;

(iii) phối trộn và tạo chế phẩm: phối trộn hỗn hợp thu được ở bước (i), sinh khối thu được ở bước (ii) với than bùn khô và hạt polyacrylamit;

(iv) nghiền mịn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ phân lập bào tử nấm rễ nội sinh từ mẫu đất.

Fig.2 là sơ đồ quan hệ phát sinh của ba chủng nấm rễ nội sinh *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3 dựa trên phân tích sinh học phân tử.

Fig.3 là cây phân loại của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 dựa trên phân tích sinh học phân tử.

Fig.4 là hình ảnh nhân nuôi nấm rễ *in vivo* trên cây Mã đề Ribwort và ảnh hiển vi của bào tử nấm rễ phân lập từ vùng rễ cây Mã đề Ribwort.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm vi sinh đa chủng chứa bào tử các chủng nấm rễ và sinh khối chủng vi khuẩn có tác dụng làm tăng sinh trưởng thực vật và phân hủy dư lượng thuốc trừ sâu OP trong một số vùng chuyên canh cây trồng tại Việt Nam.

Bào tử các nấm rễ thuộc 3 chủng *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3, đã được phân lập từ các nguồn trong nước, đang được lưu giữ tại Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các bào tử nấm trên đã được xác định qua thử nghiệm là có hoạt tính sinh enzym phân giải phosphat khó tan và sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật.

Sơ đồ quan hệ phát sinh của ba chủng nấm rễ nội sinh *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3 dựa trên phân tích sinh học phân tử được thể hiện trên Fig.2.

Cây phân loại của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 dựa trên phân tích sinh học phân tử được thể hiện trên Fig.3.

Các bào tử nấm rễ của 3 chủng nấm *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3 tồn tại trong chế phẩm dạng bột dưới dạng bào tử, với hàm lượng của mỗi chủng trong chế phẩm là khoảng 200 bào tử/1gam chế phẩm. Ở mật độ này, đây là các chủng nấm an toàn với sức khỏe con người không độc hại tới môi trường. Hàm lượng tổng số khoảng 600 bào tử/1gam chế phẩm.

Việc nhân giống *in vivo* các bào tử nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 được thực hiện trên cây Mã đề Ribwort

(*Plantago lanceolata*), bởi các chủng nấm rễ này phát triển rất chậm khi nhân giống *in vitro* trên môi trường bán lỏng. Khi nhân giống các bào tử nấm rễ trên cây Mã đề, các bào tử sẽ nảy mầm sinh trưởng tạo hệ sợi rồi hình thành bào tử. Bào tử nấm rễ sau nhân giống sẽ có sự đồng đều, sức sinh trưởng và hình thái rõ ràng hơn bào tử tự nhiên. Sau khoảng 3 đến 4 tháng nhân nuôi trên cây *P. lanceolata* thì số lượng bào tử nấm rễ nội cộng sinh tổng số của các mẫu tăng lên rõ rệt. Tỷ lệ tăng sinh bào tử đạt từ 75,4% đến 198,2%.

Quy trình nhân nuôi được thực hiện theo các bước cụ thể như sau:

- Xử lý hạt giống cây Mã đề Ribwort *P. lanceolata*: hạt giống cây Mã đề được khử trùng bằng cồn, NaOCl 3% và rửa lại bằng nước cất.
- Tạo mẫu đất nhân giống: tạo bầu đất theo tỉ lệ 1 cát vàng: 2 than bùn. Khử trùng giá thể lần 1 ở nhiệt độ 60⁰C trong thời gian 1 giờ, sau 24 giờ khử trùng lần 2 ở nhiệt độ 121⁰C trong thời gian 1 giờ.
- Gieo hạt giống: cho đất mẫu có chứa bào tử vào bầu đất, xịt đều nước đủ ẩm đất sau đó gieo hạt giống ngay lên trên phần đất mẫu. Mỗi bầu gieo từ 10 – 15 hạt. Sau khoảng 2 tuần hạt đã nảy mầm ổn định, tiến hành tỉa bỏ những cây không đạt tiêu chuẩn và chỉ giữ lại mỗi bầu đồng đều 10 cây.
- Kiểm tra mật độ bào tử nấm rễ sau nhân nuôi: sau 3 đến 4 tháng nhân nuôi trên cây Mã đề, lấy đất phân lập lại bào tử nấm rễ bằng phương pháp lọc ướm. Từ kết quả đếm mật độ bào tử nấm rễ, xác định tỉ lệ tăng sinh bào tử theo công thức:

$$SP = [(N2-N1)/N2]*100\%$$

Trong đó: SP là Tỷ lệ tăng sinh bào tử; N2 là Số lượng bào tử nấm rễ sau nhân nuôi; N1 là Số lượng bào tử nấm rễ trước nhân nuôi.

Các sinh khối bào tử của các chủng nấm rễ được thu riêng rẽ, tiếp đó được trộn lẫn với nhau cùng với chất mang rắn theo tỷ lệ trọng lượng bằng nhau, trong đó chất mang là hỗn hợp của cám gạo, bột đậu tương, glucoza, canxi cacbonat và khoáng chất với tỷ lệ theo trọng lượng như sau:

- cám gạo: 50%;
- bột đậu tương: 20%;

- glucoza: 15%;
- canxi cacbonat: 10%;
- khoáng chất: 5%.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, hỗn hợp sinh khối bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 và chất mang có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 8 đến 12% trọng lượng.

Nhân sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên môi trường lỏng Luria-Bertani ở nhiệt độ 30°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 48 đến 60 giờ để thu được sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 lỏng. Thành phần môi trường Luria-Bertani như sau: Tryptone 10g/l; cao nấm men 5g/l; NaCl 10g/l; agar 20g/l; môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 30 phút trước khi sử dụng.

Mật độ vi khuẩn trong sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 lỏng được xác định bằng phương pháp MPN, là phương pháp sử dụng ước tính nồng độ vi sinh vật trong mẫu (đơn vị tính: CFU/g) bằng xác định số lượng khuẩn lạc hình thành trên đĩa thạch Luria-Bertani từ dịch pha loãng liên tục theo mức 10 lần (10^8 - 10^9 CFU/1 gam).

Sinh khối sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 lỏng với mật độ vi khuẩn của chủng *Ensifer* sp. CNN3 là nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^9 CFU/g được trộn với chất mang như ở trên theo tỷ lệ thể tích:trọng lượng là 1:1. Sau đó sấy khô sản phẩm phối trộn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến khi đạt độ ẩm 10% để thu được sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 30 đến 40% trọng lượng.

Để bổ sung đặc tính có lợi của chế phẩm theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế được bổ sung thêm than bùn đã được làm khô. Than bùn được tạo thành từ xác các loài thực vật khác nhau. Xác thực vật được tích tụ lại, được đất vùi lấp và chịu tác động của điều kiện ngập nước trong nhiều năm. Với điều kiện phân huỷ yếm khí các xác thực vật được chuyển

thành than bùn. Hoạt động của các loài vi sinh vật làm phân huỷ các chất có hại và khoáng hoá các chất hữu cơ tạo thành chất dinh dưỡng cho cây.

Than bùn trước khi được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế cần được sấy khô ở nhiệt độ 100°C đến khi đạt độ ẩm dưới 5%, điều này sẽ giúp oxy hoá hợp chất bitumic.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, than bùn khô có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 55 đến 60% trọng lượng.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được bổ sung hạt polyacrylamit với lượng nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2% trọng lượng để làm kết tụ các chất hữu cơ.

Các chủng nấm thuộc chi *Gigaspora*, *Glomus* và *Scutellospora* đều tạo bào tử bền vững nên thuận tiện trong việc phối trộn và bảo quản chế phẩm. Các chủng vi sinh vật dùng bào chế chế phẩm không có tính đối kháng lẫn nhau, đặc biệt đã được xác định là an toàn cho người, động vật và có thể sử dụng cho cây trồng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh, trong đó quy trình này bao gồm các bước như sau:

(i) sản xuất hỗn hợp bào tử của các chủng nấm rễ: nhân giống riêng rẽ bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 trên cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 4 tháng, tiếp đó bào tử các chủng nấm rễ thu được được phối trộn với nhau cùng với chất mang theo tỉ lệ bào tử chủng *Gigaspora* sp. CPNR1: bào tử chủng *Glomus* sp. CPNR2: bào tử chủng *Scutellospora* sp. CPNR3: chất mang là 1:1:1:1 theo trọng lượng để thu được hỗn hợp bào tử trên chất mang;

(ii) sản xuất sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3: nhân giống chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên môi trường lỏng Luria-Bertani ở nhiệt độ 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 48 đến 60 giờ, tiếp đó trộn sinh khối lên men thu được với chất mang theo tỷ lệ thể tích:trọng lượng là 1:1 và làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến khi đạt độ ẩm 10% để thu được sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang;

(iii) phối trộn và tạo chế phẩm: phối trộn hỗn hợp thu được ở bước (i), sinh khối thu được ở bước (ii) với than bùn khô và hạt polyacrylamit;

(iv) nghiền mịn.

Chế phẩm thu được không chứa các sinh vật chuyển gen, không hại cho đất trồng, có chứa thành phần các chất độc hại trong mức cho phép ($As < 0,0001\%$, $Cd < 0,00002\%$, $Co < 0,0005\%$, Cr , Pb và $Cu < 0,001\%$). Thời gian bảo quản trong 1 năm.

Chế phẩm được đóng túi 200g/túi, có in ngày sản xuất. Trong bước này có thể bổ sung thêm các đoạn rễ của cây Mã đề Ribwort vào sản phẩm phối trộn để hỗ trợ duy trì bào tử của nấm rễ nội cộng sinh.

Thực tế thử nghiệm cho thấy, chế phẩm nấm rễ nói trên có hiệu quả kích thích sinh trưởng cho cây chè (*Camelia sinensis*) (kích thước, số lượng búp / cây và sinh khối khô / m^2) và rau cải xanh (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) (kích thước, số lượng lá / cây), làm giảm hàm lượng thuốc trừ sâu OP loại Chlorpyrifos trong rau và trong đất trồng rau, chè tới 5 lần so với cây không sử dụng chế phẩm.

Cần phải hiểu rằng, phần mô tả trên đây chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế và do đó không làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào. Rõ ràng là, trên cơ sở phần mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện các biến đổi và/hoặc cải biến tương đương với các phương án cụ thể được mô tả theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn nữa thông qua các ví dụ chỉ với mục đích minh họa cho sáng chế. Cần lưu ý rằng, các bước, thành phần và điều kiện thực hiện tốt hơn là, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bước, thành phần và điều kiện như được mô tả một cách cụ thể trên đây và dưới đây.

Ví dụ 1: Quy trình sản xuất 10kg chế phẩm vi sinh từ vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 và các vi sinh vật nấm rễ theo sáng chế

Các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3 và chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 do Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Sản xuất hỗn hợp bào tử trên chất mang

Hạt giống cây Mã đề được khử trùng bằng cồn, NaOCl 3% và rửa lại bằng nước cất. Tiếp đó, tạo mẫu đất nhân giống bằng cách tạo bầu đất theo tỉ lệ 1 cát vàng: 2 than bùn. Khử trùng giá thể lần 1 ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 giờ, sau 24 giờ khử trùng lần 2 ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 1 giờ.

Bào tử ba chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 được nhân nuôi riêng rẽ trên bầu đất, xịt đều nước đủ ẩm đất sau đó gieo hạt giống ngay lên trên phần đất mẫu. Mỗi bầu gieo từ 10 – 15 hạt. Sau khoảng 2 tuần hạt đã nảy mầm ổn định, tiến hành tỉa bỏ những cây không đạt tiêu chuẩn và chỉ giữ lại mỗi bầu đồng đều 10 cây.

Sau khoảng thời gian từ 3 đến 4 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, sinh khối các chủng nấm rễ này được thu như trên Fig.1. Mỗi chủng lấy 200g sinh khối và phối trộn với nhau để thu được 600g (0,6kg) hỗn hợp bào tử.

Trộn 600g hỗn hợp bào tử này với 400g (0,4kg) chất mang bao gồm các thành phần với tỷ lệ % trọng lượng là bột đậu tương: 20%; glucoza: 15%; cám gạo: 50%; CaCO₃ : 10%, khoáng chất: 5%; để thu được 1kg hỗn hợp bào tử trên chất mang.

Sản xuất sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3

Chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 được nhân sinh khối trên môi trường Luria-Bertani lỏng chứa tryptone 10g/l; cao nấm men 5g/l; NaCl 10g/l; agar 20g/l; môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 30 phút trước khi sử dụng và tỷ lệ cấp giống là 10%. Thực hiện quy trình nhân sinh khối ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 giờ để thu sinh khối lên men lỏng.

Trộn 2,5 lít sinh khối lên men lỏng với 2,5kg chất mang (tỷ lệ theo trọng lượng bột đậu tương: 20%; glucoza: 15%; cám gạo: 50%; CaCO₃ : 10%, khoáng chất: 5%) đã được sấy ở 50°C trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 đến 2 ngày trước khi trộn. Sau đó, sấy khô hỗn hợp thu được ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 45 °C đến khi đạt độ ẩm khoảng 10%, thu được 3,2kg sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3.

Phối trộn

Trộn đều 1kg hỗn hợp bào tử nấm ba chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3, 3,2kg sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3, 5,6kg than bùn đã được sấy khô, và 0,2kg polyacrylamit và nghiền mịn để thu được 10kg chế phẩm vi sinh theo sáng chế. Đóng gói chế phẩm này với lượng 200g/gói.

Ví dụ 2: Thử nghiệm chế phẩm trên cây rau cải xanh *Brassica rapa* subsp. *chinensis*

Phương pháp thử nghiệm:

Tác động của chế phẩm đến năng suất rau và dư lượng thuốc trừ sâu OP trong rau và đất được thử nghiệm tại nhà lưới trên các chậu thí nghiệm. Giống rau trong thử nghiệm là cải xanh lùn Thanh Giang của Trung Quốc (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) cung cấp bởi Công ty TNHH sản xuất thương mại và hạt giống Việt Nhật (Hoàng Mai, Hà Nội). Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần lặp, mỗi chậu thí nghiệm trồng 5 cây, lượng đất trong mỗi chậu là 10kg. Liều lượng phân bón cho mỗi chậu là 0,7g urê, 1,7g supe lân và 0,3g kali clolua, mỗi chậu bổ sung 300g trấu nghiền phủ bề mặt.

Bố trí ba công thức thí nghiệm như sau:

CTR1: Công thức đối chứng, không bón chế phẩm vi sinh theo sáng chế

CTR2: Công thức bón 10g chế phẩm theo sáng chế/m²

CTR3: Công thức bón 100g chế phẩm theo sáng chế/m²

Thí nghiệm được thực hiện trên 3 công thức, các công thức CTR1, CTR2 và CTR3 đều được phun thuốc trừ sâu OP loại chlorpyrifos (CAS 2921-88-2) với liều 200mg/m². Tại thời điểm mỗi cây có 3 lá. Dư lượng chlorpyrifos trong mẫu đất và mẫu rau sau khi phun 40 ngày được xác định bằng phân tích sắc ký khí GC-MS theo phương pháp chuẩn EPA 8141B.

Kết quả thử nghiệm:

Sau 2 tháng trồng trong nhà lưới, các lô cây cải trong công thức CTR1, CTR2 và CTR3 được theo dõi và thống kê các chỉ tiêu sinh trưởng, gồm có chiều cao cây, số lá / cây, và năng suất thực thu. Kết quả quan sát được tóm tắt trong bảng 1 dưới đây. Kết quả cho thấy chế phẩm vi sinh của sáng chế đã làm tăng chiều dài thân và rễ ở mức có ý nghĩa, cụ

thể là làm tăng năng suất rau cải trung bình tại công thức bón 10 và 100g chế phẩm theo sáng chế/m² ở lần lượt ở mức 9,9 và 23,4% so với lô đối chứng.

Bảng 1. Đặc điểm sinh trưởng và năng suất cây cải xanh tại các công thức thí nghiệm

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	Năng suất thực thu (g)	Năng suất tăng so đối chứng (%)
CTR1 (ĐC)	20,3 ± 1,9	10,3 ± 1,1	151,0	-
CTR2	20,9 ± 1,3	11,7 ± 1,4	166,0	9,9
CTR3	24,2 ± 2,2	13,4 ± 1,2	186,3	23,4

Sau khi phân tích đã cho thấy, hàm lượng chlorpyrifos trong đất trồng rau ở 2 công thức thử nghiệm và công thức đối chứng có sự biến động rõ rệt (Bảng 2): Hàm lượng chlorpyrifos trong mẫu đất tại CTR2 (bổ sung chế phẩm vi sinh theo sáng chế với lượng 10g/m²) ở mức 7,07mg/kg đất, trong mẫu đất tại CTR3 (bổ sung chế phẩm vi sinh theo sáng chế với lượng 100g/m²) ở mức 4,173mg/kg đất, giảm lần lượt 59,1 và 75,9% so với đối chứng.

Bảng 2. Hàm lượng chlorpyrifos trong đất trồng rau cải xanh sau 40 ngày

Công thức	Hàm lượng chlorpyrifos trong đất (mg/kg đất)	Hàm lượng chlorpyrifos giảm so với đối chứng (%)
CTR1 (ĐC)	17,302 ± 1,037	-
CTR2	7,070 ± 0,933	59,1
CTR3	4,173 ± 0,861	75,9

Số liệu phân tích hàm lượng chlorpyrifos trong lá rau cải xanh ở các công thức (Bảng 3) cho thấy, hàm lượng chlorpyrifos trong rau ở công thức CTR2 và CTR3 giảm lần lượt 81,5 và 96,4% so với hàm lượng phân tích được ở trong lá rau cải ở công thức không bổ sung chế phẩm (CTR1).

Bảng 3. Hàm lượng chlorpyrifos trong lá rau cải xanh sau 40 ngày

Công thức	Hàm lượng chlorpyrifos trong rau (mg/kg rau)	Hàm lượng chlorpyrifos giảm so với đối chứng (%)
CTR1 (ĐC)	0,276 ± 0,031	-
CTR2	0,051 ± 0,004	81,5
CTR3	0,010 ± 0,001	96,4

Những kết quả nghiên cứu sơ bộ về ảnh hưởng của liều sử dụng chế phẩm vi sinh trên cây rau cải xanh trong thí nghiệm cho thấy, khi bổ sung chế phẩm theo sáng chế ở mức 10g/m² thì không chỉ các chỉ tiêu về năng suất được cải thiện mà hiệu quả phân hủy dư lượng thuốc trừ sâu OP loại chlorpyrifos trong đất trồng và trong cây rau cũng tăng đáng kể so với đối chứng. Đặc biệt, với mức 100g/m² thì hiệu quả về sinh trưởng, năng suất và phân hủy cơ chất OP của chế phẩm đạt mức cao hơn rõ rệt. Kết quả thử nghiệm trên cho thấy triển vọng ứng dụng của chế phẩm như một loại phân bón vi sinh thể hệ mới có tác động kép đối với cây nông nghiệp ngăn ngừa tại Việt Nam.

Ví dụ 3: Thử nghiệm chế phẩm trên cây chè *Camelia sinensis*

Phương pháp thử nghiệm:

Thử nghiệm được thực hiện tại xã Hùng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An, tiến hành trên cây chè kinh doanh giống LDP1 (4-7 tuổi). Thí nghiệm được bố trí với 3 công thức canh tác như sau:

CTC1: Công thức không bón chế phẩm theo sáng chế (đối chứng)

CTC2: Công thức bón chế phẩm theo sáng chế với lượng 10g/m² (tương đương 1kg/ô thí nghiệm)

CTC3: Công thức bón chế phẩm theo sáng chế với lượng 50g/m² (tương đương 5kg/ô thí nghiệm)

CTC1, CTC2, CTC3 đều được phun thuốc trừ sâu OP loại chlorpyrifos (CAS 2921-88-2) với liều 200mg/m² ngay trước khi bón chế phẩm theo sáng chế. Thí nghiệm được bố

trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh, ba lần nhắc lại. Diện tích mỗi ô thí nghiệm là 100m^2 . Tổng diện tích thí nghiệm là 1200m^2 .

Dư lượng chlorpyrifos trong mẫu đất và mẫu lá chè tại thời điểm thu hoạch (sau khi phun 60 ngày) được xác định bằng phân tích sắc ký khí GC-MS theo phương pháp chuẩn EPA 8141B.

Kết quả thử nghiệm:

Trong thời gian 2 tháng bón chế phẩm và phun thuốc trừ sâu OP, dưới điều kiện chăm sóc và nước tưới như sau, các chỉ tiêu về sinh trưởng (Chiều cao cây, rộng tán) và năng suất (Chiều dài, khối lượng và mật độ búp) cây chè tại các công thức thí nghiệm được xác định. Kết quả xác định các chỉ số trên ở giai đoạn trước khi bón phân và thời điểm thu hoạch được tóm tắt trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của cây chè tại thời điểm trước khi bón chế phẩm và thời điểm thu hoạch.

Công thức	Chiều cao cây (cm)	Rộng tán (cm)	Chiều dài búp (cm)	Khối lượng búp (gam)	Mật độ búp (búp / m^2)
Thời điểm theo dõi: Trước khi bón chế phẩm					
CTC1	$108,62 \pm 8,54$	$104,90 \pm 11,28$	$4,22 \pm 0,53$	$0,282 \pm 0,019$	$651,93 \pm 40,73$
CTC2	$107,76 \pm 10,07$	$105,05 \pm 9,85$	$4,21 \pm 0,52$	$0,290 \pm 0,023$	$649,73 \pm 52,02$
CTC3	$109,03 \pm 9,33$	$106,9 \pm 10,46$	$4,23 \pm 0,45$	$0,283 \pm 0,021$	$654,40 \pm 65,69$
Thời điểm theo dõi: Thời điểm thu hoạch					
CTC1	$111,30 \pm 6,21$	$130,46 \pm 12,14$	$5,32 \pm 0,27$	$0,606 \pm 0,033$	$1126,67 \pm 52,74$
CTC2	$113,27 \pm 8,35$	$137,04 \pm 11,37$	$5,42 \pm 0,43$	$0,646 \pm 0,041$	$1324,00 \pm 60,75$
CTC3	$114,83 \pm 7,66$	$141,29 \pm 10,55$	$5,47 \pm 0,60$	$0,668 \pm 0,028$	$1360,88 \pm 40,29$

Kết quả tại bảng 4 cho thấy, việc sử dụng chế phẩm vi sinh nấm rễ thể hệ mới đã làm tăng một số chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây và độ rộng tán của các đối tượng chè theo dõi. Ngoài ra, dù chỉ tiêu về chiều dài búp không có sự khác biệt đáng kể giữa CTC2 và CTC3 so với CTC1, nhưng những chỉ tiêu khác về năng suất của cây chè như khối lượng búp và mật độ búp đã ghi nhận mức tăng đáng kể so với công thức không bón chế phẩm.

Kết quả sau khi phân tích dư lượng OP trong đất và lá cây chè thu tại các công thức CTC1, CTC2 và CTC3 tại thời điểm thu hoạch (60 ngày sau khi phun thuốc trừ sâu OP) được mô tả trong bảng 5 và bảng 6.

Bảng 5. Hàm lượng chlorpyrifos trong đất canh tác chè tại thời điểm thu hoạch

Công thức	Hàm lượng chlorpyrifos trong đất (mg/kg đất)	Hàm lượng chlorpyrifos giảm so với đối chứng (%)
CTC1 (ĐC)	1,742 ± 0,032	-
CTC2	0,864 ± 0,089	50,6
CTC3	0,443 ± 0,025	74,7

Số liệu phân tích hàm lượng chlorpyrifos trong đất trồng chè ở các công thức cho thấy, hàm lượng chlorpyrifos trong đất trồng chè ở công thức CTC2 và CTC3 giảm lần lượt 50,6 và 74,7% so với lượng thuốc trừ sâu OP phân tích được ở đất thuộc công thức không bổ sung chế phẩm (CTC1).

Bảng 6. Hàm lượng chlorpyrifos trong lá chè tại thời điểm thu hoạch

Công thức	Hàm lượng chlorpyrifos trong lá chè (mg/kg)	Hàm lượng chlorpyrifos giảm so với đối chứng (%)
CTC1 (ĐC)	1,460 ± 0,103	-
CTC2	1,031 ± 0,097	29,4
CTC3	0,324 ± 0,074	77,8

Ngoài hàm lượng thuốc trừ sâu OP trong đất, việc sử dụng chế phẩm đề cập trong sáng chế còn thể hiện tác dụng làm giảm dư lượng chlorpyrifos trong lá chè. Kết quả thể hiện tại bảng 6 cho thấy, sử dụng chế phẩm theo sáng chế với lượng 50g/m² đất cho hiệu quả cao nhất, giảm 77,8% dư lượng chlorpyrifos trong lá chè tại thời điểm thu hoạch. Với lượng bón ít hơn (10g/m²) thì hiệu quả này đạt được ở mức 29,4%.

Như vậy chế phẩm vi sinh đề cập trong sáng chế đã thể hiện ảnh hưởng kép rõ rệt tới năng suất của cây rau cải xanh và cây chè, cũng như khả năng phân hủy dư lượng thuốc trừ sâu OP trong đất và trong nông sản. Đối với năng suất, chế phẩm giúp sản lượng rau tăng hơn 20% và tác động tích cực tới số lượng và chất lượng búp chè. Chế phẩm làm giảm dư lượng thuốc trừ sâu OP trong đất và trong nông sản sau khi thu hoạch đến 96%, tùy liều lượng sử dụng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm thu được theo sáng chế giúp cho việc canh tác cây nông nghiệp trở nên hiệu quả và an toàn, mang lại lợi ích lớn hơn cho ngành nông nghiệp của Việt Nam. Đây là sản phẩm phân bón có chất lượng, an toàn và thân thiện với môi trường, chính vì vậy hoàn toàn phù hợp với xu thế của thời đại và vì một mục tiêu phát triển ngành trồng trọt bền vững, lâu dài.

Việc ứng dụng các tập hợp vi sinh vật thuộc nhóm nấm rễ và vi khuẩn làm chế phẩm phân bón vi sinh đa tác dụng là một việc làm mới, và đây là lần đầu tiên một quy trình tạo chế phẩm phân bón vi sinh từ nấm rễ và vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu được công bố tại Việt Nam. Dưới tác dụng của chế phẩm trên sẽ tạo nên sản phẩm nông nghiệp có năng suất cao, cải thiện chất lượng môi trường trong và sau canh tác nông nghiệp tại nước ta.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm vi sinh có hiệu quả làm tăng năng suất cây trồng đồng thời phân hủy thuốc trừ sâu phospho hữu cơ chứa các thành phần sau:

- hỗn hợp sinh khối bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 trên chất mang với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 8 đến 12% trọng lượng;

- sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 với mật độ từ 10^8 đến 10^9 CFU/g trên chất mang với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 30 đến 40% trọng lượng;

- than bùn khô với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 55 đến 60% trọng lượng;

- hạt polyacrylamit với tỷ lệ nằm khoảng từ 1,5 đến 2% trọng lượng.

trong đó chất mang đối với các sinh khối vi sinh vật là hỗn hợp của cám gạo, bột đậu tương, glucoza, canxi cacbonat và khoáng chất với tỷ lệ theo trọng lượng như sau:

- cám gạo: 50%;

- bột đậu tương: 20%;

- glucoza: 15%;

- canxi cacbonat: 10%;

- khoáng chất: 5%;

trong đó số lượng bào tử của mỗi chủng nấm rễ là khoảng 200 bào tử/1g chế phẩm.

2. Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước như sau:

(i) sản xuất hỗn hợp bào tử của các chủng nấm rễ: nhân giống riêng rẽ bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora* sp. CPNR1, *Glomus* sp. CPNR2, *Scutellospora* sp. CPNR3 trên cây Mã đề Ribwort (*Plantago lanceolata*) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 3 đến 4 tháng, tiếp đó bào tử các chủng nấm rễ thu được được phối trộn với nhau cùng với chất mang theo tỉ lệ bào tử chủng *Gigaspora* sp. CPNR1: bào tử chủng *Glomus* sp. CPNR2: bào tử chủng *Scutellospora* sp. CPNR3: chất mang là 1:1:1:1 theo trọng lượng để thu được hỗn hợp bào tử;

(ii) sản xuất sinh khối của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3: nhân giống chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên môi trường lỏng Luria-Bertani ở nhiệt độ 30°C, trong thời gian nằm trong khoảng từ 48 đến 60 giờ, tiếp đó trộn sinh khối lên men thu được với chất mang theo tỷ lệ thể tích:trọng lượng là 1:1 và làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C đến khi đạt độ ẩm 10% để thu được sinh khối vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 trên chất mang;

(iii) phối trộn và tạo chế phẩm: phối trộn hỗn hợp thu được ở bước (i), sinh khối thu được ở bước (ii) với than bùn khô và hạt polyacrylamit;

(iv) nghiền mịn.

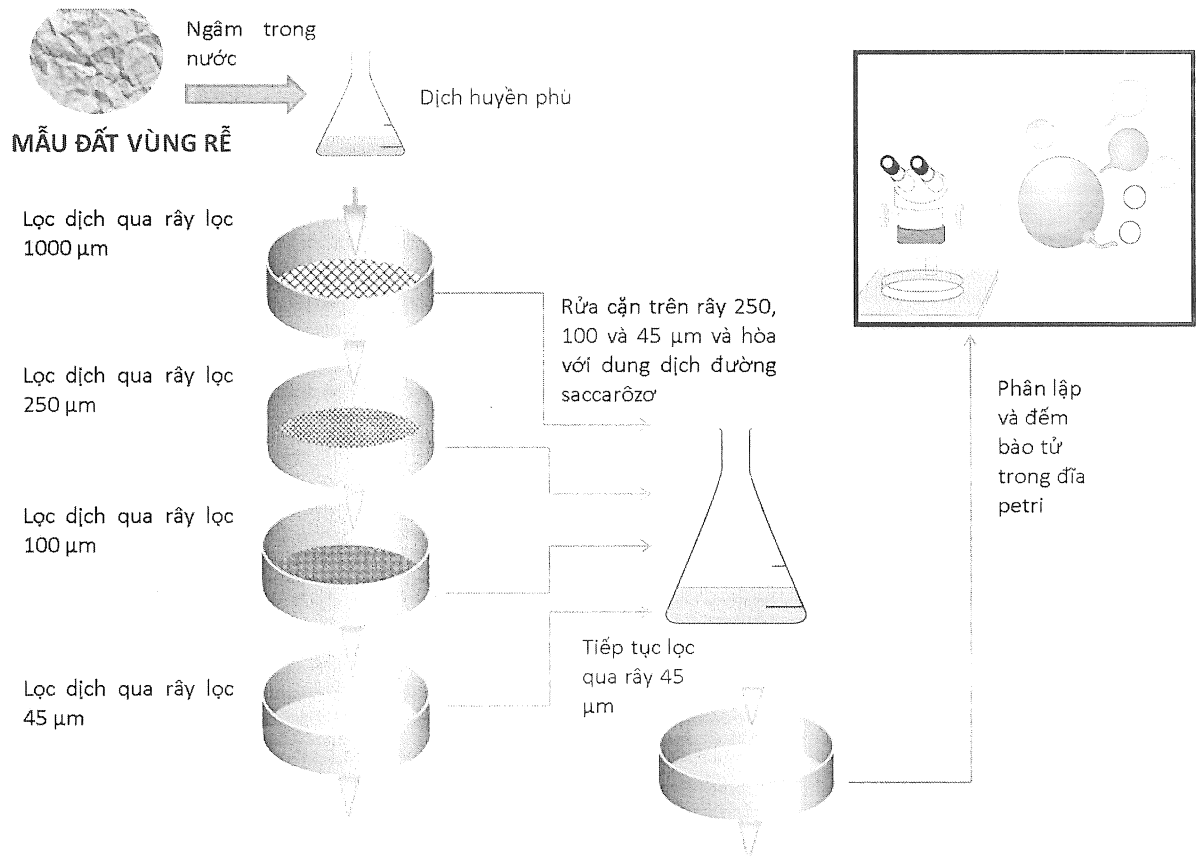


Fig. 1. Sơ đồ phân lập bào tử nấm rễ nội sinh từ mẫu đất.

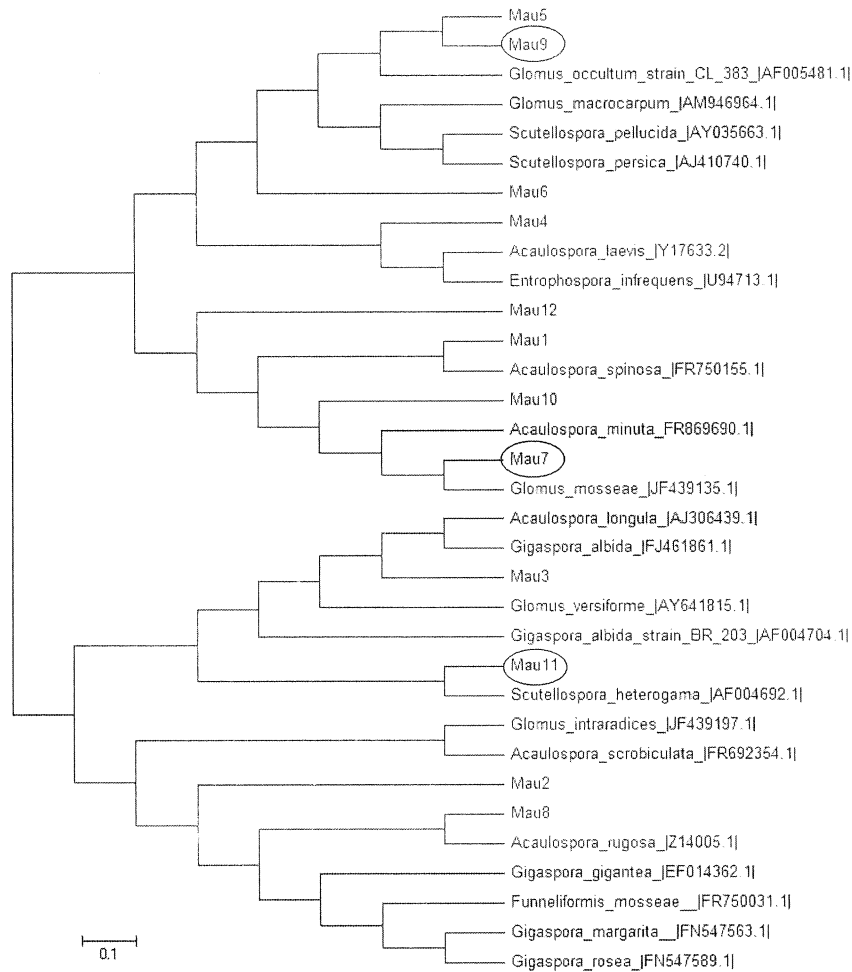


Fig. 2. Sơ đồ quan hệ phái sinh của ba chủng nấm rễ nội sinh *Gigaspora* sp. CPNR1. , *Glomus* sp. CPNR2 và *Scutellospora* sp. CPNR3 dựa trên phân tích sinh học phân tử.

Các chủng được đánh dấu vòng tròn (○) tương ứng với chủng *Glomus* sp. CPNR2 (Mau9), *Gigaspora* sp. CPNR1 (Mau7) và *Scutellospora* sp. CPNR3 (Mau11).

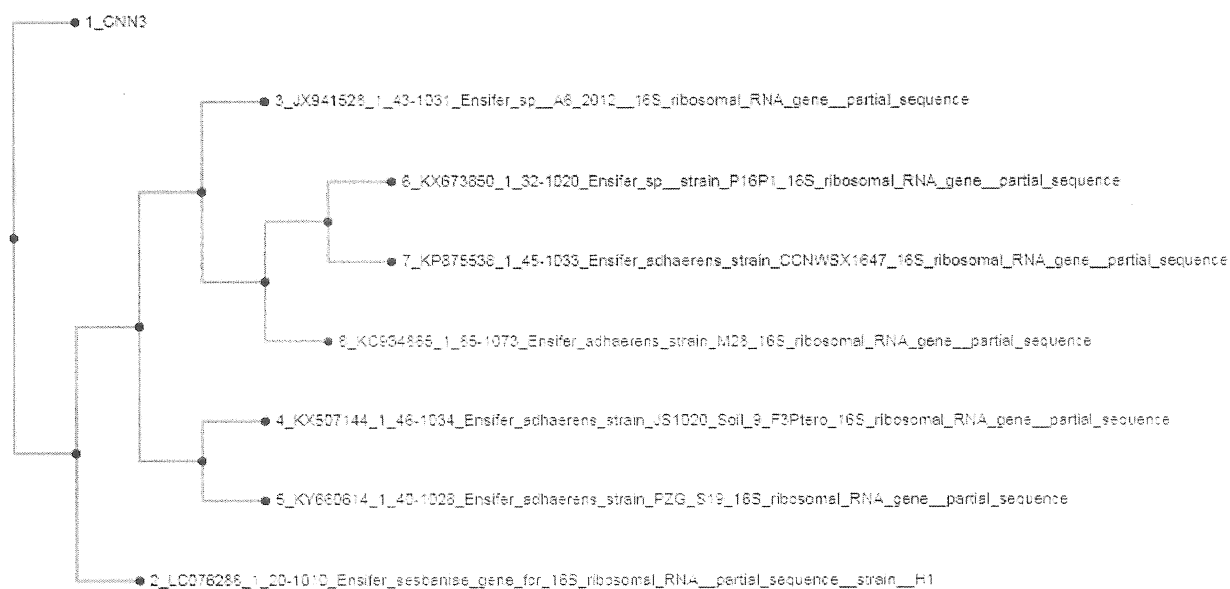


Fig.3. Cây phân loại của chủng vi khuẩn *Ensifer* sp. CNN3 dựa trên phân tích sinh học phân tử.

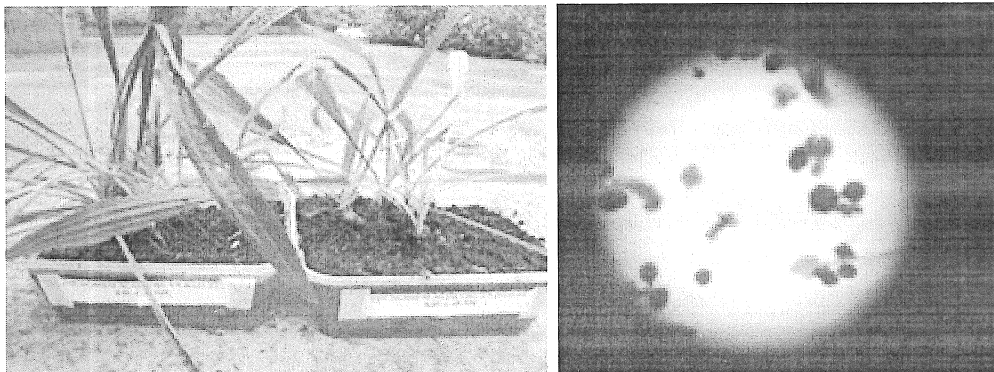


Fig. 4 Hình ảnh nhân nuôi nấm rễ *in vivo* trên cây Mã đề Ribwort (ảnh trái) và ảnh hiển vi của bào tử nấm rễ phân lập từ vùng rễ cây Mã đề Ribwort (x60) (ảnh phải).