



(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)



2-0003033

(51) **C05F 11/08; C12N 1/20**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00326

(22) 14/07/2020

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/09/2020 390A

(73) Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (VN)
10 Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(72) Lê Thị Thanh Thủy (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN VI SINH VẬT ĐA CHỨC NĂNG DÙNG CHO CÂY
ĐẬU TƯƠNG (GLYCINE MAX)

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng
cho cây đậu tương (*Glycine max*) bao gồm các bước chính:

(i) chuẩn bị dịch vi sinh vật;

(ii) chuẩn bị chất mang; và

(iii) phối trộn để tạo phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương (*Glycine max*).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh héo vàng cây do nấm *Fusarium oxysporum* đã gây thiệt hại đáng kể trong sản xuất nông nghiệp. Đây là bệnh hại vùng rễ cây trồng có nguồn gốc từ đất, mầm bệnh tồn tại lâu trong đất, tàn dư thực vật, phổ biến, nguy hiểm và phân bố rộng khắp trên thế giới, đặc biệt ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới về canh tác và chọn giống cây trồng, cũng như áp dụng biện pháp kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng các chế phẩm vi sinh, phân hữu cơ vi sinh chứa các chủng vi sinh vật đối kháng có khả năng ức chế và làm giảm độc tính của các chủng nấm gây bệnh trên. Một số nghiên cứu gần đây ở Ấn Độ, Trung Quốc, Đức, Nhật, Mỹ, Anh, Úc... cho thấy chế phẩm vi sinh tổng hợp bao gồm tập hợp các nhóm vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng vi sinh vật gây bệnh vùng rễ cây trồng như chế phẩm E2001, Phytobacter, Superlife v.v. có tác dụng đối với cây trồng tốt hơn so với từng nhóm riêng rẽ. Tuy nhiên do hệ vi sinh vật rất đa dạng, phong phú và mỗi vi sinh vật trong đất đều chịu nhiều tác động qua lại của các vi sinh vật khác cũng như điều kiện môi trường nên hiệu quả của các sản phẩm vi sinh trong các điều kiện bản địa khác nhau không giống nhau. Hiện nay chưa thấy có sản phẩm chuyên dùng cho cây đậu tương chứa hỗn hợp các chủng vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh và các nhóm vi sinh vật khác như phân giải lân, kích thích sinh trưởng và đặc biệt là nhóm vi sinh vật đối kháng chống nấm gây bệnh chết héo cây do *Fusarium oxysporum*.

Tại Việt Nam, trong nhiều năm qua các công trình nghiên cứu và thử nghiệm chế phẩm vi khuẩn nốt sần (chỉ chứa vi khuẩn *Rhizobium* - có khả năng cố định Nitơ cộng sinh) cho cây đậu đỗ cho thấy sử dụng chế phẩm chứa vi khuẩn nốt sần *Rhizobium* có thể thay thế phân đạm hóa học. Tuy nhiên việc tiên đoán được khả năng tồn tại, phát huy tác dụng của vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium* trong khu hệ vi sinh vật vùng rễ của cây đậu tương tại các vùng sinh thái khác nhau là khó xác định. Các kết quả nghiên cứu trên thế giới và trong nước cho thấy cần có các chế phẩm vi sinh đặc thù cho các loại cây trồng tại các vùng sinh thái cụ thể.

Bên cạnh việc áp dụng vi khuẩn nốt sần trong sản xuất, thì vi sinh vật có khả năng phân giải lân khó tan thành lân dễ tan cũng được dùng, có tác dụng nâng cao hiệu quả sử dụng, góp phần tiết kiệm một phần đáng kể phân bón vô cơ. Phân vi sinh vật, thông qua các hoạt chất sinh học của chúng còn có tác dụng điều hoà, kích thích quá trình sinh tổng hợp của cây trồng, đồng thời nâng cao sức đề kháng của cây trồng đối với một số sâu bệnh hại. Kết quả nghiên cứu cũng ghi nhận phân bón vi sinh vật có tác dụng làm giảm đáng kể tỷ lệ sâu bệnh hại cây trồng. Hiện nay trên thị trường Việt Nam chưa có chế phẩm/phân vi sinh chứa hỗn hợp vi khuẩn *Rhizobium* cộng sinh cây đậu tương và các vi sinh vật phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng chống nấm *Fusarium oxysporum* chuyên dùng cho cây đậu tương. Chỉ có một vài loại phân vi sinh vật hỗn hợp đã được đăng ký và được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cấp giấy phép sản xuất từ năm 2004 và 2007 là phân chuyên dùng cho cây lúa như Phân bón vi sinh đa chủng R3 chuyên cho lúa của Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch chứa vi khuẩn *Azotobacter*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Azospirillum*; Phân EM-MX của Công ty TNHH sản xuất và thương mại Mai Xuân sử dụng cho các loại cây chứa hỗn hợp vi sinh vật *Bacillus*, *Rhotopseudomonas*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*. Một số loại mới đăng ký (tháng 2, năm 2017) như Phân bón hữu cơ vi sinh Đồng Bảo Tín chứa vi khuẩn *Bacillus* và vi sinh vật cố định nitơ chuyên dùng cho cây ngắn ngày; Phân vi sinh TBS - F16 của Công ty TNHH thiết kế Garden Home sử dụng bón rễ cho cây trồng chứa hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus*, xạ khuẩn *Streptomyces*, nấm *Trichoderma*.

Trong giai đoạn từ 2006 đến nay, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa đã có một số chế phẩm vi sinh đặc hiệu cho phòng trừ bệnh héo xanh cây lạc, vừng, dưa hấu, cây họ đậu..., các sản phẩm là kết quả của các đề tài dự án như:

- Đề tài thuộc Chương trình Công nghệ sinh học trong nông nghiệp: “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật sử dụng trong phòng trừ bệnh héo xanh lạc và vừng”, giai đoạn 2007-2009. Các chế phẩm CP1 và CP2 chứa các vi sinh vật đối kháng đã được tạo ra, có hiệu quả phòng chống bệnh héo xanh cây lạc và vừng đạt trên 60% so với đối chứng

- Đề tài cấp thành phố Hà Nội: “Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh để thay thế phân bón hóa học và phòng chống một số bệnh cho cây họ đậu”, giai đoạn 2009-2010. Đề tài đã nghiên cứu và sản xuất được chế phẩm VSV1 và VSV2 sử dụng cho canh tác cây lạc và cây đậu tương. Chế phẩm chứa hỗn hợp các vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân, kích thích sinh trưởng và kháng bệnh cây trồng với mật độ vi khuẩn cố định nitơ đạt $\geq 10^9$ CFU/g; vi khuẩn kích thích sinh trưởng đạt $\geq 10^8$ CFU/g; vi khuẩn phân giải lân đạt $\geq 10^9$ CFU/g; vi khuẩn đối kháng đạt $\geq 10^9$ CFU/g. Chế phẩm sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản. Tuy nhiên quy cách đóng gói chế phẩm gồm 2 gói: 1 gói nhỏ sử dụng để

trộn hạt và 1 gói lớn sử dụng để bón lót vào rãnh trước khi trồng, các kết quả mới chỉ ở quy mô thí nghiệm.

Các chế phẩm vi sinh trên cần phải được hoàn thiện, cải tiến một số khâu trong quy trình sản xuất và sử dụng để có hiệu quả cao hơn, cũng như đáp ứng nhu cầu sản xuất lớn hơn.

Từ năm 2012 - 2015, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa đã chủ trì thực hiện thành công dự án sản xuất thử nghiệm (chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp): “Hoàn thiện công nghệ sản xuất và sử dụng chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn trên lạc”. Sản phẩm VSL10 của dự án đã được nghiên cứu hoàn thiện Quy trình sản xuất quy mô bán công nghiệp, chứa 02 chủng vi khuẩn đối kháng nhóm *Bacillus* và *Pseudomonas* và có tác dụng phòng trừ bệnh héo xanh cây lạc trên 60% so với đối chứng. Tuy nhiên sản phẩm của dự án mới chỉ được thử nghiệm trong thời gian ngắn và chỉ áp dụng trên cây lạc để phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn do *R. solanacearum*.

Trong giải pháp hữu ích này, phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương, chứa tập hợp các chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ cộng sinh cây đậu tương, phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng vi sinh vật gây bệnh chết héo cây. Vì vậy, ngoài tác dụng phòng chống bệnh héo do nấm *Fusarium oxysporum* gây ra, phân vi sinh vật đa chức năng còn giúp giảm sử dụng phân đạm khoáng, nâng cao hiệu quả sử dụng phân lân khoáng và kích thích cây trồng sinh trưởng, phát triển tốt, nâng cao khả năng phòng chống bệnh. Việc phối hợp các vi sinh vật với nhiều hoạt tính sinh học khác nhau trong một loại sản phẩm, chuyên dùng cho cây đậu tương, có thể tồn tại tốt cùng nhau trong chất mang và phát huy được hiệu quả của chúng trong vùng rễ của cây đậu tương (như cố định nitơ cộng sinh, kích thích sinh trưởng, phân giải lân khó tiêu thành dễ tiêu, phòng chống bệnh và nâng cao hiệu quả sử dụng phân khoáng...) là đặc tính ưu việt mà hiện nay chưa có loại phân bón nào trên thị trường trong nước có được. Các chủng vi sinh vật chứa trong phân vi sinh vật đa chức năng đã được lựa chọn kỹ lưỡng, có hoạt tính sinh học cao, đã được phân loại và đánh giá an toàn, ổn định trong thời gian dài, có thể sinh trưởng và phát triển tốt trên các loại môi trường rẻ tiền, dễ kiếm, dễ dàng áp dụng trong điều kiện sản xuất ở các quy mô khác nhau, một lượng nhỏ phân vi sinh vật đa chức năng nhưng ứng dụng trên một diện tích canh tác lớn (50-60 kg phân /ha). Công nghệ sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương đơn giản, không đòi hỏi nhiều máy móc, trang thiết bị hiện đại, nhưng đảm bảo mật độ tế bào các vi sinh vật tuyển chọn tương đương các sản phẩm chứa vi sinh vật sống của các đơn vị trong và ngoài nước (đạt $\geq 10^9$ CFU/g (vi khuẩn cố định nitơ); nấm men phân giải lân đạt $\geq 10^9$ CFU/g; vi khuẩn kích

thích sinh trưởng đạt 10^9 CFU/g; vi khuẩn đối kháng đạt $\geq 10^9$ CFU/g; Sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản.

Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương chứa các chất dinh dưỡng cung cấp cho cây đậu tương, các vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng, phát triển tiết ra các hoạt chất có lợi cho cây, có thể thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong phòng bệnh héo cây đậu tương và đặc biệt an toàn cho người sử dụng. Sản phẩm có giá thành thấp, hiệu quả kinh tế cao và dễ áp dụng tại các địa phương trồng đậu tương, góp phần phát triển nông nghiệp theo hướng bền vững, tạo sản phẩm an toàn cho người sử dụng. Đây là sản phẩm chuyên dùng cho canh tác cây đậu tương, chưa có sản phẩm tương tự tại thị trường trong nước.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương, nhằm khắc phục nhược điểm của các giải pháp kỹ thuật đã biết, tạo sản phẩm hữu ích cho phát triển nông nghiệp bền vững. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương, quy trình này bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dịch vi sinh vật;
- (ii) chuẩn bị chất mang;
- (iii) phối trộn để tạo phân vi sinh vật đa chức năng.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ khối quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương theo giải pháp hữu ích.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương (*Glycine max*) theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dịch vi sinh vật

Chủng giống gốc: 01 chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09 cộng sinh cây đậu tương, 01 chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B có khả năng phân giải lân, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* GL2 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, 01 chủng *Bacillus subtilis* BG4 có khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh chết héo cây đậu tương do *F.oxysporum*. Chủng giống gốc được lưu giữ bảo quản bằng các phương pháp chuẩn đảm bảo độ thuần chủng, cũng như hoạt tính sinh học. Giống gốc được cung cấp dưới dạng

ống thạch nghiêng và bảo quản trong điều kiện lạnh. Giống gốc trước khi sử dụng phải được hoạt hóa, kiểm tra độ thuần chủng cũng như hoạt tính sinh học.

Nhân giống cấp 1: Các chủng giống gốc được nuôi cấy riêng rẽ. Giống gốc được cấy truyền sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng cho từng chủng trước 48 giờ và sau đó cấy vào bình tam giác chứa dịch môi trường đặc hiệu cho từng chủng. Môi trường nhân giống cấp 1 được pha chế theo đúng thành phần môi trường đặc hiệu cho từng loại chủng giống. Hòa tan thành phần môi trường, điều chỉnh pH cho phù hợp với yêu cầu từng loại. Phân chia môi trường vào các bình tam giác (chú ý lượng dịch môi trường không lớn hơn 2/3 thể tích bình). Làm nút bông, bọc giấy sạch và khử trùng hơi nước bão hòa trong thời gian 20 phút (chú ý với môi trường có hàm lượng đường cao thời gian khử trùng không quá 15 phút). Sau khi cấy giống, các bình tam giác được đưa lên giàn máy lắc, tốc độ lắc 150 - 200 vòng/phút, ở điều kiện 30°C sau 48 giờ đối với các chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B, *Azotobacter beijerinckii* GL2, *Bacillus subtilis* BG4, thì sinh khối vi sinh vật đạt mật độ theo yêu cầu 10⁸ - 10⁹ CFU/ml; đối với chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09, thời gian nuôi cấy đạt mật độ 10⁹ CFU/ml sau 7 ngày.

Các loại môi trường nuôi cấy các chủng vi sinh vật:

Môi trường King B (Cao nấm men 5g; pepton 20g; glycerin 5 ml; K₂HPO₄ (12,5%) 12 ml; MgSO₄.7H₂O (6,25%) 25 ml; nước cất 1000 ml, pH 7,0 – 7,2; để nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* BG4);

Môi trường AT (CaCO₃ 20g; Glucoza 20g; K₂HPO₄ 0,8g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; KH₂PO₄ 0,2g; FeCl₃.6H₂O 0,1g; Na₂MoO₄.2H₂O 0,05g; nước cất 1000ml, pH 7,0 – 7,2; để nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter beijerinckii* GL2);

Môi trường YMB (K₂HPO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,2g; NaCl 0,1 g; Mannitol 10,0 g; Cao nấm men 0,5 g; CaCO₃ 0,5 g; Dung dịch công gô đỏ 1% 2,5 ml; nước cất 1000ml; pH 6,8 đến 7,0; để nhân sinh khối vi khuẩn *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09);

Môi trường Hansen (Glucoza 50,0 g; Pepton 10,0 g; KH₂PO₄ 3,0 g; MgSO₄.7H₂O 2,0 g; nước cất 1000ml; pH 5,0 đến 6,0; để nhân sinh khối nấm men *Saccharomyces cerevisiae* H_B).

Nhân giống cấp 2: Từ môi trường nhân giống cấp 1, giống phát triển tốt được cấy truyền 5% (v/v) sang môi trường nhân giống cấp 2. Môi trường nhân giống cấp 2 được pha chế theo thành phần môi trường nuôi cấy (Bảng 1), cách làm tương tự như chuẩn bị môi trường nhân giống cấp 1. Lượng dịch sau nhân giống cấp 2 bằng 1/6 khối lượng phân vi sinh vật đa chức năng VTN8-ĐT cần sản xuất.

Nhân giống cấp 2 ở các điều kiện nhiệt độ, thời gian nhân sinh khối thích hợp cho từng chủng (Bảng 2). Lượng khí được coi là vừa đủ khi thấy bọt khí nổi đều ở bình xả.

Bảng 1. Môi trường nhân giống cấp 2 các chủng vi sinh vật

TT	Chủng vi sinh vật	Thành phần môi trường (g/l)
1	<i>B. japonicum</i> ĐT09	Glucoza 7,68g; cao nấm men 9,52g; KH_2PO_4 0,48g; nước cất 1lít; pH 6,5-7,0 (MT1)
2	<i>B. subtilis</i> BG4	Glucoza 6,56 g, pepton 18,86 g, KH_2PO_4 0,91 g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT7)
3	<i>A. beijerinckii</i> GL2	Glucoza 75,0g; Pepton 10,0g; K_2HPO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT5)
4	<i>S. cerevisiae</i> H _B	Rỉ đường 1,81g; cao nấm men 0,96g; KH_2PO_4 0,22g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT4)

Bảng 2: Thông số kỹ thuật cơ bản trong nhân giống cấp 2 các chủng ĐT09, H_B, GL2, BG4

Thông số kỹ thuật	Ký hiệu chủng vi sinh vật			
	ĐT09	H _B	GL2	BG4
pH tối ưu	7,0	6,5	7,0	7,0
Nhiệt độ lên men tối ưu (°C)	30	28	30	30
Môi trường lên men	Môi trường MT1	Môi trường MT4	Môi trường MT5	Môi trường MT7
Tốc độ cánh khuấy (vòng/phút)	300	350	300	300
Lưu lượng cấp khí (m ³ không khí/giờ)	0,65	0,70	0,65	0,65
Thời gian nhân sinh khối (giờ)	144	72	42	42
Tỷ lệ giống cấp 1 (%)	5	5	5	5

Kiểm tra mật độ tế bào vi sinh vật tạp nhiễm: Sinh khối vi sinh vật sau khi nhân giống cấp 1 và 2 được kiểm tra độ thuần khiết và mật độ theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường đặc hiệu cho từng chủng. Kiểm tra vi sinh vật tạp nhiễm theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường thạch thịt pepton (Pepton 10,0g; Cao thịt 3,0g; Aga 20,0 g; nước cất đủ 1000ml; pH 6,5 đến 7,5).

Thu sinh khối vi sinh vật: sản phẩm sau quá trình nhân giống cấp 2 có mật độ tế bào đạt $10^8 - 10^9$ CFU/ml/chủng. Sinh khối thu được để phối trộn với chất mang tạo phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương chứa các chủng vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh, phân giải lân, kích thích sinh trưởng, đối kháng bệnh.

(ii) chuẩn bị chất mang

Chất mang chính để sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương là than bùn. Than bùn được phơi khô, loại bỏ tạp chất (thủy tinh, nilong...), nghiền nhỏ bằng máy nghiền và rây qua rây với kích thước 0,25 mm. Hạt than bùn càng mịn càng tốt. Bổ sung thêm 5% ri đường và 1% bột vỏ tôm cua (w/w); chất bảo quản 0,02% natri benzoat, trung hoà bằng vôi bột hoặc bột nhẹ (CaCO_3) đảm bảo chất mang có pH trung tính (6,5-7,0). Chất mang đã phối trộn trên được khử trùng bằng hơi nước bão hoà ở 121°C với thời gian 60 phút. Sau khi khử trùng chất mang được chuyển vào phòng trộn (đảm bảo vệ sinh sạch sẽ và không khí trong phòng được làm sạch bằng đèn cực tím (tia UV)).

Kiểm tra tạp nhiễm: Chất mang sau khử trùng được kiểm tra để phát hiện vi sinh vật tạp nhiễm theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường thạch thịt pepton.

(iii) phối trộn để tạo phân vi sinh vật đa chức năng

Sinh khối hỗn hợp chủng vi sinh vật sau nhân giống cấp 2 được bơm vào hệ thống phun men và phun trực tiếp vào các túi chất mang đã được xử lý, khử trùng và để nguội với tỷ lệ cứ 1 phần dịch vi sinh vật và 6 phần chất mang. Sau khi phun dịch vi sinh vật, ủ 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương sau ủ được cân định lượng và đóng túi theo nhu cầu sử dụng. Mật độ tế bào các chủng vi sinh vật trong túi phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương đảm bảo đạt 10^9 CFU/g/chủng. Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương được bảo quản ở nhiệt độ phòng $21-30^\circ\text{C}$ trong điều kiện thoáng mát, sạch sẽ, không để gần nơi chứa chất độc hóa học, thuốc trừ sâu. Thời gian sử dụng tốt nhất trong vòng 6 tháng sau ngày sản xuất.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Từ ống nghiệm giữ giống, giống gốc các chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B, *Azotobacter beijerinckii* GL2, *Bacillus subtilis* BG4 và chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09, được cấy truyền sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng cho từng chủng trước 48 giờ để hoạt hóa và sau đó cấy vào bình tam giác chứa dịch môi trường đặc hiệu cho từng chủng để nhân giống cấp 1. Giống gốc trước khi sử dụng phải được hoạt hóa, kiểm tra độ thuần chủng cũng như hoạt tính sinh học, chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B đạt đường kính vòng phân giải lân khó tan 9,0 mm (D-d), chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09 cộng sinh cây lạc có hoạt tính cố định nitơ đạt 512,0 nmol/ml/ngày, chủng *Azotobacter beijerinckii* GL2 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật sinh IAA 26,0 µg/ml sau 2-4 ngày nuôi cấy, chủng *Bacillus*

subtilis BG4 có đường kính vòng ức chế đường kính vòng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng 14,0 mm (D-d). Môi trường nhân giống cấp 1 được pha chế theo đúng thành phần môi trường đặc hiệu cho từng loại chủng giống. Hòa tan thành phần môi trường và điều chỉnh pH cho phù hợp với yêu cầu từng loại. Phân chia môi trường vào các bình tam giác (chú ý lượng dịch môi trường không lớn hơn 2/3 thể tích bình). Làm nút bông, bọc giấy sạch và khử trùng hơi nước bão hoà trong thời gian 20 phút (chú ý với môi trường có hàm lượng đường cao thời gian khử trùng không quá 15 phút). Sau khi cấy giống các bình tam giác được đưa lên giàn máy lắc, tốc độ lắc 150 - 200 vòng/phút, ở điều kiện 30°C sau 48 giờ đối với các chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B, *Azotobacter beijerinckii* GL2 và *Bacillus subtilis* BG4, thì sinh khối vi sinh vật đạt mật độ theo yêu cầu 10⁸ - 10⁹ CFU/ml; đối với chủng *Bradyrhizobium japonicum* DT09, thời gian nuôi cấy đạt mật độ 10⁹ CFU/ml sau 7 ngày.

Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy riêng rẽ, chủng *Bacillus subtilis* BG4 - môi trường King B, chủng *Azotobacter beijerinckii* GL2 - môi trường AT, chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B - môi trường Hansen, chủng *Bradyrhizobium japonicum* DT09 - môi trường YMB. Lượng giống cần thiết: 1,75 lít/chủng. Tổng lượng sinh khối vi sinh vật sau nhân giống cấp 1 là 7 lít/4 chủng vi sinh vật, chiếm 5% tổng lượng dịch môi trường sử dụng nhân giống cấp 2.

Môi trường nhân giống cấp 2 được pha chế trong nồi lên men 100 lít theo thành phần môi trường nuôi cấy trong Bảng 1, cách làm tương tự như chuẩn bị môi trường nhân giống cấp 1. Lượng dịch sau nhân giống cấp 2 bằng 1/6 khối lượng phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương cần sản xuất (để sản xuất 1000 kg phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương chứa các chủng vi sinh vật phân giải lân, kích thích sinh trưởng, đối kháng bệnh, lượng dịch vi sinh vật cần thu sau nhân giống cấp 2 khoảng 140 lít). Nhân sinh khối cấp 2 ở các điều kiện cho từng chủng như Bảng 2, lượng khí được coi là vừa đủ khi thấy bọt khí nổi đều ở bình xả.

Sinh khối vi sinh vật sau khi nhân giống cấp 2 được kiểm tra độ thuần khiết và mật độ theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường đặc hiệu cho từng chủng. Kiểm tra vi sinh vật tạp nhiễm theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường thạch thịt pepton. Sản phẩm sau quá trình nhân giống cấp 2 có mật độ tế bào đảm bảo đạt 10⁸ – 10⁹ CFU/ml/chủng. Lượng sinh khối thu được là 140 lít chuẩn bị để phối trộn với chất mang tạo phân VTN8-DT chứa các chủng vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh phân giải lân, kích thích sinh trưởng, đối kháng bệnh (860 kg).

Chuẩn bị chất mang: chất mang chính để sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương là than bùn. Than bùn được phơi khô, loại bỏ tạp chất (thủy tinh,

nilong...), nghiền nhỏ bằng máy nghiền và rây qua rây với kích thước 0,25 mm. Hạt than bùn càng mịn càng tốt. Bỏ sung vào than bùn 5% ri đường và 1% bột vỏ tôm cua (w/w); chất bảo quản 0,02 % natri benzoat. Sử dụng máy trộn nguyên liệu để trộn đều. Trung hoà hỗn hợp chất mang bằng vôi bột hoặc bột nhẹ (CaCO_3) đảm bảo chất mang có pH trung tính (6,5-7,0). Kiểm tra pH chất mang bằng máy đo pH. Chất mang phải đảm bảo pH trong khoảng 6,5-7,0 để vi sinh vật sinh trưởng, phát triển tốt.

Để sản xuất 1000 kg phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương, lượng than bùn cần thiết sau xử lý thô, phối trộn phụ gia... khoảng 860 kg. Chất mang được khử trùng bằng các phương pháp khác nhau. Phương pháp thông dụng nhất là khử trùng bằng hơi nước bão hoà. Khử trùng trong điều kiện 121°C với thời gian 60 phút. Sau khi khử trùng chất mang được chuyển vào phòng trộn (đảm bảo vệ sinh sạch sẽ và không khí trong phòng được làm sạch bằng đèn cực tím (tia UV). Sau khi để nguội các túi chất mang đã sẵn sàng để nhiễm sinh khối vi sinh vật. Chất mang sau khử trùng được kiểm tra để phát hiện vi sinh vật tạp nhiễm theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường thạch thịt pepton.

Phối trộn tạo phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương: Sinh khối hỗn hợp chủng vi sinh vật sau nhân giống cấp 2 được bơm vào hệ thống phun men và phun trực tiếp vào các túi chất mang đã được xử lý, khử trùng và để nguội với tỷ lệ cứ 1 phần dịch vi sinh vật và 6 phần chất mang. Sau khi phun dịch vi sinh vật, ủ 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm đã ủ 7 ngày, được cân định lượng (khối lượng 1 kg) và đóng vào các túi thiếc 3 biên, hàn kín bằng máy hàn miệng túi. Mật độ tế bào các chủng vi sinh vật trong phân dùng cho cây đậu tương đảm bảo đạt 10^9 CFU/g/chủng. Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương được bảo quản trong kho hàng, nhiệt độ phòng $21-30^\circ\text{C}$ trong điều kiện thoáng mát, sạch sẽ, không để gần nơi chứa chất độc hóa học, thuốc trừ sâu. Thời gian sử dụng cho cây đậu tương tốt nhất trong vòng 6 tháng sau ngày sản xuất.

Bảng 3. Mức chất lượng của phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương

TT	Chỉ tiêu chất lượng	Đơn vị đo	Mức chất lượng cần đạt
1	Mật độ tế bào vi sinh vật theo các nhóm hoạt tính:	CFU/g	
	- Cố định nitơ		$\geq 1,0 \times 10^9$
	- Phân giải lân		$\geq 1,0 \times 10^9$
	- Kích thích sinh trưởng		$\geq 1,0 \times 10^9$
	- Đối kháng bệnh héo cây lạc		$\geq 1,0 \times 10^9$
2	Hiệu quả phòng trừ bệnh héo cây do nấm <i>F. oxysporum</i>	%	> 60
3	Thời gian bảo quản ở điều kiện thường	tháng	> 6
4	Độ ẩm	%	< 30

(Theo Nghị định 84 của Chính phủ về quản lý phân bón ngày 14/11/2019)

Bảng 4. Nguyên vật liệu cho quá trình sản xuất 1 tấn Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương

TT	Nguyên vật liệu	Khối lượng	Tỷ lệ (%)	Độ ẩm (%)
1	Chất mang (than bùn: 765,228 kg; ri đường: 43 kg; bột vỏ tôm cua: 8,6 kg; natri benzoat: 0,172 kg; vôi bột hoặc bột nhẹ: 43 kg)	860 kg	86	12 - 14
2	Sinh khối vi sinh vật sau nhân giống cấp 2 (35 lít/chủng; 4 chủng)	140 lít	14	

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương (*Glycine max*) theo giải pháp hữu ích góp phần sản xuất ra được phân vi sinh vật chứa các vi sinh vật mang nhiều hoạt tính sinh học có lợi cho sinh trưởng, phát triển của cây đậu tương, cụ thể là bao gồm 01 chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09 cố định nitơ cộng sinh cây đậu tương, 01 chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B có khả năng phân giải lân khó tan thành dễ tan, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* GL2 có khả năng sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA: 3-Indole acetic acid), 01 chủng *Bacillus subtilis* BG4 có khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh chết héo cây đậu tương do *F.oxysporum*. Phân vi sinh vật đa chức năng cho cây đậu tương có tác dụng tiết kiệm 30-50% lượng phân N, 20-30% lượng phân P₂O₅, giúp cây trồng sinh trưởng, phát triển tốt, tăng khả năng chống chịu bệnh giảm tỷ lệ bệnh chết héo cây đậu tương do *F. oxysporum* gây ra trên 60%, giúp nâng cao năng suất, chất lượng sản phẩm, mang lại hiệu quả kinh tế cao cho người nông dân, do không phải sử dụng nhiều phân bón hóa học, thuốc trừ sâu, đặc biệt đây là sản phẩm sạch, an toàn, thân thiện với con người. Việc phối hợp các vi sinh vật với nhiều hoạt tính sinh học khác nhau trong một loại sản phẩm, có lợi cho cây trồng, chuyên dùng cho cây đậu tương, có thể tồn tại tốt cùng nhau trong chất mang và phát huy được hiệu quả của chúng trong vùng rễ của cây đậu tương (như cố định nitơ cộng sinh, kích thích sinh trưởng, phân giải lân khó tiêu thành dễ tiêu, phòng chống bệnh và nâng cao hiệu quả sử dụng phân khoáng...) là đặc điểm ưu việt, mang lại hiệu quả cao về nhiều mặt trong canh tác cây đậu tương theo hướng bền vững.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương (*Glycine max*) bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị dịch vi sinh vật bằng cách cấy truyền 01 chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09 cộng sinh cây đậu tương, 01 chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B có khả năng phân giải lân, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* GL2 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, 01 chủng *Bacillus subtilis* BG4 có khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh héo cây đậu tương do nấm *Fusarium oxysporum*, sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng cho từng chủng trước 48 giờ để hoạt hóa, sau đó cấy vào bình tam giác nhân giống cấp 1 chứa dịch môi trường đặc hiệu cho từng chủng, nuôi trên máy lắc tốc độ 150 - 200 vòng/phút, ở 30°C trong 48 giờ đối với các chủng *Bacillus subtilis* BG4, *Azotobacter beijerinckii* GL2, *Saccharomyces cerevisiae* H_B, và 7 ngày đối với chủng *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09, trong đó:

môi trường King B có thành phần cao nấm men 5g; pepton 20g; glyxerin 5 ml; K₂HPO₄ (12,5%) 12 ml; MgSO₄.7H₂O (6,25%) 25 ml; nước cất 1000 ml, pH 7,0 – 7,2; để nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* BG4,

môi trường AT có thành phần gồm CaCO₃ 20g; Glucoza 20g; K₂HPO₄ 0,8g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; KH₂PO₄ 0,2g; FeCl₃.6H₂O 0,1g; Na₂MoO₄.2H₂O 0,05g; nước cất 1000ml, pH 7,0 – 7,2; để nhân sinh khối vi khuẩn *Azotobacter beijerinckii* GL2,

môi trường YMB có thành phần gồm K₂HPO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,2g; NaCl 0,1 g; mannitol 10,0 g; cao nấm men 0,5 g; CaCO₃ 0,5 g; dung dịch công gô đỏ 1% 2,5 ml; nước cất 1000ml; pH 6,8 - 7,0; để nhân sinh khối vi khuẩn *Bradyrhizobium japonicum* ĐT09,

môi trường Hansen có thành phần gồm glucoza 50,0 g; pepton 10,0 g; KH₂PO₄ 3,0 g; MgSO₄.7H₂O 2,0 g; nước cất 1000ml; pH 5,0 - 6,0; để nhân sinh khối nấm men *Saccharomyces cerevisiae* H_B;

Từ môi trường nhân giống cấp 1, giống phát triển tốt, không tạp nhiễm được cấy truyền 5% (v/v) sang môi trường nhân giống cấp 2; môi trường nhân giống cấp 2 được pha chế thích hợp cho từng chủng, trong đó:

môi trường MT1 cho chủng *B. japonicum* ĐT09 có thành phần gồm glucoza 7,68g; cao nấm men 9,52g; KH₂PO₄ 0,48g; nước cất 1000ml; pH 7,0;

môi trường MT7 cho chủng *B. subtilis* BG4 có thành phần gồm glucoza 6,56g; pepton 18,86g; KH₂PO₄ 0,91g; nước cất 1000ml; pH 7,0;

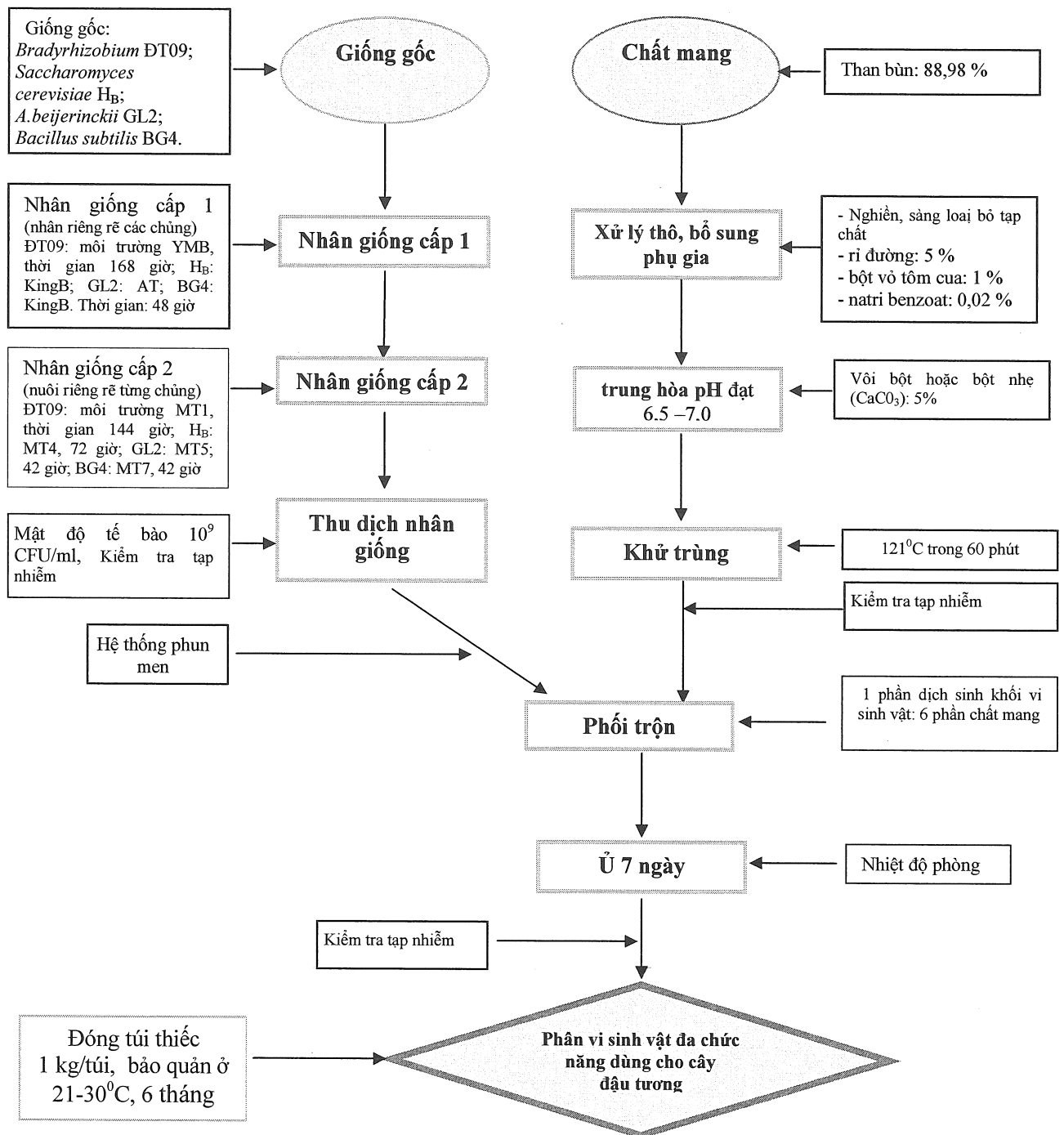
môi trường MT5 cho chủng *A. beijerinckii* GL2 có thành phần gồm glucoza 75,0g; pepton 10,0g; K₂HPO₄ 2,0g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; nước cất 1000ml; pH 7,0;

môi trường MT4 cho chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B có thành phần gồm rỉ đường 1,81g; cao nấm men 0,96g; KH₂PO₄ 0,22g; nước cất 1000ml; pH 6,5;

các chủng được nuôi với ở tốc độ khuấy 300 vòng/phút, riêng chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B khuấy 350 vòng/phút; nhiệt độ 30°C, riêng chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B được nuôi ở 28°C; tốc độ thổi khí 0,65 m³ không khí/giờ, riêng chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B được thổi 0,7 m³ không khí/giờ; thời gian nhân sinh khối chủng *B. japonicum* ĐT09 là 144 giờ, chủng *Saccharomyces cerevisiae* H_B là 72 giờ, chủng *A. beijerinckii* GL2 và *B. subtilis* BG4 là 42 giờ;

(ii) chuẩn bị chất mang bằng cách phơi khô than bùn, loại bỏ tạp chất, nghiền nhỏ bằng máy nghiền và rây qua rây với kích thước 0,25 mm, bổ sung thêm 5% rỉ đường và 1% bột vỏ tôm cua (w/w); chất bảo quản 0,02 % natri benzoat, trung hoà bằng vôi bột hoặc bột nhẹ (CaCO₃) để có pH trung tính (6,5-7,0), khử trùng bằng hơi nước bão hoà ở 121 °C với thời gian 60 phút;

(iii) phối trộn để tạo phân vi sinh vật đa chức năng bằng cách bơm giống cấp 2 vào hệ thống phun men và phun trực tiếp vào các túi chất mang với tỷ lệ cứ 1 phần dịch vi sinh vật và 6 phần chất mang, ủ 7 ngày ở nhiệt độ phòng thu được phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương có mật độ tế bào các chủng vi sinh vật đạt 10⁹ CFU/g/chủng.



Hình 1. Sơ đồ khối quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây đậu tương