



(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)



2-0003035

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00325

(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
LẠC (ARACHIS HYPOGAEA)**

(57)

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc (*Arachis hypogaea*) 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 lạc.

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 lạc (*Arachis hypogaea*).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* có nguồn gốc phát sinh từ trong đất được coi là một trong năm loại bệnh cây trồng thuộc đối tượng quan tâm nhất của chương trình phòng trừ sâu bệnh tổng hợp của FAO (1992) và chịu sự kiểm soát chặt chẽ của kiểm dịch quốc tế, nhất là các nước thuộc cộng đồng châu Âu, châu Mỹ. Bên cạnh đó bệnh thối gốc héo vàng gây ra do nấm *F. oxysporium* hại ở gốc thân, cây héo rũ, lá vàng cũng là một loại bệnh có nguồn gốc phát sinh từ trong đất, gây thiệt hại nghiêm trọng cho sản xuất nông nghiệp và rất khó phòng trừ bằng thuốc hóa học. 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 tính độc của *R. solanacearum* và *F. oxysporum*. Tuy nhiên, các biện pháp vẫn còn hạn chế là: khả năng giảm tỉ lệ bệnh còn thấp, thời gian bảo quản chế phẩm ngắn, hiệu quả chưa cao nên chưa đáp ứng nhu cầu của thực tiễn, v.v.. Mặt khác, do bản chất kháng bệnh và sự biến đổi đặc tính độc của các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* và nấm *F. oxysporum* trên toàn Thế giới, cho nên các biện pháp phòng trừ bệnh này càng trở nên phức tạp và khó khăn. Hầu hết các nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật đối kháng trên thế giới tập chung vào 2 chi: *Bacillus* và *Pseudomonas*, vì 2 chi vi khuẩn này có nhiều đặc tính sinh học phù hợp và hiệu quả cho sản xuất chế phẩm vi sinh trong phòng trừ bệnh cây trồng. Tuy nhiên cơ chế kháng vi khuẩn, nấm gây bệnh và ứng dụng của nó chưa được nghiên cứu sâu. Một số sản phẩm tiêu biểu có tác dụng phòng chống bệnh vùng rễ cây trồng như: Biosubtilin của Ấn Độ, EZB24 và Rhizo Plus của Đức và Cease của Mỹ và Mexico chứa vi khuẩn *B. subtilis*, sản phẩm Actinovate SP của Mỹ chứa xạ khuẩn *Streptomyces* sp., sản phẩm Bio-save của Mỹ chứa vi khuẩn *Pseudomonas syringae*.

Trong sản xuất cây đậu đỗ nói riêng và các cây trồng khác nói chung, ngoài các yếu tố về giống, đất đai điều kiện thời tiết khí hậu thì yếu tố kỹ thuật bón phân cho cây trồng có tính quyết định đến năng suất cây trồng và chất lượng sản phẩm. Cây đậu đỗ có thể tự cung cấp phần lớn nitơ cho nhu cầu của chúng trong quá trình sinh trưởng, phát triển và cung cấp một lượng nhất định nitơ cố định cho hệ thống đất thông qua hoạt động cố định nitơ cộng sinh với vi khuẩn *Rhizobium* (Nantakorn, 2002). Cố định

nitơ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần và cây lạc hàng năm cung cấp thêm cho đất và cây trồng 72-124 kgN/ha (FAO, 1984).

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 khác nhau không giống nhau. Hiện nay chưa thấy có sản phẩm chuyên dùng cho cây lạc 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 vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và nấm *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 chế phẩm vi khuẩn nốt sần có tác dụng nâng cao năng suất lạc vỏ 13,8-17,5% ở các tỉnh phía Bắc, miền Trung và 22% ở các tỉnh miền Nam. Lợi nhuận do chế phẩm vi khuẩn nốt sần được xác định đạt 442.000 VNĐ/ha (Ngô Thế Dân và ctv 2000). Đối với đậu tương và các cây họ đậu khác, bón chế phẩm vi khuẩn nốt sần cũng cho tác dụng tương tự. 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 lạc và 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.

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 đầu tư nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu của Phạm Văn Toàn (2001) cho thấy có thể thay thế 50% phân lân khoáng bằng quặng photphat và vi sinh vật phân giải lân mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Ngoài 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 lạc và các vi sinh vật phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng chống vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và nấm *Fusarium oxysporum* chuyên dùng cho cây lạc. 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*.

Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc (*Arachis hypogaea*), chứa tập hợp các chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ cộng sinh cây lạc, phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật, đối kháng vi sinh vật gây bệnh héo cây. Vì vậy, ngoài tác dụng phòng chống bệnh héo do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và nấm *Fusarium oxysporum* gây ra, phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc 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 lạc, có thể tồn tại tốt cùng nhau trong chất mang và phát huy được hiệu quả của chúng trong vùng rễ của cây lạc (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 dùng cho cây lạc 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 lạc 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); vi khuẩn 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 lạc (*Arachis hypogaea*) chứa các chất dinh dưỡng cung cấp cho cây lạc, 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 xanh cây lạc 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 lạc, góp phần phát triển nông nghiệp theo hướng bền vững, tạo sản phẩm an toàn cho người sử dụng. Đây là sản phẩm mang các đặc tính ưu việt, chuyên dùng cho canh tác cây lạc, 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 lạc (*Arachis hypogaea*), 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 lạc, 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 lạc 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 lạc theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dịch vi sinh vật

Chủng giống gốc: 01 chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10 (sau đây gọi là L10) cộng sinh cây lạc, 01 chủng *Bacillus subtilis* H_C (sau đây gọi là H_C) có khả năng phân giải lân, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* TL6 (sau đây gọi là TL6) có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, 01 chủng *Pseudomonas fluorescens* PU2 (sau đây gọi là PU2) có khả năng đối kháng bệnh héo cây lạc do *R.solanacearum* và *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 trong nước ấm, 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 *Bacillus subtilis* H_C, *Azotobacter beijerinckii* TL6, *Pseudomonas fluorescens* PU2, thì sinh khối vi sinh vật đạt mật độ theo yêu cầu 10⁸ - 10⁹ CFU/ml; đối với chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10, 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* H_C);

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* TL6);

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 - 7,0; để nhân sinh khối vi khuẩn *Bradyrhizobium yuanmingense* L10);

Môi trường SPA (Sacaroza 20,0 g; Pepton 5,0 g; K₂HPO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,25g; nước cất 1000ml; pH 6,8 đến 7,0; để nhân sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* PU2).

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 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 nuôi cấy (nhân giống cấp 2) các chủng vi sinh vật

TT	Chủng VSV	Thành phần môi trường (g/l)
1	<i>B. yuanmingense</i> L10	Glucoza 8,92g; cao nấm men 10,54g; KH ₂ PO ₄ 0,45g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT2)
2	<i>B. subtilis</i> H _C	Rỉ đường 1,81g; cao nấm men 0,96g; KH ₂ PO ₄ 0,22g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT3)
3	<i>A. beijerinckii</i> TL6	Glucoza 75,0g; Pepton 10,0g; K ₂ HPO ₄ 2,0g; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT5)
4	<i>P. fluorescens</i> PU2	Glucoza 2,58g, pepton 17,37g, KH ₂ PO ₄ 0,64g; nước cất 1 lít; pH 6,5-7,0 (MT6)

Bảng 2: Thông số kỹ thuật cơ bản trong nhân giống cấp 2 các chủng L10, H_C, TL6, PU2

Thông số kỹ thuật	Ký hiệu chủng vi sinh vật			
	L10	H _C	TL6	PU2
pH tối ưu	7,0	7,0	7,0	7,0
Nhiệt độ lên men tối ưu (°C)	30	30	30	30
Môi trường lên men	Môi trường MT2	Môi trường MT3	Môi trường MT5	Môi trường MT6
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	48	42	36
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 lạc 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 lạc 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% rỉ đường và 1% bột vỏ tôm cua (w/w); chất bảo quản 0,02 % Natri benzoat, sử dụng máy trộn nguyên liệu, trung hoà bằng vôi bột hoặc bột nhẹ (CaCO₃) 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 121⁰C 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 lạc 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 lạc đảm bảo đạt 10^9 CFU/g/chủng. Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc được bảo quản trong kho hàng, nhiệt độ phòng 21-30°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 *Bacillus subtilis* H_C, *Azotobacter beijerinckii* TL6, *Pseudomonas fluorescens* PU2 và *Bradyrhizobium yuanmingense* L10, 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 *Bacillus subtilis* H_C đạt đường kính vòng phân giải lân khó tan 10,8 mm (D-d), chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10 cộng sinh cây lạc có hoạt tính cố định nitơ đạt 672,7 nmol/ml/ngày, chủng *Azotobacter beijerinckii* TL6 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật sinh IAA 109,30 µg/ml sau 2-4 ngày nuôi cấy, chủng *Pseudomonas fluorescens* PU2 có đường kính vòng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh 18 mm (D-d) và đường kính vòng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng 12,5 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 trong nước ấm, để nguội 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 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 *Bacillus subtilis* H_C, *Azotobacter beijerinckii* TL6, *Pseudomonas fluorescens* PU2, thì sinh khối vi sinh vật đạt mật độ theo yêu cầu 10^8 - 10^9 CFU/ml; đối với chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10, thời gian nuôi cấy đạt mật độ 10^9 CFU/ml sau 7 ngày, hoạt tính.

Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy riêng rẽ, chủng *Bacillus subtilis* H_C - môi trường King B, chủng *Azotobacter beijerinckii* TL6 - môi trường AT, chủng

Pseudomonas fluorescens PU2 - môi trường SPA, chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10 - 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 lạc cần sản xuất (để sản xuất 1000 kg phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc 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 $10^8 - 10^9$ CFU/ml/chủng. Lượng sinh khối thu được là 140 lít chuẩn bị để phối trộn với chất mang tạo phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc 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 lạc 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 vào than bùn 5% rỉ đường và 1% bột vỏ tôm cua; 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 lạc, 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 lạc: 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 vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc đảm bảo đạt 10^9 CFU/g/chủng. Phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc được bảo quản trong kho hàng, nhiệt độ phòng, 21-30 °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 lạc 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 lạc

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 do vi khuẩn <i>R. solanacearum</i> và 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)

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc (*Arachis hypogaea*) theo giải pháp hữu ích góp phần sản xuất một loại phân vi sinh chứa các vi sinh vật với nhiều hoạt tính sinh học có lợi cho sinh trưởng, phát triển của cây lạc, cụ thể là gồm 01 chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10 cố định nitơ cộng sinh cây lạc, 01 chủng *Bacillus subtilis* H_C có khả năng phân giải lân khó tan thành dễ tan, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* TL6 có khả năng sinh hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA: 3-Indole acetic acid), 01 chủng *Pseudomonas fluorescens* PU2 có khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh héo cây lạc do *R. solanacearum* và *F. oxysporum*. Phân vi sinh vật đa chức năng cho cây lạc này 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 lạc do *R. solanacearum* và *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 lạc, có thể tồn tại tốt cùng nhau trong chất mang và phát

huy được hiệu quả của chúng trong vùng rễ của cây lạc (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 lạc theo hướng bền vững.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chức năng dùng cho cây lạc (*Arachis hypogaea*) bao gồm các bước:

(i) chuẩn bị dịch vi sinh vật bằng cách cấy truyền 01 chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10 cộng sinh cây lạc, 01 chủng *Bacillus subtilis* H_C có khả năng phân giải lân, 01 chủng *Azotobacter beijerinckii* TL6 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, 01 chủng *Pseudomonas fluorescens* PU2 có khả năng đối kháng bệnh héo cây lạc do *R.solanacearum* và *F.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 30⁰C trong 48 giờ đối với các chủng *Bacillus subtilis* H_C, *Azotobacter beijerinckii* TL6, *Pseudomonas fluorescens* PU2, và 7 ngày đối với chủng *Bradyrhizobium yuanmingense* L10, trong đó:

môi trường King B có thành phần gồm 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* H_C,

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* TL6,

môi trường YMB có thành phần gồm K₂HPO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,2g; NaCl 0,1g; mannitol 10,0g; 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 yuanmingense* L10),

môi trường SPA có thành phần gồm sacaroza 20,0 g; pepton 5,0 g; K₂HPO₄ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,25g; nước cất 1000ml; pH 6,8 - 7,0; để nhân sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* PU2;

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 MT2 cho chủng *B. yuanmingense* L10 có thành phần gồm glucoza 8,92g; cao nấm men 10,54g; KH₂PO₄ 0,45g; nước cất 1000ml; pH 6,5-7,0,

môi trường MT3 cho chủng *B. subtilis* H_C có thành phần gồm rỉ đường 1,81g; cao nấm men 0,96g; KH₂PO₄ 0,22g; nước cất 1000ml; pH 6,5-7,0,

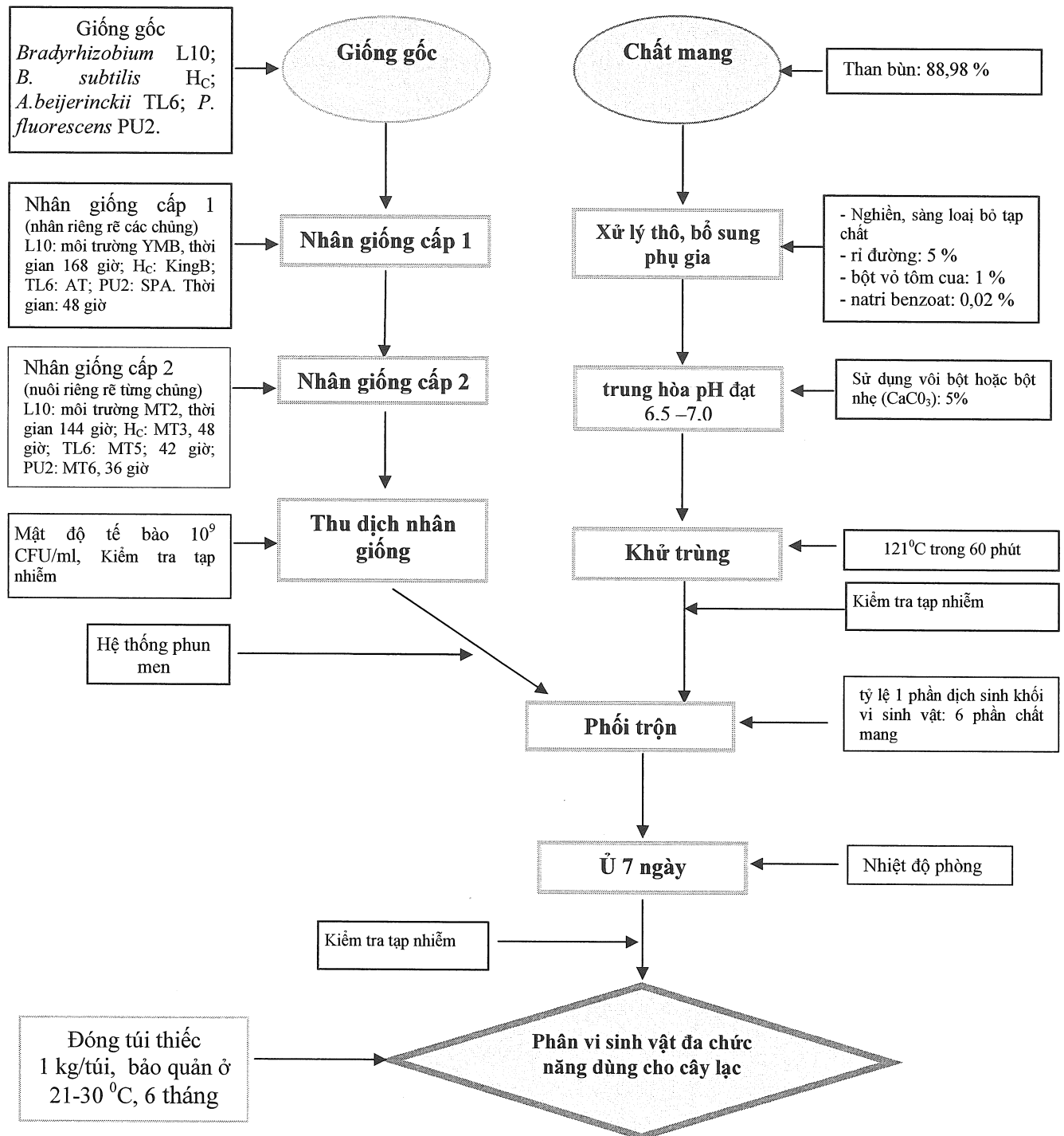
môi trường MT5 cho chủng *A. beijerinckii* TL6 có thành phần gồm glucoza 75,0g; pepton 10,0g; K₂HPO₄ 2,0g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; nước cất 1000ml; pH 6,5-7,0,

môi trường MT6 cho chủng *P. fluorescens* PU2 có thành phần gồm glucoza 2,58 g, pepton 17,37g, KH₂PO₄ 0,64 g; nước cất 1000ml; pH 6,5-7,0;

các chủng được nuôi với tốc độ khuấy 300 vòng/phút, riêng chủng *B. subtilis* H_C khuấy 350 vòng/phút, nhiệt độ 30°C, tốc độ thổi khí 0,65 m³ không khí/giờ, riêng chủng *B. subtilis* H_C được thổi 0,7 m³ không khí/giờ, thời gian nhân sinh khối chủng *B. yuanmingense* L10 là 144 giờ, chủng *B. subtilis* H_C là 48 giờ, chủng *A. beijerinckii* TL6 là 42 giờ, chủng *P. fluorescens* PU2 là 36 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% ri đường (w/w) và 1% bột vỏ tôm cua (w/w); chất bảo quản là 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 121⁰C 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 lạc 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 lạc