



(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)



2-0003081

(51)⁷ **C05F 11/00; C12N 1/20**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00275

(22) 11/07/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/01/2021 394

(73) 1. Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

Số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

2. Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A10, số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Hà Việt Sơn (VN); Chu Hoàng Hà (VN); Phạm Bích Ngọc (VN); Nguyễn Thị Hồng Hà (VN); Đỗ Thị Gấm (VN).

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VẬT NỘI SINH CHỨC NĂNG
DÙNG CHO CÂY CÀ PHÊ VÀ CHẾ PHẨM ĐƯỢC SẢN XUẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP
NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê (tên thương phẩm là CAFE - NS 01) để sử dụng trong canh tác cây cà phê theo hướng phát triển bền vững. Phương pháp theo giải pháp hữu ích bao gồm các công đoạn: (i) chuẩn bị dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật nội sinh là *Bacillus megaterium* 18R1, *Bacillus licheniformis* 3R1 và *Streptomyces* sp. 8T7; (ii) chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp vô trùng; (iii) phối trộn các dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy xốp vô trùng; (iv) nuôi ủ ở nhiệt độ 25 - 30°C trong thời gian 10 ngày; và (v) kiểm tra chất lượng và bảo quản sản phẩm.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm vi sinh vật nội sinh thu được từ phương pháp nêu bao gồm các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập và tuyển chọn từ các bộ phận của cây cà phê: *Bacillus megaterium* 18R1; *Bacillus licheniformis* 3R1 và *Streptomyces* sp. 8T7 có mật độ vi sinh vật $\geq 10^7$ CFU/g.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nông nghiệp, cụ thể là đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê và chế phẩm được sản xuất theo phương pháp này để sử dụng trong canh tác cây cà phê theo hướng phát triển bền vững.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Phần lớn vi sinh vật nội sinh có thể sống trong các mô thực vật và không gây bệnh hoặc tác động bất lợi tới quá trình phát triển bình thường của cây. Ngoài ra, vi sinh vật nội sinh còn được nhiều nhà khoa học nghiên cứu về khả năng sinh kháng sinh, enzym, chất kích thích sinh trưởng thực vật, ức chế và kiểm soát bệnh thực vật.

Vi sinh vật được tuyển chọn cho việc sản xuất phân bón vi sinh là những vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu quả đối với đất và cây trồng. Phân bón vi sinh có nhiều ưu điểm so với phân bón hóa học, ngoài tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng, tiết kiệm phân vô cơ, giảm chi phí sản xuất thì phân vi sinh còn góp phần quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và phát triển bền vững. Việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất phân vi sinh đang được coi là tiềm năng để nâng cao năng suất cây trồng bởi có chứa các vi sinh vật sống mà khi sử dụng cho hạt giống, bề mặt cây, rễ cây làm cho cây sinh trưởng mạnh mẽ.

Vi sinh vật nội sinh là những vi sinh vật sinh trưởng trong mô tế bào thực vật, không gây ra những hiệu ứng xấu tới cây chủ. Như vậy, vi sinh vật nội sinh không những không gây ảnh hưởng mà còn tăng cường khả năng trao đổi chất, kích thích sinh trưởng, miễn dịch cho vật chủ bằng cách tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất... (Adhikari và Bansnyat, 1999). Phần lớn các vi sinh vật nội sinh thường là các chủng vi khuẩn, nấm mốc và xạ khuẩn được phân lập từ đất, vùng rễ, bề mặt hoặc trong các mô thực vật. Trong số các vi sinh vật nội sinh, xạ khuẩn được chú ý bởi khả năng tổng hợp kháng sinh ức chế vi sinh vật gây bệnh. Song song với tác dụng được lý thu nhận từ xạ khuẩn nội sinh, một số nhà sinh vật học đã nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học (biocontrol) của xạ khuẩn nội sinh trong suốt hai thập kỷ qua. Xạ khuẩn đã được chứng minh khả năng tăng cường, thúc đẩy tăng trưởng của cây chủ, giảm nguy cơ nhiễm mầm bệnh và tăng cường khả năng sống sót của cây chủ trong các điều kiện khác nhau (Strobel *et al.*, 2004). Những hiểu biết về sinh lý và mối tương tác phân tử giữa xạ khuẩn và thực vật là những đặc tính quan trọng để khai thác những đặc tính có lợi của vi sinh vật nội sinh trong kích thích sinh trưởng thực vật và trong lĩnh vực khác. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định vai trò quan trọng của vi sinh vật trong sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật. Sự đa dạng của vi sinh vật nội sinh trong mô thực vật là rất phong phú, hứa hẹn tiềm năng khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học và các hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật do các chủng vi sinh vật này sinh ra trong nhiều lĩnh vực của đời sống. Các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật nội sinh được chứng

minh là rất đa dạng về mặt số lượng và hoạt tính sinh học như: các chất kiểm soát sinh học, chất kháng vi sinh vật, kháng ung thư, chống oxy hóa, chống sốt rét, chất diệt cỏ, chất kích thích sinh trưởng... (Bacon và White, 2000). Vì vậy, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính sinh học nói chung và chất kích thích sinh trưởng thực vật nói riêng từ vi sinh vật nội sinh trên thực vật tự nhiên đang là hướng nghiên cứu triển vọng của các nhà khoa học trên thế giới.

Dịch hại ở vùng rễ của cây cà phê do rất nhiều loại vi sinh vật gây ra như nấm, vi khuẩn, tuyến trùng, rệp sáp, sâu non bọ cánh cứng..., đây đều là những đối tượng gây hại nghiêm trọng và ảnh hưởng lớn đến năng suất cây cà phê. Trong các năm qua đã có nhiều kết quả sử dụng các vi sinh vật đối kháng để phòng trừ các loại bệnh hại trên cây cà phê, điển hình là sử dụng các chế phẩm nấm *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Paecilomices*, *Verticillium*, *Metarhizium*, *Beuveria*, vi khuẩn BT (*Bacillus thuringiensis*); virus *Nucleopolyhedrovirus* (NPV); tuyến trùng EPN (*Entomopathogenic nematodes*).... và cũng có nhiều loại phân bón vi sinh được sử dụng cho cây cà phê, như phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh của Tổng Công ty Sông Gianh, phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm của Tập đoàn Quế Lâm, chế phẩm vi sinh FUSA – USA nhập khẩu từ Mỹ... Các loại chế phẩm vi sinh vật này được sản xuất đại trà và sử dụng chung cho nhiều loại cây trồng. Vì vậy, nhiều chủng vi sinh trong các chế phẩm này không thích hợp cho sự sinh trưởng của cây cà phê. Do đó khi sử dụng để bón cho cây cà phê hiệu quả đạt được không cao. Tuy nhiên, hiện nay trên thị trường ở nước ta chưa có loại phân bón hoặc chế phẩm vi sinh vật nội sinh nào chuyên dùng cho cây cà phê.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là tạo ra một loại chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng chuyên dùng cho cây cà phê phù hợp với đặc tính sinh trưởng của cây cà phê nhằm kích thích tăng trưởng, tăng khả năng miễn dịch cho cây cà phê, nâng cao năng suất cây trồng và sản lượng cà phê khi thu hoạch.

Để đạt được các mục đích trên đây, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê (tên viết tắt là CAFE – NS 01) bao gồm các vi sinh vật nội sinh trong cây cà phê được lựa chọn, phân lập và nuôi cấy trong môi trường thích hợp để đạt được mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g.

Chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê được sản xuất theo phương pháp của giải pháp hữu ích này bao gồm:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus megaterium* 18R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* 3R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. 8T7 được phân lập và tuyển chọn từ thân cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 97% môi trường nuôi cấy xốp là hỗn hợp chất mang.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Giải pháp hữu ích sẽ được trình bày chi tiết và rõ ràng hơn sau đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê theo giải pháp hữu ích;

Hình 2 là hình ảnh của chủng xạ khuẩn 8T7 gồm: a) Hình thái khuẩn lạc; b) Cuống sinh bào tử c) Bề mặt bào tử;

Hình 3 là hình ảnh cây cà phê ở công thức Đối chứng và TN1 sau 14 ngày lây nhiễm vi sinh vật nội sinh;

Hình 4 là hình ảnh cây cà phê ở công thức Đối chứng và TN2 sau 14 ngày lây nhiễm vi sinh vật nội sinh;

Hình 5 là hình ảnh cây cà phê ở công thức Đối chứng, TN1 và TN2 sau 28 ngày lây nhiễm vi sinh vật nội sinh;

Hình 6 là ảnh ấu trùng *Meloidogyne incognita* chết sau 5 ngày thử nghiệm;

Hình 7 là ảnh ấu trùng *Meloidogyne incognita* chết sau 7 ngày thử nghiệm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê theo giải pháp hữu ích được xây dựng trên các nguyên tắc cơ bản sau đây:

- Chế phẩm vi sinh nội sinh chức năng (CAFE - NS 01) được sản xuất theo nguyên tắc nuôi cấy trên môi trường xốp vô trùng (chất mang). Chất mang được dùng là than bùn có kèm theo một số phụ gia như cám, trấu, đất, vôi bột... Chế phẩm chứa trong túi polyetylen, bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

- Các chủng vi sinh vật nội sinh đã được thử khả năng đối kháng trên thạch đĩa và trong chế phẩm. Các chủng đồng thời sống hoà hợp với nhau trong môi trường xốp thanh trùng, vì vậy các chủng này được lựa chọn để đưa vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng.

- Trong các loại chế phẩm vi sinh vật, chủng giống có ý nghĩa quyết định đối với chất lượng của sản phẩm. Vì vậy các chủng giống phải tuyển chọn sao cho có hoạt tính sinh học cao, có khả năng cạnh tranh để sinh trưởng và hoạt động tốt trong các môi trường sinh thái đất. Đồng thời các chủng phải giữ được hoạt tính qua thời gian bảo quản thì mới đảm bảo có quy trình công nghệ sản xuất ổn định.

- Chế phẩm được tối ưu hoá thành phần và điều kiện nuôi cấy để đạt mật độ từ 10^7 CFU/g trở lên sau 1 tuần cấy vào môi trường nuôi cấy xốp và các chủng đều sinh trưởng và phát triển tốt trong chế phẩm. Chế phẩm có thể bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng (đạt mật độ theo tiêu chuẩn ngành Nông nghiệp TCN 6167-1997). Hoạt tính sinh học của các chủng phải bảo đảm không bị mất đi sau thời gian bảo quản.

Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê theo quy trình công nghệ như được thể hiện trên Hình 1, bao gồm các công đoạn sau:

1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi vật nội sinh chức năng từ các bộ phận của

cây cà phê là *Bacillus megaterium* 18R1, *Bacillus licheniformis* 3R1, *Streptomyces* sp. 8T7. Chuẩn bị các môi trường dịch thể LB và ISP5, khử trùng môi trường dịch thể ở 121°C trong 30 phút. Các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết từ môi trường thạch nghiêng được nhân giống trên môi trường dịch thể bằng nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cấy cho mỗi loại vi sinh vật (khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^6 - 10^9 CFU/g thì cấy vào môi trường nuôi cấy xộp).

2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xộp bằng cách phối trộn cát, than bùn, trấu nghiền, cám, vôi bột, chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng theo tỉ lệ khối lượng:

- cát:	30%
- than bùn:	40%
- trấu nghiền:	15%
- cám:	10%
- vôi bột:	2%
- chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng (Gồm $ZnSO_4$, $MnCl_2$, H_3BO_3 , $CoCl_2$, $CuCl_2$, $NiCl_2$, Na_2MoO_4 , nồng độ các chất khoảng từ 0,01% - 0,05%)	1%
- nước	2%

Tiếp theo là khử trùng môi trường nuôi cấy xộp ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 90 phút.

3. Phối trộn các dịch nuôi vào môi trường nuôi cấy xộp vô trùng theo tỉ lệ khối lượng:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus megaterium* 18R1,
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* 3R1;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. 8T7; và
- 97% môi trường nuôi cấy xộp vô trùng.

4. Duy trì môi trường nuôi cấy (nuôi ủ) ở nhiệt độ 25 – 30°C, kiểm tra mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm (Mật độ vi sinh vật khi mới cấy đạt 10^6 đến 10^7 tế bào trong 1g (CFU/g) chế phẩm. Sau 10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10^7 CFU/g trở lên (đáp ứng TCVN).

5. Bảo quản chế phẩm: Chế phẩm được bảo ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời (tốt nhất là trong bóng tối) cho đến khi sử dụng. Trong quá trình bảo quản cần theo dõi mật độ vi sinh vật trong chế phẩm định kì hàng tháng. Chế phẩm đạt mật độ vi sinh vật cao nhất sau 3 tháng. Tuy nhiên, chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng (được đặt tên là CAFE-NS 01) được sản xuất theo phương pháp như trên bao gồm các thành phần theo tỉ lệ khối lượng sau:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus megaterium* 18R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* 3R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. 8T7 được phân lập và tuyển chọn từ thân cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và

- 97% môi trường nuôi cấy xốp.

Sản phẩm được tạo ra là chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê (tên viết tắt là CAFE-NS 01), được bảo quản ở nơi khô, mát, tránh ánh sáng mặt trời. Sử dụng trong vòng 6 tháng kể từ ngày sản xuất.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật các bộ phận của cây cà phê bao gồm rễ, thân.

Tên chủng: *Bacillus megaterium* 18R1; *Bacillus licheniformis* 3R1; *Streptomyces* sp. 8T7

Chức năng: Các chủng vi sinh vật có chức năng kích thích sinh trưởng, diệt tuyến trùng gây hại cho cây cà phê.

Đặc điểm phân loại:

Chủng *Bacillus megaterium* 18R1

Phân loại theo đặc điểm hình thái

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của các chủng *Bacillus megaterium* 18R1

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LB	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Bacillus megaterium</i> 18R1	Khuẩn lạc tròn, màu vàng mờ, bóng, ướt nhầy, lõi, viền trong, đường kính 2 mm	Tế bào hình que nhỏ, hai đầu tròn, kích thước 0,5-0,7 x 1,5-2,2 μ m, đứng đơn lẻ	+	+

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lí

Bảng 2. Đặc điểm sinh lí của các chủng *Bacillus megaterium*

TT	Đặc điểm	18R1
1	Hiếu khí bắt buộc	+

2	Vi hiếu khí	+
3	Phép thử catalaza	+
4	Khả năng lên men	+
5	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	35°C
6	pH cho sinh trưởng	7,0 - 7,4
7	Nồng độ NaCl sinh trưởng (%)	1 - 9

Để định tên đến loài, đã tiến hành đánh giá các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn được chọn.

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh hóa

Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* 18R1

Sử dụng kit chuẩn API 50CHB để đánh giá khả năng lên men trên các nguồn cơ chất khác nhau của chủng vi khuẩn này. API 50CHB là kit dùng để nhận diện vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và các chi gần với *Bacillus* về mặt di truyền dựa trên khả năng sử dụng các nguồn cơ chất. Phân loại được thực hiện dựa trên khả năng lên men 49 loại đường. Trong suốt quá trình nuôi cấy, chủng vi khuẩn sử dụng cơ chất, lên men tạo thành axit làm giảm pH, được nhận biết bằng sự đổi màu chất chỉ thị. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng lên men sinh axit từ các nguồn cơ chất của chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* 18R1 dựa trên kit chuẩn API 50CHB

TT	Đặc điểm	18R1	TT	Đặc điểm	18R1
1	Glycerol	+	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	Cellobioza	+
3	D-Arabinosa	-	28	Maltoza	+
4	L- Arabinosa	+	29	Lactoza	±
5	Riboza	+	30	Melibioza	+
6	D-Xyloza	+	31	Sucroza	+
7	L-Xyloza	-	32	Trehaloza	+
8	Adonitol	-	33	Inulin	±
9	β -Methylxylosit	-	34	Melezitoza	-
10	Galactoza	+	35	D-Raffinoza	+
11	D-Glucoza	+	36	Tinh bột	+
12	D-Fructoza	+	37	Glycogen	+
13	D-Mantoza	-	38	Xylitol	-
14	L-Sorboza	-	39	β -Gentiobioza	±

15	Rhamnoza	-	40	D-Turanoza	±
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxoza	-
17	Inositol	±	42	D-Tagatoza	-
18	Mannitol	+	43	D-Fucoza	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucoza	-
20	α-Methyl-D-mannosit	-	45	D- Arabitol	-
21	α-Methyl-D-glucosit	-	46	L- Arabitol	-
22	N-Axetylglucosamin	+	47	Gluconate	-
23	Amygdalin	+	48	2-Ketogluconate	-
24	Arbutin	+	49	5-Ketogluconate	-
25	Aesculin	+			

Kết quả xác định được đối chiếu với dữ liệu phần mềm cho thấy chủng 18R1 có các đặc điểm sinh hoá gần nhất với *B. megaterium*, chỉ số xác định id ≥ 98 %. (% id - mức độ gần gũi liên quan với những đơn vị phân loại khác của cơ sở dữ liệu $\geq 90,0$ % được cho là xác định tốt).

Phân loại vi khuẩn phân có khả năng kích thích sinh trưởng dựa trên trình tự gen 16S rARN

Kết quả Blast lên NCBI cho thấy chủng 18R1 có trình tự gần nhất với chủng *Bacillus megaterium*, với mức độ tương đồng 99,2%.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, kit chuẩn API 50CHB, trình tự gen 16S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey chủng 18R1 được phân loại là *Bacillus megaterium*.

Chủng *Bacillus lichenformis* 3R1

Phân loại theo đặc điểm hình thái

Bảng 4. Đặc điểm hình thái của các chủng *Bacillus lichenformis* 3R1

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LB	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Bacillus lichenformis</i> 3R1	Khuẩn lạc tròn, rìa răng cưa không đều, màu vàng sữa, khi già nhẵn, màu hơi nâu, đường kính 3mm	Tế bào hình que nhỏ, hai đầu tròn, kích thước 0,7-0,8 x 1,8-2,5 μm , đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn. Có tiêm mao.	+	+

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lý

Bảng 5. Đặc điểm sinh lý của các chủng *Bacillus lichenformis* 3R1

TT	Đặc điểm	3R1
1	Hiếu khí bắt buộc	+
2	Vi hiếu khí	+
3	Phép thử catalaza	+
4	Khả năng lên men	+
5	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	37°C
6	pH cho sinh trưởng	7,0
7	Nồng độ NaCl sinh trưởng (%)	1 – 7

Để định tên đến loài chúng tôi tiếp tục đánh giá các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh hóa

Bảng 6. Khả năng lên men sinh axit từ các nguồn cơ chất của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* 3R1 dựa trên kit chuẩn API 50CHB

TT	Đặc điểm	3R1	TT	Đặc điểm	3R1
1	Glycerol	+	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	Cellobioza	+
3	D-Arabinosa	-	28	Maltoza	+
4	L- Arabinoza	+	29	Lactoza	±
5	Riboza	+	30	Melibioza	-
6	D-Xyloza	+	31	Sucroza	+
7	L-Xyloza	-	32	Trehaloza	+
8	Adonitol	-	33	Inulin	±
9	β -Methylxylosit	-	34	Melezitoza	-
10	Galactoza	+	35	D-Raffinoza	-
11	D-Glucoza	+	36	Tinh bột	+
12	D-Fructoza	+	37	Glycogen	+
13	D-Mantoza	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorboza	-	39	β -Gentiobioza	±
15	Rhamnoza	-	40	D-Turanoza	±
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxosa	-
17	Inositol	±	42	D-Tagatoza	+
18	Mannitol	+	43	D-Fucoza	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucoza	-

20	α -Methyl-D-mannosit	-	45	D- Arabitol	-
21	α -Methyl-D-glucosit	+	46	L- Arabitol	-
22	N-Axetylglucosamin	+	47	Gluconate	-
23	Amygdalin	$\pm$	48	2-Ketogluconate	-
24	Arbutin	+	49	5-Ketogluconate	-
25	Aesculin	+			

Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S rARN

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá, kit chuẩn API 50CHB , trình tự gen 16S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey chủng 3R1 được phân loại là *Bacillus licheniformis*.

Chủng *Streptomyces* sp. 8T7

Đặc điểm hình thái

Màu sắc khuẩn lạc của một chủng xạ khuẩn khi nuôi trên các môi trường từ ISP1 đến ISP7 thường khác nhau, đây là yếu tố đầu tiên để phân loại xạ khuẩn theo khóa định tên loài xạ khuẩn ISP (1974) và khóa phân loại Bergey (1963). Khuẩn ty khí sinh (KTKS) và khuẩn ty cơ chất (KTCC) của chủng 8T7 được so với bảng màu của Tresner và Backus (Tresner, 1963). Theo đó thì xạ khuẩn được phân thành 7 nhóm theo màu sắc của khuẩn ty khí sinh và 5 nhóm theo màu của khuẩn ty cơ chất. Cùng với màu sắc của khuẩn lạc thì khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành melanin cũng là một trong những tiêu chuẩn cơ bản để phân biệt các chủng xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn 8T7 được nuôi cấy trên các môi trường ISP khác nhau để theo dõi sự biểu hiện các đặc tính của chủng. Khuẩn ty khí sinh của chủng xạ khuẩn 8T7 trên các môi trường ISP4, ISP5 và ISP7 có màu vàng, màu xám trên các môi trường ISP1, ISP2, ISP3, khi nuôi trên môi trường ISP6, khuẩn ty khí sinh của 8T7 có màu trắng. Khuẩn ty cơ chất của chủng 8T7 trên các môi trường nuôi cấy đều có màu vàng, trừ trên môi trường ISP2 - màu xám. Màu sắc môi trường nuôi cấy không thay đổi, chứng tỏ chủng xạ khuẩn 8T7 không sinh sắc tố tan, melanin (Bảng 7). Như vậy, chủng 8T7 mang đầy đủ các đặc điểm chung của xạ khuẩn theo khóa phân loại của Bergey (1963).

Bảng 7. Đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn 8T7 trên các môi trường ISP

Môi trường	Khuẩn ty		Sắc tố	
	KTKS	KTCC	Sắc tố tan	Melanin
ISP1	Xám	Vàng	-	-
ISP2	Xám	Xám	-	-
ISP3	Xám	Vàng	-	-
ISP4	Vàng	Vàng	-	-

ISP5	Vàng	Vàng	-	-
ISP6	Trắng	Vàng	-	-
ISP7	Vàng	Vàng	-	-

Ghi chú: KTKS: khuẩn ty khí sinh; KTCC: khuẩn ty cơ chất; -: không có Đặc điểm sinh học của chủng xạ khu 1262.

Các đặc điểm này được sử dụng để phân loại xạ khuẩn theo phương pháp truyền thống dựa vào khóa định tên loài xạ khuẩn ISP (1974) và khóa phân loại Bergey (1963). Bề mặt bào tử của chủng 8T7 xù xì, cuống sinh bào tử dạng xoắn ốc, số lượng bào tử khoảng 30 - 50 bào tử/chuỗi (Hình 1).

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của xạ khuẩn là khả năng đồng hóa các nguồn carbon và nitơ khác nhau, đây là chỉ tiêu quan trọng để phân loại xạ khuẩn theo Nomomura trong ISP (1974). Do đó, chúng tôi đã nuôi chủng 8T7 trên môi trường ISP9, ISP8 có bổ c nguồn đường, nguồn nitơ khác nhau. Kết quả thí nghiệm (Bảng 8) cho thấy khuẩn ty của chủng 8T7 phát triển tốt trên các môi trường có các nguồn đường kiểm tra, trừ trên môi trường có raffinosa và đối chứng âm chủng hầu như không phát triển. Bên cạnh đó, chủng 8T7 chỉ có khả năng sử dụng được một số ít các nguồn nitơ bao gồm: Methionin, Isoleucin, Cystein, trong đó chủng phát triển tốt nhất trên môi trường có bổ sung 2-amino-2-hydroxymetyl-1,3-promo hoặc L-Asparagin). Các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì vậy, nhiệt độ và pH môi trường là hai yếu tố có tác động lớn đến quá trình sống của tế bào. Để tiến hành nghiên cứu, chủng 8T7 được cấy trên môi trường ISP2 và nuôi ở độ pH, nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy 8T7 thuộc nhóm ưa ấm, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 25 - 30°C, ưa môi trường hơi kiềm và ưa mặn, phát triển tốt nhất ở pH=7 độ NaCl 5-9% (Bảng 8). Kết quả này phù hợp với công bố của Sirisha và cộng sự (2013) đa số các chủng xạ khuẩn chỉ phát triển được ở nồng độ NaCl dưới 9%.

Đối chiếu các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của chủng 8T7 với khóa phân loại ISP (1974), Gause (1983) và chúng tôi thấy chủng 8T7 có đặc điểm gần giống với chủng chuẩn sp ISP 5003, do Benedict và cộng sự mô tả năm 1954, thuộc nhóm gen mã hóa 16S rARN của chủng xạ khuẩn 8T7 đã được giải trình tự, kết quả các trình tự gen tương ứng đã đăng ký trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI được thể hiện ở bảng 9. Kết quả từ bảng 4 cho thấy gen 16S rADN của chủng 8T7 có độ tương đồng đạt 99% với gen tương ứng của các ch thuộc chi Streptomyces. Kết hợp với kết quả so sánh các đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh, theo khóa phân loại Bergey (1989) và ISP được nuôi ở các điều kiện nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl khác nhau. Kết quả cho thấy 8T7 thuộc nhóm ưa ấm, ưa môi trường hơi kiềm và ưa mặn, phát triển tốt nhất ở pH=7-8 và nồng 9% (Bảng 8). Đối chiếu các đặc điểm hình thái, sinh lý,

sinh hóa của chủng 8T7 với khóa phân loại ISP (1974), Gause (1983) và Bergey (1989), chúng tôi thấy chủng 8T7 có đặc điểm gần giống với chủng chuẩn *Streptomyces* ISP 5003, do Benedict và cộng sự mô tả năm 1954, thuộc nhóm A - 2 (Bảng 8). Gen mã hóa 16S rARN của chủng xạ khuẩn 8T7 đã được giải trình tự, kết quả so sánh với các trình tự gen tương ứng đã đăng ký trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI được thể hiện ở bảng 8 cho thấy gen 16S rADN của chủng 8T7 có độ tương đồng đạt 99% so với gen tương ứng của các chủng xạ khuẩn.

So sánh đặc điểm phân loại của chủng xạ khuẩn 8T7 với chủng chuẩn *Streptomyces* sp ISP 5003.

Bảng 8. Đặc điểm sinh lí, sinh hóa của các chủng 8T7

Các đặc điểm	Chủng 8T7	<i>Streptomyces</i> sp. ISP 5003
Cuống sinh bào tử	Thẳng, xoắn ở đầu (S)	Xoắn ốc hoặc xoắn móc câu (S)
Bề mặt bào tử	Xù xì	Xù xì hoặc trơn
Số bào tử/chuỗi	30 – 50	10 – 50
Màu khuẩn ty khí sinh	Xám	Xám
Màu khuẩn ty cơ chất	Xám	Xám
Sắc tố tan	Không	Không
Sắc tố melanin	Không	Không
Nhiệt độ	25 - 30°C	
pH	7-8	
Nồng độ NaCl	5 - 9%	
Sử dụng nguồn đường	+	+
D-Glucoza	+	+
Sucroza	+	+
D-Xyloza	+	+
Myo-Inositol	+	+
D-Mannitol	+	+
D-Fructoza	+	+
Rhamnoza	+	+
Raffinoza	-	-

Ghi chú: (-): Không sinh trưởng; (+): Có sinh trưởng

Bảng 9. So sánh trình tự gen 16S rADN của chủng 8T7 với gen tương ứng của các chủng xạ khuẩn được đăng kí trên GenBank

Trình tự gen 16S rADN của chủng xạ khuẩn được so sánh	Acc. No	Độ tương đồng (%)
Chủng <i>Streptomyces hydrogenans</i> IMB16-026	MH496600.1	99
Chủng <i>Streptomyces somaliensis</i> IMB16-155	MH496595.1	99
Chủng <i>Streptomyces violascens</i> WZS031	MH482912.1	99

Ví dụ 2: Đánh giá độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật:

Độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật sử dụng trong đời sống có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Theo hướng dẫn số 90/679/EWG của cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học, nhóm tác nhân sinh học vi sinh vật được phân làm 4 cấp độ an toàn, trong đó chỉ các vi sinh vật ở cấp độ 1 được ứng dụng trong sản xuất.

Kết quả xác định mức độ an toàn của các chủng vi sinh vật được tập hợp trong bảng 10. Cả 3 chủng vi sinh vật đều được xếp vào mức độ an toàn cấp 1 vì vậy có thể ứng dụng các chủng vi sinh vật hữu ích này cho sản xuất phân vi sinh đa chức năng trong điều kiện bình thường.

Bảng 10. Đánh giá cấp độ an toàn của các chủng vi sinh vật đã được phân loại

TT	Ký hiệu chủng	Tên vi sinh vật	Mức độ an toàn
1	8T7	<i>Streptomyces sp</i>	Cấp độ 1
2	3R1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cấp độ 1
3	18R1	<i>Bacillus megaterium</i>	Cấp độ 1

Ví dụ 3: Sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật nội sinh chức năng từ các bộ phận của cây cà phê là *Bacillus megaterium* 18R1, *Bacillus licheniformis* 3R1, *Streptomyces sp.* 8T7. Chuẩn bị các môi trường dịch thể LB và ISP5, khử trùng môi trường dịch thể ở 121°C trong 30 phút. Các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết từ môi trường thạch nghiêng được nhân giống trên môi trường dịch thể bằng nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cấy cho mỗi loại vi sinh vật (khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^6 - 10^9 CFU/g thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp).

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp bằng cách phối trộn cát, than bùn, trấu nghiền, cám, vôi bột, chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng theo tỉ lệ khối lượng:

- cát:	30%
- than bùn:	40%
- trấu nghiền:	15%
- cám:	10%
- vôi bột:	2%
- chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng (Gồm ZnSO ₄ , MnCl ₂ , H ₃ BO ₃ , CoCl ₂ , CuCl ₂ , NiCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , nồng độ các chất khoảng từ 0,01% - 0,05%)	1%
- nước	2%

Tiếp theo là khử trùng môi trường nuôi cấy xốp ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 90 phút.

Phối trộn các dịch nuôi vào môi trường nuôi cấy xốp vô trùng theo tỉ lệ khối lượng:

- 1% dịch nuôi chủng *Bacillus megaterium* 18R1,
- 1% dịch nuôi chủng *Bacillus licheniformis* 3R1;
- 1% dịch nuôi chủng *Streptomyces* sp. 8T7; và
- 97% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng.

Duy trì môi trường nuôi cấy (nuôi ủ) ở nhiệt độ 25 – 30°C, kiểm tra mật độ vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm (Mật độ vi sinh vật khi mới cấy đạt 10⁶ đến 10⁷ tế bào trong 1g (CFU/g) chế phẩm. Sau 10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10⁷ CFU/g trở lên (đáp ứng TCVN).

Bảo quản chế phẩm: Chế phẩm được bảo ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời (tốt nhất là trong bóng tối) cho đến khi sử dụng. Trong quá trình bảo quản cần theo dõi mật độ vi sinh vật trong chế phẩm định kì hàng tháng. Chế phẩm đạt mật độ vi sinh vật cao nhất sau 3 tháng. Tuy nhiên, chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Ví dụ 4: Đánh giá chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm vi sinh vật chức năng cho cây cà phê

Chế phẩm được tối ưu hoá thành phần và điều kiện nuôi cấy để mật độ vi sinh đạt từ 10⁷ CFU/g trở lên sau 10 ngày cấy vào môi trường nuôi cấy xốp vô trùng và đã được theo dõi biến động mật độ vi sinh vật theo thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng. Kết quả xác định số lượng vi sinh vật trong chế phẩm theo thời gian bảo quản được trình bày ở Bảng 11.

Khi nghiên cứu khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm đã nhận thấy chúng đều sinh trưởng và phát triển tốt trong chế phẩm. Chế phẩm có thể bảo quản trong 6 tháng ở nhiệt độ phòng (đạt mật độ theo tiêu chuẩn ngành Nông nghiệp TCN 6167-1997). Hoạt tính sinh học của các chủng cũng không bị mất đi sau thời gian bảo quản.

Bảng 11. Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đa chức năng cho cây cà phê theo thời gian (CFU/g trọng lượng khô)

Chủng vi sinh vật	Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm (x 10 ⁷ CFU/g)						
	10 ngày	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
<i>Bacillus megaterium</i>	0,26	1,02	1,14	1,18	1,06	0,85	0,65
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,35	1,15	1,24	1,28	1,15	1,05	0,82
<i>Streptomyces</i> sp.	0,12	1,75	2,21	2,28	1,79	1,48	1,02

Ví dụ 5: Đánh giá hiệu quả đạt được từ việc ứng dụng vi sinh vật nội sinh chức năng cho cây cà phê (CAFE-NS 01)

a) Ảnh hưởng của các nồng độ vi sinh vật nội sinh tinh sạch đến khả năng sống sót của ấu trùng *Meloidogyne incognita*

Để đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật nội sinh CAFE-NS 01 đến khả năng sống sót của ấu trùng *Meloidogyne incognita* các thí nghiệm đã được tiến hành ở các nồng độ là 10, 20, 30 và 50%, đồng thời tiến hành ghi nhận lượng ấu trùng còn sống sót sau 24h, 48h, 72h, 168h và 336h. Các kết quả thu được trình bày ở Bảng 12 như sau:

Bảng 12. Khả năng sống sót của ấu trùng *Meloidogyne incognita* ở các nồng độ vi sinh vật nội sinh

Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ sống sót (%) ấu trùng <i>Meloidogyne incognita</i>					
	24h	48h	72h	120h	168h	336h
ĐC (H ₂ O)	100 ± 0	99,5 ± 0,5	99,5 ± 0,5	97,1 ± 1,9	97,1 ± 1,9	97,1 ± 1,9
Công thức 1 (dịch vi sinh vật nội sinh 10%)	94,3 ± 1,8	88,4 ± 2,6	81,1 ± 3	68,4 ± 2,5	62,1 ± 1,2	43,2 ± 2,5
Công thức 2 (dịch vi sinh vật nội sinh 20%)	93,4 ± 1,5	83,6 ± 3,4	76,3 ± 5,2	61,8 ± 1,8	55,2 ± 2,5	38,4 ± 4
Công thức 3 (dịch vi sinh vật nội sinh 30%)	90,9 ± 3,1	78,1 ± 5,1	69,7 ± 3,6	56,7 ± 5,2	53,9 ± 4,6	36,4 ± 3
Công thức 4 (dịch vi sinh vật nội sinh 50%)	83,9 ± 4,1	74,9 ± 4,1	57,3 ± 2,8	44,5 ± 4	43,4 ± 3,5	18,7 ± 2

Sau 24h thí nghiệm, tỉ lệ sống sót của ấu trùng chưa có sự thay đổi nhiều so với đối chứng, ở các công thức có sự phát triển của vi sinh vật nội sinh, ở các nồng độ cao như 20, 30 và 50% ấu trùng có hiện tượng ít hoạt động, chuyển về trạng thái duỗi thẳng

cơ thể, kiểm tra cho thấy tỉ lệ sống sót ở các nồng độ này cho thấy ở công thức đối chứng ấu trùng vẫn sống 100% và tỉ lệ sống ở 4 nồng độ 10, 20, 30 và 50% lần lượt là: 94, 93, 90 và 83%. Sau 48h, tỉ lệ sống sót đã có sự biến đổi hơn so với đối chứng, cao nhất là ở nồng độ 50% với tỉ lệ ấu trùng sống là 74%, ở 3 nồng độ còn lại không có sự sai khác nhiều về tỉ lệ sống sót. Tỉ lệ sống sót của ấu trùng đạt được sau 3 ngày (72h) biến đổi giữa các công thức nồng độ vi khuẩn và đối chứng, tại thời gian này cơ thể ấu trùng chết đã có sự thay đổi với sự phân hủy của ấu trùng, các nội quan bên trong bị co rút lại, lớp vỏ bên ngoài bắt đầu bị phân hủy. Sau 7 ngày tỉ lệ ấu trùng sống giảm còn từ 43-62% ở các công thức nồng độ vi khuẩn từ 50-10%. Sau 14 ngày thử nghiệm kết quả đạt được tỉ lệ sống sót của ấu trùng ở các công thức thí nghiệm đều giảm trên 50%, cao nhất là ở nồng độ 50% với 18,7 % ấu trùng sống sót. Ở thời gian này các đĩa thí nghiệm đã xuất hiện 1 lượng lớn các dấu vết của tuyến trùng đã bị phân hủy thành dạng sợi.

Như vậy khi thử nghiệm ở các công thức khác nhau của vi sinh vật nội sinh cho thấy có sự phân hủy tuyến trùng *Meloidogyne incognita* với khả năng gây chết cao nhất là 81.3% ở nồng độ 50% sau 14 ngày (336h). Tuy nhiên ở nồng độ vi sinh vật nội sinh này là khá cao nên cần phải xem xét khả năng sử dụng chủng vi sinh vật nội sinh này trong phòng trừ tuyến trùng. Các kết quả thu được cũng cho thấy ở nồng độ chế phẩm vi sinh vật nội sinh từ 20-30%, sau 14 ngày cũng gây chết hơn 60% tuyến trùng *Meloidogyne incognita*, do đó có thể sử dụng các nồng độ này để phòng trừ tuyến trùng gây hại cho cây cà phê.

b) Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh nội sinh chức năng CAFE - NS 01 đến sự sinh trưởng và phát triển của cây cà phê trồng trong nhà lưới

Để đánh giá tác dụng của chế phẩm vi sinh nội sinh chức năng CAFE –NS 01, chế phẩm này đã được sử dụng để lây nhiễm và phun cho cây cà phê (cây *in vitro* sạch bệnh) trồng trong nhà lưới. Thí nghiệm được triển khai tại phòng Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thí nghiệm bao gồm các công thức như sau:

- *Công thức Đối chứng*: Sử dụng phân bón cho cây cà phê theo tập quán canh tác thông thường của nông dân;

- *Công thức Thí nghiệm 1*: Bón phân và chăm sóc theo quy trình của ngành nông nghiệp 10TCN 478-2001 và cẩm nang khuyến nông của sở nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk.

- *Công thức Thí nghiệm 2*: Sử dụng chế phẩm vi sinh vật nội sinh CAFE-NS 01. Điểm quan trọng của thí nghiệm 2 là không dùng phân bón hóa học mà thay bằng chế phẩm vi sinh vật nội sinh CAFE-NS 01 phun dự phòng nhằm hạn chế sâu bệnh và giảm thuốc hóa học.

Quy trình lây nhiễm vi sinh vật nội sinh trên cây cà phê: Lây nhiễm vi sinh vật trên cây cà phê đã được 20 ngày tuổi, nuôi cây trên môi trường thủy canh có bổ sung chế phẩm vi sinh vật nội sinh CAFE-NS 01 với tỉ lệ 1% trong 28 ngày sau đó theo dõi và kiểm tra các chỉ số sinh trưởng về chiều cao, số cặp lá (Bảng 13) chiều dài rễ chính và số rễ nhánh (Bảng 14) của cây cà phê.

Chiều cao thân và số cặp lá mới mọc/cành: Đã tiến hành theo dõi số cặp lá mới mọc ra của các cây cà phê ở các thí nghiệm nghiên cứu; mỗi cây cà phê chọn 5 cành có sự sinh trưởng tương đối đồng đều nhau (bảng 13).

Bảng 13. Theo dõi sinh trưởng về chiều cao và số cặp lá của cây cà phê 20 ngày tuổi sau lây nhiễm vi sinh vật nội sinh

Kết quả theo dõi sinh trưởng của cây cà phê tại Bảng 13 cho thấy:

Thời gian	Chiều cao thân (cm)			Số lá (cặp)		
	ĐC	TN1	TN2	ĐC	TN1	TN2
0 ngày	1,3	1,28	1,2	2,2	2,2	2,2
7 ngày	1,3	1,38	1,35	2,6	2,8	3,1
14 ngày	1,3	1,39	1,37	3,2	3,4	3,4
21 ngày	1,3	1,42	1,5	3,3	3,5	3,6
28 ngày	1,5	2,03	1,7	3,5	3,78	3,81

- Chiều cao thân ở công thức thí nghiệm 1 và 2 luôn cao hơn công thức đối chứng qua các ngày theo dõi.

- Số cặp lá mới mọc/cành ở công thức thí nghiệm 1 và 2 luôn cao hơn công thức đối chứng qua các ngày theo dõi.

- Nhận xét về màu sắc lá: ở công thức thí nghiệm 2 cây cà phê có lá xanh, bóng và mượt hơn so với công thức thí nghiệm 1 và công thức đối chứng.

Sự tăng trưởng về chiều dài rễ và số rễ nhánh:

Đã tiến hành đo chiều dài rễ (cm) của 5 cây cà phê ở mỗi công thức thí nghiệm. Kết quả được trình bày ở Bảng 14.

Bảng 14. Theo dõi sinh trưởng về chiều dài rễ chính và số rễ nhánh của cây cà phê 20 ngày tuổi sau lây nhiễm vi sinh vật nội sinh

Thời gian	Số rễ nhánh			Chiều dài rễ chính (cm)		
	ĐC	TN1	TN2	ĐC	TN1	TN2
0 ngày	2	3	2,3	3,5	4,3	3,9
7 ngày	2	3	4,5	3,6	4,5	4,2
14 ngày	2	3,1	4,5	3,6	4,6	4,5

21 ngày	2,3	3,4	5,1	3,8	4,8	5,2
28 ngày	2,6	4,3	5,1	3,9	5,5	6,3

Kết quả tại Bảng 14 cho thấy:

- Chiều dài rễ chính ở công thức thí nghiệm 1 và 2 luôn cao hơn công thức đối chứng qua các ngày theo dõi.

- Số rễ phụ công thức thí nghiệm 1 và 2 tăng sinh nhiều hơn so với công thức đối chứng

- Số rễ phát triển nhanh nhất ở thời điểm từ 0 đến 7 ngày ở thí nghiệm 1 và 2 trong khi đối chứng gần như không phát triển mà chỉ bắt đầu phát triển chậm sau 14 ngày

Điều này giúp cho cây hấp thu dinh dưỡng cũng như phát triển khỏe nhanh hơn trong các giai đoạn phát triển về sau.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

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

Chế phẩm vi sinh nội sinh chức năng sản xuất như mô tả trong giải pháp hữu ích dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế hiện nay của nước ta.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê bao gồm các công đoạn:

(i) chuẩn bị dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật nội sinh bằng cách:

phân lập các chủng vi sinh vật từ thân, rễ cây cà phê và tuyển chọn các chủng vi sinh vật nội sinh thuần khiết từ môi trường thạch nghiêng gồm các chủng: *Bacillus megaterium* 18R1, *Bacillus licheniformis* 3R1, *Streptomyces* sp. 8T7,

tiếp đó chuẩn bị môi trường dịch thể LB và ISP5, khử trùng môi trường dịch thể ở nhiệt độ 121°C trong 30 phút; và

nhân giống các chủng vi sinh vật nội sinh nêu trên bằng môi trường dịch thể bằng nuôi cấy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cấy cho mỗi chủng vi sinh vật;

(ii) chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp bằng cách phối trộn các thành phần chất mang gồm: cát, than bùn, trấu nghiền, cám, vôi bột, chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng và nước theo tỉ lệ phần trăm khối lượng:

- cát:	30%
- than bùn:	40%
- trấu nghiền:	15%
- cám:	10%
- vôi bột:	2%
- chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng (Gồm ZnSO ₄ , MnCl ₂ , H ₃ BO ₃ , CoCl ₂ , CuCl ₂ , NiCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , nồng độ các chất khoảng từ 0,01% - 0,05%)	1%
- nước	2%

sau đó khử trùng môi trường nuôi cấy xốp ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 90 phút;

(iii) phối trộn các dịch nuôi cấy thu được ở bước (i) vào môi trường nuôi cấy xốp vô trùng thu được ở bước (ii) theo tỉ lệ khối lượng:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus megaterium* 18R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10⁷ CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* 3R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10⁷ CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. 8T7 được phân lập và tuyển chọn từ thân cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10⁷ CFU/g.; và

- 97% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng;

(iv) nuôi ủ các chủng vi sinh vật nội sinh bằng cách duy trì môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 25 – 30°C trong 10 ngày; và

(v) kiểm tra chất lượng và bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời, tốt nhất là trong bóng tối, cho đến khi sử dụng.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm thu được ở bước (v) được bảo quản cho đến khi sử dụng với thời gian là 6 tháng, thời gian sử dụng tốt nhất là 3 tháng kể từ ngày sản xuất.

3. Chế phẩm vi sinh vật nội sinh chức năng dùng cho cây cà phê được sản xuất bằng phương pháp nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm có chứa các chủng vi sinh vật nội sinh được phối trộn và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy xốp vô trùng bao gồm các thành phần theo tỉ lệ phần trăm khối lượng như sau:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus megaterium* 18R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g,

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Bacillus licheniformis* 3R1 được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;

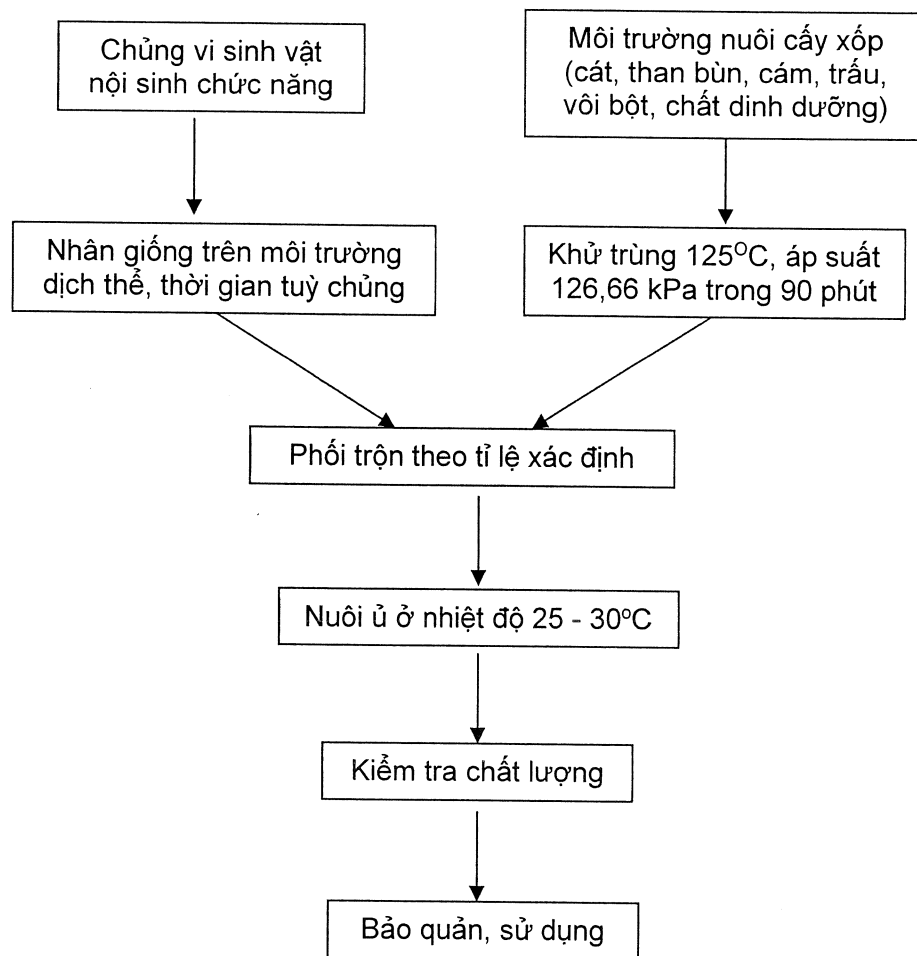
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Streptomyces* sp. 8T7 được phân lập và tuyển chọn từ thân cây cà phê có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và

- 97% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng được phối trộn từ các thành phần theo tỉ lệ phần trăm khối lượng sau:

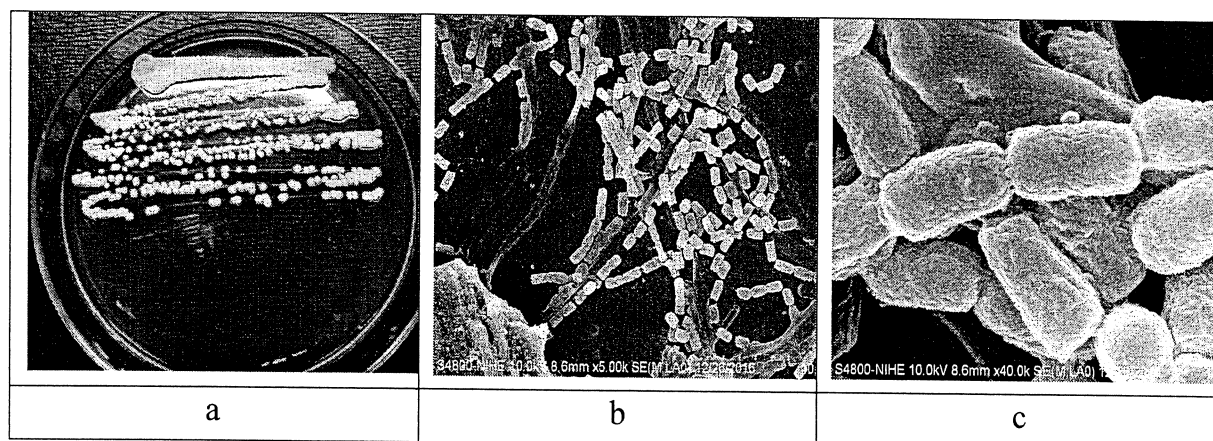
- cát:	30%
- than bùn:	40%
- trấu nghiền:	15%
- cám:	10%
- vôi bột:	2%
- chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng (Gồm $ZnSO_4$, $MnCl_2$, H_3BO_3 , $CoCl_2$, $CuCl_2$, $NiCl_2$, Na_2MoO_4 , nồng độ các chất khoảng từ 0,01% - 0,05%)	1%
- nước	2%

trong đó, môi trường nuôi cấy xốp được khử trùng ở nhiệt độ $125^\circ C$, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at) trong thời gian 90 phút trước khi phối trộn với dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật.

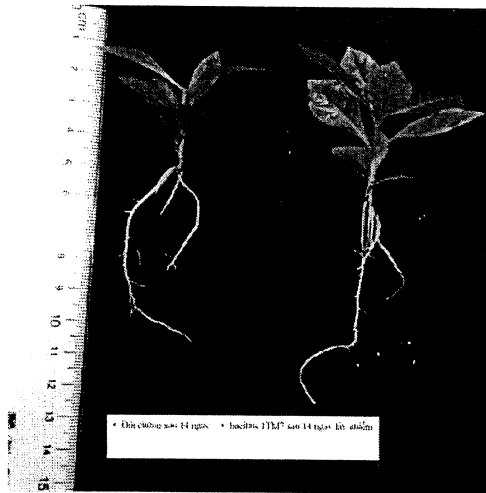
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm được bảo quản ở nhiệt độ phòng ($25-30^\circ C$), tránh ánh sáng mặt trời, thời hạn bảo quản là 6 tháng, thời hạn sử dụng tốt nhất là 3 tháng kể từ ngày sản xuất.



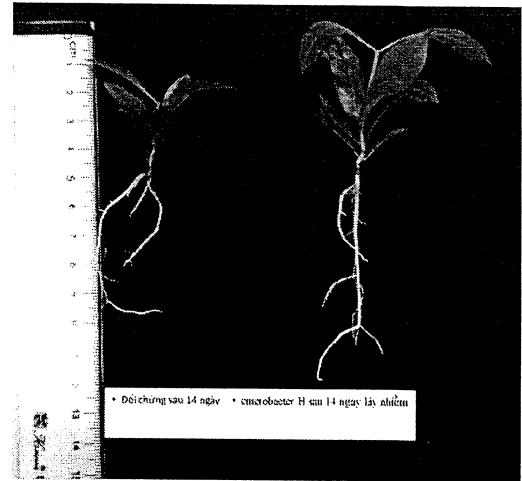
Hình 1



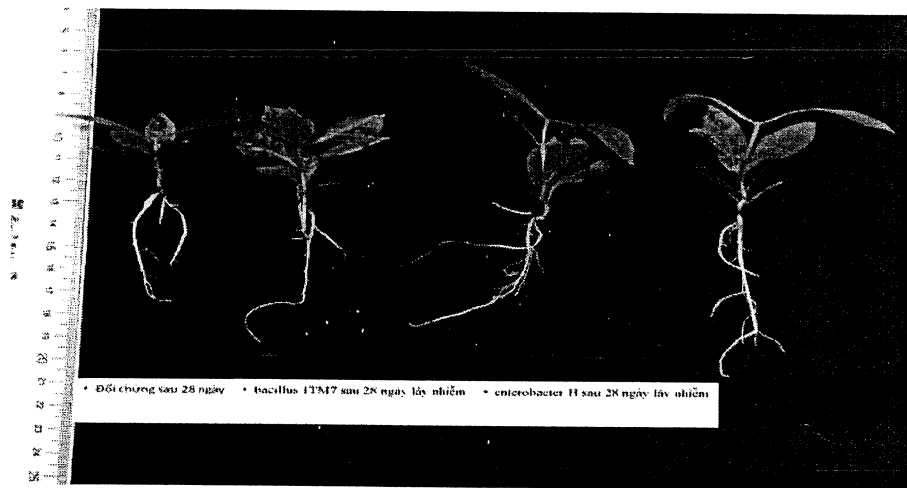
Hình 2



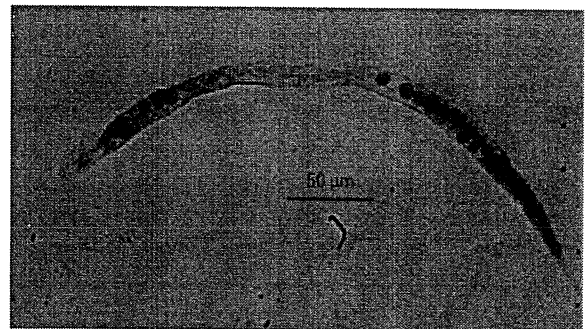
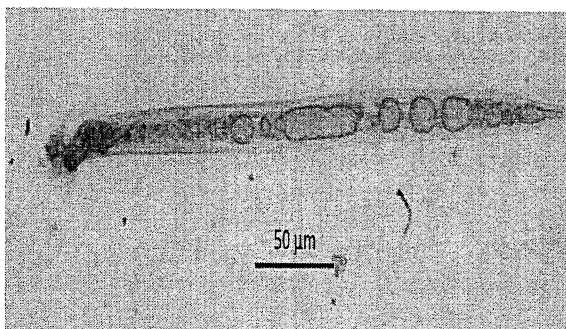
Hình 3



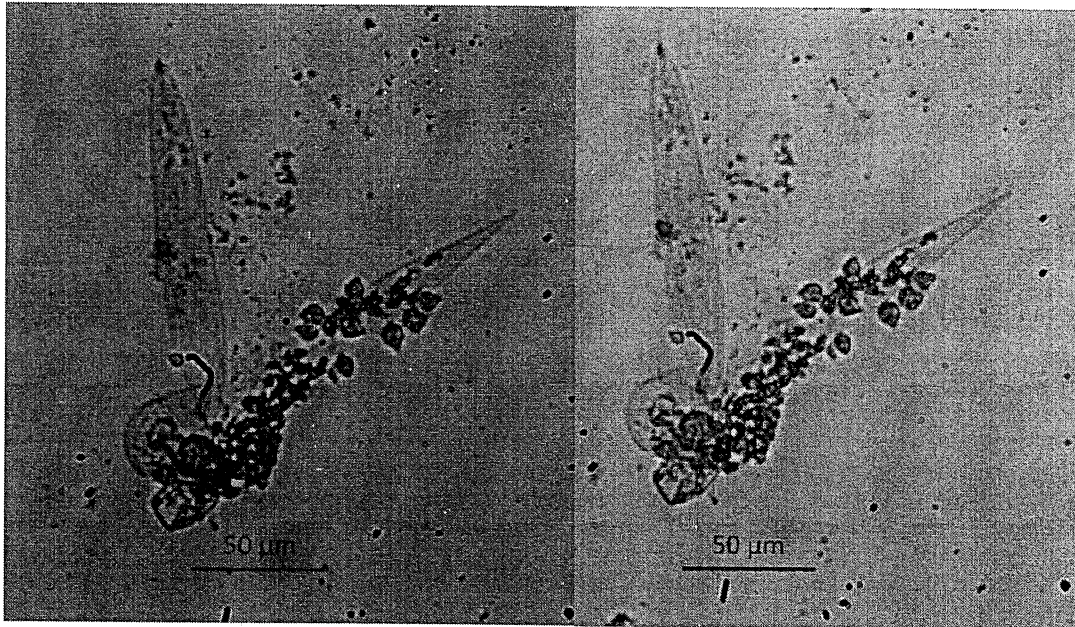
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7