



(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)



2-0003082

(51)⁷ **C05F 11/08; C12N 1/20**

(13) **Y**

(21) 2-2019-00276

(22) 11/07/2019

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/01/2021 394

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

Tòa nhà ươm tạo công nghệ, số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trần Đình Mẫn (VN); Đỗ Thị Gấm (VN); Hà Việt Sơn (VN); Phạm Thanh Hà (VN); Nguyễn Thị Thu (VN).

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CHỨC NĂNG DÙNG CHO CÂY HỒ TIÊU 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 chức năng dùng cho cây hồ tiêu bao gồm các công đoạn: (i) chuẩn bị dịch nuôi cấy các chủng vi sinh gồm 5 chủng được phân lập từ đất trồng hồ tiêu: *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2; *Acetobacter diazotrophicus* AC-HT4.2; *Azospirillum brasilense* As-HT14.1; *Pseudomonas putida* VL-HT14.5; và *Aspergillus niger* ML-HT4, (ii) chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp vô trùng, (iii) phối trộn các chủng vi sinh đã vào môi trường nuôi cấy xốp vô trùng theo tỉ lệ khối lượng 1% dịch nuôi cấy mỗi chủng vi sinh và 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng, (iv) nuôi ủ hỗn hợp đã phối trộn ở nhiệt độ 25 - 30°C trong 7-10 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 chức năng dùng cho cây hồ tiêu thu được từ phương pháp này (tên gọi là HOTIEU - HTD 03), trong đó chế phẩm bao gồm 5 chủng vi sinh được phân lập từ đất trồng hồ tiêu gồm các chủng; *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2; *Acetobacter diazotrophicus* AC-HT4.2; *Azospirillum brasilense* As-HT14.1; *Pseudomonas putida* VL-HT14.5; và *Aspergillus niger* ML-HT4, được phối trộn và nuôi ủ trong môi trường nuôi cấy xốp vô trùng theo tỉ lệ khối lượng 1% dịch nuôi cấy mỗi chủng vi sinh có mật độ vi sinh vật >10⁷ CFU/g và 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng.

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 chức năng cho cây hồ tiêu (tên viết tắt là HOTIEU-HTD 03) và chế phẩm được sản xuất theo phương pháp này để sử dụng trong canh tác cây hồ tiêu theo hướng phát triển bền vững.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Phân bón vi sinh là sản phẩm chứa các vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn có mật độ phù hợp với tiêu chuẩn ban hành, thông qua các hoạt động sống của chúng tạo nên các chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được (N, P, K, S, Fe,...) hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông sản. Phân vi sinh phải đảm bảo không gây ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

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. 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. Việc bổ sung các loại vi sinh vật có khả năng phân giải cellulosa cao (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*...), cố định nitơ tự do (*Azotobacter*), phân giải lân (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) với mật độ 10^6 - 10^8 CFU/g cùng các nguyên tố dinh dưỡng như N dạng hữu cơ, P dạng quặng photphorit đã làm tăng chất lượng của phân bón lên đáng kể. Các sản phẩm phân bón sinh học sản xuất và chế biến từ phế, phụ phẩm nông nghiệp, từ than bùn, từ đất hiếm... đều đã được nghiên cứu, xây dựng quy trình sản xuất phục vụ sản xuất nông lâm nghiệp. Các sản phẩm phân bón vi sinh như: Azogin, Rhizolec, Vitaragin, Phosphobactein... đều có hiệu quả tốt cho cây trồng.

Mặc dù phân bón sinh học đã được nghiên cứu từ lâu, nhưng có lẽ do nhiều yếu tố chủ quan và khách quan khác nhau nên mức độ ứng dụng cho từng cây trồng còn rất hạn chế. Mặt khác, các loại phân bón đã sản xuất và cung ứng ra thị trường mới chỉ được sản xuất từ một số loài vi sinh vật nhất định (cố định nitơ cộng sinh, hội sinh tự do, phân giải lân...), hiệu quả sử dụng các loại phân này trên các cây trồng khác nhau, các vùng thổ nhưỡng khác nhau là không giống nhau. Nguyên nhân của hiện tượng này là do sự phong phú, đa dạng của hệ vi sinh vật trong đất và tác động qua lại nhiều chiều của các vi sinh vật với nhau, của vi sinh vật với cây trồng và điều kiện môi trường.

Trong canh tác cây hồ tiêu ở nước ta có nhiều loại phân bón hữu cơ vi sinh đã được đăng ký và khảo nghiệm đưa vào sử dụng 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, MT1 (SH1), TN-3, TN-4 ... 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 hồ tiêu. Do đó khi được sử dụng để bón cho cây hồ tiêu, hiệu quả đạt được không cao. Hiện nay, trên thị trường ở nước ta cũng đã có 1 số loại phân hữu cơ vi sinh chuyên dùng cho cây hồ tiêu như phân hữu cơ An Điền 1, phân hữu cơ vi sinh HQ8, phân hữu cơ vi sinh BLC 08, phân hữu cơ vi sinh HCMK8... Tuy nhiên, các loại phân hữu cơ vi sinh này mới chỉ bao gồm các chủng vi sinh vật là *Bacillus* và *Trichoderma* do đó cũng chưa thực sự thích hợp nhất cho cây hồ tiêu. Cho đến nay trên thị trường ở nước ta cũng chưa có loại phân vi sinh nào chuyên dùng cho cây hồ tiêu mà trong đó bao gồm đầy đủ các chủng vi sinh vật chức năng như các chủng vi sinh phân giải cellulosa, cố định đạm, phân giải lân... và hơn nữa lại là các chủng vi sinh được phân lập từ chính đất trồng hồ tiêu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng chuyên dụng thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây hồ tiêu nhằm nâng cao năng suất và hiệu quả của loại cây công nghiệp này.

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đã đưa ra phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng bao gồm đầy đủ các vi sinh vật chức năng thích hợp cho sự tăng trưởng của cây hồ tiêu và được phân lập từ chính đất trồng hồ tiêu. Chế phẩm vi sinh vật chức năng được sản xuất theo phương pháp này bao gồm các thành phần theo khối lượng như sau:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT4.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azospirillum brasilense* As-HT14.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Pseudomonas putida* VL-HT14.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* ML-HT4.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 95% môi trường xốp vô trùng 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 hình vẽ thể hiện sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu theo giải pháp hữu ích;
- Hình 2 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Azotobacter* sp. Ab-HT14.2;

- Hình 3 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2;
- Hình 4 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Azospirillum* sp. As-HT14.1;
- Hình 5 là ảnh phân loại chủng *Pseudomonas* sp VL-HT14.5 dựa trên kit chuẩn API 20NE;
- Hình 6 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Pseudomonas* sp VL-HT14.5;
- Hình 7 là hình vẽ thể hiện vị trí phân loại của chủng *Aspergillus niger* ML-HT4.1;
- Hình 8 là đặc điểm hình thái của chủng *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2;
- Hình 9 là đặc điểm hình thái của các chủng *Azospirillum* sp. As-HT14.1;
- Hình 10 là đặc điểm hình thái của các chủng *Pseudomonas* sp. VL-HT14.5;
- Hình 11 là hình ảnh cây hồ tiêu ở các mô hình thí nghiệm, trong đó bên trái là mô hình thí nghiệm, bên phải là mô hình đối chứng;
- Hình 12 là năng suất hồ tiêu thực thu của mô hình tại phường Yên Thế, trong đó (a): năm 2014; (b): năm 2015.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu theo giải pháp hữu ích dựa trên các nguyên tắc cơ bản sau đây:

- Chế phẩm được sản xuất theo nguyên tắc nuôi cấy trên môi trường xộp vô trùng. Chất mang được dùng là than bùn có kèm theo một số phụ gia như cao lanh, cám nghiền, trấu, đất, vôi bột....

- Các chủng vi sinh vật đã được thử khả năng đối kháng trên thạch đĩa và trong chế phẩm. Các chủng đồng thời sống hòa hợp với nhau trên môi trường xộp thanh trùng, vì vậy các chủng này được lựa chọn để đưa vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa 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 10^9 CFU/g trở lên sau 1 tuần cấy vào và các chủng đều sinh trưởng và phát triển tốt trong chế phẩm. Chế phẩm chứa trong túi polyetylen, bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. 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.

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình công nghệ của phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu theo giải pháp hữu ích. Phương pháp được đề xuất bao gồm các công đoạn sau:

1. Chuẩn bị dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật bằng cách: lấy các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết (gồm 5 chủng vi sinh vật: *Azotobacter vinelandii* Ab-HT 14.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT 4.1; *Azospirillum brasilense* As-HT 14.1; *Pseudomonas putida* VL-HT 14.5; và *Aspergillus niger* ML-HT 14.2) từ môi trường thạch nghiêng và nhân giống trên môi trường dịch thể bằng cách nuôi cấy lắc với tốc độ 200 vòng/ phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cho mỗi loại vi sinh vật, khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ml thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp.

2. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp (hỗn hợp chất mang) bằng cách: phối trộn cao lanh, than bùn, trấu nghiền, cám, bột sắn, đường kính, vôi bột, nước và chất dinh dưỡng đa lượng (gồm K_2HPO_4 , $MgSO_4$ và NaCl phối trộn với nhau theo tỉ lệ khối lượng 1:1:1). Khử trùng hỗn hợp chất mang ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 150 phút.

3. Phối trộn các thành phần để tạo chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu (HOTIEU-HTD 03) bằng cách: Phối trộn 1% dịch nuôi cấy mỗi loại vào 95% môi trường xốp vô trùng để môi trường đạt độ ẩm khoảng 30%.

4. Tiến hành lên men xốp trong 7-10 ngày ở nhiệt độ phòng (nhiệt độ 25-30°C).

5. 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 chế phẩm. Sau 7-10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10^7 CFU/g trở lên (TCVN).

5. Bảo quản: bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời cho đến khi sử dụng. Các chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu thu được theo phương pháp của giải pháp hữu ích này bao gồm các thành phần tính theo phần trăm khối lượng như sau:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azotobacter vinelandii* Ab-HT 14.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT 4.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azospirillum brasilense* As-HT 14.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Pseudomonas putida* VL-HT 14.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* ML-HT 14.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Tuyển chọn các chủng vi sinh vật được sử dụng để sản xuất chế phẩm

Nguồn gốc: Được phân lập từ đất trồng cây Hồ tiêu.

Tên chủng: *Azotobacter* sp. Ab-HT14.2; *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2; *Azospirillum* sp. As-HT14.1; *Pseudomonas* sp. VL-HT14.5; và *Aspergillus* sp. ML-HT4.1.

Chức năng: Các chủng vi sinh vật có chức năng cố định đạm, sinh chất kích thích sinh trưởng và phân giải lân. Sử dụng các chủng vi sinh vật có các đặc tính này giúp cải thiện độ phì của đất, kích thích sinh trưởng của cây hồ tiêu, tăng chất dinh dưỡng và tăng khả năng giữ ẩm cho đất.

Đặc điểm phân loại:

Chủng *Azotobacter* sp. Ab-HT14.2

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái:

Các chủng sẽ được phân loại sơ bộ theo hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tế bào. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của chủng *Azotobacter* sp. Ab-HT14.2

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên Ashby	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Azotobacter</i> sp. Ab-HT14.2	Khuẩn lạc tròn, màu lục huỳnh quang, bóng, nhầy. Sắc tố khuếch tán vào môi trường. Đường kính 2,5 mm.	Tế bào hình cầu, 2 tế bào thường dính nhau, kích thước 1,5 x 2 μ m., tạo nang xác.	-	-

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

Bảng 2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng *Azotobacter* sp. Ab-HT14.2

TT	Đặc điểm	Ab-HT14.2
1	Hiếu khí	+
2	Vi hiếu khí	-
3	Khả năng di động	$\pm$
4	Phép thử catalaza	+
5	Phép thử oxidaza	+
6	Khả năng đồng hóa tinh bột, rhamnoza,	+

	disacarit, dextrin	
7	Khả năng đồng hóa lactoza, manitol, natribenzoat	-
8	Sinh trưởng trên alcohol	+
9	Sinh trưởng trên axit hữu cơ	+
10	Axit hóa các nguồn sucroza, lactoza, mannitol, maltoza, fructoza, sorbitol, glucoza	+
11	Axit hóa nguồn galactoza	+
12	Tạo H ₂ S	+
13	Hoạt tính ureaza	+
14	Khử nitrat	+
15	Sinh enterotoxin	-
16	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	28 - 30°C
17	pH cho sinh trưởng	6,5-7,5

Dựa trên một số đặc điểm hình thái (Bảng 1), sinh lý, sinh hóa (bảng 2) nhận thấy chủng Ab-HT14.2 có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. vinelandii* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey, 1994).

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

Để khẳng định đặc điểm phân loại và xác định vị trí phân loại của các chủng, đã tiến hành giải trình tự gen 16S của chủng vi sinh vật được phân lập. Mức độ tương đồng nucleotit của chủng *Azotobacter sp.* Ab-HT14.2 được so sánh với các chủng đã được công bố trong Genbank (Hình 2).

Kết quả giải trình tự gen và xác định vị trí phân loại chủng *Azotobacter* cũng cho kết quả trùng với kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh lý, sinh hóa có trình tự tương đồng với vi khuẩn *A. vinelandii*, với mức độ tương đồng 99,5% (Hình 2).

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S ARN, có thể khẳng định chủng vi khuẩn được phân lập có tên phân loại là *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2.

Chủng *Acetobacter sp.* Ac-HT4.2

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái:

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn *Acetobacter sp.* Ac-HT4.2 được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của chủng *Acetobacter sp.* Ac-HT4.2

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Acetobacter</i>	Khuẩn lạc vàng, tròn nhỏ đều đặn, đường	Tế bào hình que thẳng, đầu tròn, xếp	-	-

sp. Ac-HT4.1	kính 1-2 mm, bề mặt trơn bóng, không sinh sắc tố.	chuỗi, kích thước 0,7 x 1,2 μm . Có chu mao.		
--------------	---	---	--	--

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

Bảng 4. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2

TT	Đặc điểm	Ac-HT4.2
1	Hiếu khí bắt buộc, sinh trưởng nhanh	+
2	Cố định nitơ trong điều kiện vi hiếu khí	+
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng oxy hoá	-
6	Sinh axit từ glucoza, etanol	+
7	Sinh axit từ D-mannitol, D-sorbitol, I-propanol	-
8	Khả năng đồng hóa etanol, glycerol, D-galactoza, D-xyloza, maltoza, fructoza, glucoza, sucroza.	+
9	Khả năng đồng hóa natri acetat	+
10	Khả năng đồng hóa D-arabinoza	-
11	Khả năng đồng hóa D-sorbitol	+
12	Khả năng đồng hóa D-mannitol	-
13	Khả năng đồng hóa metanol (1%), mannoza, dextrin, tinh bột	-
14	Sinh trưởng trên môi trường chứa 30% glucoza hoặc sucroza	+
15	Tạo H_2S	-
16	Sinh enterotoxin	-
17	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	27-30°C
18	pH cho sinh trưởng	5,5

Dựa trên một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2 (Bảng 4) có thể nhận thấy rằng chủng vi khuẩn có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. diazotrophicus* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey). Để khẳng định thêm chúng tôi tiếp tục xác định trình tự gen 16S của các chủng vi khuẩn được phân lập.

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

Kết quả giải trình tự gen của chủng *Acetobacter* sp. Ac-HT4.2 (hình 2) so sánh với trình tự các chủng được công bố trong Genbank cũng khẳng định chủng này là *A. diazotrophicus* với mức độ tương đồng 99-100%. Như vậy dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S ARN, chủng vi khuẩn được phân lập có tên phân loại là *A. diazotrophicus* Ac-HT4.2.

Chủng *Azospirillum* sp. As-HT14.1

Phân loại theo đặc điểm hình thái

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng

5.

Bảng 5. Đặc điểm hình thái của các chủng *Azospirillum* sp. As-HT14.1

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Azospirillum</i> sp. As-C1.3	Khuẩn lạc tròn đều, bề mặt trơn, bóng, nhầy, mép phẳng, màu trắng sữa, đường kính 1,7 mm.	Tế bào có dạng que, đầu xoắn, kích thước 2,1 x 3,7 μ m. Trên môi trường dịch có tiên mao.	-	-

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào cho thấy chủng đều mang những đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn thuộc chi *Azospirillum*.

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

Đặc điểm sinh hóa của các chủng được xác định dựa trên kit chuẩn API 20NE

Bảng 6. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng *Azospirillum* sp. As-HT14.1

TT	Đặc điểm	As-HT14.1
1	Hiếu khí	+
2	Cố định nitơ trong điều kiện vi hiếu khí	+
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng oxy hoá	-
6	Thủy phân gelatin	-
7	Sinh axit từ D-glucosa	+
8	Khả năng đồng hóa D-fructoza, glycerol, D-gluconat, 2-ketogluconat, axit malic, D-riboza, D-sorbitol, D-xyloza.	+
9	Khả năng đồng hóa N-acetylglucosamine, L-arabitol, celobioza, D-arabinoza, inositol, maltoza, L-rhamnoza, sucroza, L-xyloza, D-glucosa, D-mannitol,	-
10	Khả năng đồng hóa D-riboza, D-mannoza, L-arabinoza, D-arabitol, D-fructoza, D-galactoza	+
11	Khả năng đồng hóa D-lactoza	-
12	Khử nitrat	-
13	Hoạt tính ureaza	+
14	Thủy phân gelatin	+
15	Sinh indol	-

16	Sinh enterotoxin	-
17	Sinh H ₂ S	-
18	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25 - 37 ⁰ C
19	pH cho sinh trưởng	6 - 7

Dựa trên một số đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *Azospirillum* có thể nhận thấy chủng As-HT14.1 có đặc điểm giống với vi khuẩn thuộc loài *A. brasilense* (Khóa phân loại vi khuẩn của Bergey 1994).

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

Trong số những vi khuẩn rễ cố định N, *Azospirillum* được đánh giá là một trong những ứng cử viên tiềm năng cho sản xuất phân vi sinh do có các hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật như vừa có khả năng cố định N, phân giải P lại vừa có khả năng sinh các phytohormon auxin, cytokinin, zeatin, cơ chất điều hòa hoặc siderophore. Cho đến nay có tổng số khoảng 15 loài đã được miêu tả trong chi *Azospirillum*.

Từ ADN tổng số, bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đã thu được gen mã hoá 16S ARN của chủng. Kết quả điện di đồ cho thấy sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S của chủng thu được một băng rất đặc hiệu. Kích thước phân tử vào khoảng ~ 1,5 kb tương đương với tính toán lí thuyết.

Sản phẩm PCR sau tinh sạch được dùng trực tiếp để xác định trình tự nucleotit của gen 16S ARN. Sử dụng đoạn mồi đã gắn huỳnh quang của bộ hoá chất chuẩn, phân tích trên máy xác định trình tự ADN tự động, xử lí bằng chương trình PC/GEN. Truy cập ngân hàng gen để tìm những loài đã đăng ký có trình tự tương đồng.

Kết quả giải trình tự gen của chủng (Hình 3) so sánh với trình tự các chủng được công bố trong Genbank cho thấy chủng As-HT14.1 có quan hệ gần với loài *Azospirillum brasilense* (mức độ tương đồng 98,2%).

Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và trình tự gen 16S ARN, có thể khẳng định chủng được phân lập có tên phân loại là *Azospirillum brasilense* As HT14.1.

Chủng *Pseudomonas* sp. VL-HT14.5

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 7.

Bảng 7. Đặc điểm hình thái của các chủng *Pseudomonas* sp. VL-HT14.5

Chủng	Hình thái khuẩn lạc trên LGI	Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Gram	Bào tử
<i>Pseudomonas</i> sp.VL-	Khuẩn lạc phẳng màu kem đục, có viền nhẵn,	Tế bào hình que, kích thước 0,7-	-	-

HT14.5	tiết sắc tố huỳnh quang, đường kính khuẩn lạc 8 mm.	1,1 x 2,5-4 μ m, đứng đơn lẻ. Có tiên mao.		
--------	---	--	--	--

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh lý

Bảng 8. Đặc điểm sinh lý của các chủng *Pseudomonas* sp. VL-HT14.5

TT	Đặc điểm	VL-HT14.5
1	Hiệu khí bắt buộc	+
2	Vi hiếu khí	-
3	Khả năng di động	+
4	Phép thử catalaza	+
5	Khả năng lên men	+
6	Sinh enterotoxin	-
7	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25-30°C
8	pH cho sinh trưởng	4 - 8

Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhận thấy chủng VL-HT14.5 có đặc điểm tương đối giống vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas*.

Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm sinh hóa

Chủng VL-HT14.5 thuộc loại trực khuẩn Gram (-) và có nhiều đặc điểm giống vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* nên được phân loại theo kit API 20NE. Trong suốt quá trình nuôi cấy, các phản ứng được nhận biết bằng sự đổi màu hoá chất. Kết quả được trình bày ở Bảng 9.

Bảng 9. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn *Pseudomonas* phân giải lân VL-HT14.5 dựa trên kit chuẩn API 20NE

TT	Đặc điểm	Phản ứng	TT	Đặc điểm	Phản ứng
1	Khử nitrat	+	12	Đồng hóa mannitol	-
2	Sinh indol	-	13	Đồng hóa N-acetyl-glucosamine	-
3	Lên men D-glucoza	+	14	Đồng hóa maltoza	-
4	Thủy phân L-arginin	+	15	Đồng hóa kali gluconat	+
5	Sinh ureaza	+	16	Đồng hóa axit capric	-
6	Thủy phân β -glucosidaza	+	17	Đồng hóa axit adipic	-
7	Thủy phân gelatin	-	18	Đồng hóa axit malic	+
8	Thủy phân β -galactosidaza	+	19	Đồng hóa trinati citrat	-
9	Đồng hóa glucoza	+			

10	Đồng hóa arabinosa	+	20	Đồng hóa phenylacetic	-
11	Đồng hóa mannoza	-	21	Sinh Oxidaza	+

Đối chiếu với dữ liệu phần mềm cho thấy chủng VL-HT14.5 tương đồng với vi khuẩn *Pseudomonas putida* (% id) $\geq 95\%$ (xác định tốt). Kết hợp với khóa phân loại vi khuẩn của Bergey có thể sơ bộ định tên chủng VL-HT14.5 là *Pseudomonas putida*.

Do mức độ xác định của các chủng VK phân giải lân theo kit chuẩn API không cao nên cần tiếp tục tiến hành xác định trình tự gen 16S rARN để khẳng định thêm về vị trí phân loại của các chủng này.

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

Trình tự của đoạn gen 16S rARN của chủng VK VLHT14.5 cũng được so sánh với các chủng có mức độ tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen (Hình 5). Kết quả phân tích cho thấy chủng VLHT14.5 thể hiện mức độ tương đồng với *P. putida* J312 tới 100%. Cây phả hệ cũng cho thấy, chủng VLHT14.5 phân lập tại Việt Nam cùng nhóm phụ với chủng *Pseudomonas putida* J312, như vậy chúng có chung nguồn gốc tiến hoá.

Pseudomonas putida đã được biết đến như loại vi khuẩn được sử dụng trong điều khiển bệnh thực vật và có thể làm suy giảm nhiều tác nhân gây ô nhiễm vì vậy nó có thể được sử dụng trong sản xuất phân vi sinh.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, kit chuẩn API 20NE, trình tự gen 16S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey, chủng VL-HT14.5 được phân loại là *Pseudomonas putida*.

Chủng *Aspergillus* sp. ML-HT4.1

Phân loại nấm mốc dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý

Sau 2-5 ngày nuôi cấy tiến hành khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc non. Sau 5-12 ngày nuôi cấy khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc trưởng thành, đồng thời quan sát cách sắp xếp của bộ máy mang bào tử và của bào tử ở tiêu bản vi học.

Đặc điểm chung của chủng nấm sợi được nghiên cứu là trụ nấm tách biệt và có hyalin. Các bào tử có nguồn gốc xuất phát từ các tế bào chân đáy trên trụ đỡ và kết thúc bằng một túi nấm ở đầu. Khuẩn ty tăng trưởng ở ngọn, có vách ngăn, phân nhánh, không màu, màu nhạt hoặc trở nâu. Vừa có khả năng sinh sản sinh dưỡng (từ khuẩn ty), lại vừa có khả năng sinh sản vô tính (bằng bào tử trần).

Đặc điểm sinh lý: Hiếu khí, chịu nhiệt độ cao, chịu axit.

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của các chủng nấm mốc được thể hiện ở Bảng 10.

Bảng 10. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, khuẩn ty và bào tử của chủng *Aspergillus* sp. ML-HT4.1

Chủng	ML-HT4.1
Hình thái khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên Czapek chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	- Khuẩn lạc tốc độ mọc trung bình, kích thước 4,4-5,6 cm - Khuẩn lạc bông, dạng bột dờn lấm tấm, tâm khuẩn lạc rời, rìa là lớp tơ trắng - Không hình thành giọt tiết - Màu sắc: Mặt phải màu đen, mặt trái không màu - Sắc tố không khuếch tán vào môi trường.
Hình thái bào tử dưới kính hiển vi	- Bông hình cầu, có màu đen, tỏa tia khi non và xé rách tạo dạng cột khi già. Kích thước 100-200 μm. - Cuống không màu, bề mặt cuống nhẵn, có màu nâu gần bông. Kích thước (400-800) x (15-18) μm. - Bọng hình cầu. Kích thước 45-72 μm. Vùng sinh sản khắp mặt bông. - Thê bình 2 tầng với đặc trưng lớp thứ nhất dài gấp đôi lớp thứ hai. Lớp 1 hình trụ dài, kích thước (17,5-25) x (5-7,5) μm. Lớp 2 hình chai, kích thước (5-8) x (3-3,75) μm. - Bào tử đỉnh màu nâu đen, có gai. Có 2 bộ cuống đỉnh bào tử. Bọng và sợi cuống có màu nâu bóng. - Bào tử hình cầu, bề mặt có gai xù xì, kích thước (3,5-5) μm.
Nhiệt độ opt	27 - 32°C
Có khả năng đồng hóa	Glucosa, fructoza, sucroza, mannoza, sorboza, galactoza, lactoza
Khả năng sinh enzym	Amylaza, proteaza, cellulaza
Sinh axit	+

Căn cứ vào kết quả khảo sát các đặc điểm của khuẩn lạc nhận thấy các chủng nấm mốc đều mang các đặc điểm đặc trưng của chi nấm mốc *Aspergillus*.

Dựa trên một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc và các đặc điểm vi học của các chủng nghiên cứu kết hợp với khóa phân loại vi nấm của Samson (1994) nhận thấy chủng ML-HT4.1 có đặc điểm giống với nấm sợi thuộc loài *Aspergillus niger*.

Tiếp tục phân loại sâu hơn dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử để định danh chính xác các loài nấm mốc.

Phân loại vi nấm dựa trên trình tự gen 28S rARN

Cây phả hệ (hình 6) dựa trên phân tích phân đoạn gen 28S rARN đã được thiết lập theo chương trình điện toán MEGA 2.1. Kết quả phân tích cho thấy chủng ML-HT4.1 có trình tự gần nhất với chủng *Aspergillus niger* CBS55465^T với mức độ tương đồng 100%.

Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, trình tự gen 28S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi nấm của Raper & Thom (1965), chủng nấm mốc được phân loại là *Aspergillus niger* ML-HT4.1.

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 11.

Bảng 11. 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	Ab-HT14.2	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Cấp độ 1
2	Ac-HT4.1	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Cấp độ 1
3	As HT14.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Cấp độ 1
4	VL-HT14.5	<i>Pseudomonas putida</i>	Cấp độ 1
5	ML-HT 14.2	<i>Aspergillus niger</i>	Cấp độ 1

Cả 5 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.

Ví dụ 3: Sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng cho cây hồ tiêu

Chuẩn bị dịch nuôi cấy của các chủng vi sinh vật bằng cách: lấy các chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết (gồm 5 chủng vi sinh vật: *Azotobacter vinelandii* Ab-HT 14.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT 4.1; *Azospirillum brasilense* As-HT 14.1; *Pseudomonas putida* VL-HT 14.5; và *Aspergillus niger* ML-HT 14.2) từ môi trường thạch nghiêng và nhân giống trên môi trường dịch thể bằng cách nuôi cấy lắc với tốc độ 200 vòng/ phút ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày để tạo ra dịch nuôi cho mỗi loại vi sinh vật, khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ml thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp (hỗn hợp chất mang) bằng cách: phối trộn cao lanh, than bùn, trấu nghiền, cám, bột sắn, đường kính, vôi bột, nước và chất dinh dưỡng đa lượng (gồm K_2HPO_4 , $MgSO_4$ và NaCl phối trộn với nhau theo tỉ lệ khối lượng 1:1:1). Khử trùng hỗn hợp chất mang ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 150 phút.

Phối trộn các thành phần để tạo chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu (HOTIEU-HTD 03) bằng cách: Phối trộn 1% dịch nuôi cấy mỗi loại vào 95% môi trường xốp vô trùng để môi trường đạt độ ẩm khoảng 30%.

Tiến hành lên men xốp trong 7-10 ngày ở nhiệt độ phòng (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 chế phẩm. Sau 7-10 ngày giữ ở nhiệt độ phòng, mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đạt từ 10^7 CFU/g trở lên (TCVN).

Bảo quản: bảo quản chế phẩm ở nhiệt độ phòng, nơi khô thoáng, tránh ánh sáng mặt trời cho đến khi sử dụng. Các chế phẩm có thể sử dụng tốt sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Ví dụ 4: Chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm vi sinh vật chức năng cho cây hồ tiêu

Chế phẩm được tối ưu hoá thành phân và điều kiện nuôi cấy để mật độ vi sinh đạt từ 10^8 CFU/g trở lên sau 1 tuần cấy vào 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 12.

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 12. Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm đa chức năng cho cây hồ tiêu theo thời gian (CFU/g trọng lượng khô)

Chủng vi sinh vật	Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm (x 10^9 CFU/g)						
	1 tuần	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
<i>Azotobacter</i>	0,5	1,25	1,46	1,35	1,1	1,05	0,75
<i>Azospirillum</i>	1,2	3,5	3,8	3,1	2,0	1,25	1,0
<i>Acetobacter</i>	0,92	2,35	3,1	2,15	1,45	1,1	1,0
<i>Pseudomonas</i>	1,1	4,5	4,5	3,65	3,2	2,5	1,25

Hiệu quả có thể đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu theo giải pháp hữu ích đã tạo ra được chế phẩm chứa các chủng vi sinh vật được phân lập từ chính đất để trồng hồ tiêu. Các chủng giống vi sinh vật được tuyển chọn để phối trộn vào chế phẩm là *Azotobacter vinelandii* Ab-HT 14.2; *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT 4.1; *Azospirillum brasilense* As-HT 14.1; *Pseudomonas putida* VL-HT 14.5; và *Aspergillus niger* ML-HT 14.2, đây là các chủng 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 giữ được hoạt tính qua thời gian bảo quản. Chế phẩm thu được theo phương pháp nêu trong giải pháp có khả năng kích thích tăng trưởng, nâng cao hiệu quả năng suất của cây hồ tiêu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

(i) chuẩn bị dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật *Azotobacter vinelandii* Ab-HT 14.2, *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT 4.1, *Azospirillum brasilense* As-HT 14.1, *Pseudomonas putida* VL-HT 14.5 và *Aspergillus niger* ML-HT 14.2 bằng cách lấy từng chủng vi sinh vật hữu ích thuần khiết này và nhân giống trên 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 cho mỗi loại vi sinh vật, khi mật độ tế bào đạt khoảng 10^7 - 10^9 CFU/ml thì cấy vào môi trường nuôi cấy xốp;

(ii) chuẩn bị môi trường nuôi cấy xốp là hỗn hợp chất mang bằng cách phối trộn cao lanh, than bùn, trấu nghiền, cám, bột sắn, đường kính, vôi bột, nước và chất dinh dưỡng đa lượng theo tỉ lệ phần trăm khối lượng như sau

- cao lanh:	35 - 40%
- than bùn:	20 - 25 %
- trấu nghiền:	8 - 10%
- cám:	5 - 6%
- bột sắn:	5 - 6%
- đường kính:	0,8 - 1%
- vôi bột:	0,5 - 0,6%
- nước và chất dinh dưỡng đa lượng (gồm K_2HPO_4 , $MgSO_4$ và $NaCl$ phối trộn với nhau theo tỉ lệ khối lượng 1:1:1)	18,5 - 18,6%

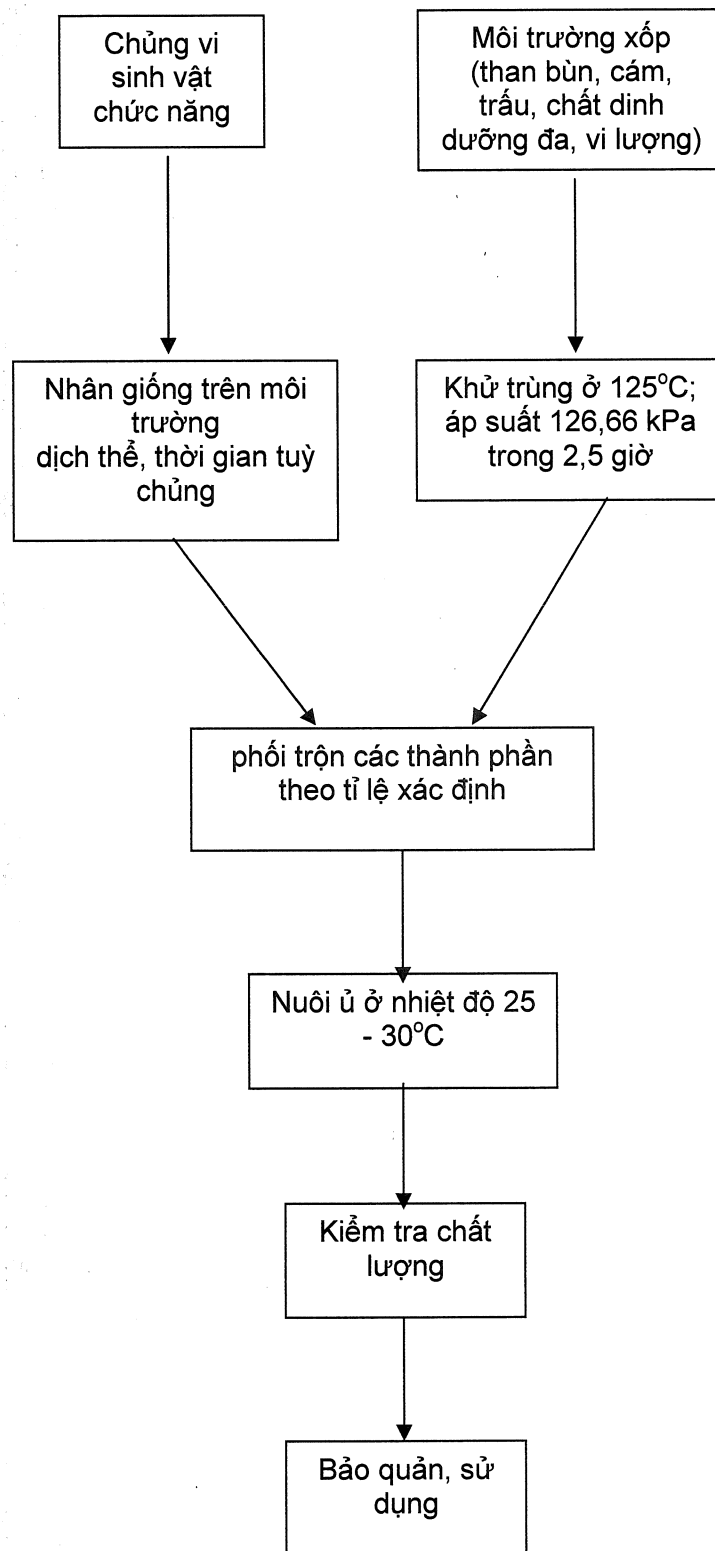
sau đó khử trùng môi trường nuôi cấy xốp ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at), thời gian 150 phút để thu được môi trường nuôi cấy xốp vô trùng;

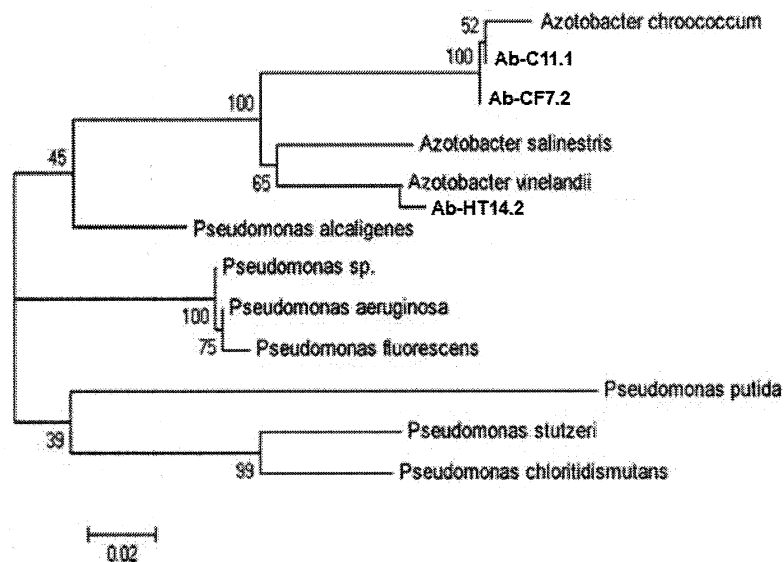
(iii) phối trộn các thành phần dịch nuôi cấy từng chủng vi sinh vật thu được ở bước (i) vào môi trường nuôi cấy xốp thu được ở bước (ii) theo tỉ lệ phối trộn sau:

- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT4.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azospirillum brasilense* As-HT14.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Pseudomonas putida* VL-HT14.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* ML-HT4.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
- 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng;

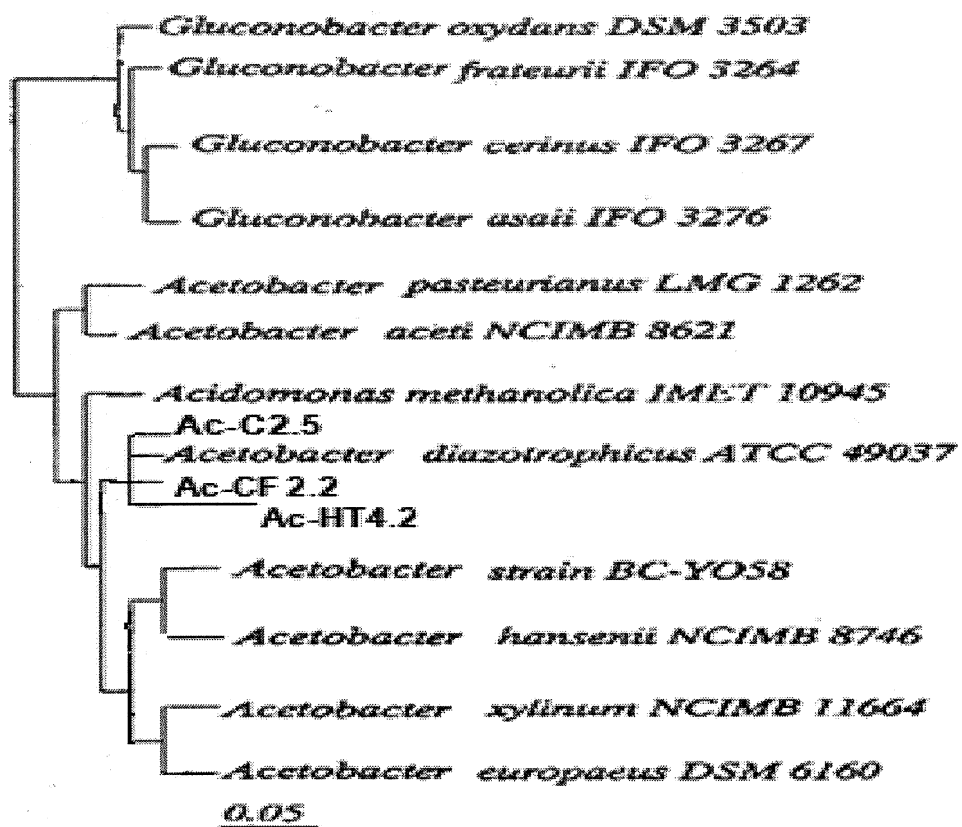
- (iv) nuôi ủ hỗn hợp đã phối trộn ở bước (iii) trong điều kiện nhiệt độ phòng (nhiệt độ từ 25-30°C), áp suất không khí trong phòng, độ ẩm 30%, trong thời gian 7-10 ngày để tạo ra chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu; và
- (v) kiểm tra chất lượng và bảo quản sản phẩm.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm thu được ở bước (iv) được bảo quản trong các túi polyetylen trong điều kiện nhiệt độ 25-30°C, áp suất không khí trong phòng, thời gian bảo quản tối đa là 6 tháng.
3. Chế phẩm vi sinh vật chức năng dùng cho cây hồ tiêu thu được từ phương pháp nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần với tỉ lệ phần trăm theo khối lượng như sau:
- 1% dịch nuôi cấy chủng *Azotobacter vinelandii* Ab-HT14.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
 - 1% dịch nuôi cấy chủng *Acetobacter diazotrophicus* Ac-HT4.2 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
 - 1% dịch nuôi cấy chủng *Azospirillum brasilense* As-HT14.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
 - 1% dịch nuôi cấy chủng *Pseudomonas putida* VL-HT14.5 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g;
 - 1% dịch nuôi cấy chủng *Aspergillus niger* ML-HT4.1 được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng hồ tiêu có mật độ vi sinh vật bằng hoặc lớn hơn 10^7 CFU/g; và
 - 95% môi trường nuôi cấy xốp vô trùng được phối trộn từ các thành phần theo tỉ lệ phần trăm khối lượng như sau:

- cao lanh:	35 - 40%
- than bùn:	20 - 25 %
- trấu nghiền:	8 - 10%
- cám:	5 - 6%
- bột sắn:	5 - 6%
- đường kính:	0,8 - 1%
- vôi bột:	0,5 - 0,6%
- nước và chất dinh dưỡng đa lượng (gồm K_2HPO_4 , $MgSO_4$ và NaCl phối trộn với nhau theo tỉ lệ khối lượng 1:1:1)	18,5 - 18,6%
- trong đó môi trường nuôi cấy xốp này được khử trùng ở nhiệt độ 125°C, áp suất 126,66 kPa (tương đương 1,25 at) trong thời gian 150 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 trong các túi polyetylen trong điều kiện nhiệt độ 25-30°C, áp suất không khí trong phòng, thời gian bảo quản tối đa là 6 tháng.

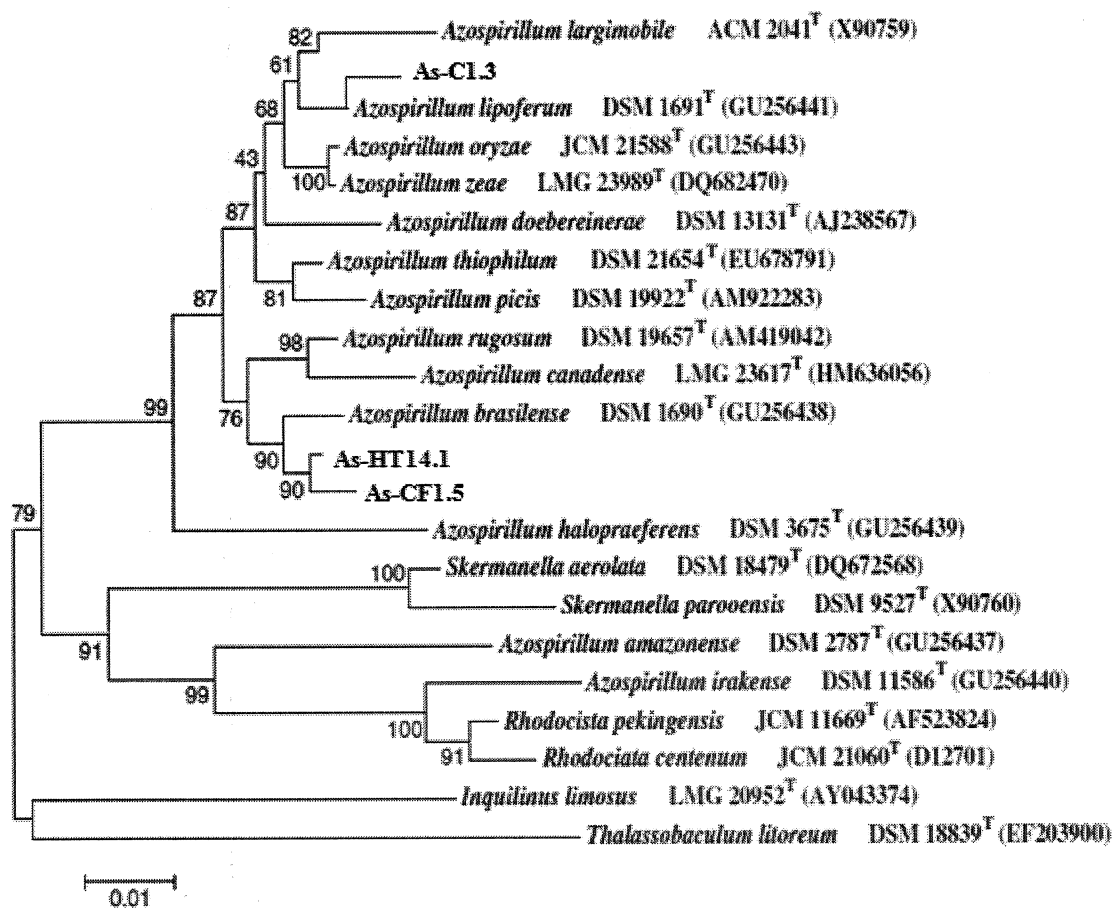
**Hình 1**



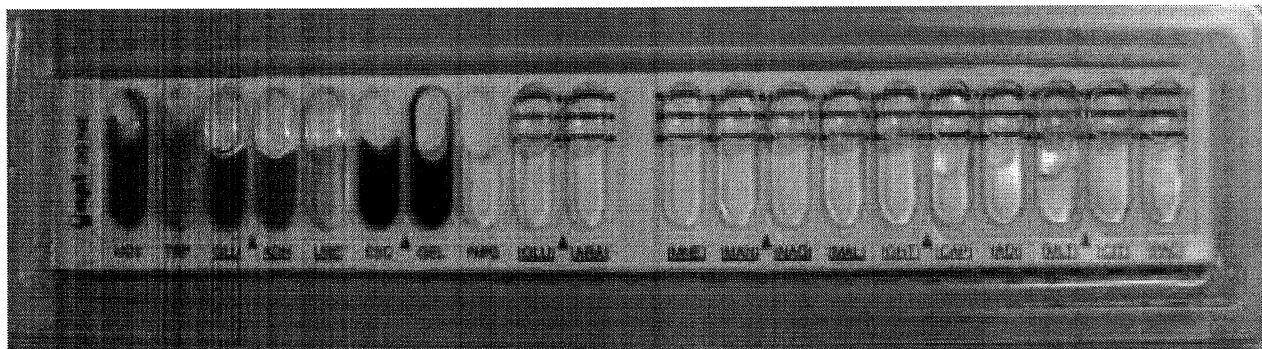
Hinh 2



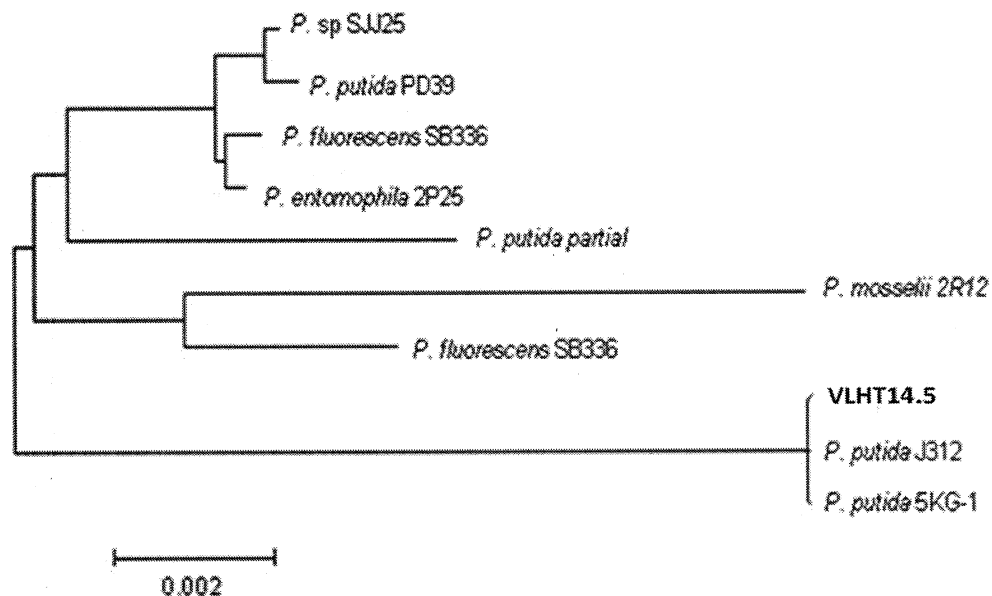
Hinh 3



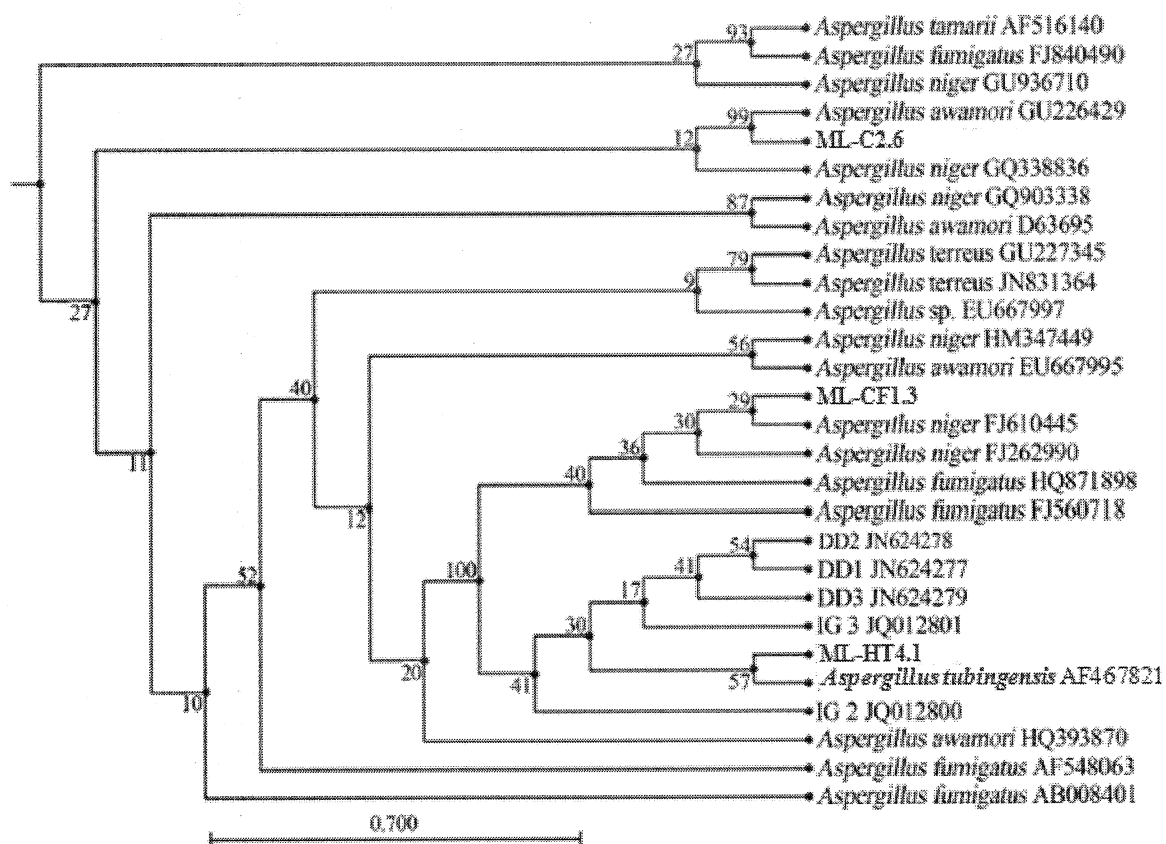
Hình 4



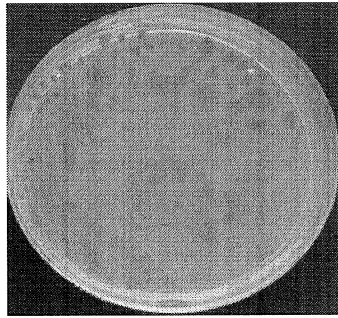
Hình 5



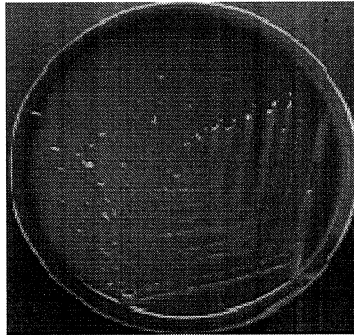
Hình 6



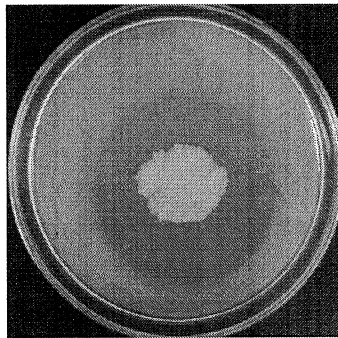
Hình 7



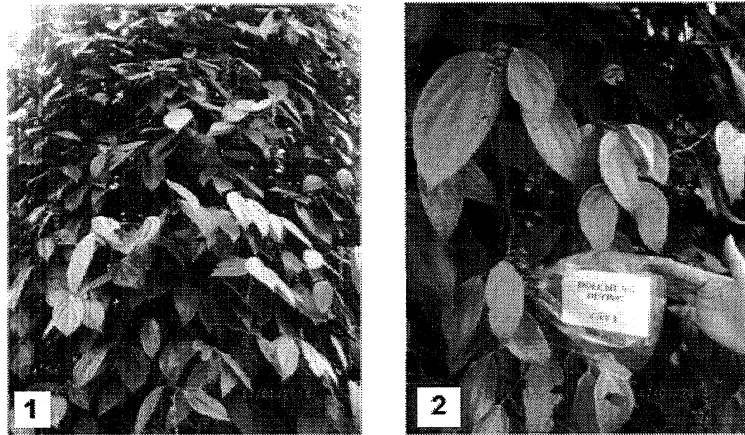
Hình 8



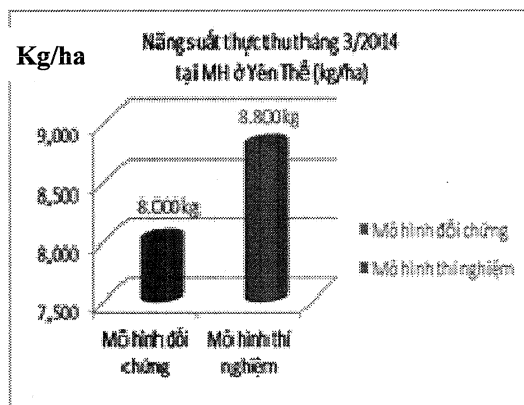
Hình 9



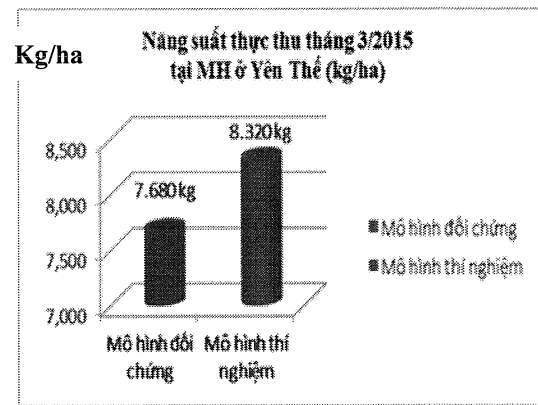
Hình 10



Hình 11



(a)



(b)

Hình 12