



(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) 
2-0001752

(51)⁷ **C05F 11/08, C12N 11/02**

(13) **Y**

(21) 2-2016-00225

(22) 24.06.2016

(45) 25.07.2018 364

(43) 26.09.2016 342

(73) **HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM (VN)**
Thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Minh (VN), Nguyễn Thu Hà (VN), Phan Quốc Hưng (VN)

(54) **CHẾ PHẨM SINH HỌC DÙNG ĐỂ TÁI TẠO THẨM THỰC VẬT VÀ QUY
TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thẩm thực vật chứa các thành phần bao gồm hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3, chất nền và các chất dinh dưỡng bổ sung. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học nông nghiệp. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm sinh học và quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật từ bào tử của các chủng nấm rễ nội cộng sinh Arbuscular Mycorrhizae và các chủng vi khuẩn nốt sần Rhizobium.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Chế phẩm sinh học được sản xuất từ các chủng nấm rễ Mycorrhizae fungi (MF) và nội cộng sinh Arbuscular Mycorrhizae (AM) đã được đưa vào sản xuất và ứng dụng trong việc tái tạo thảm thực vật, tạo cảnh quan ở Nhật Bản từ năm 2008 dưới dạng màng che phủ (Takino filter Co.ltd, 2010). Màng che phủ này có thể dùng được trên mọi loại đất và địa hình nhằm tái tạo rừng, phủ xanh đất trống đồi trọc, cải tạo đất hay tạo cảnh quan, v.v., đặc biệt chế phẩm này phát huy được hiệu quả rõ rệt trên cả các loại đất bị thoái hóa và nghèo dinh dưỡng. Hiện nay, màng che phủ dạng này tại Nhật Bản vẫn đang được nghiên cứu hoàn thiện sản xuất để tăng phổ ứng dụng tùy theo mục đích, điều kiện thổ nhưỡng và loại cây trồng. Tuy nhiên, giá thành của loại sản phẩm này khá cao, trung bình $250.000^{\text{đ}}/\text{m}^2$ và các giống AM sử dụng chủ yếu là các chủng bản địa (*Gigaspora margarita* và *Glomus intraradices*), chỉ phát huy được hiệu quả tối đa trên các vùng sinh thái sở tại.

Một số nghiên cứu đã cho thấy các chủng Arbuscular Mycorrhizae (AM) và Rhizobium có hiệu quả tốt cho cây trồng (Alan et al., 2009; Alireza et al., 2011). Một số tác giả đã sử dụng các chủng AM trong việc bảo trì sân golf bằng cách gây nhiễm chủng *Glomus intraradices* trực tiếp cho cỏ khi trồng (Amarathus, 2001) hay xử lý cây bằng các chủng AM trong giai đoạn vườn ươm giúp cây phát triển sớm khi trồng trên đất rừng (Mridra, 2003). Viện Nghiên cứu Sinh thái và Môi trường rừng Việt Nam đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm rễ nội cộng sinh AM từ *Glomus* sp. được sử dụng để bón cho cây lâm nghiệp như một loại phân bón sinh học. Bên cạnh đó, một số chế

phẩm *Rhizobium* cũng đã được nghiên cứu và sản xuất. Lê Quốc Huy và cộng sự (2004) cũng đã sản xuất và thử nghiệm chế phẩm *Rhizobium* cho cây keo Lai và keo Tai tượng để làm tăng sự sinh trưởng và phát triển của cây và tăng năng suất rừng trồng.

Ở Việt Nam, ngày càng có nhiều diện tích đất bị hoang hóa. Nguyên nhân này một phần là do nạn phá rừng và khai hoang gây ra, một phần khác do không biết khai thác nên sau một vài năm gieo trồng, đất trở nên khô cằn và thiếu chất dinh dưỡng. Đất không được che phủ làm thảm thực vật bị thoái hóa và xuống cấp nghiêm trọng. Đây chính là nguyên nhân gây nên hiện tượng xói mòn, gây ra lũ lụt đầu nguồn, cũng như giảm diện tích đất canh tác dẫn đến lãng phí nguồn tài nguyên đất. Thêm vào đó, việc phát triển đô thị hóa cũng làm giảm một lượng lớn thực vật dẫn đến chất lượng sống của con người cũng bị ảnh hưởng. Do đó, việc tái tạo thảm thực vật đang là nhu cầu rất lớn.

Các sản phẩm hiện có tại Việt Nam mới chỉ dừng lại ở mức chế phẩm sinh học hay hóa học có tác dụng giữ ẩm cho đất và kích thích cây trồng phát triển. Tuy nhiên, cho đến nay chưa hề có nghiên cứu nào liên quan đến việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật tại các vùng đất nghèo chất dinh dưỡng. Do đó, vẫn có nhu cầu tìm kiếm các chế phẩm sinh học này nhằm khắc phục các nhược điểm nêu trên.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật chứa các thành phần bao gồm hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3, chất nền và các chất dinh dưỡng bổ sung.

Theo một phương án cụ thể, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật chứa các thành phần (tính theo % trọng lượng):

- Hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3: 15-18%;

- Chất nền: 80-83% ;
- Các chất dinh dưỡng bổ sung: 1,5-2,0%.

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình để sản xuất chế phẩm sinh học nêu trên bao gồm các bước: (i) nhân giống riêng biệt bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2; (ii) nhân sinh khối riêng biệt các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3; (iii) tạo hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3; và (iv) phối trộn với chất nền và các chất dinh dưỡng bổ sung.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ khối quy trình sản xuất chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Thuật ngữ “tái tạo thảm thực vật” dùng để chỉ việc phủ xanh các vùng đất nghèo chất dinh dưỡng vốn làm cho các thực vật khó phát triển, theo tiêu chuẩn đánh giá về đất nghèo chất dinh dưỡng của Bộ Nông nghiệp (Cẩm nang sử dụng đất nông nghiệp tập 7 (2009)).

Chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật theo giải pháp hữu ích chứa các thành phần bao gồm hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1, *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5, *Bradyrhizobium japonicum* ASS3; chất nền; và các chất dinh dưỡng bổ sung.

Các chủng nấm rễ được sử dụng để tạo bào tử theo giải pháp hữu ích là các chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1, *Dentiscutata nigra* DSB2 (thuộc nhóm AM) và các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5, *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 để tạo sinh khối được lưu giữ trong bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm ươm tạo công nghệ Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các chủng *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 đều là các

chủng nấm rễ bản địa được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây trồng trong nước, có hoạt tính sinh học và sức sống cao với khả năng nảy mầm và xâm nhiễm rễ cây tốt nên hoàn toàn thích nghi với các điều kiện sinh thái của Việt Nam. Sự liên kết của các nhóm nấm rễ AM làm tăng hình thành nốt sần ở cây họ đậu, dẫn đến tăng cường sự sinh trưởng phát triển của cây (Bethelenfalvay et al, 1987, Gueye et al., 1987; Badr EL-Dim & Moawad, 1988, de la Cruz et al., 1988; Louis & Lim, 1988; Kaur & Singh, 1988) nhờ khả năng hấp thụ dinh dưỡng, đặc biệt là phospho qua hệ sợi nấm. Các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 cũng được phân lập từ rễ cây họ đậu trong nước. Nhóm vi khuẩn nốt sần này cũng đã được chứng minh là kích thích sự phát triển của cây họ đậu mạnh hơn nhờ sự cố định nitơ phân tử (Howeler et al., 1987). Sự có mặt của các chủng vi khuẩn nốt sần bản địa *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 làm tăng cường khả năng cố định nitơ, có tác dụng thúc đẩy hoạt động của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 cũng như hoạt động của hệ vi sinh vật hữu ích trong đất, làm tăng cường sự sinh trưởng phát triển của cây trồng đồng thời có tác dụng cải tạo đất, giúp tái tạo thành công thảm thực vật.

Hỗn hợp bao gồm bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1, *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 có trong chế phẩm theo giải pháp hữu ích với lượng nằm trong khoảng 15-18% trọng lượng.

Chất nền được sử dụng trong chế phẩm là đất và các chất hữu cơ. Thường sử dụng đất phù sa sông Hồng do chứa nhiều khoáng chất. Các chất hữu cơ được sử dụng bao gồm bột khô đậu tương và bột cá với hàm lượng 2-3% mỗi loại tính theo tổng trọng lượng chất nền. Hàm lượng chất nền trong chế phẩm nằm trong khoảng 80-83% trọng lượng.

Các chất dinh dưỡng bổ sung được sử dụng trong chế phẩm bao gồm đất khoáng, ure và kali clorua được trộn theo tỷ lệ 32,5% urê: 25% phân kali clorua: 42,5% đất khoáng. Hàm lượng chất dinh dưỡng bổ sung nằm trong khoảng 1,5-2,0% trọng lượng của chế phẩm.

Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau đây:

(i) Nhân giống bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2

Bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 thu được từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm ươm tạo công nghệ Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Việc nhân giống bào tử các chủng *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 có thể được thực hiện theo phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro*.

a) Nhân giống bào tử theo phương pháp *in vivo* :

Hạt giống cây chủ như cỏ mần trầu (*Eleusine indica*), Alfafa (*Medicago sativa* L.) được khử trùng bằng etanol 70° trong 1 phút, tiếp tục khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorit 5% trong 3 phút (lặp lại 3 lần, mỗi lần 1 phút), rồi rửa sạch bằng nước vô trùng 5 lần, mỗi lần trong 1 phút. Sau đó, hạt giống được cho nảy mầm trên đĩa petri có giấy lọc thấm nước vô trùng ở điều kiện 27°C cho đến khi ra rễ dài 2-3 cm.

Các bào tử của chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 gốc sau khi khử trùng và giữ trong dung dịch dinh dưỡng hoặc đất ẩm, được khử trùng lại trong chloramin T và streptomycin. Xử lý một cách riêng biệt các hạt bào tử đã nảy mầm (được thực hiện trên giấy lọc ẩm trong đĩa petri vô trùng ở 27°C và rễ dài 2-3 cm) vào hệ rễ cây chủ trong chậu chứa 100g đất vô trùng với 10 bào tử và 3 cây con/ chậu, nuôi cây con trong điều kiện ở 25°C với 12h sáng/ngày. Theo dõi và bổ sung nước vô trùng hàng ngày. Các bào tử mới sinh ra sẽ được thu nhặt sau 2 tháng theo phương pháp sàng ướt cải tiến.

b) Nhân giống bào tử theo phương pháp *in vitro* :

Trong điều kiện thời tiết bất thuận (quá lạnh hoặc quá nóng), sẽ tiến hành nhân sinh khối theo phương pháp *in vitro*. Sử dụng nguồn nguyên liệu là chủng *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 OK đã nảy mầm để tiến hành cộng sinh với mô rễ thực vật trên môi trường MSR.

Hạt cỏ Alfalfa (*Medicago sativa* L.) và/hoặc Ruzi (*Brachiaria ruziziensis*) (của công ty TNHH hạt giống Sen vàng) được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm 5 phút trong cồn etanol 70⁰, ngâm trong dung dịch natri hypochlorit 5% trong 10 phút, tiếp theo là rửa kỹ 5 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó các hạt này được cấy vào đĩa thạch 0,5% agar với lượng 5-7 hạt/đĩa, tiếp đó đậy kín bằng parafin và úp ngược trong tủ ẩm ở 27⁰C và theo dõi quá trình nảy mầm trong thời gian 10 ngày.

Sau thời gian từ 7 đến 10 ngày, các hạt nảy mầm với đoạn rễ dài khoảng 3-5 cm. Dùng panh và dao vô trùng cắt đoạn rễ (khoảng 3 - 4 đốt phân nhánh) và chuyển sang môi trường MS có bổ sung IBA (axit indole butylic) với nồng độ 1,5 ppm. Nuôi cấy rễ phát triển trong khoảng 15 ngày trên môi trường MS này, sau đó quan sát và đánh dấu những đoạn rễ không nhiễm khuẩn (thường có màu trắng hoặc vàng nhạt, có phân nhánh cấp 1 hoặc 2, có đường kính trội hơn) để tiếp tục cấy chuyển. Dùng dao vô trùng cắt đoạn rễ đã xác định dài khoảng 3-5 cm, rồi dùng panh gấp mảnh rễ sang đĩa petri đã có sẵn môi trường MS có bổ sung IBA mới, mỗi đĩa petri cấy 2 đoạn rễ với chiều ngược nhau. Bọc kín đĩa petri bằng parafin rồi đưa đĩa này vào tủ nuôi cấy trong điều kiện tối ở 27⁰C. Thực hiện cấy chuyển như vậy nhiều lần trong điều kiện vô trùng nhằm lựa chọn được các dòng mô rễ cỏ Alfalfa và/hoặc Ruzi *in vitro* thuần, sinh trưởng tốt nhất để sử dụng làm nguồn nguyên liệu cộng sinh với AM. Thành phần môi trường MS được sử dụng cho việc cấy chuyển là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Murashige and Skoog, 1962).

Việc cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 với mô rễ thực vật thuần, được lựa chọn từ thử nghiệm nêu trên, được tiến hành bằng cách dùng dao cần thận chuyển phần thạch của một đĩa petri chứa một cách riêng biệt các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 đã nảy mầm sang đặt vừa vào phần thạch vừa loại bỏ trên môi trường MSR (Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection) (Declerck et al., 1998) chứa 0,5% aga, độ pH =5,5 của một đĩa petri khác. Cấy chuyển mô rễ thực vật thuần, được lựa chọn từ thí nghiệm nêu trên lên đĩa thạch chứa các chủng nấm rễ này sao cho chiều hướng phát triển của rễ mới sẽ chạm sợi nấm. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện tối, ở 27⁰C. Theo

đôi sự tiến triển của rễ, sợi nấm, hệ cộng sinh và sinh bào tử mới trên đĩa cấy nhằm loại bỏ sự tạp nhiễm.

Sau thời gian 4-5 tháng, đếm số lượng bào tử riêng biệt của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 trực tiếp theo ô có kích thước 1mm và thu nhặt bào tử nấm rễ mới trên các đĩa nuôi cấy. Bào tử được khử trùng bề mặt trong Chloramin T 2% với Streptomycin 1200 ppm rồi cất giữ ở điều kiện 4°C làm giống cho sản xuất chế phẩm sinh học.

(ii) Nhân sinh khối các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3.

Các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 thu được từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm ươm tạo công nghệ Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Từ ống nghiệm giữ giống, các chủng *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 được cấy chuyển một cách riêng biệt sang ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng, nuôi cấy trong thời gian 3-5 ngày. Tiếp theo, tiến hành nhân giống cấp I bằng cách cấy giống vào bình tam giác trên môi trường có thành phần như sau (tính theo g/L): manitol 10; cao nấm men 0,5; KH_2PO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; NaCl; 0,1; pH 6,8, nuôi cấy trên máy lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong 72 giờ.

Từ môi trường nhân giống cấp I, giống phát triển tốt được cấy truyền với lượng 5% (v/v) sang môi trường nhân giống cấp II có thành phần sau (g/L): manitol 10; cao nấm men 0,5; KH_2PO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; NaCl; 0,1; pH 6,8. Sau 72 giờ nuôi cấy với tốc độ khuấy 300 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C, kiểm tra khả năng sinh trưởng, phát triển và độ thuần khiết để tiến hành nhân giống cấp III.

Từ môi trường nhân giống cấp II, giống phát triển tốt được tiếp tục cấy truyền với lượng 5% (v/v) sang môi trường nhân giống cấp III có thành phần tương tự như môi trường nhân giống cấp II. Tiến hành lên men với tốc độ khuấy 300 vòng/phút; tốc độ thổi khí 1 lít/1 lít môi trường/1 phút. Sau 120 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C thu được

sinh khối các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 để sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học.

(iii) Tạo hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3.

Bào tử của từng chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 thu được trong mục (i) nêu trên được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 theo số lượng để thu được hỗn hợp bào tử của các chủng nấm rễ này. Sinh khối của từng chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 thu được trong mục (ii) cũng được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 theo trọng lượng để thu được hỗn hợp sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần này. Sau đó, hỗn hợp bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 được trộn với hỗn hợp sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 theo tỷ lệ 2300-2500 bào tử/150-180ml. Hàm lượng hỗn hợp này trong chế phẩm nằm trong khoảng 15-18% trọng lượng.

(iv) Phối trộn với chất nền và chất dinh dưỡng bổ sung

Chất nền được sử dụng trong chế phẩm này bao gồm đất và các chất hữu cơ với tỷ lệ 80-83% theo trọng lượng. Sử dụng loại đất bất kỳ có chứa khoáng chất và chất hữu cơ, chẳng hạn như đất phù sa sông Hồng. Đất thu được được sàng qua rây có cỡ lỗ 2-5mm để loại bỏ tàn dư thực vật và đất đá thô, sau đó bổ sung chất hữu cơ bao gồm bột khô đậu tương và bột cá theo tỷ lệ 2-3% mỗi loại tính theo tổng trọng lượng chất nền vào. Hàm lượng chất hữu cơ trong chất nền nằm trong khoảng 4-6% trọng lượng.

Các chất dinh dưỡng bổ sung được sử dụng trong chế phẩm này bao gồm ure, kali clorua và đất khoáng mịn được phối trộn theo tỷ lệ: 32,5% urê: 25% phân kali clorua: 42,5% đất khoáng. Hàm lượng của chất dinh dưỡng bổ sung trong chế phẩm nằm trong khoảng 1,5-2,0% trọng lượng.

Hỗn hợp thu được nêu trong mục (iii) sẽ được phối trộn với chất nền và chất dinh dưỡng bổ sung để thu được chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích.

Chế phẩm thu được đạt chỉ tiêu chất lượng: độ ẩm 23-25%; OC: 0,6-0,8%; N: 0,5-0,8%; P_2O_5 : 0,07-0,1%; K_2O : 1,2-1,4%, các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 có hàm lượng > 2000 bào tử/kg, các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 > 10^6 CFU/g. Chế phẩm này có tác dụng tái tạo thảm thực vật ở những vùng đất nghèo chất dinh dưỡng, nơi thực vật khó phát triển, như được đánh giá theo chỉ tiêu của Bộ Nông nghiệp (pH < 4,0; OM < 1-2%; TN < 0,08-0,1%; P_2O_{5TS} < 0,06%; K_2O_{TS} < 1,0%; P_2O_{5dt} < 10mg/100g; K_2O_{dt} < 10mg/100g). Chế phẩm này sẽ được trộn đều với hạt giống trước khi trải trên diện tích cần tái tạo thảm thực vật hoặc trộn vào hệ rễ cây con khi trồng ngoài thực địa sau giai đoạn vườn ươm mà không cần bổ sung thêm dinh dưỡng và giảm được số lần chăm sóc như tưới nước và trừ sâu.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ sau 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 này.

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm sinh học để tái tạo thảm thực vật

Hạt giống cây chủ là cỏ mần trầu, Alfalfa (*Medicago sativa* L.) được khử trùng bằng etanol 70° trong 1 phút, tiếp tục khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorit 5% trong 3 phút (lặp lại 3 lần, mỗi lần 1 phút), rồi rửa sạch bằng nước vô trùng 5 lần, mỗi lần trong 1 phút. Sau đó, hạt giống được cho nảy mầm trên đĩa petri có giấy lọc thấm nước vô trùng ở điều kiện 27°C cho đến khi ra rễ dài 2-3 cm.

Từ hộp giữ bào tử chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 do Trung tâm ươm tạo công nghệ Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp, các chủng *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 gôc sau khi khử trùng và giữ trong dung dịch dinh dưỡng, được khử trùng lại trong chloramin T và streptomycin và được nhiễm một cách riêng rẽ vào hệ rễ cây cỏ Alfalfa (sau khi cho hạt nảy mầm trên giấy lọc ẩm trong đĩa petri vô trùng ở 27°C và rễ dài 2-3 cm) trong các chậu chứa 100g đất phù sa sông Hồng vô trùng (theo cách khử trùng 2 lần ở 80°C/60 phút cách nhau 24h) với 10 bào tử và 3 cây con/chậu. Nuôi cấy trong điều kiện ở 25°C với 12h sáng/ngày. Theo dõi và tưới nước vô trùng hàng ngày cho đảm bảo độ ẩm 40 - 45%.

Bào tử các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 sẽ được thu hoạch sau 2 tháng từ đất trong chậu theo phương pháp sàng ướt cải tiến. Sau đó, các bào tử tốt không vỡ được khử trùng bề mặt bằng Chloramin T 2% với Streptomycin 1200 ppm, rồi rửa sạch bằng nước vô trùng.

Các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3 do Trung tâm ươm tạo công nghệ Nông nghiệp – Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Từ ống nghiệm giữ giống, các chủng này lần lượt được cấy truyền sang ống nghiệm chứa môi trường YMA thạch nghiêng, nuôi cấy trong thời gian 3-5 ngày. Tiếp theo cấy giống cấp I vào bình tam giác trên môi trường có thành phần (tính theo g/L): manitol 10; cao nấm men 0,5; KH_2PO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; NaCl; 0,1; pH 6,8, nuôi cấy trên máy lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong 72 giờ, tổng thể tích giống là 0,3 lit; nuôi trên máy lắc (200 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong 72 giờ (giống cấp 1).

300ml dịch giống cấp I phát triển tốt được cấy truyền sang 6 lit môi trường nhân giống cấp II trong bình lên men dung tích 10 lit có thành phần như sau (g/l): Manitol 10; cao nấm men 0,5; KH_2PO_4 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; NaCl; 0,1; pH 6,8. Thời gian nuôi cấy 72 giờ với tốc độ khuấy 300 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C. 1500ml dịch nhân giống cấp II phát triển tốt được cấy truyền sang 30 lit môi trường nhân giống cấp III có thành phần (g/l) tương tự như môi trường nhân giống cấp II trong bình dung tích 50 lit, với tốc độ khuấy 300 vòng/phút; tốc độ thổi khí 1 lit/ 1 lit môi trường/ 1phút. Sau 120 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C thu được sinh khối lên men các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3.

1kg chất dinh dưỡng bổ sung được chuẩn bị bằng cách trộn đều 325g urê với 250g phân kali clorua và 425g đất khoáng mịn (vermiculite).

Chất nền được chuẩn bị bằng cách sử dụng 9,4kg đất phù sa sông Hồng đã được sàng qua rây 2mm để loại bỏ các tàn dư thực vật và đất đá thô, sau đó phối trộn thêm 300g bột cá và 300g bột khô đậu tương vào.

Bào tử các chủng nấm *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 được trộn theo tỉ lệ 1:1 (khoảng 12000 bào tử/loại), sau đó được trộn với 1800 ml dịch nhân giống sinh khối của các chủng Rhizobium (900 ml *Shinorrhizobium fredii* DSM5

và 900 ml *Bradyrhizobium japonicum* ASS3) với mật độ 23000-25000 bào tử/ 1800 ml để tạo hỗn hợp giống nấm rễ và vi khuẩn nốt sần (khoảng 1,8kg).

Phối trộn 1,8kg hỗn hợp giống nấm rễ và vi khuẩn nốt sần thu được ở trên vào 8kg chất nền đã xử lý như trên và 200g chất dinh dưỡng bổ sung để thu được chế phẩm theo giải pháp hữu ích. Cũng có thể thêm nước để tạo hạt đều và đảm bảo độ ẩm đạt 25%.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về hiệu quả tái tạo thảm thực vật

Thử nghiệm về hiệu quả tái tạo thảm thực vật được tiến hành tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam (2015). Nhóm 1 sử dụng đối chứng là phân bón NK (bao gồm urê và kali clorua). Nhóm 2 sử dụng chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích. Thử nghiệm được tiến hành lặp lại 5 lần trên cây cỏ hoàng lạc (*Arachis pintoii*). Các chế phẩm được trộn trực tiếp vào hệ rễ cây cỏ hoàng lạc khi trồng bầu trên đất thử nghiệm với lượng 12-15g/bầu và 25 bầu/m².

Bảng 1. Hiệu quả của chế phẩm lên sự sinh trưởng của cỏ hoàng lạc

Chi tiêu	Chiều dài thân	Chiều dài rễ	Trọng lượng thân	Trọng lượng rễ	Tỷ lệ xâm nhiễm AM	Số bào tử AM	Số lượng nốt sần
Nhóm	cm/cây		g/cây		(%)	/100g đất	Nốt/cây
1	12,13	6,08	7,39	2,01	9,48	8,25	7,32
2	19,35	12,50	18,65	8,89	45,67	45,56	22,78
LSD 5%	0,45	2,01	2,82	0,5	3,0	2,52	1,75
CV %	0,8	5,6	6,5	2,7	7,1	6,3	5,3

Kết quả sau 4 tuần thử nghiệm, khả năng sinh trưởng và phát triển của nhóm sử dụng chế phẩm sinh học cao hơn so với nhóm sử dụng đối chứng ở mức sai số có ý nghĩa. Ở nhóm sử dụng chế phẩm sinh học, cỏ sinh trưởng nhanh, trọng lượng thân, trọng lượng rễ cũng như mức độ xâm nhiễm rễ và số bào tử cao hơn hẳn so với nhóm sử dụng đối chứng, đặc biệt là ở các chỉ tiêu sinh trưởng của rễ: chiều dài rễ gấp 2,05 , lần; trọng lượng rễ gấp 4,42 lần; mức độ xâm nhiễm rễ gấp 4,82 lần; số lượng bào tử AM gấp 5,52 lần và số lượng nốt sần gấp 3,11 lần so với nhóm sử dụng đối chứng.

Bên cạnh đó, tỷ lệ che phủ ở nhóm cây này cũng cao hơn hẳn (đạt 95,63% sau 4 tuần), gấp 1,75 lần so với đối chứng (chỉ đạt 54,6%).

Ngoài ra, kết quả phân tích đất cũng cho thấy nhóm sử dụng chế phẩm sinh học góp phần vào sự chuyển biến đất theo hướng tích cực hơn so với nhóm sử dụng đối chứng do sự che phủ của thực vật làm tăng độ ẩm của đất và lượng vi sinh vật hữu ích có trong chế phẩm.

Bảng 2. Hiệu quả của chế phẩm đến tính chất đất

Chỉ tiêu	Tính chất đất sau xử lý						
	pH	OC	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Độ xốp	VSVTS
Nhóm	%						(10 ⁶ CFU/g)
1	6,1	1,68	0,14	0,12	1,69	46,4	8,6
2	6,5	1,75	0,17	0,13	1,72	67,3	98,7

Ví dụ 3: Thử nghiệm tái tạo thảm thực vật trên đất trống đồi trọc

Thử nghiệm tái tạo thảm thực vật để phủ xanh đất trống đồi trọc nghèo chất dinh dưỡng được thực hiện tại xã Tiên Phong, huyện Yên Dũng, tỉnh Bắc Giang (2012) với hai nhóm bao gồm nhóm 1 sử dụng phân bón NK làm chất đối chứng và nhóm 2 sử dụng chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích với diện tích 100m²/ô thử nghiệm.

Các chế phẩm được trộn đều với hạt giống của cây đậu mèo (*Mucuna pruriens*) theo tỷ lệ 110 hạt đậu mèo/kg chế phẩm rồi đem gieo với mật độ chế phẩm sử dụng là 300g/m².

Bảng 3. Hiệu quả của chế phẩm đến sự sinh trưởng của cây đậu mèo

Thời gian	Chỉ tiêu	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao (cm)	Số lá (lá kép)	Trọng lượng thân (g/cây)	Trọng lượng rễ (g/cây)
Tuần 1	Nhóm 1	90,74	-	-	-	-
	Nhóm 2	97,68	-	-	-	-
Tuần 2	Nhóm 1	-	6,72	2,33	-	-
	Nhóm 2	-	11,22	2,67	-	-
Tuần 3	Nhóm 1	-	7,50	2,83	-	-
	Nhóm 2	-	15,22	3,78	-	-
Tuần 4	Nhóm 1	-	9,55	4,33	2,18	0,85
	Nhóm 2	-	39,78	5,89	5,79	1,50

Tuần 8	Nhóm 1	-	44,67	8,12	3,99	1,07
	Nhóm 2	-	95,87	12,24	7,83	2,69

Kết quả thử nghiệm cho thấy việc sử dụng chế phẩm sinh học trong nhóm 2 giúp cho cây đậu mè sinh trưởng tốt hơn (chiều cao cây, chiều dài rễ, trọng lượng thân và trọng lượng rễ) so với nhóm đối chứng chỉ sử dụng phân bón NK. Ở tuần thứ 8, chiều cao cây và số lá kép trung bình/cây ở nhóm sử dụng chế phẩm sinh học (95,87 cm và 12,24 lá/cây) cao vượt trội so với nhóm đối chứng (44,67cm và 8,12 lá/cây), đặc biệt là chỉ số diện tích lá (LAI) cao hơn nhiều so với nhóm đối chứng. Ở nhóm sử dụng chế phẩm, chỉ số diện tích lá lên đến 1,83 (m^2 lá/ m^2 đất) trong khi chỉ số LAI ở nhóm đối chứng chỉ là 0,56 (m^2 lá/ m^2 đất).

Ngoài ra, kết quả phân tích tính chất đất thử nghiệm cũng cho thấy khi sử dụng chế phẩm theo giải pháp hữu ích có tác dụng cải thiện tính chất đất, đặc biệt nhờ có thảm thực vật che phủ giúp làm tăng độ ẩm của đất và lượng vi sinh vật hữu ích có trong chế phẩm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích thu được trên cơ sở bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Rhizobium Shinorrhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3. Các chủng này được phân lập từ các nguồn trong nước, do đó chế phẩm thu được có giá thành rẻ và có thể được ứng dụng rộng rãi trong việc tái tạo thảm thực vật ở các vùng đất nghèo chất dinh dưỡng, thực vật khó phát triển, cũng như giúp cải tạo đất do sự che phủ của thảm thực vật giúp làm tăng độ ẩm và lượng vi sinh vật có ích có trong chế phẩm này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm sinh học dùng để tái tạo thảm thực vật chứa các thành phần (theo % trọng lượng):

- hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3: 15-18%;

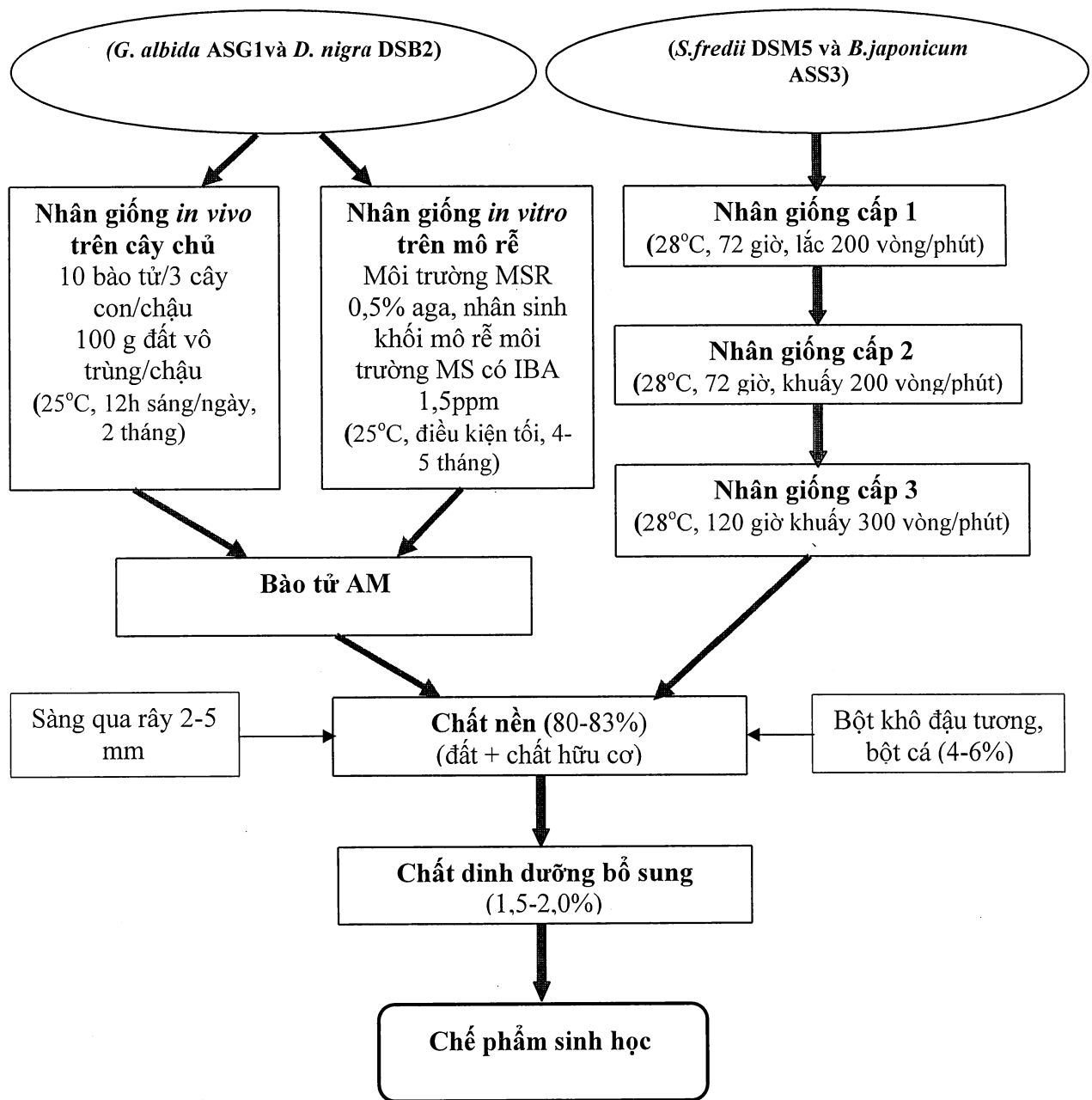
- chất nền: 80-83%; và

- chất dinh dưỡng bổ sung : 1,5-2,0%.

2. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất nền bao gồm đất và chất hữu cơ là bột khô đậu tương và bột cá

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất dinh dưỡng bổ sung bao gồm ure, kali clorua và đất khoáng.

4. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước: (i) nhân giống riêng biệt bào tử của các chủng nấm rễ nội cộng sinh *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2; (ii) nhân sinh khối riêng biệt các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3; (iii) tạo hỗn hợp gồm bào tử của các chủng nấm rễ *Gigaspora albida* ASG1 và *Dentiscutata nigra* DSB2 và sinh khối của các chủng vi khuẩn nốt sần *Shinorhizobium fredii* DSM5 và *Bradyrhizobium japonicum* ASS3; và (iv) phối trộn với chất nền và các chất dinh dưỡng bổ sung.



Hình 1. Quy trình sản xuất chế phẩm dùng tái tạo thảm thực vật