

BNN & PTNT
VKHKTNNVN

BỘ NÔNG NGHIỆP & PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam
Thanh Trì, Hà Nội

TỔNG HỢP

BÁO CÁO KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
CÁC NHÁNH ĐỀ TÀI

**Tên đề tài: Nghiên cứu công nghệ sản xuất phân bón vi sinh
vật đa chủng mới, phân bón chức năng phục vụ
chăm sóc cây trồng cho một số vùng sinh thái**

Mã số: KC.04.04

Chủ nhiệm đề tài: TS. Phạm Văn Toàn
Cơ quan chủ trì đề tài: Viện KHKTNNVN

Hà Nội, 6-2005

R

BỘ NÔNG NGHIỆP & PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

BÁO CÁO TỔNG KẾT HOẠT ĐỘNG NHÁNH ĐỀ TÀI
“Nghiên cứu và phát triển công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật đa chủng sử dụng cho khoai tây, lạc, cà chua và hồ tiêu”

Cơ quan thực hiện : Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam
Chủ nhiệm nhánh đề tài : TS Phạm Văn Toàn

Hà nội 11/2004

5391 - 1
28/6/05

TÊN NHÁNH ĐỀ TÀI: Nghiên cứu, phát triển công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật đa chủng mới, phân bón chức năng sử dụng cho khoai tây, cà chua, lạc và tiêu

ĐƠN VỊ CHỦ TRÌ: Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam

CHỦ NHIỆM NHÁNH ĐỀ TÀI: TS Phạm Văn Toàn

CÁC ĐƠN VỊ PHỐI HỢP:

Viện KHKTNNVN	Các đơn vị khác
Trung tâm NC thực nghiệm đậu đỗ	Trung tâm đấu tranh sinh học Viện BVTV
Trung tâm NC cây có củ	Bộ môn VSV Viện TNNH
Trung tâm Chuyển giao kỹ thuật	Bộ môn đất, phân bón Viện KHNN miền Nam
Bộ môn MDDTTV	Công ty TNHH hữu cơ
Bộ môn Hoá học đất & MT	Công ty thương mại & hoá sinh “Thiên Sinh” chi nhánh phía Bắc

MỤC TIÊU: Nghiên cứu xây dựng qui trình sản xuất phân bón VSV chức năng qui mô pilot và ứng dụng công nghệ tại cơ sở sản xuất

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Phân lập, tuyển chọn và đánh giá chủng, giống VSV thuộc các nhóm CĐN, PGL, KTSTTV và ĐK
- Nghiên cứu xác định tổ hợp các VSV sử dụng cho khoai tây, cà chua, lạc và tiêu
- Nghiên cứu xây dựng qui trình sản xuất chế phẩm VSV đa chủng, chức năng sử dụng cho khoai tây, cà chua, lạc và tiêu
- Nghiên cứu khả năng sử dụng phân hữu cơ làm cơ chất sản xuất phân hữu cơ VSV đa chủng, chức năng
- Sản xuất thử nghiệm phân hữu cơ VSV đa chủng, chức năng
- Khảo nghiệm đồng ruộng và xây dựng mô hình trình diễn hiệu lực của phân hữu cơ VSV đa chủng, chức năng đối với cây trồng

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Để giải quyết các nội dung nghiên cứu đáp ứng mục tiêu xác định nêu trên đề tài đã sử dụng kỹ thuật và phương pháp nghiên cứu sau

- Nghiên cứu đặc điểm chung và điều kiện sinh trưởng phát triển của VSV theo các phương pháp nghiên cứu VSV thông dụng (11, 28,)
- Phương pháp lấy mẫu đất và chuẩn bị mẫu đất theo TCVN 5297:1995; 5960-95; 10TCN 367-99
- Phương pháp phân tích các chỉ tiêu lý hoá học của mẫu đất, phân bón theo 10TCN 378-99; 369-99; 370-99; 377-99; 373-99; 371-99; 375-99; 303-97; 361-99; 306-97; 307-97; 308-97; 302-97; 366-99
- Phương pháp xác định hoạt tính cố định nitơ, phân giải lân VSV và chất lượng phân bón VSV theo TCVN 6166-2002; 6167-1996; 7185-2002; 10TCN 299-97; 298-97
- Khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật của VSV được xác định theo phương pháp nuôi cây VSV trong môi trường Salkowsky cải tiến có bổ xung 0,1 % Tryptophan . Sau 36-48 giờ tiến hành đo trên máy so màu. Hàm lượng IAA tạo ra trong môi trường được tính toán trên cơ sở đồ thị IAA chuẩn.
- Đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn/ nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng theo phương pháp khuếch tán hoạt chất ức chế vi sinh vật trong môi trường thạch (12, 27), trong đó hoạt tính đối kháng được xác định bằng đường kính vòng ức chế. Đó là vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc (đối với trường hợp cấy điểm) hoặc lỗ thạch (đối với trường hợp khoan lỗ thạch), nơi mà VSV vật gây bệnh không sinh trưởng được
- Xác định tên VSV bằng hệ thống định danh BIOLOG và kit chuẩn API. Nguyên lý của phương pháp dựa trên khả năng chuyển hoá các hợp chất các bon của VSV. Cấy chủng VSV đã làm thuần vào các giếng chứa sẵn môi trường trong khay môi trường của nhà sản xuất (96 giếng chứa 95 môi trường với các hợp chất các bon khác nhau) và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ phù hợp với yêu cầu sinh trưởng phát triển của chủng VSV. Sau 24-36 giờ tiến hành đánh giá các phản ứng sinh hoá bằng hệ thống đọc

tự động của BIOLOG và so sánh với phần mềm dữ liệu có sẵn. Hệ thống BIOLOG tự động so sánh và đưa ra tên VSV với xác suất tương đồng cao nhất.

- Phương pháp bố trí thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp và diện rộng theo 10TCN 216-95 (216-2003): Qui phạm khảo nghiệm đồng ruộng hiệu lực của phân bón đối với cây trồng và giáo trình „Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng (38, 44). Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 3 lần lặp lại. Thời gian theo dõi thí nghiệm là 1 chu kỳ sinh trưởng phát triển đối với cây nông nghiệp và công nghiệp ngắn ngày (từ khi gieo trồng cho đến khi thu hoạch xong) và 1 năm đối với cây công nghiệp ngắn ngày. Đối với cây lâm nghiệp thời gian theo dõi thí nghiệm là 10 tháng. Số liệu nghiên cứu được xử lý theo chương trình thống kê và xử lý số liệu IRRISTAT.
- Các thí nghiệm trong nhà kính, nhà lưới và vườn ươm được thực hiện với 4 lần lặp lại, trong đó đất trồng cây thí nghiệm là loại đất đã có sẵn mầm bệnh (*R.solanacearum* hoặc nấm *F. oxysporum*) hoặc được lây nhiễm nhân tạo các VSV gây bệnh với mật độ 10^3 - 10^6 CFU/g đất trồng tùy từng loại cây thí nghiệm. Thời gian theo dõi thí nghiệm trong nhà kính, nhà lưới và vườn ươm là 45 ngày đối với cây nông nghiệp, công nghiệp ngắn ngày và 2 tháng đối với cây lâm nghiệp và công nghiệp dài ngày.

KẾT QUẢ THỰC HIỆN

1. Tổng quan tài liệu

Trong tự nhiên đất trồng không chỉ thuần túy là tập hợp các nguyên tố hoá học, mà rộng hơn đất trồng là một thế giới sống. Đó là nơi trú ngụ và sinh sống của hàng triệu triệu sinh vật và nơi đó từng giờ, từng phút luôn luôn xảy ra hàng loạt các phản ứng lý, hoá và sinh học. Thông qua các phản ứng lý, hoá, sinh học và các hoạt động sống của sinh vật đất trồng mới có điều kiện để hồi phục và cân bằng thông qua các qui luật của tự nhiên. Đất trồng đồng thời cũng chứa một số lượng lớn các VSV gây bệnh hại cây trồng. Để phát triển nông

nghiệp bền vững các nhà khoa học và người sử dụng đang rất quan tâm đến các giải pháp tổng hợp vừa có tác dụng bồi dưỡng, nâng cao sức sống của đất, giảm thiểu phân bón hoá học đồng thời có khả năng hạn chế các VSV gây bệnh hại cây trồng.

Phân bón VSV, chế phẩm VSV phòng trừ bệnh vùng rễ cây trồng cạn đã được nghiên cứu từ nhiều năm nay. Các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước đã cho thấy sử dụng phân bón VSV có thể cung cấp cho đất và cây trồng từ 30 - 60 kg N/ha/năm hoặc thay thế 1/2 - 1/3 lượng lân vô cơ bằng quặng photphat. Ngoài ra thông qua các hoạt động sống của VSV cây trồng nâng cao được khả năng trao đổi chất, khả năng chống chịu bệnh tật và qua đó góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông phẩm (6, 9, 17, 18, 32, 39, 40, 41). Do hệ VSV rất đa dạng và mỗi VSV trong đất đều chịu nhiều tác động qua lại của các VSV khác cũng như điều kiện môi trường nên hiệu quả của các sản phẩm vi sinh trong các điều kiện khác nhau không giống nhau (7, 8, 22).

Bệnh vùng rễ cây trồng cạn đã và đang gây thiệt hại nặng nề cho sản xuất, trung bình khoảng 18% đối với cà chua, 4-20% đối với khoai tây, 4-15% đối với lạc và 5-20% đối với cây công và lâm nghiệp. Các nghiên cứu trong nước đã chỉ ra *Pseudomonas solanacearum* là tác nhân gây bệnh chết héo ở cà chua, khoai tây, lạc; *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* và *Phytophthora* là các tác nhân gây bệnh lở cổ rễ, thối đen rễ ở cây công nghiệp và cây lâm nghiệp (11, 16). Ngoài các kỹ thuật canh tác đến nay các biện pháp phòng trừ khác đều cho hiệu quả thấp. Các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước gần đây đã chứng minh một số VSV có khả năng hạn chế bệnh. Kết quả này mở ra một hướng mới trong công tác phòng trừ bệnh nguy hiểm này (1, 2, 3, 4, 14, 15, 19, 26, 42, 43). Một số nghiên cứu trên thế giới trong thời gian qua đã chỉ ra nhiều VSV có khả năng đa hoạt tính sinh học, trong đó có những VSV vừa có khả năng tạo nguồn dinh dưỡng cho cây, sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật đồng thời cũng có khả năng ức chế một số VSV gây bệnh vùng rễ cây trồng (23, 24, 25, 27, 28, 29, 36). Một số nghiên cứu khác cũng đã chứng minh chế phẩm tổng hợp bao gồm nhiều nhóm VSV khác nhau có tác dụng tốt hơn so với từng loại riêng rẽ, trong đó nhiều sản phẩm là phân bón VSV nhưng lại có tác dụng hạn chế bệnh vùng rễ cây trồng do vi khuẩn

hoặc nấm bệnh gây nên (10, 20, 35, 37). Trên thế giới một số sản phẩm VSV tổng hợp như *E.2001*, *Super life*, *Phytobacter*... (64, 65, 66, 67) đã được nghiên cứu sản xuất và trở thành sản phẩm thương mại. Sản phẩm dạng này hiện chưa có ở Việt Nam.

2. Kết quả nghiên cứu

2.1. Thu thập, tuyển chọn bộ chủng giống VSV

Kết quả tuyển chọn, phân lập vi sinh vật được tập hợp trong bảng 1. Đến nay nhánh đề tài đã phân lập, tuyển chọn được 32 chủng VSV bao gồm 18 chủng VSVCDN, 3 chủng VSVPGI, 5 chủng VSV KTSTTV và 6 chủng VSV đối kháng, trong đó 12 chủng được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Các chủng VSV tuyển chọn đều được xây dựng lý lịch chủng giống và bảo quản dài hạn tại bộ môn VSV, Viện KHKTNNVN

Bảng 1: Số lượng chủng giống vi sinh vật đã thu thập

TT	Tên sản phẩm	ĐVĐ	Kế hoạch theo HĐ	Số lượng thực hiện
1	VSV Cố định N	Chủng	18	18
2	VSV phân giải lân	-“-	3	3
3	VSV KTST thực vật	-“-	3	5
4	VSV đối kháng VSV gây bệnh	-“-	6	6

Trên cơ sở xác định hoạt tính sinh học, nguồn gốc phân lập và mức độ an toàn đối với cây trồng nhánh đề tài đã lựa chọn được 4 tập hợp VSV, bao gồm 25 chủng sử dụng cho lạc, cà chua, khoai tây và hồ tiêu (bảng 2).

2.2. Nghiên cứu xác định tổ hợp vi sinh vật cho các đối tượng cây trồng

Nhằm đánh giá khả năng tổ hợp các VSV, cán bộ khoa học của đề tài đã tiến hành các thí nghiệm xác định khả năng tồn tại của vi sinh vật trong điều kiện đơn lẻ và tổ hợp. Kết quả trình bày trong bảng 3 và 4 cho thấy trong điều kiện tổ hợp các chủng VSV có khả năng tồn tại tốt với nhau. Sau 4 tháng bảo quản ở cùng điều kiện mật độ mỗi giống VSV trong tổ hợp trên nền chất mang là than bùn khử trùng hoặc trong sinh khối dạng lỏng không có sự sai khác

đáng kể so với mật độ của các đơn chủng. Bằng phương pháp nuôi cấy vạch các chủng VSV trong tổ hợp tiếp xúc với nhau trên môi trường thạch để tài cũng không nhận thấy biểu hiện của sự đối kháng giữa các chủng VSV trong cùng 1 tổ hợp. Kết quả nghiên cứu của đề tài hoàn toàn phù hợp với một số nhận định đã được công bố trước đây về khả năng tương hỗ của các VSV khác nhau trong cùng một môi trường sống, khi đó sản phẩm trao đổi chất của chủng VSV này là nguồn thức ăn, nguồn năng lượng hoặc men trao đổi chất đối với chủng VSV khác. Các chủng VSV sẽ cùng nhau sinh trưởng tốt hơn (10, 20, 35, 37).

Bảng 2: Kết quả lựa chọn tổ hợp VSV sử dụng cho các đối tượng cây trồng

Cây trồng	Chủng vi sinh vật	Ký hiệu chủng	Hoạt tính sinh học
Lạc	<i>Bradyrhizobium</i>	RA18	CĐN cộng sinh
	<i>Bradyrhizobium</i>	RA04	CĐN cộng sinh
	<i>Pseudomonas</i> sp	RTL2.2	PGL
	<i>Ag.radiobacter</i>	Ag15	KTSTTV
	<i>B. subtilis</i>	Ba 16	ĐK vi khuẩn héo xanh
Cà chua, khoai tây	<i>A.Chroococcum</i>	AT03	CĐN tự do, KTSTTV
	<i>Ag.radiobacter</i>	Ag15	KTSTTV
	<i>B.Polymixa</i>	B 14	PGL
	<i>Pseudomonas putida</i>	PS56	ĐK vi khuẩn héo xanh
	<i>B. subtilis</i>	Ba 17	ĐK vi khuẩn héo xanh
Tiêu	<i>A. Bejerinskii</i>	AT19	CĐN tự do, KTSTTV
	<i>B.polymixa</i>	B14	PGL
	<i>E. cloacae</i>	4g	KTSTTV
	<i>B.subtilis</i>	Ba17	ĐK nấm bệnh
	<i>Pseudomonas putida</i>	Ps 94	ĐK nấm bệnh

Chú thích:

KTSTTV: Kích thích sinh trưởng thực vật

CĐN: Cố định nitơ

ĐK: Đối kháng

PGL: Phân giải lân

Bảng 3: Khả năng tồn tại của vi sinh vật trong điều kiện tổ hợp trên nền than bùn khử trùng

Chủng vi sinh vật	Công thức nhiễm	Mật độ VSV (CFU/g) sau thời gian bảo quản		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
<i>Bradyrhizobium</i>	Đơn chủng	$3,10 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$	$4,30 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$3,31 \times 10^8$	$2,21 \times 10^8$	$3,35 \times 10^7$
<i>Azotobacter</i>	Đơn chủng	$5,40 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$5,40 \times 10^6$	$6,60 \times 10^8$	$7,40 \times 10^7$
<i>Bacillus</i> (Phân giải lân)	Đơn chủng	$1,40 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$5,70 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$9,38 \times 10^7$	$1,74 \times 10^8$	$4,18 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> (Đối kháng)	Đơn chủng	$1,30 \times 10^8$	$2,50 \times 10^8$	$1,10 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$1,30 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$
<i>Pseudomonas</i> (Đối kháng)	Đơn chủng	$2,85 \times 10^8$	$4,63 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$
	Hỗn hợp	$1,90 \times 10^8$	$2,42 \times 10^8$	$4,70 \times 10^7$
<i>Enterobacter</i>	Đơn chủng	$4,38 \times 10^8$	$9,50 \times 10^8$	$9,70 \times 10^8$
	Hỗn hợp	$1,68 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$	$4,84 \times 10^8$
<i>Burkholderia</i>	Đơn chủng	$7,80 \times 10^7$	$1,20 \times 10^9$	$9,20 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$7,80 \times 10^7$	$8,40 \times 10^8$	$1,38 \times 10^8$
<i>Agrobacter</i>	Đơn chủng	$2,40 \times 10^6$	$3,00 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$2,40 \times 10^6$	$5,60 \times 10^7$	$6,40 \times 10^7$

Kết quả nghiên cứu 4 tập hợp VSV cho thấy trong điều kiện hỗn hợp các chủng vi sinh vật có khả năng tồn tại tốt với nhau, mật độ các chủng không có sự sai khác đáng kể so với đơn chủng. Trong điều kiện bảo quản bình thường mật độ vi sinh vật đạt 10^8 CFU/g(ml) sau thời gian bảo quản 4 tháng Hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật không bị ảnh hưởng trong điều kiện hỗn hợp

Đánh giá tính chức năng của hỗn hợp vi sinh vật đã xác hỗn hợp có tác dụng đến sinh trưởng, phát triển, khả năng tích lũy sinh khối và năng suất lạc, khoai tây, cà chua và hồ tiêu, làm giảm đáng kể tỷ lệ chết của lạc, cà chua, khoai tây và hồ tiêu, trong đó tổ hợp vi sinh vật có ảnh hưởng tốt nhất đến sinh trưởng phát triển của cây trồng và hạn chế bệnh vùng rễ được ưu tiên lựa chọn cho nghiên cứu qui trình sản xuất phân vi sinh vật đa chủng chức năng ở qui mô

pilot, các tổ hợp còn lại phục vụ cho nghiên cứu xây dựng qui trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật chức năng ở qui mô phòng thí nghiệm (chi tiết kết quả đánh giá được tập hợp trong các báo cáo phụ kèm theo).

Bảng 4: Khả năng tồn tại của vi sinh vật trong điều kiện tổ hợp dạng lỏng

Chủng vi sinh vật	Công thức nhiễm	Mật độ VSV (CFU/g) sau thời gian bảo quản		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
<i>Bradyrhizobium</i>	Hỗn hợp	$1,27 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	$1,65 \times 10^7$
	Đơn chủng	$2,43 \times 10^9$	$4,80 \times 10^9$	$8,75 \times 10^7$
<i>Azotobacter</i>	Hỗn hợp	$1,40 \times 10^7$	$3,60 \times 10^8$	$2,80 \times 10^7$
	Đơn chủng	$9,06 \times 10^8$	$9,40 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> (Phân giải lân)	Hỗn hợp	$1,60 \times 10^9$	$6,10 \times 10^9$	$3,60 \times 10^8$
	Đơn chủng	$1,69 \times 10^9$	$1,79 \times 10^9$	$6,00 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> (Đối kháng)	Hỗn hợp	$1,30 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$	$3,80 \times 10^5$
	Đơn chủng	$1,30 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$1,25 \times 10^8$
<i>Pseudomonas</i> (Đối kháng)	Hỗn hợp	$1,38 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$2,29 \times 10^7$
	Đơn chủng	$4,40 \times 10^9$	$1,68 \times 10^{10}$	$4,00 \times 10^8$
<i>Enterobacter</i>	Hỗn hợp	$1,31 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	$2,62 \times 10^7$
	Đơn chủng	$5,20 \times 10^8$	$7,80 \times 10^8$	$4,10 \times 10^7$
<i>Burkholderia</i>	Hỗn hợp	$4,22 \times 10^7$	$3,20 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$
	Đơn chủng	$4,22 \times 10^7$	$6,60 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7$
<i>Agrobacter</i>	Đơn chủng	$1,32 \times 10^7$	$6,60 \times 10^7$	$3,60 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$1,32 \times 10^7$	$5,60 \times 10^7$	$8,40 \times 10^7$

3. Nghiên cứu qui trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng chức năng qui mô pilot

3.1. Môi trường nhân sinh khối vi sinh vật

Để có thể tạo được sinh khối vi sinh vật lớn dùng trong sản xuất phân bón vi sinh vật đa chủng, chức năng bên cạnh các điều kiện sinh trưởng phát triển như nhiệt độ, pH, nồng độ oxy thành phần môi trường nuôi cấy có vai trò vô cùng quan trọng. Lựa chọn môi trường nuôi cấy từ các nguồn vật liệu rẻ tiền, dễ kiếm song phải đảm bảo cho vi sinh vật sinh trưởng phát triển tốt là mục

tiêu của nghiên cứu này. Trên cơ sở các nghiên cứu thử nghiệm nhân sinh khối chủng giống vi sinh vật trên các loại môi trường sản xuất khác nhau: Nước chiết đậu, nước chiết đất, rỉ đường, cám gạo... đề tài đã lựa chọn được môi trường thích hợp cho từng chủng loại vi sinh vật. Kết quả được tổng hợp trong bảng 3. Sau thời gian nhân sinh khối ở điều kiện nhiệt độ, độ pH và nồng độ oxy phù hợp với từng chủng giống vi sinh vật, mật độ sinh khối vi sinh vật đạt 10^9 - 10^{10} CFU/ml.

Bảng 5: Kết quả lựa chọn môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Chủng vi sinh vật	Môi trường nhân sinh khối	Thời gian nhân sinh khối (ngày)	Mật độ (CFU/ml)
Bradyrhizobium	YMA	7	$1,72 * 10^9$
Azotobacter	Rỉ đường	2	$1,15 * 10^9$
B.polymixa	Rỉ đường	2	$1,46 * 10^9$
B. subtilis	MT1	2	$1,43 * 10^9$
Pseudomonas	SPA	2	$2,58 * 10^9$
E.cloaceae	MPA	2	$2,92 * 10^9$
A.radiobacter	Rỉ đường	2	$1,16 * 10^{10}$

3.2. Lựa chọn chất mang dạng bột

Sinh khối vi sinh vật sau khi thu hoạch được tẩm nhiễm vào chất mang được lựa chọn trong nghiên cứu là than bùn, đất mùn và bột thạch cao. Kết quả nghiên cứu được tập hợp trong bảng 4 cho thấy than bùn khu trung là chất mang tốt nhất cho sản xuất phân bón vi sinh vật đa chủng. Sau 4 tháng bảo quản ở điều kiện thường mật độ vi sinh vật đạt 10^7 - 10^8 CFU/g.

3.3. Lựa chọn các chất bảo quản cho chế phẩm dạng lỏng

Để đánh giá khả năng sản xuất chế phẩm dạng lỏng đề tài đã sử dụng CMC và hợp chất cacbon cao phân tử VHH và bổ sung vào sinh khối vi sinh vật sau quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu được tổng kết trong bảng 5. Qua kết quả bảng 6 có thể nhận thấy vi sinh vật có thể tồn tại tương đối tốt trong môi trường có bổ sung hợp chất cacbon cao phân tử VHH, khi đó mật độ vi sinh vật ban đầu và mật độ vi sinh vật sau 4 tháng bảo quản dưới điều kiện bình thường là tương đương nhau.

Bảng 6: Ảnh hưởng các loại chất mang dạng bột đến sự tồn tại của VSV

Chủng vi sinh vật	Dạng chất mang	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) sau thời gian		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
Bradyrhizobium	Than bùn	$3,10 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$	$4,30 \times 10^7$
	Đất	$3,31 \times 10^8$	$2,21 \times 10^8$	$3,35 \times 10^6$
	Thạch cao	$4,31 \times 10^8$	$2,20 \times 10^6$	-
Azotobacter	Than bùn	$5,40 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$
	Đất	$5,40 \times 10^6$	$6,60 \times 10^8$	$7,40 \times 10^7$
	Thạch cao	$5,49 \times 10^6$	$1,45 \times 10^4$	-
B.Polymixa	Than bùn	$1,40 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$5,70 \times 10^7$
	Đất	$9,38 \times 10^7$	$1,74 \times 10^8$	$4,18 \times 10^8$
	Thạch cao	$2,25 \times 10^7$	$3,25 \times 10^6$	-
B. Subtilis	Than bùn	$1,30 \times 10^8$	$2,50 \times 10^8$	$1,10 \times 10^7$
	Đất	$1,30 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$
	Thạch cao	$1,30 \times 10^8$	$3,15 \times 10^6$	-
Pseudomonas	Than bùn	$2,85 \times 10^8$	$4,63 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$
	Đất	$1,90 \times 10^8$	$2,42 \times 10^8$	$4,70 \times 10^7$
	Thạch cao	$2,55 \times 10^8$	$1,85 \times 10^6$	-
E.cloaceae	Than bùn	$4,38 \times 10^8$	$9,50 \times 10^8$	$9,70 \times 10^8$
	Đất	$1,68 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$	$4,84 \times 10^8$
	Thạch cao	$2,34 \times 10^8$	$3,15 \times 10^6$	-
A.Radiobacter	Than bùn	$5,40 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$
	Đất	$5,40 \times 10^6$	$6,60 \times 10^7$	$7,40 \times 10^7$
	Thạch cao	$5,40 \times 10^6$	$2,45 \times 10^4$	-

Bảng 7: Ảnh hưởng của các chất bảo quản đến sinh khối lỏng VSV

Chủng vi sinh vật	Chất bảo quản dạng lỏng	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) sau thời gian		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
Bradyrhizobium	CMC	$1,27 \times 10^8$	$1,37 \times 10^7$	-
	VHH	$2,43 \times 10^9$	$4,80 \times 10^9$	$8,75 \times 10^7$
Azotobacter	CMC	$1,40 \times 10^7$	$3,60 \times 10^8$	$2,80 \times 10^7$
	VHH	$9,06 \times 10^8$	$9,40 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$
B.Polymixa	CMC	$1,60 \times 10^9$	$6,10 \times 10^9$	$3,60 \times 10^8$
	VHH	$1,69 \times 10^9$	$1,79 \times 10^9$	$6,00 \times 10^8$
B. Subtilis	CMC	$1,30 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$	$3,80 \times 10^5$
	VHH	$1,30 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$1,25 \times 10^8$
Pseudomonas	CMC	$1,38 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$2,29 \times 10^7$
	VHH	$4,40 \times 10^9$	$1,68 \times 10^{10}$	$4,00 \times 10^8$
E.cloaceae	CMC	$1,31 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	$2,62 \times 10^7$
	VHH	$5,20 \times 10^8$	$7,80 \times 10^8$	$4,10 \times 10^7$
A.Radiobacter	CMC	$2,32 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$
	VHH	$2,32 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$	$9,40 \times 10^7$

3.4. Nghiên cứu tỷ lệ phối hợp sinh khối vi sinh vật trong sản xuất phân vi sinh vật đa chủng và khả năng tồn tại trong điều kiện tổ hợp

Tốc độ sinh trưởng phát triển của các chủng vi sinh vật khác nhau là khác nhau. Để bảo đảm độ ổn định và cân bằng tương đối của mật độ các chủng vi sinh vật trong chế phẩm, một công việc quan trọng là xác định tỷ lệ phối hợp hợp lý sinh khối của các chủng vi sinh vật. Kết quả nghiên cứu của đề tài cho thấy mật độ các chủng vi sinh vật khi phối hợp để tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng phải đạt $1,50 - 2,50 \times 10^9$ CFU/ml. Trong quá trình bảo quản mật độ và hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật sử dụng được kiểm tra và đánh giá. So sánh mật độ và hoạt tính sinh học của các chủng vi sinh vật trong điều kiện hỗn hợp và đơn lẻ không có sự sai khác đáng kể (bảng 8-9).

Bảng 8: Khả năng tồn tại của VSV trong điều kiện tổ hợp trên nền than bùn

Chủng vi sinh vật	Công thức nhiễm	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) sau thời gian		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
Bradyrhizobium	Đơn chủng	$3,10 \times 10^8$	$2,00 \times 10^8$	$4,30 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$3,31 \times 10^8$	$2,21 \times 10^8$	$3,35 \times 10^7$
Azotobacter	Đơn chủng	$5,40 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$5,40 \times 10^6$	$6,60 \times 10^8$	$7,40 \times 10^7$
B.Polymixa	Đơn chủng	$1,40 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$5,70 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$9,38 \times 10^7$	$1,74 \times 10^8$	$4,18 \times 10^8$
B. Subtilis	Đơn chủng	$1,30 \times 10^8$	$2,50 \times 10^8$	$1,10 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$1,30 \times 10^8$	$2,80 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$
Pseudomonas	Đơn chủng	$2,85 \times 10^8$	$4,63 \times 10^8$	$2,60 \times 10^8$
	Hỗn hợp	$1,90 \times 10^8$	$2,42 \times 10^8$	$4,70 \times 10^7$
E.cloaceae	Đơn chủng	$4,38 \times 10^8$	$9,50 \times 10^8$	$9,70 \times 10^8$
	Hỗn hợp	$1,68 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$	$4,84 \times 10^8$
A.Radiobacter	Đơn chủng	$5,40 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$
	Hỗn hợp	$5,40 \times 10^6$	$6,60 \times 10^7$	$7,40 \times 10^7$

Bảng 9: Khả năng tồn tại của VSV trong điều kiện tổ hợp dạng lỏng

Chủng vi sinh vật	Công thức nhiễm	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) sau thời gian		
		0 giờ	7 ngày	4 tháng
Bradyrhizobium	Hỗn hợp	$1,27 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	$1,65 \times 10^7$
	Đơn chủng	$2,43 \times 10^9$	$4,80 \times 10^9$	$8,75 \times 10^7$
Azotobacter	Hỗn hợp	$1,40 \times 10^7$	$3,60 \times 10^8$	$2,80 \times 10^7$
	Đơn chủng	$9,06 \times 10^8$	$9,40 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$
B.Polymixa	Hỗn hợp	$1,60 \times 10^9$	$6,10 \times 10^9$	$3,60 \times 10^8$
	Đơn chủng	$1,69 \times 10^9$	$1,79 \times 10^9$	$6,00 \times 10^8$
B. Subtilis	Hỗn hợp	$1,30 \times 10^8$	$1,40 \times 10^7$	$3,80 \times 10^5$
	Đơn chủng	$1,30 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$1,25 \times 10^8$
Pseudomonas	Hỗn hợp	$1,38 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$2,29 \times 10^7$
	Đơn chủng	$4,40 \times 10^9$	$1,68 \times 10^{10}$	$4,00 \times 10^8$
E.cloaceae	Hỗn hợp	$1,31 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$	$2,62 \times 10^7$
	Đơn chủng	$5,20 \times 10^8$	$7,80 \times 10^8$	$4,10 \times 10^7$
A.Radiobacter	Hỗn hợp	$2,32 \times 10^7$	$7,60 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$
	Đơn chủng	$2,32 \times 10^7$	$8,60 \times 10^7$	$9,40 \times 10^7$

Từ các kết quả nghiên cứu nêu trên đề tài đã bước đầu xây dựng được 4 qui trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng chức năng ở qui mô pilot bao gồm các công đoạn: lựa chọn tập hợp chủng, xác định môi trường và các điều kiện sản xuất phù hợp, xử lý sinh khối tạo chế phẩm dạng bột trên nền chất mang hoặc chế phẩm dạng lỏng và đánh giá chất lượng chế phẩm.. Chất lượng sản phẩm tạo ra bảo đảm TCVN trong thời gian 6 tháng.

4. Đánh giá ảnh hưởng của phân vi sinh vật đa chủng, chức năng đối với cây trồng ở qui mô nhà lưới, vườn ươm và thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp

Kết quả thí nghiệm nhà lưới, chậu vại và đồng ruộng chính qui diện hẹp được tổng hợp trong các bảng từ 10 đến 14. Số liệu trình bày trong bảng 10 về tính chức năng của phân bón VSV hỗn hợp cho thấy phân bón loại này có tác dụng làm tăng năng suất khoai tây 16,81-39,70%, đặc biệt khi giảm 20% dinh dưỡng NPK năng suất khoai vẫn cao hơn đối chứng 13,54-36,70% tùy theo

giống. Sử dụng hỗn hợp VSV, tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn tự nhiên đã giảm đi từ 5% xuống 3%, cá biệt có những công thức không có biểu hiện của bệnh héo xanh.

Bảng 10 : Hiệu quả của phân vi sinh vật chức năng đối với khoai tây
(Thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp tại Viện KHKTNNVN
vụ đông năm 2002-2003)

Công thức	Giống khoai tây KT03			Giống khoai tây VD2		
	Năng suất củ (kg/m ²)	% tăng so với đối chứng	Tỷ lệ chết (%)	Năng suất củ (kg/m ²)	% tăng so với đối chứng	Tỷ lệ chết (%)
ĐC = nền (NPK : 120.120.120+ PC)	1,14	-	5,0	0,67	-	5,0
Nền +HHVS1	1,38**	20,74	1,7	0,91**	35,58	1,7
80% Nền +HHVSV1	1,38**	20,52	0,0	0,91**	36,70	3,3
Nền +HHVS2	1,34*	16,81	1,7	0,93**	39,70	3,0
80% Nền +HHVS2	1,30*	13,54	3,2	0,83*	23,59	3,3
CV(%)	6,20			8,30		
LSD 5%	0,061			0,053		

Bảng 11 : Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh vật chức năng đối với khoai tây
(Thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp tại Sapa vụ đông 2003-2004)

Công thức	Giống khoai tây Mariella			Giống khoai tây VT2		
	Năng suất củ (tấn/ha)	% tăng so với đối chứng	Tỷ lệ chết (%)	Năng suất củ (tấn/ha)	% tăng so với đối chứng	Tỷ lệ chết (%)
ĐC = nền (NPK : 120.120.120+ 15 t PC)	9,60	-	21,45	4,80	-	0,47
Nền +1,5 t HCVSV	11,45	19,27	8,6	5,60	16,67	0,46
90% nền + 1,5 tấn HCVSV	10,69	11,35	9,6	5,10	6,25	0,47
CV(%)	26			22,2		
LSD 5%	0,55			0,22		

Xu hướng tương tự cũng được xác nhận tại thí nghiệm chính qui diện hẹp tại Sapa (Lào Cai), trong đó phân bón VSV chức năng có tác dụng tăng năng suất khoai tây 16,67-19,27% và giảm đáng kể tỷ lệ bệnh héo xanh (từ 21,45%

xuống còn < 10%). Trong trường hợp giảm 10% lượng đạm và lân cần bón năng suất khoai tây vẫn tăng 6,25-11,35%.

Thí nghiệm đánh giá tác dụng của phân VSV chức năng đối với cà chua được triển khai tại Viện KHKTNNVN (qui mô chậu vại) và tại HTX Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc (thí nghiệm chính qui đồng ruộng, diện hẹp). Kết quả được tổng hợp trong bảng 12 cho thấy ở thí nghiệm chậu vại phân VSV chức năng làm năng suất cà chua 18,52% so với đối chứng và hạn chế được bệnh héo xanh vi khuẩn. Nếu giảm 20% lượng dinh dưỡng NPK năng suất cà chua hầu như không có sự sai khác so với đối chứng. Trong khi công thức nhiễm bệnh héo xanh có tỷ lệ cây chết là 80% thì công thức sử dụng hỗn hợp vi sinh vật với 100% và 80% nền tỷ lệ này là 0% và 10%. Thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp cũng khẳng định sử dụng phân VSV chức năng tăng năng suất cà chua tăng 20,5% và tỷ lệ bệnh héo xanh giảm từ 33,5% xuống còn 24,1%.

Bảng 12 : Hiệu quả của hỗn hợp vi sinh vật đối với cà chua

Công thức	TN chậu vại			TN đồng ruộng diện hẹp		
	Tỉ lệ chết (%)	Năng suất (g/chậu)	% so với ĐC	Tỉ lệ chết (%)	Năng suất (kg/90m ²)	% so với ĐC
ĐC=nền = NPK :100.80.100+10 tấn PC	0,00	829.00	-	33,50	491	-
Nền + VKHX	80,0	195.00	-76,48	-	-	-
Nền + VSVCN + VKHX	0,00	982.50	18,52	-	-	-
80% Nền +VSVCN + VKHX	10,0	743.75	-10,28	-	-	-
Nền + VSV CN	-	-	-	24,10	592*	20.5
CV(%)					6,5	
LSD 5%					87,48	

Xu hướng tích cực của phân VSV chức năng cũng được xác định tương tự tại các thí nghiệm chậu vại và đồng ruộng đối với lạc và tiêu. Số liệu được tổng hợp trong các bảng từ 13 đến 17.

Đối với lạc trong thí nghiệm chậu vại tại Viện KHKTNNVN phân VSV chức năng có tác dụng giảm tỷ lệ bệnh từ 70% xuống còn 2% và tăng sinh khối

khô thân lá 32,14% sau 45 ngày gieo trồng. Kết quả thí nghiệm đồng ruộng chính qui diện hẹp tại Nông trường Thanh Hà, Kim Bôi, Hoà Bình cho thấy phân VSV chức năng đã làm tăng năng suất lạc 13,06%. Khi giảm 10% lượng dinh dưỡng đạm và lân năng suất lạc ở công thức đối chứng và thí nghiệm hầu như không có sự sai khác đáng kể. Đánh giá mức độ bệnh héo xanh vi khuẩn cho thấy khi sử dụng phân VSV chức năng tỷ lệ bệnh héo xanh vi khuẩn đã giảm từ 36,90% xuống còn dưới 20% (bảng 13).

Bảng 13 : Hiệu quả của phân HCVSV chức năng đối với lạc

Công thức	TN chậu vại		TN đồng ruộng diện hẹp		
	P khô thân lá (g/chậu)	Tỷ lệ cây chết (%)	Năng suất (tấn/ha)	% tăng so với ĐC	Tỷ lệ bệnh (%)
ĐC= Nền: NPK: 30.90.60+10tấn PC	1,142	0,00	1.868	-	36,90
Nền (NPK) + VKHX	0,520**	70,0	-	-	-
Nền (NPK) + VKHX + VSV chức năng	1,509**	2,00	-	-	-
Nền + VSV chức năng	-	-	2.112	13.06	19,8
90% Nền (NPK) + VSVCN	-	-	1.792	-4,07	17,6
CV (%)	10,50		4,5		
LSD _{0,05}	0,252		0.156		

Số liệu bảng 14 trình bày tác dụng của phân VSV chức năng đối với hồ tiêu. Kết quả cho thấy phân VSV chức năng có tác dụng tăng năng suất tiêu 22,85% và giảm tỷ lệ bệnh vùng rễ từ 17,5% xuống còn 5,82% đối với tiêu mới trồng và từ 12,3% xuống còn 6,00% đối với tiêu kinh doanh.

5. Xây dựng qui trình sản xuất phân bón VSV đa chủng, chức năng qui mô pilot và thử nghiệm áp dụng trong sản xuất

Từ các qui trình công nghệ qui mô phòng thí nghiệm đề tài đã lựa chọn, thử nghiệm và xây dựng 3 qui trình công nghệ sản xuất chế phẩm VSV chức năng ở qui mô pilot. Trên cơ sở chế phẩm VSV chức năng nhánh đề tài đã triển khai sản xuất thử nghiệm phân HCVSV chức năng tại 2 cơ sở sản xuất tại Vĩnh Phúc và Bình Dương. Sản phẩm đã được thử, khảo nghiệm trên diện rộng cho

các đối tượng cây: Lạc, cà chua, khoai tây và tiêu tại các tỉnh Hải Phòng, Hải Dương, Hưng Yên, Hà Nội, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Bình Phước và Đồng Nai. Chất lượng sản phẩm tạo ra đảm bảo TCVN. Danh sách các điểm khảo nghiệm và mô hình trình diễn sử dụng phân VSV đa chủng chức năng được tập hợp trong bảng 15. Diện tích sử dụng phân VSV đa chủng chức năng đến hết vụ xuân năm 2004 đạt gần 200 ha

Bảng 14 : Tác dụng của phân HCVSV chức năng đối với tiêu

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ bệnh (%)	Năng suất (kg/nóc)	% tăng năng suất so với ĐC	Đánh giá cảm quan
Tiêu kinh doanh 7 tuổi (Long Khánh, Đồng Nai)				
ĐC: 5 lần bón/năm=8 kg PC; 1,8kg NPK (16.16.8); 0.2kg lân; 0,3kg KCl	12,30	1,75	-	Lá xanh nhưng chóng vàng, bản lá nhỏ, thân ngắn, quả nhỏ không đều
Phân VSV chức năng: 4 lần = 6kg	6,00	2,15	22,85	Lá xanh đậm,, bản lá to, thân vươn dài, trái to, đều, hạt chắc
CV (%)		3,7		
LSD _{0,05}		0,126		
Tiêu mới trồng (Bình Long, Bình Phước)				
ĐC: 5 kg PC; 0,3kg lân; 0,5 kg NPK (16.16.8)	17,50	-	-	Nhanh ra chồi, chồi nhỏ, lá xanh và mau vàng, tỷ lệ chết cao
Phân VSV chức năng: 3 kg	5,82	-	-	Chồi ra chậm, nhưng to đậm, lá to bản xanh đậm, bền màu. Cây khỏe

Kết quả khảo nghiệm diện rộng trên đồng ruộng (bảng 16) cho thấy phân VSV chức năng có tác dụng tăng năng suất 20,5% và giảm 28,06% tỷ lệ cây chết đối với cà chua; tăng năng suất 30,98-72,38 % và giảm tỷ lệ bệnh héo xanh từ 9% xuống 1,5% đối với khoai tây; tăng năng suất lạc 13,33- 19,07%; tăng 15% năng suất và giảm 56% tỷ lệ cây chết đối với tiêu,. Hiệu quả kinh tế trên 1ha đất canh tác khi sử dụng phân HCVSV chức năng so với đối chứng đạt 6,45 đến 22,06 triệu đồng đối với cà chua; 4,26 đến 7,60 triệu đồng đối với khoai tây; 2,70 đến 3,05 triệu đồng đối với lạc, 25,12 triệu đồng đối với tiêu,

Bảng 15: Danh sách các điểm khảo nghiệm và mô hình trình diễn phân VSV chức năng năm 2003-2004

Cây trồng	Địa chỉ	Diện tích	Ghi chú
Lạc	Gia Bình, Bắc Ninh	10,0 ha	Vụ thu đông 2003
	Tân Yên, Bắc Giang	6,5 ha	Vụ thu đông 2003
	Hợp Thịnh, Vĩnh Phúc	10,0 ha	Vụ thu đông 2003
	Chương Mỹ, Quốc Oai, Hà Tây	2,0 ha	Vụ thu đông 2003
	Triệu Sơn, Thanh Hoá	10,7 ha	Vụ xuân 2004
	Ý Yên, Nam Định	5,0 ha	Vụ xuân 2004
	Tiên Lữ, Hưng Yên	7,5 ha	Đông Xuân 2003
Cà chua	Tiên Lãng, Hải Phòng	7,8 ha	Vụ đông 2003
	Tân Yên, Bắc Giang	3,0 ha	Vụ đông 2003
	Giao Thủy, Nam Định	22,0 ha	Vụ đông 2003
	Chi cục BVTV Hải Dương	3,0 ha	Vụ đông 2003
	Mê Linh, Vĩnh Phúc	20,0 ha	Năm 2004
Khoai tây	Vũ Thư, Tiền Hải, (Thái Bình)	30,0 ha	Vụ đông 2003
	Yên Phong, (Bắc Ninh)	7,0 ha	Vụ đông 2003
	Quốc Oai, (Hà Tây)	1,0 ha	Vụ đông 2003
	Hà Giang	5,0 ha	Vụ xuân 2004
	Sơn La	2,0 ha	Vụ xuân 2004
Tiêu	Lộc Ninh; (Bình Phước)	4,0 ha	Năm 2003, 2004

Bảng 16: Hiệu lực của phân bón HCVSV chức năng đối với một số cây trồng tại một số điểm khảo nghiệm

Cây trồng	Địa bàn khảo nghiệm	Năng suất (tấn/ha)		% tăng năng suất so với ĐC	Lãi (1000 đ/ha) so với đối chứng
		ĐC	Phân VSV chức năng		
Cà chua	Mê Linh, Vĩnh Phúc	54,55	65,777	20,58	22.454,00
	Tiên Lãng Hải Phòng	38,30	44,75	16,84	6.450,00*
Khoai tây	Vũ Thư, Thái Bình	13,75	18,01	30,98	4.260,00
	Yên Phong, Bắc Ninh	10,50	18,10	72,38	7.600,00
Lạc	Tam Dương, Vĩnh Phúc	2,03	2,30	13,33	2.700,00
	Gia Bình, Bắc Ninh	1,835	2.185	19,07	3.050,00
Tiêu	Long Khánh, Đồng Nai	2,700	3,105	15,00	25.124,00

Giá tính: Cà chua: 2000 đ/kg, Khoai tây: 1000 đ/kg, Lạc (làm giống): 10.000đ/kg,

Tiêu: 20.000đ/kg, * Cà chua chế biến: 800 đ/kg, HCVSV :1000 đ/kg

Phân vi sinh vật đa chủng, chức năng sử dụng cho một số cây trồng được Bộ Nông nghiệp & PTNT công nhận là tiến bộ kỹ thuật cho phép áp dụng trong sản xuất. Nhằm đưa nhanh tiến bộ kỹ thuật vào sản xuất tháng 9 năm 2004 Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam được Bộ Khoa học & Công nghệ giao nhiệm vụ triển khai dự án SXTN cấp Nhà nước về phân bón vi sinh vật chức năng.

6. Kết luận

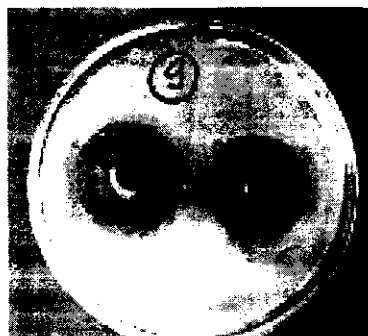
Nhánh đề tài đã luôn bám sát mục tiêu và thực hiện đầy đủ các nội dung nghiên cứu tạo sản phẩm đáp ứng yêu cầu của đề tài (bảng 17).

Bảng 17 : Sản phẩm của đề tài

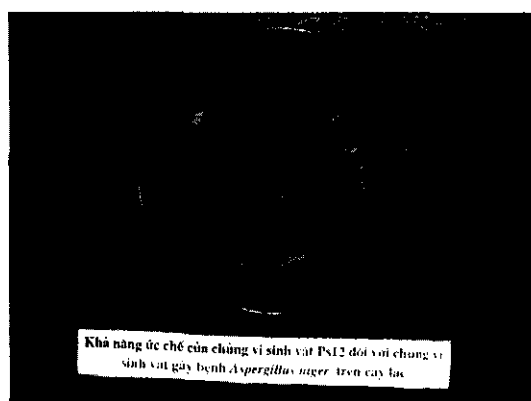
TT	Tên sản phẩm	Chỉ tiêu KT-KT	Số lượng	
			Kế hoạch	Thực hiện
1	Công nghệ SX phân bón VSV mới được SX chấp nhận	Tính mới trong chủng VSV có hoạt lực cao (tính chức năng của phân bón VSV)	2	3
2	Hoàn thành pilot thử nghiệm bằng các chủng VN	Pilot sản xuất thử nghiệm thành công phân VSVCN	1	1
3	Phân bón VSV đa chủng chức năng	Đạt qui phạm an toàn trong sử dụng, tăng năng suất cây trồng, bảo vệ MT	5ha * 3 loại	200 ha
4	Ứng dụng công nghệ vào sản xuất	Được áp dụng trong sản xuất	1	2
5	Khác: - Báo cáo khoa học - Đào tạo ĐH, SĐH - Chủng VSV	Đã công bố Đã tốt nghiệp Có hoạt tính sinh học và được sử dụng trong SX	5 10 10	10 15 12

MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ KẾT QUẢ HOẠT ĐỘNG CỦA NHÁNH ĐỀ TÀI

*Vi sinh vật đối kháng vi khuẩn héo xanh (*R.solanacearum*)*



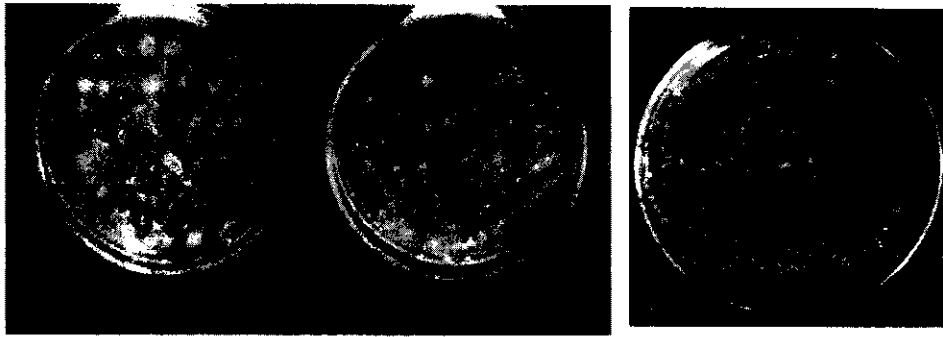
*Vi sinh vật đối kháng *R.solani**



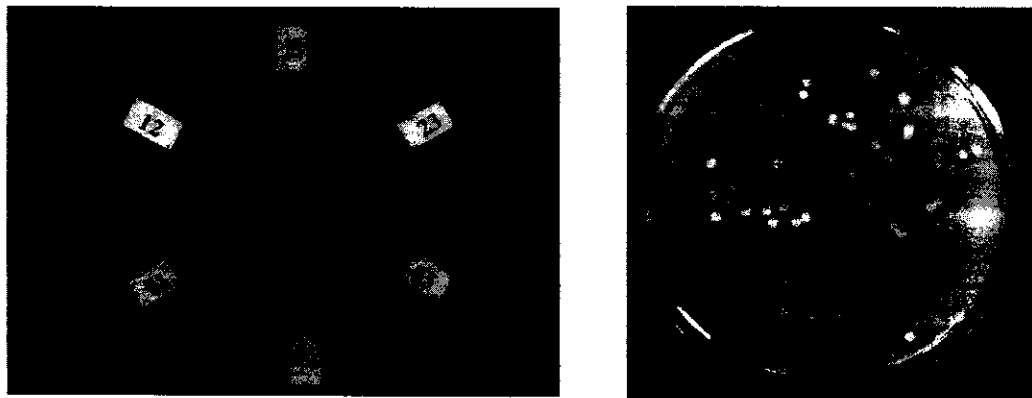
*Vi sinh vật đối kháng *A.niger**

Vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh

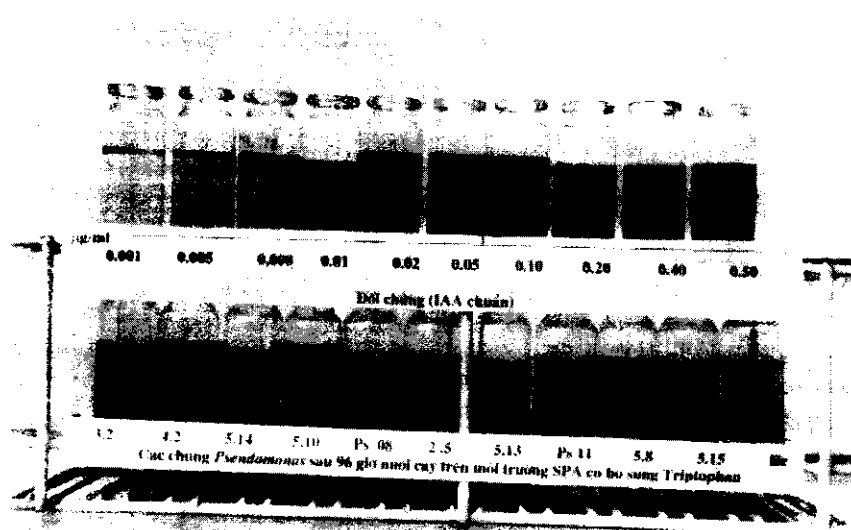
Vi sinh vật cố định nitơ tự do



Vi sinh vật phân giải photphát khó tan



Thí nghiệm xác định hoạt tính sinh tổng hợp IAA của vi sinh vật



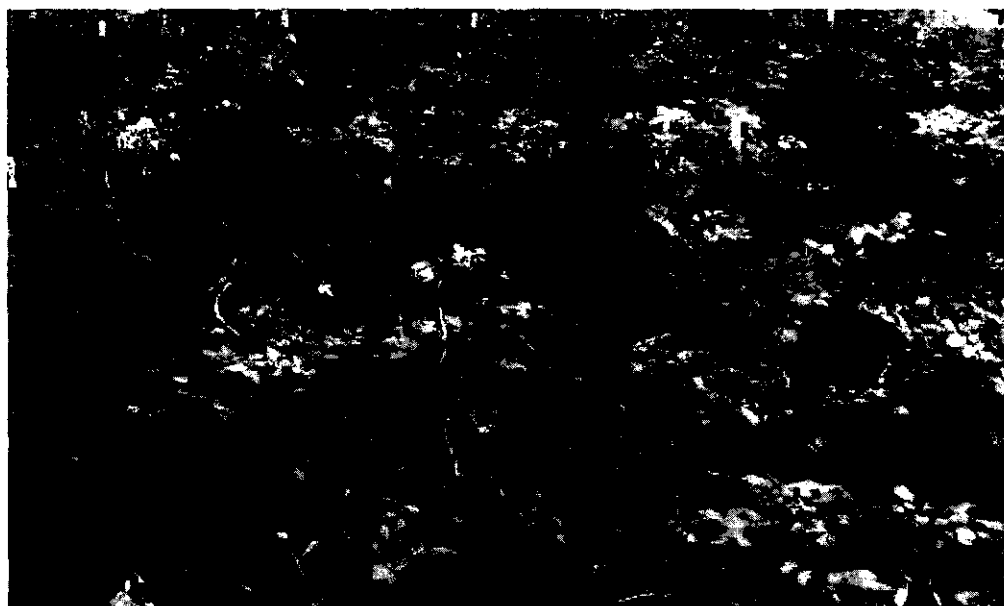
*Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của tổ hợp các VSV đến sinh trưởng của
Khoai tây Cà chua*



*Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của tổ hợp các vi sinh vật
đến sinh trưởng của lạc hồ tiêu*



*Thí nghiệm đồng ruộng diện hẹp về hiệu lực phân VSV chức năng trên
khoai tây*



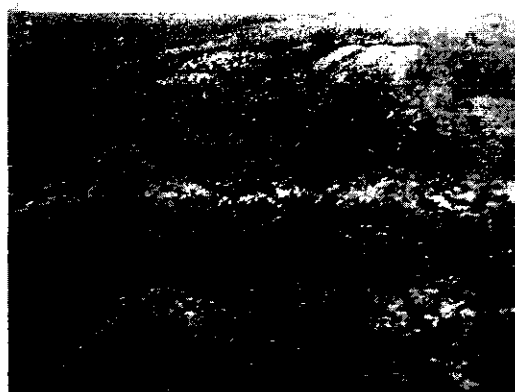
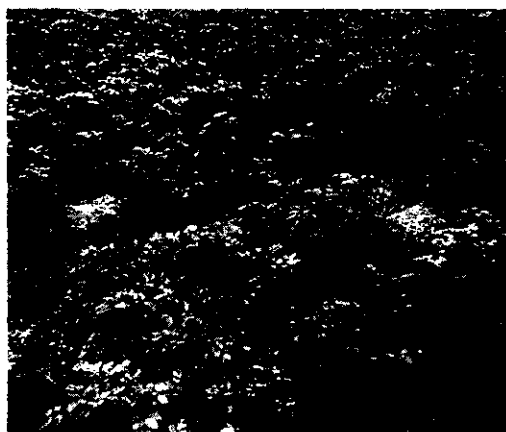
Thí nghiệm đánh giá hiệu lực phân VSV chức năng đối với lạc



*Mô hình trình diễn hiệu lực phân VSV chức năng
Đối với lạc*



Đối với khoai tây



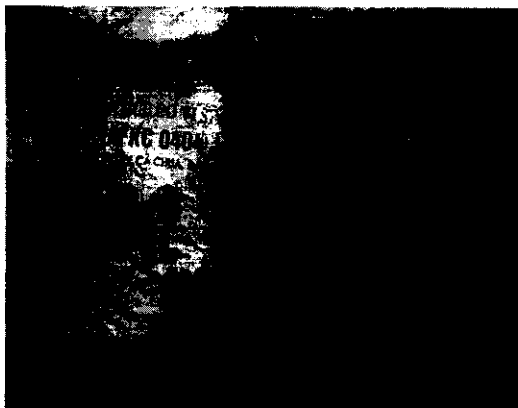
Đối với cà chua



Đối với tiêu



Phân hữu cơ vi sinh vật chức năng



Chế phẩm Vi sinh vật chức năng



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arora Diplip K. (1996): *Hand book of applied mycology*. Volume 1: Soil and plant, 327-355
2. Asaka O., Shoda M. (1996): *Biocontrol of Rhizoctonia solani damping off of tomato with Bacillus subtilis RB14*. Appl.Microbiol. 62, 4081-4085
3. Bagnasco P., L.De La Fuente, G.Gualtieri, F.Noya and A.Arias (1998): *Fluorescent Pseudomonas spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi*. Soil.Biol.Biochem. Vol 30, No 10/11, 1317-1322
4. Burges H.D. (1998): *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer academic publishes, Dordrecht/Boston/London
5. Nguyễn Sinh Cúc (2003): *Nông nghiệp nông thôn Việt Nam trong thời kỳ đổi mới*. Nhà xuất bản thống kê, Hà Nội, 198-245; 470-487
6. Ngô Thế Dân, Nguyễn Xuân Hồng, Đỗ Thị Dung, Nguyễn Thị Chinh, Trần Đình Long, Nguyễn Thị Đào, Phạm Văn Toàn, C.L.L.Gowda (2000): *Kỹ thuật đạt năng suất lạc cao ở Việt Nam*. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội, 71-116,
7. Deawin A., Hobsgood R.K. and Rusch V. (1981): *Rhizosphere microflora in relation to soil condition, Part I: Comparison of bacteria in soil*. Zbl.Bakt.II, Abt.136, 613-618
8. Deawin A., Hobsgood R.K. and Rusch V. (1981): *Rhizosphere microflora in relation to soil condition, Part II: Rhizosphere and soil "Coliform bacteria"*. Zbl.Bakt.II, Abt.136, 619-627
9. Demain A.L. and Soloman N.A. (1986): *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 32-39. American Society for microbiology, Washington D.C.
10. Dubey S.K.(1996): *Combined effect of Bradyrhizobium japonicum and phosphate solubilizing Pseudomonas striata on nodulation, yield attributes and yield of rainfed soybean under different sources of phosphorus in vertisols*. Indian Journal of agricultural science 66, 28-32
11. Đỗ Tấn Dũng (2002): *Nghiên cứu bệnh héo xanh vi khuẩn P.solanacearum Smith hại một số cây trồng ở ngoại thành Hà Nội và vùng lân cận*. Luận án TS nông nghiệp, ĐHN1 Hà Nội
12. Nguyễn Lâm Dũng (1976): *Thực tập vi sinh vật*. NXB Đại học và THCN
13. Geels, Schippers (1983): *Selection of antagonistic fluorescent Pseudomonas sp. And their colonization and persistence following treatment of seed potato*. Phytopathol.Zeitschrift 108, 193-206
14. Grosch R, Junge H, Krebs B and Bochow H (1999): *Use of Bacillus subtilis as a biocontrol agent.III.Influence of bacillus subtilis on fungal root diseases and on yield in soilless culture*. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz 106, 568-580.

15. Harris A.R., Adkins P.G. (1999): *Versatility of fungal and bacterial isolates for biocontrol of damping of disease caused by Rhizoctonia solani and Pythium spp.* Biological control 15, 10-18
16. Nguyễn Xuân Hồng, Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Văn Liễu (1997): *Kết quả nghiên cứu đặc điểm phân bố, tác hại của bệnh héo xanh lác và xác định biovar của vi khuẩn (P.solanacearum) ở miền Bắc Việt Nam.* Tạp chí bảo vệ thực vật 6, 27-31
17. Kannaiyan S. (2003): *Inoculant production in developing countries-Problems, potentiala and success. In the Maximising the use of biological nitrogen fixation in Agriculture.* Edited by Hardarson G. and W.J.Broughton, 187-198. FAO published by Kluwer Academic Publishers
18. Kennedy IR. and Choudhury A.T.M.A. (2002): *Biofertilizers in action, a report for rural industries research and development.* RIRDC publication No 02/086
19. Lê Như Kiều, Vũ Bích Hậu, Đào Thị Thu Hằng, Nguyễn Ngọc Cường, Hoàng Hoa Long, Nguyễn Hồng Hải, Trần Duy Quý (2000): *Nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật đối kháng trong phòng trừ bệnh héo xanh cà chua do vi khuẩn.* Thông tin công nghệ sinh học ứng dụng 4, 47-52
20. Koch E., Kempf H.J. and Hessenmueller A. (1998): *Characterisation of the biocontrol activity and evaluation of potential growth promoting properties of selected rhizobacteria.* J. Plant diseases and Protection 105, 567-580
21. Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (2000): *Phylogeny of bacteria beyond the 16S-rRNA standard.*
Vermicon.[http: www. Vermicon.de/english/news/science/khs99111.htm](http://www.Vermicon.de/english/news/science/khs99111.htm)
22. Lynch J.M. (1984): *Interaction between biological processes, cultivation and soil structure.* Plant and soil 76, 307-318
23. Maria C. Vega-Hernandez, Milagros Leon-Barrios, Ricardo Perez-Galdona (2002): *Indol-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in Bradyrhizobium.* Soil Biology & Biochemistry 34. 665-668
24. Parmar N. and Dadarwal KR. (1999): *Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid like compounds by rhizobacteria.* J. Appl. Microbiol.86, 36-44 .
25. Nguyễn Ngọc Quyên và cộng tác viên (2000): *Quỹ gen vi sinh vật nông nghiệp.* Nông nghiệp –CNTP 451, 29-30
26. Ramamoorthy V., Raguchander R. and Samiyappan R. (2002): *Induction of defense related proteins in tomato roots treated with Pseudomonas fluorescens Pfl and Fusarium oxysporum f.sp lycopersici.* Plant and soil 239, 55-68
27. Raupach GS, Kloepper JW (1998): *Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens.* Phytopathology 88, 1158-1164.

28. Richardson AE. (2001): *Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plant*. Australia Journal of plant physiology 28, 897-906
29. Rojas A., Holguin G., Glick BR. and Bashan Y. (2001): *Synergism between phyllobacterium sp (N-fixer) and Bacillus licheniformis (P-solubilizer) both from semi arid mangrove rhizosphere*. FEMS Microbiology Ecology 35, 181-187
30. Rupela OP., Gopalakrishnan S., Krajewski M., Sriveni M. (2003): *A novel method for identification and enumeration of microorganisms with potential for suppressing fungal plant pathogens*. Biol.Fertil.Soils 39, 131-134
31. Schinner F., Oehlinger R., Kandeler E., Margesin R. (1993): *Bodenbiologische Arbeitsmethode*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
32. Schisler DA., Slininger PJ., and Bothast RJ . (1997): *Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of fusarium dry rot of potatoes*. Phytopathology 87, 171-183
33. Sen S.P. and Pait P. (1995): *Biofertilizer, potential and problems*. Plant physiology forum, Calcuta, 237-257.
34. Sichere Biotechnologie: *Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien*, Merkblatt B 006 8/98 ZH 1/346, Bereuftsgenossenschaft der chemischen Industrie, 8/1998
35. Siddiqui IA., S.Shahid Shaukat (2002): *Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens*. Biol.Fertil.Soils 36, 260-268.
36. Siddiqui IA, Ehteshamul-Haque S, Shaukat SS (2001): *Use of rhizobacteria in the control of root rot-root knot disease complex of mungbean*. J.Phytopathol.149, 337-346
37. Sindhu SS., Sunita Suneja, Goel AK., Parmar N., Dadarwal KR. (2002): *Plant growth promoting effects of Pseudomonas sp. on coinoculation with Mesorhizobium sp. Cicer strain under steril and „wilt sick“ soil conditions*. Appl.Soil Ecology 19, 57-64.
38. Phạm Chí Thành (1988): *Phương pháp thí nghiệm đồng ruộng*. Giáo trình, Trường đại học nông nghiệp 1 Hà Nội
39. Phạm văn Toàn (1999): *Kết quả nghiên cứu triển khai đề tài khoa học công nghệ cấp Nhà nước KHCN.02.06 giai đoạn 1996-1998*. Nông nghiệp – CNTP 447, 410-411
40. Phạm văn Toàn (2002): *Đề tài KHCN.02.06 “Nghiên cứu áp dụng công nghệ mới nhằm mở rộng việc sản xuất, ứng dụng phân vi sinh vật cố định đạm và phân giải lân phục vụ phát triển nông nghiệp bền vững ”*. Hội nghị tổng kết các chương trình khoa học và công nghệ cấp Nhà nước giai đoạn 1996-2000. Hà Nội 12/2002

41. Nguyễn Kim Vũ (1994): *Xây dựng qui trình sản xuất phân vi khuẩn cố định nitơ cho lúa*. Nông nghiệp – CNTP 384, 209-211
42. Yiu-kwok Chan, Wayne A.McCormick and Keith A.Seifert (2003): *Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against Fusarium species*. Can.J.Microbiol.49, 253-262
43. Yu G.Y., Sinclair j.B., Hartman G.L. and Bertagnolli B.L. (2002): *Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani*. Soil biology & Biochemistry 34, 955-963
44. 10.TCN: 216-1995 (216-2003): *Khảo nghiệm hiệu lực phân bón trên đồng ruộng đối với cây trồng*
45. 10TCN: 301-97: Phân tích phân bón- phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu
46. 10TCN: 304-97: Phân tích phân bón- phương pháp xác định nitơ tổng số
47. 10TCN: 361-99: Phân tích phân bón- phương pháp xác định nitơ hữu hiệu
48. 10TCN: 306-97: Phân tích phân bón- phương pháp xác định photpho tổng số
49. 10TCN: 307-97: Phân tích phân bón- phương pháp xác định photpho HH
50. 10TCN: 308-97: Phân tích phân bón- phương pháp xác định kali hoà tan
51. 10TCN: 302-97: Phân tích phân bón- phương pháp xác định độ ẩm
52. 10TCN: 366-99: Phân tích phân bón- PP xác định tổng số C hữu cơ
53. 10TCN: 299-97: Phân vi sinh vật cố định nitơ- phương pháp xác định hoạt tính
54. 10TCN: 298-97: Phân vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan phương pháp xác định hoạt tính
55. 10TCN: 255-96: Phân hữu cơ vi sinh vật – Yêu cầu kỹ thuật phương pháp kiểm tra, bao bì, ghi nhãn
56. TCVN 5297:1995 : Chất lượng đất – lấy mẫu – Yêu cầu chung
57. 10TCN: 367-99: Phân tích đất – Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu
58. 10TCN: 378-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định các bon hữu cơ
59. 10TCN: 377-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định ni tơ tổng số
60. 10TCN: 375-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định photpho dễ tiêu
61. 10TCN: 373-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định photpho tổng số
62. 10TCN: 371-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định kali tổng số
63. 10TCN: 377-99: Phân tích đất – Phương pháp xác định độ pH
64. <http://www.fzb-biotechnik.de>
65. <http://www.Glsbiotech.com>
66. <http://www.prophyta.com>
67. <http://www.phytobater.com>
68. Biological fertilizer technology, International Training course, Baodinh, China 2003

ĐỀ TÀI KHCN. 04.04

**CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PHÂN VI SINH VẬT
ĐA CHỦNG, ĐA CHỨC NĂNG CHO CÀ CHUA
QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM**

Đề tài nhánh
Phòng Vi Sinh vật đất
Viện Công nghệ Sinh học
Viện KH&CNQG

Hà nội- 2004

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PHÂN VI SINH VẬT ĐA CHỦNG, CHỨC NĂNG CHO CÀ CHUA QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Phòng Vi Sinh vật đất- Viện Công nghệ Sinh học

TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

Sau hơn nửa thế kỷ sử dụng rộng rãi đến mức lạm dụng phân bón hóa học, các nước tiên tiến trên thế giới đã nhận ra mặt trái của vấn đề là các chất hóa học dùng trong nông nghiệp đã gây ô nhiễm môi trường trầm trọng. Quá trình sản xuất các chất phân bón hóa học vừa tốn kém trong chi phí đầu tư lại vừa làm ô nhiễm môi trường không khí, nước, đất. Đồng thời khi bón nhiều và lâu dài xuống ruộng, các chất hóa học đã phá huỷ sinh thái đất, tồn dư trong đất làm vô cơ hóa đất, gây ô nhiễm môi trường đất và gây nhiễm độc thức ăn cho người và động vật qua rau xanh, ngũ cốc.

Balandreau J. và P. Roger đã nhấn mạnh trong Hội nghị “Cố định nitơ sinh học hội sinh với lúa” tại Dhaka- Bangladesh (1994) là phân bón vi sinh vật giúp nhà nông đạt được lợi nhuận cao hơn hẳn so với phân bón hóa học (tỉ lệ giữa tiền sản phẩm/ tiền đầu tư).

Vì vậy hiện nay trên thế giới đang ngày càng phát triển mạnh hơn việc nghiên cứu sản xuất và sử dụng phân vi sinh vật thay thế một phần cho phân bón hóa học. Các nước trong khu vực, cũng như các nước đang phát triển cũng đang tích cực tuyên truyền thay thế một phần phân hóa học bằng phân vi sinh vật hoặc các loại phân hữu cơ- vi sinh.

Trong một số nghiên cứu trước đây chúng tôi đã nghiên cứu và ứng dụng thành công vài chế phẩm phân vi sinh vật theo hướng đơn chủng, hoặc

hỗn hợp các chủng vi khuẩn hữu ích cho cây trồng. Các chủng vi sinh vật đã được sử dụng bao gồm những chủng có khả năng tăng nguồn dinh dưỡng cho cây nhờ hoạt tính cố định nitơ, phân giải các hợp chất photphat khó tan trong đất, sinh chất kích thích sinh trưởng tương tự như axit indol axetic (AIA), sinh polysaccarit.

Từ năm 1895 các chế phẩm phân vi sinh vật cho cây họ Đậu đã bắt đầu được sản xuất tại Mỹ và Anh. Tổng quan về các loại chế phẩm phân vi sinh vật trên thế giới cho đến năm 1980, Thompson J.A. đã phân biệt 5 dạng phân bón vi sinh vật được sản xuất là: chế phẩm trên thạch, trong dịch thể, dạng khô kèm với chất mang (li tâm tách tế bào rồi trộn với thạch cao), đông khô, và dạng bột có chất mang. Dạng chế phẩm bột có chất mang có lẽ được cho là thuận tiện nhất trong khi sản xuất, vận chuyển và sử dụng. Các nước trên thế giới nhất là các nước trong vùng châu Á như Ấn Độ, Thái Lan, Trung Quốc v.v. cũng sản xuất các chế phẩm phân vi sinh vật chủ yếu theo dạng bột trên nền chất mang là than bùn. Từ năm 1925, Thụy Điển đã sản xuất phân vi sinh bằng phương pháp lên men trên môi trường xốp thành trùng gồm các nguyên liệu rẻ tiền như đất + vỏ cây nát + than bùn (Ljunggren, thông tin riêng). Phòng Vi sinh vật Đất - Viện Công nghệ Sinh học đã bắt đầu nghiên cứu sản xuất chế phẩm phân vi sinh vật cho đậu tương (Rizoda) từ năm 1987 bằng cách nuôi cấy vi khuẩn tạo nốt sần trên môi trường xốp thành trùng với chất mang là than bùn.

Nhiều tác giả (Ho, W.C. & cs., 1988; Hartman G.L. & cs., 1994; Yabuuchi & cs. 1995...) đã nhận thấy: cây cà chua trồng tại các vùng nhiệt đới hoặc vùng có khí hậu nóng ẩm thường mắc bệnh héo xanh và bị thiệt hại rất lớn. Emil Q. Javier (1994) đã ước tính mức độ thiệt hại do vi khuẩn héo xanh gây ra hàng năm khoảng từ 15% trở lên thậm chí có nơi bị hại tới 95%. Tác nhân gây bệnh héo xanh là vi khuẩn thuộc loài *Pseudomonas*

solanacaerum, hiện nay một số tác giả đã định loại là *Ralstonia solanacaerum* Smith (Yabuuchi & cs, 1995). Để chống bệnh héo xanh, hiện nay người ta đã quan tâm đến các biện pháp sinh học. Misaghi & cs. (1992) đã chứng minh vai trò quan trọng của vi khuẩn vùng rễ đối với khả năng đối kháng vi khuẩn gây héo xanh cà chua. Furuya & cs. (1991) đã đề xuất biện pháp nhiễm chủng *Pseudomonas glumae* vào cây cà chua non (tomato seedling) để đối kháng lại vi khuẩn gây héo xanh. Một số tác giả khác (Yamazaki & Hoshina, 1995; Yamazaki & cs. , 1998) đã nghiên cứu tác dụng của việc bón Can xi và thông báo hiệu quả của việc dùng phân hữu cơ (compost) cho cà chua non đối kháng lại bệnh héo xanh.

Nếu tạo được phân vi sinh vật vừa có khả năng tăng nguồn dinh dưỡng nitơ, photpho, chất kích thích sinh trưởng cho cây, lại vừa có khả năng chống chịu một số bệnh do nấm hoặc vi khuẩn gây ra thì hiệu quả sử dụng của phân vi sinh vật sẽ tăng lên về nhiều phương diện.

Trên cơ sở các thông tin trên, chúng tôi đã thực hiện nhiệm vụ nghiên cứu “Công nghệ sản xuất phân vi sinh vật đa chủng, chức năng cho cà chua quy mô phòng thí nghiệm” theo hướng công nghệ thích ứng lên men vi sinh vật trên môi trường xối thanh trùng với chất mang là than bùn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

- Các chủng vi khuẩn cố định nitơ , phân giải hợp chất photphat khó tan, sinh chất kích thích sinh trưởng trong bộ sưu tập chủng vi sinh vật của Phòng Vi sinh vật đất- Viện Công nghệ Sinh học.

- Các chủng vi khuẩn đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh do TS. Võ Thị Thứ - P. Vi sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học phân lập và định loại theo đặc điểm hình thái và sinh lý sinh hóa.

- Ba chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh thuộc loài *Pseudomonas solanacaerum*, hiện nay được định loài là *Ralstonia solanacaerum* Smith do Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp có ký hiệu : T La Dương, T Võ Cường, T LaD1.

- Chủng vi khuẩn đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh, ký hiệu Bs 46 (2) do Viện Công nghệ Sau thu hoạch cung cấp.

- Bốn chủng nấm gây bệnh thối rễ cây trồng: *Fusarium oxysporum* Hy, *F. oxysporum* Ty, *Rhizoctonia solani* và *Sclerotium rolfsii* do Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp.

- Nuôi cấy các chủng vi khuẩn gây héo xanh trên môi trường SPA (đường- pepton- agar).

- Nuôi cấy các chủng vi khuẩn đối kháng trên môi trường King B.

- Nuôi cấy các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ trên môi trường không chứa nitơ YGA.

- Nuôi cấy các chủng vi khuẩn phân giải hợp chất photphat khó tan trên môi trường Geretsen .

- Nuôi cấy chủng vi khuẩn *Azotobacter* trên môi trường không chứa nitơ Ashby.

- Nuôi cấy chủng vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh thực vật trên môi trường Chitin- pepton (Nielsen & cộng sự, 1998).

- Đánh giá khả năng ức chế bệnh héo xanh của các chủng Bs. bằng cách cấy chấm rất nhỏ của chúng trên môi trường thạch đĩa SPA đã cấy trộn đều vi khuẩn héo xanh. Sau khi nuôi ẩm từ 3 đến 7 ngày, đo đường kính vòng không sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh.

- Xác định hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh thực vật của vi khuẩn bằng cách cấy chấm nấm và cấy ria vi khuẩn đối kháng trên môi trường thạch đĩa khoai tây. Hai vệt cấy đều cách mép đĩa 1 cm và đối diện nhau. Sau 6 ngày nuôi ủ trong tủ ẩm 30°C, đo khoảng cách không có nấm mọc.

- Tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitơ hội sinh với cây trên môi trường bán lỏng không chứa nitơ NFDM theo Kleeberger và cộng sự (1983).
Thành phần như sau:

Dung dịch A: (g/l): glucoza 20; $MgSO_4$: 0,1; Na_2MoO_4 : 0,025; Agar: 1,75;
nước: 1000 ml

Dung dịch B: KH_2PO_4 3,4g ; K_2HPO_4 12,05g ; nước cất 50 ml

Dung dịch C: Xitrat sắt 0,036 g, nước cất 10 ml.

Khử trùng riêng. Sau đó trộn các dung dịch: A:B:C = 950ml: 50ml: 10ml.

Chủng được cấy trong môi trường bán lỏng, sau khoảng 2 đến 3 ngày nuôi ẩm trong 28°C - 30°C, xuất hiện đĩa sinh trưởng gần bề mặt dịch nuôi.

Các chủng được làm sạch, giữ giống thạch nghiêng trên môi trường YGA có thành phần (g/ l): glucoza: 10, KH_2PO_4 : 0,2; $MgSO_4$: 0,1; cao chiết nấm men: 0,4; đỏ Congo (0,04%) 10ml, agar: 20

- Xác định khả năng cố định nitơ kỵ khí trong môi trường bán lỏng: Vi khuẩn được cấy trong môi trường bán lỏng NFDM, lọ nuôi đầy bằng nút cao su kín khí. Hút chân không lọ nuôi nhiều lần để đuổi hết oxy. Thay thế lượng khí trong bình bằng khí nitơ. Bơm 0,5 ml khí axetylen vào ống. Sau 48 giờ

nuôi lấy 0,5 ml khí, xác định khả năng khử axetylen của chủng trên máy sắc kí khí Intermat IGC 120 DFL (Pháp).

- Xác định khả năng cố định nitơ hội sinh giữa vi khuẩn và mầm ngô hoặc mầm lúa trong ống nghiệm Pankhrust theo phương pháp mô hình mầm rễ của Thomas Bauzon có cải biên. Cụ thể: ống được dùng thí nghiệm là ống nghiệm 20x 1,8 cm, nối với 1 ống nhánh 5x 1,4 cm. Trong ống to, chứa cát vô trùng (độ dày 5 cm) được ngập trong dung dịch NFDM. Trong ống nhỏ chứa 1 ml NaOH 1N để hấp phụ khí CO₂ do cây thải ra. Hệ thống hoàn toàn vô trùng. Hạt ngũ cốc được tiệt trùng bằng H₂O₂ 10% và nước vô trùng, giữ ẩm để nảy mầm. Sau đó cẩn thận gieo vào ống cát. Đậy các ống nghiệm bằng nút cao su. Bơm 2ml khí axetylen vào mỗi ống. Toàn bộ hệ thống nuôi trong tối từ 10 đến 14 ngày. Sau đó rút 1ml khí trong ống để xác định hoạt tính khử axetylen của hệ thống hội sinh vi khuẩn và cây. Mỗi mẫu thí nghiệm tối thiểu lặp lại 10 ống/đợt.

- Xác định khả năng phân giải photphat khó tan của các chủng vi sinh vật theo Babenko & cộng sự (1984) và Cunningham & cộng sự (1992). Cụ thể: Trên đĩa thạch Geretsen chấm 1 chấm rất nhỏ sinh khối vi sinh vật. Nuôi ẩm trong nhiệt độ thích hợp. Sau từng ngày đo đường kính khuẩn lạc và đường kính vòng trong quanh khuẩn lạc (vòng phân giải photphat khó tan).

- Hàm lượng photpho tan trong dịch nuôi cấy vi sinh vật được xác định bằng phương pháp phản ứng hỗn hợp xanh molybđat, so màu trên máy quang phổ (hoặc máy so màu TQ) bước sóng 620 nm. Lượng photpho tan trong dịch được tính theo chuẩn của dung dịch KH₂PO₄ tinh sạch và khan.

- Xác định khả năng sinh axit indol axetic (AIA) thô và chất tương tự: Nuôi lắc (180 v/ phút) vi khuẩn trong dung dịch môi trường Ashby có bổ sung 100 mg. tryptophan/ l (làm tiền chất tổng hợp AIA). Sau khoảng 2 đến 5 ngày nuôi lắc trong nhiệt độ 30°C (tùy chủng), ly tâm. Xác định hàm

lượng AIA thô chứa trong dịch nổi theo phương pháp của Salkowskii, so màu trên máy so màu, bước sóng 530 nm..

- Xác định khả năng sinh polysaccarit ngoại bào theo Kenney đã được một số tác giả cải biên (Chin- Hang Shu, 1990; Hitoshi Funahashi, 1989). Cụ thể các bước: Lấy 30 ml dịch nuôi chủng VK , rót từ từ côn tuyệt đối, vừa rót vừa khuấy cho đến khi polysaccarit kết tủa hoàn toàn (dịch trong). Lượng côn dùng kết tủa có thể bằng 1; 1,5; 2; 3 lần dịch nuôi tùy theo độ nhầy của dịch nuôi các chủng khác nhau. Lọc qua giấy lọc. Sấy khô ở 100°C đến khi cân lại 2 lần không đổi trọng lượng. Lượng polysaccarit được tính bằng hiệu số của mẫu sấy trừ đi trọng lượng khô ban đầu của giấy lọc.

- Sản xuất chế phẩm phân vi sinh vật trên môi trường xốp với chất mang là than bùn đã thanh trùng.

- Xác định mật độ các chủng vi khuẩn trong phân vi sinh vật bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc hình thành trên môi trường thạch đĩa theo Koch. Môi trường thạch đĩa là môi trường đặc trưng cho từng chủng.

- **Thử nghiệm trong chậu vại:** Gieo hạt cà chua giống trong các chậu có kích thước : $d = 24$ cm, $h = 27$ cm chứa đất phù sa sông Hồng. Nhiễm bệnh cho đất bằng cách trộn dịch huyền phù các chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh, tính sao cho mỗi gam đất chứa khoảng 10^6 tế bào vi khuẩn. Các mẫu thí nghiệm trộn hạt cà chua với chế phẩm phân vi sinh vật trước khi gieo sao cho mỗi hạt có ít nhất trên 10^6 tế bào vi khuẩn đối kháng bệnh và vi khuẩn có ích cho cây. Đối chứng là cây nhiễm chế phẩm đã thanh trùng (không chứa vi sinh vật sống). Sầu khoảng 40 ngày tuổi (tùy thí nghiệm) nhổ các cây non, đo chiều cao, trọng lượng toàn cây. Thí nghiệm hồ chế phẩm vào rễ cây non, mỗi chậu 1g chế phẩm.

Năm 2002 đã thử nghiệm 2 vụ: Vụ Xuân tháng 1-2 và Vụ Thu tháng 9- 10. Các chậu thí nghiệm chứa đất phù sa sông Hồng. Giống cà chua Ba Lan (do Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp). Các công thức thử nghiệm bao gồm 5 chế phẩm đơn chủng: 4g; IIIe; AN11; RTL2.2; Bs11; 4 chế phẩm chứa 2 chủng Bs11 + 4g; Bs11 + IIIe; Bs11 + AN11; Bs11 + RTL2.2 và 1 chế phẩm đa chủng chứa 5 chủng vi khuẩn. Mỗi công thức thử nghiệm lập lại 7 chậu, mỗi chậu gieo 7 hạt. Sau 45 ngày thu mẫu, xác định vài chỉ tiêu sinh trưởng của cây.

Năm 2003 đã thử nghiệm 3 vụ:

* *Vụ Xuân 2003* (tháng 2 - tháng 3) gieo hạt cà chua Hà Lan, ký hiệu HN512- F1. Thử nghiệm với 2 chế phẩm VSV đơn chủng: Bs 46(2) , RTL1 và 4 hỗn hợp chế phẩm đa chủng đa chức năng, đối chứng bằng mẫu đất tương ứng. Mỗi mẫu chế phẩm thử nghiệm trên 3 loại đất: đất phù sa sông Hồng, đất phù sa sông Hồng có nhiễm đơn chủng gây héo xanh ký hiệu T La Dương, đất phù sa sông Hồng nhiễm hỗn hợp 3 chủng gây bệnh héo xanh, có các ký hiệu TLa Dương, T Võ Cường, TLaD1. Mỗi thí nghiệm chế phẩm trên mỗi mẫu đất được lập lại 5 chậu, mỗi chậu gieo 7 hạt.

* *Vụ Thu 2003* (tháng 9- tháng 10) thí nghiệm 4 chế phẩm đa chủng đa chức năng trên các chậu đất phù sa sông Hồng đã nhiễm hỗn hợp 3 chủng gây bệnh héo xanh. Giống cà chua thí nghiệm: Nhật Bản, ký hiệu: VL805-F1. Mỗi mẫu thí nghiệm lập lại 20 chậu, mỗi chậu gieo 7 hạt.

* *Vụ Đông 2003* (từ 7/10/2003 đến 12/1/ 2004) thử nghiệm hồ rễ cây cà chua giống T18 (Viện Di truyền nông nghiệp) bằng 4 chế phẩm hỗn hợp VSV. Các chậu đất phù sa sông Hồng đã nhiễm hỗn hợp 3 chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh. Mỗi mẫu chế phẩm lập lại trên 20 chậu, mỗi chậu 1 cây.

- Thử nghiệm đồng ruộng:

**Vụ xuân - hè 2003 tại huyện Gia Lộc- Hải Dương (giống Trang Nông)*

**Vụ đông năm 2003 tại Tứ kỳ- Hải Dương, trên giống VN 2000 (Mỹ) do Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Hải Dương bố trí và theo dõi thí nghiệm. Mỗi vụ thử nghiệm và theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất quả trên diện tích gần 1,5 sào (520 m²).*

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

1. Các chủng vi sinh vật tham gia vào cơ cấu chủng giống để sản xuất các loại chế phẩm vi sinh vật đa chủng, chức năng.

Trong công nghệ vi sinh vật, các chủng vi sinh vật đóng vai trò quan trọng nhất. Đối với các chế phẩm phân vi sinh vật, các chủng phải có hoạt tính hữu ích cao cho cây trồng, có khả năng tồn tại trong thời gian dài trong chế phẩm và có tính cạnh tranh cao khi đưa vào môi trường đất trồng. Trên cơ sở các chủng giống tốt có trong Bộ sưu tập chủng Vi sinh vật của Phòng Vi sinh vật Đất và tuyển chọn thêm, chúng tôi đã tuyển chọn được 20 chủng vi sinh vật để tham gia thực hiện đề tài KHCN.04.04.

Các chủng vi khuẩn hữu ích cho cây trồng đóng góp bao gồm:

- 4 chủng có hoạt tính cố định nitơ hội sinh với cây trồng.
- 4 chủng có hoạt tính hòa tan photphat.
- 4 chủng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng.
- 4 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng bệnh héo xanh cà chua..
- 4 chủng có hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây trồng.

1.1. Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ.

Bảng 1: Đặc điểm các chủng VK cố định nitơ

Ký hiệu	Nguồn gốc chủng	Tên PL theo API 20E	Hoạt tính khử C_2H_2 (nmol/ mẫu ngô 10 ngày)
IIIe	Rễ lúa Sóc Sơn- Hà Nội	<i>Enterobacter aerogenes</i>	4011,12
4g	Rễ lúa Từ Liêm- Hà Nội	<i>Enterobacter cloacae</i>	3695,43
ZP 101	Rễ ngô Bengrat- Nam Tư	<i>Enterobacter cloacae</i>	3528,30
333	Rễ lúa mì Bayreuth- Đức	<i>Enterobacter agglomerans</i>	2015,23

Các chủng này đã được bảo quản nhiều năm, nhưng không bị mất hoạt tính. Các chủng (đặc biệt 2 chủng tự phân lập) đã thử nghiệm rộng trong 6 năm gần đây trên cây lúa trong điều kiện chậu vại và trên đồng ruộng đạt kết quả khả quan. Từ năm 2000, chúng tôi đã bước đầu thử nghiệm trên vài cây trồng cạn như cà chua, ngô, hoa xuxi, cà phê, hồ tiêu trên chậu vại và trên đồng ruộng cũng đã thu được kết quả tốt.

Ngoài khả năng cố định nitơ hội sinh cho cây trồng, 2 chủng IIIe và 4g còn có khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng axit indol axetic (AIA). Sau 3 ngày nuôi lắc trong môi trường Shalkowski, chủng IIIe sinh tổng hợp được 21,09 mg/l AIA, còn chủng 4g : 25,63 mg/l.

Chủng IIIe cũng có khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa Geretsen sau 12 ngày, đường kính khuẩn lạc (D_1) của chủng IIIe đạt 1,84 cm; đường kính vòng trong sáng (D_2) là 2,45 cm. $D_2 - D_1 = 0,61\text{cm}$.

Cả 3 chủng ZP101, IIIe và 4g có khả năng đối kháng nấm gây bệnh thực vật thuộc loài *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*.

2.2 Các chủng vi khuẩn có hoạt tính hoà tan photphat.

Các kết quả nghiên cứu từ Mỹ, Canada, Nga, Nhật, Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan... cho thấy sử dụng chế phẩm vi sinh vật có thể thay thế từ 1/3 đến 1/2 lượng lân hóa học. Nhiều tác giả đã khảo sát thấy hiệu quả sử dụng phân lân hóa học rất thấp do các phản ứng kết tủa ngược xảy ra trong đất. Premono (1994- Indonexia) đã thông báo hiệu quả này chỉ đạt 1- 5% ở vùng đất chua tại Indônêxia. Chỉ có nhờ vi sinh vật mới có thể chuyển hóa tốt và thường xuyên các hợp chất photphat khó tan trong đất thành dễ tiêu cho cây. Từ bộ sưu tập chủng vi sinh vật có hoạt tính hòa tan photphat của Phòng Vi sinh vật đất- Viện Công nghệ Sinh học chúng tôi đã lựa chọn 4 chủng tốt nhất để đóng góp vào việc thực hiện đề tài KHCN. 04.04

Bảng 2: Đặc điểm của 4 chủng VK hoà tan photphat vô cơ

Ký hiệu	Nguồn gốc	Tên PL theo API 20E	D ₂ phân giải Ca ₃ PO ₄ sau 8 ngày ; (cm)
RTL 2.2	rễ ngô Từ Liêm	<i>Pseudomonas</i> sp.	2,00 ± 0,24
RTL.7	rễ ngô Từ Liêm	<i>Achromobacter</i> sp.	2,20 ± 0,08
ĐTL2.2	Đất ngô Từ Liêm	<i>Achromobacter</i> sp.	2,06 ± 0,05
Đ ĐP 5	Đất ngô Đan Phượng- Hà Tây	<i>Flavobacterium</i> <i>odoratum</i>	2,20 ± 0,16

Ngoài khả năng phân giải hợp chất photphat khó tan, chủng RTL2.2 còn có khả năng đối kháng 3 loài nấm gây bệnh thực vật là: *Fusarium*

oxysporum, *Rhizoctonia solani* và *Sclerotium rolfii*. Chủng ĐTL2.2 đối kháng được 2 loài *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*.

1.3. Các chủng vi khuẩn sinh chất kích thích sinh trưởng.

Các chất kích thích sinh trưởng thực vật thuộc nhóm gibberellin và thuộc nhóm auxin đều có thể được sinh tổng hợp nhờ vi sinh vật. Xu hướng sử dụng các vi sinh vật trong phân bón hữu cơ vi sinh thường hay chú ý lựa chọn các chủng có khả năng sinh các chất thuộc nhóm auxin, thí dụ AIA (axit indol axetic và các chất tương tự). Trong số các chi vi sinh vật có khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, hiện nay người ta quan tâm nhiều đến chi *Azotobacter*, vì ngoài khả năng cố định nitơ tự do và sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, chúng còn có thể sinh ra nhiều sản phẩm ngoại bào có lợi cho thực vật: các vitamin, hormone, chất chống nấm v.v... Nhiều nước trên thế giới, nhất là Ấn Độ đã sản xuất các chế phẩm *Azotobacter* thành hàng hóa sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp.

Trong nhiều năm qua từ 1992 tới nay, phòng Vi sinh vật đất đã tiến hành thu thập khảo sát mật độ, phân lập tuyển chọn các chủng *Azotobacter* từ khoảng trên 50 mẫu đất lấy từ nhiều tỉnh thành trong cả nước. Đã phân lập và tuyển chọn được khoảng trên trăm chủng *Azotobacter* có hoạt tính tốt đối với cây trồng. Giai đoạn đầu tham gia đề tài KC.04.04, chúng tôi đã khảo sát lại bộ sưu tập chủng và tuyển chọn thêm, bước đầu chọn ra 4 chủng có khả năng để đóng góp vào việc xây dựng các chế phẩm phân vi sinh vật đa chức năng, phù hợp cho các vùng sinh thái.

Bảng 3: Đặc điểm của 4 chủng *Azotobacter*

Ký hiệu	Nguồn gốc	Tên loài	Màu K.lạc	D K.lạc (6 ngày)	D K.lạc (10 ngày)	AIA (mg/l)
AN11	Đất ngô Nhật Tân - Hà Nội.	<i>Azotobacter chroococcum</i>	nâu	1,7 cm	8,03 cm	15,3
AQ.7b	Đất đậu Quốc Oai - Hà Tây	<i>Azotobacter vinelandii</i>	vàng	1,9 cm	8,00 cm	10,4
AHH.3	Đất lúa Hiệp Hòa- Bắc Giang	<i>Azotobacter chroococcum</i>	nâu	1,2 cm	1,49 cm	13,75
SH8	Đất ngô Nhật Tân - Hà Nội.	<i>Azotobacter vinelandii</i>	vàng nhạt	2,0 cm	KXD	13,13

Bảng 3 cho thấy 4 chủng *Azotobacter* đều cố định nitơ tự do, vì chúng có thể sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường *Ashby* không chứa nitơ, đặc biệt 2 chủng AN11 và AQ.7b.

Đồng thời chúng có khả năng sinh polysacarit ngoại bào là một đặc điểm quý, đóng góp vào việc giữ độ ẩm cho đất, tăng khả năng hình thành mùn cho đất.

Hai chủng AN11 và AQ.7b còn có hoạt tính hoà tan photphat vô cơ rõ. Các kết quả về xác định lượng polysacarit trong môi trường dịch thể *Ashby*

nuôi lắc và hoạt tính phân giải photphat Canxi trong môi trường thạch đĩa Geretsen của 4 chủng *Azotobacter* được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: Khả năng sinh polysacarit và hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của 4 chủng *Azotobacter*

Chủng	Polysacarit sau 3 - 5 ngày nuôi lắc (mg/ml)	Đường kính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của VK sau 10 ngày nuôi (D= đường kính, đơn vị: cm)			
		D khuẩn lạc (D1)	D vòng phân giải (D2)	Hiệu số D2- D1	Nhận xét
AN11	7,85	2,30	2,69	0,39	vòng phân giải rõ
AQ7b	10,01	1,51	1,96	0,45	vòng phân giải rõ
AHH3	8,73	0,60	0,99	0,33	vòng phân giải mờ
SH8	8,92	kxd			

1.4. Các chủng vi khuẩn đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua.

Các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng bệnh héo lá được phân lập từ các mẫu rễ cây lạc và rễ cà chua thu thập tại Hoà Bình và Hải Dương. Sau khi phân lập và đã tuyển chọn được 4 chủng có hoạt tính tốt nhất đối kháng với các chủng *Ralstonia solanacearum*.

Bảng 5: Đặc điểm hình thái tế bào, bào tử của các chủng VSV đối kháng bệnh héo xanh cà chua

Ký hiệu chủng	Đặc điểm tế bào	Đặc điểm bào tử
T2	Gram +, hình que nhỏ, đơn	Hình oval, không phình
T8	Gram +, hình que nhỏ, đơn	Hình oval, không phình
T10	Gram +, hình que nhỏ, đơn	Hình oval, không phình
T11	Gram +, hình que nhỏ, đơn	Hình oval, không phình

Đây là các chủng thuộc chi *Bacillus*.

Để có thể định tên tới loài, chúng tôi đã xác định các đặc điểm sinh hóa của 4 chủng này.

Bảng 6: Đặc điểm sinh hoá của các chủng Vi khuẩn đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua

Đặc điểm	T2	T8	T10	T11
Katalaza	+	+	+	+
Acetoin (VP)	+	+	+	+

Thủy phân tinh bột	+	+	+	+
Ureaza	-	-	-	-
Đỏ nitrat	+	+	+	+
Lên men đường				
Manoza	+	+	+	+
<i>Salicine</i>	+	+	+	+
<i>Saccharoza</i>	+	+	+	+

Với những đặc điểm hình thái và sinh hóa của 4 chủng trên, chúng đều có thể thuộc loài *Bacillus subtilis*.

1.5. Các chủng vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh thối rễ cây trồng.

Lựa chọn từ bộ sưu tập các vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng kháng nấm đã được Phòng Vi sinh vật đất phân lập trong các mẫu đất và rễ cây trồng của đồng bằng sông Hồng, sông Cửu Long và Tây Nguyên 4 chủng có hoạt tính cao để đóng góp tham gia đề tài KC.04.04.

Bảng 7: Hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây của 4 chủng vi khuẩn

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng đối kháng (MT. khoai tây)		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>R. rolfsii</i>
1	<i>Pseudomonas</i> sp.7.1	++++	++++	++++
2	<i>Pseudomonas</i> sp. 9.1	++++	++++	++++
3	<i>Pseudomonas</i> sp. 9.4	+++	+++	+++
4	<i>Pseudomonas</i> sp.F104D	++++	+++	Kxd

***Chú thích:** ++++: khoảng cách giữa mép khuẩn lạc nấm và vi khuẩn $\geq 15\text{mm}$

+++ : khoảng cách giữa mép khuẩn lạc nấm và vi khuẩn $\geq 10\text{mm}$

kxd: chưa xác định

Hai mươi chủng nói trên đã được đóng góp vào đề tài KHCN.04.04 để lựa chọn dùng cho các chế phẩm phân vi sinh vật đa chủng, chức năng cho các loại cây nông lâm nghiệp trong phạm vi nội dung đề tài.

2. Các chủng vi khuẩn được sử dụng để lựa chọn thành phần trong phân VSV cho cây cà chua.

Dựa trên các kết quả nghiên cứu cơ bản về nhiều chủng vi khuẩn cố định nitơ, sinh chất kích thích sinh trưởng, phân giải photphat khó tan, chúng tôi đã chọn các chủng Ille, 4g, AN11, RTL1, RTL.2.2, ĐTL2.2 là những vi khuẩn có hoạt tính có lợi cho sinh trưởng của cây cà chua để đưa vào nghiên cứu lựa chọn. Đồng thời đã sơ tuyển khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh của một số chủng *Bacillus subtilis*, cuối cùng đã chọn 2 chủng BS 11 và chủng Bs 46(2) là các chủng tốt nhất. Chủng Bs11 sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường SPA đã cấy chủng vi khuẩn héo xanh TLa Dương và T Võ Cường đã tạo vòng vô khuẩn với đường kính (d) = 2,78 cm và d = 3, 27cm. Tương ứng với chủng Bs 46(2) là các số liệu với chủng TLa Dương: d= 2,43 cm; chủng T Võ Cường d= 3,10 cm. Một số hoạt tính sinh học của các chủng đưa vào lựa chọn thành phần hỗn hợp phân VSV được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8: Hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn được sử dụng để nghiên cứu sản xuất phân vi sinh đa chức năng cho cà chua.

Ký hiệu chủng	Tên phân loại	Cố định nitơ	Phân giải photphat	Sinh AIA thô	Sinh polysaccharit	Kháng VK héo xanh		
						T La Dương	T LalĐ l	TVõ Cường
Bs46 (2)	<i>Bacillus subtilis</i>	kxd	kxd	Kxd	kxd	+	kxd	+
Bs11	<i>Bacillus subtilis</i>	kxd	kxd	kxd	kxd	+	kxd	+
Ille	<i>Enterobacter aerogenes</i> ^{(a) (b)}	+	+	+	+	+	0	0

4g	<i>Enterobacter cloacae</i> (a) (b)	+	0	+	0	Kxd	kxd	kxd
AN11	<i>Azotobacter chroococcum</i>	+	0	+	+	Kxd	kxd	kxd
RTL1	<i>Pseudomonas sp.</i> ^(a)	kxd	+	0	0	+	0	+
RTL2 .2	<i>Pseudomonas</i> ^(a) <i>Burkholderia</i> ^(b)	kxd	+	0	0	+	+	+
DTL2 .2	<i>Achromobacter</i> ^(a) <i>Burkholderia</i> ^(b)	kxd	+	0	0	+	+	+

Chú thích: kxd: không xác định, + : có hoạt tính; 0 : không hoạt tính;

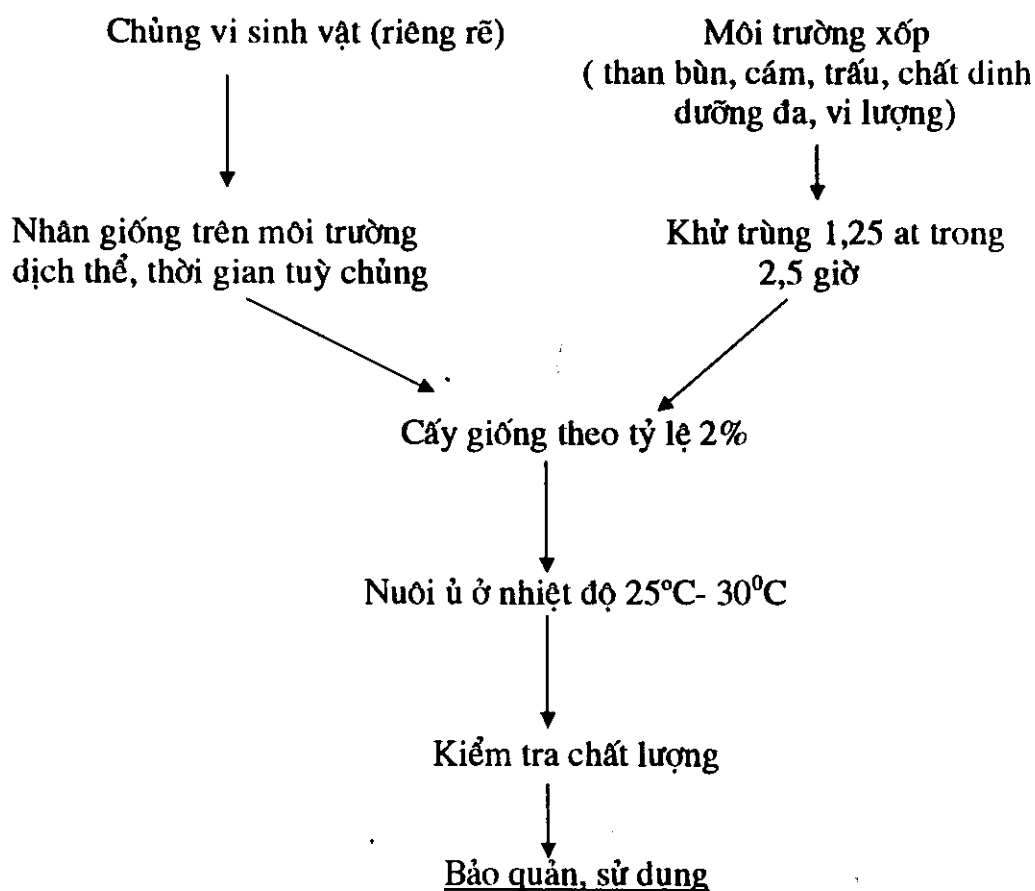
(a); định loại theo Kit chuẩn API 20E

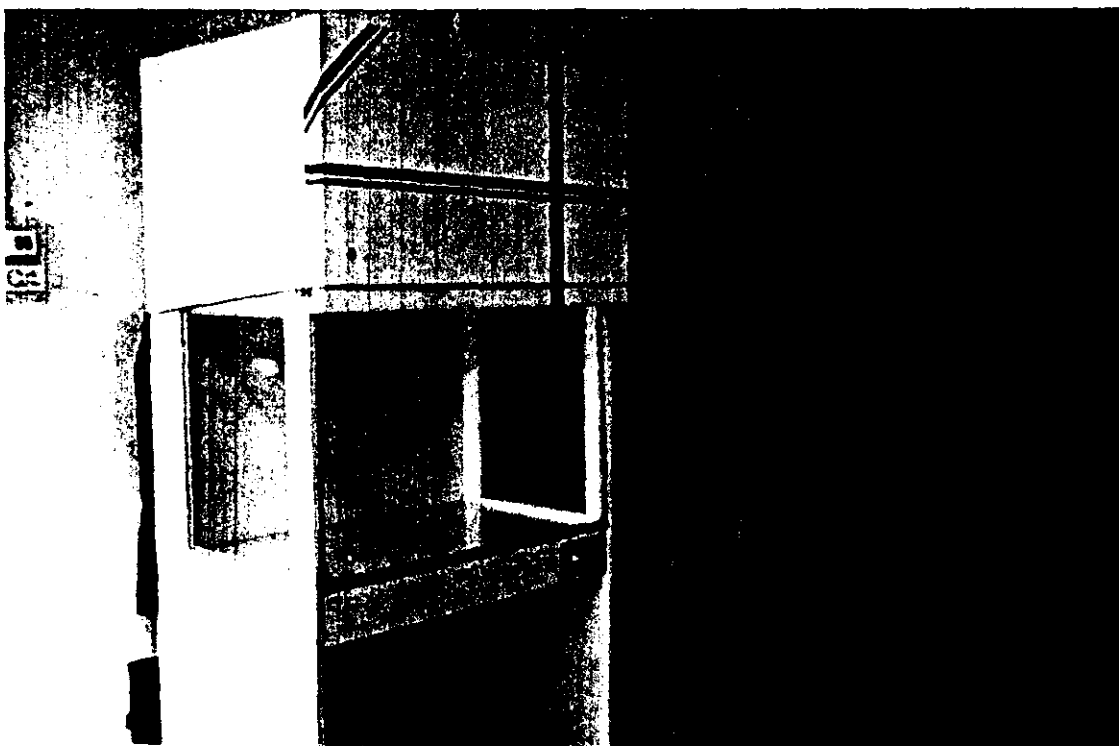
(b) định loại theo trình tự 16S- rRNA

3. Công nghệ thích ứng để sản xuất phân vi sinh vật đa chủng, chức năng cho cà chua.

Dựa trên cơ sở công nghệ sản xuất các chế phẩm phân vi sinh trên nền chất mang thanh trùng của Phòng Vi sinh vật đất phục vụ cho các loại cây đậu và lúa, chúng tôi đã ứng dụng vào việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm phân vi sinh đa chủng, đa chức năng cho cà chua. Nguyên tắc của quy trình sản xuất theo sơ đồ:

Sơ đồ : Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật trên môi trường xốp thanh trùng





Hình 1: Các thiết bị trong Pilot sản xuất chế phẩm giống vi sinh vật



Hình 2: Nhà lưới thí nghiệm trồng cà chua chấu vại

4. Biến động mật độ của các chủng vi khuẩn trong phân vi sinh vật đa chủng theo thời gian bảo quản.

Tám chủng vi khuẩn được nêu tên trong bảng 8 đều được nghiên cứu các điều kiện thích hợp để sản xuất phân vi sinh đơn chủng, đạt mật độ theo TCVN 2002. Tiếp theo đã nghiên cứu sản xuất các chế phẩm phân vi sinh của từng cặp chủng bao gồm 1 chủng VSV cung cấp nguồn dinh dưỡng và 1 chủng vi khuẩn đối kháng bệnh héo xanh, cụ thể:

Bs11+ 4g ;

Bs11+ IIIe ;

Bs 11+ RTL 2.2;

Bs11+ AN11

và chế phẩm hỗn hợp 5 chủng Bs11+ 4g+ IIIe+ RTL2.2+ AN11.

Kết hợp với những kết quả của các thí nghiệm chậu vại trong 2 năm trước, giai đoạn 2003 chúng tôi đã xây dựng 4 tập hợp chủng để sản xuất chế phẩm đa chủng, đa chức năng cho cà chua.

Bảng 9 trình bày kết quả của một trong những đợt sản xuất thử các chế phẩm đa chức năng cho cây cà chua. Sau 6 tháng được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng, các mẫu phân vi sinh vật đều có pH_{KCl} và pH_{H_2O} dao động từ 6 đến 6,8. Riêng đối với các chủng đối kháng vi khuẩn héo xanh sau khi các khuẩn lạc đã phát triển rõ trên môi trường KingB, cấy chấm sinh khối chủng sang đĩa thạch SPA có chứa vi khuẩn gây héo xanh. Kết quả cho thấy các chủng Bs11 và Bs46(2) trong các chế phẩm vi sinh vật đã bảo quản cho đến 6 tháng vẫn giữ hoạt tính đối kháng như chủng gốc. Trong suốt thời gian bảo quản ở điều kiện trong phòng, các chế phẩm không bị nhiễm vi sinh vật khác.

Bảng 9: Biến động mật độ các chủng vi khuẩn trong phân vi sinh vật theo thời gian bảo quản.

Thời điểm xác định mẫu trên từng môi trường		Mật độ vk trong các chế phẩm hỗn hợp chủng (đơn vị : CFU/ g)			
		IIIe+ ĐTL2.2+ Bs11+ AN11	4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) + AN11	4g + ĐTL2.2+ Bs11 + AN11	4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11
Sau khi cấy vào (ban đầu)	YGA	$6,10. 10^7$	$6,20. 10^8$	$6,20. 10^7$	$6,20. 10^7$
	Geretsen	$1,30. 10^8$	$1,30. 10^8$	$1,30. 10^8$	$1,40. 10^8$
	Ashby	$5,00. 10^6$	$5,00. 10^6$	$5,00. 10^6$	$5,00. 10^6$
	King B	$1,20. 10^7$	$1,30. 10^7$	$1,20. 10^7$	$1,20. 10^7$
Sau 0,5 tháng bảo quản	YGA	$9,70. 10^8$	$1,20. 10^9$	$1,60. 10^9$	$1,40. 10^9$
	Geretsen	$1,10. 10^9$	$1,40. 10^9$	$1,90. 10^9$	$2,10. 10^9$
	Ashby	$1,70. 10^8$	$1,20. 10^8$	$1,00. 10^8$	$1,10. 10^8$
	King B	$8,70. 10^8$	$7,50. 10^8$	$1,10. 10^9$	$1,30. 10^9$
Sau 1 tháng bảo quản	YGA	$4,30. 10^9$	$1,30. 10^9$	$2,70. 10^9$	$1,90. 10^9$
	Geretsen	$1,60. 10^9$	$1,10. 10^9$	$1,20. 10^9$	$3,80. 10^8$
	Ashby	$4,60. 10^8$	$6,50. 10^8$	$7,00. 10^8$	$5,00. 10^8$
	King B	$5,80. 10^8$	$1,00. 10^9$	$5,00. 10^8$	$7,00. 10^8$
Sau 2 tháng bảo	YGA	$1,30. 10^{10}$	$3,30. 10^9$	$4,60. 10^9$	$2,80. 10^9$
	Geretsen	$9,60. 10^9$	$1,90. 10^9$	$2,10. 10^9$	$2,70. 10^9$
	Ashby	$5,00. 10^8$	$4,00. 10^8$	$5,00. 10^8$	$4,00. 10^8$

quản	King B	$1,30. 10^8$	$6,60. 10^8$	$7,80. 10^8$	$3,00. 10^8$
Sau 3 tháng bảo quản	YGA	$2,90. 10^9$	$1,80. 10^9$	$1,10. 10^9$	$1,30. 10^9$
	Geretsen	$3,00. 10^9$	$1,40. 10^9$	$1,70. 10^9$	$2,10. 10^9$
	Ashby	$3,00. 10^8$	$2,10. 10^8$	$1,10. 10^8$	$1,03. 10^8$
	King B	$1,09. 10^8$	$2,20. 10^8$	$3,20. 10^8$	$2,80. 10^8$

Sau 6 tháng bảo quản chế phẩm trong nhiệt độ phòng, mật độ các chủng vi sinh vật chứa trong đó vẫn đạt được lớn hơn 10^8 CFU/ g, đạt TCVN 2002.

5. Tác dụng của các chế phẩm phân vi sinh vật lên cây cà chua trong điều kiện chậu vại.

Các kết quả thử nghiệm tác dụng của phân vi sinh đơn chủng và hỗn hợp chủng lên sinh trưởng cà chua Ba Lan được trình bày trong các bảng 10, 11, 12 và 13.

Bảng 10. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà chua Ba Lan nhiễm chế phẩm VSV trồng chậu vại (cây 44 ngày tuổi, tháng 1 & 2 / 2002)

TT	Mẫu chế phẩm	Chiều cao TB/ cây (cm)	Số lá TB/ cây	Dài rễ TB/ cây	Trọng lượng TB (g/ cây)
1	ĐC	$7,192 \pm 0,986$	$4,132 \pm 0,767$	$2,797 \pm 0,955$	$0,303 \pm 0,076$
2	AN11	$8,738 \pm 0,762$	$4,756 \pm 0,685$	$4,079 \pm 0,782$	$0,416 \pm 0,034$
3	ĐTL2.2	$8,944 \pm 0,898$	$4,684 \pm 0,758$	$4,750 \pm 0,575$	$0,495 \pm 0,055$
4	Ille	$7,563 \pm 0,845$	$4,538 \pm 0,765$	$4,190 \pm 0,756$	$0,339 \pm 0,045$
5	Hỗn hợp 3 chủng trên	$8,505 \pm 0,761$	$4,499 \pm 0,505$	$2,814 \pm 0,825$	$0,402 \pm 0,067$

Chú thích: SD - Thử nghiệm hiệu quả hơn đối chứng với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Bảng 11: Tác dụng của chế phẩm VSV đối với cây cà chua Ba Lan
(cây 44 ngày tuổi, thí nghiệm tháng 1 & 2/ 2002)

STT	Mẫu VSV	% tăng độ cao cây	% tăng số lá/ cây	% tăng độ dài rễ	% tăng trọng lượng
1	AN11	21,49	15,11	45,82	37,29
2	ĐTL2.2	24,36	13,35	69,82	63,39
3	IIIe	5,16	9,82	49,82	11,86
4	Hỗn hợp 3 chủng trên	18,25	8,88	0,61	32,8

Sau khi nhổ cây con để xác định một số chỉ tiêu sinh trưởng, chúng tôi đã hồ rễ của mẫu cây nhiễm hỗn hợp vi sinh với chế phẩm này (1g/ chậu), mỗi chậu 1 cây, lấp lại 7 chậu. Sau 102 ngày, các số liệu tăng so với đối chứng của chế phẩm hỗn hợp VS là: cao cây 19,44%, số lá 5,59%; trọng lượng 32,26%, số hoa/cây 95,65%. Riêng rễ cây có nhiễm hỗn hợp vi sinh giảm độ dài rễ giảm 4,57%, nhưng các rễ cấp 2, cấp 3 nhiều hơn.. Cây thí nghiệm lá xanh tốt trong khi cây đối chứng lá bị úa vàng nên không tiếp tục theo dõi được trong điều kiện trồng chậu.



Hình 3: Thí nghiệm cà chua chậu vại bổ sung các chủng VSV có ích giai đoạn cây non 2002



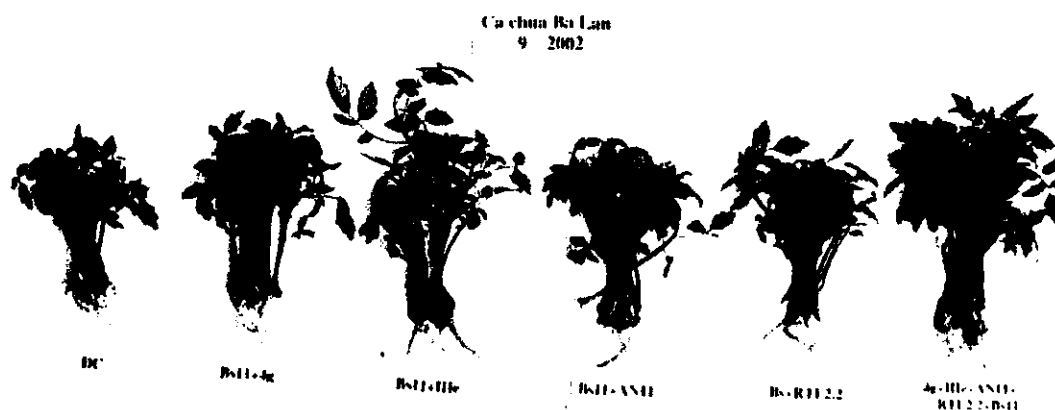
Hình 4: Thí nghiệm cà chua chậu vại bổ sung các chủng VSV có ích giai đoạn cây ra hoa 2002

Bảng 12. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà chua Ba Lan nhiễm chế phẩm VSV trồng chậu vại (cây 45 ngày tuổi, tháng 9 & 10 / 2002)

ST T	Mẫu	Số cây sống	Chiều cao cây TB (cm)	Độ dài rễ TB (cm)	Số lá TB/ cây	Trọng lượng TB (g/cây)
1	4g	23	12,86± 1,854	4,70± 1,001	6,10± 1,212	1,3417± 0,963
2	IIIe	17	8,57± 1,385	3,53± 0,875	5,12± 1,075	0,4918± 1,082
3	AN11	17	10,87± 1,642	3,65± 0,956	5,12± 1,122	0,7053± 1,001
4	RTL2.2	10	9,87± 2,115	3,93± 0,842	4,90± 0,862	0,5180± 0,412
5	Bs 11	11	8,83± 1,473	2,74± 0,545	4,69± 0,765	0,3618± 0,245
6	Bs11+ 4g	30	10,35± 1,756	3,42± 0,786	4,77± 0,756	0,4953± 0,320
7	Bs11 + IIIe	18	10,46± 1,892	2,86± 0,642	4,61± 0,980	0,4956± 0,442
8	Bs11+ AN11	27	9,94± 1,765	3,25± 0,695	4,74± 0,852	0,5252± 0,375
9	Bs11 + RTL2.2	9	10,12± 2,010	3,87± 0,755	4,56± 0,790	0,524± 0,482
10	Hỗn hợp 5 chủng	18	11,17± 2,321	3,21± 0,826	5,50± 0,851	0,7794± 0,562
11	Đối chứng	21	7,26± 1,761	2,80± 0,764	3,33± 0,810	0,2661± 0,241



Hình 5: Thí nghiệm cà chua chậu vai bổ sung các chủng VSV có ích giai đoạn cây ra quả 2002



Hình 6: Thí nghiệm cà chua chậu vai với cặp chủng và hỗn hợp chủng VSV kích thích sinh trưởng và VK đối kháng VK gây héo xanh 2002

Bảng 13: Tác dụng của các chế phẩm VSV lên tăng sinh trưởng cà chua
(cây 45 ngày tuổi, tháng 9 và 10/ 2002)

Mẫu	% tăng cao cây	% tăng dài rễ	% tăng số lá	% tăng trọng/ cây
4g	77,13	67,96	84,08	404,2
IIIe	18,04	26,05	53,75	84,82
AN11	49,73	30,25	53,75	165,05
RTL2.2	35,95	40,36	47,15	94,66
Bs 11	21,59	0	22,85	35,97
Bs11 + 4g	42,56	22,14	43,24	86,15
Bs11 + IIIe	43,25	1,98	38,47	86,25

Bs11 + AN 11	36,98	16,07	42,34	97,37
Bs 11 + RTL2.2	39,39	38,21	36,94	97,07
Hỗn hợp 5 chủng	53,86	14,68	65,16	192,90

Xếp theo mức độ tăng trọng lượng của cây , thứ tự giảm dần như sau: 4g, hỗn hợp 5 chủng, AN11, Bs11+ An11, Bs11+ RTL2.2, RTL2.2, Bs11+ Ille, Bs11+ 4g, Ille, Bs11.

Thí nghiệm lặp lại trong tháng 10 và tháng 11 năm 2002, có bổ sung thêm phân hóa học N, P, K cũng cho kết quả dương tính tương tự.

Điều đáng chú ý là chế phẩm đơn chủng 4 g luôn tăng năng suất vượt trội so với các mẫu chế phẩm khác (tăng 404,2% và 233% so với đối chứng).

Năm 2003 đã tiến hành thử nghiệm tác dụng của các chế phẩm vi sinh vật trong 3 đợt: hai đợt trên cây non, giai đoạn từ khi gieo hạt đến 40 ngày tuổi và 1 đợt từ cây trồng cây giống cho tới khi có quả (sau khi trồng 105 ngày). Mỗi mẫu chế phẩm được lặp lại trên 20 chậu trong 1 đợt gieo trồng.

Kết quả về hoạt tính đối kháng bệnh héo xanh của các chế phẩm được trình bày trên bảng 14, 15, 16, 17.

Bảng 14: Số lượng cây cà chua không bị nhiễm bệnh héo xanh

Vụ Xuân 2003 (cây 40 ngày tuổi sau khi gieo hạt)

STT	Mẫu phân VSV	Đất nhiễm VK T La Dương		Đất nhiễm hỗn hợp 3 chủng VK gây bệnh	
		Số cây mọc/ 35 hạt gieo	Số cây không nhiễm bệnh	Số cây mọc / 35 hạt gieo	Số cây không nhiễm bệnh
1	Đối chứng	33	19	26	10
2	Bs 46 (2)	26	21	19	15
3	RTL1	35	33	32	27
4	IIIe + DTL22 + Bs11+ AN11	32	25	27	22
5	4g+ DTL2.2+ Bs46(2)+ AN11	23	18	26	24
6	4g+ DTL2.2+ Bs11+ AN11	30	22	23	19
7	4g+ RTL2.2+ Bs11+ AN11	27	24	32	27

Trong các chậu trồng hạt đã nhiễm phân vi sinh, các chậu nhiễm chế phẩm Bs 46 (2) có tỷ lệ nảy mầm thấp nhất so với đối chứng, đó cũng là vấn đề cần suy nghĩ khi sử dụng tiếp theo. Vì vậy nếu so số cây không bị nhiễm

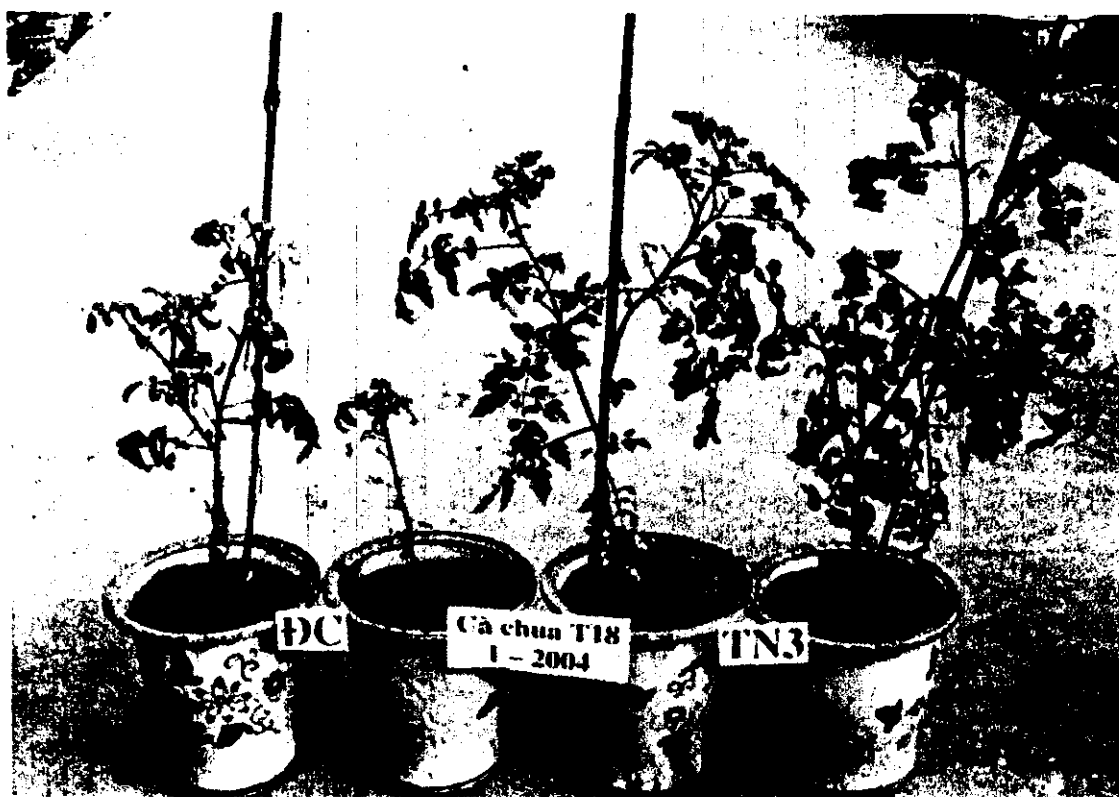
bệnh với số cây non thì tỷ lệ cây không nhiễm bệnh là cao, nhưng nếu so với số hạt được gieo thì tỷ lệ này không khả quan so với các chế phẩm khác.

Bảng 15: Mức độ hạn chế bệnh héo xanh cà chua của các chế phẩm phân vi sinh (Vụ Xuân 2003)

Mẫu phân VSV	% cây không bị bệnh trên lô đất nhiễm VK TLa Dương	% cây không bị bệnh trên lô đất nhiễm 3 chủng gây bệnh
Đối chứng	57,58	38,46
Bs 46 (2)	80,77	78,95
RTL1	94,29	84,37
IIIe + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	78,12	81,48
4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) + AN11	78,26	92,31
4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	73,33	82,61
4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	88,89	84,85



Hình 7: Thí nghiệm cà chua chậu vại bị nhiễm VK gây bệnh héo xanh 2003



Hình 8: Thí nghiệm cà chua chậu vại bị nhiễm VK gây bệnh héo xanh giai đoạn thu hoạch 2004

Bảng 16: Số lượng cây cà chua không bị nhiễm bệnh héo xanh trồng trong chậu vại chứa đất nhiễm hỗn hợp 3 chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh (Vụ Thu và Vụ Đông năm 2003)

STT	Mẫu chế phẩm	Vụ Thu. Gieo hạt giống Nhật. Cây non 35 ngày tuổi)		Vụ Đông. Cà chua T18 sau 105 ngày trồng từ cây non
		Số cây mọc/ 140 hạt	Số cây không bị héo xanh	Số cây không bị héo xanh / 20 cây trồng
1	Đối chứng	125	25	8
2	IIIc + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	138	68	16
3	4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) + AN11	137	65	19
4	4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	135	58	19
5	4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	140	58	18

Bảng 17: Mức độ hạn chế bệnh héo xanh cà chua của các chế phẩm phân vi sinh (Vụ Thu và Vụ Đông 2003)

Mẫu phân VSV	% cây không bị bệnh (Vụ Thu)	% cây không bị bệnh (Vụ Đông)
Đối chứng	20,00	40,00
IIIe + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	49,28	80,00
4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) + AN11	47,45	95,00
4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	42,96	95,00
4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	41,43	90,00

Sau khi hạt nảy mầm 13 ngày, bắt đầu xuất hiện bệnh héo xanh ở các chậu đối chứng. Theo dõi số cây bị héo xanh cho đến khi thu hoạch mẫu. Các hạt được gieo trên đất nhiễm 3 chủng vi khuẩn gây bệnh đã bị bệnh nặng hơn so với nhiễm 1 chủng vi khuẩn T.La Dương, vì vậy những thí nghiệm tiếp theo đã sử dụng hỗn hợp cả 3 chủng gây bệnh. Khi thu hoạch mẫu, đã xác định các chỉ số: chiều cao cây, số lá, chiều dài rễ, trọng lượng cây, số cây có quả, tổng trọng quả.

Tác dụng của các chế phẩm phân vi sinh lên sinh trưởng cà chua được trình bày trong các bảng 18, 19, 20 và 21. Các chế phẩm chứa đơn chủng vi khuẩn cũng như đa chủng đều làm tăng chiều cao và trọng lượng trung bình của các cây cà chua thí nghiệm so với đối chứng. Bốn chế phẩm đa chủng thử nghiệm vừa có khả năng làm giảm rõ rệt bệnh héo xanh cà chua và tăng sinh trưởng, tăng khả năng tạo quả.

Bảng 18. Chiều cao & trọng lượng trung bình của cà chua trồng chậu vại khi
sử dụng các chế phẩm vi sinh vật.
(cây 40 ngày tuổi, thí nghiệm vụ Xuân 2003)

S T T	Mẫu chế phẩm	Chiều cao TB/ cây (cm)			Trọng lượng TB/ cây (g)		
		Lô đất	Lô đất	Lô đất	Lô đất	Lô đất	Lô đất
		1	2	3	1	2	3
1	ĐC	13,856 ±0,759	8,421 ±1,459	10,890 ±1,789	1,232 ±0,295	0,358 ±0,059	0,630 ±0,075
2	Bs 46 (2)	17,858 ±1,245	10,829 ±1,254	12,960 ±0,762	1,874 ±0,642	0,657 ±0,132	0,944 ±0,095
3	IIIe + ĐTL2.2 + Bs11+ AN11	16,738 ±1,454	11,972 ±0,757	14,040 ±2,336	1,995 ±0,125	0,792 ±0,236	1,214 ±0,132
4	4g + ĐTL2.2 + Bs46 (2) + AN11	16,489 ±0,972	10,383 ±1,649	12,804 ±1,466	1,552 ±0,467	0,564 ±0,442	0,789 ±0,176
5	4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	16,369 ±0,988	11,655 ±1,162	13,174 ±1,479	1,598 ±0,139	0,714 ±0,563	0,987 ±0,242

6	4g + Bs11 + RTL2.2 + AN11	18,850 ±1,320	12,896 ±1,232	12,790 ±1,295	1,791 ±0,658	0,788 ±0,239	0,759 ±0,324
7	RTL1	18,356 ±1,467	12,909	13,120	1,829	0,707	0,815

Chú thích: Lô đất 1: Đất không nhiễm bệnh, Lô đất 2: Nhiễm VK chủng TLa Dương, Lô đất 3: Nhiễm 3 chủng bệnh.

Bảng 19: Tác dụng của các chế phẩm phân vi sinh vật lên sinh trưởng cây cà chua 40 ngày tuổi trong chậu vại
(Vụ Xuân 2003)

Mẫu phân VSV	Tỷ lệ tăng chiều cao cây so với đối chứng (%)				Tỷ lệ tăng trọng lượng cây so với đối chứng (%)			
	Lô đất 1	Lô đất 2	Lô đất 3	Trung bình	Lô đất 1	Lô đất 2	Lô đất 3	Trung bình
Bs 46 (2)	28,88 ^S D	28,60 ^S D	19,01	25,50	52,12 ^{SD}	83,52 ^{SD}	49,84 ^{SD}	61,84
IIIc + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	20,80 ^S D	42,17 ^S D	28,93 ^{SD}	30,63	61,90 ^{SD}	121,30 ^S D	92,70 ^{SD}	91,97
4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) +	19,00 ^S D	23,30 ^S D	17,58 ^{SD}	19,96	26,00 ^{SD}	57,54 ^{SD}	25,24 ^{SD}	36,26

AN11								
4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	18,14 ^S D	38,40 ^S D	20,97 ^{SD}	25,84	29,73 ^{SD}	99,44 ^{SD}	56,67 ^{SD}	61,95
4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	36,04 ^S D	53,14 ^S D	17,45 ^{SD}	35,54	45,41 ^{SD}	120,11 ^S D	20,48 ^{SD}	62,00
RTL1	32,48 ^S D	53,30 ^S D	20,48 ^{SD}	35,42	48,42 ^{SD}	97,49 ^{SD}	29,37 ^{SD}	58,43

Chú thích: Lô đất 1: Đất không nhiễm bệnh, Lô đất 2: Nhiễm VK chủng TLa Dương, Lô đất 3: Nhiễm 3 chủng bệnh

SD: Thí nghiệm hiệu quả hơn đối chứng với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

Bảng 20. Chiều cao & trọng lượng trung bình của cà chua trồng chậu vại chứa đất nhiễm hỗn hợp 3 chủng VK héo xanh được sử dụng các chế phẩm vi sinh vật(thí nghiệm vụ Thu + vụ Đông 2003)

S T T	Mẫu chế phẩm	Cà chua Nhật 40 ngày tuổi (Vụ Thu 2003)		Cà chua T18 sau 105 ngày trồng từ cây non (Vụ Đông 2003)	
		Chiều cao TB/ cây (cm)	Trọng lượng TB/ cây (g)	Chiều cao TB/ cây(cm)	Trọng lượng TB/ cây (g)
1	ĐC	9,120 ± 1,528	6,561 ± 1,455	43,960 ± 2,323	30,251 ± 1,987
2	IIIe + ĐTL2.2 + Bs11+ AN11	12,050 ± 1,297	11,89 ± 1,453	52,784 ± 3,121	84,942 ± 2,412

3	4g + ĐTL2.2 + Bs46 (2) + AN11	11,330 ± 1,135	9,341 ± 1,767	54,710 ± 2,765	51,633 ± 2,542
4	4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	10,363 ± 1,315	8,242 ± 1,654	41,972 ± 2,543	39,081 ± 1,956
5	4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	10,321 ± 1,321	7,421 ± 1,898	51,832 ± 3,245	41,000 ± 1,768

Bảng 21: Tác dụng của các chế phẩm phân vi sinh vật lên sinh trưởng cây cà chua trong chậu vại , nhiễm hỗn hợp 3 chủng vi khuẩn gây bệnh héo xanh

Mẫu phân VSV	Cà chua Nhật 40 ngày tuổi (Vụ Thu 2003)		Cà chua T18 sau 105 ngày trồng từ cây non (Vụ Đông 2003)			
	% tăng cao cây so ĐC	% tăng trọng cây so ĐC	% tăng cao cây so ĐC	% tăng trọng cây so ĐC	Số cây có quả (/20 cây)	Tổng TL quả (g)
IIIc + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11	32,13 ^{SD}	73,63 ^{SD}	20,06 ^{SD}	180,79 ^{SD}	7	475
4g + ĐTL2.2 + Bs46(2) + AN11	24,23 ^{SD}	42,42 ^{SD}	24,45 ^{SD}	70,68 ^{SD}	10	290
4g +						

DTL2.2 + Bs11 + AN11	13,60 ^{SD}	25,57 ^{SD}	-4,94	56,23 ^{SD}	5	208
4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11	13,16 ^{SD}	13,11 ^{SD}	17,90 ^{SD}	35,54 ^{SD}	1	15
ĐC					1	0,5

SD: Thí nghiệm hiệu quả hơn đối chứng với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$

6. Kết quả thử nghiệm phân vi sinh vật trên đồng ruộng.

Các chế phẩm phân vi sinh vật đã được Chi cục Bảo vệ thực vật Hải Dương (do kỹ sư Nguyễn Thị Hồng Nhị chịu trách nhiệm theo dõi) thử nghiệm trên ruộng cà chua, vụ Xuân hè và Vụ Đông năm 2003.

*Vụ Xuân hè năm 2003 đã thử nghiệm chế phẩm phân vi sinh vật có tập hợp chủng: 4g + RTL2.2 + Bs11 + AN11 đối với cà chua trên diện tích 520 m² tại huyện Gia Lộc- Hải Dương. Giống cà chua Trang Nông 129. Ruộng thí nghiệm diện tích 520 m², chia 2 ô. Luống rộng 1,2m; cao 35 cm; trồng 2 hàng/ luống, trồng so le. Trồng cây hàng cách hàng 70 cm; cây cách cây: 40cm. Hồ rế cây non bằng phân vi sinh vật trước khi trồng sao cho đạt khoảng 10⁷ tế bào vi khuẩn có ích/ cây non. Hàng tuần theo dõi các chỉ tiêu : cao cây, số cành, số lá, chùm hoa, chùm quả, số quả và số cây chết vì bệnh héo xanh. Thu năng suất quả thực tế cuối vụ. Đối chứng là các ruộng liên kế..

Sau 9 ngày đã nhận thấy có sự sai khác rõ giữa cây thí nghiệm và đối chứng. Cây thí nghiệm xanh sáng, đường kính cây khoảng 4 cm, mập hơn so với đối chứng (3 cm), lá đứng, rế tơ nhiều hơn so với đối chứng khoảng

30%. Đã tiến hành theo dõi các chỉ tiêu : cao cây, số cành, số lá, số chùm hoa, số quả trung bình 10 cây trên mỗi luống thí nghiệm theo từng tuần tuổi cho đến khi hết thu hoạch quả.

Bảng 22: Tác dụng của phân vi sinh vật lên sinh trưởng và năng suất cà chua trên đồng ruộng Gia Xuyên- Gia Lộc- Hải Dương

(Vụ Xuân hè 2003)

Chỉ tiêu trung bình	Ruộng thí nghiệm	Ruộng đối chứng
- Tỷ lệ cây bị héo xanh (%)	0,25	0,61
- Số chùm quả / cây	6,0	5,5
- Số quả / cây	20,5	19,1
- Trọng lượng 1 quả (gam)	77	67
- Năng suất lý thuyết (tấn / ha)	48,0	38,6
- Năng suất thực thụ (tấn / ha)	37,6	28,2

Giống cà chua Trang Nông 129, là giống đã được lựa chọn ít bị bệnh héo xanh, vì vậy tỷ lệ bị bệnh của cả ruộng thí nghiệm lẫn ruộng đối chứng rất thấp. Tuy vậy ruộng thí nghiệm vẫn giảm rõ số cây héo xanh so với ruộng không dùng chế phẩm phân VSV. Điều đáng chú ý là phân vi sinh vật nhiễm

vào rễ cà chua đã làm tăng năng suất và ngoại hình quả rõ rệt. Năng suất lý thuyết đã tăng 24, 35% và năng suất thực thụ đã tăng 33,33% so với đối chứng.

*Vụ Đông năm 2003 đã tiến hành thí nghiệm trên giống cà chua VN2000 của Mỹ, tại Hưng Đạo- Tứ Kỳ- Hải Dương, dùng 2 chế phẩm : CC1 và CC3. Phân vi sinh CC1 là tập hợp chủng : Ille + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11 và CC3 là tập hợp chủng: 4g + ĐTL2.2 + Bs11 + AN11. Mỗi ruộng thí nghiệm có diện tích 360 m² (chia làm 8 luống), đối chứng 2 luống. Chế phẩm CC1 trộn lẫn với phân rác ủ mục và bón vào gốc lúc trồng cây. Còn chế phẩm CC3 thì hồ trực tiếp phân vi sinh vật vào rễ cây trước khi trồng. Kết quả cả 2 ruộng thí nghiệm đều cho nhận xét như sau:

Bảng 23: Tác dụng của phân vi sinh vật lên sinh trưởng cà chua trên đồng ruộng Hưng Đạo- Tứ Kỳ- Hải Dương (Vụ Đông 2003)

Ruộng bón phân VSV.	Đối chứng
- Cây nhanh hồi xanh	-Cây lâu hồi xanh.
-Thân cây mập hơn	-Thân cây nhỏ.
-Lá màu xanh sáng, bóng.	-Lá xanh đen xỉn.
-Cây phân cành sớm.	-Phân cành muộn
-Hoa nở đều.	-Hoa nở lai rai.
-Đài hoa to hơn.	-Đài hoa nhỏ hơn
-Tỷ lệ đậu quả cao hơn từ 7% - 10%	-Tỷ lệ đậu quả kém



**Hình 9: Thí nghiệm đồng ruộng tại Gia Xuyên - Gia Lộc
Hải Dương 2003**



**Hình 9: Thí nghiệm đồng ruộng tại Gia Xuyên - Gia Lộc
Hải Dương 2003**

Cán bộ thực hiện thí nghiệm cho nhận xét là chế phẩm số 3 tốt hơn CC1 vì cây phát triển khoẻ hơn và đều hơn. Nhưng chúng tôi nghĩ đó là kết quả của việc hồ trực tiếp vào rễ cây non trước khi trồng sẽ cho hiệu quả tốt hơn là trộn vào phân ủ.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đề tài nhánh đã thực hiện nghiêm chỉnh nội dung của hợp đồng với Chủ nhiệm đề tài KHCN.04.04 :

-Đã đóng góp cho đề tài 20 chủng vi sinh vật có hoạt tính tốt. Một số chủng đã được đưa vào sử dụng trong quy trình công nghệ sản xuất phân vi sinh đa chủng, đa chức năng cho một số cây nông, lâm nghiệp có hiệu quả.

-Hiện nay đã hoàn thiện quy trình sản xuất ổn định chế phẩm phân vi sinh vật đa chủng, chức năng cho cà chua. Các chế phẩm đảm bảo mật độ vi sinh vật và hoạt tính của VSV theo TCVN - 2002 trong 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ trong phòng.

-Phân vi sinh vật đã được thử nghiệm tác dụng lên 3 giống cà chua Hà Lan HN 512- F1, Nhật VL- 805- F1, T18 (Viện Di truyền NNVN) trong điều kiện chậu vại chứa đất nhiễm tập hợp 3 chủng vi khuẩn gây héo xanh cho kết quả tốt. Các chế phẩm phân vi sinh vật tăng khả năng chống chịu bệnh héo xanh rõ. Các chậu đối chứng chỉ sống sót từ 20% đến 40% , trong khi các chậu có sử dụng phân bón vi sinh vật đã tăng số lượng cây sống lên từ 41% đến 95%. Đồng thời tăng sinh trưởng cây, tăng sinh khối cây từ 19,96% tới 180,9% tùy thời vụ và giống cây, loại phân VSV.

- Thí nghiệm 2 vụ Xuân hè và Đông năm 2003 trên 2 giống cà chua Trang Nông 129 và VN 2000 (Mỹ) tại đồng ruộng Hải Dương cho kết quả phù hợp với thí nghiệm trong chậu vại. Hồ rễ cà chua hoặc trộn vào phân hữu cơ bón gốc cây đã làm cà chua bén rễ nhanh, tăng sinh trưởng cây và năng

suất quả trên 24%. Ngoài ra, nông dân ở Hải Dương đã sử dụng thử chế phẩm này cho cà chua với diện tích 3 ha đều cho kết quả tốt.

- Đề nghị Ban Chủ nhiệm đề tài có thể maketing giúp cho đề tài nhánh triển khai sản phẩm trên diện rộng trong thời gian tiếp theo.

Phụ lục

BẢN TỰ ĐÁNH GIÁ VỀ TÌNH HÌNH THỰC HIỆN VÀ NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA NHÁNH ĐỀ TÀI

- 1. Tên nhánh đề tài:** Phòng Vi sinh vật Đất- Viện Công nghệ Sinh học
- 2. Chủ nhiệm nhánh đề tài:** NCVC. TS. Nguyễn Thị Phương Chi
- 3. Cơ quan chủ trì nhánh đề tài:** Viện Công nghệ Sinh học- VKH&CNVN
- 4. Thời gian thực hiện:** từ 1/ 10 / 2001 đến 31/ 12/ 2003 (theo 3 Hợp đồng)
- 5. Tổng kinh phí :** 265.000.000đ (hai trăm sáu mươi lăm triệu đồng chẵn)
Trong đó kinh phí từ NSNN ; 265 triệu đồng.

6. Tình hình thực hiện nhánh đề tài so với hợp đồng

6.1. Về mức độ hoàn thành công việc: Đề tài đã hoàn thành vượt mức yêu cầu trong các hợp đồng. Chúng tôi đã hoàn thiện qui trình sản xuất phân VSV đa chủng đa chức năng quy mô pilot, công suất có thể đáp ứng cho khoảng 25 ha cây trồng/ ngày. Chế phẩm đã thử nghiệm trên diện rộng hàng chục ha cho cà chua và bắp cải, dưa hấu tại Hải Dương.

6.2. Về các yêu cầu khoa học và chỉ tiêu cơ bản của các sản phẩm KHCN:

- Các chủng giống đóng góp cho đề tài có hoạt tính tốt. Do đó đã được sử dụng có kết quả trong các chế phẩm phân VSV của các đề tài nhánh khác (theo báo cáo của chủ nhiệm đề tài tại Hội nghị CNSH toàn quốc lần 2 năm 2003 tại Hà Nội, báo cáo số 1.O.13, tr. 127- 131)

- Các chế phẩm phân VSV đa chủng đa chức năng cho cây cà chua trên nền chất mang thanh trùng đạt yêu cầu theo TCVN- 2002, bảo quản hơn 3 tháng trong nhiệt độ trong phòng.

6.3. Về tiến độ thực hiện : Thực hiện theo đúng tiến độ của các hợp đồng do Chủ nhiệm đề tài giao.

7. Về những đóng góp mới của nhánh đề tài:

Trên cơ sở so sánh với những thông tin đã được công bố trên các ấn phẩm trong và ngoài nước đến thời điểm kết thúc nhánh đề tài, nhánh đề tài có những điểm mới sau:

7.1. Về giải pháp KH&CN: Công nghệ thích ứng để sản xuất phân VSV đa chức năng cho cà chua bằng lên men VSV trên môi trường xốp với cơ chất chủ yếu là than bùn vô trùng.

7.2. Về phương pháp nghiên cứu: Dựa trên những kết quả nghiên cứu sâu về các đặc điểm sinh học của các chủng VSV (bằng các phương pháp VSV học thông thường và hiện đại) nên đã có cơ sở khoa học cơ bản để bảo

quản giống, xây dựng môi trường nhân giống, môi trường lên men xốp. Nhờ vậy quy trình sản xuất ổn định và giá thành hạ.

7.3. Những đóng góp mới khác: -Chọn lựa được các chủng thích hợp để tạo các hỗn hợp chủng từ các chủng phân lập tại VN để làm chủng sản trong công nghệ sản xuất phân VSV đa chủng, đa chức năng cho cây cà chua. Bằng các phương pháp phân loại VSV theo API 20E , 20 API NE và phương pháp đọc trình tự gen 16S- rARN của các chủng đã phân loại các chủng được sử dụng, đồng thời cũng nhận thấy các chủng phân lập tại VN có nhiều đặc điểm quý không hoàn toàn trùng với các đặc điểm của các chủng điển hình của các loài, hy vọng nghiên cứu sâu hơn nữa sẽ thuộc những loài mới.

-Trong số các chủng được dùng, có một số chủng có đồng thời nhiều hoạt tính quý. Thí dụ chủng IIIe có các khả năng: cố định nitơ hội sinh, sinh AIA, phân giải photphat khó tan, kháng 3 loại nấm *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp. Các chủng RTL1, ĐTL2.2; ĐTL2.2 vừa có khả năng hoà tan photphat, lại có khả năng đối kháng chủng gây bệnh héo xanh, đối kháng 3 loại nấm hại cây nêu ở trên.

8. Kết quả đào tạo: 3 học viên đang làm luận án thạc sĩ.

1 nghiên cứu sinh đã bảo vệ luận án tiến sĩ (xuất sắc):

Tên luận án: “Nghiên cứu, lựa chọn và xác định đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải photphat khó tan”

CHỦ NHIỆM NHÁNH ĐỀ TÀI



TS. Nguyễn Thị Phương Chi

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
PHÒNG VI SINH VẬT PHÂN TỬ

BÁO CÁO KHOA HỌC ĐỀ TÀI NHÁNH

Tên đề tài nhánh:

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT
ĐA CHỨC NĂNG CHO CÂY CÔNG NGHIỆP
(CÀ PHÊ, BÔNG) Ở QUY MÔ PILOT**

Chủ trì: TS. Phạm Việt Cường
Thuộc đề tài, mã số: KC 04-04

Hà Nội - 2004

I. TỔNG QUAN

Tây nguyên là vùng sinh thái có khí hậu và đất đai rất phù hợp cho cây công nghiệp, đặc biệt là cây cà phê, cây bông vải. Trong thập niên qua cây cà phê phát triển mạnh, là cây hàng hoá xuất khẩu đứng thứ 2 sau lúa gạo với diện tích đã lên tới 350.000 ha. Cây bông vải đã trở thành cây công nghiệp quan trọng, được trồng khắp nơi, đặc biệt ở vùng duyên hải Miền Trung, Tây Nguyên và vùng núi phía Bắc. Cây bông càng ngày càng khẳng định vai trò quan trọng của mình trong sự phát triển kinh tế xã hội của đất nước. Diện tích trồng bông cả nước đang có khoảng 27.000 ha và mở rộng đến năm 2005 là 115.000 ha và năm 2010 là 230.000 ha. Những nghiên cứu về phân bón cho cây cà phê và cây bông đã được thực hiện trong những năm gần đây, nhưng chỉ tập trung vào các yếu tố đa và trung lượng, việc nghiên cứu chế phẩm phân bón VSV đa chủng chức năng cho loại cây trồng nói chung cũng như cho cây bông vải và cây cà phê nói riêng mới bắt đầu. Với nhiệm vụ của đề tài KC 04-04 chúng tôi tiến hành xây dựng công nghệ sản xuất phân bón VS đa chủng chức năng cho hai loại cây trồng trên với các chủng VSV đối kháng, cố định đạm, sinh tổng hợp IAA và phân giải lân phù hợp với vùng sinh thái của chúng.

1.1 Vi sinh đối kháng

Hàng loạt các loại bệnh ở cây trồng đều bắt nguồn từ vi sinh vật, điển hình như các loại bệnh héo vàng và héo xanh ở khoai tây, cà chua, do vi khuẩn, nấm gây ra. Trong số 24 bệnh lúa ở Việt Nam, có tới 13 bệnh có nguồn gốc từ nấm, chủ yếu là bệnh đạo ôn (*Pyricularia grisea*), khô vằn (*Rhizoctonia solani*) và thối thân, thối rễ (*Fusarium oxysporum*). Bệnh do nấm *Fusarium oxysporum* gây thiệt hại nặng nề cho cây trồng, chiếm tới 83% (theo OU, 1972). Đặc biệt *Fusarium oxysporum* gây bệnh vàng lá thối rễ cho cây cà phê và cây bông ở Tây nguyên và vùng duyên hải miền Trung.

Thế kỷ 21, khoa học kỹ thuật và công nghiệp hiện đại phát triển nhanh chóng, máy móc, phân hoá học, thuốc trừ cỏ được sử dụng với số lượng lớn trong sản xuất nông nghiệp đã nâng cao năng suất cây trồng, nhưng đồng thời cũng gây ô nhiễm môi trường, đất đai bạc màu, làm chết các sinh vật có ích, làm tăng khả năng kháng thuốc của sinh vật gây hại, kết quả là việc sản xuất nông nghiệp rơi vào tình trạng khó khăn.

Để giảm tới mức thấp nhất hậu quả xấu do phương pháp hoá học mang lại, đồng thời làm tăng hiệu quả kiểm soát, dẫn tới tiêu diệt bệnh do nấm gây ra cho cây trồng, các nhà khoa học đang chú ý đến nguồn tài nguyên vi sinh vật có ích trong việc bảo vệ môi trường sinh thái. Phương pháp sử dụng vi sinh vật trong bảo vệ môi trường không những mang lại hiệu quả cao, an toàn, sản phẩm thu hoạch không ảnh hưởng tới người sử dụng, có lợi cho cân bằng sinh thái, mà còn giảm phần lớn lượng thuốc hoá học sử dụng. Việt nam là một nước nằm trong khu vực có khí hậu nhiệt đới gió mùa, với đặc trưng khí hậu nóng ẩm, lượng mưa hàng năm lớn, là điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật mà điển hình là nấm bùng phát, gây hại cho cây trồng, dẫn đến tổn thất lớn cho sản xuất nông nghiệp. Mỗi năm chi phí trong việc phòng, trừ bệnh cây là rất cao mà phần lớn là sử dụng thuốc hoá học. Trên thực tế phương pháp này có hiệu quả tức thời nhưng nếu sử dụng lâu dài sẽ dẫn đến tình trạng thoái hoá đất và kháng thuốc của các nguồn bệnh. Vì vậy, biện pháp sử dụng vi sinh vật đối kháng sẽ là một trong những giải pháp thiết thực để có một nền sản xuất nông nghiệp bền vững. Việc phân lập, tuyển chọn và định loại các vi sinh vật này là mục tiêu quan trọng đầu tiên khi muốn sử dụng chúng trong thực tế.

Chi *Fusarium* bao gồm trên 20 loài, trong đó loài *Fusarium oxysporum* là loài phổ biến và cũng là loài gây bệnh nguy hiểm ở thực vật, trong số các loại bệnh cây thì bệnh do nấm chiếm tới 83 %, *Fusarium oxysporum* gây ra hiện tượng tắc mạch dẫn của cây và cũng là nguyên nhân trực tiếp của bệnh thối thân, thối rễ ở một số cây rau quả, cây lương thực và cây công nghiệp như : Cà chua, khoai tây, bông, hồ tiêu, cà phê... bệnh ít khi xuất hiện sớm mà thường gây hại mạnh nhất vào giữa giai đoạn sinh trưởng của cây. Do đặc điểm và tính chất gây bệnh nguy hiểm của *Fusarium oxysporum* nên rất khó kiểm soát và tiêu diệt bằng phương pháp đơn lẻ mà chỉ có thể kết hợp một số biện pháp để kiểm soát được bệnh, tuy nhiên biện pháp này có hiệu quả ngay tức thời nhưng lại có nhiều nhược điểm đó là kích thích sự kháng thuốc của tác nhân gây bệnh.

Biện pháp hữu hiệu để phòng trừ các bệnh do nấm gây ra là việc sử dụng các chủng vi sinh vật có khả năng ngăn cản hoặc tiêu diệt chúng. Đây là biện pháp góp phần thay thế các phương pháp hoá học trong kiểm soát bệnh cây trồng, việc sử dụng vi sinh vật đối kháng để hạn chế và loại trừ nấm gây bệnh ngày càng được nhiều nước trên thế giới sử dụng rộng rãi, ở Việt nam

hiện nay cũng đã có một số các nhà khoa học đã và đang tập trung khai thác khả năng tiềm tàng của các yếu tố tự nhiên này. Một số chủng vi sinh vật trong tự nhiên có khả năng sinh tổng hợp enzym 2,4 - diacetylphloroglucinol. Enzym này có tác dụng tiêu diệt và ngăn cản sự phát triển của *Fusarium oxysporum*. Ngoài khả năng sinh enzym vi sinh vật còn có khả năng tiết một số chất kích thích sinh trưởng như IAA, phân giải lân khó tan, cố định đạm.....có tác dụng kích thích cây trồng phát triển tăng năng suất, bổ xung các yếu tố vi lượng đa lượng, các chất dinh dưỡng cho cây trồng điều này đã được chứng minh thông qua các thí nghiệm với nấm *Fusarium oxysporum* khi lây nhiễm chúng trên cây trồng, sau đó được sử lý bằng vi sinh vật đối kháng.

2.2 Vi sinh vật sinh tổng hợp IAA.

Thực vật sử dụng một số hoocmon để điều chỉnh quá trình sinh trưởng và phát triển của mình, trong đó nhóm hoocmon gọi là auxin nội sinh được tìm thấy hầu hết ở các loài. Một trong những auxin phổ biến nhất là axit indol axetic (IAA). Bên cạnh thực vật, nhiều vi sinh vật đặc biệt là các vi sinh vật đất và vùng rễ thực vật bao gồm các vi khuẩn biểu sinh, vi khuẩn gây bệnh cho thực vật và vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật cũng có khả năng sinh tổng hợp IAA. Ở mỗi loại vi khuẩn tồn tại các con đường sinh tổng hợp IAA khác nhau.

Việc nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp IAA của vi sinh vật rất có ý nghĩa trong việc phát triển một nền nông nghiệp bền vững. Các chủng vi khuẩn sinh IAA thường được đưa vào phân bón vi sinh để phục vụ sản xuất nông nghiệp. Sử dụng các vi khuẩn không gây bệnh và có khả năng sinh tổng hợp auxin có tác dụng kích thích sinh trưởng cho cây trồng đặc biệt có ý nghĩa trong việc tạo rễ.

2.3 Vi sinh phân giải photphat khó tan

Photpho trong đất thường ở dạng liên kết hữu cơ như phytin và các dẫn xuất của nó, có độ hoà tan và chuyển động thấp. Phần lớn phân photphát vô cơ bón vào đất nhanh chóng bị cố định, tạo thành dạng không tan và cây không sử dụng được. Lượng photphát không tan thông thường chiếm 95-99%

photphát tổng số, vì vậy việc giải phóng dạng photphát khó tan (hữu cơ hoặc vô cơ) và bị cố định là một hướng quan trọng để tăng lượng photpho dễ sử dụng trong đất. Rất nhiều vi sinh vật đất có khả năng chuyển hoá cả photpho vô cơ và hữu cơ thành dạng hoà tan, tạo nguồn dinh dưỡng quý giá cho cây trồng. Trên thế giới cũng như ở Việt nam đã có một số nghiên cứu về vi sinh vật phân giải photphát vô cơ khó tan và ảnh hưởng của chúng đối với cây trồng. Các nghiên cứu cho thấy axit hữu cơ được vi sinh vật tiết ra môi trường là tác nhân chủ yếu phân giải photphat khó tan. Ngoài ra, một số vi sinh vật phân giải photphát khó tan nhờ sinh ra CO_2 , H_2S , axit khoáng hoặc các axit chelating oxo từ đường....

Trong những năm gần đây, vi sinh vật phân giải photphát khó tan đã được sử dụng để sản xuất phân bón vi sinh. Nhằm tuyển chọn được các chủng vi khuẩn có hoạt tính cao, không độc đồng thời có khả năng sinh tổng hợp IAA, chúng tôi đã phân lập từ các mẫu đất, rễ cây khác nhau các chủng vi khuẩn phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ có tiềm năng sử dụng trong thực tế.

2.4 Vi sinh cố định đạm

Có rất nhiều loại vi khuẩn có ích được tìm thấy ở vùng rễ, trên rễ và thân của lúa, lúa mì, ngô, mía và các loại cây hoà thảo khác. Sự quan tâm đến các loại vi khuẩn vùng rễ thời gian gần đây tăng mạnh do khả năng sử dụng chúng như một loại phân sinh học. Một số tác giả cho rằng hiệu ứng kích thích sự phát triển cây là do quá trình cố định nitơ sinh học và sự tạo phytohormon, làm cho rễ cây phát triển, như vậy quá trình hấp thụ nước và các chất dinh dưỡng có hiệu quả và kết quả là sự phát triển của cây tốt hơn. Vi khuẩn cố định nitơ sống tự do thuộc các chi *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Enterobacter* và *Herbaspirillum* thường sống ở vùng rễ của các cây trồng.

Các loại cây trồng đều đòi hỏi một lượng phân đầy đủ và cân đối cho sự sinh trưởng và phát triển và phân hoá học đã đáp ứng được yêu cầu đó. Các loại phân bón sử dụng trong nông nghiệp gồm có các nguyên tố nitơ và photpho, nói chung nguồn dinh dưỡng này được phân bố trong đất trồng

nhưng cây khó hấp thụ nếu không có sự tham gia của vi sinh vật đất. Mặt khác, giá của phân hoá học tương đối cao và khi được sử dụng lâu dài chúng sẽ gây thoái hoá đất trồng. Vì vậy, các nhà khoa học và đặc biệt là các nhà công nghệ sinh học trong khi cố gắng giảm giá thành phân bón, đã sử dụng các chi vi khuẩn khác nhau được phân lập từ đất ở dạng phân sinh học để giảm lượng phân hoá học, cải thiện và tăng độ phì nhiêu của đất. Trong thời gian gần đây ở nước ta, phân bón vi sinh cố định đạm đã dần được sử dụng một phần nào thay thế cho phân bón hoá học- một trong những tác nhân gây ô nhiễm môi trường. Điều này đã cải thiện đáng kể môi trường đất và tăng năng suất cây trồng.

Để thực hiện đề tài chúng tôi đã phân lập, tuyển chọn, xác định tính chất, đọc trình tự gen 16S ARN riboxom để định loại đến loài của một số chủng vi sinh vật có khả năng kháng *Fusarium oxysporum*, cố định N₂, phân giải lân và sinh tổng hợp IAA phù hợp với vùng sinh thái cho hai loại cây trồng là cà phê và bông. Nghiên cứu hoạt tính, quy trình công nghệ, tạo chế phẩm và đánh giá hiệu lực lên hai đối tượng cây trồng trên.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. *Vi sinh vật*: Các chủng vi sinh vật đã được phân lập từ đất trồng ở khu vực Hà Nội, Tây nguyên, Ninh thuận và nhận từ viện BVTV, VKHNNVN

2.1.2. *Các môi trường phân lập*:

- Đối với vi sinh phân giải lân: MT Geretsen(g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:0,5; NaCl: 0,2; Glucoza: 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5; Vi lượng: 1 ml; aga: 18. PH: 7-7,2.
- Đối với vi sinh cố định đạm: MT Ashby(g/l): Glucoza: 20; K_2HPO_4 : 0,5; MgSO_4 : 0,2; FeSO_4 : 1 ml (dung dịch 1%); CaCO_3 : 5; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1 ml (dung dịch %); Vi lượng: 1ml; aga:18. pH 7,6-8.
- Hoạt tính kháng nấm được xác định in vitro trên môi trường thạch Waksman (WA : pepton-5g; glucoza-10g; cao thịt-3g; NaCl-5g; thạch-20g; nước cất-1lít).

• *Các môi trường và dung dịch khác*

2.1.3 *Môi trường*

- Môi trường LB (g/l): Trypton: 10; NaCl: 5; Cao nấm men: 10. pH 7,4. Môi trường đặc thêm 18g aga.
- Dung dịch vi lượng (g/l): H_3BO_3 : 5; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$: 5, KS: 0,5; NaBr: 0,5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: 0,3.
- Môi trường MPB: Pepton (g/l): 10, NaCl: 5; Cao thịt: 5; pH: 7.
- Môi trường OF aga (g/l): NaCl:5; K_2HPO_4 : 3; Bromothymol blue: 0,03; Trypton: 2; Glucoza: 1(bổ sung sau); aga:9; pH 7.
- Môi trường Simmon's xitrat aga (g/l): MgSO_4 : 0,2; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{SO}_4$: 1; K_2HPO_4 : 1, Natri xitrat: 2; NaCl: 5; Bromothymol blue: 0,03; Aga: 18; pH 7
- Môi trường casein aga (g/l): Cao thịt: 3, trypton: 5; casein: 10; aga: 18. pH 7
- Môi trường tinh bột aga (g/l): trypton: 10; cao men: 10; K_2HPO_4 : 5; tinh bột tan: 3; aga: 18; pH7.

- Môi trường gelatin (g/l): Cao thịt: 3, trypton: 5, gelatin: 40; pH 7.
- Môi trường tối thiểu (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:2; K_2HPO_4 :14; KH_2PO_4 : 6; natri xitrat: 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; 10 ml MnCl_2 0,001 M (Khử trùng riêng); aga: 18; pH 7
- Môi trường khử nitrat (g/l): Casitone: 10 ; cao men: 3; Kali nitrat: 2; pH 7,1.
- Môi trường MS dùng nuôi cấy in vitro.

Các môi trường đều được khử trùng ở 0,8 atm trong 30 phút.

2.1.4. Dung dịch

- Dung dịch dùng trong tách ADN tổng số: Đệm TE pH8 (Tris-Cl: 10mM, pH8; EDTA 1 mM pH8). SDS: 10%. NaCl 5M. CTAB/ NaCl (CTAB: 10%; NaCl 0,7M. Hoà 4,1g NaCl trong 80 ml H_2O và thêm từ từ 10g CTAB trong khi vừa đun vừa khuấy. Dẫn H_2O đến 100 ml. Phenol: chloroform: isoamyl alcohol 25:24:1. chloroform: isoamyl alcohol 24:1). Cồn tuyệt đối. Cồn 70%. Natri axetat 3M pH 5,2.
- Dung dịch dùng trong tách ADN plasmit: Đệm TE-ARNaza pH8 (1ml đệm TE + 10 μl ARN-aza 2%). Sol I (glucoza: 50mM; Tris-Cl pH8: 25mM; EDTA pH8: 10mM. Khử trùng dung dịch ở 0,5 atm trong 15 phút, giữ lạnh). Sol II (NaOH: 0,2 N; SDS: 1%. Pha mới trước khi sử dụng). Sol III (Kali axetat 5M: 60ml; axit axetic: 11,5ml; H_2O : 28,5ml). Chloroform: isoamyl alcohol 24:1. Cồn tuyệt đối. Cồn 70%. Natri axetat 3M pH7.
- Dung dịch dùng trong phản ứng Salkowski's: Thuốc thử Salkowski's (150 ml H_2SO_4 đặc, 7,5 ml FeCl_3 , 250 ml H_2O).
- Dung dịch dùng trong nhuộm gram: Dung dịch tím kết tinh: Hoà 1 thể tích tím kết tinh (20g/100 ml cồn) trong 4 thể tích amonium oxalat 1%, đun nhẹ đến khi tan, lọc. Dung dịch Lugol (g): Iốt tinh thể: 1 (nghiên trước trong cối xú); KI: 2; H_2O : 100 ml. Dung dịch Safranin: Hoà 100 ml safranin (2,5 g/100 ml cồn) trong 1 lit nước.

- Các dung dịch đường 20%: Glucoza, Saccaroza, Xycloza, Manitol, Lactoza.

- Dung dịch Tryptophan 1%.

- Dung dịch Trommsdorf's: thêm từ từ và khuấy đều liên tục 100 ml $ZnCl_2$ 20% đun sôi vào 150 ml H_2O chứa 4 g tinh bột, tiếp tục đun nóng cho đến khi tinh bột tan.

2.1.5. Cặp môi 16S ARN riboxom được thiết kế dựa trên trình tự bảo thủ của đoạn gen 16S ARN riboxom ở E.coli có trình tự như sau:

Primer 1: AGAGTTTGAT CATGGCTCA

Primer 2: AAGGAGGTGA TCCAGCC

2.1.6. Bộ TA cloning kit của hãng Invitrogen.

Bộ kit gồm các thành phần dùng cho quá trình tách dòng: vectơ TM đã mở vòng có đầu dính timin, enzym ligaza, đệm cho ligaza, tế bào khả biến DH5 α chủng TOF10F, môi trường SOC.

2.1.4. Bộ kit tinh sạch ADN plasmid của hãng QIAGEN: Gồm đệm P1, đệm P2, đệm N3, đệm PB, đệm PE đệm EB, ARN-aza, ống thu mẫu.

2.2 Phương pháp

2.2.1 - Phương pháp phân lập bằng môi trường đặc hiệu.

2.2.2 - Phương pháp đánh giá các đặc điểm sinh hóa bằng kit, kính hiển vi và các loại thuốc thử.

2.2.3 - Phương pháp đo hoạt tính khử axetylen trên máy sắc ký khí Chromatopac C-R3A, để xác định khả năng sinh tổng hợp N

2.2.4 - Phương pháp xác định IAA theo Salkowski's

2.2.5 - Phương pháp điện di ADN

2.2.6 - Phương pháp phân loại học phân tử bằng giải trình tự gen 16S ARN ribosom, 18S ARN ribosom và so sánh theo chương trình phần mềm Fasta

2.2.7 - Phương pháp đánh giá in vitro đối với cây trồng

2.2.8 - Phương pháp đánh giá khảo nghiệm ngoài đồng ruộng với cây cà phê và cây bông.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Phân lập các chủng vi sinh vật

3.1.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân huỷ P khó tan

Đã phân lập được 80 chủng vi khuẩn từ nhiều mẫu đất khác nhau có khả năng phân giải P khó tan trên môi trường Geretsen, trong đó 24 chủng có vòng phân giải từ 11-24mm (chiếm 30%), 34 chủng có vòng phân giải từ 6-10mm (chiếm 42,5%) và 22 chủng có vòng phân giải ≤ 5 mm (chiếm 27,5%). Một số tính chất của các chủng phân lập được trên bảng 1. Một số tính chất của 24 chủng có hoạt tính cao đã được nghiên cứu. Trong số các chủng này, 10 chủng có Gram (+), số còn lại Gram (-), tế bào hình que ngắn hoặc dài, đứng đơn hoặc đôi. Tất cả các chủng nghiên cứu đều có catalaza dương tính và không có hoạt tính CMC-aza, proteaza. Đã sơ bộ định loại 3 chủng (Ge12, Ge23, Ge71) thuộc chi *Pseudomonas*, 2 chủng (Ge16, Ge 67) thuộc chi *Bacillus* và 1 chủng (Ge39) thuộc chi *Achromobacter*.

3.1.2 Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định N_2 tự do và sinh tổng hợp IAA

Từ các mẫu đất khác nhau đã tuyển chọn được 25 chủng vi khuẩn có hoạt tính cố định N_2 trên môi trường Ashby. Đã nghiên cứu các tính chất sinh lý, sinh hoá của các chủng phân lập được và xác định hoạt tính của chúng theo phương pháp sắc ký khí khả năng khử axetylen thành etylen của hệ enzym nitrogenaza của vi khuẩn. Kết quả nhận được cho thấy trong số 21 chủng nghiên cứu 10 chủng có Gram (+) và 11 chủng có Gram (-). Tế bào của các chủng phân lập rất đa dạng: hình que, hình cầu hoặc elip. Hoạt tính nitrogenaza của 5 chủng nghiên cứu dao động trong khoảng 1,5 đến 2,5 μM C_2H_4 /ml.giờ. Đã định loại 3 chủng (as2, as 7, as 10) đến chi *azotobacter* và 2 chủng (as 5, as 12) đến chi *Bacillus*. Hai chủng trong nhóm có khả năng cố định đạm as4(*Pseudomonas nitroreducens*), và as10 có khả năng sinh tổng hợp IAA trong môi trường có bổ sung Tryptophan.

3.1.3 Tuyển chọn chủng đối kháng với *Fusarium oxysporum* và *Ralstonia solanacearum*.

Để xác định khả năng kháng nấm của các chủng vi nấm, chúng tôi sử dụng phương pháp cấy vạch vuông góc. Khả năng kháng nấm của các chủng vi khuẩn được đánh giá sau khi chủng vi khuẩn và nấm được cấy trên cùng môi trường và sau 7 ngày quan sát sự phát triển khuẩn ty của nấm. Đã chọn được hai chủng nấm kháng *F. oxysporum* gây bệnh thối rễ cà phê và tiêu, phân lập từ đất rễ cây cà phê ở Đắk Lắk và sơ bộ định loại đến chi *Gliocladium* và *Trichoderma*, hai chủng vi nấm khác (*Metarhizium* và *Beauveria*) có khả năng diệt côn trùng và mối. Ngoài ra đã chọn được 2 chủng vi khuẩn kháng tốt *F. oxysporum* và *Ralstonia solanacearum* (thuộc chi *Bacillus*), 8 chủng

khác có hoạt tính kháng nhưng yếu hơn. Cơ chế kháng nấm của các chủng rất khác nhau, có chủng ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm nhưng cũng có chủng làm gãy các khuẩn ty khí sinh của nấm gây bệnh. (Các chủng nấm và vi khuẩn gây bệnh nhận được từ viện Bảo vệ thực vật, Hà nội và phân lập tại vùng rễ cây bông và cà phê bị bệnh tại Tây nguyên.)

Từ mẫu đất Hương sơn, Hoà Bình, đã phân lập được chủng xạ khuẩn *Streptomyces nigriscesus* có khả năng kháng nấm gây bệnh ở thực vật như *Fusarium oxysporum*, vi khuẩn G(+), G(-) như *Ralstonia solanacearum* và phân giải tinh bột mạnh. Chủng *Streptomyces hygroscopicus* có hoạt tính kháng *Fusarium oxysporum* đã được phân lập từ mẫu đất Tây nguyên.

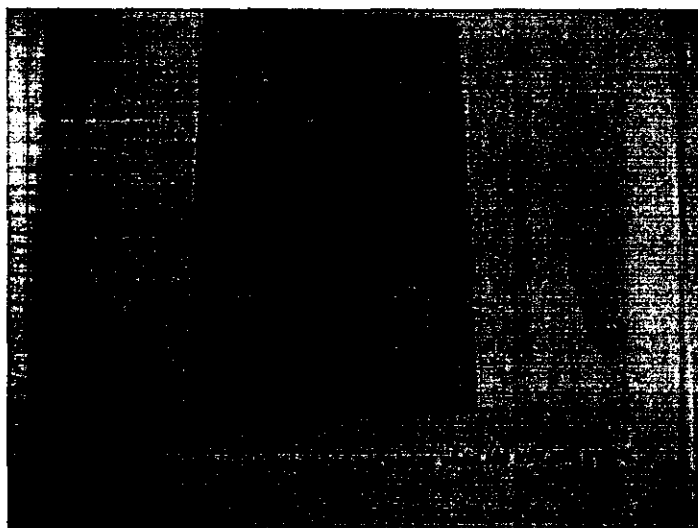
3.2. Các đặc tính của các chủng phân lập

3.2.1 Vi sinh phân giải lân

Bảng 1 :Đặc điểm của một số chủng có hoạt tính phân giải photpho khó tan.

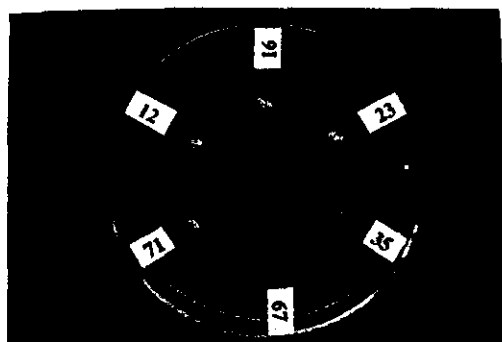
Số TT	Chủng	vòng phân giảimm	lượng P_2O_5 hoà tan $\mu g/ml$	Gram	catalaza	CĐ
1	Ge 5	12	42,2	-, que dài, đơn, đôi	+	+
2	Ge 6	12	44,3	-, que dài, đơn, đôi	+	+
3	Ge 9	16	42,3	-, que dài, đơn, đôi, chuỗi	+	+
4	Ge 11	14	36,1	-, que dài, đơn, đôi	+	+
5	Ge 12	19	46,2	-, que dài, đơn, đôi	+	+
6	Ge 13	16	48,5	-, que dài, đơn, đôi	+	+
7	Ge 14	14	50,5	-, que dài, đơn, đôi	+	+
8	Ge 15	12	48,7	+, que dài, đơn, đôi, chuỗi	+	±
9	Ge 16	19	52	-, que dài, đơn, đôi	+	±
10	Ge 17	12	41,5	-, que dài, đơn, đôi	+	+
11	Ge 18	11	42,1	-, que dài, đơn, đôi	+	+
12	Ge 23	24	46,3	-, que, đơn	+	±
13	Ge 25	11	32,4	-, que dài, đơn, đôi	+	±
14	Ge 31	12	30,2	-, que dài, đơn, đôi	+	±
15	Ge 35	13	38,5	+, que ngắn, đơn, đôi	+	±
16	Ge 39	18	38,2	+, que ngắn, đơn, đôi	+	+
17	Ge 40	12	32,3	-, que ngắn	+	-
18	Ge 42	13	30,7	-, que dài, đơn, đôi	+	+
19	Ge 47	11	30,9	+, ô van, chùm	+	±
20	Ge 49	11	38	+, que dài, đơn, đôi	+	+
21	Ge 66	15	34,5	+, que dài, đơn, đôi	+	-
22	Ge 67	18	44,5	-, que dài, đơn, đôi	+	+
23	Ge 71	20	40,5	+, que đơn	+	±
24	Ge 75	13	30,5	+, que	+	±

ĐC : 24,2



Ảnh 1: Lượng P tan trong MT lỏng được xác định sau 5 ngày nuôi cấy.

không dương tính và không có hoạt tính CMC-aza, proteaza.



Ảnh 1 : Vòng phân giải phosphat của các chủng phân lập trên môi trường Geretsen đặc.

Ảnh 2 : Vòng phân giải của các chủng phân lập trên môi trường Geretsen

3.2.2 Chủng vi khuẩn cố định N_2 tự do

Bảng 2: Một số đặc điểm sinh lý sinh hoá của các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập được.

Số TT	Chủng	Gram	Hình dáng TB	cata-laza	CĐ	IAA
1	As1	-	que ngắn, đơn, đôi	-	+	-
2	As2	+	elip, đơn, đôi	+	+	-
3	As3	+	cầu, đơn, đôi	-	+	-
4	As4	-	que, đơn, đôi	+	+	+
5	As5	-	que, đơn, đôi	-	-	-
6	As6	-	que ngắn, đơn, đôi	+	+	-
7	As7	-	oval, đơn, đôi	-	+	-
8	As8	+	ovan, đơn, đôi	+	+	-
9	As9	+	que ngắn, đơn, đôi	+	-	-
10	As10	+	cầu, đơn, đôi	-	+	+
11	As11	-	que, đơn	-	+	-
12	As12	-	que, đơn, đôi	-	-	-
13	As13	-	cầu, đơn, đôi	+	+	ND
14	As14	+	que dài, đơn, đôi	-	+	ND
15	As15	+	cầu, đơn, đôi	+	-	ND
16	As16	+	que, đơn, đôi	+	-	ND
17	As17	-	que, đơn, đôi	+	+	ND
18	As18	+	ovan, đơn, đôi	±	-	ND
19	As19	-	que dài, đơn, đôi	+	+	ND
20	As20	-	ovan, đơn, đôi	±	-	ND
21	As21	+	ovan, đơn, chùm	+	-	ND

Ghi chú : ND - chưa xác định. .

Bảng 3. Khả năng khử acetylen của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Số thứ tự	Tên chủng	Lượng Êtylen (nM/ml)	
		Sacroza	Manitol
1	As 3	57,3	4,5
2	As 4	127,6	4,71
3	As 6	129,71	15,9
4	As 7	30,91	3,71
5	As 8	16,99	8,04
6	As 12	14,81	3,2
7	As 15	17,2	7,8
8	As 16	19,0	7,79
9	As 17	15,01	1,32
10	As 19	28,1	4,9
11	As 20	11,35	4,95
12	As 22	10,21	9,7
13	As 26	14,25	ND
14	As 32	11,57	ND

Ghi chú : ND - không xác định

Enzym nitrogenaza là một phức hệ nhiều enzym, có Fe, Mo và nhóm SH. Hệ enzym này không những khử nitơ phân tử mà cả acetylen [3,6,8]. lượng khử acetylen tương ứng với lượng N

Bảng 3 là kết quả xác định khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn bằng phương pháp sắc ký khí. Từ 34 chủng nghiên cứu, đã chọn được 14 chủng có khả năng cố định nitơ cao hơn cả. Các chủng còn lại do hàm lượng nitơ cố định được nhỏ (dưới 10 nM etylen/ml môi trường với nguồn cacbon là sacroza) nên kết quả không được đưa lên bảng.

Kết quả nhận được cho thấy 3 trong số 14 chủng có hoạt tính tương đối tốt (as 3, as 4, as 6) với lượng etylen được tạo thành tương ứng 57,3; 127,6; 129,71 nM/ml. Hai chủng as 7 và as 19 có hoạt tính khá với 30,91 và 28,1 nM etylen/ml môi trường. Bảng 3 cũng cho thấy nguồn cacbon thích hợp cho các chủng vi khuẩn nghiên cứu là sacroza. Nếu sử dụng manitol, khả năng khử acetylen của các chủng này giảm rõ rệt.

Một số tác giả cũng nhận thấy khả năng khử acetylen của vi khuẩn cố định nitơ phụ thuộc vào thành phần môi trường [6]. Vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* và *Azospirillum brasiliense* khử acetylen trong môi trường cacbon tổng hợp mạnh hơn từ 2 đến 20 lần so với khi nuôi cấy trong môi trường malat không có nitơ. Smirnova và cs.(2001) xác định hoạt tính cố định nitơ của chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ xenluloza cũng nhận thấy hoạt tính này phụ thuộc vào nguồn xenluloza được đưa vào môi trường.

Với 3 chủng có khả năng tổng hợp N mạnh, tiếp tục nghiên cứu thêm các đặc tính sinh lý sinh hoá và di truyền để phân loại.

Bảng 4. Một số tính chất sinh lý, sinh hoá của ba chủng vi khuẩn phân lập.

Tính chất	As 4	As 6	As 19
Khử NO ₃ ⁻	+	+	+
Tạo indol	-	-	-
Axit hoá glucoza	-	-	+
Arginin dihydrolaza	-	-	+
Ureaza	+	+	-
Thuỷ phân Esculin	+	+	+
Thuỷ phân Gelatin	+	+	+
β- galactosidaza	+	+	+
Sử dụng: Glucoza	+	+	+
Arabinoza	+	+	+
Mannoza	+	+	+
Manitol	+	+	+
N-acetyl-glucozamin	+	+	+
Maltoza	+	+	+
Gluconat	+	+	+
Caprat	+	+	+
Adipat	+	+	-
Malat	+	+	+
Citrat	+	+	+
Phenyl-acetat	+	+	-

Kết quả trên bảng cho thấy cả 3 chủng nghiên cứu đều có khả năng khử nitrat, chủng As 19 có khả năng lên men đường glucoza và sinh enzym arginin dihydrogenaza. Cả 3 chủng đều thuỷ phân gelatin và sử dụng các loại đường được nghiên cứu.

3.2.3. Vi sinh vật sinh tổng hợp IAA

Trong quá trình phân lập và tuyển chọn các chủng VSV có hoạt tính phân giải lân và cố định ni tơ đồng thời chúng tôi đánh giá đặc tính sinh tổng hợp IAA của chúng và chọn lựa ra các chủng sau: AS4, AS61, AS62, AS8, GE16, GE23, GE671, GE672

Bảng 5: Các đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng nghiên cứu

CHŨNG TÍNH CHẤT	AS4	AS61	AS62	AS8	GE 16	GE 23	GE 671	GE 672
Thuỷ phân casein	-	-	-	-	+	-	-	-
Thuỷ phân tinh bột	-	-	-	-	-	-	-	-
Thuỷ phân gelatin	-	+	-	-	+	-	+	-
Sử dụng xitrat	-	+	-	+	+	+	+	+
Hoạt tính catalaza	+	+	+	-	+	-	+	+
Lên men cacbonhidrat								
▪ Hiếu khí	+	-	+	-	+	-	+	+
▪ Kị khí	+	-	+	+	+	-	+	+
Khả năng sử dụng đường								
Glucosa	+++	++	+	+	+++	+	+++	+
Saccaroza	+++	++	+	+	+++	+	++	+
Xycloza	+++	+	+	+	+++	+	+	+
Manitol	++	++	+	+	+++	+	++	+
Lactoza	++	+	+	+	++	+	+	+

Chú thích: +: Dương tính; -: Âm tính

Khả năng sử dụng đường:

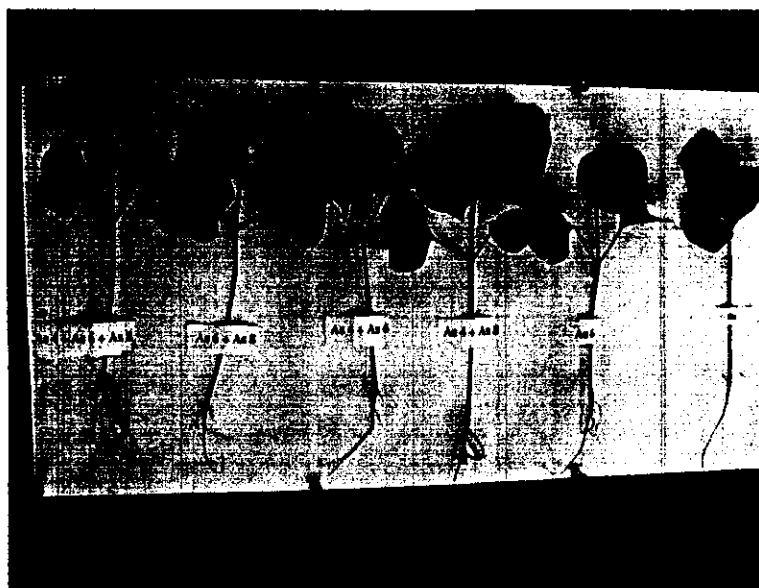
+: mọc yếu; ++: mọc mạnh; +++: mọc rất mạnh

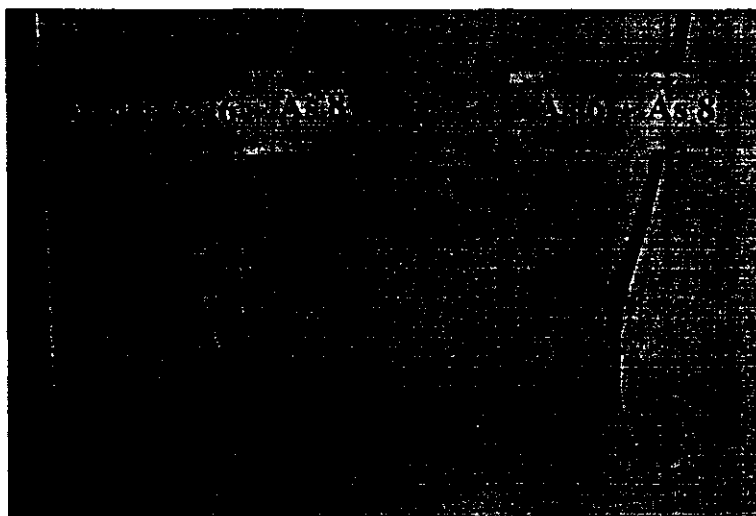
Theo kết quả bảng 5, chủng AS4 không có khả năng thuỷ phân tinh bột và gelatin, chủng GE16 không có khả năng thuỷ phân tinh bột, điều này phù hợp với khoá phân loại của Bergey's 84 đối với các loài *Pseudomonas nitroreducens* (AS4) và *Bacillus pumilus* (GE16). Các chủng còn lại hầu hết không có khả năng thuỷ phân tinh bột và casein, khả năng thuỷ phân gelatin có các chủng AS61, GE16, GE671 dương tính.

Khả năng sử dụng citrat có 2 chủng AS4 và AS62 âm tính, còn lại đều dương tính. Về hoạt tính catalaza hầu hết dương tính, chủng AS8 và GE23 âm tính.

Khả năng lên men cacbonhidrat của các chủng rất khác nhau (hình 7). Chủng AS4 môi trường chỉ thị đều chuyển màu từ xanh sang vàng ở cả 2 điều kiện kỵ khí và hiếu khí, trong điều kiện có parafin lỏng (kỵ khí) cả ống nghiệm chuyển màu vàng, trong điều kiện hiếu khí chỉ có phần trên của ống nghiệm chuyển màu vàng chứng tỏ chủng AS4 vừa có khả năng lên men, vừa có khả năng oxi hoá. Theo khoá phân loại của Bergey *Pseudomonas nitroreducens* cũng có khả năng oxi hoá [40]. Chủng GE16 cũng cho kết quả dương tính với cả 2 điều kiện. Các chủng còn lại có AS61, GE23 đều không có khả năng lên men và khả năng oxi hoá, AS62, GE671, GE672 vừa có khả năng oxi hoá vừa có khả năng lên men, riêng chủng AS8 chỉ có khả năng oxi hoá.

Ảnh hưởng của các chủng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm lên bộ rễ của cây bông





Ảnh 3;4: Bộ rễ cây bông khi bón trồng trong cát khử trùng được bổ sung dung dịch các chủng vi khuẩn cố định đạm và sinh tổng hợp IAA

3.2.4 Nghiên cứu các chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng

Hoạt tính kháng nấm được xác định trong điều kiện *in vitro* trên môi trường thạch Waksman (WA : pepton-5g; glucoza-10g; cao thịt-3g; NaCl-5g; thạch-20g; nước cất-1lít). Chủng nấm kiểm định và chủng vi khuẩn nghiên cứu được cấy hai vạch song song trên cùng một đĩa. Nói chung, nấm gây bệnh và vi khuẩn đều phát triển tốt trên môi trường WA. Vùng ức chế được xác định sau 3-5 ngày nuôi ở 30°C. Sự ức chế được phân biệt rõ bằng sự phát triển hạn chế hoặc hoàn toàn không có hệ sợi nấm trong vùng ức chế gần đường phát triển của vi khuẩn.

Đã xác định ảnh hưởng của dịch nuôi cấy 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* lên sự phát triển của cà chua. Cà chua giống P375 (F₂) được mua tại Trung tâm Kỹ thuật rau quả Hà nội. Hạt cà chua được khử trùng bằng H₂O₂, rửa sạch bằng nước cất vô trùng và cho nảy mầm ở nhiệt độ phòng (25⁰-27⁰C). Hạt đã nảy mầm được nuôi trồng trong ống nghiệm có 5 ml môi trường thạch khoáng MS và 20µl dịch vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* 20µl dịch vi khuẩn *Bacillus*.

Theo dõi sự phát triển của cây và rễ của cây. Kết quả nhận được cho thấy *Bacillus* không gây ảnh hưởng xấu lên sự phát triển của cà chua nuôi cấy *in vitro*. Tỷ lệ sống và phát triển bình thường 84%.

Đối với cây bông nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS và thử khả năng kháng đối với *Ralstonia solanacearum* và *F. oxysporum*

Bảng 6: Kết quả phân lập và hình thái tế bào của các chủng vi sinh vật đối kháng phân lập.

Tên chủng	Gram	Hình thái tế bào	Ghi chú
Th29	+	Hình que dài, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào lớn	
H2	+	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào nhỏ	
TH19	+	Hình que dài, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào lớn	
TH9	+	Hình que dài, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào lớn	
H3	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
TH1	-	Hình cầu, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
H15	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
H16	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
H13	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
H6	-	Hình oval, xuất hiện đơn, kích thước bé	
TH10	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
H10	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
TH4	-	Hình cầu, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào lớn	
TH1'	-	Hình que ngắn, xuất hiện đơn hoặc đôi, kích thước tế bào bé	
TH8	+	Hình cầu, xuất hiện đơn, kích thước tế bào lớn	

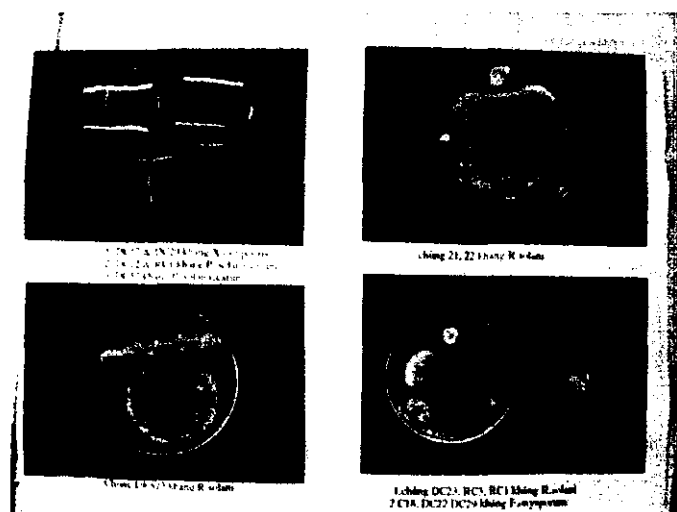
Các chủng phân lập được có tế bào hình que, hình cầu và hình oval, Gram(-) hoặc Gram(+) và tạo sắc tố huỳnh quang. có khả năng sử dụng xyloza và sorbitol, arginin dihydrogenaza và oxydaza dương tính, làm lỏng gelatin nhưng không thủy phân tinh bột.

Khả năng kháng nấm của các chủng phân lập cũng khác nhau, trong đó có các chủng H15, H16, H13, H6, TH10, H10, TH8 có hoạt tính cao hơn cả, kết quả đối kháng nấm được trình bày ở bảng 7.

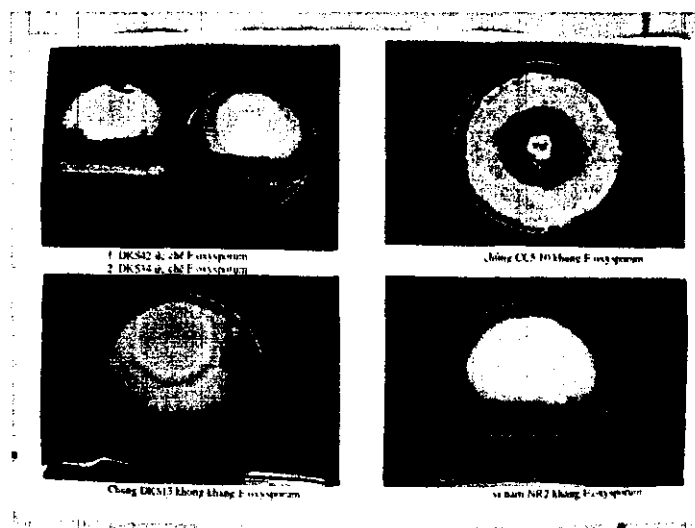
Bảng 7: Khả năng kháng *Fusarium oxysporum* của các chủng phân lập

Tên chủng	Khả năng kháng <i>F. oxysporum</i>	Đường kính vòng kháng nấm	Ghi chú
TH29	-	0	
H2	+	2	
TH19	-	0	
TH9	-	0	
H3	++	10	
TH1	-	0	
H15	+++	20	
H16	+++	19	
H13	+++	18	
H6	+++	18	
TH10	+++	21	
H10	+++	17	
TH4	-	0	
TH1'	-	0	
TH8	++	12	

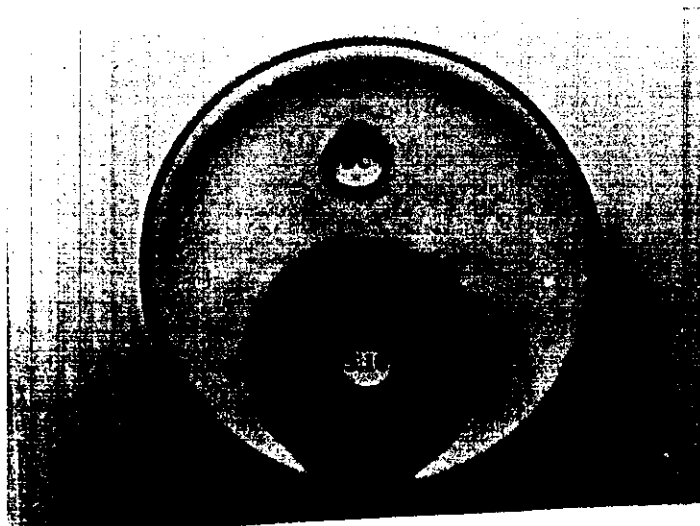
Qua bảng trên, cho thấy các chủng phân lập có mức độ kháng *Fusarium oxysporum* khác nhau. Trong số 15 chủng phân lập, 6 chủng ký hiệu H15, H16, H13, H6, H10, TH10 có hoạt tính ức chế sự phát triển của *Fusarium oxysporum* mạnh hơn tất cả (≥ 10 cm), đặc biệt có chủng TH10 có đường kính ức chế *Fusarium oxysporum* 21mm vì vậy chủng này được chọn cho những nghiên cứu tiếp theo.



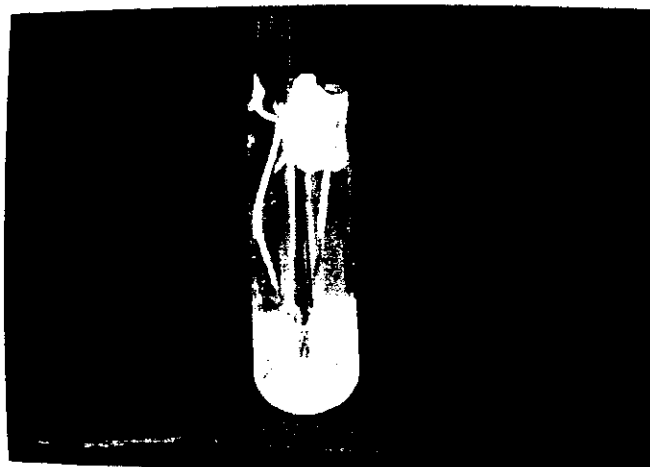
Ảnh 5: thử các chủng có hoạt tính kháng *R.solani*, *F. oxysporum*, *X. campestris*



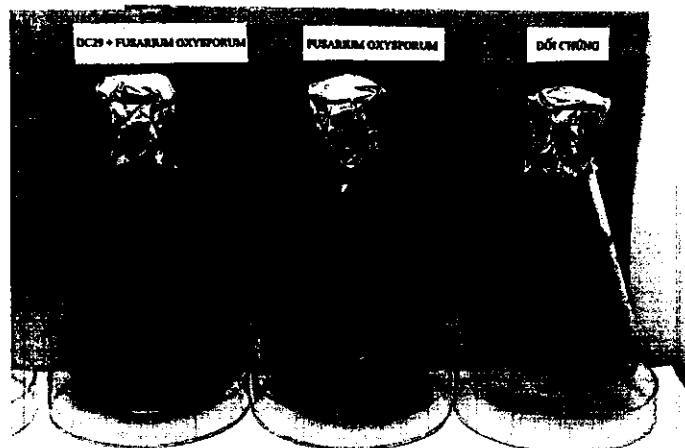
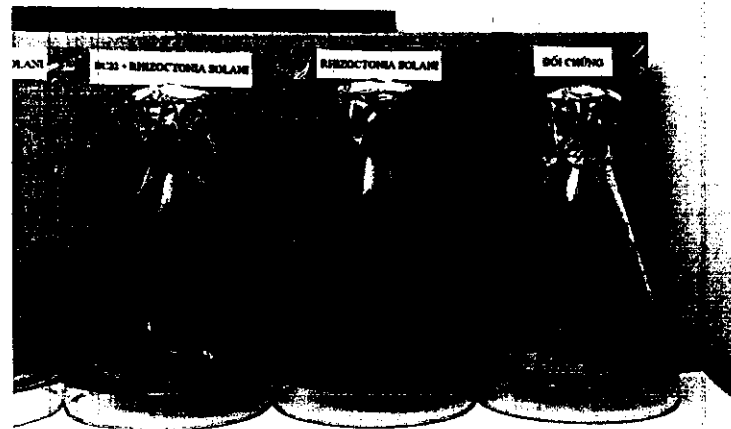
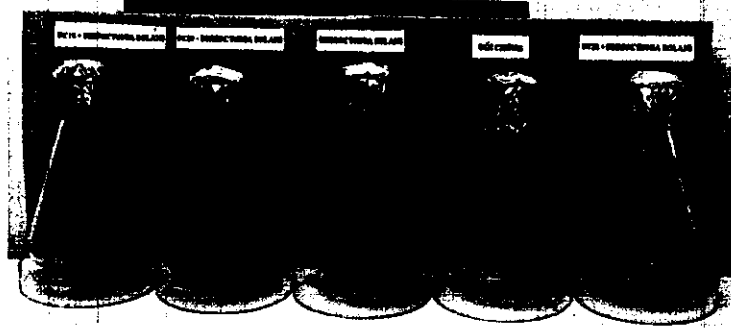
Ảnh 6: thử các chủng có hoạt tính kháng *F. oxysporum* và ức chế *F. oxysporum*



Ảnh 7: Thử hoạt tính kháng *F. oxysporum* của chủng VTCC 5.10



Ảnh 8: Rễ bông bị nhiễm bệnh



Ảnh 9,10,11: Thử khả năng nhiễm bệnh của các chủng đối với giống cây trồng

3.3. Nghiên cứu đặc điểm di truyền gen 16S và 18S của một số chủng có hoạt tính:

Hiện nay các nhà khoa học chấp nhận rằng mức độ giống nhau trình tự 16s ARNr phản ánh khoảng cách quan hệ giữa các cá thể. Vì cấu trúc của ARNr có cấu trúc bậc 2 chính xác và tác động qua lại với các protein khác nhau để tạo ra riboxom chức năng (functional ribosome). Tần số thay đổi của trình tự các gen mã hoá 16s ARNr ít hơn so với genom và dựa trên trình tự này có thể xác định quan hệ họ hàng ở một khoảng cách tiến hoá rất xa [2]. Phương pháp đọc trình tự 16s ARNr gần đây được áp dụng rộng rãi để định loại vi khuẩn

Các chủng vi sinh vật có hoạt tính cao, có khả năng ứng dụng, sau khi đã nghiên cứu các đặc tính sinh lý sinh hoá của chúng, chúng tôi tiến hành cắt và đọc trình tự gen 16S r. riboxom đối với vi khuẩn và 18S đối với nấm, so sánh cây chủng loại phát sinh loài và đăng ký vào trong ngân hàng gen quốc tế:

Giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) có khả năng khuếch đại những trình tự ADN đặc biệt được sử dụng như một phương pháp chẩn đoán miễn dịch và đặc hiệu để phát hiện trực tiếp vi sinh vật trong môi trường, thức ăn và bệnh phẩm... Phương pháp giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom trở thành vũ khí quan trọng nhất để nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Việc sử dụng phương pháp này trong những năm gần đây làm tăng đáng kể sự hiểu biết của chúng ta về đa dạng phát sinh loài của vi sinh vật và quan hệ họ hàng của chúng. Phương pháp giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom thường được sử dụng cùng với các phương pháp khác như PCR-DGGE, PCR-TGGE để định loại loài trong mẫu vật. Điều này có thể thực hiện được nhờ một số lượng lớn dữ liệu trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom được tích lũy từ trước đến nay.

Chúng tôi đã sử dụng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của các chủng vi khuẩn nghiên cứu, so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen quốc tế EMBL bằng phương pháp FASTA 33 để định loại đến loài các chủng này.

Cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của chủng *E.coli* (J01695), tương ứng với các vị trí nucleotid 15-33 (cho mỗi thuận chiều) và 1548-1532 (cho mỗi ngược). Phản ứng PCR với cặp mồi trên và template là ADN tổng số đã được tiến hành. Sản phẩm PCR với độ dài gần

1500 bp được gắn vào TA cloning kit, biến nạp vào *E.coli* chủng TOP10 F' và chọn dòng trên môi trường có ampicilin (100µg/ml). Riêng đối với chủng Ge16 chúng tôi sử dụng cặp mồi tương ứng với các vị trí nucleotid 310 – 340 (cho mồi xuôi) và 770-740 (cho mồi ngược) của chủng *E.coli*. Sản phẩm PCR có độ dài xấp xỉ 500bp.

Trình tự nucleotit của các chủng nghiên cứu được giải trình trên máy tự động ABI-377 của Hãng Perkin-Elmer (Mỹ), sau đó được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03 và chương trình AssemblyLIGN 1.9 trong hệ chương trình MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.).

Truy cập Ngân hàng Gen bằng chương trình Entrez/nucleotide/ tìm kiếm các trình tự gen 16s ARN riboxom của vi khuẩn. So sánh đối chiếu và xử lý số liệu của tất cả các chuỗi bằng chương trình GENDOC2.5 (Nicholas và Nicholas, 1999). Thành phần nucleotit được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn) trong Ngân hàng Gen (bảng mã di truyền số 11) thông qua chương trình GENDOC 2.5.

Tất cả các chuỗi của 15 chủng phân lập tại Việt Nam xử lý theo chương trình GENDOC2.5 và được đưa vào phân tích phả hệ bằng chương trình MEGA2.1 về thành phần nucleotit, sử dụng hệ số tiến hoá thấp ME (minimum evolution index) (Kumar và cs, 2001).

ADN genom của chủng TH10 đã được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của vi khuẩn tương ứng với các vị trí nucleotid 15-33 (cho mồi thuận chiều) và 1548-1532 (cho mồi ngược) của *E.coli*. Sản phẩm PCR với độ dài gần 1500 bp được gắn vào TA cloning kit, biến nạp vào *E.coli* chủng TOP10 F' và chọn dòng trên môi trường có ampicilin (100µg/ml). Trình tự nucleotit của các chủng được giải trình trên máy tự động ABI-377 của Hãng Perkin-Elmer (Mỹ), sau đó được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03 và chương trình AssemblyLIGN 1.9 trong hệ chương trình MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.). Đã sử dụng chương trình FASTA33 để so sánh trình tự nhận được với các trình tự gen 16s ARN riboxom của vi khuẩn trong ngân hàng gen EMBL.

Kết quả nhận được cho thấy trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của chủng TH10 tương đồng đến hơn 97% với đoạn gen 16s ARN riboxom của chủng vi khuẩn *Burkholderia cepacia*, Dựa trên một số đặc điểm sinh lý, sinh

hoá đã nghiên cứu ở trên và độ tương đồng của trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của các chủng nghiên cứu có thể khẳng định rằng chủng TH10 đã được định loại đến loài *Burkholderia cepacia* tương ứng.

Trình tự các đoạn gen 16s ARN riboxom của các chủng nghiên cứu:

3.3.1. Các chủng phân giải lân:

Chủng B14

TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGA
AGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTCTCTTGCCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTA
TCACTTACAGATGGCCCCGGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAAGTCTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAAGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
GAGTGCAGAAAGAGAAAAGCGGAATTCCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGGTG
GCGAAAGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGCGGAGCAACCAAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCC.GCCTGGGGAGTACGGTCGCAA.GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT.CCTCTGACAACCTCTA
GAGATAGAGCGTTCCCTTCCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGCGGTAACC
TTTATGGAGCCAGCCGCCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAG
GTGCGGCTGGATCACCTCCTTA

Chủng GE16 (ngoài phân giải lân còn sinh tổng hợp IAA).

TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATAGGG
AGCTTGCTTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTG
TCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTGTCTGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC
AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGA
GTGCAGAAAGAGAAAAGCGGAATTCCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGGTGGCGA
AAGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGCGGAGCAACCAAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGATGACAACCTTAGAGA
TAGGGCGTTCCCTTCCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCTAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA
TGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCG
GCTGGATCACCTCC

Chủng GE 16 tương đồng với (*Bacillus pumilus*) được đăng ký với mã số: AJ550463

Trình tự của Ge67

```

TAGAGTTTGA TCATGGCTCA GGACGAACGC TGGCGGCGTG CCTAATACAT GCAAGTCGAG
CGGAAATTTT ATTGGTGCTT GCGCCTTTAA AATTTTAGCG GCGGACGGGT GAGTAACACG
TGGGTAACCT ACCTTATAGA TTGGGATAAC TCCGGGAAAC CGGGGCTAAT ACCGAATAAT
ACTTTTAAAC ACATGTTTGA AAGTTGAAAG ACGGTTTCGG CTGTCACTAT AAGATGGACC
CGCGGCGCAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC GGCTACCAA GGCAACGATG CGTAGCCGAC
CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG
CAGTAGGGAA TCTTCCACAA TGGACGAAAG TCTGATGGAG CAACGCCGCG TGAGTGAAGA
AGGATTTTCG TTCTGTAAC TCTGTTGCAA GGAAGAACA AGTAGCGTAG TAACTGGCGC
TACCTTGACG GTACCTTGTT AGAAAACCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
ACGTAAGTGG CAAGCGTTGT CCGGAATATT GGGCGTAAAG CGCGCGCAGG TGGTTCCTTA
AGTCTGATGT GAAAGCCCCC GGCTCAACCG GGAGGGTCAT TGGAACTGG GGAACCTGAG
TGCAAAAAGG ATATGGAATT CCAATGGTAC CGTGAAATGC GTTAAGATTG GAGGAACACC
ATGGCAAGGC AACTGTTGGT CTGTAAGTGA CACTGAGGCC CAAAGCGGGG AACAAACAGA
T

```

Kết quả so sánh bằng chương trình FASTA cho thấy chủng Ge67 có trình tự 16s ARN riboxom tương đồng đến 99% so với trình tự 16s ARN riboxom của *Bacillus silvestris*.

3.3.2 Cố định đạm và sinh tổng hợp IAA

Trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom của hai chủng như sau :

a/ Trình tự của As 4

```

TAGAGTTTGA TCATGGCTCA GATTGAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG
CGGATGAAGA GAGCTTGCTC TCTGATTTAG CGGCGGACGG GTGAGTAATG CCTAGGAATC
TGCCTGATAG TGGGGGATAA CGTTCCGAAA GGAACGCTAA TACCGCATA C GTCCTACGGG
AGAAAGCAGG GGACCTTCGG GCCTTGCGCT ATCAGATGAG CCTAGGTCGG ATTAGCTAGT
TGGTGAGGTA ATGGCTCACC AAGGCTACGA TCCGTAAGT GTCTGAGAGG ATGATCAGTC
ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC
AATGGGCGAA AGCCTGATCC AGCCATGCCG CGTGTGTAAG GAAGGTCTTC GGATTGTAAG
GCACTTTAAG TTGGAGGGAA GGGCAGTAAG TTAATACCTT GCTGTTTTGA CGTTACCGAC
AGAATAAGCA CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATCCAAGGTG CAAGCGTTAA
TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCGCGTAG GTGGTTTCGT AAGTTGGATG TGAAAGCCCC
GGGCTCAACC TGGGAACTGC ATCAAACTG GCGAGCTAGA GTCCGGGATA GGGTGGGTGG
AATTCCTGG TAGCGGTGAA ATGCGTAATA TAGGAAGGGA ACCCAATGGC GAAGGCGACC
ACTGGACTGG TACTGACACT GAGGTGGCAA AGCTTGGGGA GCAAACCGGA TTAATCCCCT
GG

```

Như vậy As 4 có thể là dưới loài *Pseudomonas nitroreducens* đoạn gen này đã được đăng ký tại ngân hàng gen với mã số AJ550469

Chủng AS 8

```

TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCT
TTCAAAAGCTTGCTTTTGGAAAGATCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTTCCTGTGAGACTGG
GATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATAAGGAACCTCCTGGTTCTTTATTGAAAGATGGTTT
CGGCTATCACTCACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATG
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTCC
TAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAG

```

CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAAAGGTCATTGGAAACTGG
 GGAAGTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
 ACCGGTGGCGAAAGCGGCTTTTGGTCTGTAACGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACCAGGATT
 AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAO
 CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGCCA
 CTCCTAGAGATAGGACGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTG
 TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAA
 GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
 ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAAAACCGCGAGGTGAGCAAAATCCCATAAAACCGTTC
 TCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCCCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGG
 GGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATC
 GGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTA

3.3.3. Vi sinh đối kháng.

Chủng TH10

Trình tự nucleotit của đoạn gen 16S ARN riboxom của chủng TH₁₀

HUE PRELIMINARY; DNA; 1099 BP.
 SQ SEQUENCE 1099 BP; 279 A; 253 C; 352 G; 212 T; 3 OTHER;

AGAGTTTGAT	CATGGTTCAG	ATTGAACGCT	GGCGGCATGC
CTTACACATG	CAAGTCGAAC	GGCAGCACGG	GTGCTTGCAC
CTGGTGGCGA	GTGGCGAACG	GGTGAGTAAT	ACATCGGAAC
ATGTCCTGTA	GTGGGGGATA	GCCCGGCGAA	AGCCGGATTA
ATACCGCATA	CGATCTACGG	ATGAAAGCGG	GGGACCTTCG
GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG
TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT
GGTCTGAGAG	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG
GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	CAGCAGTGGG	GAATTTTGA
CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	GCGTGTGTGA
AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA
AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG
AAGAATAAGC	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT
AATACGTAGG	GTGCGAGCGT	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT
AAAGCGTGCG		CAGGCGGTAG	GCTAAGACCG
ATGTGAAATC			

CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAGGC
TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG
TGAAATGCGT	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG
CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	GACGCTCATG	CACGAAAGCG
TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC
CTAAACGATG	TCAACTAGTT	GTTGGGGATC	ATTTCTTAG
TAACGTAGCT	AACGCGTGAA	GTTGACCGCT	GGGGAGTACG
GTCGCAGATT	AAACTCAAGG	ATGACGGGGA	CCGCACAGCG
GAGATGATGT	GAATAATCGT	GCACGCGAAA	ACTACCTACC
TTGACTGGTC	GATCCCCTGA	AGTGGGATGC	TCAAAAACC
GCCCAGGTCT	GCTGCTGCTC	ACTCGGCTGA	ATGTGGTAAT
CCCACAGCCA	CCTGCCTATT	GTCCAGACCT	TAGGANGCGN
ANACGAGAGG	GGAACCAGC		

Đã sử dụng chương trình FASTA để so sánh trình tự đoạn gen của chủng TH₁₀ với các trình tự gen 16s ARN riboxom vi khuẩn khác đã được đăng ký trong ngân hàng gen Quốc tế. Kết quả cho thấy đoạn gen này có độ tương đồng cao với gen 16s ARN riboxom của chủng vi khuẩn *Burkholderia cepacia* (hơn 97%). Như vậy có thể khẳng định chủng TH₁₀ thuộc chi *Burkholderia*.

Chủng H22

TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGA
 AGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
 TCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTA
 TCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGC
 CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGAAAACCTC
 TGGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
 AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGA
 GTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGA
 AAGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACCAGGATTAGATAACCTGGT
 AGTCCACGCGGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
 GCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCCTCTGACAACTCTAGAGA
 TAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC
 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
 TACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGAT
 TGTAGGTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTA
 TGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCG
 GCTGGATCACCTCC

Tách dòng, giải trình tự đoạn gen 18s ARN riboxom của chủng nấm đối kháng CC 5.10

ADN tổng số được tách và kiểm tra độ sạch cũng như nồng độ bằng điện di trên gel agarosa 0,8% và đo quang phổ ở A260 nm và A280 nm trên quang phổ kế Hewlett Packard. Tỷ lệ $A_{260} / A_{280} = 1,85$ và điện di cho thấy ADN nhận được đáp ứng các yêu cầu cho những phản ứng tiếp theo.

ADN genom đã được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi được thiết kế từ trình tự đoạn gen 18s ARN riboxom của vi nấm bằng chương trình PC/gene. Trình tự của đoạn mồi :

P 5'- ACC ACA TCC AAG GAA GGC AGC -3'

M 5'- CAA AGG GCA GGG ACG TAA TCG -3'

Kết quả sản phẩm PCR nhận được là một băng đặc hiệu trên điện di đồ với chiều dài khoảng 1,3 kb, đúng với dự đoán lý thuyết Sản phẩm PCR nhận được gắn trực tiếp vào plasmid vectơ pCRTMII plasmid tái tổ hợp và biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* chủng TOP 10 F' để chọn dòng và đọc trình tự đoạn gen này.

Plasmid tái tổ hợp được tách dòng và đọc trình tự gen. Đoạn gen 18s ARN riboxom của chủng CC 510 có trình tự sau :

```
AGTTGTCAAC GACGGCCAGT GAATTGAATA CGACTCCTAT AGGGCGAATT GGGCCCTCTA
GATGCATGCT CGAGCGGCCG CCAGTGTGAT GGATATCTAG CAGAATTCGG CTTACCACAT
CCAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCCGAT ACGGGGAGGT AGTGACAATA
AATACTGATA CAGGGCTCTT TTGGGTCTTG TAATTGGAAT GAGAACAATC TAAATCCCTT
AACGAGGAAC AATTGGAGGG CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT
AGCGTATATT AAAGTTGTTG CAGTTAAAAA GCTCGTAGTT GAACCTTGGG CCCGTCCTGC
CGGTCCGCCT CACCGCGAGT ACTGGTCCGG ATGGGCCTTT CTTTCTGGGG AATCCCATGG
CCTTCACTGG CTGTGGCGGG GGAACCAGGA CTTTACTGG TGAAAANTTA GAAGTGTC
```

Với chương trình Fasta 3, đoạn gen trên có độ tương đồng với gen 18s ARNr của chủng *Chromocleista cinnaba* (mã số AB 003952 và chủng mã số AB 006747) là 99,5%.

Trong phân loại nấm sợi, phương pháp truyền thống thường dựa vào các đặc điểm hình thái và nuôi cấy như khả năng sinh trưởng trên các loại môi trường khác nhau, màu sắc và hình thái khuẩn lạc, hình dạng, kích thước cuống sinh bào tử và bào tử... Tuy nhiên, trong thực tế rất nhiều yếu tố ngoại cảnh có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi nấm và đôi khi dẫn đến sự đa dạng hình thái của chúng và kết quả việc định loại chúng sẽ gặp rất nhiều khó khăn.

3.3.4. Khả năng hỗn hợp của các chủng giống vi sinh vật

3.3.4.1. Khả năng phân giải photphat khó tan của hỗn hợp chủng so với đơn chủng

Môi trường nuôi cấy là NBIR không có chỉ thị màu. Nguồn photphat là $(\text{Ca})_3(\text{PO}_4)_2$, lượng P tan được xác định theo phương pháp xanh molipden. Kết quả ở bảng 1

Bảng 1 : Khả năng phân giải P khó tan của vi khuẩn đơn chủng và hỗn hợp

Số TT	Chủng vi khuẩn	P ($\mu\text{g/ml}$)		
		3 ngày	5 ngày	7 ngày
1	Ge 16	24,08	240,32	156,96
2	Ge23	32,28	272,68	188,20
3	Ge67	23,04	336,48	273,88
4	B14	32,04	336,00	212,80
5	Ge16+Ge23	51,12	260,04	151,20
6	Ge16+Ge67	50,68	295,20	239,64
7	Ge16+B14	44,80	336,16	187,72
8	Ge23+Ge67	31,51	315,28	160,32
9	Ge23+B14	36,84	106,84	188,40
10	Ge67+B14	26,08	364,64	211,52
11	Ge16+Ge23+Ge67	35,64	63,56	171,24
12	Ge16+Ge23+B14	18,56	50,44	80,36
13	Ge23+Ge67+B14	18,72	60,12	46,00
14	Ge16+Ge23+Ge67+B14	16,28	54,40	63,72

Kết quả nhận được cho thấy trong hầu hết tất cả các lô thí nghiệm, lượng P tan trong môi trường đạt cực đại vào ngày thứ 5, sau đó giảm dần. Khi kết hợp 2 chủng một với nhau, lượng P tan trong môi trường sau 3 ngày lớn hơn so với đơn chủng và đa chủng, nhưng sang ngày thứ 5 kết quả nhận được không khác so với đơn chủng. Đặc biệt việc kết hợp giữa Ge23 và B14 làm giảm khả năng phân giải P khó tan của chúng so với từng chủng riêng biệt. Khi kết hợp từ 3 chủng trở lên, lượng P tan trong môi trường giảm hẳn so với hai trường hợp trên. Phải chăng ở đây có sự ức chế hoạt tính photphatasa bởi sản phẩm trao đổi chất của các chủng hoặc P tan được tạo ra bị các chủng sử dụng trong quá trình phát triển?

3.3.4.2. Khả năng tạo IAA của các chủng vi khuẩn (đơn chủng và hỗn hợp)

Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường tối thiểu với nguồn cacbon là Glucoza (10g/l). Tiền chất để tạo IAA là Tryptophan (100mg/l).

Bảng 2 : So sánh khả năng sinh IAA của đơn chủng và đa chủng

Số TT	Chủng vi khuẩn	IAA (µg/ml)				
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày	11 ngày
1	Ge16	12,24	18,60	106,60	124,40	124,80
2	Ge23	15,60	15,40	56,20	63,00	64,20
3	Ge67	4,80	11,60	47,00	58,20	58,00
4	B14	11,60	31,00	48,00	64,80	59,60
5	Ge16+Ge23	28,20	37,00	58,20	105,40	105,60
6	Ge16+Ge67	15,60	33,80	106,40	87,80	88,20
7	Ge16+B14	15,60	27,60	86,80	159,00	157,60
8	Ge23+Ge67	35,40	27,60	146,50	89,20	88,40
9	Ge23+B14	12,60	85,00	86,40	85,40	86,20
10	Ge67+B14	15,60	108,60	84,20	106,40	106,80
11	Ge16+Ge23+Ge67	49,00	56,80	175,00	198,40	198,10
12	Ge16+Ge23+B14	34,20	85,00	186,50	197,80	198,40
13	Ge23+Ge67+B14	29,00	106,80	189,20	218,60	198,60
14	Ge16+Ge23+Ge67+B14	28,20	106,40	159,00	162,80	164,60
15	As4	12,64	28,20	43,80	49,00	46,20
16	As6	36,20	118,40	106,80	55,00	46,60
17	As8	29,60	106,00	37,00	43,80	44,60
18	As4+ As6	12,64	28,20	46,40	46,20	55,00
19	As4+ As8	12,24	43,80	55,40	58,20	62,40
20	As6+ As8	12,64	16,80	43,80	47,00	55,00
21	As4+ As6+ As8	12,64	18,60	59,20	59,60	64,20

Từ bảng 2 ta thấy khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tăng dần theo thời gian, trừ trường hợp của chủng As6 và As8, Ge67+B14. Đối với các chủng có khả năng phân giải P khó tan, khi kết hợp 2 hoặc 3 chủng với nhau cũng đồng thời làm tăng khả năng sinh tổng hợp IAA của chúng. Riêng ba chủng vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định nitơ, việc sử dụng đa chủng làm giảm lượng IAA được tạo thành trong môi trường nuôi cấy.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của ba chủng vi khuẩn cố định nitơ lên sinh trưởng và phát triển của cây bông và cây cà chua

Hạt bông và hạt cà chua được ngâm nước cho nảy mầm và cấy vào cát. Vi khuẩn được cấy đến nồng độ OD 620 = 1,3. Bổ sung 10ml dịch vi khuẩn / bình có 3 kg cát. Sau 1 tháng kiểm tra khả năng phát triển của cây. Trong quá trình thí nghiệm đảm bảo độ ẩm 60%.

Bảng 3 : Kết quả thí nghiệm lên cây bông

SỐ TT	LÔ THÍ NGHIỆM	1 THÁNG			2 THÁNG		
		CAO CÂY (CM)	DÀI RỄ (CM)	SỐ LÁ	CAO CÂY (CM)	DÀI RỄ (CM)	SỐ LÁ
1	ĐC	16,5	6,8	5	20,5	8,5	5
2	AS4	16,0	7,2	5	20,5	15	5
3	AS6	16,0	5,8	5	21,5	12	8
4	AS8	16,0	5,8	5	20,5	12	6
5	AS4+ AS6	16,0	6,8	5	18,5	14,5	6
6	AS4+ AS8	15,5	5,5	5	19,5	8,5	5
7	AS6+ AS8	16,4	7,0	5	19,5	13	5
8	AS4+ AS6+ AS8	16,5	8,5	5	18,5	11	6

Bảng 3 cho thấy về chiều cao cây sau 1 tháng và 2 tháng không thấy sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm và đối chứng. Chiều dài rễ của lô 2, 7 và 8 dài hơn so với ĐC. Sau 2 tháng bộ rễ của các cây trong lô thí nghiệm đều phát triển rất tốt và ở một số lô lá cũng phát triển tốt hơn so với ĐC (Lô 3, 4, 5, 8). Một điều dễ nhận thấy là khi đất được xử lý với vi khuẩn, rễ phụ phát triển rất tốt (ảnh). Các chủng vi khuẩn được chọn không những có khả năng cố định nitơ không khí mà còn có khả năng sinh tổng hợp IAA. Sự phát triển của rễ ở đây có thể là do đồng tác dụng của IAA.

Đối với cây cà chua, kết quả nhận được tương tự (bảng 4). Như vậy sơ bộ có thể thấy khi sử dụng cả 3 chủng vi khuẩn sự phát triển của cây tốt hơn rõ rệt so với đối chứng.

Bảng 4 : Kết quả thí nghiệm lên cây cà chua

SỐ TT	LÔ THÍ NGHIỆM	CAO CÂY(CM)	DÀI RỄ (CM)	SỐ LÁ
1	ĐC	8,5	3,5	5
2	AS4	9,0	3,5	5
3	AS6	8,5	3,5	5
4	AS8	8,5	4,0	5
5	AS4+ AS6	8,5	4,0	5
6	AS4+ AS8	9,0	4,0	5
7	AS6+ AS8	9,0	4,0	5
8	AS4+ AS6+ AS8	9,5	4,0	5

3.4. Hoàn thiện công nghệ lên men chế phẩm vi sinh chức năng đa chủng ở quy mô pilot

3.4.1. Các chủng vi sinh tham gia vào chế phẩm vi sinh đa chủng

Để hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm phân bón VSV đa chủng chức năng cho cây bông và cà phê ở quy mô pilot, đề tài đã sử dụng:

Chủng đối kháng là:

Burkholderia cepacia TH10

Các chủng vi sinh phân giải lân, cố định N₂:

(1) *Pseudomonas nitroreducens* As4 (Cố định N₂ + sinh tổng hợp IAA)

(2) *Bacillus silvestris* Ge 67 (phân giải lân)

(3) *Bacillus pumilus* Ge16 (phân giải lân và sinh IAA)

- Đã xác định tính đối kháng của chủng vi sinh vật nghiên cứu (các chủng cố định nitơ, phân giải lân và kháng *Fusarium oxysporum* và *Ralstonia solanacearum*) bằng cách cấy vuông góc trên đĩa thạch. Kết quả nhận được cho thấy các chủng này vẫn phát triển không ức chế sự phát triển của nhau. Đồng thời xác định khả năng sống sót khi trộn chúng vào hỗn hợp chế phẩm sau từng tháng.

Vi sinh vật sau 48 giờ nuôi cấy ly tâm trộn, trộn với cám, than bùn vô trùng và pentovit đảm bảo độ ẩm 25%. Cho chế phẩm vào túi nilon, dán kín và giữ ở nhiệt độ phòng. Sau các khoảng thời gian nhất định, xác định độ sống sót của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Xác định độ sống sót của vi khuẩn theo thời gian trong hồ hợp

TT	Tên chủng	Cám (x 10 ⁸)								Than bùn (x 10 ⁸)							
		Tháng								Tháng							
		0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	0	1
1	TH10	5,7	5,7	5,6	5,4	5,4	5	4,2	4,1	4	4	4	4	2	1,7		
2	As4	9,2	9	9	8,9	8,5	8	7,6	7	5	3,2	2	1,2	1,0	1,0		
3	Ge67	10,3	10	10	9,1	9	7,8	6,7	3,2	3,0	3,0	3,0	2,4	2,1	1,3		
4	Ge16	5,3	5,2	5,2	5,2	4	4	1,0	6,2	5	4,0	4,0	3	1,0	-1,0		

- Các nghiên cứu thử nghiệm công nghệ được thực hiện tại pilot Viện Công nghệ sinh học.

- Chế phẩm vi sinh chức năng được đưa vào chất mang nền hữu cơ Polyfa sản xuất tại Buôn Ma Thuột- Đắk Lắk.

- Các nghiên cứu hiệu lực của chế phẩm được lên cây bông được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu bông và cây có sợi Tây nguyên, Viện nghiên cứu cây bông và cây có sợi, cà phê tại Khoa Nông lâm, trường Đại học Tây nguyên.

3.4.2. Thử nghiệm công nghệ sản xuất phân bón vi sinh chức năng ở quy mô pilot:

Các chủng vi sinh đối kháng nuôi trong môi trường được nghiên cứu và thử nghiệm cho kết quả tối ưu nhất để nhân giống cấp 1 trong phòng thí nghiệm sau đó chuyển sang lên men 70 l với các thông số sau:

A. Công thức môi trường:

Đối với các chủng vi khuẩn:

Thành phần môi trường:

Urea	1,0
K ₂ O	1,0
P ₂ O ₅	0,5
NaCl	0,2
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,1
MnSO ₄ và FeSO ₄	0,001
Rỉ đường	10 ml
Dịch thạch bò	5%

Đối với các chủng vi khuẩn cố định ni tơ và phân giải lân:

Thành phần môi trường:

KH ₂ PO ₄ - 0,4	CaCl ₂ . 2H ₂ O - 0,02
K ₂ HPO ₄ - 0,1	FeCl ₃ .6H ₂ O - 0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O - 0,2	NaMoO ₄ .2H ₂ O - 0,002
Manitol - 20	NaCl - 0,1
Dịch thịt bò	5%
Pepton	3

B. Các thông số công nghệ:

Bảng 8: Các thông số công nghệ tối ưu được chọn

Chủng	T(C°)	T(h)	PH	VT. v/ph	Mật độ VSV đạt cực đại
Vi khuẩn đối kháng <i>Burkholderia cepacia TH10</i> <i>Pseudomonas nitroreducens</i> (sinh tổng hợp IAA)	35	36	7,0-7,2	150	$4,8.10^9-5.10^9$
Vi khuẩn PG lân và CD ni tơ <i>Bacillus silvestris</i> (PG lân) <i>Bacillus pumilus</i> (phân giải lân và sinh IAA)	37	48	7,0-7,2	150	10^9

- Dịch lên men được thu hồi và ly tâm 5000 v/p với chất hấp phụ pentovit thu hồi sinh khối và làm khô. Sinh khối được trộn với cơ chất là cám gạo và diatomit tỉ lệ 1/80/19.

- Sản phẩm được đóng trong bao trắng bạc với trọng lượng 500g độ ẩm 22-25 , bảo quản ở nhiệt độ phòng,

- Thời gian bảo quản sau 3 tháng mật độ các chủng $10^7-5.10^8$

- Chế phẩm vi sinh chức năng được phối trộn với nền hữu cơ polyfa-bông tỉ lệ 1/100 thành phân bón chức năng cho cây bông.

- Chế phẩm vi sinh chức năng được phối trộn với nền hữu cơ polyfa-CF tỉ lệ 1/100 thành phân bón chức năng cho cây Cà phê.



Ảnh 12: Pilot Thực hiện Dự án

3.4.3. Chất lượng phân hữu cơ vi sinh đa chủng chức năng nền polyfa.

- Chỉ tiêu chất lượng theo từng loại sản phẩm:

+ Phân hữu cơ vi sinh đa chủng nền POLYFA.

+ POLYFA 0,5.3.0,5

N: 0,5%, P_2O_5 : 3%, K_2O : 0,5%

+ POLYFA 1.3.1

N: 1%, P_2O_5 : 3%, K_2O : 1%

+ POLYFA 3.3.3

N: 3%, P_2O_5 : 3%, K_2O : 3%

+ Chất hữu cơ: 22% (từ vỏ cà phê, mun mía, than bùn)

+ Chất điều hoà sinh trưởng(NAA): 50- 100 ppm

+ Vi lượng tính theo ppm: Mo, B, Mn, Zn: 10-150 ppm

+ Vi sinh vật đa chủng: 10^7 CFU/gr.

3.5. Đánh giá Hiệu lực của phân bón đa chủng trên cây trồng

Việc sử dụng liên tục phân vô cơ bón cho cây trồng trong sản xuất nông nghiệp và không bón phân hữu cơ đã phá vỡ cân bằng C/N , dẫn đến phá vỡ kết cấu và làm giảm dung tích hấp thu của đất, làm cho đất ngày càng chua và bị rửa trôi. Hậu quả là, cây trồng vụ sau sinh trưởng và cho năng suất kém hơn vụ trước mặc dù chi phí đầu tư cao hơn. Vì vậy, để xây dựng nền sản xuất nông nghiệp bền vững và tăng hiệu quả của việc đầu tư thì việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh đa chủng bón cho cây trồng là hết sức cần thiết. Trong năm 2002- 2003 tại Đaklak, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm:

“Nghiên cứu hiệu lực của phân bón hữu cơ tổng hợp chức năng đa chủng POLYFA đến khả năng chống chịu sâu bệnh, sinh trưởng và năng suất của cây cà phê và cây bông”.

Với mục đích xác định hiệu lực của phân bón vi sinh chức năng đa chủng trên nền POLYFA đến khả năng chống chịu sâu bệnh, sinh trưởng và năng suất của cây cà phê và cây bông.

3.5.1 Ảnh hưởng của chế phẩm lên quy mô chậu vại

3.5.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm Vi sinh đa chủng chức năng lên cây bông vải ở quy mô chậu vại

Cây bông vải được trồng trong các chậu với 5 kg đất, mỗi công thức thí nghiệm được trồng theo các công thức sau:

CT1: Đất không

CT2: Đất nhiễm *F.oxysporum*

CT3: Đất nhiễm *F.oxysporum* + 20g chế phẩm VSĐCCN

Tất cả các công thức thí nghiệm đều được bón NPK với số lượng và lần bón như nhau.

Để xác định hiệu quả ảnh hưởng của các chủng vi sinh đối kháng, cố định đạm và sinh tổng hợp IAA chúng tôi theo dõi sự phát triển của chiều cao cây và bộ rễ trong giai đoạn sau 20 ngày nảy mầm và số lượng, khối lượng quả cây bông sau khi thu hoạch. Kết quả được trình bày trong các bảng sau:

Bảng 1: Ảnh hưởng của chế phẩm lên sự phát triển của bộ rễ và chiều cao của cây sau 20 ngày nảy mầm.

Công thức	Chiều dài TB của rễ chính (cm)	Số lượng rễ TB trên một cây	Chiều cao TB của cây (cm)
CT1	6,26	5	18,0
CT2	4,46	2	13,2
CT3	9,04	8	24,6

Bảng 2: Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm lên các yếu tố cấu thành năng suất

Công thức	Quả/cây	Khối lượng quả (g)	Năng suất (tạ/ha)	
			Lý thuyết	Thực thu
1. Đ/C	8,9	3,15	11,21	10,3
2. Đất nhiễm <i>F.oxysporum</i>	6	2,24	5,37	5,01
3. Đất nhiễm <i>F.oxysporum</i> + 20g chế phẩm VSDCCN	11,5	3,40	14,96	14,00

Bảng 3: Tình hình bệnh hại và thời gian phát dục của các công thức.

Công thức	Tỷ lệ bệnh (%)		Cấp Rầy 70 ngày	Thời gian từ gieo đến ... (ngày)	
	Lở cổ rễ	Đốm cháy lá		50% quả nở	Tận thu
1. Đ/C	5	80	1,15	113,0	145,7
2. Đất nhiễm <i>F.oxysporum</i>	75	80	1,01	134,0	165,0
3. Đất nhiễm <i>F.oxysporum</i> + 20g chế phẩm VSDCCN	0,00	75	1,02	112,3	145,3

- Qua những bảng trên ta thấy sử dụng chế phẩm chức năng đa chủng có tác dụng rõ rệt đến khả năng chống chịu bệnh của cây và tăng năng suất cho bông trong điều kiện chậu vại.

3.5.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm Vi sinh đa chủng chức năng lên cây cà phê ở quy mô vườn ươm:

Cây cà phê được trồng trong các túi PE với 1 kg đất, mỗi công thức thí nghiệm được trồng theo các công thức sau:

CT1: Đất không

CT2: Đất nhiễm *F.oxysporum*

CT3: Đất nhiễm *F.oxysporum* + 5g chế phẩm VSDCCN

Tất cả các công thức thí nghiệm đều được bón NPK với số lượng và lần bón như nhau.

Để xác định hiệu quả ảnh hưởng của các chế phẩm Vi sinh đa chủng chức năng. Chúng tôi theo dõi sự phát triển của cây trong giai đoạn sau 6 tháng trước khi đưa ra trồng ngoài rẫy.

Tình hình sâu bệnh hại của các công thức.

Công thức	Tỷ lệ bệnh (%)
	Lở cổ rễ
T1	5
T2	75
T3	0

Ươm hạt chọn giống đủ tiêu chuẩn, nên bóc vỏ trấu trước khi ươm, ủ nước ấm (37 -40°C), hàng ngày tưới nước cho đủ ẩm. Sau 21-25 ngày hạt cà phê mới nứt nanh (nhú mầm 1-2mm, đạt 80-85%. Khi đó mới đem gieo vào chậu. Đất làm tơi xốp, gieo hạt đã nứt nanh, phủ lớp đất mịn lên hạt chỉ dày 1-1,5mm. Theo 3 công thức trên.

Sau gieo 20 -25 ngày hạt cà phê mới đội mũ, sau 15 ngày nữa mới bung lá sò. Khi đó nhổ những cây tốt, rễ cọc chỉ có một, rễ thẳng trồng ngoài rẫy.

Chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê

Chỉ tiêu		Sau 1 tháng	Sau 2 tháng	Sau 3 tháng	Sau 4 tháng	Sau 5 tháng	6 tháng
Chiều cao thân	<i>CT1</i>	7-8	9-13	14-18	19-26	25-27	28-31
	<i>CT2</i>	3-5	6-9	11-15	17-19	19-20	22-25
	<i>CT3</i>	8-12	12-15	16-20	21-26	25-29	30-35
Chiều dài rễ cọc	<i>CT1</i>	4-6	7-9	11-14	14-15	16-18	18-19
	<i>CT2</i>	2-3	4-7	8-11	12-13	14-15	15-17
	<i>CT3</i>	6-9	8-10	10-13	14-19	17-22	20-24
Đường kính thân cách mặt đất 5 cm	<i>CT1</i>	1-1.2	1.3-1.7	1.8-2.4	2.6-3.4	3.8-4	4.3-5.4
	<i>CT2</i>	0.5-0,7	1.0-1.5	1.7-1.9	2.3-2.6	3.1-3.7	3.8-4.0
	<i>CT3</i>	1-1.5	1.4-1.9	2.2-2.5	3.0-3.8	4-5	5-6.5
Số cặp lá thật	<i>CT1</i>	1 cặp lá sò	1.4-2.0	2.5-3.3	3.6-4.3	4.6-4.9	5.5-5.9
	<i>CT2</i>	1 cặp lá sò	1.4-1,6	1,6-1.9	2.6-2.9	3.5 -3.9	4.3-4.8
	<i>CT3</i>	1 cặp lá sò	1.5-2.2	2.8-3.6	4.1-5	5.4-6.2	6.7-7.4

Sau khi cấy vào bịch PE khoảng 4.5 đến 5 tháng, cây có 5 -6 cặp lá thật, cao hơn 20 cm, đường kính thân gốc hơn 4.0mm có thể đưa ra vườn trồng được.

Qua các kết quả nghiên cứu trong vườn ươm cho ta thấy rằng nếu sử dụng chế phẩm đa chủng chức năng sẽ làm giảm tỉ lệ mắc bệnh thối cổ rễ của cây và tăng chất lượng cây giống.

3.5.2. Đánh giá khảo nghiệm hiệu lực của Phân bón Vi sinh đa chủng chức năng ở ngoài đồng ruộng

3.5.2.1 Hiệu lực đối với cây Bông.

- Địa điểm thử nghiệm : tại xã Quảng Hiệp - huyện CưMgar - tỉnh Daklak.
- Cơ quan thực hiện khảo nghiệm: Trung tâm nghiên cứu cây bông và cây có sợi Tây Nguyên, Viện nghiên cứu cây bông và cây có sợi

Nội dung khảo nghiệm: Thí nghiệm gồm 3 công thức:

- CT1 (Đ/c): Bón phân phân đơn ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$) /ha.
- CT2: Bón phân hữu cơ sinh học tổng hợp đa chủng nền hữu cơ POLYFA loại CF (1:3:1) lượng 500 kg/ha, bổ sung phân đơn đủ lượng ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$) /ha.
- CT3: Bón phân hữu cơ sinh học tổng hợp đa chủng nền POLYFA loại CFM (3:3:3) lượng 400 kg/ha, bổ sung phân đơn đủ lượng ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$) /ha.

Ghi chú: Tất cả các công thức đều được phun PIX (chất điều hòa sinh trưởng) 3 lần.

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên RCBD, diện tích mỗi ô là: 100m^2 , tổng diện tích thí nghiệm là: 1200m^2 .

* Chỉ tiêu theo dõi

- Thành phần dinh dưỡng đất trước khi làm thí nghiệm: 1 mẫu; thành phần dinh dưỡng đất khi kết thúc thí nghiệm: 3 mẫu (của 3 công thức).
- Thời gian sinh trưởng từ gieo đến 50% số cây có quả đầu tiên nở và tận thu.
- Đánh giá tình hình bệnh cây con: giai đoạn trước 30 ngày sau gieo.
- Đánh giá cấp rầy gây hại giai đoạn 70 - 90 ngày (trước khi phun thuốc trừ rầy).
- Các yếu tố cấu thành năng suất: mật độ cây cuối vụ, số quả/cây, số quả/ m^2 và khối lượng quả.
- Năng suất lý thuyết và năng suất thực thu.

- Chỉ tiêu thời gian phát dục qua các giai đoạn được theo dõi trên 20 cây cố định ở hàng giữa mỗi ô.

- Khối lượng quả : mỗi ô, thu toàn bộ số quả của 3 cây liên tiếp.

- Đánh giá cấp rầy gây hại và bệnh hại: 10 cây liên tiếp/ô.

- Năng suất thực thu: cân toàn ô.

- Hiệu quả kinh tế.

Kỹ thuật canh tác:

- Mật độ: gieo 5 vạn cây/ha.

- Phân bón: Tất cả các công thức đều bón đủ 120 kg N + 60 kg P_2O_5 + 60 kg K_2O .

• Công thức 1 (đối chứng)

Lần bón (Ngày sau gieo)	Lượng phân thương phẩm (kg/ha)			
	Lân VĐ	SA	Urê	Kali
1. Bón lót	400	143	0	20
2. Bón thúc lần 1 (20-25 ngày)	0	0	60	20
3. Bón thúc lần 2 (40-45 ngày)	0	0	65	30
4. Bón thúc lần 3 (60-65 ngày)	0	0	70	30
Tổng	400	143	195	100

• Công thức 2: (Nền: 500 kg Đa chủng nền CF (1:3:1) + 115 kg N + 45 kg P_2O_5 + 55 kg K_2O)

Lần bón (Ngày sau gieo)	Lượng phân thương phẩm (kg/ha)				
	CF	Lân VĐ	SA	Urê	Kali
1. Bón lót	500	225	143	0	10
2. Bón thúc lần 1 (20-25 ngày)		0	0	40	22
3. Bón thúc lần 2 (40-45 ngày)		0	0	65	30
4. Bón thúc lần 3 (60-65 ngày)		0	0	70	30
Tổng	500	225	143	175	92

• Công thức 3: (Nền: 400 kg Đa chủng CFM (3:3:3) + 108 kg N + 48 kg P_2O_5 + 48 kg K_2O)

Lần bón (Ngày sau gieo)	Lượng phân thương phẩm (kg/ha)				
	CFM	Lân VĐ	SA	Urê	Kali
1. Bón lót	400	253	135	0	10
2. Bón thúc lần 1 (20-25 ngày)		0	0	50	10
3. Bón thúc lần 2 (40-45 ngày)		0	0	54	30
4. Bón thúc lần 3 (60-65 ngày)		0	0	60	30
Tổng	400	253	135	165	80

3.5.2.2. Kết quả nghiên cứu hiệu lực của phân bón đa chủng trên cây bông

Bảng 9: Tình hình sâu bệnh hại và thời gian phát dục của các công thức.

Công thức	Tỷ lệ bệnh (%)		Cấp Rầy 70 ngày	Thời gian từ gieo đến ... (ngày)	
	Lở cổ rễ	Đốm cháy lá		50% quả nở	Tận thu
1. Đ/C	3,33	83,33	1,27	113,0	145,7
2. Đa chủng CF	0,00	83,33	1,23	113,0	146,0
3. Đa chủng CFM	0,00	76,67	1,27	112,3	145,3
Cv (%)	-	26,47	10,11	1,52	0,40

Số liệu bảng 1, cho thấy:

- Tình hình sâu bệnh hại ở các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O)/ha chưa thể hiện sai khác so với công thức đối chứng bón phân đơn. Tuy nhiên, các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O)/ha không thấy xuất hiện bệnh lở cổ rễ.

- Các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O)/ha có thời gian sinh trưởng từ gieo đến 50% số cây đầu tiên có quả nở và tận thu cũng chưa thể hiện sai khác so với công thức đối chứng bón phân đơn.

Bảng 9: Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lý thuyết.

Công thức	Mật độ (cây/m ²)	Quả/cây	Quả/m ²	Khối lượng quả (g)	Năng suất (tạ/ha)	
					Lý thuyết	Thực thu
1. Đ/C	4,57	10,10	46,09	3,76	17,31	14,75
2. Đa chủng nền Polyfa CF	4,81	11,47	55,21	3,71	20,52	16,58
3. Đa chủng nền Polyfa CFM	4,47	11,63	52,05	3,89	20,21	16,40
Cv (%)	3,24	4,41	4,24	4,11	4,42	2,37
LSD _{0.05}	-	0,78	3,47	-	1,37	0,60

Cv (%) = $(S/\bar{X}) \cdot 100\%$: hệ số biến động.

LSD_{0.05}: So sánh kết quả của các công thức kê có ý nghĩa thống.

Số liệu bảng 9, cho thấy:

- Mật độ cây cuối vụ của các công thức trong thí nghiệm đảm bảo theo đúng quy trình đề ra.

- Các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O)/ha cho số quả /cây, số quả/m², năng suất lý thuyết và năng suất thực thu cao hơn công thức đối chứng bón phân đơn và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê.

- Khối lượng quả của các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O)/ha chưa thể hiện sai khác có ý nghĩa so với công thức đối chứng bón phân đơn.

Bảng 10: Hiệu quả kinh tế (triệu đồng/ha).

Công thức	Tổng thu	Chi phí phân bón	Thu sau khi trừ chi phí phân bón	Thu vượt so với đối chứng
1. Đ/C	8 112,5	1 499,0	6 613,5	-
2. Đa chủng nền Polyfa CF	9 119,0	1 761,9	7 357,1	743,6
3. Đa chủng nền Polyfa CFM	9 020,0	1 724,1	7 295,9	682,4

Số liệu bảng 3, cho thấy: Do mọi khâu thực hiện ở các công thức tương tự nhau, do vậy chúng tôi chỉ so sánh phần thu và chi phí phân bón giữa các công thức. Các công thức bón phân đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$)/ha có tổng thu và phần thu sau trừ chi phí bón phân cao hơn công thức đối chứng, mặc dù các công thức này có chi phí bón phân cao hơn đối chứng. Lãi do việc bón phân hữu cơ đa chủng POLYFA so với bón phân đơn từ 680 đến 743 nghìn đồng/ha.

3.5.3 Đánh giá hiệu lực đối với cây cà phê.

3.5.3.1. Thí nghiệm gồm 5 công thức sau

T1 : $300 \text{ kg N} + 100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 300 \text{ kg K}_2\text{O}$

T2: $300 \text{ kg N} + 100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 300 \text{ kg K}_2\text{O} + 5 \text{ tấn phân chuồng/ha}$.

T3: $300 \text{ kg N} + 100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 300 \text{ kg K}_2\text{O} + 1000 \text{ kg Phân hữu cơ đa chủng POLYFA/ha}$.

T4: $300 \text{ kg N} + 100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 300 \text{ kg K}_2\text{O} + 1500 \text{ kg Phân hữu cơ đa chủng POLYFA/ha}$.

T5: $300 \text{ kg N} + 100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 300 \text{ kg K}_2\text{O} + 2000 \text{ kg Phân hữu cơ đa chủng POLYFA/ha}$.

Thí nghiệm được bố trí ở huyện Krôngbuk - tỉnh Daklak, gồm 4 lần nhắc lại được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên.

- Thời gian thực hiện: 2002 -2003.

- Phân bón được bón như sau:

- + Phân lân và phân chuồng bón lần 1 vào đầu mùa mưa (tháng 5).

- + Phân vi sinh hữu cơ đa chủng POLYFA bón là 2 lần vào đầu mùa mưa và giữa mùa mưa (tháng 5 và tháng 7), mỗi lần 50 %.

- Các công đoạn kỹ thuật khác được tiến hành thực hiện như nhau ở tất cả các công thức như: tưới nước, làm cỏ, tạo hình, phun thuốc phòng trừ sâu bệnh, thu hoạch...

- Kiểm tra chất lượng của phân bón.

- Quan trắc các chỉ tiêu đồng ruộng: sinh trưởng phát triển của cây, các chỉ tiêu cấu thành năng suất, chỉ tiêu năng suất.

- Phân tích theo dõi diễn biến độ phì nhiêu của đất.
- Phân tích hiệu quả kinh tế.
- Số liệu theo dõi được tập hợp và xử lý thống kê trên máy tính.

3.5.3.2. Kết quả nghiên cứu hiệu lực của phân bón đa chủng POLYFA trên cây cà phê.

- Tác động của phân bón hữu cơ đa chủng POLYFA đến tính chất hoá học của đất

Bảng 11: Tính chất của đất trước thí nghiệm (0-30cm)

Công thức	pH _{KCl}	HC (%)	N (%)	P ₂ O ₅ dt (mg/100gd)	K ₂ Odt (mg/100gd)	Ca ⁺⁺ (ldl/100gd)	Mg ⁺⁺ (ldl/100gd)
T1	4.5	3.93	0.169	6.5	14.6	2.04	1.99
T2	4.5	3.80	0.168	6.4	14.4	2.33	1.88
T3	4.5	3.92	0.164	6.5	14.5	2.18	1.79
T4	4.5	3.81	0.166	6.4	14.5	2.46	1.91
T5	4.5	3.99	0.165	6.5	14.7	2.41	1.68

Bảng 12: Tính chất của đất sau thí nghiệm (0-30cm)

Công thức	pH _{KCl}	HC (%)	N (%)	P ₂ O ₅ dt (mg/100gd)	K ₂ Odt (mg/100gd)	Ca ⁺⁺ (ldl/100gd)	Mg ⁺⁺ (ldl/100gd)
T1	4.5	3.82	0.161	6.0	14.8	2.36	1.87
T2	4.5	4.20	0.172	7.1	15.1	2.53	1.83
T3	4.5	4.02	0.170	6.9	15.6	2.55	1.76
T4	4.5	4.09	0.177	7.2	16.6	2.48	1.96
T5	4.5	4.15	0.181	7.5	16.9	2.50	1.84

Phân tích tính chất hoá học đất trước và sau 2 năm thí nghiệm bón phân hữu cơ vi sinh đa chủng cho thấy: công thức bón hoàn toàn phân khoáng hàm lượng dinh dưỡng trong đất không những không được cải thiện, mà có chiều hướng còn bị sụt giảm. Trong khi đó các công thức có sử dụng phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA và phân chuồng thì các chỉ tiêu dinh dưỡng được cải thiện rõ rệt (hữu cơ, N, P₂O₅dt và K₂Odt đều tăng lên). Chiều hướng công thức

bón lượng phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA càng cao thì các chỉ tiêu hoá học càng được cải thiện.

- Tác động của phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA đến lý tính đất:

Bảng 13: Thành phần lý học đất trước thí nghiệm

Công thức	Đoàn lạp đất (%)				Dung trọng (g/cm ³)	Độ xốp (%)
	>5 mm	5-1 mm	1-0.25 mm	<0.25 mm		
T1	25.25	39.21	20.75	14.79	0.97	62.56
T2	26.06	40.36	20.04	13.55	0.97	62.56
T3	25.18	39.72	20.76	14.34	0.97	62.56
T4	26.02	40.24	20.58	13.16	0.97	62.56
T5	25.47	40.05	20.47	14.01	0.97	62.56

Bảng 14: Tính chất lý học đất sau thí nghiệm

Công thức	Đoàn lạp đất (%)				Dung trọng (g/cm ³)	Độ xốp (%)
	>5 mm	5-1 mm	1-0.25 mm	<0.25 mm		
T1	23.90	40.20	21.17	14.16	0.97	62.56
T2	28.06	40.25	20.04	11.65	0.96	63.77
T3	27.50	40.03	21.00	11.47	0.96	63.77
T4	27.67	40.21	20.58	11.54	0.96	63.77
T5	27.82	39.95	20.05	11.73	0.96	63.77

Đối với cây cà phê thì tính chất vật lý của đất quan trọng hơn cả tính chất hoá học đất, nó quyết định rất lớn đến sinh trưởng phát triển và cho năng suất của cây trồng. Số liệu về đoàn lạp, dung trọng và độ xốp đất (bảng 6, 7) cho thấy: công thức bón hoàn toàn phân khoáng (T1) trước và sau thí nghiệm thay đổi không đáng kể. Các công thức có bón phân chuồng và phân hữu cơ vi sinh đa chủng (T2-T5) nhờ tác dụng của chất hữu cơ trong đó bón vào đất làm chất keo gắn kết các đoàn lạp bé lại với nhau nên tỷ lệ các đoàn lạp có giá trị nông học (>5mm) được tăng lên, tỷ lệ đoàn lạp bé (<0,25mm) giảm xuống, tạo cho đất có độ thoáng khí cao, dung trọng giảm độ xốp tăng lên.

Tác động của phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA đến chế độ ẩm của đất.

Khả năng giảm độ ẩm của đất có quan hệ mật thiết với sinh trưởng và phát triển của cây cà phê, đặc biệt là trong điều kiện mùa khô ở Đăklăk. Nếu

như sức giữ ẩm của đất kém thì chu kỳ một lần tưới sẽ ngắn, số lần tưới phải tăng lên. Bón phân chuồng cũng như phân hữu cơ vi sinh đa chủng liên tục (T2-T5) sẽ tăng cường sức giữ ẩm của đất. Kết quả theo dõi độ ẩm đất ở các công thức sau thời gian tưới trong mùa khô 2002-2003 cho thấy: công thức chỉ bón phân khoáng (T1) sau 14 ngày độ ẩm đã xuống dưới 30%, trong khi các công thức có bón phân chuồng và phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA độ ẩm đất vẫn còn từ 31-35%. Sở dĩ có điều này là do khả năng hút ẩm cũng như che phủ đất giảm quá trình bốc hơi nước của chất hữu cơ bón vào đất. Điều này rất có ý nghĩa giúp cho cây có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt, sẽ giúp cho cây có khả năng chống chịu được với điều kiện khô hạn lượng nước tưới bị thiếu.

3.5.3.3. Ảnh hưởng của phân bón hữu cơ vi sinh đa chủng nền POLYFA đến sinh trưởng phát triển của cây cà phê.

Hàm lượng dinh dưỡng trong lá cà phê là chỉ tiêu đánh giá khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây cũng như hiệu lực cung cấp chất dinh dưỡng của phân bón, thông qua đó biết được lượng dinh dưỡng cung cấp cho cây trồng có đầy đủ hay không. Phân bón thành phần dinh dưỡng trong lá cà phê trước và sau khi bón phân cho thấy: bón hoàn toàn phân khoáng có hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá thấp, bón phân chuồng và phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA kết hợp bón phân khoáng thì cây tích lũy dinh dưỡng nhiều hơn (T2-T5). Công thức bón 1500 - 2000 kg phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA/ha cho tích lũy N, K trong lá cao nhất.

Bảng 15: Thành phần dinh dưỡng trong lá cà phê trước và sau khi bón phân (%)

Công thức	Trước bón phân			Sau bón phân 10 ngày		
	N	P	K	N	P	K
T1	2.67	0.12	1.53	2.78	0.13	1.61
T2	2.67	0.11	1.53	2.85	0.13	1.63
T3	2.66	0.11	1.54	2.88	0.13	1.69
T4	2.67	0.12	1.55	3.04	0.14	1.75
T5	2.67	0.11	1.56	3.04	0.14	1.75

Bảng 16: Tốc độ tăng trưởng cà phê trong 2 năm thí nghiệm

Công thức	Δ dài cành (cm)		Δ đ/k cành (mm)		Cặp lá hình thành	
	5/11/2002	12/6/2003	5/11/2002	12/6/2003	5/11/2002	12/6/2003
T1	24.7	31.7	0.7	0.8	7.2	13.0
T2	26.2	34.5	0.7	0.9	7.8	14.6
T3	26.0	33.8	0.7	0.9	7.3	13.5
T4	26.6	34.7	0.7	0.9	9.3	14.8
T5	27.5	35.5	0.7	0.9	9.0	15.5

Về tốc độ tăng trưởng chiều dài cành, đường kính cành cơ bản, hình thành cặp lá, cho thấy: nếu bón hoàn toàn phân khoáng sẽ làm cho cây sinh trưởng phát triển kém. Nhưng nếu bón thêm phân chuồng hoặc phân vi sinh hữu cơ đa chủng POLYFA kết hợp với phân khoáng sẽ cho cây cà phê sinh trưởng và phát triển tốt hơn, tốc độ tăng trưởng chiều dài cành, đường kính cành nhanh hơn, cặp lá hình thành nhiều hơn. trong các công thức bón phân chuồng và phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA thì các công thức bón 1500-2000 kg POLYFA cho cây cà phê sinh trưởng và phát triển tốt hơn cả, đây là cơ sở rất tốt để thiết lập năng suất cao của những vụ sau.

Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA đến chất lượng quả cà phê.

Kết quả quan trắc các chỉ tiêu về quả cà phê ở 2 năm 2002-2003 cho thấy giữa các công thức có xuất hiện khác nhau có ý nghĩa, năm 2003 sự khác biệt giữa các công thức lớn hơn so với năm 2002. Công thức chỉ bón phân khoáng (T1) tỷ lệ quả rụng, quả 1 nhân và tỷ lệ tươi/nhân cao, thể tích và trọng lượng quả nhỏ. Công thức bón bổ sung phân chuồng (T2) mặc dù thể tích và trọng lượng quả có tăng lên song tỷ lệ quả rụng, quả 1 nhân và tỷ lệ tươi/nhân còn khá cao. Các công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA (T3-T5) đã khắc phục được những hạn chế trên nhờ vào sự có mặt của đầy đủ các chất dinh dưỡng trong phân bón: đã giảm được tỷ lệ quả rụng, quả 1 nhân, tỷ lệ quả tươi/nhân, tăng kích thước và trọng lượng quả góp phần tăng năng suất và chất lượng sản phẩm cây trồng. Trong các công bón phân POLYFA thì công thức bón lượng 2000kg/ha có các chỉ tiêu về quả hơn cả.

Bảng 17: Một số chỉ tiêu chất lượng quả cà phê .

Công thức	Tỷ lệ quả rụng (%)	Tỷ lệ quả 1 nhân (%)	V100 quả (cm ³)	P 100 quả (g)	Tỷ lệ tươi/nhân
T1	18.5	9.2	114	110	4.55
T2	17.8	8.5	120	118	4.58
T3	16.8	8.1	119	118	4.42
T4	15.5	7.3	126	121	4.40
T5	14.3	7.2	132	125	4.31
LSD _{0,05}	1.76	0.8	3.1	3.0	0.08

3.6. Tình hình sâu bệnh hại của các công thức.

Bảng 18: Tình hình sâu bệnh hại của các công thức.

Công thức	Tỷ lệ bệnh (%)	
	Lở cổ rễ	Đốm cháy lá
T1	3,33	83,33
T2	3,10	43,03
T3	0,00	27,67
T4	0,00	17,78
T5	0,00	19,02

3.6.1 Năng suất và hiệu quả kinh tế của việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA

Bảng 19: Năng suất cà phê nhân năm 2002- 2003

Công thức	Năm 2002		Năm 2003		Tổng 2 năm	
	tấn/ha	%	tấn/ha	%	tấn/ha	%
T1	3.42	100.00	3.35	100.00	6.77	100.00
T2	3.58	112.57	3.92	117.01	7.77	114.77
T3	3.80	111.11	3.90	116.42	7.70	113.74
T4	3.92	114.62	4.25	126.87	8.17	120.68
T5	3.94	115.20	4.30	128.36	8.24	121.71

Bảng 20: Lượng toán hiệu quả kinh tế ở các công thức sử dụng sử dụng phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA

Công thức	Đầu tư (1000đ/ha)		Thu nhập (1000đ/ha)		Thặng dư (1000/ha)	VCR
	Phân bón	Tăng	cà phê	Tăng		
T1	6780	-	97990	-	91210	-
T2	10280	3500	112840	14850	102560	1.12
T3	83380	1600	111900	13910	103520	1.13
T4	9180	2400	119290	21300	110110	1.20
T5	9800	3200	120380	22390	110400	1.21

(Tiền lãi chưa tính tiền thuê nhân công và các chi phí phụ khác vì các chi phí đó ở các lô thí nghiệm là như nhau)

Đơn giá tính toán:

- Urea: 2760đ/kg
- Lân Văn điển: 1000đ
- Cà phê nhân: 12.000đ
- Phân chuồng: 350đ
- Phân bón hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA: 800đ

Kết quả năng suất thụ hoạch ở cả 2 năm 2002-2003 cho thấy giữa các công thức năng suất có sự khác nhau rất có ý nghĩa. Tính toán sơ bộ hiệu quả kinh tế ở các công thức đầu tư phân bón khác nhau cho thấy bón hoàn toàn phân khoáng cho hiệu quả kinh tế thấp, số tiền lãi thấp hơn là bổ sung phân chuồng và phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA (hệ số lãi VCR = thặng dư (lô thí nghiệm)/ thặng dư (lô đối chứng) đều >1 chứng tỏ phân bón hữu cơ vi sinh đa chủng có ý nghĩa về mặt kinh tế (bảng 12)).

3.6.2. Kết luận về phần khảo nghiệm hoạt lực của phân đa chủng

Từ những kết quả nghiên cứu trên ta có thể rút ra một số kết luận sau:

3.6.2.1. Đối với cây bông:

- Tình hình sâu bệnh và sinh trưởng của cây bông ở các công thức bón phân POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng (120 kg N + 60 kg P₂O₅ + 60 kg K₂O) /ha không sai khác so với công thức đối chứng bón phân đơn. Tuy nhiên, các công thức bón phân POLYFA loại CF và CFM có bổ

sung thêm phân đơn cho đủ lượng ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$) /ha không thấy xuất hiện bệnh lở cổ rễ. Bệnh này do nấm *F. oxporum* gây hại.

- Các công thức bón phân POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng ($120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$) /ha cho số quả/cây, số quả/m², năng suất lý thuyết và năng suất thực thu cao hơn có ý nghĩa so với công thức đối chứng bón phân đơn.

- Các công thức bón phân hữu cơ đa chủng POLYFA loại CF và CFM có bổ sung thêm phân đơn cho đủ lượng $120 \text{ kg N} + 60 \text{ kg P}_2\text{O}_5 + 60 \text{ kg K}_2\text{O}$ /ha cho tổng thu và phân thu sau khi trừ chi phí bón phân lớn hơn công thức đối chứng bón phân đơn và lãi trên 680 000 đồng/ha.

3.6.3. Đối với cây cà phê:

- Có thể dùng bón lót hoặc bón thúc kết hợp với phân khoáng vô cơ.
- Phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA cải thiện tốt độ phì nhiêu của đất: tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng, tăng độ xốp, tăng sức giữ ẩm cho đất; không thấy xuất hiện bệnh lở cổ rễ.
- Phân hữu cơ vi sinh đa chủng POLYFA giúp tăng chất lượng quả cà phê, tăng năng suất và đem lại hiệu quả kinh tế cao cho người sản xuất (hệ số lãi VCR đều >1).

3.7. Kết quả sản xuất chế phẩm:

- Đã xây dựng được 1 pilot
- Trong năm 2003-2004 đã sản xuất được 400 kg chế phẩm vi sinh chức năng đa chủng và phối hợp với xí nghiệp phân bón Polyfa Buôn Ma thuật Đặc sản xuất 400 tấn phân bón chức năng đa chủng nền hữu cơ POLYFA.

3.8. Kết quả đào tạo

- 01 - Thạc sỹ
- 04 - sinh viên tốt nghiệp CN

3.9. Các công trình đã công bố:

Đã có 7 trình tự gen đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế

1. Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Kim Cúc, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Hoàng Thị Hằng, Lê Trần Bình, 2001. Định loài chủng vi khuẩn HN51 ứng dụng trong chế phẩm phân bón vi sinh Microcom. Tạp chí Di truyền và Ứng dụng, N2, 30-34

2. Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Kim Cúc, 2002. Tuyển chọn và nghiên cứu một số tính chất của vi khuẩn phân giải photphat khó tan phân lập từ đất trồng bông ở Tây nguyên. TC Di truyền học và Ứng dụng, 4, 31-36.
3. Phạm Việt Cường, Phạm Văn Duyệt, Nguyễn Thị Kim Cúc, 2002. Hoạt tính cố định N_2 của một số chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng cây hoa mầu tại Hà nội. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 40, số đặc biệt, 173-178.
4. Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Văn Toàn, Phạm Đức Thuận, Phạm Việt Cường, 2002. Định danh loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử và nghiên cứu khả năng kháng Fusarium của chủng vi nấm CC 5.10 phân lập tại Việt nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 40, số đặc biệt, 168-172.
5. Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Kim Cúc, 2003. Một số đặc điểm của vi khuẩn sinh tổng hợp IAA (Indole-3-acetic acid) phân lập từ vùng rễ cây đậu tương. TC Nông nghiệp và PT Nông thôn, số 3, 276-278.
6. Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Việt Cường, 2003. Vi sinh vật kháng nấm gây bệnh cây và khả năng ứng dụng trong phòng trừ bệnh cây. TC Nông nghiệp và PT Nông thôn, số 7, 845-846 & 851.
7. Nguyễn Thị Kim Cúc, Phạm Việt Cường 2003. Sinh tổng hợp indol acetic axit của một số chủng vi khuẩn chi Bacillus phân lập tại Việt nam. TC Nông nghiệp và PT Nông thôn (sẽ in 8/2003).
8. Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Kim Cúc, 2003. Phân lập và định tên vi khuẩn chi Pseudomonas kháng khuẩn/nấm gây bệnh cho cây trồng bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16s ARN riboxom. . TC Nông nghiệp và PT Nông thôn).

Viện Công nghệ Sinh học

Người viết báo cáo



Trưởng Viện
Phạm Việt Cường

Phạm Việt Cường

PHỤ LỤC

BAO CÁO KẾT QUẢ SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM PHÂN BÓN VI SINH ĐA CHỨC NĂNG

Kiểm định Viện Công nghệ sinh học - Viện khoa học và công nghệ Việt Nam

Trong hai năm 2003 — 2004 Xi nghiệp phân bón POLYFA thuộc Công ty Cổ phần Bùn Ma Thuật đã tiếp nhận chế phẩm Vi sinh chức năng đa chủng và Công Viện Công nghệ sinh học sản xuất thử nghiệm được 400 tấn phân Vi sinh chức năng đa chủng loại POLYFA. Sản phẩm đã được đầu tư cho sản xuất cả phân và bón cho công nhân trong công ty. Đồng thời một phần bán ra ngoài phục vụ cho nông dân trong vùng bông tiêu. Sản phẩm đã được người tiêu dùng đánh giá cao và bắt đầu được thị trường chấp nhận, vì nó nhiều đặc tính làm tăng độ phì và làm giảm được bệnh vàng lá, thối rễ của cây cà phê, tiêu và bông vải.

Vì vậy kính đề nghị quý Viện trong tương lai sẽ kết hợp chặt chẽ hơn nữa cùng Công ty không ngừng nâng cao chất lượng tổ chức sản xuất với quy mô lớn sản phẩm phân bón trên.

Bùn Ma Thuật, ngày tháng năm 2004



NGUYỄN QUANG THỤ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM
CỦA PHÂN BÓN HỮU CƠ VI SINH CN ĐA CHỦNG
(Tại Nông trường Chư Quynh)

Trong năm 2003 – 2004 Viện Công Nghệ Sinh học đã đầu tư bón vi sinh hữu cơ đa chủng cho Nông trường Chư Quynh – Krông Na – DakLak.

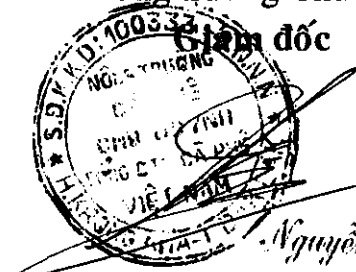
- Loại phân bón vi sinh hữu cơ đa chủng số lượng : 150 tấn
 - Loại phân bón này đã triển khai bón làm hai đợt (bón lót và bón thúc) cho tổng diện tích các lô cà phê, điều mới trồng và bông khoảng 100ha
- Nhận xét kết quả trên các lô cà phê, điều trồng mới, bông :

- Không phát hiện thấy bệnh lở cổ rễ trên diện tích rộng. Diện tích trồng cà phê, điều trồng mới và bông không bón phân hữu cơ vi sinh đa chủng thì thấy xuất hiện bệnh lở cổ rễ : rễ bị đen và có biểu hiện thối, lá cây bị vàng úa nhiều, cành và thân kém phát triển.

- Đất quanh gốc cây rất tươi xốp, độ mùn tăng, đất không có chai cứng
- Năng suất cà phê cao hơn so với năng suất của cà phê không bón khoảng 8%

Phân bón vi sinh hữu cơ vi sinh đa chủng đã làm giảm bệnh lở cổ rễ, làm đất tươi xốp, tăng năng suất cho cây cà phê. Ban giám đốc Nông trường Chư Quynh đề nghị Viện Công Nghệ sinh học tiếp tục tạo điều kiện đầu tư phân bón hữu cơ vi sinh đa chủng cho nông trường trong năm tiếp theo.

Buôn Ma Thuột, ngày 12 tháng 12 năm 2004
Nông trường Chư Quynh


Nguyễn Chí Tình

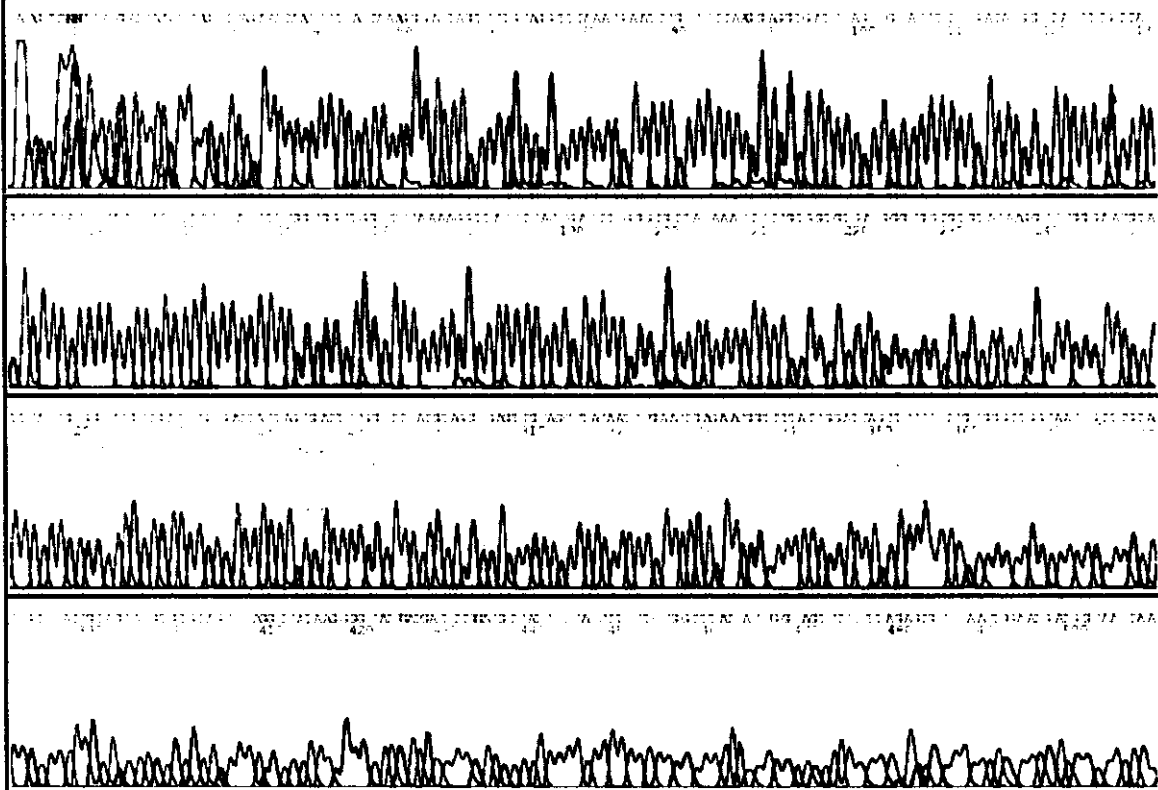


Model 377
Version 3.7
Basecaller 377.bcp
BC 1.3.0.0

30CG67 M13R ab1
CG67-M13R
Cap 30

Signal G.749 A 429 T.351 C.466
DT377(BDx3)v1.mob
BD_MultiV3.mbr
Points 1257 to 10620 Ph 1 Loc 1257

Page 1 of 2
Wed Jul 10, 2002 8:02 AM
Tue Jul 09, 2002 10:18 AM
Spacing: 10.71(10.71)

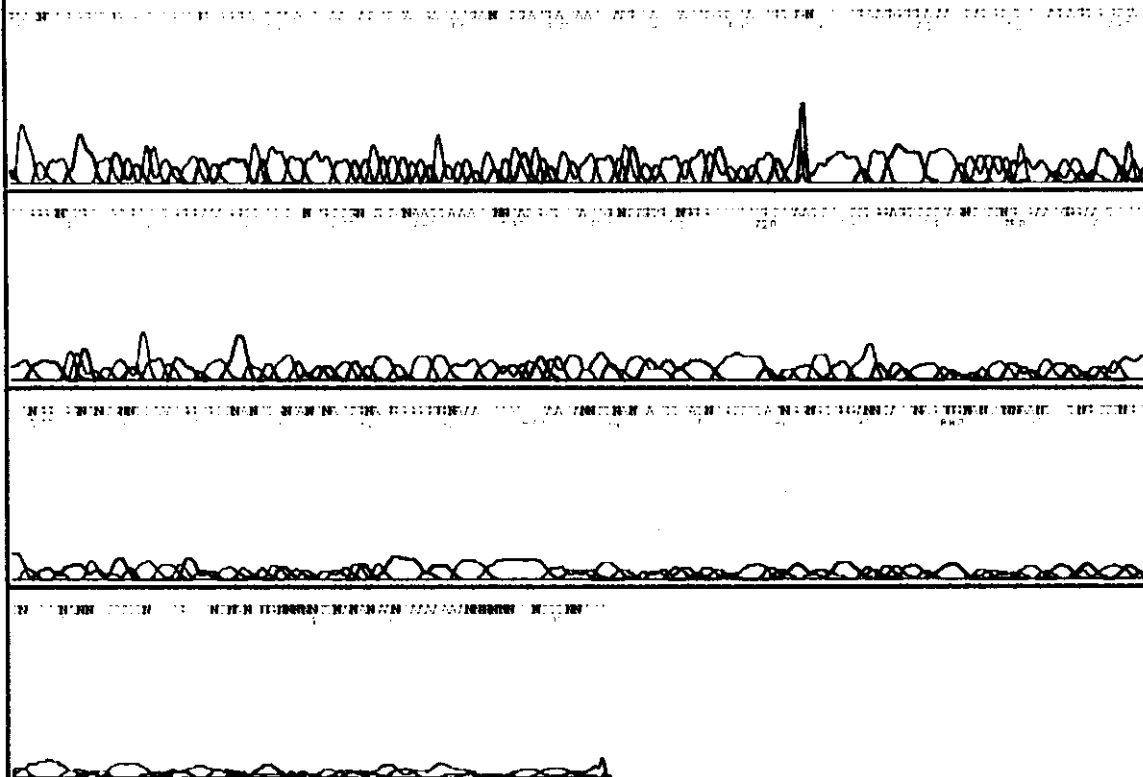




Model 377
Version 3.7
Basecaller: 377.bcp
BC 1.3.0.0
30CG67-M13R.ab1
CG67-M13R
Cap 30

Signal G.749 A 429 T:361 C:468
DT377(BDv3v1.mbc
BD_MutataV3.mbc
Points 1257 to 10820 Ph 1 Loc 1257

Page 2 of 2
Wed Jul 10, 2002 8:02 AM
Tue Jul 09, 2002 10:16 AM
Spacing: 10.71(10.71)



AS8: co dinh nito, sinh IAA

>>EM_PRO:AB043865 AB043865.1 *Bacillus horikoshii* gene fo (1521 nt)
 initn: 7266 initl: 7266 opt: 7272 Z-score: 3627.3 bits: 683.9 E(): 1.8e-194
 banded Smith-Waterman score: 7272; 98.527% identity (98.527% ungapped) in 1494
 nt overlap (1-1494:19-1512)

	10	20	30	40	
Sequen	GGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG				
EM_PRO	GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG				
	10	20	30	40	50
	50	60	70	80	90
Sequen	GATCTTTCAAAGCTTGCTTTTGAAGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA				
EM_PRO	GATCTTTCAAAGCTTGCTTTTGAAGGTGAGTAACACGTGGGCA				
	70	80	90	100	110
	110	120	130	140	150
Sequen	ACCTTCCTGTGAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATAAGG				
EM_PRO	ACCTGCCTGTGAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATAAGG				
	130	140	150	160	170
	170	180	190	200	210
Sequen	AACCTCCTGGTTCTTTATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTCACAGATGGGCCCGCGGC				
EM_PRO	AACCTCCTGGTTCTTTATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTCACAGATGGGCCCGCGGC				
	190	200	210	220	230
	230	240	250	260	270
Sequen	GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA				
EM_PRO	GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA				
	250	260	270	280	290
	290	300	310	320	330
Sequen	GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG				
EM_PRO	GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG				
	310	320	330	340	350
	350	360	370	380	390
Sequen	GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCT				
EM_PRO	GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCT				
	370	380	390	400	410
	410	420	430	440	450
Sequen	TCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTT				
EM_PRO	TCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTT				
	430	440	450	460	470
	470	480	490	500	510
Sequen	GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG				
EM_PRO	GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG				
	490	500	510	520	530
	530	540	550	560	570
Sequen	GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT				
EM_PRO	GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT				
	550	560	570	580	590
	590	600	610	620	630
	630	640			


```

EM_PRO  CAAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCCCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA
          1270      1280      1290      1300      1310      1320

          1310      1320      1330      1340      1350      1360
Sequen  ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO  ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
          1330      1340      1350      1360      1370      1380

          1370      1380      1390      1400      1410      1420
Sequen  GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO  GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCG
          1390      1400      1410      1420      1430      1440

          1430      1440      1450      1460      1470      1480
Sequen  GTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_PRO  GTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT
          1450      1460      1470      1480      1490      1500

          1490      1500
Sequen  AACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCG
          :::::::::: ::
EM_PRO  AACAAGGTAACCCCTGAATTC
          1510      1520

```

DC17: Doi khang

>>EM_PRO:AF134704 AF134704.1 *Pseudomonas fluorescens* rib (5679 nt)
initn: 7287 initl: 3989 opt: 7284 Z-score: 3718.2 bits: 702.6 E(): 4.2e-200
banded Smith-Waterman score: 7284; 97.513% identity (97.641% ungapped) in 1528
nt overlap (1-1528:476-2001)

```

                                10      20      30
Sequen      AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCT
              .....
EM_PRO TTTCTCAAACCCAAAGATGTTTGAAGTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCT
      450      460      470      480      490      500

                                40      50      60      70      80      90
Sequen      GGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTGCACCTCTTGAGAGC
              .....
EM_PRO GGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTGCACCTCTTGAGAGC
      510      520      530      540      550      560

                                100     110     120     130     140     150
Sequen      GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGGAAAC
              .....
EM_PRO GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGGAAAC
      570      580      590      600      610      620

                                160     170     180     190     200     210
Sequen      GGGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTA
              .....
EM_PRO GGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTA
      630      640      650      660      670      680

                                220     230     240     250     260     270
Sequen      TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT
              .....
EM_PRO TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT
      690      700      710      720      730      740

                                280     290     300     310     320     330
Sequen      CCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCT
              .....
EM_PRO CCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCT
      750      760      770      780      790      800

                                340     350     360     370     380     390
Sequen      ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
              .....
EM_PRO ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC
      810      820      830      840      850      860

                                400     410     420     430     440     450
Sequen      GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAAAC
              .....
EM_PRO GTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAAAC
      870      880      890      900      910      920

                                460     470     480     490     500     510
Sequen      TAATACGTTAGTGCTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCA
              .....
EM_PRO TAATACGTTAGTGCTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCA
      930      940      950      960      970      980

                                520     530     540     550     560     570
Sequen      GCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
              .....
EM_PRO GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
      990     1000     1010     1020     1030     1040
```

	580	590	600	610	620	630
Sequen	GGTGGTTCGT	TAAAGTTGGAT	GTGAAAGCCCCGGG	CTCAACCTGGG	AACTGCATCCAA	AAAC
EM_PRO	GGTGGTTTGT	TAAAGTTGGAT	GTGAAAGCCCCGGG	CTCAACCTGGG	AACTGCATTCAA	AAAC
	1050	1060	1070	1080	1090	1100

	640	650	660	670	680	690
Sequen	TGGCGAGCTAG	AGTACGGTAG	AGGGTGGTGA	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	TGCGTAG
EM_PRO	TGACAAGCTAG	AGTATGGTAG	AGGGTGGTGA	ATTTCCTGTG	TAGCGGTGAA	TGCGTAG
	1110	1120	1130	1140	1150	1160

	700	710	720	730	740	750
Sequen	ATATAGGAAG	GAACACCAGT	GGCGAAGGCG	ACCACCTGGA	CTGATACTGA	CTGAGGTG
EM_PRO	ATATAGGAAG	GAACACCAGT	GGCGAAGGCG	ACCACCTGGA	CTGATACTGA	CTGAGGTG
	1170	1180	1190	1200	1210	1220

	760	770	780	790	800	810
Sequen	CGAAAGCGTGG	GAGCAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAA	ACGATGTC
EM_PRO	CGAAAGCGTGG	GAGCAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAA	ACGATGTC
	1230	1240	1250	1260	1270	1280

	820	830	840	850	860	870
Sequen	AACTAGCCGTT	GGTGGTTCCT	TGAGAACTTAG	TGGCGCAGCT	AACGCATTA	AAGTTGACCG
EM_PRO	AACTAGCCGTT	--GGAGCCTT	GAGCTCTTAG	TGGCGCAGCT	AACGCATTA	AAGTTGACCG
	1290	1300	1310	1320	1330	1340

	880	890	900	910	920	930
Sequen	CCTGGGGAGT	ACGCCGCAAG	GTTAAAACTC	AAATGAATTG	ACGGGGCCCG	CACAAGCG
EM_PRO	CCTGGGGAGT	ACGCCGCAAG	GTTAAAACTC	AAATGAATTG	ACGGGGCCCG	CACAAGCG
	1350	1360	1370	1380	1390	1400

	940	950	960	970	980	990
Sequen	GTGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCTGGCCT	TGACATGCTG
EM_PRO	GTGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GAAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACAGGCCT	TGACATCAA
	1410	1420	1430	1440	1450	1460

	1000	1010	1020	1030	1040	1050
Sequen	AGAACTTTCAG	AGATGGATTG	GTGCCTTCGG	GAACCTCAG	ACAGGTGCTG	CATGGCTG
EM_PRO	TGAACCTTTCAG	AGATGGATTG	GTGCCTTCGG	GAACATTGAG	ACAGGTGCTG	CATGGCTG
	1470	1480	1490	1500	1510	1520

	1060	1070	1080	1090	1100	1110
Sequen	TCGTCAGCTCG	TGTCGTGAG	ATGTTGGGT	TAAAGTCCCG	TACGAGCGCA	ACCCTTGTCCT
EM_PRO	TCGTCAGCTCG	TGTCGTGAG	ATGTTGGGT	TAAAGTCCCG	TACGAGCGCA	ACCCTTGTCCT
	1530	1540	1550	1560	1570	1580

	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Sequen	TAGTTACCAGC	ACGTTATGGT	GGGCACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGACAAAC	CGGAGGAA
EM_PRO	TAGTTACCAGC	ACGTAATGGT	GGGCACTCTA	AGGAGACTGCC	GGTGACAAAC	CGGAGGAA
	1590	1600	1610	1620	1630	1640

	1180	1190	1200	1210	1220	1230
Sequen	GGTGGGGATG	ACGTCAAGT	CATCATGGCC	CTTACGGCC	AGGGCTACAC	ACGTGCTACA
EM_PRO	GGTGGGGATG	ACGTCAAGT	CATCATGGCC	CTTACGGCC	TGGGTACAC	ACGTGCTACA
	1650	1660	1670	1680	1690	1700

	1240	1250	1260	1270	1280	1290
Sequen	GGTCCGTACA	AAGGGTTGCC	AAGCCGCGAG	GTGGAGCTA	ATCCCATAAA	ACCGATCGTAG

DC29: DOI KHANG

>>EM_PRO:AF521652 AF521652.1 Pseudomonas sp. 9-1 16S rib (1528 nt)
initn: 3996 initl: 3996 opt: 7613 Z-score: 3927.0 bits: 739.4 E(): 3.7e-211
banded Smith-Waterman score: 7613; 99.869% identity (99.935% ungapped) in 1529
nt overlap (1-1529:1-1528)

	10	20	30	40	50	60
Sequen	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC					
						
EM_PRO	AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
Sequen	GGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT					
						
EM_PRO	GGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
Sequen	GCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA					
						
EM_PRO	GCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGCGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGA					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
Sequen	GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTT					
						
EM_PRO	GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTT					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
Sequen	GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA					
						
EM_PRO	GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
Sequen	CACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA					
						
EM_PRO	CACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
Sequen	ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAG					
						
EM_PRO	ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAG					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460	470	480
Sequen	CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTACTTACCTAATACGTGAGTATTTTGACGTTACCGACA					
						
EM_PRO	CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTACTTACCTAATACGTGAGTATTTTGACGTTACCGACA					
	430	440	450	460	470	480
	490	500	510	520	530	540
Sequen	GAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA					
						
EM_PRO	GAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTA					
	490	500	510	520	530	540
	550	560	570	580	590	600
Sequen	ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC					
						
EM_PRO	ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCC					
	550	560	570	580	590	600
	610	620	630	640	650	660

Sequen	CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTG				
EM_PRO	CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTG				
	610	620	630	640	650
	670	680	690	700	710
Sequen	GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGAAGGCG				
EM_PRO	GAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCACTGGCGAAGGCG				
	670	680	690	700	710
	730	740	750	760	770
Sequen	ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT				
EM_PRO	ACCACCT-GACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT				
	730	740	750	760	770
	790	800	810	820	830
Sequen	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAG				
EM_PRO	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAG				
	780	790	800	810	830
	850	860	870	880	890
Sequen	TGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCA				
EM_PRO	TGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCA				
	840	850	860	870	890
	910	920	930	940	950
Sequen	AATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG				
EM_PRO	AATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG				
	900	910	920	930	950
	970	980	990	1000	1010
Sequen	AAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG				
EM_PRO	AAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG				
	960	970	980	990	1010
	1030	1040	1050	1060	1070
Sequen	GAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA				
EM_PRO	GAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA				
	1020	1030	1040	1050	1070
	1090	1100	1110	1120	1130
Sequen	GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAA				
EM_PRO	GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAA				
	1080	1090	1100	1110	1130
	1150	1160	1170	1180	1190
Sequen	GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTT				
EM_PRO	GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTT				
	1140	1150	1160	1170	1180
	1210	1220	1230	1240	1250
Sequen	ACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGT				
EM_PRO	ACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGT				
	1200	1210	1220	1230	1250
	1270	1280	1290	1300	1310
Sequen	GGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA				
EM_PRO	GGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA				
	1270	1280	1290	1300	1310

EM_PRO	GGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA					
	1260	1270	1280	1290	1300	1310
		1330	1340	1350	1360	1370
Sequen	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG					
	AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG					
EM_PRO	1320	1330	1340	1350	1360	1370
		1390	1400	1410	1420	1430
Sequen	TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTC					
	TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTC					
EM_PRO	1380	1390	1400	1410	1420	1430
		1450	1460	1470	1480	1490
Sequen	GGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT					
	GGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT					
EM_PRO	1440	1450	1460	1470	1480	1490
		1510	1520			
Sequen	AGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT					
	AGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT					
EM_PRO	1500	1510	1520			

GE16: phan huy photpho, sinh IAA

>>EM_PRO:AY548955 AY548955.1 *Bacillus pumilus* strain S9 (1544 nt)
initn: 7281 initl: 4477 opt: 7408 Z-score: 3401.6 bits: 642.2 E(): 6.8e-182
banded Smith-Waterman score: 7408; 98.189% identity (98.635% ungapped) in 1546
nt overlap (2-1547:1-1539)

	10	20	30	40	50	60
Sequen	TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAG					
EM_PRO	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAG					
	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	120
Sequen	CGGACAGATAGGGAGCTTGCTTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGG					
EM_PRO	CGGACAGA-AGGGAGCTTGC-TCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGG					
	60	70	80	90	100	110
	130	140	150	160	170	180
Sequen	TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCT					
EM_PRO	TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCT					
	120	130	140	150	160	170
	190	200	210	220	230	240
Sequen	TGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCG					
EM_PRO	TGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCG					
	180	190	200	210	220	230
	250	260	270	280	290	300
Sequen	GCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA					
EM_PRO	GCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA					
	240	250	260	270	280	290
	310	320	330	340	350	360
Sequen	GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT					
EM_PRO	GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT					
	300	310	320	330	340	350
	370	380	390	400	410	420
Sequen	AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT					
EM_PRO	AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT					
	360	370	380	390	400	410
	430	440	450	460	470	480
Sequen	TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACC					
EM_PRO	TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACC					
	420	430	440	450	460	470
	490	500	510	520	530	540
Sequen	TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT					
EM_PRO	TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT					
	480	490	500	510	520	530
	550	560	570	580	590	600
Sequen	AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT					
EM_PRO	AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT					
	540	550	560	570	580	590
	610	620	630	640	650	660

67

EM_PRO GGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
1260 1270 1280 1290 1300 1310
Sequen 1330 1340 1350 1360 1370 1380
CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
EM_PRO CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
1320 1330 1340 1350 1360 1370
Sequen 1390 1400 1410 1420 1430 1440
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGA
EM_PRO AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGA
1380 1390 1400 1410 1420 1430
Sequen 1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGA
EM_PRO AGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGA
1440 1450 1460 1470 1480 1490
Sequen 1510 1520 1530 1540
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCC
EM_PRO AGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT
1500 1510 1520 1530 1540

BÁO CÁO ĐỀ TÀI KHCN 04 04
Nhánh đề tài Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

BÁO CÁO TỔNG KẾT NHÁNH ĐỀ TÀI

**SẢN XUẤT PHÂN VI SINH ĐA CHỨC NĂNG
CHO CÁC LOÀI KEO, BẠCH ĐÀN VÀ THÔNG
QUI MÔ PILOT**

Chủ trì nhánh đề tài:

TS. Phạm Quang Thu

Trưởng phòng nghiên cứu bảo vệ rừng
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

Cán bộ tham gia nhánh đề tài

- Trần Thanh Trăng
- Nguyễn Thị Hoàng Yến
- Nguyễn Thuý Nga
- Lương Thị Thu Hà

Phần 1: MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Theo thống kê năm 1999, cả nước ta đã trồng được 288.073 ha rừng các loài keo, trong đó rừng trồng thuần loài là 164.288 ha và rừng trồng hỗn giao là 63.785 ha. Keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd) và keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* Cunn.), và gần đây đã tạo ra được các dòng keo lai (keo lai từ keo lá tràm x keo tai tượng) là các loài cây trồng quan trọng hiện nay được cho là các loài cây trồng rừng chính bởi một số lý do sau:

- Cây sinh trưởng nhanh, gỗ dùng làm nguyên liệu cho các ngành công nghiệp.
- Thích hợp với nhiều loại đất và vùng sinh thái rộng.
- Có khả năng cải tạo đất do rễ cộng sinh với vi khuẩn cố định đạm.

Quan hệ cộng sinh giữa vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium* với rễ của các cây họ đậu là quá trình chung sống bên nhau cùng có lợi; vi khuẩn lấy nguồn hydrat cac bon từ cây chủ cho hoạt động sống của mình, ngược lại cây chủ sẽ được vi khuẩn cung cấp nguồn đạm vô cơ cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Quan hệ cộng sinh này có vai trò hết sức quan trọng trong sự ổn định chu trình dinh dưỡng Nitơ, bổ xung nguồn đạm cho đất và dinh dưỡng cho cây trồng, ổn định năng suất và phát triển bền vững sinh thái (Macdicken, 1994).

Nhờ có quá trình cố định đạm sinh học tự nhiên, hàng năm trên toàn thế giới có khoảng 120 – 160 triệu tấn nitơ khí quyển đã được cố định và chuyển hoá thành phân đạm dưới các dạng khác nhau (A Gibson, 1995). Lượng đạm này ước tính gấp khoảng 2 lần lượng phân bón sản xuất ra hàng năm trên toàn thế giới. Cố định đạm sinh học là một quá trình được thực hiện bởi vi khuẩn và các loại vi sinh vật khác.

Thông (*Pinus* spp.) là loài cây có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam. Theo số liệu kiểm kê rừng Việt Nam, đến năm 1999 tổng diện tích rừng trồng cả nước là 1.471.394 ha, trong đó diện tích rừng trồng thông là 218.056 ha chiếm 14,8%. Hiện nay cây thông được xem như cây trồng chính được lựa chọn cho Chương trình trồng mới 5 triệu ha rừng của Nhà nước.

Trong thực tế sản xuất, cây thông con ở vườn ươm thường bị bệnh thối nhũn (damping-off) với 4 triệu trứng điển hình: thối mầm hạt, đổ gục, chết đứng và khô đầu lá do các loài nấm *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. ... gây ra đã gây lên sự thiệt hại rất lớn cho sản xuất cây con ở vườn ươm cũng như chất lượng cây thông con khi đưa đi trồng rừng. Trong sản xuất, người ta cũng đã áp dụng nhiều biện pháp để ngăn chặn sự phá hại của dịch bệnh như: gieo ươm hạt thông vào thời vụ không thích hợp với sự phát triển của nấm bệnh hoặc dùng thuốc hoá học Benlate để phòng trừ. Thực tế cho thấy các

biện pháp này ngày càng tỏ ra không đạt được hiệu quả cao, không kiểm soát được dịch bệnh do không chủ động được về thời tiết và do dùng liên tục 1 loại thuốc bảo vệ thực vật nên đã hình thành tính kháng thuốc ở các loại nấm bệnh, ngoài ra đối với biện pháp hoá học còn gây tác hại xấu đối với sức khoẻ con người và gây ô nhiễm môi trường.

Xuất phát từ thực tế trên, ở Việt Nam cũng đã có nhiều tác giả đi sâu vào việc phân lập các vi sinh vật như: vi nấm (*Trichoderma* spp), xạ khuẩn (*Actinomyces* spp., *Streptomyces* spp.) và vi khuẩn (*Bacillus* spp.) từ môi trường đất hoặc nước có khả năng sản sinh ra các chất kháng sinh và nghiên cứu tách chiết và sử dụng các chất kháng sinh, sản xuất chế phẩm phục vụ việc phòng trừ các sinh vật gây bệnh cho thực vật.

Để góp phần hạn chế sự phát triển của dịch bệnh đối với cây trồng, tạo ra cây con ở vườn ươm có chất lượng cao, đảm bảo cho việc trồng rừng có hiệu quả, việc nghiên cứu sản xuất phân vi sinh hỗn hợp giữa gồm nhiều loài vi sinh vật: vi khuẩn cộng sinh cố định đạm, nấm cộng sinh, vi sinh vật phân giải phốt phát khó tan và vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh là một việc làm cần thiết nhằm nâng cao năng suất và chất lượng cây rừng, đảm bảo thành công trong việc trồng rừng mới trên các lập địa nghèo chất dinh dưỡng.

2. Tình hình ứng dụng nấm cộng sinh của một số nước trên thế giới:

Trong quá trình sản xuất cây con ở vườn ươm, đặc biệt là các loài cây lá kim sẽ bị thất bại nếu như thiếu vắng mối quan hệ cộng sinh giữa nấm và cây con. Nấm cộng sinh làm nhiệm vụ phân giải các chất dinh dưỡng ở dạng khó tan thành dễ tan và hấp thụ dinh dưỡng khoáng và nước cho cây trồng. Khi không có mối quan hệ cộng sinh này cây trồng thường không đủ chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển dẫn đến cây con sinh trưởng kém, bị vàng còi. Khi trồng những cây con này trên các lập địa nghèo chất dinh dưỡng, đất thoái hoá sẽ gặp nhiều trở ngại và khó tránh khỏi thất bại. Trong nhiều thập kỷ qua, các nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành nhiệm vụ cho cây con ở vườn ươm với các loài nấm cộng sinh đã được tuyển chọn cho phù hợp với loài cây và điều kiện lập địa nhằm nâng cao chất lượng cây con ở vườn ươm và chất lượng của rừng trồng, điển hình là công trình của Bowen 1965; Mikola 1973; Trappe 1977; Molina và Trappe 1982, Marx và Cordell 1988. Tuy nhiên việc ứng dụng nấm cộng sinh trong việc nhiệm vụ cho cây con ở vườn ươm được thực hiện khác nhau tùy theo điều kiện của mỗi nước.

2.1. Tình hình sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh ở Mỹ:

Ở Mỹ từ hai thập kỷ qua, các nhà khoa học Nông – Lâm thuộc Viện Nghiên cứu và phát triển nấm (IRMD) đã tiến hành nghiên cứu xác định vai trò và ý nghĩa của nấm ngoại cộng sinh đối với sinh đối với sinh trưởng và

phát triển của cây con trong các điều kiện khác nhau. Hầu hết các công trình đều tập trung nghiên cứu về nấm *Pisolithus tinctorius* (viết tắt là Pt) bởi lẽ tính thích ứng của nó với nhiều vùng sinh thái, nhiều loài cây chủ, có khả năng chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường và hệ sợi của nó dễ nuôi cấy trong môi trường nhân tạo (Schramm, 1966; Marx, 1980, 1981; Marx và cộng sự 1984). Chế phẩm Pt được sản xuất theo các công thức đã được thương mại hoá và việc nhiễm chế phẩm cho cây con đã được áp dụng trên toàn quốc. Marx 1980 đã sản xuất chế phẩm hệ sợi nấm Pt trên nền giá thể than bùn và vermiculite, điều chỉnh tỷ lệ các thành phần sao cho pH môi trường đạt 4.8-5.5, giá thể được làm ẩm với môi trường dinh dưỡng MMN. Công thức giá thể này rất phù hợp với sự phát triển của nấm và được nhiều nước áp dụng để sản xuất chế phẩm trên quy mô lớn. Bào tử nấm Pt cũng được dùng để sản xuất chế phẩm nhiễm cho cây trên quy mô lớn. Các công trình nghiên cứu mới đây khẳng định khả năng cộng sinh và làm tăng sinh trưởng của cây của loại chế phẩm này. Theo Marx và cộng sự năm 1989: Bào tử nấm Pt được thu từ thể quả của nấm ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, cộng sinh với nhiều loài cây chủ đã tạo cho chế phẩm bằng bào tử có tính đa dạng về mặt sinh học hơn chế phẩm bằng hệ sợi. Năm 1989 hơn 8 triệu cây con đã được nhiễm chế phẩm bằng hệ sợi và nhiều triệu cây con đã được nhiễm chế phẩm bằng bào tử.

2.2. Tình hình sản xuất nấm cộng sinh ở Pháp

Ở Pháp: Đã tiến hành nhiễm nấm ngoại cộng sinh cho các cây con ở vườn ươm nhằm 2 mục đích: tăng sinh trưởng của cây, nâng cao hiệu quả của việc trồng rừng và nâng cao khả năng sản xuất nấm ăn (Le Tacon và cộng sự năm 1988). Quy trình sản xuất chế phẩm và nhiễm nấm cộng sinh cho cây con cũng tương tự như ở Mỹ. Từ năm 1973 các cây con được nhiễm nấm cộng sinh phục vụ cho việc trồng rừng đã được sản xuất ở các vườn ươm quy mô lớn và mang tính thương mại. Quy trình lên men công nghiệp đã áp dụng thành công trong việc sản xuất chế phẩm bằng hệ sợi. Các kết quả thí nghiệm nhiễm nấm cộng sinh cho các loài cây con ở vườn ươm đã được Le Tacon và cộng sự tổng kết năm 1988. Hầu hết các công trình nghiên cứu đều tập trung vào một số loài cây, đặc biệt là các loài cây lá kim. Các loài nấm cộng sinh được chú ý nhiều là *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata* và *Laccaria bicolor*.

2.3. Tình hình sản xuất nấm cộng sinh ở Canada

Ở Canada: Các công trình nghiên cứu về sản xuất chế phẩm và nhiễm chế phẩm cho cây con ở vườn ươm ở Canada cũng tập trung vào các loài cây lá kim với các loài nấm như *Pisolithus tinctorius* và *Laccaria laccata* và *Laccaria bicolor*. Từ năm 1992 Canada đã xây dựng một kế hoạch lớn là sản xuất đủ chế phẩm nấm cộng sinh để cung cấp cho các cơ sở sản xuất cây con trong phạm vi toàn quốc.

2.4. Tình hình sản xuất nấm cộng sinh ở Philippin

Ở Philippin: De La Cruz và cộng sự đã sản xuất chế phẩm nấm cộng sinh dưới dạng viên nén bằng bào tử của các loại nấm *Pisolithus tinctorius* và *Scleroderma* spp. để nhiễm cho các loài cây lá kim và các loài bạch đàn. Sau 3 tháng nấm và rễ cây đã thiết lập mối quan hệ cộng sinh với tỷ lệ khá lớn. Kết quả này thể hiện rất rõ khi nhiễm chế phẩm cho cây được trồng trên các loại đất nghèo chất dinh dưỡng và có hàm lượng nhôm tự do cao. Đường kính của các cây con được nhiễm chế phẩm tăng hơn so với đối chứng là 75% sau 16-18 tháng tuổi. Hiện nay chế phẩm bằng viên nén này đang được dùng rất phổ biến ở Philippin.

2.5. Tình hình sản xuất nấm cộng sinh ở Venezuela

Trong những năm 1970, ở Venezuela, người ta sử dụng lớp đất mặt của các rừng trồng đã khép tán trộn với đất của vườn ươm để tạo ruột bầu sản xuất cây con. Nguồn nấm cộng sinh chủ yếu là *Thelephora terrestris* có trong tự nhiên. Từ đầu năm 1980, bào tử nấm *Pisolithus tinctorius* được đưa về từ bang Georgia của Mỹ đã được sử dụng để nhiễm cho cây con các vườn ươm. Hiện nay thể quả nấm *P. tinctorius* được thu hái ở các vườn ươm đã được nhiễm nấm cộng sinh đủ để sản xuất mỗi năm 100 triệu cây con đủ để phục vụ cho chương trình trồng rừng của quốc gia.

2.6. Tình hình sản xuất nấm cộng sinh ở Việt Nam

Ở Việt Nam: về vấn đề vai trò của nấm cộng sinh đối với cây trồng cũng được quan tâm và chú ý từ rất lâu. Quy trình kỹ thuật gieo ươm thông do bộ Lâm nghiệp nay là bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn ban hành năm 1983 đã quy định tiêu chuẩn, chất lượng cây thông con khi xuất vườn phải có nấm rễ. Việc ứng dụng nấm cộng sinh trong sản xuất cây thông con ở vườn ươm ở các cơ sở sản xuất đều sử dụng lớp đất mặt của các rừng trồng thông đã khép tán trộn với đất đóng bầu nhằm lây nhiễm nguồn nấm cộng sinh có trong tự nhiên. Cách thức này xem ra hết sức đơn giản song nó cũng gây ra không ít những điểm bất lợi như: khi đào lớp đất mặt đã ảnh hưởng đến môi trường sống của các rừng trồng đã khép tán, mang theo không ít nguồn bệnh sẵn có trong tự nhiên; nguồn nấm cộng sinh không được tuyển chọn, hiệu quả không cao.

Để ứng dụng các thành tựu về khoa học và kỹ thuật trong việc sử dụng nấm cộng sinh sản xuất cây con ở vườn ươm được tiến hành theo hai hướng:

- Sử dụng bào tử nấm *Pisolithus tinctorius*
- Bước đầu nghiên cứu sử dụng chế phẩm bằng hệ sợi các loài nấm cộng sinh qua phân lập và gây nuôi thuần khiết.

Phần 2: MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh đa chủng, chức năng cho các loài keo và các loài thông.

Đánh giá hiệu lực của chế phẩm đối với các loại cây trồng

2.2. Nội dung nghiên cứu:

- Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng cho cây keo ở quy mô Pilot; công thức của chế phẩm hỗn hợp *Rhizobium* + vi sinh vật phân giải lân + vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ.

- Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm hỗn hợp chức năng cho cây bạch đàn và thông qui mô Pilot; công thức chế phẩm hỗn hợp: nấm cộng sinh *Pisolithus tinctorius* + vi sinh vật phân giải lân + vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng

2.3.1.1. Sản xuất chế phẩm vi sinh vật phân giải lân:

Sau khi tuyển chọn được những chủng có khả năng phân giải cao, tiến hành nhân sinh khối trên máy lắc trong 72 giờ. Khi số lượng tế bào đạt 10^8 - 10^{10} trong 1 ml dung dịch nuôi cấy, đưa dung dịch đã nuôi các chủng cấy vào môi trường than bùn vô trùng với liều lượng là 1 ml dung dịch trong 10g đất than bùn. Chế phẩm DTL2-2 do phòng vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học sản xuất và cung cấp.

2.3.1.2. Sản xuất chế phẩm *Rhizobium*:

Phân lập nguồn giống:

Nốt sần của cây keo sau khi rửa sạch nhiều lần bằng nước máy. khử trùng bề mặt bằng $HgCl_2$, rửa và tráng bằng nước cất vô trùng sau đó nghiền nát trong nước cất vô trùng thành dịch huyền phù. Nhỏ 1 giọt dung dịch và trang đều trên mặt thạch của các đĩa Petri chứa môi trường YMA- đỏ công gô. Các đĩa thạch này được nuôi ủ trên các tủ định ôn có nhiệt độ 28-30°C. Sau 3-5 ngày chọn các khuẩn lạc điển hình mọc riêng rẽ cấy truyền vào môi trường YMA mới. Phân

nhóm các chủng vi khuẩn được tiến hành trên môi trường YMA-Bromothymol blue. Cây vi khuẩn nốt sần phân lập được trên môi trường YMA chứa Bromothymol Blue, vi khuẩn sinh trưởng nhanh, hình thành khuẩn lạc rõ rệt sau 3 ngày, phản ứng axit màu vàng trên môi trường được xếp vào nhóm *Rhizobium*, còn vi khuẩn sinh trưởng chậm, có phản ứng màu xanh trên môi trường chứa Bromothymol blue được xếp vào nhóm *Bradyrhizobium*. Các chủng vi khuẩn hiện có của phòng thí nghiệm Nghiên cứu bảo vệ thực vật rừng chủ yếu là các chủng *Rhizobium* sinh trưởng nhanh.

Công thức môi trường YMA theo Somasegaran và Hoben, 1985:

Manitol	10 gram
K ₂ HPO ₄	0.5 gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gram
NaCl	0.1 gram
Cao nấm men	0.5 gram
Agar	15 gram
H ₂ O	1000 ml

Sản xuất giống:

Các chủng *Rhizobium* đã được tuyển chọn và đánh giá có hiệu lực cộng sinh cao đối với keo lá tràm và keo tai tượng trong kết quả thí nghiệm đối với bình Leonard sẽ được sử dụng để nhân sinh khối trên các bình tam giác 500 ml với máy lắc ngang ở tốc độ 250 vòng phút trong thời gian 72 h. Mật độ vi sinh vật đạt được 10⁸-10⁹ tế bào/ml.

Môi trường được sử dụng là YMB theo Somasegaran và Hoben, 1985:

Manitol	10 gram
K ₂ HPO ₄	0.5 gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gram
NaCl	0.1 gram
Cao nấm men	0.5 gram
H ₂ O	1000 ml

Sản xuất chế phẩm:

Chất mang: Chất mang lý tưởng cho các vi khuẩn cộng sinh *Rhizobium* có các tiêu chuẩn sau:

- Không chứa chất độc đối với *Rhizobium*
- Khả năng hấp thụ độ ẩm tốt
- Độ pH ở mức gần trung tính hoặc trung tính
- Không vón cục
- Có kích thước nhỏ để dễ bán vào hạt giống hoặc rễ cây.

Than bùn là một vật liệu có những đặc tính phù hợp với những tiêu chuẩn trên. Khi không có than bùn có thể thay thế bằng một số vật liệu khác để làm chất mang như: than đá, than củi hay bã mía nhưng không có một vật liệu nào phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của các chủng *Rhizobium* (Somasegaran & Hoben, 1985). Vì vậy, Than bùn là vật liệu đã được chọn là chất mang để sản xuất các loại chế phẩm vi sinh vật. Than bùn tiêu chuẩn ở nước ta có thành phần hữu cơ: 60%, hàm lượng axit humic từ 4 đến 8% tơi xốp và không chứa các tạp chất khác. Than bùn phơi khô, nghiền nhỏ, rây qua rây 0,1 mm.

Độ ẩm giá thể: Độ ẩm giá thể được điều chỉnh khoảng 20%, dùng vôi bột để điều chỉnh pH của giá thể đạt trị số 6.8-7.0, đóng gói và khử trùng.

Quy trình sản xuất dịch *Rhizobium* bằng thiết bị lên men:

- Chuẩn bị giống cấy: giống cấy được nhân trên bình tam giác hoặc ống nghiệm. Đổ 25 ml môi trường YMB vào bình tam giác dung tích 50 ml, khử trùng, để nguội và cấy chủng vi khuẩn đã tuyển chọn, lắc 200 vòng phút ở nhiệt độ 28-30°C.
- Chuẩn bị thiết bị lên men: bình lên men có dung tích 20 lít được nối với hệ thống bơm cấp khí qua hệ thống lọc vô trùng. Đổ 15 lít môi trường và khử trùng ở 121°C trong thời gian 3 giờ. Để môi trường nguội, cấy giống bằng syrin. Cấy 100 ml giống cho bình 15 lít môi trường.

Công thức môi trường lên men như sau (theo Burton 1967):

- Manitol	2.0 g
- Đường kính	10.0 g
- K_3PO_4	0.2 g
- KH_2PO_4	0.4 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
- NaCl	0.06 g
- $CaCO_3$	0.2 g
- $CaSO_4 \cdot H_2O$	0.04 g
- Cao nấm men	0.5 g
- $(NH_4)_2HPO_4$	0.1 g
- Nước	1000 ml

Các nguyên tố vi lượng:

- H_3BO_3	2.78 g
- $MnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.54 g
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.21 g
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5.0 g
- Na_2MoO_4	4.36 g

- CoSO ₄ .6H ₂ O	0.004 g
- Lactic axit	580 ml
- Nước	420 ml

Thêm 1 ml dung dịch vi lượng vào 1 lít môi trường như đã nêu ở trên.

- Nhiễm dịch vào túi chất mang: Bơm dịch vi khuẩn vào túi giá thể với liều lượng 25 ml/100 gram giá thể, hàn kín túi. Nuôi ủ trong điều kiện 28-30°C, sau 10 ngày đem sử dụng.

2.3.1.3. Sản xuất chế phẩm đối kháng với nấm gây bệnh

Phân lập vi khuẩn:

Các mẫu cây được ngâm khử trùng trong dung dịch cồn 70% và được cắt thành các miếng nhỏ có kích thước 0.5x1 cm. Sau đó các miếng nhỏ này được đặt trong các ống nghiệm chứa 1 ml môi trường PBS (NaCl 8.5 g, KH₂PO₄ 6.8g, NaOH 1.16 g và 1000 ml nước, pH = 7), và đưa lên máy lắc, lắc trong khoảng 4 tiếng đồng hồ với tốc độ 250 vòng/phút và ở nhiệt độ 28°C loại bỏ mẫu vật cây chuyển dung dịch của môi trường PBS trên các đĩa môi trường King B, để ở nhiệt độ 28°C, sau 48 tiếng đồng hồ vi khuẩn mọc lên. Cây truyền các khuẩn lạc mọc riêng rẽ với các hình thái phân biệt trên các đĩa môi trường King B khác, nuôi vi khuẩn trong điều kiện nhiệt độ 28°C.

Đánh giá khả năng kháng nấm bệnh *Fusarium oxysporum*:

Cấy vi khuẩn vào các đĩa môi trường PDA, đặt các đĩa Petri đã cấy vi khuẩn trong các tủ định ôn có nhiệt độ 28-30°C, sau 5-7 ngày nấm bệnh được cấy 3 điểm vào sát mép của đĩa Petri. Sau 4-5 ngày đánh giá hiệu lực ức chế sự phát triển nấm bệnh của vi khuẩn trên môi trường PDA bằng việc đo đường kính vòng ức chế.

Đường kính vòng ức chế được tính bằng công thức sau:

$$V \text{ (mm)} = D \text{ (mm)} - d \text{ (mm)}$$

Trong đó: - D là đường kính trung bình vòng ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh xung quanh khuẩn lạc tính từ điểm cấy vi khuẩn theo 3 chiều vuông góc với 3 điểm cấy nấm đến vị trí sợi nấm không thể mọc được
- d là đường kính trung bình tính theo 2 chiều vuông góc của khuẩn lạc vi khuẩn.

Sản xuất chế phẩm:

Chất mang: Tiêu chuẩn của chất mang trong việc sản xuất chế phẩm vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh cũng giống như việc sản xuất chế phẩm *Rhizobium*.

- Không chứa chất độc đối với vi khuẩn
- Khả năng hấp thụ độ ẩm tốt
- pH ở mức gần trung tính hoặc trung tính
- Không vón cục
- Có kích thước nhỏ để dễ bán vào hạt giống hoặc rễ cây.

Than bùn là vật liệu đã được chọn là chất mang để sản xuất các loại chế phẩm vi sinh vật. Than bùn tiêu chuẩn ở nước ta có thành phần hữu cơ: 60%, hàm lượng axit humic từ 4 đến 8% tối xốp và không chứa các tạp chất khác. Than bùn phơi khô, nghiền nhỏ, rây qua rây 0,1 mm.

Độ ẩm giá thể: Độ ẩm giá thể được điều chỉnh khoảng 20%, dùng vôi bột để điều chỉnh pH của giá thể đạt trị số 6.8-7.0, đóng gói và khử trùng.

Quy trình sản xuất dịch vi khuẩn kháng nấm bệnh bằng thiết bị lên men:

- Chuẩn bị giống cấy: giống cấy được nhân trên bình tam giác hoặc ống nghiệm. Đổ 25 ml môi trường PAB (24 g bột khoai tây, 15 g đường dextrose và 1000 ml nước) vào bình tam giác dung tích 50 ml, khử trùng, để nguội và cấy chủng vi khuẩn đã tuyển chọn, lắc 200 vòng phút ở nhiệt độ 28-30°C.
- Chuẩn bị thiết bị lên men: bình lên men có dung tích 20 lít được nối với hệ thống bơm cấp khí qua hệ thống lọc vô trùng. Đổ 15 lít môi trường PAB và khử trùng ở 121°C trong thời gian 3 giờ. Để môi trường nguội, cấy giống bằng syrin.
- Cấy 100 ml giống cho bình 15 lít môi trường. Thời gian lên men là 96 giờ.
- Nhiễm dịch vào túi chất mang: Bơm dịch vi khuẩn vào túi giá thể với liều lượng 25 ml/100 gram giá thể, hàn kín túi. Nuôi ủ trong điều kiện 28-30°C, sau 10 ngày đem sử dụng.

2.3.2. Kiểm tra biến động số lượng tế bào của các vi sinh vật ở chế phẩm hỗn hợp

Việc kiểm tra được tiến hành bằng phương pháp pha loãng tới hạn, cấy dung dịch pha loãng lên các môi trường tương ứng với sự phát triển của từng loại vi sinh vật. Việc kiểm tra được tiến hành định kỳ với các khoảng thời gian khác nhau

2.3.3. Đánh giá hiệu lực của chế phẩm

Đánh giá hiệu lực của chế phẩm được tiến hành tại vườn ươm với các loại cây trồng: thông nhựa, thông mã vĩ, thông caribê, keo tai tượng và keo lai.

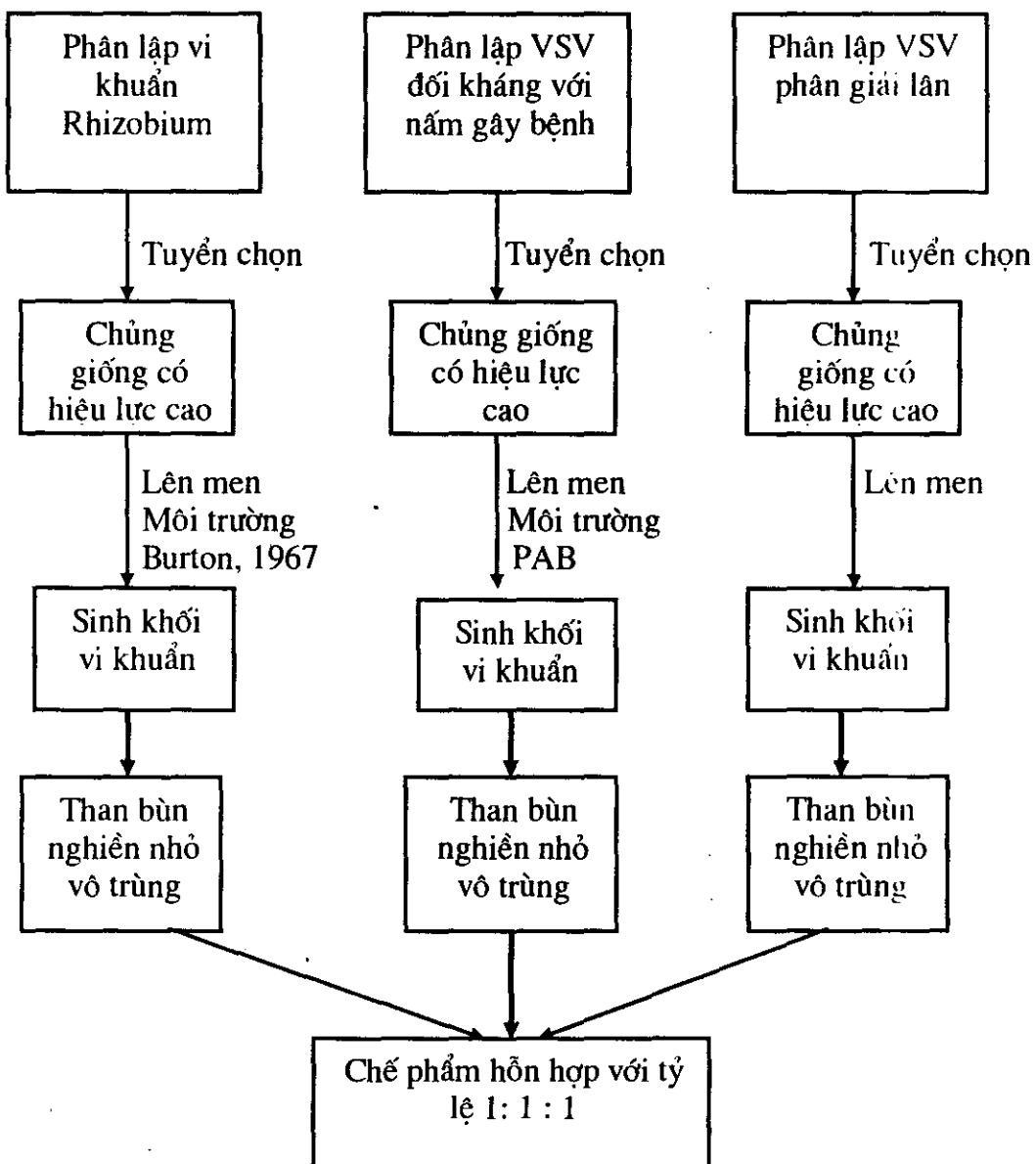
Phần 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng cho cây keo

3.1.1. Sản xuất chế phẩm hỗn hợp *Rhizobium* + vi sinh vật phân giải lân + vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ cho các loài keo:

Chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp được tạo ra bằng việc trộn các chế phẩm đơn lẻ theo tỷ lệ 1: 1 :1, đảm bảo cho mỗi loại chế phẩm khi khởi điểm có số lượng tế bào lớn hơn 10^7 trong 1g chế phẩm.

Quy trình sản xuất được tóm tắt bằng sơ đồ sau:



3.1.2. Kết quả sản xuất thử nghiệm

Từ quy trình sản xuất chế phẩm được trình bày ở phần trên trong năm 2004, nhánh đề tài đã sản xuất được 1000 kg phân vi sinh hỗn hợp cho các loài keo.

Chế phẩm bao gồm 3 thành phần vi sinh vật: vi khuẩn nốt sần cố định đạm, vi sinh vật phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ *Fusarium oxysporum*.

Chế phẩm đã được thử nghiệm ở vườn ươm và rừng trồng, cụ thể như sau:

- Thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng keo lai được thí nghiệm tại Đại Lải, Vĩnh Phúc, mô hình thí nghiệm 1.0 ha.
- Thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng keo lai được thí nghiệm tại Bầu Bàng, Bình Dương, mô hình thí nghiệm 1,0 ha.
- Thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng keo lai được thí nghiệm tại Kon Hà Nừng, Gia Lai, mô hình thí nghiệm 1,0 ha.

3.1.3. Biến động số lượng tế bào *Rhizobium* chủng AH6 và vi khuẩn kháng nấm gây bệnh chủng MD2 ở chế phẩm hỗn hợp:

Chế phẩm hỗn hợp được sản xuất trên cơ sở phối trộn của 3 loại chế phẩm đơn lẻ *Rhizobium*, vi khuẩn phân giải lân, vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh với tỷ lệ 1 : 1 : 1. Sự biến động mật độ tế bào của các loại vi sinh vật trong chế phẩm hỗn hợp theo thời gian được trình bày ở bảng 1:

Bảng 1: Biến động số lượng tế bào vi khuẩn *Rhizobium* chủng AH6, vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh, chủng MD2 ở chế phẩm hỗn hợp

TT	Thời điểm kiểm tra	Mật độ tế bào chủng AH6/1g	Mật độ tế bào chủng MD2/1g	Mật độ tế bào chủng ĐTL 2.2/1g
1	Khi sản xuất	4.52×10^7	5.00×10^7	4.50×10^7
2	Sau 10 ngày	9.50×10^8	2.50×10^8	1.00×10^{10}
3	Sau 2 tháng	1.12×10^9	4.25×10^9	1.60×10^9
4	Sau 4 tháng	7.30×10^8	9.7×10^8	1.10×10^9
5	Sau 6 tháng	4.51×10^8	3.24×10^8	8.00×10^7
6	Sau 9 tháng	7.80×10^7	$6,10 \times 10^7$	8.50×10^7
7	Sau 12 tháng	5.00×10^6	3.20×10^6	5.00×10^6

Qua bảng trên cho thấy:

- Sự sinh trưởng của các chủng vi sinh vật cộng sinh cố định đạm, chủng AH6 và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh, chủng MD2 và vi sinh vật phân giải lân chủng DTL 2.2 sống trong cùng một chế phẩm không có sự cạnh tranh nào.
- Mật độ tế bào của cả hai chủng đều tăng lên ngay sau khi trộn, nhưng tốc độ tăng chậm và không đạt được trị số như ở chế phẩm đơn lẻ.
- Thời gian sử dụng tốt nhất của chế phẩm hỗn hợp trong thời gian 6 tháng khi bảo quản chế phẩm trong điều kiện nhiệt độ phòng.

3.1.4. Hiệu lực của chế phẩm đối với các loài keo

Để đánh giá hiệu lực của chế phẩm hỗn hợp với cây trồng thí nghiệm được tiến hành ở vườn ươm Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam với 2 loài cây:

- Keo tai tượng và
- Keo lai.

Đối với keo tai tượng: Hạt giống keo tai tượng do Công ty Giống Lâm nghiệp cung cấp. Hạt giống được khử trùng hạt bằng dung axit H_2SO_4 , ngâm hạt trong thời gian 15 phút, sau đó đổ axit và rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng, ngâm hạt trong nước cất vô trùng 2-3 giờ, đựng hạt trong các túi vải khi hạt nứt nanh gieo hạt trên cát-ấm vô trùng.

Đối với keo lai: Sử dụng cây có nguồn gốc từ hom cành được giâm vào cát ẩm. Khi hom xuất hiện rễ thì nhổ cây làm thí nghiệm.

Đối với mỗi loài cây, thí nghiệm với 4 công thức thí nghiệm. 4 lần lặp và số cây/mỗi công thức/ 1 lần lặp là 30 cây.

- Bón chế phẩm hỗn hợp cho keo tai tượng
- Đối chứng không nhiễm cho keo tai tượng
- Bón chế phẩm hỗn hợp cho keo lai
- Đối chứng không nhiễm cho keo lai

Kết quả trung bình về sinh trưởng và tỷ lệ bị bệnh của cây con ở các công thức thí nghiệm với các lần lặp được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Hiệu lực của chế phẩm hỗn hợp đối với keo tai tượng và keo lai ở vườn ươm

Loài cây	Chiều cao (cm)	Đường kính cổ rễ (mm)	Trọng lượng khô (gam)	Số lượng nốt sần (cái)	Tỷ lệ bị bệnh (%)
Keo tai tượng	66.5 b	3.6 b	3.92 b	17	0
Đối chứng keo tai tượng	42.2 d	1.8 d	2.50 d	0	11.0
Keo lai	69.8 a	3.8 a	4.05 a	20	0
Đối chứng keo lai	45.4 c	2.8 c	2.87 c	0	5.5

* Ghi chú : trên cùng một cột, trị số trung bình theo sau bởi cùng một chữ thì không có sự khác biệt bởi trắc nghiệm Duncan ở mức sai khác 5%.

Kết quả ở bảng trên cho thấy:

- Các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây như chiều cao, đường kính cổ rễ, trọng lượng khô đã tăng lên rất nhiều so với đối chứng
- Đối với keo tai tượng chiều cao tăng 1.6 lần, đường kính cổ rễ tăng 2.0 lần và trọng lượng khô tăng 1.6 lần so với đối chứng. Cây chủ và vi khuẩn đã hình thành mối quan hệ cộng sinh và cây không bị chết do bị bệnh trong suốt quá trình gieo ươm.
- Đối với keo lai, chiều cao tăng 1.6 lần, đường kính cổ rễ tăng 1.4 lần và trọng lượng khô tăng 1.4 lần so với đối chứng. Cây đã hình thành mối quan hệ cộng sinh, cây không bị bệnh.
- Cả hai công thức đối chứng không nhiễm chế phẩm hỗn hợp, cây sinh trưởng kém và bị bệnh. Tỷ lệ bị bệnh gần 10% cho cả 2 loài cây.

3.2. Sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng cho cây thông và bạch đàn

3.2.1. Quy trình sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng

- Chế phẩm hỗn hợp Mycorrhiza + vi sinh vật phân giải lân + vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ cho các loài thông được sản xuất trên cơ sở trộn 3 chế phẩm đơn lẻ Mycorrhiza và vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ.
- Chế phẩm Mycorrhiza được sản xuất trên cơ sở bào tử hữu tính của nấm cộng sinh *Pisolithus tinctorius* sau khi sấy khô ở 40°C, dùng sàng có kích thước lỗ 200 - 300 µm để loại bỏ vỏ, vách ngăn và chỉ giữ lại bào tử thành thực. Bào tử được trộn với chất mang độ ẩm 12% với 1,5 mg bào tử trong 1 gam giá thể.

- Chế phẩm vi sinh vật phân giải lân: Sau khi tuyển chọn được những chủng có khả năng phân giải cao, tiến hành nhân sinh khối trên máy lắc, để đạt được 10^8 - 10^{10} tế bào trong 1 ml dung dịch nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy trong vòng 72 giờ. Tiến hành đông khô dịch nuôi cấy trên máy đông khô với thời gian 24 giờ. Sản phẩm thu được ở dạng bột khô độ ẩm 20%
- Chế phẩm vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ chủng MD2 được sản xuất theo quy trình như trên. Tiến hành đông khô dịch nuôi cấy trên máy đông khô với thời gian 24 giờ. Sản phẩm thu được ở dạng bột khô độ ẩm 20%.
- Chế phẩm hỗn hợp được trộn 3 thành phần: nấm cộng sinh + vi sinh vật phân giải lân + vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ với tỷ lệ 15 mg : 100mg : 100mg trong 100 gam chế phẩm. Để có được 1 kg chế phẩm cần 996,5 gam chất mang và 3,5 gam bột bào tử khô của 3 loại: nấm cộng sinh, vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum*. Chất mang là đất sét sấy khô ở độ ẩm 15-20% rây qua rây có kích thước 250 μ m.

5.2.3. Kết quả sản xuất chế phẩm hỗn hợp, chức năng cho cây bạch đàn và thông

Từ quy trình sản xuất chế phẩm được trình bày ở phần trên trong năm 2004, nhánh đề tài đã sản xuất được 1500 kg phân vi sinh hỗn hợp cho các loài bạch đàn và thông.

Chế phẩm bao gồm 3 thành phần vi sinh vật: nấm cộng sinh, vi sinh vật phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ *Fusarium oxysporum*.

Chế phẩm đã được thử nghiệm ở vườn ươm và rừng trồng, cụ thể như sau:

- Thí nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng thông mã vĩ được thí nghiệm tại Đại Lải, Vĩnh Phúc, mô hình thí nghiệm 1,0 ha.
- Thí nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng thông được thí nghiệm tại Công ty Lâm nghiệp Đông bắc: 20 ha
- Thí nghiệm hiệu lực của chế phẩm đối với rừng trồng bạch đàn được thí nghiệm tại Công ty Lâm nghiệp Đông bắc: 20 ha

Hiện nay nhánh đề tài đang sản xuất cung cấp cho Công ty Lâm nghiệp Đông Bắc 1000 kg chế phẩm nấm cộng sinh hỗn hợp phục vụ cho trồng 600 ha rừng bạch đàn trên các loại đất trống trọc nghèo chất dinh dưỡng ở địa bàn Bắc Giang và Thái Nguyên.

3.2.3. Biến động số lượng tế bào vi khuẩn kháng nấm gây bệnh chủng MD2 và vi khuẩn phân giải lân ở chế phẩm hỗn hợp.

Chế phẩm hỗn hợp được sản xuất trên cơ sở phối trộn của 3 loại chế phẩm đơn lẻ nấm cộng sinh Mycorrhiza và vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh với tỷ lệ 1.5 : 1 : 1 + chất mang. Do nấm cộng sinh không nảy mầm trong môi trường nhân tạo nên thí nghiệm này chỉ xác định sự biến động số lượng tế bào của vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn kháng nấm. Sự biến động mật độ tế bào của các loại vi sinh vật trong chế phẩm hỗn hợp theo thời gian được trình bày ở bảng 3:

Bảng 3: Biến động số lượng tế bào vi khuẩn phân giải lân chủng ĐTL 2.2 và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh, chủng MD2 ở chế phẩm hỗn hợp

TT	Thời điểm kiểm tra	Mật độ tế bào chủng MD2/lg	Mật độ tế bào chủng ĐTL 2.2/lg
1	Khi sản xuất	5.00×10^7	4.50×10^7
2	Sau 10 ngày	2.54×10^7	1.50×10^7
3	Sau 2 tháng	5.05×10^7	7.60×10^7
4	Sau 4 tháng	3.45×10^7	7.10×10^7
5	Sau 6 tháng	1.24×10^7	2.00×10^7
6	Sau 9 tháng	$6,10 \times 10^6$	8.50×10^6
7	Sau 12 tháng	8.20×10^5	7.67×10^5

Qua bảng trên cho thấy:

- Vi khuẩn phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ *Fusarium oxysporum* được làm khô trên máy đông khô trộn với bào tử nấm cộng sinh và chất mang, được đóng gói và bảo quản trong túi nilon với độ ẩm khoảng 20% đều tồn tại và vẫn giữ được hoạt tính.
- Mật độ tế bào của cả hai chủng đều giảm dần theo thời gian bảo quản.
- Thời gian sử dụng tốt nhất của chế phẩm hỗn hợp trong thời gian 6 tháng khi bảo quản chế phẩm trong điều kiện nhiệt độ phòng.

3.2.4. Kết quả thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm hỗn hợp, chức năng cho thông:

Chế phẩm hỗn hợp chức năng sau khi sản xuất được thử nghiệm với 3 loài thông đang được gây trồng chủ yếu hiện nay ở nước ta là:

- Thông nhựa *Pinus merkusii*
- Thông mã vĩ *Pinus massoniana*
- Thông caribê *Pinus caribaea*

+ Phương pháp xử lý đất: Cần phải tiến hành xử lý đất nhằm loại trừ khỏi đất hoặc làm giảm mật độ quần thể của các loài nấm, vi khuẩn, côn trùng, hoặc tuyến trùng có trong đất mà những loài này có khả năng cạnh tranh chất dinh dưỡng hoặc làm giảm hiệu quả của các loài nấm cộng sinh khi nhiễm cho cây. Trong thí nghiệm

này chúng tôi áp dụng phương pháp khử trùng đất bằng phương pháp gia nhiệt. Đất được dàn mỏng và được phơi trực tiếp dưới ánh sáng mặt trời.

+ Phương pháp nhiễm : Chế phẩm hỗn hợp, chức năng nấm cộng sinh gồm bào tử của nấm *Pisolithus tinctorius* + vi khuẩn phân giải lân + vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh. Chế phẩm được trộn đều với đất đóng bầu với liều lượng 1g chế phẩm cho một cây con tương đương với $1,1.10^6$ bào tử.

Kết quả thí nghiệm đối với thông nhựa: *Pinus merkusii*

Thí nghiệm nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh cho thông nhựa *Pinus merkusii* và được tiến hành tại vườn ươm thuộc Trung tâm Khoa học sản xuất Lâm Nghiệp Đông Bắc Bộ - Đại Lải, Vĩnh Phúc, trực thuộc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên với 3 công thức, 4 lần lặp . Số cây/công thức/1 lần lặp là 50 cây. Các công thức thí nghiệm là:

Công thức 1: Đối chứng không nhiễm

Công thức 2: Nhiễm chế phẩm đơn lẻ

Công thức 3: Nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng

Đánh giá chất lượng của chế phẩm dựa trên 3 chỉ tiêu: tỷ lệ nhiễm nấm cộng sinh, tỷ lệ bị bệnh và sinh trưởng về chiều cao, đường kính và trọng lượng khô của cây con . Kết quả được trình bày ở bảng 4 .

Bảng 4: Sự sinh trưởng của cây thông nhựa sau 5 tháng tuổi nhiễm chế phẩm Pt và chế phẩm hỗn hợp, chức năng

Công thức thí nghiệm	Chiều cao (cm)	Đường kính cổ rễ (mm)	Trọng lượng khô (g/cây)	Tỷ lệ bị bệnh (%)	Tỷ lệ hình thành cộng sinh (%)
Đối chứng	20.91 a*	3.77 a	1.89 a	35.7	0 (15% loại khác)
Chế phẩm đơn lẻ (Pt)	25.59 b	4.17 b	2.32 b	10.1	87.2
Chế phẩm hỗn hợp, chức năng	27.86 c	4.75 c	2.85 c	0	89.4

* Ghi chú : trên cùng một cột, trị số trung bình theo sau bởi cùng một chữ thì không có sự khác biệt bởi trắc nghiệm Duncan ở mức sai khác 5%.

Kết quả ở bảng trên cho thấy rằng:

Sinh trưởng của cây con được nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh được thể hiện qua các chỉ tiêu chiều cao cây, đường kính cổ rễ và trọng lượng khô lớn hơn nhiều so với đối chứng không nhiễm chế phẩm. Nếu tính chỉ tiêu trọng lượng khô chế phẩm đơn lẻ làm tăng sinh trưởng của cây 1.2 lần trong khi đó chế phẩm hỗn hợp làm tăng 1,5 lần so với đối chứng.

Tỷ lệ bị bệnh ở công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp bằng 0, nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh đơn lẻ là 10.1% và công thức đối chứng không nhiễm là 35.7%, một tỷ lệ thường gặp ở các vườn ươm sản xuất cây thông.

Kết quả thí nghiệm đối với thông mã vĩ: *Pinus massoniana*

Thí nghiệm nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh cho thông mã vĩ *Pinus massoniana* và được tiến hành tại vườn ươm Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên với 3 công thức, 4 lần lặp. Số cây/công thức/1 lần lặp là 50 cây. Các công thức thí nghiệm là:

Công thức 1: Đối chứng không nhiễm

Công thức 2: Nhiễm chế phẩm đơn lẻ

Công thức 3: Nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng

Đánh giá chất lượng của chế phẩm dựa trên 3 chỉ tiêu: tỷ lệ nhiễm nấm cộng sinh, tỷ lệ bị bệnh và sinh trưởng về chiều cao, đường kính và trọng lượng khô của cây con. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Sự sinh trưởng của cây thông mã vĩ sau 3 tháng tuổi nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng

Loài cây	Chiều cao (cm)	Đường kính cổ rễ (mm)	Trọng lượng khô (gam)	Tỷ lệ cộng sinh (%)	Tỷ lệ bị bệnh (%)
Chế phẩm đơn lẻ (Pt)	12.3 b *	3.2 b	0.34 b	87.4	18.8
Chế phẩm hỗn hợp, chức năng	18.2 c	4.0 c	0.44 c	98.3	0
Đối chứng	5.4 a	1.2 a	0.15 a	0	95.6

* Ghi chú : trên cùng một cột, trị số trung bình theo sau bởi cùng một chữ thì không có sự khác biệt bởi trắc nghiệm Duncan ở mức sai khác 5%.

Kết quả trình bày ở bảng trên cho thấy:

Các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây như chiều cao, đường kính cổ rễ, trọng lượng khô đã tăng lên rất nhiều so với đối chứng và công thức chỉ nhiễm chế phẩm đơn lẻ.

Các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây con ở công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng tăng lên nhiều so với sinh trưởng của cây con ở công thức đối chứng không nhiễm chế phẩm: chiều cao tăng 3,4 lần, đường kính cổ rễ tăng 3,3 lần và trọng lượng khô tăng 3.0 lần.

Các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây con ở công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng tăng lên nhiều so với sinh trưởng của cây con ở công thức nhiễm chế phẩm đơn lẻ: chiều cao tăng 1,5 lần, đường kính cổ rễ tăng 1,3 lần và trọng lượng khô tăng 1,3 lần.

Công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp đã hình thành mối quan hệ cộng sinh với tỷ lệ 98.3%; công thức nhiễm chế phẩm đơn lẻ chỉ hình thành mối quan hệ cộng sinh với tỷ lệ 87,4%.

Cây con ở các công thức thí nghiệm không bị bệnh thối cổ rễ. Như vậy, cây con nhiễm chế phẩm đơn lẻ có tỷ lệ bị bệnh là 18,8%. Như vậy, chế phẩm hỗn hợp đã có khả năng rất tốt trong việc phòng và chống bệnh thối cổ rễ do các loài nấm bệnh gây hại.

Kết quả thí nghiệm đối với thông caribê: *Pinus caribaea*

Thí nghiệm nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh cho thông caribê *Pinus caribaea* được tiến hành tại vườn ươm thuộc Trung tâm Khoa học sản xuất Lâm Nghiệp Đông Bắc Bộ - Đại Lải, Vĩnh Phúc, trực thuộc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên với 13 công thức, 4 lần lặp. Số cây/công thức/1 lần lặp là 30 cây.

Công thức thí nghiệm như sau:

Công thức thí nghiệm	Thành phần của chế phẩm
1	LC1 + L1 + KTST + MD2
2	AM1+ L1 + KTST + MD2
3	Pt+ L1 + KTST + MD2
4	LC1 + L1 + KTST + SP14
5	AM1+ L1 + KTST + SP14
6	Pt+ L1 + KTST + SP14
7	LC1 + L2 + KTST + MD2
8	AM1+ L2 + KTST + MD2
9	Pt+ L2 + KTST + MD2
10	LC1 + L2 + KTST + SP14
11	AM1+ L2 + KTST + SP14
12	Pt+ L2 + KTST + SP14
13	Đối chứng

Ký hiệu ở các công thức thí nghiệm:

- LC1: nấm cộng sinh *Laccaria laccata*
- L1: vi sinh vật phân giải lân
- KTST: vi sinh vật kích thích sinh trưởng
- MD2: Vi khuẩn kháng nấm thối cổ rễ *Fusarium oxysporum*
- AM1: nấm cộng sinh *Amanita muscaria*
- Pt: nấm cộng sinh *Pisolithus tinctorius*
- SP14: vi khuẩn đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum*
- L2: vi sinh vật phân giải lân 2

Đánh giá chất lượng của chế phẩm dựa trên 3 chỉ tiêu: tỷ lệ bị bệnh và sinh trưởng về đường kính và chiều cao của cây con. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6 : Sự sinh trưởng của cây caribê sau 10 tháng tuổi được nhiễm chế phẩm hỗn hợp, chức năng

Công thức	Đường kính TB (cm)	Chiều cao TB (cm)	Tỷ lệ bị bệnh thối cổ rễ (%)
1	5.24	27.33	2,6
2	5.18	28.78	2,0
3	5.55	27.64	3,2
4	5.57	23.92	3.1
5	5.72	27.57	3,4
6	5.54	26.98	2,5
7	4.48	25.46	2,2
8	5.53	29.59	3,1
9	5.08	24.73	2,1
10	5.54	25.29	2.6
11	5.28	25.30	2,4
12	4.73	24.68	2,5
13 (đối chứng)	3.38	19.87	30,3

Bảng số liệu trên cho thấy chế phẩm hỗn hợp, chức năng có ảnh hưởng rất rõ nét đến sinh trưởng và tỷ lệ bị bệnh của thông caribê khi gieo cấy ở vườn ươm. Công thức cho chiều cao của cây lớn nhất là công thức số 2, tăng 1,4 lần so với đối chứng. Chế phẩm hỗn hợp, chức năng có hiệu quả rất rõ rệt trong việc phòng chống bệnh thối cổ rễ cho cây con. Các công thức bón chế phẩm. Tỷ lệ bị bệnh từ 2 đến 3% trong khi đó công thức đối chứng trên 30%.

Phân 4: KẾT LUẬN

- Chế phẩm vi sinh vật đa chủng, chức năng cho các loài keo được sản xuất từ các chế phẩm đơn lẻ vi khuẩn cộng sinh cố định đạm *Rhizobium*, vi sinh vật phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ. Phối trộn các chế phẩm đơn lẻ theo tỷ lệ 1:1:1, các vi sinh vật trong hỗn hợp chủng này không có sự cạnh tranh nào. Các vi sinh vật đều tồn tại và phát triển tốt.
- Nếu bảo quản trong điều kiện bình thường, hoạt tính của các vi sinh vật trong chế phẩm hỗn hợp vẫn có hiệu lực trong thời gian sau 6 tháng kể từ ngày sản xuất.
- Khi nhiễm chế phẩm hỗn hợp chức năng, đối với keo tai tượng chiều cao tăng 1.6 lần, đường kính cổ rễ tăng 2.0 lần và trọng lượng khô tăng 1.6 lần so với đối chứng. Cây chủ và vi khuẩn đã hình thành mối quan hệ cộng sinh và cây không bị chết do bị bệnh trong suốt quá trình gieo ươm. Đối với keo lai, chiều cao tăng 1.6 lần, đường kính cổ rễ tăng 1.4 lần và trọng lượng khô tăng 1.4 lần so với đối chứng. Cây đã hình thành mối quan hệ cộng sinh, cây không bị bệnh. Cả hai công thức đối chứng không nhiễm chế phẩm hỗn hợp, cây sinh trưởng kém và bị bệnh. Tỷ lệ bị bệnh gần 10% cho cả 2 loài cây.
- Chế phẩm vi sinh vật đa chủng, chức năng cho các loài thông được sản xuất từ các chế phẩm đơn lẻ nấm cộng sinh *Pisolithus tinctorius*, vi sinh vật phân giải lân và vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vùng rễ.
- Nếu bảo quản trong điều kiện bình thường, hoạt tính của các vi sinh vật trong chế phẩm hỗn hợp vẫn có hiệu lực trong thời gian sau 6 tháng kể từ ngày sản xuất.
- Sinh trưởng của cây còn thông nhựa được nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh được thể hiện qua các chỉ tiêu chiều cao cây, đường kính cổ rễ và trọng lượng khô lớn hơn nhiều so với đối chứng không nhiễm chế phẩm. Nếu tính chỉ tiêu trọng lượng khô chế phẩm đơn lẻ làm tăng sinh trưởng của cây 1.2 lần trong khi đó chế phẩm hỗn hợp làm tăng 1,5 lần so với đối chứng. Tỷ lệ bị bệnh ở công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp bằng 0, nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh đơn lẻ là 10.1% và công thức đối chứng không nhiễm là 35.7%, một tỷ lệ thường gặp ở các vườn ươm sản xuất cây thông.
- Đối với thông mã vĩ, các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây như chiều cao, đường kính cổ rễ, trọng lượng khô đã tăng lên rất nhiều so với đối chứng: về chiều cao tăng 3.4 lần, đường kính cổ rễ tăng 3.3 lần và trọng lượng khô tăng 3.0 lần so với đối chứng. Công thức nhiễm chế phẩm đã hình thành mối quan hệ cộng sinh với tỷ lệ 98.3%, cây không bị bệnh thối cổ rễ.
- Đối với thông Caribê chế phẩm hỗn hợp, chức năng có ảnh hưởng rất rõ nét đến sinh trưởng và tỷ lệ bị bệnh của thông caribê khi gieo cấy ở vườn ươm. Chiều cao bình quân của cây ở các công thức nhiễm chế phẩm hỗn hợp tăng 1,2 lần so với đối chứng. Chế phẩm hỗn hợp, chức năng có hiệu quả rất rõ rệt trong việc phòng chống bệnh thối cổ rễ cho cây con. Các công

thức bón chế phẩm. Tỷ lệ bị bệnh từ 2 đến 3% trong khi đó công thức đối chứng trên 30%.

Tài liệu tham khảo chính

1. Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. and Malajczuc N., 1996 *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph 32. 374p
2. Gibson A. 1995, International Workshop on Rhizobium, China
3. Kim Jinwi. 2000. Isolation and Purification of antifungal compound and B-lactamase inhibitor from endophytic bacteria. Thesis for the degree of master of science. SNU, Korea.
4. Somasegaran P. and Hoben H., 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. NIFTAL and MIRCEN monograph, 365p.

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRUNG TÂM CÔNG NGHỆ SINH HỌC

-----oOo-----

CHƯƠNG TRÌNH KC.04.04

*“Nghiên cứu công nghệ sản xuất phân bón
vi sinh vật đa chủng mới và phân bón chức năng
phục vụ chăm sóc cây trồng cho các vùng sinh thái”*

Đề tài nhánh

**"NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SẢN XUẤT PHÂN
BÓN VI SINH VẬT ĐA CHỨC NĂNG SỬ DỤNG
CHO CÂY LẠC TỪ CÁC CHỦNG VI SINH VẬT"**

Chủ trì đề tài nhánh: PGS.TS.Phạm Văn Ty

**Người thực hiện: ThS. Đào Thị Lương
CN. Nguyễn Thị Thu Huyền
CN. Nguyễn Thị Anh Đào
CN. Nguyễn Duy Thịnh**

HÀ NỘI- 2004

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ lâu các nhà khoa học đã chứng minh rằng việc bổ sung các vi sinh vật hữu hiệu vào đất có thể tăng năng suất cây trồng, do chúng đóng vai trò chuyển hoá vật chất trong đất để cung cấp chất dinh dưỡng dễ tiêu cho cây. Người ta cũng chứng minh rằng nếu cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng dưới dạng phân hoá học cũng không nâng cao thêm năng suất cây trồng. Điều đó chứng tỏ vấn đề không chỉ dừng lại ở chất dinh dưỡng mà vi sinh vật còn đóng nhiều vai trò quan trọng khác nữa. Vi sinh vật tạo lập mối quan hệ qua lại phức tạp với cây trồng trong vùng rễ, bảo đảm độ ẩm, duy trì độ xốp cho rễ phát triển, cung cấp vitamin, hormone sinh trưởng, nâng cao khả năng chống bệnh thông qua việc tiết các chất ức chế mầm bệnh và khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi. Để thực hiện các chức năng trên, không chỉ một loài mà là phải là một tập hợp nhiều loài vi sinh vật cùng tham gia một cách hiệp đồng. Chính phân vi sinh vật "inoculant" nhằm mục đích cung cấp các vi sinh vật hữu hiệu nói trên để lấp vào sự thiếu hụt trong hệ thống sản xuất đất cây trồng. Chúng tôi muốn đưa ra một khái niệm mới là "phân chức năng" (functional fertilizer). Giống như thực phẩm chức năng (functional food), ngoài việc cung cấp chất dinh dưỡng còn chứa các thành phần giúp cho cơ thể tăng sức đề kháng, tăng khả năng miễn dịch v.v... Cũng như vậy, phân chức năng ngoài việc cung cấp thức ăn cho cây còn kích thích sự phát triển của cây và giúp cho cây đề kháng với một số bệnh thường gặp. Sử dụng phân chức năng cũng giống như một mũi tên trúng hai đích vậy.

Trong báo cáo này, hỗn hợp vi sinh vật cố định nitơ, chuyển hoá photpho khó tan, kích thích sinh trưởng thực vật và vi sinh vật đối kháng vi sinh vật gây bệnh vùng rễ, được tìm hiểu khả năng tồn tại, hoạt tính sinh học khi đưa vào đất và ảnh hưởng của chúng đối với cây lạc.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Môi trường:

- Môi trường canh thang: Pepton-10g, cao thịt - 3g, thạch-20g, nước cất-1000ml, pH-7,0: để nuôi cấy chủng Bs.9 và hỗn hợp 4 chủng.
- Môi trường Gerretsen[4]: Đường kính-10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -5g, FeSO_4 -vết, ZnSO_4 -vết, thạch-20g, nước cất-1000ml, pH-7,0: để nuôi cấy chủng RTL 2.2.
- Môi trường YMA: Manitol-10g, K_2HPO_4 - 0,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25g, NaCl- 0,1g, cao men- 0,5g, CaCO_3 - 0,5g, đỏ Congo-10ml (1g/400ml nước cất), thạch-20g, nước cất-1000ml, pH- 6,5-6,7: để nuôi cấy chủng RA.04.

- Môi trường Burk cải tiến: Đường kính- 20g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0,1 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1g, thạch-20g, đệm phot phát 0,005M pH7-1000ml, bổ sung triptophan- 0,1g/l: để nuôi cấy chủng A_5 .

Phương pháp.

- Xác định khả năng đối kháng của 4 chủng vi khuẩn theo phương pháp cấy vạch trên môi trường thạch đĩa.
- Xác định hàm lượng nitơ theo phương pháp khử axetylen bằng sắc kí khí.
- Xác định trọng lượng khô thân, rễ, lá theo phương pháp trọng lượng không đổi.
- Kiểm tra số lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa Petri.
- Xác định hàm lượng IAA theo phương pháp Sinna, Basu.
- Xác định phot pho tổng số và phot pho hoà tan theo phương pháp so màu dùng xanh molipden.
- Xác định khả năng kháng *F. oxysporum* và *P. solanacearum* theo phương pháp khuếch tán trên thạch.
- Kiểm tra số lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa Petri.
- Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm dạng xốp .

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

I. PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CAO

1.1. Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hoá photpho khó tan.

- Phân lập được 1 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hoá photpho khó tan dùng trong nghiên cứu là trực khuẩn Gram (+), khuẩn lạc có hình tròn, màu từ trắng tới nâu. Phát triển tốt nhất trong điều kiện pH trung tính và nhiệt độ 30°C. Có khả năng đồng hoá cacbonhydrat như: glucoza, maltoza, saccaroza, arabinoza. Có khả năng sinh lizin decarboxylaza và phản ứng VP (Voges-Proskauer) dương tính. Chủng này được xác định thuộc chi *Bacillus* và ký hiệu là *Bacillus* sp.21.

- Nghiên cứu khả năng chuyển hoá các nguồn photpho là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và FePO_4 quặng apatit và photphorit của chủng *Bacillus* sp. 21. Kết quả thực nghiệm cho thấy lượng photpho hoà tan tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Sau 144 giờ nuôi cấy lắc, chủng *Bacillus* sp. 21 có khả năng chuyển hoá tương đối cao với tất cả các dạng photpho: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ là 11mg/ml, FePO_4 là 7,2mg/ml apatit là 10 mg/ml và quặng photphorit là 10,6 mg/ml (tính theo P_2O_5).

1.2. Phân lập các chủng vi khuẩn quang hợp có khả năng cố định nitơ và có hoạt tính nitrogenaza cao.

- Phân lập được 3 chủng vi khuẩn quang hợp H6, H11 và H14 đều có khả năng cố định nitơ và có hoạt tính nitrogenaza cao. Nghiên cứu về đặc điểm hình thái, nuôi cấy, sinh lý - sinh hoá của 3 chủng H6, H12, H14 cho phép xác định chúng thuộc về chi *Rhodospseudomonas*.

- Mức độ sinh trưởng và hoạt tính nitrogenaza của 3 chủng H6, H11, H14 chịu ảnh hưởng rõ rệt của điều kiện khí và chiếu sáng. Cả 3 chủng này có thể sinh trưởng được ở phạm vi pH khá rộng (từ 4,5 - 8,5) tuy nhiên pH thích hợp nhất là 7,0; nồng độ NaCl thích hợp là 0,2 - 1%. Cả 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng tích lũy chất kích thích sinh trưởng thực vật là axit indol axetic (IAA).

- Khi xử lý bằng dịch nuôi các chủng vi khuẩn pha loãng ở nồng độ 1%:

+ Tỷ lệ nảy mầm của lúa đạt 96% (chủng H6), 97% (H11) và 96% (H14)

+ Hoạt độ amylaza của ngô sau khi xử lý 24 giờ tăng 1,5 lần (chủng H6), 1,7 lần (H11) và 1,4 lần (H14) so với mẫu đối chứng.

+ Lượng rễ phụ của cây mạ xử lý với dịch nuôi cấy tăng 27% (chủng H6), 15% (H11) và 25% (H14).

- Sau 2 tuần trồng lúa và ngô thủy canh được bổ xung thêm dịch nuôi các chủng vi khuẩn:

+ Trọng lượng khô rễ lúa tăng 43,8% (chủng H6), 16,2% (H11) và 20,4% (H14); trọng lượng rễ ngô tăng 15,1% (chủng H6), 8,6% (H11) và 13,8% (H14) so với đối chứng.

+ Chiều dài của rễ lúa tăng 49,6% (chủng H6), 43,1% (H11) và 56,1% (H14); chiều dài rễ ngô tăng 13,3% (chủng H6), 5,3% (H11) và 8% (H14) so với đối chứng.

1.3. Phân lập vi khuẩn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật

- Hai chủng A3 và A5, khuẩn lạc có màu ngà, bóng, ướt, mép không bằng phẳng, khuẩn lạc khi còn non có màu trắng đục, ít khi keo đặc. Khi già khuẩn lạc ngả màu đen không tiết sắc tố ra ngoài môi trường. Hai chủng này được xác định thuộc chi *Azotobacter*.

- Hàm lượng IAA thô được tổng hợp đạt cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy lắc. Cả hai môi trường MT1 và MT2 đều có thể được sử dụng cho việc nuôi cấy sản xuất. Trên môi trường MT1 hàm lượng IAA thô được tổng hợp với chủng A3 đạt là 16,8mg/l chủng M2 đạt là 16,4mg/l. Trên môi trường MT1 hàm lượng IAA thô của chủng A5 đạt là 17,2mg/l, chủng A3 đạt 15,2mg/l. Hàm lượng IAA thô được tổng hợp cao nhất khi hàm lượng triptophan được bổ sung 50mg/l.

1.4. Phân lập xạ khuẩn sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật

- Từ 200 chủng xạ khuẩn thuộc Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật-ĐHQGHN đã chọn được 3 chủng có hoạt tính sinh IAA mạnh nhất, các chủng được ký hiệu là M₆₁, 27.6 và 5.4.

- Bước đầu nghiên cứu các đặc điểm sinh học và phân loại của 3 chủng xạ khuẩn, chủng 27.6 được xác định thuộc loài *Streptomyces roseofulvus*, chủng 5.4 thuộc loài *Streptomyces thermoflavus*, chủng M₆₁ là *Streptomyces* sp.

- Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho khả năng tổng hợp axit indol axetic cao nhất của 3 chủng xạ khuẩn bao gồm: môi trường Gauze, nhiệt độ 30-37 °C, pH7, thời gian nuôi 3-4 ngày.

- Dịch nuôi xạ khuẩn có ảnh hưởng tốt của tới sự nảy mầm và phát triển của cây mạ và cây ngô non.

1.5. Phân lập xạ khuẩn kháng *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh

- Từ 154 chủng xạ khuẩn phân lập được, đã tuyển chọn được 68 chủng có khả năng sinh CKS kháng vi khuẩn kiểm định (chiếm 44,16 %).

- Trong số 10 chủng có hoạt phổ rộng với các loại vi khuẩn kiểm định đã chọn được 4 chủng: 94, 112, G7, G13 có hoạt tính kháng *Ralstonia solanacearum* cao nhất. Dựa vào các đặc điểm phân loại, chủng 94 được xác định là *Streptomyces actuosus*; chủng 112 được xác định là *Streptomyces arabicus*; chủng G7 được xác định là *Streptomyces misakiensis*, chủng G13 được xác định là *Streptomyces cyaneogriseus*.

- Môi trường thích hợp nhất cho sinh tổng hợp CKS ở cả 4 chủng là ISP-4 với pH 7, nhiệt độ thích hợp để sinh tổng hợp kháng sinh là 28-35°C, thời gian lên men là 120- 144 giờ.

- Khi trộn xạ khuẩn sinh chất kháng sinh vào đất trồng không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây trồng.

1.6. Phân lập xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật.

- Từ 120 chủng xạ khuẩn phân lập được đã tuyển chọn được 54 chủng có khả năng sinh CKS kháng nấm *Fusarium oxysporum* chiếm 39,7%.

- Trong số 10 chủng có hoạt phổ rộng với các loại nấm đã chọn được 2 chủng: H7 và H10 có hoạt tính cao nhất. Dựa vào các đặc điểm phân loại chúng tôi xác định chủng H7 là *Streptomyces spadicis*, chủng H10 là *Streptomyces aureocirculatus*.

- Môi trường thích hợp nhất cho sinh tổng hợp CKS ở cả 2 chủng là ISP-4 với pH từ 6 đến 8, thời gian lên men là 120 giờ. Các nguồn cacbon: tinh bột tan, glucoza, dextrin đều thích hợp cho sinh tổng hợp CKS. Hiệu suất sinh tổng hợp CKS cao khi kết hợp cả hai nguồn nitơ vô cơ và hữu cơ.

Chủng H7 có nhiệt độ thích hợp để sinh tổng hợp kháng sinh là 28-35°C, chủng H10 là 28-30°C.

PHẦN II. NUÔI CẤY HỖN HỢP CÁC CHỦNG VI KHUẨN HỮU ÍCH DÙNG TRONG SẢN XUẤT PHÂN BÓN CHỨC NĂNG

2.1. Kiểm tra tính đối kháng của các chủng vi khuẩn.

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy khi nuôi cấy hỗn hợp, các chủng vi sinh vật có khả năng bổ trợ cho nhau, do đó chúng sinh trưởng tốt hơn. Ví dụ sản phẩm trao đổi chất của chủng này có thể là cơ chất cho chủng kia. Tuy nhiên trước hết cần phải xác định xem chúng có đối kháng lẫn nhau không. Các chủng *Bradyrhizobium* sp. RA.04, *Pseudomonas* sp. RTL 2.2, *Bacillus subtilis* Bs.9, *Azotobacter* sp. A₅ được nuôi cấy vạch tiếp xúc với nhau trên môi trường thạch đĩa. Sau 2 ngày quan sát khả năng ức chế.

Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều sinh trưởng tốt, không đối kháng lẫn nhau.

2.2. Sự tương tác giữa các chủng vi khuẩn khi nuôi cấy hỗn hợp.

2.2.1. Nuôi trên môi trường dịch thể

Cấy 3 chủng vào bình nón chứa môi trường canh thang để nuôi hỗn hợp, sau một ngày lọc qua màng lọc vô trùng, lấy phần dịch và loại bỏ tế bào, sau đó cấy chủng vi khuẩn còn lại vào môi trường thích hợp, có bổ sung 20% dịch lọc hỗn hợp vi khuẩn, bình không bổ sung dịch lọc hỗn hợp được dùng làm đối chứng. Kiểm tra số lượng vi khuẩn theo thời gian.

Bảng 1a. Ảnh hưởng của dịch nuôi hỗn hợp các chủng vi khuẩn A5, BS.9, RTL2.2, tới khả năng sinh trưởng của chủng RA.04.

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào chủng RA.04 ($\times 10^8$ CFU/ml)	
	Môi trường YMA (đối chứng)	Môi trường YMA + dịch nuôi hỗn hợp
0	0,1	0,1
1	1,4	3,2
2	104	310
3	110	306

Bảng 1b. Ảnh hưởng của dịch nuôi hỗn hợp các chủng vi khuẩn RA.04, BS.9, RTL2.2, tới khả năng sinh trưởng của chủng A5.

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào chủng A ₅ ($\times 10^8$ CFU/ml)	
	Môi trường Burk (đối chứng)	Môi trường Burk + dịch nuôi hỗn hợp
0	0,1	0,1
1	1,8	4,8
2	115	390
3	108	364

Bảng 1c. Ảnh hưởng của dịch lọc nuôi hỗn hợp các chủng vi khuẩn A₅, BS.9, RA.04, tới khả năng sinh trưởng của chủng RTL2.2.

Thời gian	Số lượng tế bào RTL2.2 ($\times 10^8$ CFU/ml)	
	Môi trường Gerretsen (đối chứng)	Môi trường Gerretsen + dịch nuôi hỗn hợp
0	0,2	0,2
1	1,6	3,6
2	110	320
3	110	310

Bảng 1d. Ảnh hưởng của dịch nuôi hỗn hợp các chủng vi khuẩn A₅, RA.04, RTL2.2, tới khả năng sinh trưởng của chủng BS.9.

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào chủng BS.9 ($\times 10^8$ CFU/ml)	
	Môi trường canh thang (đối chứng)	Môi trường canh thang + dịch nuôi hỗn hợp
0	0,1	0,1
1	1,2	2,5
2	80	320
3	68	300

Tất cả các thí nghiệm trên đều cho kết quả tương tự nhau. Khi nuôi bất kể chủng nào trong số 4 chủng, nếu bổ sung dịch lọc nuôi cấy hỗn hợp từ ba chủng còn lại đều cho kết quả tốt hơn khi nuôi riêng rẽ không bổ sung. Rõ ràng khi nuôi hỗn hợp 4 chủng lựa chọn có tác dụng hiệp đồng. Các vi sinh vật bổ trợ cho nhau hoặc tiết ra hệ enzym đầy đủ hơn để sử dụng các cơ chất trong môi trường hoặc sử dụng các sản phẩm trao đổi chất của nhau. Sản phẩm trao đổi chất của chủng này có thể là nguồn kích thích sinh trưởng của các chủng khác.

2.2.2. *Nhiễm các chủng vi khuẩn vào đất.*

Để kiểm tra khả năng tồn tại của các chủng nghiên cứu trong đất vô trùng và không vô trùng, bốn chủng vi khuẩn được cấy theo tỷ lệ 1 % vào các túi đất đã khử trùng và

không khử trùng. Nuôi ở 30⁰C, sau 15, 30 và 45 ngày lấy mẫu, kiểm tra số lượng tế bào. Kết quả được trình bày ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Khả năng tồn tại của các chủng vi khuẩn khi nuôi trong đất vô trùng theo thời gian.

Ngày	Hình thức nuôi	Số lượng tế bào ($\times 10^5$ CFU /g)			
		RA.04	A ₅	Bs.9	RTL 2.2
0	Hỗn hợp	35	45	55	25
	Riêng rẽ	30	40	55	15
15	Hỗn hợp	3950	2650	2450	2950
	Riêng rẽ	2850	2000	1400	1250
30	Hỗn hợp	2750	2300	2150	2100
	Riêng rẽ	1850	1420	1750	1000
45	Hỗn hợp	1820	1650	1860	1220
	Riêng rẽ	890	650	790	650

Số liệu bảng 2 cho thấy số lượng tế bào của các chủng vi khuẩn khi nuôi hỗn hợp và riêng rẽ trong điều kiện đất vô trùng đều tăng trong thời gian 15 ngày đầu, sau 30 ngày số lượng giảm do trong môi trường đã cạn nguồn dinh dưỡng. Tốc độ giảm số lượng khi nuôi riêng rẽ nhanh hơn so với khi nuôi hỗn hợp.

Bảng 3. Khả năng tồn tại của các chủng vi khuẩn khi nuôi trong đất không vô trùng theo thời gian.

Ngày	Hình thức nuôi	Số lượng tế bào ($\times 10^5$ CFU /g)			
		RA04	A ₅	Bs.9	RTL 2.2
0	Hỗn hợp	35	50	50	30
	Riêng rẽ	30	45	45	25
15	Hỗn hợp	1500	1750	1350	1550
	Riêng rẽ	850	750	950	1250
30	Hỗn hợp	970	810	960	950
	Riêng rẽ	550	350	550	530
45	Hỗn hợp	380	376	265	520
	Riêng rẽ	150	110	240	240

Số liệu ở bảng 3 cho thấy đất không vô trùng cũng cho kết quả tương tự như khi nuôi trong đất vô trùng nhưng số lượng tế bào giảm nhanh hơn do trong đất chưa vô trùng còn có nhiều loại vi sinh vật tạp nhiễm khác cạnh tranh với chúng. Ở thí nghiệm này, các

chúng vi khuẩn được nuôi trong các túi đất trong không gian hẹp, các chất dinh dưỡng, không được truyền theo mao dẫn để cung cấp thường xuyên như ngoài môi trường, nên số lượng các chủng vi khuẩn đều giảm sau 30 ngày, sau đó tốc độ giảm từ từ hơn do các chủng vi khuẩn này và các vi sinh vật khác trong đất cùng hỗ trợ nhau.

Tóm lại, khi nuôi vi sinh vật cả trong đất vô trùng và không vô trùng sau 15 ngày số lượng các loại vi khuẩn đều tăng, sau 30 ngày số lượng giảm và sau 45 ngày giảm 10-20 lần. Ở môi trường vô trùng tốc độ giảm chậm hơn so với môi trường không vô trùng, lý do là: chất dinh dưỡng cạn dần, tế bào mới tăng chậm trong khi tế bào cũ chết nhanh. Ở môi trường không vô trùng còn có sự cạnh tranh với các vi sinh vật có sẵn trong đất mặc dù *B. subtilis* là vi khuẩn có bào tử, *A₅* là *azotobacter* có khả năng tạo nang (cyst) nhưng số lượng đều bị giảm đi khá nhanh sau 45 ngày cấy vào đất. Do vậy cần xem xét để bọc vi khuẩn (capsulation) nhằm kéo dài thời gian sống của chúng trong đất.

2.3. Xác định hoạt tính sinh học.

Hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn cũng được xác định song song với việc kiểm tra số lượng tế bào trong quá trình nuôi hỗn hợp và riêng rẽ.

2.3.1. Khả năng kháng vi khuẩn gây héo xanh *Ralstonia solanacearum* của chủng Bs.9 khi nuôi hỗn hợp và riêng rẽ.

Chủng Bs.9 được nuôi cấy lắc ở 30°C trong 2 ngày, li tâm lấy dịch trong, tiến hành thử khả năng kháng *Ralstonia solanacearum* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch.

Dịch nuôi cấy chủng Bs.9 được tẩm vào đất vô trùng và không vô trùng với tỷ lệ 1 %. Sau 15 ngày, phân lập lại rồi xác định khả năng kháng *R. solanacearum* bằng phương pháp thời thạch.

Bảng 4. Khả năng kháng vi khuẩn gây héo *R. solanacearum* của chủng Bs.9.

Điều kiện nuôi	Hoạt tính kháng sinh(D-d,mm)		
	Nuôi dịch thể	Nuôi trong đất không vô trùng	Nuôi trong đất vô trùng
Riêng rẽ	7	6	6
Hỗn hợp	17	12	15

Khả năng kháng *R. solanacearum* của chủng Bs.9 trong điều kiện hỗn hợp có hiệu quả hơn hẳn nuôi riêng rẽ cả khi nuôi dịch thể, trong đất vô trùng hay không vô trùng.

2.3.2. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng.

IAA (axit indol axetic) là hoóc môn sinh trưởng rất cần thiết cho cây trồng. Trong thí nghiệm này, chủng A5 được nuôi cấy trên môi trường dịch thể, sau 120 giờ, xác định hàm lượng IAA. Đồng thời xác định khả năng sinh IAA của chủng A5 trong đất vô trùng và không vô trùng sau 15 ngày nuôi cấy.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy: Khả năng sinh IAA của chủng A₅ cũng tăng hơn khi nuôi hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Bảng 5. Khả năng sinh IAA của chủng A₅ khi nuôi hỗn hợp và riêng rẽ trong đất.

Điều kiện nuôi	Hàm lượng IAA (µg/g) hoặc (µg/ml)	
	Riêng rẽ	Hỗn hợp
Nuôi cấy lác	16,9	17,3
Nuôi trong đất vô trùng	0,78	0,94
Nuôi trong đất không vô trùng	0,42	0,57

2.3.3. Khả năng cố định nitơ của chủng RA.04 khi nuôi hỗn hợp và riêng rẽ.

Dịch nuôi chủng vi khuẩn RA.04 và dịch nuôi hỗn hợp 4 chủng được cấy vào đất. Sau 15 ngày trồng lạc. Đến giai đoạn ra hoa (40 ngày), nhổ lấy bộ rễ, đếm số lượng nốt sần và đo hoạt tính khử axetylen (phương pháp để kiểm tra hoạt tính cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần).

Bảng 6. Khả năng cố định nitơ của chủng RA.04 khi nuôi hỗn hợp và riêng rẽ.

Điều kiện nuôi	Số lượng nốt sần	Hoạt tính cố định nitơ (µmol C ₂ H ₂ /cây/giờ)
Đối chứng	20	31,25
Chủng RA04	115	178,86
Hỗn hợp chủng	100	208,33

Số liệu bảng 6 cho thấy: khi nhiễm vi khuẩn *Bradyrhizobium* sp. RA.04 vào đất đã làm tăng số lượng nốt sần, rễ lạc, do vậy khả năng cố định nitơ cũng tăng lên. Trong các chậu cây đối chứng, rễ vẫn có các nốt sần do vi khuẩn nốt sần sẵn trong đất và trên hạt, các nốt sần này thường nhỏ không thật hồng, nằm cả trên rễ chính và rễ phụ. Số lượng nốt sần trong các cây nuôi hỗn hợp không nhiều bằng khi nhiễm chủng RA.04 nhưng lại to hơn và chủ yếu nằm ở rễ chính. Đó là nốt sần hữu hiệu, có hoạt tính cố định nitơ mạnh.

2. 3.4. Khả năng phân giải photphat của chủng RTL 2.2 khi nuôi cấy hỗn hợp và riêng rẽ.

Chủng vi khuẩn RTL 2.2 và hỗn hợp 4 chủng vi khuẩn được nuôi cấy lắc trên môi trường Gerretsen. Sau 5 ngày xác định lượng P_2O_5 hoà tan trong dung dịch nuôi cấy. Đồng thời dịch nuôi chủng RTL 2.2 và hỗn hợp cũng được cấy với tỷ lệ 1% vào đất vô trùng và đất không vô trùng có trộn thêm 0,5% $Ca_3(PO_4)_2$. Sau 15 ngày, xác định hàm lượng P_2O_5 hoà tan.

Bảng 7. Khả năng phân giải photphat khó tan của chủng RTL 2.2 khi nuôi cấy hỗn hợp và riêng rẽ.

Điều kiện nuôi cấy	Hàm lượng P_2O_5 (µg/ml)		
	Nuôi dịch thể	Đất vô trùng	Đất không vô trùng
Đối chứng	0,5	6	6
Nuôi riêng rẽ	40	17,5	13,5
Nuôi hỗn hợp	45	20,2	15,9

Kết quả ghi ở bảng 7 cho thấy khi nuôi cấy hỗn hợp, khả năng phân giải photphat của các chủng tăng lên rõ rệt.

2.4. Ảnh hưởng của việc nuôi cấy các chủng vi sinh vật đơn lẻ và nuôi cấy hỗn hợp đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây lạc.

2.4.1. Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh của việc nhiễm chủng Bs.9 đơn lẻ và hỗn hợp.

Tiến hành nhiễm các chủng vi khuẩn nghiên cứu vào đất, cho chúng phát triển 2 tuần sau nhiễm tiếp chủng gây bệnh héo xanh *R. solanacearum* 222 vào trước khi trồng lạc. Sau 1 tháng trồng lạc, tiến hành quan sát các chậu đất. Khi lạc được 2-3 lá, tiến hành tiêm *R. solanacearum* 222 (ở nồng độ 10^{-5}) vào các lách lá cây lạc. Sau một tháng đọc kết quả.

Bảng 8. Khả năng kháng bệnh của hỗn hợp chủng và của chủng Bs.9 đơn lẻ trên cây lạc.

Mẫu	Số cây lạc sống sót		
	Nhiễm <i>R. solanacearum</i> vào đất	Tiêm <i>R. solanacearum</i> vào cây lạc	Không nhiễm <i>R. solanacearum</i> vào cây lạc
Không nhiễm (ĐC)	5	0	25
Nhiễm hỗn hợp chủng	25	25	25
Nhiễm chủng Bs.9	23	20	25

Kết quả cho thấy, khi nhiễm *R. solanacearum* vào đất trồng lạc, hay tiêm trực tiếp vào thân cây, trong điều kiện trước đó đã nhiễm hỗn hợp chủng thì không có cây nào bị nhiễm bệnh (tỷ lệ sống sót 100%), trong khi đó khi nhiễm dịch nuôi riêng rẽ chủng Bs.9 thì chỉ còn 80-92 % cây sống sót, ở mẫu đối chứng 80-100% cây bị bệnh.

2.4.2. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật nuôi cấy hỗn hợp và riêng rẽ đến khả năng sinh trưởng của cây lạc

Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được nhiễm vào các luống đất trồng 15 ngày trước khi gieo lạc. Gieo lạc, đo chiều cao của cây, khối lượng thân, rễ, số lượng nốt sần và số củ trên cây trong 60 ngày.

Bảng 9. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đến sinh trưởng của cây lạc.

Ngày	Chiều cao cây (cm)					
	Nuôi riêng rẽ				Hỗn hợp chủng	ĐC
	Chủng Bs.9	Chủng RA 04	Chủng RTL 2.2	Chủng A5		
15	6,7	6,6	6,5	6,8	7,0	6,5
30	26,0	25,1	23,6	25,8	26,2	23,3
45	29,5	28,9	28,7	29,5	30,0	28,2
60	31,2	30,3	30,0	31,5	32,0	29,8

Bảng 10. Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây lạc khi trồng trong đất nhiễm vi sinh vật.

Chỉ tiêu	Nhiễm riêng rẽ				Nhiễm hỗn hợp	ĐC
	Bs.9	RTL.2.2	A5	RA.04		
Khối lượng cây tươi (g)	31	30,5	31,1	30,8	31,4	29,0
Khối lượng cây khô (g)	8,0	7,8	8,1	8,0	8,5	7,5
Số lượng nốt sần/cây	46	48	65	135	105	22
Khối lượng rễ tươi (g)	3,8	3,9	4,0	4,2	4,5	3,1
Khối lượng rễ khô (g)	0,81	0,80	0,84	0,95	0,98	0,66
Số lượng củ /cây	14,8	14,3	15,4	16,5	17,3	12,6
Khối lượng củ tươi/cây(g)	28,6	28,4	30,2	32,2	34,6	24,6
Khối lượng củ khô/cây (g)	16,6	17,4	19,1	19,7	20,4	14,3

Kết quả ở bảng 9 và 10 cho thấy:

- Khi nhiễm các chủng vi khuẩn nghiên cứu vào đất trồng lạc không những không làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lạc mà còn giúp cây sinh trưởng tốt, đặc biệt là khi nhiễm hỗn hợp các chủng.
- Khối lượng cây ở đất nhiễm dịch nuôi hỗn hợp vi sinh vật là lớn nhất, sau đó mới đến các cây trồng trong đất nhiễm chủng A5 (sinh chất kích thích sinh trưởng).
- Số lượng nốt sần/cây ở những cây có nhiễm chủng RA.04 là 135 cao hơn hẳn các trường hợp khác do quan hệ cộng sinh giữa RA.04 và cây lạc. Các nốt sần này nhỏ và nằm cả ở rễ chính và rễ phụ. ở những cây nuôi hỗn hợp nốt sần ít hơn (105) nhưng phát triển to hơn và chủ yếu trên các rễ chính do vậy có hiệu quả rõ rệt như trong kết quả của bảng 7. ở các cây nhiễm chủng Bs.9 và RTL.2.2, A5, số lượng nốt sần không nhiều bằng các cây trồng trên đất nhiễm hỗn hợp chủng và các nốt sần phát triển cả trên rễ chính và rễ phụ.
- Bộ rễ phát triển nhất khi trồng lạc ở đất nhiễm hỗn hợp chủng, tiếp đến là nhiễm chủng RA.04.
- Ở các cây lạc và bộ rễ phát triển mạnh đều cho năng suất củ cao. ở đất nhiễm hỗn hợp chủng, số lượng củ nhiều, củ chắc và thường có 2-3 hạt, trong khi đó ở mẫu đối chứng củ thường chỉ có 1 hạt, đôi khi còn bị lép.

III. XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN BÓN ĐA CHỨC NĂNG

3.1. Nhân giống.

3.1.1. Nhân giống gốc.

Kết quả trong mục I đã chọn được các môi trường nhân giống gốc trong thạch nghiêng cho các chủng như sau:

- Chủng RA.04 được nuôi cấy trên môi trường YMA.
- Chủng A₅ được nuôi cấy trên môi trường Burk.
- Chủng RTL2.2 được nuôi cấy trên môi trường Gerretsen.
- Chủng Bs.9 được nuôi cấy trên môi trường canh thang.

3.1.2. Nhân giống cấp 1.

Lấy một vòng que cấy các chủng vi khuẩn RA.04, A₅, RTL2.2, Bs.9, từ ống giống gốc cấy vào bình bình nón dung tích 250ml, chứa 100ml môi trường canh thang, lắc 220 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C.

3.1.3. Nhân giống cấp 2 (trong nổi lên men).

3.1.3.1. Tuổi giống hỗn hợp cấp 1 thích hợp để cấy nhân giống cấp II.

Giống hỗn hợp cấp 1 các chủng được cấy ở các độ tuổi 1, 2, 3 ngày vào nổi lên men chứa môi trường canh thang. Khuấy 200 vòng/phút ở 30°C, tốc độ thổi khí 1 đơn vị (một thể tích không khí vào một thể tích môi trường trong 1 phút). Sau hai ngày đếm số lượng tế bào các chủng vi khuẩn.

Bảng 11. Tuổi giống hỗn hợp cấp I thích hợp để cấy nhân giống cấp II.

Thời gian nuôi (ngày)	Số lượng tế bào ($\times 10^9$ CFU/ml)				
	RA.04	A ₅	RTL2.2	Bs.9	Tổng số
1	68	72	64	65	269
2	58	72	58	62	250
3	4,5	4,2	5,2	2,4	16,3

Kết quả ghi ở bảng 11 cho thấy số lượng các chủng vi khuẩn gần tương đương nhau khi cấy ở 1, 2 ngày tuổi của giống cấp 1 và giảm hẳn ở 3 ngày tuổi. Khi lên men sử dụng giống một ngày tuổi thì không có bọt, còn giống 2,3 ngày tuổi thì có nhiều bọt trào ra, làm ảnh hưởng đến năng suất lên men. Tuổi giống cấp 1 sau một ngày lắc là thích hợp cho việc nhân giống trong nổi lên men.

3.1.3.2. Tỷ lệ giống hỗn hợp cấp I thích hợp để cấy nhân giống cấp II.

Giống cấp I sau một ngày lắc được cấy với các tỷ lệ 0,1; 0,5; 1; 5; 10% vào nổi lên men chứa môi trường canh thang. Khuấy 200 vòng/phút ở 30°C, tốc độ thổi khí 1 đơn vị. Sau hai ngày đếm số lượng tế bào các chủng vi khuẩn.

Kết quả cho thấy tỷ lệ giống cấy từ 1-10% cho số lượng các chủng vi khuẩn là lớn nhất. Để tiết kiệm lượng giống cấy cấp I, ta nên chọn tỷ lệ giống cấy từ 1- 5%.

Bảng 12. Tỷ lệ giống hỗn hợp cấp I thích hợp để cấy nhân giống cấp II.

Tỷ lệ (%)	Số lượng tế bào ($\times 10^9$ CFU/ml)				
	RA.04	A ₅	RTL2.2	Bs.9	Tổng số
0,1	5	5,6	8	9,6	28,2
0,5	24	32	42	45	143
1	63	60	56	58	237
5	66	62	54	65	247
10	65	60	63	66	254

3.1.3.3. Tốc độ khuấy thích hợp trong lên men hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Giống cấp 1 sau một ngày nuôi được cấy vào nổi lên men 10 lít chứa môi trường canh thang. Đặt ở chế độ khuấy 100, 200, 300 vòng/phút, ở 30⁰C, tốc độ thổi khí 1 đơn vị. Sau hai ngày nuôi tiến hành đếm số lượng tế bào các chủng vi khuẩn.

Bảng 13. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy trong lên men hỗn hợp các chủng vi khuẩn

Tốc độ khuấy (V/P)	Số lượng tế bào ($\times 10^9$ CFU/ml)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
100	26	18	20	28	92
200	66	58	70	64	258
300	68	64	72	77	276

Kết quả cho thấy với tốc độ khuấy 200 – 300 vòng/phút cho số lượng tế bào các chủng vi khuẩn là lớn nhất.

3.1.3.4. Tốc độ thổi khí thích hợp trong lên men hỗn các chủng vi khuẩn.

Giống cấp I sau một ngày lắc được cấy vào nổi lên men chứa môi trường canh thang. Đặt ở chế độ thổi khí 0,5, 1, 1,5 đơn vị, tốc độ khuấy 200 vòng/phút ở 30⁰C. Sau hai ngày đếm số lượng tế bào của các chủng vi khuẩn.

Bảng 14. Ảnh hưởng của tốc độ thổi khí trong lên men hỗn hợp đến khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn.

Tốc độ thổi khí (V/V/p)	Số lượng tế bào ($\times 10^9$ CFU/ml)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
0,5	20	13	14	28	75
1	62	59	72	74	267
1,5	68	66	70	72	276

Qua bảng trên ta thấy ở tốc độ thổi khí tỷ lệ thuận với số lượng tế bào vi sinh vật. Chúng tỏ nhu cầu oxy của các chủng trên là cao vì vậy tốc độ thổi khí từ 1 – 1,5 là thích hợp cho lên men.

3.1.3.5. Xác định thời gian thích hợp cho lên men hỗn hợp các chủng vi khuẩn thích hợp.

Sự phát triển của vi sinh vật trong nồi lên men luôn tuân thủ theo đường cong sinh trưởng. Dựa vào sản phẩm lên men mong muốn (sản phẩm sơ cấp hay thứ cấp) để ta kết thúc quá trình lên men.

Giống cấp I sau một ngày lắc được cấy vào nồi lên men chứa môi trường canh thang. Tốc độ thổi khí 1 đơn vị, tốc độ khuấy 200 vòng/phút ở 30°C. Hàng ngày đếm số lượng tế bào các chủng vi khuẩn

Bảng 15. Thời gian thích hợp cho lên men hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào ($\times 10^9$ CFU/ml)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
1	2,4	1,2	1,8	2,2	7,6
2	70	72	68	66	276
3	54	74	54	62	244
4	38	42	23	20	123

Từ kết quả trên cho thấy thời gian từ 2 - 3 ngày cho số lượng tế bào cao nhất. Do vậy có thể chọn thời gian này cho lên men xốp.

3.2. Lên men xộp cho sản xuất phân vi sinh vật.

3.2.1. Lựa chọn chất mang.

Tham khảo các tài liệu sản xuất chế phẩm của chương trình KC.02-06 giai đoạn 1996-2000 để sản xuất chế phẩm phân vi sinh đa chủng, ở đây sử dụng 7 loại cơ chất: cám, bột dong, bột ngô, than bùn, bột đậu tương vừa làm chất dinh dưỡng vừa làm chất mang, thêm 5% rỉ đường. Cấy 10% giống vào các túi cơ chất đã được khử trùng. Kiểm tra số lượng các chủng sau 6 ngày.

Bảng 16. Biến động số lượng tế bào theo thời gian khi nuôi cấy hỗn hợp trên các nguồn cơ chất khác nhau.

Cơ chất	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/ml)				
	Bs.9	A5	RTL 2.2	RA 04	Tổng số
Cám	40	32	36	29	137
Cám trấu	25	25	20	16	93
Bột dong	9	8	15	2	34
Bột gạo	28	36	38	22	124
Than bùn	1,8	0,3	1,2	0,6	3,9
Bột đậu tương	76	70	86	68	300

Kết quả bảng 2 cho thấy số lượng tế bào đạt cao nhất khi nuôi trên môi trường chứa bột đậu tương. Do vậy ở các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng công thức này.

3.2.2. Lựa chọn tỷ lệ rỉ đường thích hợp.

Nuôi hỗn hợp 4 chủng trong môi trường bột đậu tương và bổ sung rỉ đường với các nồng độ khác nhau, cấy 10% giống. Sau 5 ngày tiến hành kiểm tra số lượng tế bào.

Bảng 17. Số lượng tế bào khi nuôi trong môi trường với các tỷ lệ rỉ đường

Tỷ lệ rỉ đường (%)	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/ml)				
	RAO4	A5	Bs. 9	RTL 2.2	Tổng số
1	22	29	33	36	120
3	85	78	71	82	316
5	78	65	92	75	310
10	82	68	88	77	315

Kết quả bảng 4 cho thấy, tỷ lệ rỉ đường 3% là thích hợp nhất.

3.2.3. Lựa chọn tỷ lệ giống cấy thích hợp.

Nuôi cấy hỗn hợp 4 chủng nghiên cứu trong môi trường xốp: bột đậu tương + 3% rỉ đường với tỷ lệ giống cấy khác nhau. Sau 5 ngày kiểm tra số lượng tế bào.

Bảng 18. Số lượng tế bào khi nuôi trong môi trường với các tỷ lệ giống cấy.

Tỷ lệ giống cấy (%)	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/ml)				
	RAO4	A5	Bs. 9	RTL 2.2	Tổng số
1	21	29	18	20	88
5	42	48	38	32	160
10	75	72	87	79	313
15	78	69	79	92	318

Kết quả cho thấy tỷ lệ giống cấy 10% là hợp lý nhất.

3.2.4. Thời gian thích hợp cho lên men xốp.

Cấy 10% hỗn hợp các chủng vi khuẩn sau khi nuôi ở nổi lên men vào bột đậu tương có bổ sung 3% rỉ đường, độ ẩm 40-50%, giữ ở nhiệt độ từ 28 - 30°C . Kiểm tra số lượng theo thời gian.

Bảng 19. Thời gian lên men xốp hỗn hợp các chủng vi khuẩn thích hợp

Thời gian (ngày)	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/g)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
2	18	20	16	22	76
4	85	76	72	80	313
6	78	74	80	78	310

Qua kết quả ở bảng 10 ta thấy số lượng tế bào cao nhất ở ngày thứ 4. Thời gian thu sản phẩm thích hợp vào ngày thứ 4.

2.2.5. Lựa chọn độ ẩm thích hợp cho bảo quản chế phẩm.

Sau khi hoàn thiện khâu nuôi cấy, chúng tôi tiến hành sấy khô nhẹ chế phẩm đến các hàm ẩm khác nhau. Sau 30 ngày, tiến hành lấy mẫu để kiểm tra số lượng tế bào. Kết quả được trình bày ở bảng sau.

Bảng 20. Số lượng tế bào khi bảo quản ở các độ ẩm khác nhau theo thời gian.

Thời gian (ngày)	Độ ẩm (%)	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/g)				
		RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
0	10	48	47	59	66	220
	15	78	84	60	94	322
	20	69	78	52	76	275
	25	62	59	44	62	217
30	10	13	28	48	40	129
	15	76	82	66	92	316
	20	80	66	42	49	237
	25	82	52	23	25	182

Số liệu ở bảng 6 cho thấy, độ ẩm 15% là thích hợp nhất để duy trì khả năng sống của các vi sinh vật trong chế phẩm.

3.2.5. Thời gian bảo quản chế phẩm

Sau khi lên men xốp ở ngày thứ 4, tiến hành sấy khô ở 37-40°C đến khi độ ẩm đạt 10-15%. Chế phẩm được đóng vào bao kềm. Hàng tháng tiến hành kiểm tra số lượng.

Bảng 21. Thời gian bảo quản chế phẩm

Thời gian (tháng)	Số lượng tế bào ($\times 10^8$ CFU/g)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
0	76	82	60	90	318
1	78	84	66	94	322
2	76	82	60	96	314
3	70	80	56	88	294
4	38	46	42	64	190
5	30	31	28	28	117
6	15	18	20	22	75

Số lượng tế bào trong ba tháng đầu hầu như không thay đổi, từ tháng thứ tư bắt đầu giảm dần. Chế phẩm nên sử dụng trong vòng 6 tháng.

Thông thường phân bón vi sinh (Microbioal fertilizer) loại giống cấy nhằm đưa vi sinh vật hữu hiệu vào đất để thay đổi sự cân bằng khu hệ vi sinh vật, tăng cường các vi sinh vật có lợi để giảm thiểu các vi sinh vật có hại. Loại phân này được bón rất ít, chỉ 3 -4 kg/ha. Vì số lượng ít nên khó giải đều, nên cũng thường được dùng để hồ rế hoặc tắm hạt.

3.3. Sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh từ than bùn

3.3.1. Xử lý than bùn

Than bùn được chỉnh pH về 6-6,5, bổ sung rỉ đường 3%, urê 0,2%, kali 0,1%, lân 0,1%, bột đậu tương 2% và vi sinh vật hân giải xenluloz. Tưới nước ở độ ẩm 45-50%. Ủ 15 ngày. Sau khi ủ các thành phần hữu cơ trong than bùn được khoáng hoá, nhất là không còn thành phần làm chai đất.

3.3.2. Lên men phân bón hữu cơ vi sinh

Phân bón vi sinh nếu một lần nữa được nhân lên trong than bùn và xử lý thì không những có thể làm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích trong phân mà than bùn còn là chất mang tốt, bao bọc vi sinh vật để có thể kéo dài thời gian bảo quản. Loại phân này sẽ thuận tiện khi sử dụng, đồng thời vừa cung cấp chất dinh dưỡng cho cây, vừa cung cấp các vi sinh vật hữu ích cho đất.

3.3.2.1. Khả năng sinh trưởng của hỗn hợp các chủng vi khuẩn trong đồng ủ.

Than bùn đã được xử lý trộn thêm rỉ đường 3%, urê 0,2%, kali 0,1%, lân 0,1%, bột đậu tương 2%, chế phẩm 10%, độ ẩm 45-50%. Tiến hành đo nhiệt độ và kiểm tra số lượng tế bào cứ 2 ngày một lần.

Bảng 22. Thời gian lên men thích hợp của các chủng vi khuẩn trong đồng ủ.

Thời gian (ngày)	Nhiệt độ (°C)	Số lượng tế bào ($\times 10^7$ CFU/g)				
		RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
2	37	2	3	3	4	12
4	40	18	12	9	16	55
6	38	34	24	30	30	118
8	37	96	48	52	44	240
10	36	120	60	72	68	318
12	34	122	64	72	66	324
14	32	122	60	68	64	314

Kết quả bảng trên cho thấy sau 10 ngày, số lượng tế bào các chủng vi khuẩn đạt cao nhất. Do vậy ta nên dừng ủ sau 10 ngày.

3.3.3.2. Thời gian bảo quản phân bón hữu cơ vi sinh

Sau 10-15 ngày ủ. Phân bón được sấy khô đến độ ẩm 10-15%. Sau đó được làm mịn qua sàng rồi đóng bao polime kín. Hàng tháng kiểm tra số lượng tế bào các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Bảng 23. Thời gian bảo quản phân bón hữu cơ vi sinh

Thời gian (tháng)	Số lượng tế bào ($\times 10^7$ CFU/g)				
	RA.04	A5	RTL2.2	BS.9	Tổng số
0	136	72	80	76	364
1	125	70	82	74	351
2	92	68	80	72	312
3	45	52	54	48	199
4	22	34	32	32	120
5	12	8	10	14	44
6	2,3	1,5	2,8	2,7	9,3

Kết quả trên cho thấy sau 3 tháng bảo quản số lượng các chủng vi khuẩn không thay đổi nhiều. Sau 6 tháng số lượng đạt 10^7 /g.

3.4. Khảo nghiệm

Các khảo nghiệm được tiến hành tại gia đình ông Lê Thọ, thôn Hồng Kỳ, xã Hải Ninh, huyện Tĩnh Gia, tỉnh Thanh Hoá trên đất cát pha với diện tích 1 sào (500 m²) với các công thức bón như sau:

- Ruộng không bón làm đối chứng
- Ruộng bón phân bón vi sinh: 0,5 kg/sào
- Ruộng bón phân hữu cơ vi sinh: 42 kg/sào

Sau khi thu hoạch kết quả như sau:

- Ruộng không bón đạt 105 kg lạc khô/sào

- Ruộng bón phân bón vi sinh: 140 kg lạc khô/sào (tăng năng suất 33%)
- Ruộng bón phân hữu cơ vi sinh: 150 kg lạc khô/sào (tăng năng suất 43%)

Chi phí giá thành như sau:

- Ruộng không bón: $105 \text{ kg lạc} \times 5.000 \text{ đ} = 525.000 \text{ đ}$
- Ruộng bón phân bón vi sinh: $140 \text{ kg lạc} \times 5.000 \text{ đ} = 700.000 \text{ đ}$
 Trừ phân bón: $0,5 \text{ kg} \times 30.000 \text{ đ} = 15.000 \text{ đ}$
 Còn lại: **685.000 đ**
- Ruộng bón phân hữu cơ vi sinh: $150 \text{ kg lạc} \times 5000 \text{ đ} = 750.000 \text{ đ}$
 Trừ phân bón: $42 \text{ kg} \times 1.200 \text{ đ} = 50.400 \text{ đ}$
 Còn lại: **699.600 đ**

Như vậy khi sử dụng phân bón vi sinh vật để trồng lạc tăng thêm 160.000 đ/sào. Sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh để trồng lạc tăng thêm 174.600 đ/sào.

KẾT LUẬN

1. Phân lập tuyển chọn được các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao gồm:

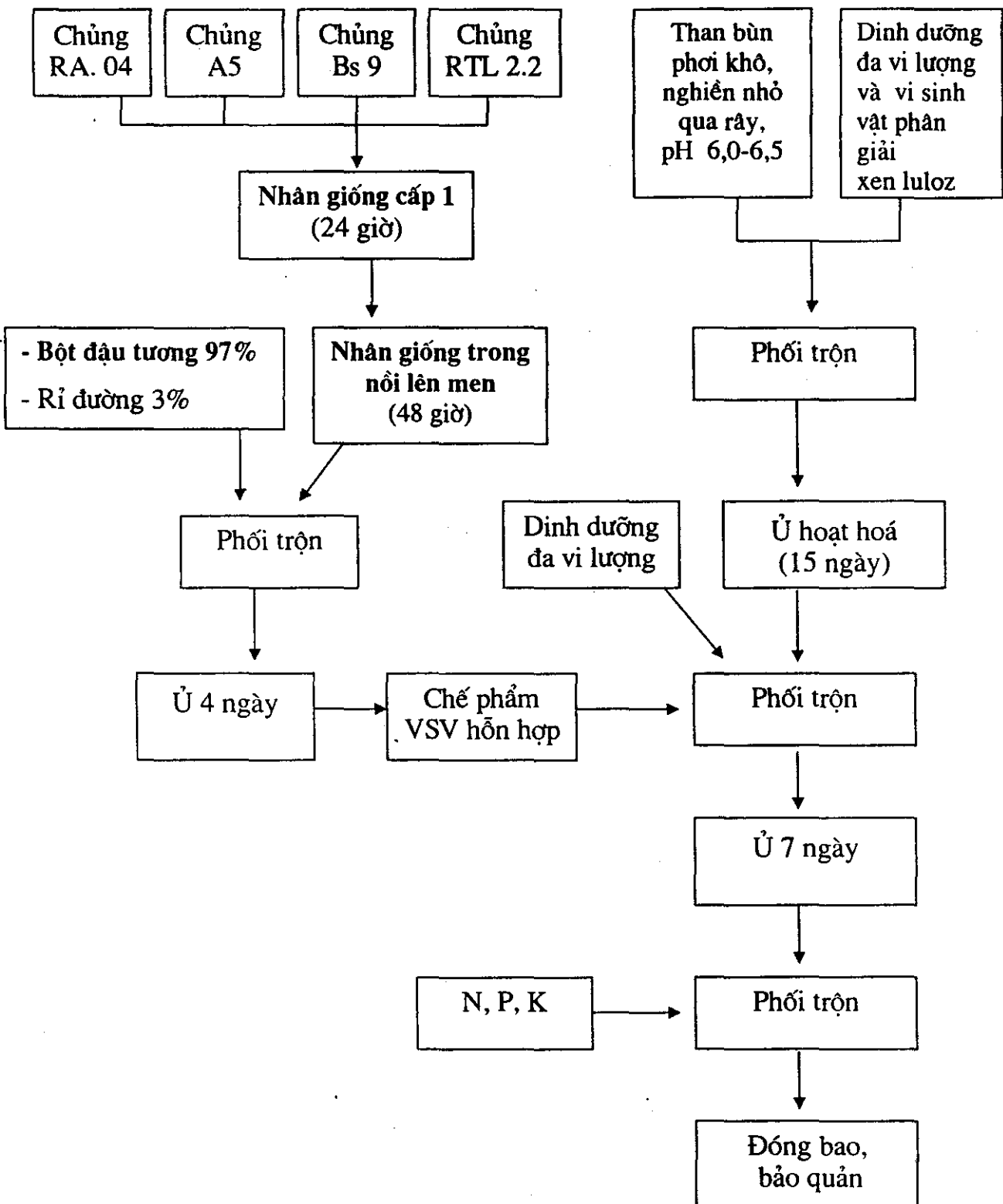
- Một chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hoá photpho khó tan ký hiệu là *Bacillus* sp.21.
- Ba chủng vi khuẩn quang hợp H6, H11 và H14 có khả năng cố định nitơ và có hoạt tính nitrogenaza cao thuộc chi *Rhodopseudomonas*.
- Hai chủng vi khuẩn A3 và A5 thuộc chi *Azotobacter*, ba chủng xạ khuẩn 27.6 được xác định thuộc loài *Streptomyces roseofulvus*, chủng 5.4 thuộc loài *Streptomyces thermoflavus*, chủng M₆₁ là *Streptomyces* sp. Năm chủng này có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng cao.
- Bốn chủng xạ khuẩn: 94, 112, G7, G13 có hoạt tính kháng *Ralstonia solanacearum* cao nhất. Dựa vào các đặc điểm phân loại, chủng 94 được xác định là *Streptomyces actuosus*; chủng 112 được xác định là *Streptomyces arabicus*; chủng G7 được xác định là *Streptomyces misakiensis*, chủng G13 được xác định là *Streptomyces cyaneogriseus*.
- Hai chủng xạ khuẩn: H7 và H10 có hoạt tính kháng nấm *Fusarium oxysporum* cao nhất. Dựa vào các đặc điểm phân loại chúng tôi xác định chủng H7 là *Streptomyces spadici*, chủng H10 là *Streptomyces aureocirculatus*.

2. Khi nuôi cấy hỗn hợp các chủng vi khuẩn RA.04, RTL 2.2, Bs.9 và A₅ thì khả năng sinh trưởng và sinh các chất có hoạt tính sinh học tốt hơn nuôi riêng rẽ.

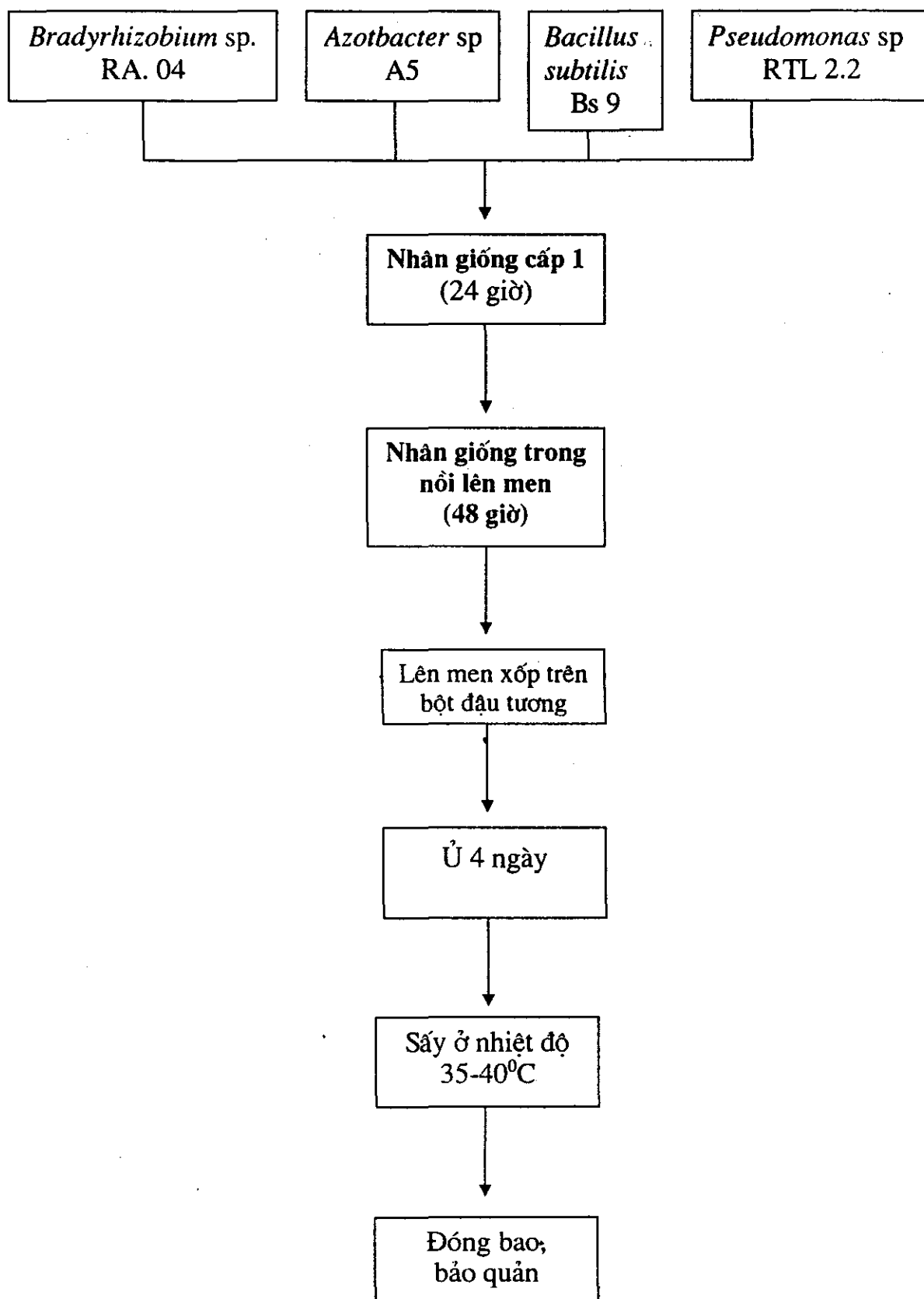
3. Điều kiện thích hợp trong lên men dịch thể và lên men xộp các chủng vi khuẩn RA.04, RTL 2.2, Bs.9 và A₅

- Tuổi giống cấp 1 sau một ngày nuôi cấy là thích hợp cho việc nhân giống cấp II.
- Điều kiện lên men dịch thể thích hợp nhất là: Tốc độ khuấy 200 vòng/phút, độ thổi khí 1v/v/p, tỷ lệ giống 5%, nhiệt độ 30°C.
- Điều kiện lên men xộp tối ưu trong sản xuất phân bón đa chức năng trên cơ chất bột đậu tương: bổ sung 3% rỉ đường, tỷ lệ giống cấy 10%, độ ẩm 45-50%, thời gian lên men sau 4 ngày.
- Điều kiện ủ phân bón hữu cơ vi sinh trên cơ chất than bùn: bổ sung 2% bột đậu tương, 3% rỉ đường, tỷ lệ giống cấy 10%, độ ẩm 45-50%, thời gian lên men sau 10 ngày.

QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN BÓN HỮU CƠ VI SINH



QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hướng dẫn sử dụng EM cho các mạng lưới APNAN (Mạng lưới Nông nghiệp thiên nhiên châu á- Thái Bình Dương). 1995.
2. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. Vi sinh vật học. Nhà xuất bản giáo dục.1997.tr 361-362.
3. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyến, Nguyễn Phùng Tiến, Phạm Văn Ty. 1976. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
4. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. Phương pháp nghiên cứu Vi sinh vật học. Tập 3. Nxb Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội, 1977.
5. Vũ Minh Đức. Khả năng hình thành chất kích thích sinh trưởng thực vật của vi khuẩn vùng rễ và ứng dụng. Đề tài khoa học cấp Trường Đại học Khoa học Tự nhiên-1996.
6. Nguyễn như Khanh, Phùng Gia Tường, Võ Minh Tư. ảnh hưởng của một số chất điều hoà sinh trưởng(α -IAA,GA3, kinetin) đến sự nảy mầm và một số chỉ tiêu sinh lý của cây mạ CR 203. Tạp chí Sinh học.17, 1995. 36-39.
7. Phạm Văn Toàn. 2000. Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng chế phẩm phân bón vi sinh vật tổng hợp phục vụ phát triển nông, lâm nghiệp bền vững. Báo cáo tổng kết đề tài KHCN.02.06.
8. Vũ Văn Vụ, Vũ Thanh Tâm, Hoàng Minh Tấn. Sinh lý học thực vật. Nhà xuất bản Giáo dục. 1997.
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol 4, 1998.
10. Bose, S. K. Media for anaerobic growth of photosynthetic bacteria. In: Gest, H., San Pitro, A., verson, L.P.Bacterial photosynthesis. Yellow springs, Ohio Abticoch press.1963. 501-519.
11. Casida, L. E. Industrial Microbiology - Jonh Wiley and Sons, Inc. 1986.
12. Chattopadhyay, K.K. and P.S. Basu (1989). Bioproduction of Indole Acetic Acid by the Rhizobium species: Microbiol. 11A: 29-35.
13. Dullaart, J. (1970). The bioproduction of indole-3-acetic acid and related compound in root nodules and roots in Lupinus L. and it rhizobial symbiont. Acta. Bot. Neer. 19: 537-615.

14. Fuchs, G., Stupperich, E., and Jaenchen, R., Autotrophic CO₂ fixation in *Chlorobium limicola*. Evidence against the operation of the Calvin cycle in growing cell: *Arch Microbiol.* 128. 1980. 64-71.
15. Gettetsen, F. C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by the plant. *Plant and Soil.* 1. 51-81.
16. Jain, D.K. and D.G. Patriquin (1985). Characterization of substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can.J. Microbiol.* 31:206-210.
17. Kapulnik, Y., R. Gafny and Y. Okon (1985). Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃⁻ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can.J.Bot.* 63: 627-631.
18. Porter, N.. Cultural conditions for antibiotic- producing microorganisms. *Methods in enzymology.* Vol 18, 1975, p. 3-23.
19. Ronald, M. Atlas - Principles of Microbiology - Mosby - Year Book, Inc. 1995.
20. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bact.*, 22, 1966, p. 313-340.

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NCKH CẤP NHÀ NƯỚC NĂM 2001 - 2004

Mã số: KC 04 - 04 . ĐHNH I

**Tên đề tài: "NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT PHÂN VI
SINH VẬT ĐA CHỦNG, ĐA CHỨC NĂNG SỬ DỤNG CHO CÂY LẠC"**

**Chủ nhiệm đề tài nhánh: PGS. TS Nguyễn Xuân Thành
KHOA ĐẤT VÀ MÔI TRƯỜNG TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP I**

Những người tham gia: PGS. TS Nguyễn Đình Mạnh

Th.S. Lê Thị Hồng Xuân

KS. Vũ Thị Hoàn

KS. Trần Văn Chiến

KS Phan Văn Khuê

KS. Nguyễn Hạ Văn

KS. Hoàng Hữu Nội

Hà Nội - 2004

TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU

Vài thập kỷ gần đây, chế phẩm vi sinh vật nói chung và phân vi sinh vật nói riêng đã được người nông dân biết đến. Những loại chế phẩm vi sinh vật này đã thực sự góp phần vào việc làm tăng năng suất và chất lượng của các loại cây trồng, thúc đẩy nông nghiệp phát triển theo hướng bền vững ở Việt Nam.

Muốn có phân vi sinh vật tốt, phải có giống VSV tốt, thích ứng ở môi trường pH rộng, có sức cạnh tranh lớn, có hoạt lực cao, phát huy tác dụng ở nhiều vùng sinh thái.

Xu hướng hiện nay là tạo ra được một loại chế phẩm vi sinh vật có nhiều chức năng khác nhau.

Thực hiện nhiệm vụ của Ban Chủ nhiệm đề tài Nhà nước KC 04 - 04 giao, năm 2001 - 2003 nhánh đề tài KC 04 - 04 - ĐHNHI đã thực thi đề tài:

“Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất phân vi sinh vật đa chủng, đa chức năng sử dụng cho cây lạc”

Hy vọng sẽ tạo ra được một loại phân VSV đa chức năng (vừa có khả năng cố định nitơ phân tử, vừa phân giải các hợp chất photphat khó tan, tăng khả năng quang hợp của cây, lại vừa tăng khả năng đề kháng sâu bệnh của cây trồng

I. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Đánh giá đặc tính sinh học của các chủng giống VSV dùng trong nghiên cứu
- Xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây lạc.
- Đánh giá hiệu lực của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây lạc.

II. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu:

- Chủng giống VSV từ ban chủ nhiệm đề tài KC 04- 04 cung cấp
- Đất trồng cây lạc - đất phù sa sông Hồng và đất bạc màu Bắc Giang

- Chất mang – Phế thải hữu cơ sau xử lý (Rác thải sinh hoạt khu dân cư của trường Đại học Nông nghiệp I, sau khi đã xử lý)

2. Nội dung nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu trên cần nghiên cứu những nội dung sau:

- Đánh giá đặc tính sinh học của các chủng VSV, làm giống sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây lạc, gồm: xác định thời gian mọc, hình thái tế bào, kích thước khuẩn lạc, Khả năng thích ứng ở môi trường pH, Khả năng cạnh tranh (khả năng chịu kháng sinh).

Nguồn gốc các chủng giống VSV được dùng trong nghiên cứu:

- + Chủng RA 18 (*Bradyrhizobium*) - do VKHKTNN.VN cung cấp
- + Chủng 4g (*Enterobacter cloacae*) - do VKHKTNN.VN cung cấp
- + Chủng B16 (*Bacillus sp*) - do VKHKTNN.VN cung cấp
- + Chủng B1 (*Bacillus subtilis*) - do trường ĐHNNI cung cấp
- + Chủng BM2 (*Rhizobium vigna*) - do trường ĐHNNI cung cấp
- Nghiên cứu chất mang để làm cơ chất – từ rác thải hữu cơ sau khi đã xử lý
- Xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ đa chức năng
- Đánh giá chất lượng của phân hữu cơ đa chủng đa chức năng trong thời gian bảo quản và sử dụng

3. Phương pháp nghiên cứu:

3.1. Nuôi cấy VSV trên môi trường chuyên tính cho từng chủng giống

* Môi trường YMA cho *Bradyrhizobium* (chủng RA18)

Manitol	- 10g	Agar	- 18g
KH ₂ PO ₄	- 0,5g	pH	- 7,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	- 0,25g	Công gô	- 7ml
NaCl	- 0,1g	Nước cất	- 1000ml
Cao nấm men	- 0,5g		

* Môi trường YGA cho *Enterobacter cloacae* (Chủng 4g)

Glucosa	- 10g	Agar	- 18g
KH ₂ PO ₄	- 0,5g	pH	- 7,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	- 0,1g	Công gô	- 10ml
Cao nấm men	- 0,4g	Nước cất	- 1000ml

* Môi trường KINH cho *Bacillus sp* (Chủng B16)

Pepton	- 5g	Glyxerin	- 10g
MgSO ₄	- 0,5g	K ₂ HPO ₄	- 0,5g
Nước cất	- 1000ml	pH	- 7,0

* Môi trường Thịt - Pepton cho *Bacillus subtilis* (chủng B1)

Cao thịt	- 5g	Pepton	- 5g
NaCl	- 0,5g	Agar	- 20g
Nước cất	- 1000ml	pH	- 7,0

* Môi trường nước chiết đậu tương cho *Rhizobium vigna* (Chủng BM2)

Đậu tương	- 50g	K ₂ HPO ₄	- 0,5g
MgSO ₄	- 0,5g	Glucosa	- 10g
Agar	- 20g		
Nước cất	- 1000ml	pH	- 7,0

3. 2. Nuôi cấy VSV trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28 °C.
3. 3. Xác định kích thước khuẩn lạc theo phương pháp đo trực tiếp.
3. 4. Xác định hình thái tế bào VSV trên kính hiển vi
3. 5. Xác định khả năng mọc ở môi trường pH khác nhau, nuôi cấy trực tiếp trên môi trường pH khác nhau theo phương pháp chuẩn độ đệm photphat
3. 6. Đánh giá khả năng cạnh tranh của các chủng theo phương pháp nuôi cấy trên môi trường có nồng độ Streptomycin khác nhau (100 - 1000 mg/lit MT)
3. 7. Đánh giá hiệu lực của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bằng thí nghiệm trên cây ở quy mô chậu vại và trên đồng ruộng.
- 3.8. Xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây lạc theo phương pháp hỗn hợp chủng giống của trường ĐHNNT

3.9 Kiểm tra chất lượng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng theo hướng dẫn của Bộ NN &PTNT. Năm 2000. TCVN 1996.

3.10 Đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng trên cây

+ Thí nghiệm trồng cây trong chậu của Vacek có cải tiến.

Giống lạc thí nghiệm - lạc Sen lai. T/N gồm 4 công thức 4 lần nhắc lại:

Công thức 1: Đối chứng trắng

Công thức 2: Cơ chất hữu cơ từ rác thải đã tiệt trùng

Công thức 3: Bón phân hữu cơ hỗn hợp vi sinh vật cũ (SP. KHCN 02 - 06)

Công thức 4: Bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng (SP. KC04-04)

+ Thí nghiệm đồng ruộng: Gồm 4 công thức 4 lần nhắc lại

Thí nghiệm 1 - trên đất phù sa sông Hồng

Công thức 1: Nền: $30N + 90P_2O_5 + 45 K_2O$ (nền thâm canh của dân)

Công thức 2: Nền + Cơ chất hữu cơ triệt trùng (0,5T/ha)

Công thức 3: Nền + Phân hỗn hợp VSV (VKCĐĐ + VKPGL - sản phẩm KHCN 02- 06) (0,5T/ha)

Công thức 4: Nền + Phân VSV đa chức năng (0,5T/ha) - sản phẩm của đề tài KC 04- 04. ĐHNH

Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn toàn.

Diện tích ô T/N = $10m^2$, tổng diện tích thí nghiệm = $10 \times 4 \times 4 = 160 m^2$

Tổng diện tích ruộng thí nghiệm là $360 m^2$ T/N được triển khai khu ruộng thí nghiệm khoa Đất & Môi trường - trường ĐHNH Hà Nội.

Thí nghiệm 2 - được lặp lại như thí nghiệm 1, nhưng trên đất bạc màu xã Gia Đông huyện Thuận Thành tỉnh Bắc Ninh (ở chân ruộng chuyên màu), chỉ khác ở công thức nền - bón $40N + 120P_2O_5 + 75 K_2O$ (nền thâm canh của dân)

3.11 Theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất lạc theo phương pháp cân đong đo đếm trực tiếp.

3.12 Xử lý số liệu trên máy vi tính theo chương trình IRRISTAT & EXCEL

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá đặc tính sinh học của các chủng VSV

Bảng 1 Một số đặc tính sinh học của các chủng VSV

Ký hiệu chủng VSV	Thời gian mọc (giờ)	Kích thước khuẩn lạc sau một tuần nuôi cấy (mm)	Hình dáng và kích thước tế bào (μm)	Khoảng thích ứng ở môi trường pH	Khả năng kháng sinh mg/ lít MT
Chủng RA18	52	3,8	Que 0,92 x 4,65	5,0 - 8,0	300
Chủng 4g	42	4,3	Cầu 4,82 - 5,16	5,0, - 8,0	500
Chủng B16	76	3,7	Que 0,86 x 3,43	5,0 - 9,0	600
Chủng B1	83	3,3	Que 0,55 x 2,89	4,0 - 9,0	800
Chủng BM2	48	4,9	Que 0,74 x 3,28	4,0 - 8,0	400

Số liệu bảng 1 cho thấy:

+ Về thời gian mọc trên môi trường chuyên tính:

Tuỳ từng chủng VSV khác nhau có thời gian mọc khác nhau. Cả 5 chủng nuôi cấy đều mọc trước 96 giờ sau khi cấy vào môi trường chuyên tính. Mọc nhanh nhất là chủng 4g sau 42 giờ; tiếp đến là chủng BM2 mọc sau 48 giờ và chủng RA18 mọc sau 52 giờ. Chủng mọc chậm nhất là B1 mọc sau 83 giờ.

+ Về kích thước khuẩn lạc:

5 chủng nghiên cứu có kích thước khuẩn lạc dao động từ 3,3 mm đến 4,9 mm. Chủng có kích thước khuẩn lạc lớn nhất là BM2 đạt 4,9 mm, chủng có kích thước nhỏ nhất là B1 chỉ đạt 3,3 mm.

+ Về hình thái tế bào:

Trong 5 chủng, thì có 1 chủng 4g hình cầu, đó là tụ cầu, có kích thước tế bào dao động từ 4,82 - 5,16 μm , còn lại 4 chủng hình que, đó là RA18, B16, B1, BM2, có kích thước tế bào dao động từ 0,55 x 2,89 μm đến 0,92 x 4,65 μm . Trong đó B1 và B16 là vi khuẩn Gram dương, có nha bào, còn lại đều thuộc nhóm Gram âm không sinh nha bào.

+ Khả năng thích ứng ở môi trường pH:

Nhìn chung cả 5 chủng đều có thể mọc tốt ở pH từ 6,0 đến 8,0. Trong đó có 2 chủng là B1, B16 mọc được ở pH = 9,0; có 2 chủng còn mọc được ở pH rất chua, đó là: chủng B1, BM2 ở pH = 4,0

+ Khả năng kháng kháng sinh:

Tuỳ từng chủng VSV khác nhau, chịu được ở môi trường có nồng độ kháng sinh khác nhau. Cả 5 chủng đều mọc được ở nồng độ kháng sinh 300 mg/ lít môi trường, trong đó chủng B1 còn mọc được ở nồng độ kháng sinh rất cao 800 mg/ lít môi trường.

2. Nghiên cứu chất mang

Chất mang được tái chế từ rác thải hữu cơ sinh hoạt khu gia đình trường ĐHNLI.

Rác hữu cơ sinh hoạt được xử lý bằng chế phẩm vi sinh vật trong bể ủ trong 4 tuần, sau đó đem nghiền nhỏ qua máy sàng có kích thước < 0,5 mm, bột phế thải mịn, được bổ sung thêm các chất dinh dưỡng đa, vi lượng để làm cơ chất sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2: Kết quả phân tích rác thải hữu cơ sau khi đã xử lý, tái chế để làm cơ chất sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng.

Chỉ tiêu \ Nguồn gốc P.T	Rác thải sinh hoạt
pH _{KCl}	7,2
Độ ẩm (%)	40
Độ xốp (%)	72
OM%	24,60
N (%)	0,65
P ₂ O ₅ (%)	0,35
K ₂ O (%)	0,42
P ₂ O ₅ dt (mg/100g)	28
K ₂ O trao đổi (mg/100g)	52
Axit humic (%)	0,15

Số liệu bảng 2 cho thấy:

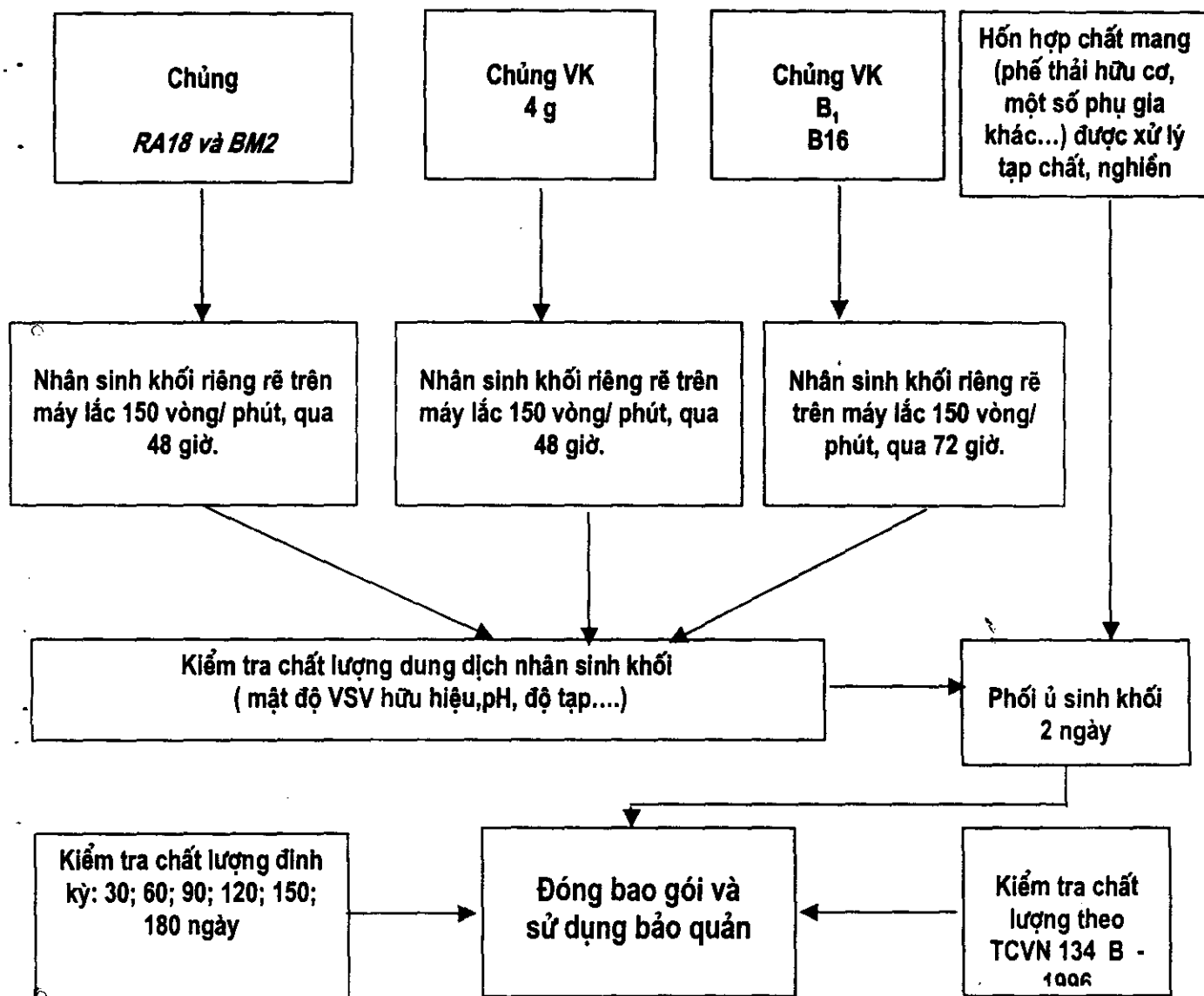
pH_{KCl} của phế thải hữu cơ sau xử lý đạt trung tính (7,2), độ ẩm 40 %, độ xốp 72 %, OM tổng số = 24,6 %, N tổng số = 0,65 %, P₂O₅ = 0,35 %, K₂O = 0,42 %, P₂O₅ dễ tiêu = 28 mg /100g, K₂O trao đổi = 52 mg /100g, axit humic = 0,15

Nhận xét:

Hàm lượng các chất dinh dưỡng trong cơ chất được chế biến từ rác thải hữu cơ đều giàu, có thể dùng làm cơ chất sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng.

3. Quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng:

Quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng



**Bảng 3: Chất lượng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng
trong thời gian bảo quản sử dụng**

Chỉ tiêu	Độ ẩm (%)	pH _{KCL}	Tỷ lệ nhiễm tạp (%)	Mật độ VSV hữu hiệu (CFU/g phân)			
				RA18	B1	4g	B16
Ngày kiểm tra							
Sau thành phẩm	39,8	6,8	1	$1,8.10^9$	$0,6.10^9$	$2,5.10^8$	$0,5.10^8$
7 ngày	39,1	6,9	1	$6,5.10^9$	$3,5.10^9$	$1,6.10^8$	$1,2.10^8$
15 ngày	38,7	7,0	1	$2,8.10^9$	$1,2.10^9$	$0,3.10^8$	$0,9.10^8$
30 ngày	36,5	7,2	1	$1,1.10^9$	$6,4.10^8$	$2,1.10^7$	$3,6.10^7$
60 ngày	32,2	7,4	2	$5,3.10^8$	$1,9.10^8$	$1,6.10^7$	$1,8.10^7$
90 ngày	28,5	7,5	2	$4,2.10^8$	$9,3.10^7$	$7,3.10^6$	$1,3.10^7$
120 ngày	25,5	7,6	3	$1,6.10^7$	$1,2.10^7$	$2,6.10^6$	$2,6.10^6$
150 ngày	23,0	7,6	3	$1,2.10^7$	$4,6.10^6$	$2,3.10^6$	$1,9.10^6$
180 ngày	22,0	7,6	3	$0,2.10^7$	$1,2.10^6$	$1,3.10^5$	$1,6.10^6$
210 ngày	18,0	7,6	5	$1,2.10^6$	$0,2.10^5$	$2,3.10^4$	$0,6.10^5$

Số liệu ở bảng 3 cho thấy:

- Về độ ẩm: Sau thành phẩm đạt 39,8%, độ ẩm giảm dần theo thời gian bảo quản sử dụng và sau 6 tháng chỉ còn 22% vẫn đạt TCVN. Sau 7 tháng chỉ còn 18 %

- Về pH_{KCL}: Sau thành phẩm đạt 6,8; sau 1 tháng bảo quản tăng đến 7,2; sau 3 tháng đạt 7,5; sau 4 tháng bảo quản sử dụng trở ra pH ổn định, đạt 7,6

- Về mật độ vi sinh vật hữu hiệu : Sau thành phẩm mật độ vi khuẩn cố định Nitơ đạt $1,8 \times 10^9$ CFU/1g phân; mật độ vi khuẩn phân giải Lân đạt 0,6

$\times 10^9$ CFU/1g phân; mật độ vi khuẩn quang hợp đạt $2,5 \times 10^8$ CFU/g phân; mật độ vi khuẩn kháng sâu bệnh, đạt $0,5 \cdot 10^8$ CFU/g phân, vượt xa TCVN. Mật độ VSV đạt cực đại sau thành phẩm 7 ngày, sau đó giảm dần theo thời gian bảo quản sử dụng, và sau 4 tháng bảo quản mật độ vi sinh vật giảm mạnh: Mật độ vi khuẩn phân giải lân đạt $1,2 \times 10^7$ CFU/1g phân; mật độ vi khuẩn cố định Nitơ $1,6 \times 10^7$ CFU/1g phân, mật độ vi khuẩn quang hợp đạt $2,6 \times 10^6$ CFU/g phân, nhưng vẫn đạt TCVN. Và sau 6 tháng số lượng vi khuẩn phân giải lân chỉ còn $1,2 \times 10^6$ CFU/1g phân; vi khuẩn cố định Nitơ chỉ còn $0,2 \times 10^7$ CFU/1g phân; vi khuẩn quang hợp giảm mạnh, chỉ còn $1,3 \times 10^5$ CFU/g phân, vi khuẩn kháng sâu bệnh chỉ còn $1,6 \cdot 10^6$ CFU/g phân, vẫn đạt TCVN. Sau 7 tháng mật độ VSV giảm mạnh không đạt TCVN.

- Về tỷ lệ tạp nhiễm: sau thành phẩm đến 2 tháng bảo quản sử dụng luôn $<1\%$, đạt TCVN; Tỷ lệ tạp nhiễm tăng dần theo thời gian bảo quản sử dụng và sau 6 tháng bảo quản tỷ lệ tạp nhiễm $<3\%$, vẫn đạt TCVN. Sau 7 tháng không đạt TCVN

Tóm lại phân hữu cơ vi sinh đa chức năng được sản xuất từ cở chất rác thải hữu cơ sinh hoạt bón cho cây lạc có thể sử dụng trong 6 tháng.

4. Đánh giá hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng bón cho cây lạc

4.1. Kết quả thí nghiệm trong chậu vại

Bảng 4 ảnh hưởng của phân hữu cơ VSV đa chức năng đến sinh trưởng của cây lạc (Trị số trung bình của 4 lần nhắc lại)

Chỉ tiêu Công thức TN	Chiều cao (cm/cây)	Trọng lượng tươi (g/cây)	Số lượng nốt sản tổng số (nốt/cây)	Số củ lạc (củ/ cây)
1. Đối chứng trắng	16,73	9,54	0,12	2,33
2. Cơ chất hữu cơ tiết trùng	18,56	12,76	0,32	3,76
3. Phân hỗn hợp CĐN+PGL	21,80	15,55	4,54	5,22
4. Phân HCVSV đa chức năng	23,98	19,78	6,89	6,88
LSD 5%	1,04	3,12	2,10	1,28

+ Về chiều cao cây:

Ở Công thức được bón phân hữu cơ vi sinh cho chiều cao cao hơn ở công thức đối chứng và bón cơ chất hữu cơ không được nhiễm VSV. Ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho chiều cao cây lạc cao nhất, đạt 23,98 cm/ cây, cho cao hơn ở công thức bón phân hỗn hợp (VKCĐN + VKPGL) là 2,18 cm/ cây, tăng 10,0 %, cho cao hơn ở công thức 2 là 5,42 cm/ cây, tăng 29,2 %.

+ Trọng lượng cây tươi:

Trọng lượng cây tươi cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đạt 19,78 g/ cây, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp là 4,23 g/cây, tăng 27,2 %, cho cao hơn ở công thức bón cơ chất hữu cơ không có VSV là 7,02 g/ cây, tăng 55,01 %, cho cao hơn ở công thức đối chứng là 10,24 g/cây, gấp 1,1 lần. Sự sai khác trên đều vượt xa sai số có ý nghĩa LSD 5%.

+ Số lượng nốt sần tổng số / cây:

Ở công thức bón phân vi sinh đa chức năng cho số lượng nốt sần cao nhất, đạt 6,98 nốt/ cây, cho cao hơn công thức nhiễm VSV hỗn hợp là 2,35 nốt/cây, tăng 51,76 %. Ở công thức bón cơ chất hữu cơ và công thức đối chứng trắng hầu như không có nốt sần.

+ Về số củ lạc trên cây

Ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đều cho số củ cao hơn ở công thức đối chứng, cho cao hơn từ 1,41 - 2,89 củ/ cây (bón VKCĐN+VKPGL) đến 3,12 - 4,55 củ/ cây (bón HCVSVĐCN), tăng 0,37 - 1,95 lần. Sự sai khác này đều vượt xa sai số cho phép LSD 5 %.

4.2 Kết quả thí nghiệm đồng ruộng:

* Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh trên đất phù sa sông Hồng Gia Lâm Hà Nội

Bảng 5: Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đến các chỉ tiêu sinh trưởng của lạc xuân năm 2003 trên đất phù sa sông Hồng

Chỉ tiêu Công thức	Tỷ lệ nảy mầm sau gieo 15 ngày (%)	Chiều cao cây ở thời kỳ cây ra hoa (cm/cây)	Trọng lượng khô cây ở thời kỳ cây ra hoa (g/cây)	Số lượng nốt sần hữu hiệu ở thời kỳ cây ra hoa (nốt/cây)	Tỷ lệ sâu bệnh (%)
1.(Nền)30N+90P+45K	76,3	39,42	10,50	87,98	23,86
2. Nền + Cơ chất hữu cơ	85,0	41,31	12,11	96,34	22,74
3. Nền + VSV hỗn hợp	90,9	47,40	15,62	134,56	13,65
4. nền + HCVSV ĐCN	94,6	51,52	17,86	148,53	11,88
LSD 5%	-	3,55	1,46	9,58	6,45

Số liệu ở bảng 6 cho thấy:

+ Về tỷ lệ nảy mầm của cây lạc xuân:

Ở công thức bón phân khác nhau cho tỷ lệ nảy mầm khác nhau, cho thấp nhất ở công thức nền, chỉ bón phân NPK, đạt 76,3 %. Tỷ lệ nảy mầm cho cao nhất ở công thức được bón phân hữu cơ vi sinh, đạt 90,0 - 94,6 %, cho cao hơn ở công thức nền là 14,6 - 18,3 %. ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn ở công thức bón phân VSV hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 3,5 %.

+ Về chiều cao cây: Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 51,52 cm / cây, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 4,12 cm/ cây, tăng 8,69 %, cho cao hơn ở công thức nền bón phân NPK là 12,1 cm/ cây, tăng 30,69 %.

+ Về trọng lượng cây: Cho cao nhất vẫn ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 17,86 g / cây, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 2,24 g/ cây, tăng 14,34 %, cho cao hơn ở công thức nền bón phân NPK là 7,36 g/ cây, tăng 70 %.

+ Về số lượng nốt sần hữu hiệu: ở các công thức bón phân vi sinh vật cho số lượng nốt sần hữu hiệu cao hơn hẳn ở công thức bón phân NPK. Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng, đạt 148,53 nốt / cây, tăng 10,38 % so với ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL, tăng 68,82 % so với ở công thức bón phân NPK.

+ Về tỷ lệ sâu bệnh: ở công thức bón phân NPK cho tỷ lệ nhiễm sâu bệnh cao nhất, đạt 23,86 %, ở công thức bón phân hỗn hợp VSV là 13,65 %, giảm 10,21 %. ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng chỉ có 11,88 %, giảm hơn so với ở công thức bón phân hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 1,77 %, giảm hơn so với ở công thức bón phân NPK là 11,98 %.

Bảng 6: ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đến các chỉ số tạo năng suất và năng suất lạc củ vụ xuân năm 2003 trên đất phù sa trong đê sông Hồng.

Chỉ tiêu Công thức	Số củ/ cây	Tỷ lệ củ chắc (%)	Trọng lượng củ g/100 củ	Năng suất chất xanh (Tấn/ ha)	Năng suất củ khô (Tấn/ ha)
1.(Nền)30N+90P+45K	17,54	80,40	62,89	19,27	1,66
2. Nền + Cơ chất hữu cơ	19,68	83,21	63,12	22,32	1,79
3. Nền + VSV hỗn hợp	21,86	87,65	64,38	26,48	2,16
4. nền + HCVS ĐCN	23,59	89,86	64,96	28,54	2,32
LSD 5%	0,68	1,25	0,42	2,06	0,068

Số liệu ở bảng 6 cho thấy:

+ Về số củ/ cây:

Số củ/ cây cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng, đạt 23,59 củ / cây, tăng 1,73 củ/ cây, tăng 7,91 % so với ở công thức bón phân vi sinh hỗn hợp VKĐCN + VKPGL, cho cao hơn ở công thức nền thâm canh của dân là 6,05 củ / cây, tăng 34,49 %. Sự sai khác này đều vượt xa sai số cho phép LSD 5%.

+ Về tỷ lệ củ chắc:

ở các công thức được bón phân hữu cơ vi sinh cho tỷ lệ củ chắc cao hơn hẳn ở công thức chỉ bón phân NPK, cho tăng từ 7,25 % đến 9,46 %.

+ Về trọng lượng củ: ở các công thức được bón phân hữu cơ vi sinh cho trọng lượng củ lạc tăng 1,49 - 2,07 g/ 100 củ.

+ Về năng suất chất xanh:

Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 28,54 tấn / ha, cho cao hơn ở công thức nền (bón NPK) là 9,27 tấn/ ha, tăng 48,1 %, cho cao hơn ở công thức bón phân vi sinh vật hỗn hợp VKCDN + VKPGL là 2,06 tấn / ha, tăng 7,8 %.

+ Về năng suất củ khô:

ở các công thức bón phân hữu cơ vi sinh cho năng suất củ khô cao hơn ở công thức bón phân NPK là 0,50 - 0,66 tấn/ ha, tăng 30,12 - 39,75 % và cho cao nhất ở công thức được bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 2,32 tấn/ ha, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCDN + VKPGL là 0,16 tấn / ha, tăng 7,4 %. Sự sai khác giữa các công thức đều vượt qua sai số cho phép LSD 5 %.

* Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng trên đất bạc màu thuận thành Bắc Ninh

Bảng 7: Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đến các chỉ tiêu sinh trưởng của lạc xuân năm 2002 trên đất bạc màu Bắc Ninh

Chỉ tiêu Công thức	Tỷ lệ nảy mầm sau gieo 15 ngày (%)	Chiều cao cây ở thời kỳ cây ra hoa (cm/cây)	Trọng lượng khô cây ở thời kỳ cây ra hoa (g/cây)	Số lượng nốt sản hữu hiệu ở thời kỳ cây ra hoa (nốt/cây)	Tỷ lệ sâu bệnh (%)
1.(Nền)40N+120P+ 75K	71,5	35,12	13,12	19,67	34,68
2. Nền + Cơ chất hữu cơ	77,2	38,43	14,89	25,86	33,50
3. Nền + VSV hỗn hợp	84,3	44,20	16,22	36,54	28,41
4. nền + HCVS ĐCN	89,8	46,56	18,42	44,31	14,96
LSD 5%	-	2,17	1,21	5,25	3,67

Số liệu ở bảng 7 cho thấy:

+ Về tỷ lệ nảy mầm của cây lạc xuân:

Ở công thức bón phân khác nhau cho tỷ lệ nảy mầm khác nhau, cho thấp nhất ở công thức nền, chỉ bón phân NPK, đạt 71,5 %. Tỷ lệ nảy mầm cho cao nhất ở công thức được bón phân hữu cơ vi sinh, đạt 84,3 - 89,8 %, cho cao hơn ở công thức nền là 12,8 - 18,3 %. Ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn ở công thức bón phân VSV hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 5,3 %.

+ Về chiều cao cây: Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 46,56 cm / cây, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 2,36 cm/ cây, tăng 5,34 %, cho cao hơn ở công thức nền bón phân NPK là 11,44 cm/ cây, tăng 32,57 %.

+ Về trọng lượng cây: Cho cao nhất vẫn ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 18,42 g / cây, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 2,2 g/ cây, tăng 13,56 %, cho cao hơn ở công thức nền bón phân NPK là 5,3 g/ cây, tăng 40,39 %.

+ Về số lượng nốt sần hữu hiệu: ở các công thức bón phân vi sinh vật cho số lượng nốt sần hữu hiệu cao hơn hẳn ở công thức bón phân NPK. Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng, đạt 44,31 nốt / cây, tăng 21,26 % so với ở công thức bón hỗn hợp VKCĐN + VKPGL, tăng gấp 1,25 lần so với ở công thức bón phân NPK.

+ Về tỷ lệ sâu bệnh: ở công thức bón phân NPK cho tỷ lệ nhiễm sâu bệnh cao nhất, đạt 34,68 %, ở công thức bón phân hỗn hợp VSV là 28,41%, giảm 6,27 %. Ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng chỉ có 14,96 %, giảm hơn so với ở công thức bón phân hỗn hợp VKCĐN + VKPGL là 13,45 %, giảm hơn so với ở công thức bón phân NPK là 19,72 %, giảm 56,86 %.

Bảng 8: ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đến các chỉ số tạo năng suất và năng suất lạc củ vụ xuân năm 2002 trên đất bạc màu Thuận Thành Bắc Ninh.

Chỉ tiêu Công thức	Số củ/ cây	Tỷ lệ củ chắc (%)	Trọng lượng củ g/100 củ	Năng suất chất xanh (Tấn/ ha)	Năng suất củ khô (Tấn/ ha)
1.(Nền)30N+90P+45K	18,54	82,14	66,21	17,34	1,56
2. Nền + Cơ chất hữu cơ	19,67	84,92	66,87	18,25	1,65
3. Nền + VSV hỗn hợp	22,11	88,30	67,58	20,67	2,16
4. nền + HCVS ĐCN	24,65	91,22	67,96	22,32	2,48
LSD 5%	0,87	1,45	0,38	1,08	0,053

Số liệu ở bảng 8 cho thấy:

+ Về số củ/ cây:

Số củ/ cây cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng, đạt 24,65 củ / cây, tăng 2,54 củ/ cây, tăng 11,49 % so với ở công thức bón phân vi sinh hỗn hợp VKĐN + VKPGL, cho cao hơn ở công thức nền thâm canh của dân là 6,11 củ / cây, tăng 32,95 %. Sự sai khác này đều vượt xa sai số cho phép LSD 5%.

+ Về tỷ lệ củ chắc:

Ở các công thức được bón phân hữu cơ vi sinh cho tỷ lệ củ chắc cao hơn hẳn ở công thức chỉ bón phân NPK, cho tăng từ 6,16 % đến 9,08 %.

+ Về trọng lượng củ: ở các công thức được bón phân hữu cơ vi sinh cho trọng lượng củ lạc tăng 1,37 - 1,75 g/ 100 củ.

+ Về năng suất chất xanh:

Cho cao nhất ở công thức bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 22,32 tấn / ha, cho cao hơn ở công thức nền (bón NPK) là 4,98 tấn/ ha, tăng 28,72 %, cho cao hơn ở công thức bón phân vi sinh vật hỗn hợp VKCDN + VKPGL là 1,65 tấn / ha, tăng 7,98 %.

+ Về năng suất củ khô:

Ở các công thức bón phân hữu cơ vi sinh cho năng suất củ khô cao hơn ở công thức bón phân NPK là 0,60 - 0,92 tấn/ ha, tăng 38,46 - 59,97 % và cho cao nhất ở công thức được bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, đạt 2,48 tấn/ ha, cho cao hơn ở công thức bón hỗn hợp VKCDN + VKPGL là 0,32 tấn / ha, tăng 14,81%. Sự sai khác giữa các công thức đều vượt qua sai số cho phép LSD 5 %.

5. Hiệu quả kinh tế của phân hữu cơ vi sinh vật

Số liệu ở bảng 9 cho thấy:

Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh trên 2 loại đất khác nhau, cho khác nhau và cho luôn luôn cao hơn ở công thức không bón phân hữu cơ vi sinh vật.

Ở đất phù sa sông Hồng, cho hiệu cao cao nhất khi bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng, cho tăng năng suất 0,66 tấn lạc củ/ ha, cho cao hơn ở công thức bón phân hữu cơ CDN +PGL là 0,16 tấn/ha. Lãi suất đạt 3,3 triệu đồng/ ha, cho gấp 5,5 đồng/ 1 đồng chi phí.

Ở đất bạc màu hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho tăng năng suất củ khô cao hơn ở công thức đối chiếu là 0,92 tấn/ ha, cho cao hơn ở công thức bón phân vi sinh CDN + PGL là 0,32 tấn /ha. Lãi suất đạt 4,87 triệu đồng/ ha, cho gấp 7,49 đồng/ 1 đồng chi phí.

Kết quả cho thấy hiệu quả của của phân hữu cơ vi sinh trên đất bạc màu cho cao hơn trên đất, phù sa sông Hồng. Lãi suất cho cao hơn 1,57 triệu đồng/ ha, cho lãi suất đồng vốn đầu tư cao hơn 1,99 đồng/ 1 đồng chi phí.

(tính theo đơn giá tháng 6 năm 2003)

Công thức	Năng suất củ khô (tấn/ha)	phần tăng năng suất do phân hữu cơ vi sinh	Quy thành tiền (đồng)	Tổng chi phí do phần năng suất tăng (đồng)	Lãi suất trên 1 ha (đồng)	Lãi suất đồng/ đồng đầu tư (đồng)
Đất phù sa sông Hồng						
Nền	1,66	-	-			
Phân VSV hỗn hợp	2,16	0,50	3.000.000	500.000	2.500.000	5,00
Phân hữu cơ VSV đa chức năng	2,32	0,66	3.900.000	600.000	3.300.000	5,50
Đất bạc mẫu						
Nền	1,56	-	-			
Phân VSV hỗn hợp	2,16	0,6	3.600.000	550.000	3.050.000	5,54
Phân hữu cơ VSV đa chức năng	2,48	0,92	5.520.000	650.000	4.870.000	7,49
So sánh phần tăng (Đất BM/ PS)	0,16	0,26	1.620.000	50.000	1.570.000	1,99

IV KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận:

+ Về đặc tính sinh học

Cả 5 chủng VSV có thời gian mọc từ 42 giờ đến 83 giờ, kích thước khuẩn lạc 3,3 - 4,0 mm, pH = 5 - 8, trong đó có chủng B1 còn mọc được ở pH 4,0 và 9,0. Khả năng chịu kháng kháng sinh 300 - 500 mg/ lít môi trường, trong đó có chủng B1 còn mọc được ở 800 mg/ lít môi trường. Cả 5 chủng này đều có thể chọn làm giống để sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật đa chức năng.

+ Về chất mang

Đã cải tiến chất mang, tái chế từ rác thải hữu cơ sinh hoạt để làm cơ chất sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng. Chất lượng đạt TCVN, đó là: pH = 7,2, độ xốp = 72 %, OM % = 24,6, N % = 0,65, P₂O₅ % = 0,35 , K₂O % = 0,42, P₂O₅ dễ tiêu = 28,0 mg/ 100 g cơ chất, K₂O trao đổi = 52,0 mg/ 100 g cơ chất, a xít humíc = 0,15%.

+ Đã xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng theo phương pháp hỗn hợp chủng, đạt chất lượng phân theo TCVN, thời gian sử dụng 6 tháng. Sau 6 tháng mật độ VSV hữu hiệu, đạt: VKCDN = $0,2 \cdot 10^7$ CFU/ g; VKPGL = $1,2 \cdot 10^6$ CFU/ g; VKQH = $1,3 \cdot 10^5$ CFU/ g; VKDS = $1,6 \cdot 10^6$ CFU/ g.; tỷ lệ tạp khuẩn < 3 %; độ ẩm = 22,0 %, pH = 7,6

+ Đã đánh giá hiệu lực của phân hữu cơ vi sinh đa chức năng trên cây Lạc ở quy mô chậu vại và trên đồng ruộng. Kết quả cho thấy:

Phân hữu cơ vi sinh đa chức năng có tác dụng làm tăng tỷ lệ nảy mầm, tăng chiều cao cây, tăng trọng lượng cây, tăng số lượng nốt sần hữu hiệu, giảm tỷ lệ sâu bệnh 12,0 - 19,52 %, tăng số củ/ cây 5,05 - 6,11, tăng tỷ lệ củ

giảm tỷ lệ sâu bệnh 12,0 - 19,52 %, tăng số củ/ cây 5,05 - 6,11, tăng tỷ lệ củ chắc, tăng năng suất chất xanh 4,98 - 9,27 tấn/ ha, tăng 48,1 %, tăng năng suất củ khô 0,66 - 0,92 tấn / ha, tăng 25,00 - 39,75 %. Lãi suất do bón phân hữu cơ vi sinh đa chức năng là 3,30 - 4,87 triệu đồng / ha. Lãi suất đồng vốn đầu tư đạt 5,5 - 7,49 đồng/ 1 đồng đầu tư.

2. Đề nghị

- Cho tiếp tục triển khai pha 2 về sản xuất thử nghiệm, đưa ra thử nghiệm trên đồng rộng với quy mô rộng hơn.

- Nghiệm thu kết quả của đề tài cấp Nhà nước KC 04-04 và áp dụng tiến bộ khoa học kỹ thuật này vào sản xuất.

- Tổng Kinh phí 3 năm (2001-2003) = 105 Triệu đã quyết toán xong với bên A

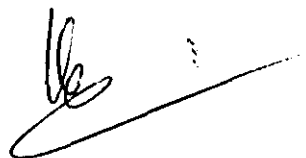
Hà Nội, ngày 25 tháng 10 năm 2004

Phòng khoa học trường ĐHNHI

Chủ nhiệm Nhóm đề tài KC-04-04



PGS.TS. Vũ Đình Hòa



PGS. TS Nguyễn Xuân Thành

Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông nghiệp I



TRƯỞNG
PG. TS. Đặng Thị Minh

**BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH**

BÁO CÁO KHOA HỌC

ĐỀ TÀI NHÁNH:

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT
ĐA CHỦNG, CHỨC NĂNG CHO KHOAI TÂY TỪ CÁC CHỦNG
AZOTOBACTER VÀ BACILLUS**

Thuộc đề tài công nghệ sinh học cấp nhà nước KC 04 - 04

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Thùy Châu
Cộng tác viên : Thạc Sĩ. Đỗ Ngọc Huyền
Trần Văn Tuấn
Lâm Tú Minh
Trần Duy Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Phân bón vi sinh vật, gọi tắt là phân vi sinh là sản phẩm sinh học được nhắc nhiều đến trong sản xuất nông nghiệp. Trên thế giới, phân vi sinh đã được các nhà khoa học nghiên cứu, ứng dụng một cách rộng rãi bởi nhiều tác dụng hữu ích của nó (vi sinh vật cố định Nitơ tự nhiên, vi sinh vật phân giải các hợp chất bền vững khó tan như quặng apatit, photphorit, các polysacarid như cellulose, vi sinh vật kích thích sinh trưởng v.v.). Các nhà khoa học đã dựa vào khả năng tồn tại bền bỉ của vi sinh vật đối với những điều kiện không thuận lợi ngoài môi trường tự nhiên để sản xuất phân vi sinh. Khi đó vi sinh vật sẽ hình thành một lớp vỏ dày vững chắc bao bọc lấy tế bào đồng thời lượng nước tự do trong vỏ tế bào sẽ giảm xuống thấp nhất cho phép vi sinh vật có thể tồn tại từ 1 cho đến hàng chục năm, thậm chí hàng trăm năm dưới các điều kiện khắc nghiệt của môi trường như chất dinh dưỡng cạn kiệt, nhiệt độ, pH quá cao hoặc quá thấp v.v. Gặp điều kiện thuận lợi vi sinh vật sẽ tự phá vỡ vỏ bọc và tiếp tục quá trình sống của mình. Thông qua các hoạt động sống của vi sinh vật trong chế phẩm phân vi sinh mà khả năng nâng cao năng suất và chất lượng nông sản ngày càng được cải thiện; cây trồng tăng khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng, thúc đẩy quá trình trao đổi chất. Với số lượng từ 10^6 đến 10^8 CFU/gam chế phẩm, phân vi sinh đã giữ một vai trò quan trọng trong việc cân bằng hệ sinh thái, tăng độ mùn xốp cho đất, chống sói mòn. Người ta đã xác định được rằng sử dụng phân bón vi sinh đối với rau màu thì chi phí cho thuốc bảo vệ thực vật giảm đáng kể, năng suất tăng và thời gian bảo quản nông sản lâu hơn. Mặt khác, vốn đầu tư cho một nhà máy sản xuất phân vi cơ lớn hơn rất nhiều lần so với đầu tư xây dựng một nhà máy phân vi sinh, đó còn chưa kể đến môi trường sống bị ô nhiễm, sức khỏe của công nhân làm việc trong các nhà máy phân vi cơ đó bị ảnh hưởng do thường xuyên tiếp xúc với các hóa chất độc hại. Chính vì thế, các nước có nền khoa học công nghệ phát triển như Mỹ, Nhật, Tây Âu, Canada đều sử dụng phân vi sinh trong nông nghiệp. Có thể nói rằng, cùng với các công nghệ khác, phân vi sinh vật đã góp phần quan trọng trong phát triển nông nghiệp các nước này.

Ở nước ta, nhu cầu về phân bón là rất lớn. Hằng năm, chúng ta phải nhập hàng nghìn tấn với chi phí nhiều triệu USD. Do đó, việc nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng phân bón vi sinh trong nông nghiệp là một vấn đề bức thiết đòi hỏi sự quan tâm của nhiều nhà khoa học, phần đầu đưa nước ta trở thành một nước có nền nông nghiệp phát triển và bền vững.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

II.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.

II.1.1. Đối tượng nghiên cứu.

Các chủng vi khuẩn cố định N₂ *Azotobacter vinelandii* AT19, vi khuẩn đối kháng *Bacillus subtilis* BS16, vi khuẩn phân giải hợp chất photpho khó tan *Bacillus polymyxa* B14 và vi khuẩn kích thích sinh trưởng *Azotobacter Beijerincki* AT03 do môn Vi sinh, Viện Khoa học kỹ thuật Việt nam cung cấp

Giống khoai tây KT3 được cung cấp từ Trung tâm nghiên cứu cây có củ, Viện KHKTNN Việt Nam.

II.1.2 Môi trường nghiên cứu.

- Môi trường CD cho nhân nuôi *Azotobacter vinelandii* (g/l): sucrose 10, glucose 10, MgSO₄.7H₂O 0,2, KH₂PO₄ 0.15, CaSO₄.2H₂O 0.1, K₂HPO₄ 0.05, CaCl₂ 0.02, Na₂MoO₄ 2mg, FeCl₃ 1mg, pH 7,2.
- Môi trường CD1 cho nhân nuôi *Azotobacter vinelandii* (g/l): Sucrose 20, KH₂PO₄ 0.15, MgSO₄ 0.2, K₂HPO₄ 0.05, CaCl₂ 0.02, Na₂MoO₄ 2mg, FeCl₃ 1mg, pH 7,2.
- Môi trường CD2 cho nhân nuôi *Azotobacter vinelandii* (g/l) : Glucoza 20, K₂HPO₄ 0.2, MgSO₄ 0.2, K₂SO₄ 0.1, CaCO₃ 5, pH 7± 2.
- Môi trường PG1 cho nhân nuôi *Bacillus polymyxa* B14 (g/l): pepton 1, dịch chiết nấm men 10ml, glucoza 5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, Ca₃(PO₄)₂.
- Môi trường DK cho chủng *Bacillus subtilis* BS 16 (g/l). pepton 10g, glucose 10, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ 0.5, H₂O 1lit. pH 7
- Môi trường nhân nuôi trên hệ thống lên men 150l/mẻ đối với chủng B 14 và BS 16 (g/l): pepton 1, cao nấm men 10ml, (NH₄)₂SO₄ 0.5, Ca(PO₄)₂ 5, MgSO₄ 0.1, cám ngô 20
- Môi trường KT1 cho nhân nuôi *Azotobacter Beijerincki* AT03 (g/l): glucoza 20, K₂HPO₄ 0.8, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.2, FeCl₃ 0.05, Na₂MoO₄ 0.05, pH 7,4

II.1.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

- Phương pháp đánh giá khả năng phân giải photphat khó tan của vi sinh vật.

Tiến hành nhân nuôi vi sinh vật trong môi trường có chứa 5% Ca₃(PO₄)₂ sau 3 ngày, 6 ngày, 10 ngày nhân nuôi lấy mẫu xác định hàm lượng phospho hoà tan bằng phương pháp xanh molipden (tiêu chuẩn ngành) trên máy so màu ở bước sóng 620nm. Lượng P₂O₅ tan được tính theo % so với tổng lượng P₂O₅ có trong Ca₃(PO₄)₂.

- Phương pháp xác định khả năng ức chế của *Bacillus subtilis* BS16 đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Pseudomonas solanaceum*.

Tiến hành theo phương pháp của Kimura, N và Ohno. Trên môi trường PDA, cấy khoảng 200 tế bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* BS16 và 200 vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Pseudomonas solanaceum*, trên đĩa petri, lắc đều. Nuôi trong tủ ẩm ở 30°C từ 1 - 5 ngày và theo dõi sự phát triển của chúng. Mẫu đối chứng cấy 200 vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Pseudomonas solanaceum*.

- Phương pháp nhân nuôi các chủng vi sinh vật ở các điều kiện tối ưu trên hệ thống nhân nuôi chìm sục khí 150l /mẻ của Bộ môn Vi sinh, Viện Công nghệ Sau thu hoạch.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của vi sinh vật tới sự sinh trưởng và phát triển của cây khoai tây.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của vi sinh vật tới sự sinh trưởng và phát triển của cây khoai tây.

Giống khoai được ủ mọc mầm sau đó được đem trồng trên đất. Sau 2 tuần tiến hành trộn các chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Azotobacter vinelandii* AT19, *Basillus subtilis* BS16 riêng lẻ hoặc hoặc hỗn hợp. Sau đó so sánh với cây đối chứng để đánh giá các chỉ tiêu như chiều cao cây, khối lượng củ thu được, khối lượng rễ.

Nghiên cứu chọn lựa chất mang cho các chủng vi sinh vật *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Azotobacter vinelandii*, *Basillus subtilis* BS16

- Chất mang:

Chất mang được dùng là hỗn hợp than bùn, bột phosphorit, có đủ dinh dưỡng cho vi sinh vật phát triển và tồn tại, không gây độc đối với vi sinh vật và cây trồng cung như môi trường sinh thái. Chất mang được xử lý đảm bảo các chỉ tiêu kỹ thuật như: độ ẩm, pH, pO_2 , chất mang được bao gói trong túi PE và thanh trùng bằng chiếu xạ ở 25 KGy.

- Phối trộn chất mang với các chủng vi sinh vật.

Phối trộn các chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Azotobacter vinelandii* AT19, *Basillus subtilis* BS16 đã được nhân nuôi vào chất mang với tỷ lệ 10% khối lượng. Ủ trong tủ ẩm 30°C trong 7 ngày sau đó được bảo quản ở điều kiện thường. Tiến hành kiểm tra định kỳ mật độ tế bào sau 7 ngày, 15 ngày, 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.

III.1. Khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật riêng lẻ và hỗn hợp trên nền chất mang thanh trùng.

Nghiên cứu khả năng tồn tại của các chủng vi sinh vật là một trong những công đoạn quan trọng để sản xuất phân vi sinh. Điều này có ý nghĩa quyết định đến chất lượng và hiệu quả của chế phẩm. Đề tài đã tiến hành nhân nuôi sinh khối các chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, vi khuẩn phân giải hợp chất photpho khó tan *Bacillus polymyxa* B14 và vi khuẩn kích thích sinh trưởng *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Basillus subtilis* BS16 ở quy mô nhỏ trên máy lắc phòng thí nghiệm, xử lý bằng các phương pháp hoá lý, tiến hành nhiễm riêng lẻ và hỗn hợp các chủng vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng. Khả năng tồn tại của các vi sinh vật được kiểm tra định kỳ 15 ngày/lần trên các môi trường thích hợp. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1: Khả năng tồn tại của của vi sinh vật nhiễm riêng rẽ trên nền chất mang than bùn.

Các chủng được nhiễm	Mật độ vi sinh vật khi nhiễm (CFU/g)	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) trong chế phẩm nhiễm sau các ngày						
		15	30	45	60	90	120	150
<i>Azotobacter Bejerinski</i> AT03 nhiễm đơn lẻ	2.0×10^9	2.0×10^1 1	1.9×10^9	1.5×10^9	1.2×10^9	1.0×10^9	6×10^8	8.5×10^7
<i>Azotobacter vinelandii</i> AT19 nhiễm đơn lẻ	2.0×10^9	6.5×10^1 1	6.2×10^8	6.0×10^8	5.8×10^8	4.3×10^8	2.2×10^8	8.2×10^7
<i>Basillus subtilis</i> BS16 nhiễm đơn lẻ	2.0×10^9	5.8×10^1 1	5.2×10^9	5.0×10^9	4.6×10^9	3.7×10^9	3.4×10^9	$1,6 \times 10^9$
<i>Bacillus polymyxa</i> B14 nhiễm đơn lẻ	2.0×10^9	2.5×10^1 1	2.2×10^9	1.8×10^9	1.8×10^9	1.2×10^9	1.2×10^9	1.2×10^9

Kết quả kiểm tra chế phẩm phân vi sinh sau thời gian bảo quản cho thấy: các chủng vi sinh vật trên đều có khả năng tồn tại trên nền chất mang thanh trùng, mật độ tăng sau 15 ngày đầu và giảm ở thời gian sau. Sau 150 ngày mật độ vi sinh vật vẫn đạt 10^9 đối với các chủng *Bacillus* và 10^7 đối với các chủng *Azotobacter*.

Bảng 2: Khả năng tồn tại của của vi sinh vật nhiễm hỗn hợp trên nền chất mang than bùn.

Các chủng nhiễm	Mật độ vi sinh vật khi nhiễm (CFU/g)	Mật độ vi sinh vật (CFU/g) trong chế phẩm nhiễm sau các ngày							
		15	30	45	60	75	90	120	150
<i>Azotobacter Bejerinski</i> AT03	2.10^9	6.5×10^8	5.4×10^8	3.8×10^8	2.1×10^8	7.5×10^7	5.1×10^7	4.2×10^7	2.2×10^7
<i>Azotobacter vinelandii</i> AT19	2.10^9	4.3×10^8	2.8×10^8	1.6×10^8	8.5×10^7	6.2×10^7	5.0×10^7	3.5×10^7	1.2×10^7
<i>Bacillus subtilis</i> BS16	2.10^9	5.8×10^8	5.2×10^8	5.0×10^8	4.6×10^8	4.1×10^8	3.7×10^8	3.4×10^8	3.0×10^8
<i>Bacillus polymyxa</i> B14	2.10^9	8.5×10^8	7.0×10^8	5.2×10^8	3.4×10^8	2.0×10^8	1.2×10^8	8.7×10^7	6.2×10^7

Kết quả bảng 2 cho thấy trong chế phẩm đa chủng, mật độ vi sinh vật giảm so với chế phẩm đơn chủng, từ $2,0.10^9$ giảm xuống 2.2×10^7 CFU/g đối với chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03, 1.2×10^7 CFU/g đối với chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, đối với chủng *Bacillus subtilis* BS16 là 3.0×10^8 CFU/g, đối với chủng *Bacillus polymyxa* B14 là 6.2×10^7 CFU/g.

Từ kết quả ở bảng 1 và 2 cho thấy khi nhiễm hỗn hợp hay đơn lẻ thì mật độ CFU của chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03, và *Azotobacter vinelandii* AT19 là không có sự thay đổi nhiều vẫn đạt được mật độ tế bào là trên 10^7 CFU/g.

Hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của chủng *Bacillus polymyxa* B14

Chủng *Bacillus polymyxa* B14 sau khi tạo chế phẩm ở dạng riêng rẽ và hỗn hợp trên nền chất mang thanh trùng được kiểm tra hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sau 5 ngày. Kết quả được trình bày theo bảng sau.

Bảng 3. Hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của chủng *Bacillus polymyxa* B14

Thời gian theo dõi thí nghiệm (ngày)	Đường kính vòng phân giải (cm)		
	<i>Bacillus polymyxa</i> B14 khi chưa tạo chế phẩm	<i>Bacillus polymyxa</i> B14 đã ở dạng chế phẩm riêng rẽ	<i>Bacillus polymyxa</i> B14 đã ở dạng chế phẩm hỗn hợp
1	0.20	0.20	0.20
2	0.24	0.24	0.24
3	0.63	0.62	0.63
4	0.90	0.90	0.89
5	0.90	0.90	0.90

Kết quả cho thấy sau 5 ngày *Bacillus polymyxa* B14 ở dạng chế phẩm hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ với khi chưa tạo chế phẩm hay ở dạng chế phẩm hỗn hợp. Số liệu hầu như không có sự thay đổi, đặc biệt là đường kính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của *Bacillus polymyxa* B14 ở cả hai dạng nhiễm riêng lẻ và hỗn hợp trên chất mang thanh trùng. Điều này thể hiện hoạt tính ổn định của chủng *Bacillus polymyxa* B14 trên chất mang cũng như phối trộn chủng với các vi sinh vật khác.

Ảnh hưởng của thời gian và các điều kiện nuôi cấy đến sinh khối và hoạt tính của vi khuẩn phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *Bacillus polymyxa* B14, cố định N_2 *Azotobacter vinelandii* và *Azotobacter Bejerinski*, *Bacillus subtilis* BS16 trên hệ thống lên men 150l /mẻ.

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến lượng sinh khối tạo thành của vi khuẩn *Bacillus polymyxa* B14 và *Bacillus subtilis* BS16 trên hệ thống lên men 150 l/mẻ trên môi trường bột ngô và muối khoáng.

Thời gian nhân nuôi (giờ)	Lượng sinh khối vi khuẩn(CFU/ml)	
	Vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> BS16	vi khuẩn <i>Bacillus polymyxa</i> B14
14	4.0×10^7	2.1×10^7
20	4.3×10^7	4.3×10^7
24	5.3×10^7	5.3×10^7
28	6.2×10^7	6.2×10^7
32	1.8×10^8	1.8×10^8
36	3.3×10^8	3.3×10^8
40	4.2×10^8	4.2×10^8
44	5.4×10^8	6.4×10^8
48	6.3×10^8	6.8×10^8
52	1.4×10^9	7.2×10^8
54	2.2×10^9	7.6×10^8
58	3.2×10^9	8.5×10^8
62	4.3×10^9	1.0×10^9
66	4.3×10^9	1.0×10^9
72	3.5×10^9	1.0×10^9

Kết quả bảng 4 cho thấy sinh khối của chủng *Bacillus polymyxa* B 14 nhân nuôi trên tăng lên men 150l tăng dần từ 2.1×10^7 đến 1.0×10^9 CFU/ml trong thời gian nhân nuôi từ 20 giờ đến 62 giờ. Từ 66 giờ đến 72 giờ lượng sinh khối ổn định ở mức cực đại. Còn đối với chủng *Bacillus subtilis* BS16 lượng sinh khối cũng tăng dần từ sau 20 giờ 4.0×10^7 CFU/ml và đạt cực đại ở 62 giờ là 4.3×10^9 CFU/ml. Sau đó lượng sinh khối bắt đầu giảm dần từ 4.3×10^9 CFU/ml xuống 3.5×10^9 CFU/ml ở giờ thứ 72. Vậy chúng tôi đưa ra kết luận là thời gian nhân nuôi thích hợp cho hai chủng *Bacillus polymyxa* B 14 và *Bacillus subtilis* BS16 là 62 giờ trên hệ thống lên men 150l/mẻ.

Bảng 5: Ảnh hưởng của thời gian nhân nuôi đến lượng sinh khối tạo thành của các chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter Bejerinski* AT03 trên hệ thống lên men chìm sục khí 150l/mẻ ($t^{\circ}=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7\pm 2$).

Thời gian nhân nuôi (giờ)	Lượng sinh khối vi khuẩn CFU/ml	
	Chủng <i>Azotobacter vinelandii</i>	Chủng <i>Azotobacter Bejerinski</i>
20	5.4×10^6	3.2×10^6
24	6.5×10^6	4.5×10^6
28	7.2×10^6	1.8×10^7
32	7.5×10^6	3.7×10^7
36	2.1×10^7	4.2×10^7
40	3.5×10^7	5.3×10^7
44	5.2×10^7	6.7×10^7
48	5.8×10^7	8.5×10^7
52	6.2×10^7	9.0×10^7
54	6.8×10^7	2.5×10^8
58	2.5×10^8	5.6×10^8
62	4.6×10^8	6.8×10^8
66	5.6×10^8	7.5×10^8
72	5.8×10^8	5.8×10^8
74	5.3×10^8	4.9×10^8

Số liệu bảng 6 cho thấy từ 20 giờ đến 72 giờ nhân nuôi trên hệ thống lên men chìm sục khí 150 l/mẻ các chủng vi khuẩn cho sinh khối cực đại: Đối với chủng *Azotobacter vinelandii* AT19 tăng từ 5.4×10^6 đến 5.8×10^8 CFU/ml ở 72 giờ trên môi trường CD1. Còn đối với vi khuẩn *Azotobacter Bejerinski* AT03 đạt cực đại sau 66 giờ là 7.5×10^8 CFU/ml trên môi trường KT1. Từ giờ thứ 74 đối với chủng *Azotobacter vinelandii* AT19 lượng sinh khối bắt đầu giảm, còn đối với chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03 thời gian bắt đầu giảm sau 66 giờ.

Từ các số liệu trên chúng tôi đưa ra kết luận là : Thời gian thích hợp cho nhân nuôi chủng vi khuẩn *Azotobacter vinelandii* AT19 là 72 giờ và chủng *Azotobacter Bejerinski* AT03 là 66 giờ trên hệ thống lên men chìm sục khí 150l/mẻ.

Tác động của phân bón vi sinh được khảo nghiệm trên cây khoai tây tại Viện Công nghệ sau thu hoạch. Kết quả được trình bày trong bảng 7:

Bảng 6: Ảnh hưởng của phân bón vi sinh đa chủng *Azotobacter Vinelandi* AT19, *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* BS16 và đơn chủng đến năng suất cây khoai tây. (thí nghiệm trên chậu, số thí nghiệm lặp lại 3).

Công thức thí nghiệm	Chỉ tiêu theo dõi		
	Chiều cao cây (cm)	Tổng trọng lượng rễ (g)	Tổng trọng lượng củ (g)
Đối chứng (không bổ sung phân bón vi sinh đơn chủng và đa chủng)	82.35	13.25	16.50
<i>Azotobacter Vinelandi</i> AT19	1002.04	24.20	56.21
<i>Azotobacter Bejerinski</i> AT03	98.55	15.52	30.30
<i>Bacillus polymyxa</i> B14	95.42	19.65	32.25
<i>Bacillus subtilis</i> BS16	85,40	16,5	32,00
Hỗn hợp AT19+AT03+B14+BS16	88.36	19.23	30.45
Hỗn hợp AT19+AT03	87.45	22.41	31.50

Kết quả cho thấy các chủng vi sinh vật khi nhiễm đơn lẻ hoặc nhiễm hỗn hợp đều có tác dụng rõ rệt so với cây đối chứng cả về chiều cao cây và trọng lượng củ và rễ sau thu hoạch. Đặc biệt chủng vi khuẩn cố định N₂ AT19 cho thấy sự ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Các chỉ tiêu như trọng lượng củ cũng chứng tỏ hiệu quả của vi khuẩn cố định N₂ trên cây khoai tây. Chủng vi khuẩn phân giải lân cũng cho thấy sự tăng trưởng đáng kể của cây trồng so với đối chứng. Qua quan sát đánh giá, lô cây được bón chế phẩm đơn phân giải lân cây phát triển cứng cáp, khỏe.

Chiều cao cây khoai tây ở tất cả các công thức nhiễm vi sinh vật đều lớn hơn so với cây đối chứng. Chiều cao cây đạt cao nhất khi nhiễm đơn lẻ một chủng đó là chủng AT19 đạt 100,24cm, tăng hơn đối chứng 20 cm. Tiếp đó là đến chủng AT 03 đạt 98,55 cm tăng hơn so với đối chứng là 16 cm. Sau đó là đến chủng B14 đạt 95,42 cm, BS 16 đạt 85,4 cm.

Nhiễm thực nghiệm vi khuẩn *Pseudomonas solanaceum* trên cây khoai tây.

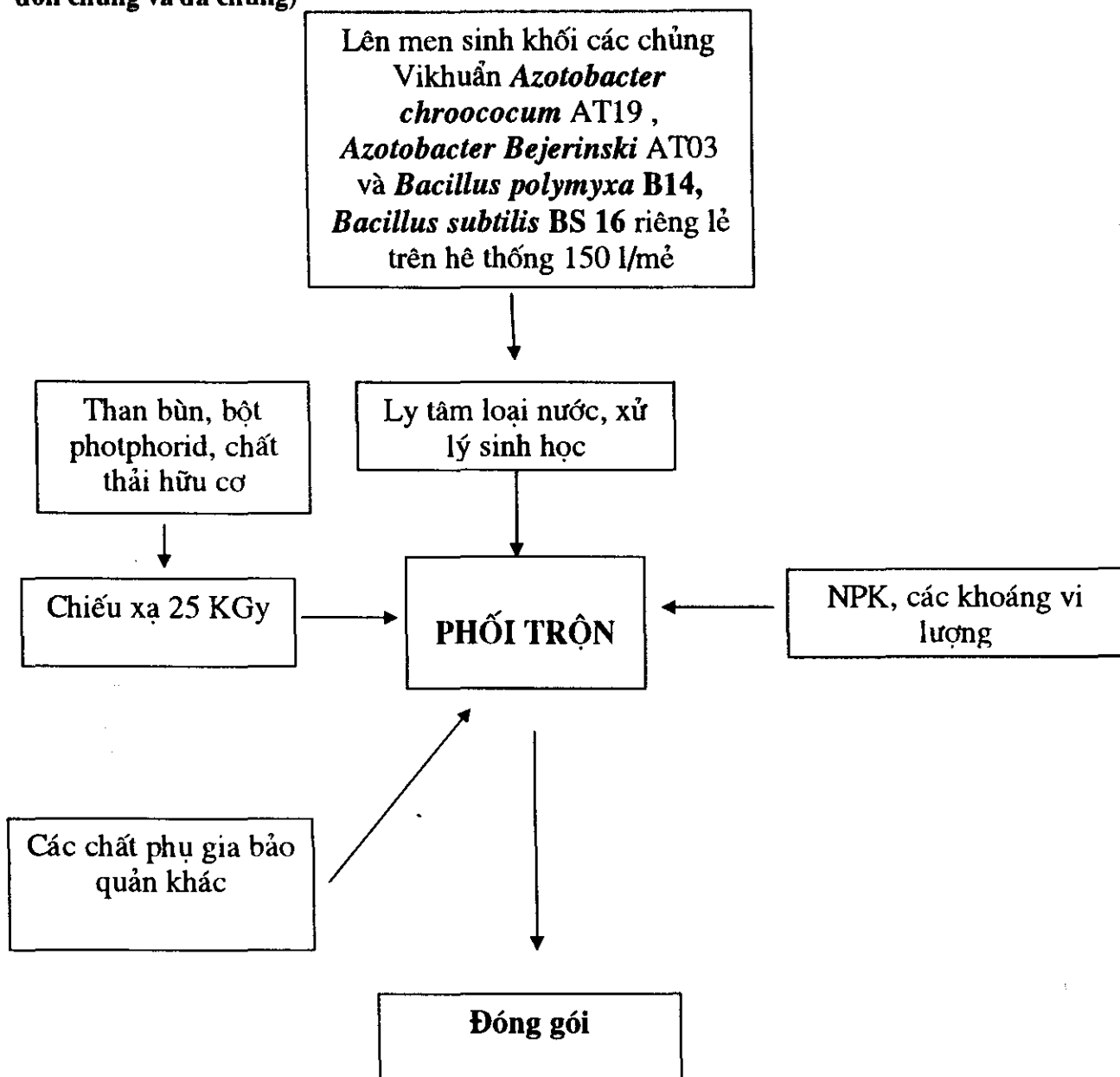
Kết quả cho thấy sau 45 ngày nhiễm chủng *Pseudomonas solanaceum* trên cây khoai tây vẫn không thấy biểu hiện gây bệnh trên cây khoai tây.

Bảng 7: Kết quả nhiễm thực nghiệm chủng *Pseudomonas solanaceum* trên cây khoai tây

Nhiễm chủng <i>Pseudomonas solanaceum</i>	Đối chứng (không nhiễm <i>Pseudomonas solanaceum</i>)
Không có biểu hiện của bệnh	Không có biểu hiện của bệnh

Từ kết quả trên chúng tôi đề nghị cần làm thêm thí nghiệm để có kết luận chính xác về vấn đề này.

Sơ đồ 1: Quy trình sản xuất phân bón đa chủng trên nền than bùn.(áp dụng cho chế phẩm đơn chủng và đa chủng)



Sinh khối của vi sinh vật sau khi lên men sinh khối được ly tâm loại nước, xử lý sinh học sau đó được phối trộn tiếp với chất mang là than bùn, bổ sung thêm các đa vi lượng và một số chất phụ gia bảo quản khác.



Ảnh 1: Hiệu quả của phân bón đa chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16, nhiễm hỗn hợp và đơn lẻ trên cây khoai tây sau 1 tháng.

Ghi chú: Từ trái sang phải:

Ảnh 1. Nhiễm hỗn hợp *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16.

Ảnh 2. *Azotobacter vinelandii* AT19.

Ảnh 3. *Azotobacter bejerinsli* AT03.

Ảnh 4. *Bacillus subtilis* B1S16.

Ảnh 5. *Bacillus polymyxa* B14.

Ảnh 6. Đối chứng.



Ảnh 1: Hiệu quả của phân bón đa chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16, nhiễm hỗn hợp và đơn lẻ trên cây khoai tây sau 2 tháng.

Ghi chú: Từ trái sang phải:

Ảnh 1. *Bacillus polymyxa* B14.

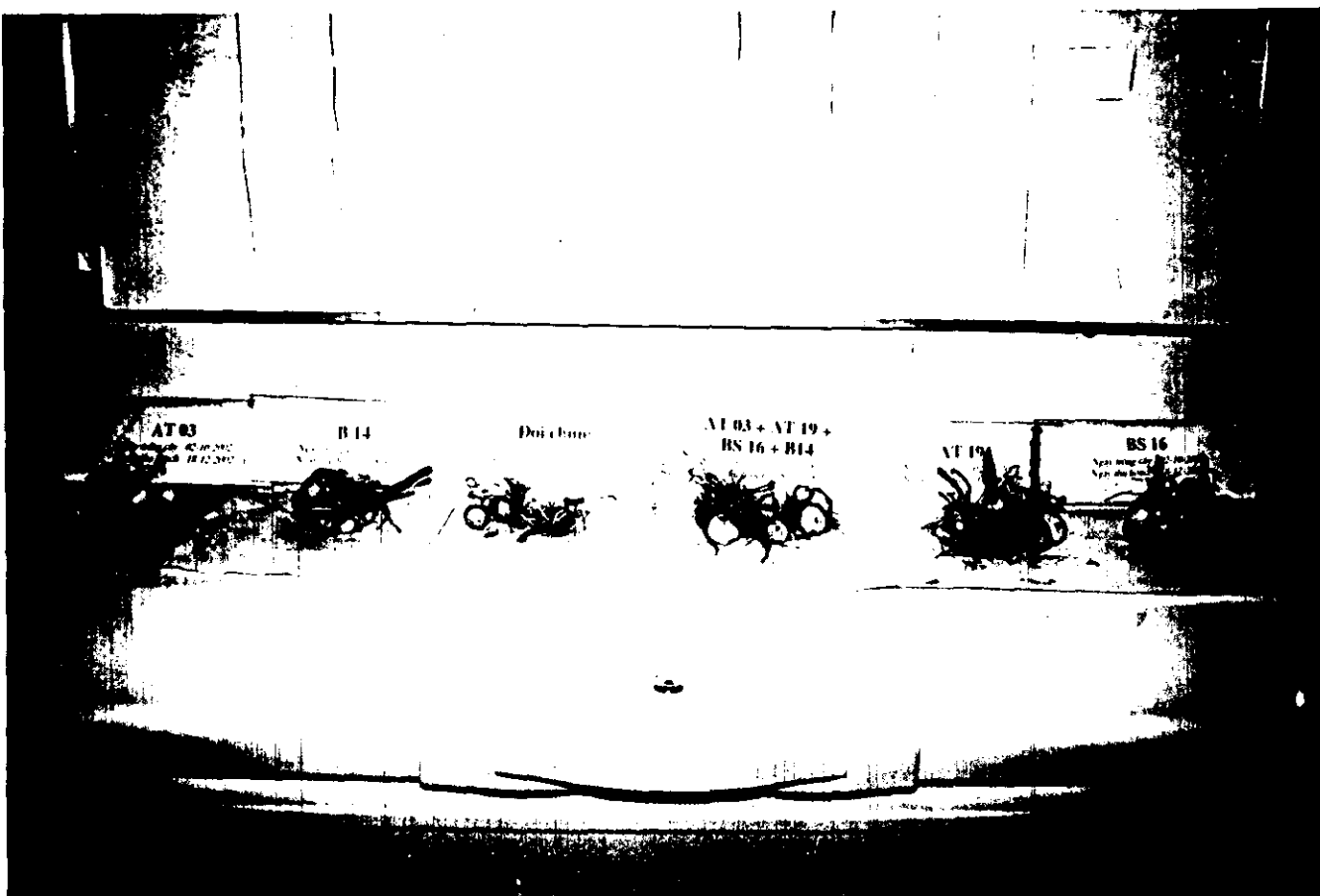
Ảnh 2. Nhiễm hỗn hợp *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16.

Ảnh 3. Đối chứng.

Ảnh 4. *Azotobacter bejerinsli* AT03.

Ảnh 5. *Bacillus subtilis* B1S16.

Ảnh 6. *Azotobacter vinelandii* AT19.



Ảnh 3: Hiệu quả của phân bón đa chủng *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16, nhiễm hỗn hợp và đơn lẻ đến năng suất củ của cây khoai tây.

Ghi chú: Từ trái sang phải:

Ảnh 1. *Azotobacter bejerinsli* AT03.

Ảnh 2. *Bacillus polymyxa* B14.

Ảnh 3. Đối chứng.

Ảnh 4. Nhiễm hỗn hợp *Azotobacter vinelandii* AT19, *Azotobacter bejerinsli* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Bacillus subtilis* B1S16.

Ảnh 5. *Azotobacter vinelandii* AT19.

Ảnh 6. *Bacillus subtilis* B1S16.



Ảnh 4: Sản xuất sinh khối *Azotobacter Bejerinski* AT03, *Bacillus polymyxa* B14, *Azotobacter vinelandii* AT19, *Bacillus subtilis* BS16 trên hệ thống lên men chìm sục khí 150 l/mẻ tại xưởng thực nghiệm – Viện Công nghệ Sau thu hoạch

IV KẾT LUẬN.

Bằng phương pháp lên men chìm sục khí trên hệ thống lên men 150, và các kỹ thuật sinh học khác đề tài đã nghiên cứu và xây dựng thành công quy trình sản xuất phân vi sinh cố định Nitơ, phân giải lân, kích thích sinh trưởng trên nền chất mang là than khử trùng bằng chiếu xạ ở 25000K Gy.

Chế phẩm đã đảm bảo được mật độ tế bào là trên 10^7 CFU/g sau 150 ngày bảo quản

Đã tiến hành khảo nghiệm bước đầu trên cây khoai tây. Cho thấy sự tăng trưởng rõ rệt về năng suất.

Hà nội ngày tháng năm 2002

Chủ nhiệm đề tài

TS. Nguyễn Thuỳ Châu
Trưởng Bộ môn vi sinh
Viện Công nghệ Sau thu hoạch

BỘ NÔNG NGHIỆP & PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP

BÁO CÁO TỔNG KẾT

2001 - 2003

Đề tài phối hợp trong khuôn khổ đề tài KC.04.04:

**Nghiên cứu hình thành quy trình sản xuất phân bón vi sinh
vật đa chủng, chức năng cho cà chua quy mô
phòng thí nghiệm**

Mã số:

Cơ quan chủ trì đề tài KC.04.04: Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp
Đơn vị chủ trì: Viện Di truyền nông nghiệp
Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Ngọc Cường
Thời gian thực hiện: 3 năm (2001-2003)

Hà Nội - 2004

NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

Họ và tên

Cơ quan

Chủ nhiệm đề tài

TS. Nguyễn Ngọc Cường

Viện Di truyền nông nghiệp

Cán bộ tham gia nghiên cứu

1. Th S. Lê Như Kiều

(Viện DTNN)

2. CN. Đào thị Thu Hằng

(Viện DTNN)

3. KS. Nguyễn Thị Hồng Hải

(Viện DTNN)

4. KS. Phạm Công Minh

(Viện DTNN)

5. KS. Trần Quang Minh

(Viện DTNN)

6. KS. Nguyễn Linh Chi

(Viện DTNN)

7. CN. Cao Hồ Thu Thuỷ

(Viện DTNN)

8. KS. Nguyễn Thị Hồng Minh

(Viện DTNN)

và một số cán bộ trong, ngoài Viện
khác

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Tt	Viết tắt	Viết đầy đủ
1	VKHX	Vi khuẩn héo xanh
2	pgl	Phân giải lân
3	Vsv	Vi sinh vật
4	Vkđk	Vi khuẩn đối kháng
5	Qt	Quy trình
6	Bckh	Báo cáo khoa học
7	Ktst	Kích thích sinh trưởng
8	P ²	Phương pháp
9	Mt	Môi trường
10	TH	Tập hợp
11	TK	Thạch khoáng
12	KTL	Kích thước lá
13	KR	Trọng lượng khô phần rễ
14	DR	Dài rễ
15	CT	Chiều cao thân
16	TLT	Trọng lượng tươi
17	Sig.	Sai khác có ý nghĩa
18	ALC	Áp lực bệnh cao
19	ALT	Áp lực bệnh thấp
20	KTLR	Sinh khối khô của thân lá và rễ
21	KTL	Sinh khối khô của thân lá
22	KR	Sinh khối khô của rễ

MỤC LỤC

	Trang
TÓM TẮT.. . . .	1
1.GIỚI THIỆU CHUNG	4
1.1. Mục tiêu của đề tài	4
1.2. Nội dung nghiên cứu đề tài	4
1.3. Dự kiến sản phẩm tạo ra	4
2.ĐỊA ĐIỂM, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	6
2.1. Địa điểm	6
2.2. Vật liệu	6
2.3. Phương pháp	6
3.KẾT QUẢ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ	8
3.1.Kết quả chung theo kế hoạch	8
3.1.1.Lựa chọn các chủng vsv gốc sử dụng trong nghiên cứu	
3.1.2.Đặc điểm tương tác và hình thành tập hợp chủng	9
3.1.3.Hình thành các tập hợp đa chức năng làm cơ sở sản xuất phân bón vsv đa chủng, chức năng	10
3.1.4.Đánh giá hoạt tính, hoạt lực của các tập hợp chủng đã thành lập..	14
3.1.5.Đánh giá tập hợp chủng trong điều kiện nhà lưới & đồng ruộng phạm vi hẹp	18
3.1.6.Quy trình nhân nuôi tập hợp vsv sản xuất chế phẩm vsv phòng trừ bệnh HXVK đa tính năng trong thiết bị tự tạo ..	20
3.1.7. Chế biến chế phẩm vsv phòng trừ VKHX & tăng cường sinh trưởng dùng cho cà chua..	22
3.2. Các kết quả khác của đề tài..	24
3.2.1. Các bài báo và công trình nghiên cứu	24
a/ Đã công bố	24
b/ Các bài báo đã hoàn thành sẽ công bố trong năm 2004-2005	25
3.2.2. Đào tạo	26

4.KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ	27
4.1. Kết luận	27
4.2. Tồn tại	27
4.3. Kiến nghị	28
5.KINH PHÍ	29

TÓM TẮT

Phòng Di truyền & Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền nông nghiệp đã nghiên cứu bệnh héo xanh cà chua do *R solanacearum* từ những năm 90 và từ năm 1996 đã tập chung nghiên cứu khả năng sử dụng vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R solanacearum* để phòng trừ bệnh héo xanh trong sản xuất cà chua. Một trong những kết quả nổi bật mà đơn vị thu được là đã phân lập và xác định được vị trí phân loại của một số chủng gốc, tiêu biểu là chủng *P monteilli* 58 (vk 58) có phổ đối kháng *R solanacearum* rộng, hoạt lực đối kháng mạnh tiềm tàng khả năng sử dụng để sản xuất chế phẩm vsv phòng trừ bệnh héo xanh trong thực tiễn sản xuất rau mầu (cà chua, ớt, khoai tây,...).

Để khẳng định khả năng sử dụng trong thực tiễn phòng trừ bệnh héo xanh của chế phẩm VSV dựa trên VSV đối kháng VKHX rất cần có các thông tin về đặc điểm tương tác giữa các vsv đối kháng với các vsv có ích khác trong đất như nhóm cố định N_2 khí quyển (tự do và cộng sinh), nhóm phân giải lân chậm tan và nhóm sản sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật. Liệu vi sinh vật đối kháng VKHX có tác động có hại lên những vsv chức năng sẵn có trong môi trường đất dẫn tới ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng và năng suất cây trồng ?. Tham gia với tư cách là một đề tài nhánh của đề tài cấp nhà nước KC 04.04 chính là một cơ hội để bổ sung thêm những thông tin này.

Trong 05 chủng "chức năng" nguồn gốc KC 04.04 có chủng *A. chroococcum* AT03 và chủng KFL7 tương ứng là những chủng cố định N_2 tự do và pgl chậm tan điển hình (theo kết quả kiểm tra của chúng tôi). Nghiên cứu đặc điểm tương tác giữa các chủng đối kháng VKHX với các chủng chức năng khi cùng phát triển trên một môi trường đã phát hiện 02 kiểu tương tác giữa chúng: ức chế phát triển hay ức chế tăng sinh tế bào và ức chế thể hiện chức năng hay hoạt tính sinh học (cố định N_2 tự do, pgl, sản sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật). Trong khi chủng AT03 và đa số các chủng cố định N_2 tự do khác không chỉ dễ dàng hoà hợp với các chủng đối kháng VKHX thuộc chi *Pseudomonas* hay *Bacillus* mà còn làm tăng hoạt lực đối kháng của những chủng này thì chủng pgl điển hình KFL7(RTL7?)

lại thường bị các chủng đối kháng kim hãm phát triển hoặc ức chế thể hiện chức năng pgl chậm tan. Các tập hợp chủng hình thành từ các vsv đối kháng VKHX và các chủng chức năng nguồn gốc khác nhau (KC 04.04 hoặc từ bộ sưu tập của Phòng Di truyền & Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền nông nghiệp) tuy có thể hiện một phần đặc điểm đa chức năng invitro (cụ thể ở đây là sự đồng thể hiện hoạt tính đối kháng VKHX và hoạt tính cố định N_2 khí quyển) và tuy có làm tăng ít nhiều một hay một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà chua so với đối chứng nhưng mức độ tăng trưởng cũng thường không đạt tới một sự tăng trưởng có ý nghĩa ngay ở mức 5%.

Để vượt qua thực tế này, để có những tập hợp vsv không chỉ thể hiện đặc điểm đa chức năng invitro mà cả trong điều kiện nhà kính/nhà lưới và ngoài đồng ruộng tập thể nghiên cứu đề tài nhánh **"Nghiên cứu hình thành quy trình sản xuất phân bón vsv đa chủng, chức năng cho cà chua quy mô phòng thí nghiệm"** chúng tôi đã đồng thời tiến hành một cách tiếp cận khác : tìm các tổ hợp vsv mong muốn trên cơ sở kết hợp giữa các chủng đối kháng VKHX điển hình với nhóm chủng "R" phân lập từ mẫu đất có xuất xứ từ vùng sản xuất cà chua chuyên canh có lịch sử nhiều năm liền hầu như không bị dịch bệnh héo xanh do *R. solanacearum* phá hoại. Các thực nghiệm khác nhau từ invitro, đến trong nhà lưới và ngoài đồng ruộng phạm vi hẹp do tập thể nghiên cứu tiến hành đã xác nhận hai tập hợp chủng VSV- *P. monteilli 58 + R1+R7* và *P. monteilli 58 + ΣR* (cả 7 chủng R) là những tập hợp VSV đa công dụng: vừa có tác dụng phòng trừ bệnh héo xanh vừa tăng cường sinh trưởng cho cây cà chua và một số cây trồng có ý nghĩa kinh tế khác.

Chế phẩm VSV hình thành trên cơ sở các tập hợp chủng này cũng có các công dụng như chính bản thân tế bào của các tập hợp chủng. Chế phẩm thử nghiệm pha chế trên cơ sở tế bào của tập hợp *P. monteilli 58 + R1+R7* và *P. monteilli 58 + ΣR* và dây chuyền công nghệ không đòi hỏi đầu tư ban đầu cao về thiết bị có tác dụng làm giảm thiệt hại đối với năng suất của nhiều giống cà chua sản xuất khi có áp lực của bệnh héo xanh.

Ngoài kết quả khả quan về khoa học công nghệ để tài cũng góp phần đào tạo sau đại học/đại học và trau dồi khả năng nghiên cứu cho nhiều cán bộ khoa học trẻ.

1. GIỚI THIỆU CHUNG

1.1. Mục tiêu của đề tài

Xây dựng và phát triển công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh héo xanh do vi khuẩn (the bacterial wilt) đa công dụng phục vụ sản xuất cà chua hàng hoá đặc biệt là vụ xuân - hè ở các tỉnh miền Bắc.

1.2. Nội dung nghiên cứu đề tài

- Theo dõi diễn biến bệnh do *R. solanacearum* ở cà chua Xuân - hè tại địa bàn huyện Mê Linh - Vĩnh Phúc và vùng ven thị xã Bắc Ninh.
- Lựa chọn các VSV làm đối tượng nghiên cứu.
- Tương tác giữa các chủng nhóm chủng
- Khả năng nhân nuôi & sản xuất chế phẩm, sản phẩm VSV đối kháng
- Đánh giá tính năng & công năng tập hợp chủng invitro
- Tính năng & công năng của chế phẩm VSV đối kháng đa tính năng đối với cà chua quy mô nhà kính
- Xác định vị trí phân loại chủng VSV đối kháng chủ yếu
- Quy trình nhân nuôi & Quy cách chế biến chế phẩm

1.3. Dự kiến sản phẩm tạo ra

Bảng 1. Dự kiến kết quả của đề tài (theo thuyết minh đề tài và hợp đồng nghiên cứu)

TT	Nội dung công việc	Sản phẩm phải đạt	Ghi chú
1	Phân lập bổ sung VKHX	Các chủng VKHX	
2	Phân lập bổ sung vi khuẩn đối kháng(VKĐK)	Các chủng VKĐK với VKHX	
3	Phân lập bổ sung VSV kháng nấm hại rễ	Các chủng VSV kháng nấm hại rễ	
4	Phân lập VSV có tác dụng tích cực lên cây trồng	Các chủng VSV có tác dụng tích cực lên cây trồng	

(Tiếp Bảng 1)

1	2	3	4
5	Công nghệ sản xuất chế phẩm/sản phẩm VSV đơn/đa chủng phòng trừ bệnh héo xanh và bệnh nấm hại rễ cây trồng	01 qui trình 1 công bố (bài báo) khoa học	
6	Chế phẩm VSV đơn/đa chủng phòng trừ bệnh héo xanh	1 chế phẩm	
7	Đánh giá tác dụng của sản phẩm invitro và trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng phạm vi hẹp	Số liệu liên quan đến kết quả đánh giá	
8	Một số sản phẩm khác: • Bài báo khoa học • Đào tạo:	Công bố/đăng trên tạp chí Đại học và trên đại học	

2. ĐỊA ĐIỂM, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm

Viện Di truyền nông nghiệp

Xã Tiền Phong, huyện Mê Linh, Vĩnh Phúc

Xã Võ Cường, tỉnh Bắc Ninh

Một số cơ sở nghiên cứu và ứng dụng khác

2.2. Vật liệu

Các nhóm chủng VSV phân lập trong quá trình thực hiện đề tài, bao gồm

- Nhóm VSV đối kháng *R. solanacearum* gây héo xanh

- Nhóm VSV đối kháng *P. cinamoni* gây bệnh Dứa, và nhiều nấm gây bệnh cây trồng do TS. Nguyễn Thị Li, Viện Bảo vệ thực vật và khoa Nông học, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội cung cấp.

- Nhóm *R. solanacearum* gây bệnh với các thứ sinh học khác nhau

Chủng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas monteillii* 58, *P. cepacia* 41(2) do phòng DT và CNVS Viện DTNN phân lập và đã phối hợp cùng 2 phòng thí nghiệm tại Nhật và Đức để nhận dạng, phân loại nhờ giải trình toàn bộ gen ARN riboxom 16S.

Các giống cà chua thử nghiệm: VL₂₀₀₀, C₉₅, P₃₇₅, HP7, CCCN-H1(cà chua chịu nhiệt H1), Trang Nông, Hai Mũi Tên, VL 2700.

Các mẫu đất canh tác chuyên canh cà chua, luân canh với cây mầu và luân canh với lúa: Mê Linh (Vĩnh Phúc), Vĩnh Bảo, An Lão (Hải Phòng), Gia Lộc, Tứ Kỳ (Hải Dương), và:

Các hoá chất cần thiết cho việc nghiên cứu của đề tài.

2.3. Phương pháp

a. Phương pháp đánh giá tác động của các nhân tố sinh học, phi sinh học lên nảy mầm sinh trưởng và năng suất cây trồng

b. Đánh giá phổ, hoạt lực và quan hệ với cây trồng của nhóm VSV đối kháng và nhóm VSV tác động tích cực lên sinh trưởng, năng suất cây trồng invitro và quy mô nhà lưới.

c. Nghiên cứu quan hệ tương tác giữa VSV đối kháng với các VSV tác động dương tính lên cây trồng khác

d. Nhận dạng vi khuẩn nhờ phương pháp VSV truyền thống và nhờ giải trình chuỗi nucleotit của gen

Các phương pháp này đã mô tả chi tiết trong các công bố của tập thể tác giả liệt kê ở trang cuối báo cáo này.

3. KẾT QUẢ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

3.1. Kết quả chung theo kế hoạch

Bảng 2. Tổng hợp kết quả thực hiện kế hoạch 3 năm của đề tài

TT	Nội dung công việc	Đơn vị đo	Sản phẩm phải đạt	Kết quả thực hiện	Vượt kế hoạch
1	Bổ sung, làm phong phú Bộ sưu tập chủng VSV gốc phục vụ đề tài	Nhóm chức năng	04 nhóm: 1/ Nhóm đối kháng VKHX 2/ Nhóm đối kháng nấm hại rễ 3/Nhóm tác dụng tích cực lên cây trồng, và 4/ Nhóm VSV gây bệnh héo xanh	4	0
2	Hình thành tập hợp chủng	Số tập hợp	Ít nhất 01 tập hợp vừa đối kháng VKHX đồng thời thể hiện một/một số chức năng mong muốn khác	• 02 tập hợp thoả mãn đòi hỏi thống kê học • Nhiều tập hợp khác cần hoàn thiện để thoả mãn thống kê học	0
3	Sản phẩm VSV phòng trừ héo xanh do vi khuẩn	Nhóm đối kháng trung tâm	02 sản phẩm tương ứng 02 nhóm đối kháng trung tâm: 1/ Nhóm <i>Bacillus</i> , và 2/ Nhóm <i>Pseudomonas</i>	03 nhóm đối kháng trung tâm: 1/ Nhóm R 2/ Nhóm dựa trên <i>P. monteilli</i> VK 58 3/ nhóm <i>Bacillus</i>	01 Nhóm đối kháng trung tâm
4	Xây dựng quy trình công nghệ	Loại (quy mô) QT	1	1 loại: 1/ QT quy mô PTN	0
5	Nhân nuôi sinh khối và đánh giá tác dụng sản phẩm VSV đa chủng, chức năng	Số liệu khoa học (BCKH)	1-2	4	2-3 bài báo

3.1.1. Lựa chọn các chủng vsv gốc sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 3. VSV gốc sử dụng trong nghiên cứu này và hoạt tính hữu ích của chúng

Ký hiệu chủng	Đối kháng VKHX Ca chua (KB/ml : D-d; mm)	ĐK nấm bệnh (PDA/ bào tử: D-d; mm)	Phân giải lân chậm tan (D-d; mm)		CD.Nitơ tự do (Phát triển trên MT Ashby)		Kích thích STTV Trong ống nghiệm
			Lần 1	Lần 4	Lần 1	Lần ≥ 4	
vk58	++ (8 mm)	-	-		(mọc)	(yếu)	
PS 15							
B1							
B7							
R8							
AT03	-	-	-		■	■	
AT19	-	-	-		-	-	
AT34	-		-		+	-	
Ag15	-		-		-	-	
KFL7	-		+ (3 mm)	+ (mọc)	-	-	
B1	-	++ (3 mm)	-		-		
B7	-	++ 3 mm	-		-		
G3	-	++ 2 mm	-		-		
G5	-	++ 2 mm	-		-		
G9	-	++ (2 mm)	-		-		
C4	+ yếu		-		+ (ax)	+ (mọc)	
VT81	-		+		+ (ax)	+ (ax)	
DHR1	-		+		+ (ax)	+ (ax)	
DH*2	-		-		+ (mọc)	+ (yếu)	
R1	-		-		+ mọc	-	
R 2	-		-		+ (ax)	-	
R 3	-		-		+ (mọc)	+ (yếu)	
R 5	-		-		+ (ax)	-	
R 6	-		-		-		
R 7	-		-		-		
R8	++ 3 mm		+ 3 mm	+ (mờ)	■ ax	■	

Chú thích. "Ax": Axít hoá môi trường; "Mọc", "Yếu", "Mờ ": Nhận xét cảm quan bổ sung về mức độ phát triển: phát triển ở mức gianh giới giữa phát triển và không phát triển.

Nhận xét: Có nhiều chủng phân lập từ tự nhiên đã là những chủng đa chức năng rồi như : vk 58 (đk VKHX, cố định N₂ tự do), R8 (đk VKHX, pgl chậm tan và cố định N₂ tự do),...

3.1.2. Đặc điểm tương tác và hình thành tập hợp chủng

3.1.2.1. Cạnh tranh tăng mật độ quần thể tế bào

a/ Giữa vk 58 với PS 15 và nhóm các chủng "R"

Bảng 4. Khả năng cùng phát triển giữa chủng vk 58 với chủng PS15 và nhóm chủng "R" (P²: Cây vạch; MT: KB)

Chủng cấy sau (Mức độ phát triển: ----; -- hoặc -)		Chủng cấy trước: VK 58 ở các mật độ khác nhau (mức độ phát triển thể hiện bằng số lượng các dấu " + " : +++; ++ hoặc +)		
Ký hiệu	Hệ số hoà loãng	Hệ số pha loãng (lần)		
		10	10 ²	10 ³
1	2	3	4	5
PS 15	10	+ -	+ -	-- +
	10 ²	+ + -	+ -	-- +
	10 ³	+ + -	+ -	+ -
R1	10	+++ (R ₁ dứt)	---	---
	10 ²	+++	+ -	-- +
	10 ³	+++	+ -	---
R2	10	+ -	---	-- +
	10 ²	+ + -	-- +	-- +
	10 ³	+ + -	+ -	+ -
R3	10	+ -	+ -	+ -
	10 ²	+ -	+ -	+ -
	10 ³	+ -	+ -	+ -
R5	10	+ -	+ -	+ -
	10 ²	+ -	+ -	+ -
	10 ³	+ -	+ -	+ -

(tiếp Bảng 4)

R6	10	++ -	-- +	--- : Phủ lên
	10 ²	+++ (R6 đứt)	+ -	-- +
	10 ³	+++ (R6 đứt)	-- +	-- +
1	2	3	4	5
R7	10	+ -	+ -	+ -
	10 ²	+ -	+ -	+ -
	10 ³	+ -	+ -	+ -
R8	10	---	---	---
	10 ²	-- +	-- +	-- +
	10 ³	+ -	+ -	-- +

Chú thích.

(+++): mức độ phát triển tốt nhất của vk 58, giảm dần tới các mức: ++ và +.

(---): mức độ phát triển tốt nhất của nhóm R, và PS 15 giảm dần tới các mức --, -

(+ -): khi 2 vệt cấy cân bằng, có các khuẩn lạc xen kẽ cùng phát triển.

(- - +): khi chủng thuộc nhóm "R" phát triển tốt hơn chủng vk58.

(+ + -): khi chủng 58 phát triển tốt hơn chủng thuộc nhóm "R".

Nhận xét:

- Nhìn chung giữa 58 và nhóm "R" không đối kháng tạo vòng, tuy R6, R1 và PS 15 bị vk 58 lấn át ở các mức độ khác nhau

- Cặp 58 và R6: R6 cấy sau, vạch cấy bị đứt khi đi qua vệt cấy vk58. Vậy có thể nếu nuôi lẫn chung 58 và R6 thì 58 sẽ phát triển tốt hơn về số lượng. Còn để khẳng định rằng R6 giúp 58 tăng hoạt tính đối kháng hơn so với khi không có R6 kết quả cho thấy trên môi trường KB tập hợp vk 58 và R6 cho vòng đối kháng lớn hơn đơn chủng vk 58 trên nền VKHX nôi độc.

- Nhóm 58 và R8 thì R8 sẽ phát triển lấn át, nếu nuôi chung ở cùng mật độ 58 sẽ không cạnh tranh được về số lượng tế bào so với R8. Điều này đã được xác nhận khi nuôi lẫn chung hai chủng này)

b/ Giữa các chủng cùng nhóm R với nhau

Bảng 5. Các chủng cùng thuộc nhóm "R" (trừ R6) đều không ức chế phát triển lẫn nhau (MT: KB, P²: nuôi lẫn lộn trên cùng một vị trí của môi trường dinh dưỡng)

		Chủng chịu tác động (thảm vi khuẩn trên môi trường thạch)								
		R1	R2	R3	R5	R7	R8	B1	B5	B7
Chủng tác động (cấy điểm)	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R5	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R8	-	-	-	-	-	-	+	++	+

Chú thích. "-": Chủng tác động không hìm hãm phát triển chủng chịu tác động; "+

": Chủng tác động hìm hãm phát triển chủng chịu tác động

c/ Giữa vk58, R8, B1 với các chủng chức năng khác

Bảng 6. Tương tác đối kháng giữa vsv đối kháng VKHX: R8, VK 58, B1 và một số chủng chức năng

		Chủng tác động		
		R8	Vk58	B1
Chủng chịu tác động	AT19	-	-	-
	Ag15	-	-	-
	AT34	-	-	-
	16C	-	-	-
	17C	-	-	-
	16H	-	-	++ 2 mm
	17H	-	-	-
	KEL7	-	-	+
	G1	-	-	+(yếu)
	G4	-	-	-
	G5	-	-	-
	G7	-	-	-

Nhận xét:

- Chủng R8 và vk 58 không ức chế phát triển các chủng chức năng đã lựa chọn

- Chủng B1 ức chế chủng 16H (cố định N₂ tự do, tác động dương tính lên một chỉ tiêu phát triển cây cà chua non), chủng KFL7 (nhận từ Phòng vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học và là chủng pgf chậm tan tốt) cả chủng G1 (ức chế nấm bệnh).

d/ Giữa các chủng cùng có nguồn gốc từ KC.04.04

Bảng 7. Đặc điểm tác động lên phát triển giữa các chủng cùng nguồn gốc từ KC.04.04 (MT: KB, P²: nuôi lần lượt trên cùng một vị trí của môi trường dinh dưỡng; Minh-H)

Chủng chịu tác động	Chủng tác động				
	AT03	AT19	AT34	Ag15	KFL7
AT03		+	+ yếu	-	++ 5
AT19	-		-	-	-
AT34	-	-		-	-
Ag15	-	-	++ 3 mm		+
KFL7	-	-	-	-	

Chú thích.

- +** : Đối kháng yếu (K.thức vòng đối kháng = K.thước điểm tran)
- ++** : Đối kháng mạnh(K.thức vòng đối kháng > K.thước điểm tran)
- : Không đối kháng (Nền mọc phủ lên hoàn toàn)

3.1.2.2. Kim hãm/tăng cường 01/ nhiều hoạt tính sinh học

PS 15 kim hãm hoạt tính phân giải lân chậm tan của chủng KFL7

Các chủng đk và các chủng cố định N₂ tự do thường bổ trợ cho nhau dẫn tới làm tăng hoạt lực đối kháng (Bảng...; chủng AT03 làm tăng hoạt tính đối kháng của chủng PS15)

3.1.3. Hình thành các tập hợp đa chức năng làm cơ sở sản xuất phân bón vsv đa chủng, chức năng

Bảng 8. Một số tập hợp vsv lí thuyết và tính năng & công năng dự kiến chính của chúng

Ký hiệu tập hợp	Thành phần đơn chung của tập hợp	Tính năng & công năng dự kiến				Chú thích
		Hoạt lực đkVKHX (%)...	Hoạt lực cố định N ₂ ...	Hoạt lực phân giải lân chậm tan ...	Kích thích STTV	
TH ₁ (MinhH):	58 - R8 - B1 - AT03 (16H)	+++	+++	+		
TH ₂ (MinhH):	58 - B1 - RFL7 - AT34 - Ag 15	++	+++	+++		
TH ₃ (MinhB - Hang):	PS15 - AT34 - AG15 - RTL ₇	++	+++	++		
TH ₄ (Minh B):	B ₇ - R5 - AT03 - AT19 - RTL7	++	++	++		
TH ₅ (Hang)	(58 - 16H - 17H - AT03 - AT19)	++	++++	+		

3.1.4. Đánh giá hoạt tính, hoạt lực của các tập hợp chủng đã thành lập

3.1.4.1 Đánh giá tập hợp chủng/ đơn chủng invitro

a/ Một số thí dụ minh họa (Bảng 9)

Bảng 9. Ảnh hưởng lên hoạt lực đk VKHX của các tổ hợp chủng có nguồn gốc từ KC.04.04 (P²: đồng phát triển, MT: KB)

TH ₁ : PS15 + AG15 + AT34 + RLT ₇	Đối kháng VT ₃ (Đ-d; mm)	TH ₂ : B ₇ + AT03 + AT19 + R ₅ + RLT ₇	Đối kháng VT ₃ (Đ-d; mm)
1	2	3	4
PS15	4	B ₇	10
PS15 + AT34	4	B ₇ + AT03	20
PS15 + AG15 + AT34	4	B ₇ + AT03 + R ₅ + RLT ₇	15
1	2	3	4
PS15 + AG15 + RLT ₇	4	B ₇ + AT03 + AT19 + RLT ₇	15
PS15 + RLT ₇ + AT34	3	B ₇ + AT03 + AT19 + R ₅	15
PS15 + AG15 + AT34 + RLT ₇	10	B ₇ + AT19 + R ₅ + RLT ₇	10 (=đối chứng B ₇)
		B ₇ + AT03 + AT19 + R ₅ + RLT ₇	20

Nhận xét: Các tổ hợp thành lập từ 05 chủng nguồn gốc KC.04.04 làm tăng hoạt lực đk của chủng B₇ (trừ tổ hợp "AT19 + R₅ + RLT₇" thể hiện tác động trung tính) nhưng thể hiện tác động trung tính lên hoạt lực chủng PS15.

Bảng 10. Hoạt lực đối kháng VKHX VT₃ của một số tập hợp chủng VSV

(Chủng VKHX VT₃ phân lập từ mẫu thu ở Thanh Hoá; MT:KB)

Đơn chủng/ tập hợp chủng	Hoạt lực đối kháng (Đ-d; mm)		
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 6
B ₇	5	5	0
B ₇ +AT03	15	15	10
B ₇ +AT03+AT19+RLT ₇	10	10	10
B ₇ +AT03+AT19+R ₅	0	0	0
B ₇ +AT03+ RLT ₇ +R ₅	0	0	0

(Tiếp Bảng 10)

1	2	3	4
PS15	14	14	14 (vòng hơi đục)
PS15+AT34	16	16	16 (vòng hơi đục)
PS15+AT34+Ag15	5	5	0
PS15+Ag15+RLT ₇	5	5	5

Chú thích.

- Đối với PGL chọn chủng RLT₇ làm đối chứng cho mức : +++ ($D-d=4mm$);
 ++: $D-d \leq 3mm$;
 +: Vòng ức chế phát triển chỉ trong phạm vi điểm cấy tế bào
- Cố định nitơ tự do chọn 2 chủng
 AT03 (Đối với hỗn hợp H_2^2) cho mức: +++
 AT34 (Đối với hỗn hợp H_1^2) cho mức : +++
- Các chủng đối kháng héo xanh chọn
 Ps₁₅ (Đối với hỗn hợp H_1^2) cho mức : +++
 B₇ (Đối với hỗn hợp H_2^2) cho mức: +++
 Chỉ đối kháng trong phạm vi điểm cấy tế bào : +

Nhận xét:

- Đối với chủng B7

Tập hợp các chủng nguồn gốc từ KC 04.04 không ảnh hưởng tiêu cực lên hoạt lực đối kháng của chủng B7 (không làm giảm hoạt lực). Riêng chủng AT03 làm tăng 3 lần hoạt lực đối kháng VKHX của của chủng B7

Chủng R5 (tách từ mẫu đất thu thập từ vùng chuyên canh có lịch sử không nhiễm bệnh héo xanh) kìm hãm mạnh hoạt lực đối kháng của chủng B7

- Đối với chủng PS15:

AT34 (nguồn gốc KC 04.04, cố định N_2 tự do không điển hình) đã tăng cường chút ít trong khi chủng AG15 (chủng choc năng khác cũng nguồn gốc KC 04.04) đã làm giảm hoạt lực đk VKHX của chủng PS15, ngoài ra:

- Chủng R6 tăng cường hoạt lực đk VKHX của chủng VK 58

3.1.4.2. Tuyển chọn tập hợp vsv và một số ưu việt của chúng (so với đơn chủng)

Bảng 11. Tổng hợp tính năng & công năng của một số tập hợp giữa *P. monteilli* 58 (VK 58) với các chủng thuộc nhóm "R" hoặc có nguồn gốc từ KC.04.04. invitro (so với đơn chủng)

Ký hiệu tập hợp	Thành phần đơn chung của tập hợp	Hoạt lực đkVKHX (%)	Hoạt lực cố định N ₂	Hoạt lực phân giải lân chậm tan	Chú thích
		... so với đơn chủng in vitro			
TH ₁ (MinhH):	vk 58 - R8 - B1 - AT03 (16H)	+ 100	Tương đư- ơng	Tương đư- ơng	
TH ₂ (MinhH):	vk58 - B1- RFL7 - AT34 - AG 15	Tơng đ- ơng	Tương đ- ương	-100 → 0	
TH ₃ (MinhB - Hang):	PS15 - AT34 - AG15 - RTL ₇	+ 100	Tương đ- ương	- 50 → 0	
TH ₄ (Minh B):	B ₇ - R5 - AT03 - AT19 - RTL ₇	+ 150	Tương đ- ương	- 100	
TH ₅ (Hang)	58 -16H - 17H - AT03 - AT19	+ 50	Tương đ- ương	- 100	

a/ Hoạt lực đối kháng

Bảng 12. So sánh hoạt lực đối kháng VKHX invitro của tập hợp và của chủng đơn (nuôi nhiều thế hệ trên thạch khoáng(TK) & KB; VKHX: VT₃)

Ký hiệu tập hợp/ đơn chủng	Hoạt lực đối kháng VT sau các lần cấy chuyển (D-d; mm)			
	Lần 1(KB)	Lần2 (TK +KB)	Lần3 (TK +KB)	Lần4 (TK +KB)
TH ₁	15	15	15	12
PS15	10	8	10	10
TH ₂	20	17	17	15
B ₇	10	10	10	10

Chú thích (Bảng 12). Các mẫu cấy được theo dõi trong 3 ngày sau đó ghi lại kết quả

Nhận xét:

Hoạt lực của tập hợp mạnh hơn tuy mức độ trội có xu hướng giảm dần theo thời gian

B/ Phổ đối kháng của tập hợp so với đơn chủng

Bảng 13. So sánh phổ hoạt lực đối kháng VKHX invitro của tập hợp và của chủng đơn (nuôi 2 ngày trên KB; VKHX: chủng VT₃)

VKHX		Cặp so sánh TH ₁ & PS15 Hoạt lực (D-d; mm)		cặp so sánh TH ₂ & B ₇ Hoạt lực (D-d; mm)	
Ký hiệu	Nguồn gốc	TH ₁	PS15	TH ₂	B ₇
VT ₃	Vĩnh phúc	14	10	20	14
VT ₆	Nghệ an	10	8	13	10
SBR	Sóc sơn	14	10	16	12
SB2	Sóc sơn	6	4	6	6
No.1	Sóc sơn	12	10	12	12

3.1.5. Đánh giá tập hợp chủng trong điều kiện nhà lưới & đồng ruộng phạm vi hẹp

Bảng 14. Tác dụng lên sinh trưởng cà chua của nhóm chủng R (R1, R2,..., R8) và tỷ lệ sống sót khi có áp lực bệnh héo xanh

Tổ hợp VSV	Giống cà chua	Tỷ lệ sống (%) so với đối chứng	Chỉ tiêu phát triển So với đối chứng
Σ R	Trang Nông	+ 60 ^(b) (Sig.)	
	VL 2700	KC (ALT)	KTL(+89; Sig) KR (+64; Sig) CT (+17; Sig)
		+ 28 (Sig.)(ALC)	—
	Hai mũi tên		CT (+12; Sig) DR (+49; Sig)

(Tiếp Bảng 14)

Σ R khuyết R1	Hai mũi tên		KTLR (+54; Sig) DR (+10; Sig)
Σ R khuyết R2	Hai mũi tên		KTLR(+34; Sig) CT(+6; Sig) DR(+16; Sig)
Σ R khuyết R3	Hai mũi tên		TLT(+ 46; Sig) CT (+13; Sig) DR (+25; Sig)
Σ R khuyết R5	Hai mũi tên		TLT(+ 67; Sig) CT(+17; Sig)
Σ R khuyết R6	Hai mũi tên		TLT(+ 14; Sig) KTLR(+19; Sig)
Σ R khuyết R7	Hai mũi tên		KTLR (+38; Sig)
Σ R khuyết R8	Hai mũi tên		—

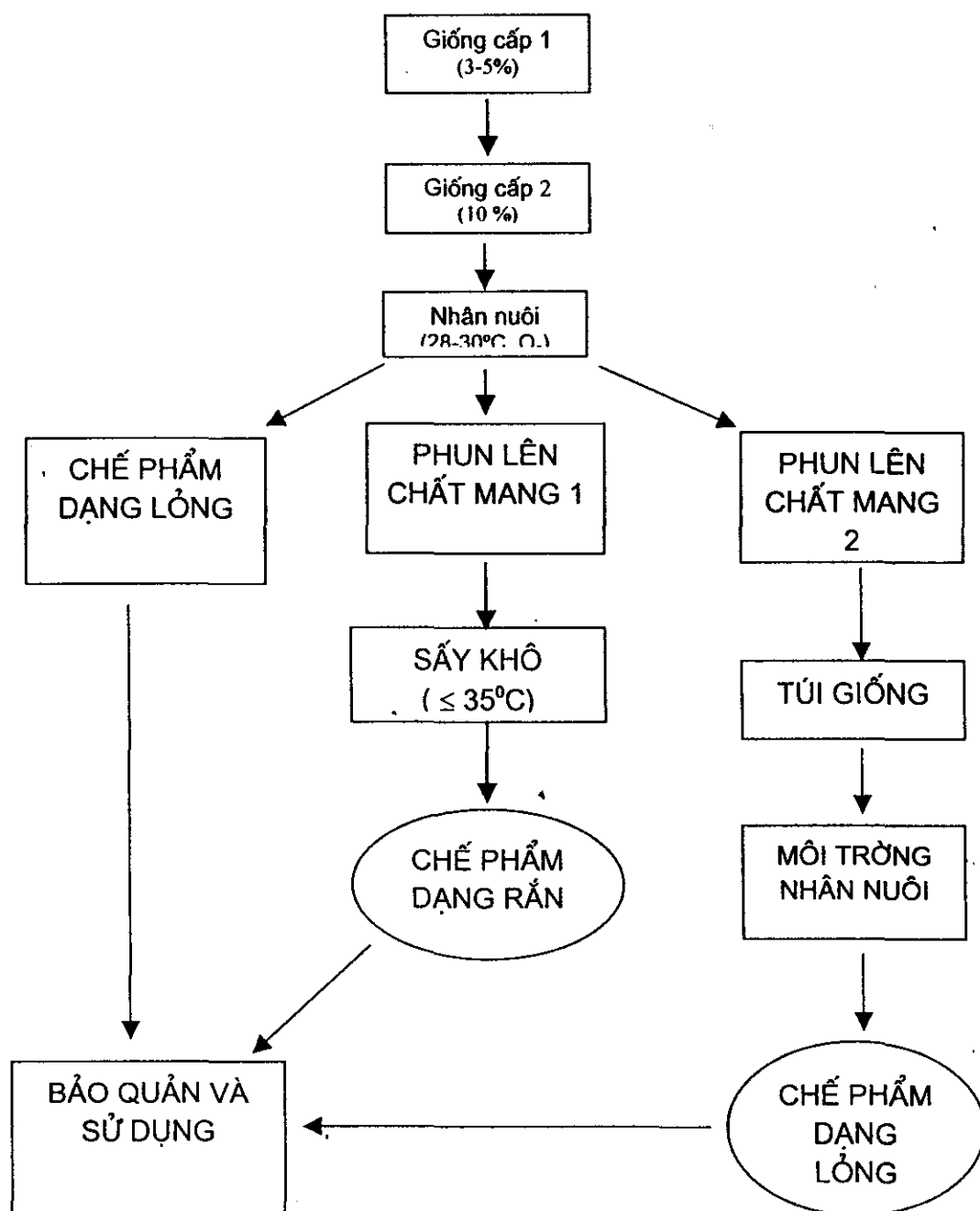
Bảng 15. Tác dụng làm tăng tỷ lệ sống sót khi có áp lực bệnh héo xanh của các tập hợp chủng có *P montelli* 58 trong điều kiện nhà lưới

Ký hiệu chủng/tập hợp chủng VSV	Giống cà chua	Tỷ lệ sống (%)
1	2	3
Bổ sung chế phẩm VSV vào đất trồng cây		
VK 58 và R1, R7	Trang Nông	+ 58 (Sig.)
VK 58 + Σ R	VL 2700	+ 33 (Sig.)
	Cà chua (DA-15)	+ 67,0 (Sig.)
VK 58 và AT03	Hai mũi tên	+ 20
	Trang Nông	+ 18
VK 58, 16H, 17H và AT03	Hai mũi tên	+ 19
	Trang Nông	+ 22
VK58 và R1, R7, R8, B1, AT19, AT03)	"Viện rau"	+ 18
	VL 2700	+ 34

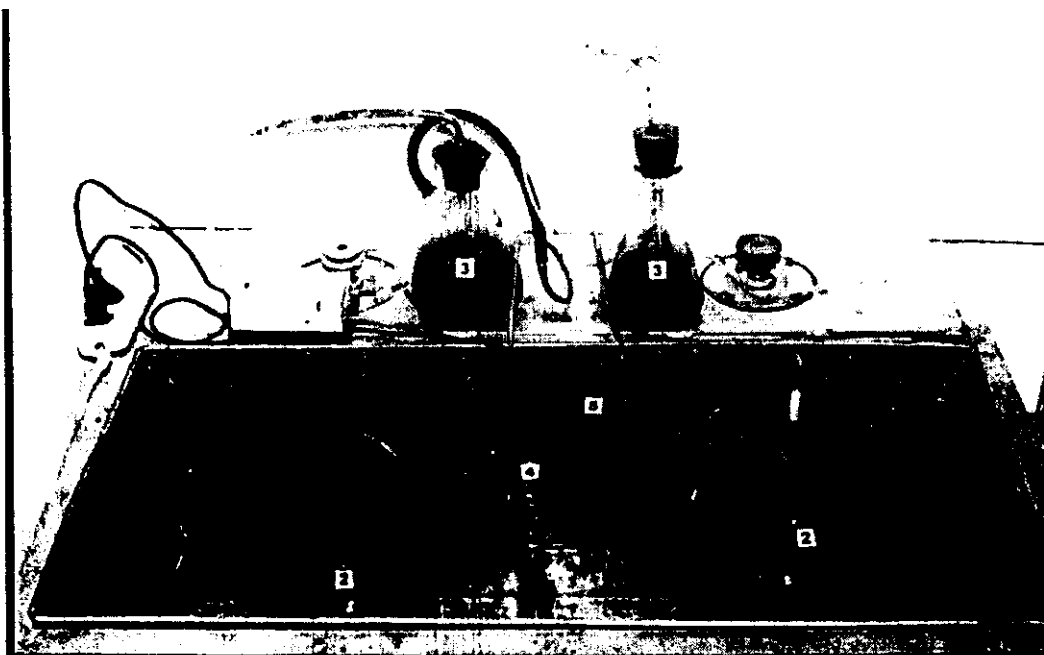
3.1.6. Quy trình nhân nuôi tập hợp vsv sản xuất chế phẩm vsv phòng trừ bệnh HXVK đa tính năng trong thiết bị tự tạo

3.1.6.1. Quy trình nhân nuôi:

Sơ đồ 1. Quy trình sản xuất chế phẩm VSV đối kháng & tác động tích cực lên cây trồng (quy mô phòng thí nghiệm)

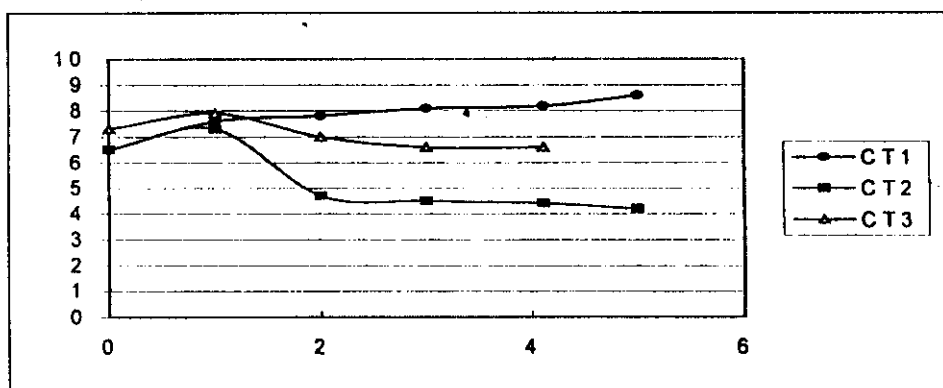


Tính năng công nghệ của quy trình: Mật độ VSV gốc của chế phẩm:
 $\geq 2.10^8$ tế bào/g(ml)



Ảnh 1 . Dụng cụ nhân nuôi tế bào vi khuẩn phục vụ quy trình quy mô phòng thí nghiệm

3.1.6.2. Động thái pH trong quá trình nhân nuôi



Hình 1. Sự biến đổi pH của dịch lên men HHVK phòng trừ *R.solanacearum* theo thời gian

3.1.7. Chế biến chế phẩm vsv phòng trừ VKHX & tăng cường sinh trưởng dùng cho cà chua

3.1.7.1. Công thức thành phần của chế phẩm

Bảng 16. Kích thước vòng đối kháng của tập hợp chủng VK 58 & R1, R7 trên nền chất mang là than bùn khử trùng đối với chủng VK gây bệnh héo xanh

Tt	Thời gian TN (ngày)	Đường kính vòng đối kháng (cm)			
		CT 1 (TH vi khuẩn & than bùn)	CT 2 (TH vi khuẩn & than bùn-điều hoà pH)	CT 3 (TH vi khuẩn & than bùn-điều hoà pH -Nguồn vitamin)	CT 4 (TH vi khuẩn & than bùn-điều hoà pH - Nguồn vitamin- Nguồn N)
	1	0	3,2	2,4	2,2
	4	0	3,2	1,6	2,2
	7	0	3,2	1,5	2
	12	0	0,8	1,5	2
	17	0	0,2	1,0	2
	30	0	0,4	0,8	1,6

Nhận xét: qua kết quả ở Bảng 15 chúng ta thấy:

Ở CT2 : Sau khi cân bằng pH của than bùn thì hoạt lực đối kháng là lớn nhất, tuy nhiên tính ổn định của hoạt lực chỉ kéo dài được 7 ngày và giảm dần hoạt tính ở những thời gian sau

Ở CT4 : Mặc dù hoạt lực đối kháng không lớn bằng CT2 nhưng vẫn duy trì được tính đối kháng sau 30 ngày theo dõi thí nghiệm. Điều này chứng tỏ tập hợp VSV vẫn có thể tồn tại và phát triển tốt, tuy nhiên nhược điểm của chất mang này là cần phải vô trùng tuyệt đối và than bùn không có tính ổn định, các thành phần tạp chất và hệ vi sinh vật rất phức tạp, điều này có thể chi phối đến sự tồn tại lâu dài của tập hợp đa chủng, đa chức năng.

3.1.7.2. Đánh giá tính năng & công năng của chế phẩm VK 58 & R1, R7 và VK 58 & ΣR

Bảng 17. Tác dụng tổng hợp đối với cà chua của các chế phẩm VSV phòng trừ héo xanh đa tính năng dựa trên tổ hợp giữa *P. monteilli* 58 với nhóm chủng "R" trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng

Ký hiệu chủng/tập hợp chủng VSV	Giống cà chua	Tỷ lệ sống (%) so với đối chứng	Chỉ tiêu sinh trưởng với đối chứng
1	2	3	5
Bổ sung chế phẩm VSV vào gốc cây non			
VK 58 và R1, R7	Trang Nông	+ 50 (Sig.)	+ 58 (Sig.)
VK 58 + ΣR	VL 2700	+ 30 (Sig.)	KTL (+ 216; Sig.)/ CT (+ 38; Sig.)
	Cà chua (DA-15)	+ 50,0 (Sig.)	

Chú thích. "KTL": Kích thước lá; "CT": Cao thân

3.2. Các kết quả khác của đề tài

3.2.1. Các công trình được đề tài hỗ trợ kinh phí (toàn bộ hoặc một phần) đã hoặc sẽ công bố trong năm 2004

a. Đã công bố

1. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường, Đào Thị Thu Hằng, Hoàng Hoa Long, Vũ Bích Hậu. Nghiên cứu vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua ở miền Bắc Việt Nam và phương pháp chẩn đoán nhanh. *Kết quả nghiên cứu khoa học- Viện Di truyền nông nghiệp - 2000-2001*, tr. 107-116.

2. Lê Như Kiều, Đào Thị Thu Hằng, Hoàng Hoa Long, Vũ Bích Hậu, Nguyễn Ngọc Cường. Vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua và vi sinh vật đối kháng. *Kết quả nghiên cứu khoa học - Viện Di truyền nông nghiệp 2000 – 2001*, tr. 117-124.

3. Lê Như Kiều, Đào Thị Thu Hằng, Hoàng Hoa Long, Vũ Bích Hậu, Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Ngọc Cường. Nghiên cứu và thử nghiệm chế phẩm vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua. *Hội thảo bệnh cây và sinh học phân tử. Nhà xuất bản nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh*, 06 - 2002, tr. 55-59.

4. Hoàng Hoa Long, Lê Như Kiều, Đào Thị Thu Hằng, Vũ Bích Hậu, Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Ngọc Cường. Giám định vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* bằng kỹ thuật nhân gen PCR (Polymerase chain reaction). *Hội thảo bệnh cây và sinh học phân tử. Nhà xuất bản nông nghiệp TP. Hồ Chí Minh*, 06 - 2002, tr. 41-43.

5. Lê Như Kiều, Đào Thị Thu Hằng, Nguyễn Ngọc Cường. Sử dụng kỹ thuật miễn dịch enzym (ELISA) để xác định mật độ vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* nội mô gây bệnh héo xanh (bacterial wilt) cà chua. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Tập 41, số 4, 2003*, tr. 16-21.

6. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường, Shin san Ichi Ito. Phân tích ADN của một số chủng vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn gây bệnh héo xanh cà chua. *Tạp chí Công Nghệ Sinh học. Tập 1, số 1, 2003*, tr. 79 - 84.

7. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường, Shin san Ichi Ito. Xác định vị trí phân loại vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua. *Thông tin Công nghệ Sinh học ứng dụng*. Số 2+3, 2003, tr. 32-35.

8. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường. Sử dụng các cặp primer khác nhau trong phân nhóm vi khuẩn *R. solanacearum* thành các biovar. *Thông tin Công nghệ Sinh học ứng dụng*. Số 2+3, 2003, tr. 46-50.

9. Lê Như Kiều, Nguyễn Ngọc Cường. Phát hiện biovar 1 và 5 trong quần thể vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua ở Việt nam. *Proceedings Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 12- 2003. tr. 97-100.

10. Đào Thị Thu Hằng, Phạm Công Minh, Lê Như Kiều và Nguyễn Ngọc Cường. Thử nghiệm chế phẩm vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas montevillii* 58 phòng trừ bệnh héo xanh cà chua quy mô nhà lưới. *Proceedings Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, 12- 2003. tr. 234-237.

b. Các bài báo đã hoàn thành sẽ công bố trong năm 2004-2005

1. Đào Thị Thu Hằng,.... và TS .NN Cuong. VSV phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn (the bacterial wilt) và có tác dụng tích cực lên cây cà chua: Tác động của chủng *P. montevillii* 58 ở dạng đơn lẻ và hỗn hợp

2. Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Linh Chi, Trịnh Thị Thu Hà và TS. NNCường. Tuyển chọn tập hợp VSV có tác dụng tích cực lên sinh trưởng và khả năng kháng bệnh héo xanh cây trồng

3. Phạm Công Minh, Trần Quang Minh, Cao Hồ Thu Thuỷ và TS. NN Cường. Quy trình nhân nuôi tập hợp chủng VSV phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn (the bacterial wilt) và có tác dụng tích cực lên cây trồng

4. Phạm Công Minh, Lê Như Kiều, Nguyễn Thị Hồng Minh, Phạm Công Minh.. Nguyễn Linh Chi, Đào Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng Hải Cao Hồ Thu Thuỷ và TS. NN Cường. Thử nghiệm chế phẩm VSV phòng trừ bệnh héo xanh cà chua ngoài đồng ruộng

5. Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Linh Chi và NN Cường. Nấm nội sinh ở một số giống cỏ và tiềm năng ứng dụng thực tiễn

3.2.2. Kết quả đào tạo được để tài hỗ trợ một phần kinh phí

- Tiến sĩ: 01
- Thạc sĩ: 02
- Cử nhân và kỹ sư: 05

4. KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Trong 3 năm (2001- 2003) đề tài đã triển khai đúng theo các nội dung đã đề ra, sản phẩm ở hầu hết các nội dung chính đều đảm bảo hoặc vượt so với kế hoạch.

1. Từ 03 nhóm vi sinh vật chính là nhóm đối kháng VKHX và nhóm các chủng "R" tác động dương tính lên sinh trưởng cây trồng do Phòng Di truyền & Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền nông nghiệp phân lập, sưu tập và 05 chủng do chủ nhiệm đề tài KC 04.04 hoặc chủ nhiệm một trong các đề tài nhánh tham gia đề tài KC 04.04 cung cấp đã nghiên cứu đặc điểm tương tác giữa chúng làm cơ sở hình thành các tập hợp và tổ hợp VSV để sản xuất chế phẩm vsv phòng trừ bệnh héo xanh cà chua do *R. solanacearum* đa công dụng (tính năng). Trong số nhiều tập hợp vsv làm tăng tỷ lệ sống sót cũng như tốc độ sinh trưởng cây cà chua 02 chế phẩm VK 58 -R1- R7 và VK 58 + ΣR đã làm tăng rất đáng kể cả 02 chỉ tiêu - tỷ lệ sống sót khi có áp lực bệnh héo xanh và tăng cường phát triển cây cà chua - ở mức ý nghĩa 5 %.

2. Đã xây dựng thành công quy trình công nghệ quy mô phòng thí nghiệm để sản xuất chế phẩm vsv phòng chống VKHX dạng rắn đa tính năng. Quy trình thuộc loại công nghệ thích ứng và có thể thực hiện khả thi tại các cơ sở ứng dụng chế phẩm có mức độ đầu tư khiêm tốn giành cho trang thiết bị.

3. Chủng vi khuẩn đối kháng chính trong chế phẩm đã được xác định là đại diện của loài *P. montellii* nhờ kết hợp nhiều phương pháp nhận dạng, phân loại vsv khác nhau và đã được đăng ký tại ngân hàng dữ liệu ADN Nhật Bản dưới mã số đăng ký "AB 114205".

4.2. Tồn tại

Còn một lượng khá lớn các tập hợp chủng VSV đa choc năng có thể sử dụng trong Nông nghiệp & Bảo vệ thực vật vẫn chưa được đánh giá tác dụng và hiệu quả

4.3. Kiến nghị

Đề nghị Hội đồng công nhận quy trình là một tiến bộ kỹ thuật trong sản xuất chế phẩm vsv phòng trừ bệnh héo xanh do vk *R. solanacearum* & tăng cường sinh trưởng cây cà chua quy mô phòng thí nghiệm.

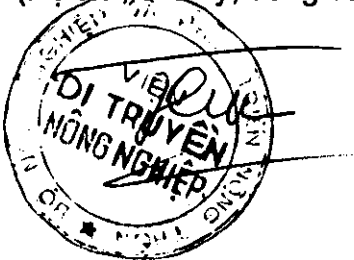
5. KINH PHÍ ĐỀ TÀI

Tổng kinh phí đã quyết toán: 115 triệu đồng, trong đó:

- Năm 2001: 25 triệu đồng
- Năm 2002: 70 triệu đồng
- Năm 2003: 20 triệu đồng

Hà Nội, ngày 11 tháng 8 năm 2004

Cơ quan chủ trì đề tài

Chủ nhiệm đề tài, dự án (Họ tên, chữ ký)	Kế toán trưởng cơ quan chủ trì đề tài, dự án (Họ tên, chữ ký)	Thủ trưởng cơ quan chủ trì đề tài, dự án (Họ tên, chữ ký, đóng dấu)
		
TS. Nguyễn Ngọc Cường	Vũ Thị Huấn	GS.TSKH. Trần Duy Quý

Cơ quan chủ quản	
Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp	Ban chủ nhiệm chương trình KC.04.04 