

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO      BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT**  
**VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM**

=====

**NGUYỄN THỊ THUÝ NGA**

**NGHIÊN CỨU CƠ SỞ KHOA HỌC SẢN XUẤT  
CHẾ PHẨM VI SINH VẬT ĐA CHỦNG ĐỂ GIEO ƯƠM VÀ  
TRỒNG THÔNG NHỰA (*Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese)  
TRÊN ĐẤT THOÁI HÓA Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP**

**HÀ NỘI - 2016**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO      BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT**  
**VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM**

=====

**NGUYỄN THỊ THUÝ NGA**

**NGHIÊN CỨU CƠ SỞ KHOA HỌC SẢN XUẤT  
CHẾ PHẨM VI SINH VẬT ĐA CHỦNG ĐỂ GIEO ƯƠM VÀ  
TRỒNG THÔNG NHỰA (*Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese)  
TRÊN ĐẤT THOÁI HÓA Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP**

**Chuyên ngành đào tạo: Quản lý Tài nguyên rừng**

**Mã số: 62 62 02 11**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS. TS. PHẠM QUANG THU**

**HÀ NỘI - 2016**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Luận án được hoàn thành trong Chương trình đào tạo Tiến sỹ khoá 24 (2012- 2016), tại Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi và có kế thừa các công trình nghiên cứu trước có liên quan đến luận án.

Các số liệu, kết quả, nghiên cứu trong luận án trung thực và chưa từng có ai công bố, trong bất kỳ công trình nào khác.

*Hà Nội ngày 12 tháng 05 năm 2016*

**Tác giả luận án**

**Nguyễn Thị Thuý Nga**

## LỜI CẢM ƠN

*Luận án được hoàn thành với sự giúp đỡ của các thầy giáo, các cơ quan đoàn thể, các bạn đồng nghiệp và sự ủng hộ động viên lớn nhất từ gia đình tôi, qua đây tôi xin được bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc của mình.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới thầy giáo PSG. TS Phạm Quang Thu, người thầy tâm huyết đã tận tình hướng dẫn, động viên khích lệ, dành nhiều thời gian, công sức định hướng nghiên cứu cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban giám đốc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Ban Đào tạo và Hợp tác quốc tế, Lãnh đạo Trung tâm nghiên cứu Bảo vệ rừng đã tạo điều kiện tốt cho tôi trong suốt quá trình học tập tại Viện.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn Tổng Công ty Lâm nghiệp, Đông Triều, Quảng Ninh, đã giúp tôi thực hiện mô hình thực nghiệm, ngoài hiện trường.*

*Tôi xin bày tỏ sự cảm ơn sâu sắc tới các đồng nghiệp thuộc Trung tâm nghiên cứu Bảo vệ rừng Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, đã tham gia hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện một số thí nghiệm tại trung tâm và đã có những ý kiến đóng góp quý báu giúp tôi hoàn thiện luận án.*

*Cuối cùng nhưng vô cùng quan trọng tôi gửi tấm lòng ân tình tới gia đình tôi, bố mẹ hai bên nội, ngoại và đặc biệt là chồng và các con tôi luôn là nguồn động viên lớn đã truyền nhiệt huyết cho tôi hoàn thành luận án này.*

***Tác giả luận án***

***Nguyễn Thị Thuý Nga***

## MỤC LỤC

<b>LỜI CẢM ƠN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT</b> .....	<b>v</b>
<b>DANH MỤC BẢNG BIỂU</b> .....	<b>vii</b>
<b>DANH MỤC HÌNH</b> .....	<b>ix</b>
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MỤC TIÊU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Mục tiêu tổng quát.....	4
2.1.2. Mục tiêu cụ thể .....	4
2.2. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu. ....	4
3.3. Cấu trúc của luận án. ....	6
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở NGOÀI NƯỚC</b> .....	<b>7</b>
1.1.1. Nghiên cứu về nấm cộng sinh. ....	7
1.1.2. Nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh sinh IAA kích thích tăng trưởng thực vật. ....	8
1.1.3. Nghiên cứu về vi sinh vật phân giải photphat khó tan. ....	10
1.1.4. Nghiên cứu vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh. ....	11
1.1.5. Nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ tự do. ....	14
1.1.6. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp. ....	17
1.1.7. Nghiên cứu về gieo trồng Thông nhựa.....	18
<b>1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở TRONG NƯỚC</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Nghiên cứu về nấm cộng sinh. ....	20
1.2.2. Nghiên cứu về VSV nội sinh sinh tổng hợp IAA kích thích tăng trưởng. ....	21
1.2.3. Nghiên cứu về vi sinh vật phân giải photphat.....	22
1.1.4. Nghiên cứu vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh. ....	23
1.2.5. Nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ tự do. ....	25
1.2.6. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp. ....	27
1.2.7. Nghiên cứu về gieo trồng Thông nhựa.....	32
1.2.8. Nghiên cứu về đất thoái hoá, bạc màu .....	33
<b>CHƯƠNG 2. ĐỊA ĐIỂM – THỜI GIAN – VẬT LIỆU - NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1. Địa điểm nghiên cứu</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2. Thời gian và vật liệu nghiên cứu</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3. Nội dung nghiên cứu.</b> ....	<b>37</b>
2.3.1. Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi sinh vật .....	37

2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.	38
2.3.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng.	38
2.3.4. Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.	38
<b>2.4. Phương pháp nghiên cứu.</b>	<b>38</b>
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu tuyển chọn chủng VSV.	38
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học các chủng VSV.	43
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng.	47
2.4.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.	49
<b>CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN</b>	
3.1. Kết quả tuyển chọn các chủng vi sinh vật có ích.	53
3.1.1 Kết quả tuyển chọn nấm cộng sinh có hiệu lực cao cho cây Thông nhựa.	53
3.1.2. Kết quả phân lập và tuyển chọn VSV nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh.	55
3.1.3. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải photphat khó tan.	65
3.2. Đặc điểm hình thái và sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.	73
3.2.1. Đặc điểm hình thái các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.	73
3.2.2. Đặc điểm sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.	76
3.2.3. Định danh đến loài các chủng VSV có hoạt tính cao.	87
3.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm VSV đa chủng.	92
3.3.1. Kết quả nghiên cứu sự tương tác của các VK trong cùng hỗn hợp.	92
3.3.2. Kết quả nghiên cứu xác định giá thể tạo chế phẩm.	92
3.3.3. Kết quả nghiên cứu hoạt tính các chủng VSV trong chế phẩm.	96
3.3.4. Kết quả nghiên cứu thời gian bảo quản của chế phẩm.	97
3.4. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm VSV đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.	101
3.4.1. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa.	101
3.4.2. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến đất thoái hoá bạc màu.	106
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b>	<b>113</b>
1. Kết luận.	113
2. Kiến nghị.	114
Tài liệu tham khảo tiếng Việt Nam.	116
Tài liệu tham khảo tiếng nước ngoài.	120

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT

<b>Ký hiệu</b>	<b>Giải nghĩa đầy đủ</b>
<b>Từ viết tắt</b>	
BT	Bào tử
CFU	Đơn vị hình thành bào tử
CPVSV	Chế phẩm vi sinh vật
CT	Công thức
C/N	Tỷ số các bon trên nitơ
DDVK	Dung dịch vi khuẩn
$D_{TB}$	Đường kính trung bình của vòng phân giải
Dg	Đường kính gốc cây
Đ/C	Đối chứng
ĐK	Đường kính
Fpr	Hệ số biến động
FAO	Food and Agriculture Organization (Tổ chức LHQ về lương thực và nông nghiệp)
GA	Gibberellin
H <sub>vn</sub>	Chiều cao vút ngọn
$\overline{H_{vn}}$	Chiều cao vút ngọn trung bình
IAA	Indole-3-acetic axit
OM	Hàm lượng mùn tổng số
N <sub>ts</sub>	Hàm lượng nitơ tổng số
Pb	Tỷ lệ bị bệnh
Pcs	Tỷ lệ cộng sinh
Pg	Phân giải
PGL	Phân giải lân
P <sub>2</sub> O <sub>5 dt</sub>	Phốt pho dễ tiêu
P <sub>2</sub> O <sub>5 TS</sub>	Phốt pho tổng số

KHCN	Khoa học công nghệ
$K_2O_{dt}$	Kali dễ tiêu
$K_2O_{TS}$	Kali tổng số
Lsd	Khoảng sai dị
MĐTB	Mật độ tế bào
N	Dung lượng mẫu
NCS	Nấm cộng sinh
NS	Nội sinh
SL	Số lượng
SLVSV	Số lượng Vi sinh vật
TB	Trung bình
TN	Thí nghiệm
VSV	Vi sinh vật
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Tổ chức LHQ về giáo dục, khoa học và văn hóa)
VSVĐK	Vi sinh vật đối kháng
VSVNS	Vi sinh vật nội sinh
VKNS	Vi khuẩn nội sinh
VK	Vi khuẩn
$V_{VK}$	Vòng ức chế của vi khuẩn kháng nấm bệnh



## DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 3.1: Kết quả chiều cao cây Thông nhựa được nhiễm nấm khác nhau sau 30 ngày .....	51
Bảng 3.2: Kết quả phân lập chủng vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa .....	53
Bảng 3.3: Kết quả phân lập các chủng VK khác nhau NS cây Thông nhựa..	57
Bảng 3.4: Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa sinh tổng hợp IAA.....	59
Bảng 3.5 : Kết quả tuyển chọn VK nội sinh cây Thông nhựa đối kháng nấm <i>Fusarium oxysporum</i> gây bệnh thối cổ rễ thông .....	62
Bảng 3.6: Đặc điểm các chủng VK phân giải lân .....	65
Bảng 3.7: Hiệu lực phân giải phot phat khó tan của VK theo thời gian. ....	67
Bảng 3.8: Hiệu lực phân giải phot phat khó tan của các chủng VK .....	69
Bảng 3.9: Hàm lượng $NH_4^+$ trong dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn tuyển chọn.....	71
Bảng 3.10: Hình thái tế bào và gram của các chủng VK có ích .....	81
Bảng 3.11: Kết quả mật độ TB và hàm lượng IAA được sinh ra,khi nuôi ở các môi trường khác nhau.....	76
Bảng 3.12: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào VK đối kháng nấm gây thối cổ rễ thông .....	84
Bảng 3.13: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào VK phân giải phot phat khó tan. ....	79
Bảng 3.14: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào VK cố định nitơ.....	80
Bảng 3.15: Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK .....	82
Bảng 3.16: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK.....	83
Bảng 3.17: Ảnh hưởng của độ pH đến mật độ tế bào VK .....	86
Bảng 3.18: Xác định tên các chủng VSV dựa trên trình tự phân đoạn 16S rDNA .....	88

Bảng 3.19: Mật độ bào tử của VSV sản xuất chế phẩm sau khi hợp chủng ..	92
Bảng 3.20: Mật độ tế bào các chủng VSV sau 2 tuần phối trộn .....	93
Bảng 3.21: Hoạt tính sinh học của VSV sau khi hợp chủng. ....	96
Bảng 3.22: Mật độ bào tử của các chủng vi sinh vật tại các thời gian khác nhau. .....	97
Bảng 3.23: Số liệu thí nghiệm vườn ươm đối với Thông nhựa <i>Pinus merkusii</i> .....	101
Bảng 3.24: Số liệu thí nghiệm rừng trồng đối với Thông nhựa <i>Pinus merkusii</i> .....	104
Bảng 3.25: Tính chất lý hóa đất thoái hoá, bạc màu trước và sau khi thí nghiệm trồng Thông nhựa. ....	107
Bảng 3.26 :Thành phần và mật độ tế bào VSV tổng số của các mẫu đất rừng trước và sau khi thí nghiệm. ....	108
Bảng 3.27: Số lượng chủng loại Nấm nội cộng sinh của đất thoái hoá, bạc màu trước và sau khi trồng Thông nhựa. ....	111

## DANH MỤC HÌNH

Hình 3.1:	Biểu đồ chiều cao cây Thông nhựa được nhiễm nấm sau 30 ngày	52
Hình 3.2:	Kết quả phân lập VSV NS cây Thông nhựa ở các vị trí khác nhau	54
Hình 3.3:	Chủng vi khuẩn QI1	60
Hình 3.4:	Chủng vi khuẩn CI6	60
Hình 3.5:	Chủng vi khuẩn QI8	60
Hình 3.6:	Chủng vi khuẩn QI26	60
Hình 3.7:	Chủng vi khuẩn QI24	60
Hình 3.8:	Chủng vi khuẩn QI23	60
Hình 3.9:	Hoá chất IAA xây dựng đường chuẩn	60
Hình 3.10:	Đường chuẩn IAA	60
Hình 3.11:	NCS phân lập VKNS	60
Hình 3.12:	Nhân sinh khối chủng VK	60
Hình 3.13:	Li tâm chủng VK	60
Hình 3.14:	Ống nghiệm chứa dịch IAA	60
Hình 3.15:	Chủng QI24 đối kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.16:	Chủng QI16 đối kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.17:	Chủng QI25 đối kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.18:	Chủng QI1 đối kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.19:	Chủng QI9 đối kháng nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.20:	Nấm <i>F. oxysporum</i>	62
Hình 3.21:	Khuẩn lạc các chủng VK phân giải phốt phát	68
Hình 3.22:	Khuẩn lạc chủng vi khuẩn N5.1	68
Hình 3.23:	Khuẩn lạc chủng vi khuẩn N2.1	68
Hình 3.24:	Khuẩn lạc chủng vi khuẩn N6.1	68
Hình 3.25:	Khuẩn lạc chủng vi khuẩn B7.1	68
Hình 3.26:	Khuẩn lạc chủng vi khuẩn N2.3	68

Hình 3.27:	Chủng vi khuẩn B2.1	71
Hình 3.28:	Chủng vi khuẩn V3.2	71
Hình 3.29:	Chủng vi khuẩn V4.	71
Hình 3.30:	Chủng vi khuẩn B8.3	71
Hình 3.31:	Chủng vi khuẩn N2.1	71
Hình 3.32:	Chủng vi khuẩn N2.3	71
Hình 3.33:	Bào tử nấm <i>P. tinctorius</i>	72
Hình 3.34:	Thể quả nấm <i>P.tinctorius</i>	72
Hình 3.35:	Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng QI <sub>1</sub> và QI <sub>8</sub>	75
Hình 3.36:	Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng QI16 và QI24	76
Hình 3.37:	Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng N2.1 và N2.3	78
Hình 3.38:	Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng V3.2 và chủng V4.2	79
Hình 3.39:	Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối tới sinh trưởng của các chủng vi khuẩn	81
Hình 3.40:	Ảnh hưởng của nhiệt độ nhân sinh khối tới sinh trưởng của các chủng VK	82
Hình 3.41:	Ảnh hưởng của độ pH đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn	85
Hình 3.42:	Sản phẩm PCR phân đoạn 16SrDNA trên bảng gen của các chủng VK	86
Hình 3.43:	Khuẩn lạc chủng <i>P. fluorescens</i> (QI1)	89
Hình 3.44:	Tế bào chủng <i>P. fluorescens</i> (QI1)	89
Hình 3.45:	Tế bào chủng <i>P. fluorescens</i> (QI1)	89
Hình 3.46:	Khuẩn lạc chủng <i>B. subtilis</i> (QI24)	89
Hình 3.47:	Tế bào chủng <i>B. subtilis</i> (QI24)	89
Hình 3.48:	Tế bào chủng <i>B. subtilis</i> (QI24)	89

Hình 3.49:	Khuẩn lạc chủng <i>B. cenocepacia</i> (N2.1)	89
Hình 3.50:	Tế bào chủng <i>B. cenocepacia</i> (N2.1)	89
Hình 3.51:	Tế bào chủng <i>B. cenocepacia</i> (N2.1) đang phân chia	89
Hình 3.52:	Khuẩn lạc chủng <i>A. beijerinckii</i> (V4.2)	89
Hình 3.53:	Tế bào chủng <i>A. beijerinckii</i> (V4.2)	89
Hình 3.54:	Tế bào chủng <i>A. beijerinckii</i> (V4.2)	89
Hình 3.55:	Các chủng vi khuẩn cùng tồn tại và phát triển trên môi trường	90
Hình 3.56:	Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng để gieo ươm và trồng cây Thông nhựa.	97
Hình 3.57:	Chế phẩm đa chủng vi sinh vật	98
Hình 3.58:	Thí nghiệm nhiễm chế phẩm Thông nhựa sau 2 tháng	101
Hình 3.59:	Thí nghiệm nhiễm chế phẩm cho Thông nhựa sau 8 tháng	101
Hình 3.60:	Đất thoái hoá bạc màu trước khi trồng rừng thí nghiệm	103
Hình 3.61:	Cây Thông nhựa sau 1.5 năm tuổi (hình a- đối chứng, hình b – bón chế phẩm đa chủng VSV).	104

## MỞ ĐẦU

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Thông là cây trồng Lâm nghiệp, được gây trồng ở hầu khắp các tỉnh trung du và miền núi nước ta. Cây thông được coi là cây loại trồng chủ yếu, với diện tích đứng thứ ba sau bạch đàn và keo. Theo quyết định số 3135/QĐ-BNN-TCLN ngày 06/8/2015 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công bố số liệu hiện trạng rừng toàn quốc năm 2014 là 13,796 triệu ha đạt độ che phủ khoảng 40,96%. Diện tích rừng trồng thông các loại là khoảng 400.000 ha (chiếm gần 12% tổng diện tích rừng trồng trong cả nước). Loại thông được trồng chủ yếu là Thông nhựa (*Pinus merkusii*), Thông đuôi ngựa (*Pinus massoniana*), Thông ba lá (*Pinus kesyia*), thông được chọn là cây phổ biến như vậy vì đặc điểm sinh vật học và giá trị mà thông mang lại. Thông mang lại giá trị lớn về mặt kinh tế như: cung cấp nguyên vật liệu cho ngành khai thác than (gỗ trụ mỏ), ngành xây dựng, ngành công nghiệp làm giấy, gỗ bao bì, nhựa thông còn được dùng trong nhiều ngành công nghiệp như sơn, vécnit, vật liệu cách điện và các mặt hàng tiêu dùng khác, thông nhựa là loài cây cho nhựa nhiều nhất. Ở nước ta hiện nay Thông nhựa được trồng với mục đích chủ yếu là khai thác nhựa, ngoài ra, rừng thông nhựa còn có ý nghĩa về bảo vệ môi trường. Về mặt xã hội trồng rừng Thông nhựa tạo công việc, tăng thu nhập cho người dân làm nghề rừng.

Các loài cây hạt trần nói chung và thông nói riêng, lông hút ở rễ kém phát triển, nên trong tự nhiên có quá trình cộng sinh bắt buộc với nấm. Sợi nấm giúp cây trồng hấp thụ nước và dinh dưỡng khoáng tốt hơn. Việc gieo ươm gây trồng cây Thông nhựa, bắt buộc phải có sự góp mặt của nấm cộng sinh. Vai trò của nấm cộng sinh đối với cây trồng cũng được quan tâm và nghiên cứu 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. Để đạt được điều đó các cơ sở sản xuất phải sử dụng 10% đất mặt rừng thông đã khép tán trộn với thành phần ruột bầu, để có nguồn nấm cộng sinh. Việc làm này đã gây nên nhiều bất lợi như sau:

- Nấm cộng sinh không được tuyển chọn,
- Mang theo mầm sâu, bệnh đặc biệt bệnh lở cổ rễ và bệnh róm lá thông,
- Hệ sinh thái của rừng thông khép tán bị ảnh hưởng nghiêm trọng,
- Chi phí rất lớn,

Ngoài ra, việc gieo ươm và gây trồng thông ở nước ta hiện nay còn gặp nhiều khó khăn và trở ngại. Gieo ươm thông tại vườn ươm còn mắc nhiều bệnh như: bệnh vàng còi do cây thông không có nấm cộng sinh, bệnh thối cổ rễ, bị chết nhiều do nấm *Fusarium* spp. Tỷ lệ cây con bị chết ở vườn ươm do nấm *Fusarium* spp. gây ra ước tính từ 40% đến 50% (Nguyễn Sỹ Giao, 1996). Ngoài ra, ở rừng trồng thông cũng hay bị bệnh róm lá thông, sâu róm thông. Không những thế năng suất rừng trồng thông hiện nay còn hạn chế, cây thông sinh trưởng phát triển kém, kéo theo sức đề kháng yếu, dễ bị bệnh và sự tấn công của nhiều loài sâu và bệnh.

Trên thế giới cũng như ở nước ta, đã sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc vi sinh vật (VSV) để bổ sung vào bầu ươm cây con, cũng như trồng rừng thông, việc làm này đã mang lại lợi ích kinh tế cao hơn và thân thiện với môi trường, nhằm tăng năng suất giá trị của cây trồng và làm giảm hiện tượng thoái hóa đất. Các loài thông và một số loài cây trồng khác, có mối quan hệ cộng sinh với nấm, nấm làm nhiệm vụ hấp thụ nước và dinh dưỡng cho cây, đối kháng với nấm gây bệnh, chính nhờ mối quan hệ này, mà cây thông sống được trong những điều kiện khí hậu khắc nghiệt, đất thoái hóa, nghèo chất dinh dưỡng.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, cây Thông nhựa có thể sống và sinh trưởng phát triển trên đất trống đồi núi trọc, đất thoái hóa, cằn cỗi, đất nghèo dinh dưỡng. Theo số liệu của FAO/UNESCO (2011) [7], trên thế giới có hàng tỷ ha đất bị bạc màu, tập trung nhiều nhất ở Châu Á, Châu Phi, Châu Mỹ, đặc biệt là các quốc gia đang phát triển. Hiện nay trên thế giới có khoảng 25% diện tích đất đang thoái hóa nghiêm trọng – với nhiều biểu hiện như xói mòn, thiếu nước và suy giảm mức độ đa dạng sinh học, khoảng 8% diện tích đất bị thoái hóa ở mức vừa phải, 36% bị thoái hóa nhẹ hoặc ổn định, diện tích đất được cải thiện chất lượng chỉ chiếm 10%. Kết quả tính

toán cho thấy, tốc độ bạc màu hiện tại khoảng 5 - 7 triệu ha/năm, diện tích đất canh tác trên đầu người giảm nhanh từ 0,5 ha/người xuống còn 0,2 ha/người. Ở Việt Nam, theo thống kê của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, cả nước có 21 triệu ha đất canh tác nông - lâm nghiệp. Trong đó phần lớn diện tích đất có hàm lượng dinh dưỡng thấp, đặc biệt có tới 9,34 triệu ha đất hoang hoá, (chiếm khoảng 28% tổng diện tích đất đai trên toàn quốc), trong đó có 5,06 triệu ha đất chưa sử dụng và 2 triệu ha đất đang được sử dụng bị thoái hóa nặng (Quyết định số 272/QĐ-TTg ngày 27/2/2007). Thực tế hiện nay ở nước ta cây Thông nhựa được trồng với diện tích lớn tại các lập địa thoái hóa, nghèo chất dinh dưỡng.

Hiện nay trên thị trường phân bón nước ta, phân vi sinh vật cố định đạm được bán dưới các tên thương phẩm sau đây: Phân nitragin chứa vi khuẩn nốt sần cây đậu tương, Phân rhidafo chứa vi khuẩn nốt sần cây lạc, Azotobacterin chứa vi khuẩn hút đạm tự do. Azozin chứa vi khuẩn hút đạm từ không khí sống trong ruộng lúa, loại phân này có thể trộn với hạt giống lúa. Các sản phẩm hiện đang lưu hành ngoài thị trường chưa đảm bảo về mật độ và hoạt lực của chủng vi sinh, do vi sinh vật là những tế bào sống cần có điều kiện thích hợp về chất mang và điều kiện ngoại cảnh. Hầu hết các chế phẩm VSV chưa được chọn lọc và tập hợp nhiều chủng VSV có ích, không những thế các chủng VSV hầu hết chỉ có 1 công dụng nhất định. Ngoài ra các chế phẩm vi sinh vật ở nước ta, chủ yếu phục vụ cho phát triển cây Nông nghiệp và cây ăn quả, những loại phân VSV riêng cho cây lâm nghiệp còn ít hoặc rất hạn chế. Phát triển cây Lâm nghiệp và cải tạo đất thoái hoá Lâm nghiệp, là cần thiết và quan trọng trong việc phát triển kinh tế, xã hội, bảo vệ môi trường và đặc biệt là phát triển nghề rừng. Để khắc phục những tồn tại trên tôi tiến hành nghiên cứu luận án “***Nghiên cứu cơ sở khoa học sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng để gieo sơm và trồng Thông nhựa (Pinus merkusii Jungh. Et de Vriese) trên đất thoái hoá ở Miền Bắc Việt Nam***”.



## **2. MỤC TIÊU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Mục tiêu nghiên cứu**

#### **2.1.1. Mục tiêu tổng quát**

- Xác định được cơ sở khoa học sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng (gồm nấm ngoại cộng sinh, vi khuẩn sinh IAA (Indole-3-acetic axit) và đối kháng nấm gây bệnh, vi sinh vật phân giải photphat khó tan và cố định nitơ tự do) để gieo ươm, gây trồng Thông nhựa nhằm tăng sinh trưởng, hạn chế bệnh thối cổ rễ và cải tạo đất thoái hoá.

#### **2.1.2. Mục tiêu cụ thể**

- Tuyển chọn được chủng nấm ngoại cộng sinh, thuộc loài *Pisolithus tinctorius*, phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa, có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa; phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải photphat khó tan và cố định nitơ tự do có hiệu lực cao.

- Xác định được đặc điểm sinh học của các chủng VSV tuyển chọn.

- Xác định được cơ sở khoa học tạo chế phẩm VSV đa chủng,

- Sản xuất được chế phẩm VSV đa chủng có khả năng tăng sinh trưởng, hạn chế bị bệnh đối với cây Thông nhựa ở vườn ươm và rừng trồng, cải tạo đất thoái hoá, bạc màu.

### **2.2. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.**

#### **2.2.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Nấm ngoại cộng sinh *Pisolithus tinctorius*

- Vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa sinh tổng hợp IAA và đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ cây thông, *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*.

- Vi sinh vật phân giải photphat khó tan và cố định nitơ tự do, được phân lập từ đất rừng, *Burkholderia cenocepacia*, *Azotobacter beijerinckii*.

#### **2.2.2. Phạm vi nghiên cứu**

- Luận án nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh cây thông; và một số vi khuẩn tự do phân lập từ đất thoái hoá, bạc màu.

- Thử nghiệm chế phẩm vi sinh vật đa chủng với cây con Thông nhựa ở vườn ươm đến 8 tháng tuổi.
- Thí nghiệm nhiễm chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho cây Thông nhựa tại rừng trồng trên đất thoái hóa tại Đông Triều, Quảng Ninh.
- Đánh giá về sinh trưởng của cây Thông nhựa, đánh giá tính chất vật lý, và mật độ vi sinh vật của đất rừng trồng cây Thông nhựa được nhiễm chế phẩm vi sinh vật đa chủng khi cây con 1 tuổi và 1,5 tuổi.

### **3. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN**

#### **3.1. Ý nghĩa khoa học**

Luận án là một công trình khoa học nghiên cứu khá đầy đủ về đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn có ích nội sinh cây Thông nhựa và một số vi sinh vật tự do phân lập được từ đất. Công trình đã đưa ra được cơ sở khoa học tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng bón cho Thông nhựa, tăng sinh trưởng, hạn chế bị bệnh ở vườn ươm và rừng trồng. Chế phẩm vi sinh vật đa chủng có khả năng cải tạo đất thoái hoá, bạc màu.

#### **3.2. Ý nghĩa thực tiễn**

Kết quả nghiên cứu của luận án đưa ra cách gieo ươm cây Thông nhựa tại vườn ươm, hiệu quả, khoa học phù hợp với thực tiễn sản xuất và bảo vệ môi trường, không phải sử dụng 10% tầng đất mặt rừng thông để trộn với thành phần ruột bầu.

Kết quả luận án cũng đã góp phần nâng cao hiệu quả rừng trồng Thông nhựa, sinh trưởng tốt, hạn chế tỷ lệ bệnh, tăng hiệu quả kinh tế góp phần cải tạo đất thoái hoá bạc màu.

#### **3.4. Những đóng góp mới của luận án**

- Lần đầu tiên phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* nội sinh cây Thông nhựa, có khả năng sinh tổng hợp IAA vừa có khả năng đối kháng với nấm *F.oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa.

- Lần đầu tiên phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn *Burkholderia cenocepacia*, *Azotobacter beijerinckii* có khả năng phân giải phốt phát khó tan vừa có khả năng cố định nitơ tự do.

- Tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho cây Thông nhựa có khả năng kích thích sinh trưởng, cố định đạm, phòng trừ nấm gây bệnh thối cổ rễ và cải tạo đất thoái hoá bạc màu, thay thế việc sử dụng 10% đất mặt rừng thông khi gieo ươm và thay thế việc sử dụng phân NPK bón lót khi trồng rừng.

### **3.5. Cấu trúc của luận án.**

Luận án bao gồm 3 chương

- Chương 1: Tổng quan các vấn đề nghiên cứu.
- Chương 2: Địa điểm, thời gian, nội dung, vật liệu và phương pháp nghiên cứu.
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu.
- Kết luận và khuyến nghị
- Tài liệu tham khảo
- Phần phụ lục

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

### 1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở NGOÀI NƯỚC

#### 1.1.1. Nghiên cứu về nấm cộng sinh

Nấm cộng sinh là các loài nấm có khả năng cộng sinh với rễ của cây, không gây hại cho cây chủ mà ngược lại cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây chủ, giúp cây chủ sinh trưởng và phát triển tốt. Nấm cộng sinh đã được các nhà nghiên cứu vi sinh vật quan tâm từ rất sớm, ở Venezuela, người ta lấy lớp đất mặt của các rừng trồng thông đã khấp tán trộn với đất của vườn ươm để tạo ruột bầu gieo ươm cây con, nấm cộng sinh chủ yếu ở đây là loài *Thelephora terrestris*. Từ những năm 1980, bào tử nấm *Pisolithus tinctorius* được bang Georgia của Mỹ nhiễm cho cây thông con ở vườn ươm. Marx và đồng tác giả (1982) [64] đã nghiên cứu, được chế phẩm *P. tinctorius* đã được sản xuất và bán rộng rãi ngoài thị trường, hầu hết các cây con gieo ươm đều được nhiễm chế phẩm này trên quy mô lớn. Các thể quả nấm cộng sinh còn được thu hái trên nhiều vùng sinh thái khác nhau, nuôi trồng cho lên hệ sợi, nhiễm cho các cây con ở dạng thể sợi hay bào tử, kết quả cho thấy, có tác dụng rõ rệt, các cây được bón nấm cộng sinh cho tăng trưởng vượt trội. Tuy nhiên việc sử dụng nấm cộng sinh của tác giả mới chỉ ở dạng đơn lẻ, chỉ có 1 chủng vi sinh vật là nấm cộng sinh, kết quả mang lại hiệu quả chưa cao.

Vào năm 1986 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 *et al.*, 1986) [59]. Các kết quả thí nghiệm nhiễm nấm cộng sinh cho các loài cây con ở vườn ươm, 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 *P. tinctorius*, *Laccaria laccata* và *Laccaria bicolor*.

Theo Marx và đồng tác giả (1989) [65], bào tử nấm *P. tinctorius* 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. Hơn tám triệu cây con, đã được nhiễm chế phẩm bằng hệ sợi và nhiều triệu cây con đã được nhiễm chế phẩm bằng bào tử, cho kết quả sinh trưởng vượt trội. Tuy chế phẩm này đã có ưu điểm rõ rệt so với các chế phẩm chỉ có 1 loài vi sinh vật nhưng chúng cũng tồn tại ở 1 loài nấm thu ở nhiều vùng sinh thái, chưa có nhiều chủng vi sinh vật khác nhau trong chế phẩm. Nhiều công trình nghiên cứu về sản xuất chế phẩm vi sinh vật và nhiễm chế phẩm cho cây con ở vườn ươm tập trung vào các loài cây lá kim với các loài nấm như *P. tinctorius* và *L. laccata* và *L. bicolor*. 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 phục vụ cho chương trình trồng rừng của quốc gia. S. Fracchia và đồng tác giả (2004) [74] là những nhà nghiên cứu người Aentina cho rằng nấm cộng sinh cũng ảnh hưởng tới sự nảy mầm bào tử nấm khác bằng những con đường khác nhau như gián tiếp thông qua sự tương tác hoặc trực tiếp bởi những hợp chất ngoại bào hoặc sự phát triển nhanh của quần thể.

Với sự ứng dụng phổ biến, nấm men cũng cho thấy triển vọng để làm tăng sự nảy mầm bào tử của nấm cộng sinh, hay ức chế sự nảy mầm của vài loài nấm bệnh chứa trong đất bởi sự cạnh tranh như kiểm soát sinh học, Marques và đồng tác giả (2006) [63] cho rằng, sử dụng nấm cộng sinh làm ngăn cản sự nảy mầm bào tử của các nấm gây bệnh khác.

### **1.1.2. Nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh sinh IAA kích thích tăng trưởng thực vật.**

Các chất kích thích tăng trưởng thực vật là những chất tự nhiên được sản xuất bởi các vi sinh vật nội sinh. Chúng có tác dụng kích thích hoặc ức chế một số quá trình sinh lý, sinh hóa ở thực vật và vi sinh vật. Brakel và Hilger (1965) [36] cho rằng, vi khuẩn *Azotobacter* có thể sản sinh ra axit indol-3-acetic (IAA) là chất tăng trưởng thực vật khi được nuôi cấy ở môi trường nhân tạo có thêm hoá chất tryptophan. Hennequin và Blachere (1966) [48] đã tìm thấy, chỉ một lượng nhỏ của IAA khi nuôi cấy vi khuẩn

*Azotobacter* trong môi trường không có tryptophan được thêm vào. Chandramohan và Mahadevan (1968b) [38] đã phân lập được vi khuẩn sinh IAA tăng trưởng thực vật từ cây Bông.

Azcorn và Barea, (1975) [34] cho rằng, vi khuẩn thuộc chi *Azotobacter* có khả năng tổng hợp auxin, cytokinin và các vi chất khác, được phân lập trên cây cà chua, những chất kích thích sinh trưởng thực vật, có thể phân lập được ở rễ hoặc ở thân cây thực vật bậc cao. Eklund (1970) [41] đã chứng minh, sự hiện diện của *Azotobacter chroococcum* trong vùng rễ, thân cây Cà chua và Dưa chuột có tương quan với tăng tỷ lệ nảy mầm và phát triển của cây.

Vi khuẩn nội sinh có mặt trong nhiều loại cây trồng và thực vật hoang dại, hầu hết chúng đều có khả năng cố định đạm như: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Govindarajan *et al.*, 2006), [44]. Nhiều loài vi khuẩn nội sinh thường được tìm thấy trong những cây ngũ cốc quan trọng, chúng có khả năng sinh tổng hợp IAA, đối kháng với nấm gây bệnh, chúng kích thích cây tăng trưởng và làm tăng năng suất cây trồng (Muthukumarasamy *et al.*, 2002) [68].

Theo Spaepen và đồng tác giả (2007) [75] cho rằng, có sự tương quan rõ ràng giữa mật độ vi khuẩn nội sinh và chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA. Hơn nữa, nghiên cứu còn cho thấy IAA cũng có thể là một trong những yếu tố có thể ảnh hưởng trực tiếp tới sinh lý của vi khuẩn. Những năm trước đây nhiều nhà khoa học cho rằng IAA được sản xuất bởi vi sinh vật chỉ là chất chuyển hóa thứ cấp. Nhưng gần đây nhà nghiên cứu Stijn và Jos (2010) [76] cho rằng, VSV nội sinh như những nhà máy không lò, sản xuất IAA tăng kích thích sinh trưởng thực vật. Ruben và đồng tác giả (2012) [72] cho rằng, có mặt của các vi sinh vật sinh IAA sẽ làm tăng sản lượng cây trồng một cách rõ rệt, ngoài ra, nghiên cứu còn cho thấy IAA có nồng độ ngoại sinh quá cao cũng không tốt cho sự phát triển của cây trồng.

### 1.1.3. Nghiên cứu về vi sinh vật phân giải phốt phát khó tan.

Vi khuẩn phân giải lân là loại vi khuẩn sống trong đất, có khả năng phân giải lân khó tan trong đất thành lân dễ tan, cây trồng có thể sử dụng được. Johri và đồng tác giả (1999) [52], đã phân lập và mô tả đặc điểm của khoảng 4.800 chủng VSV có khả năng phân giải phốt phát khó tan. Tuy nhiên, các tác giả chỉ dừng ở mô tả đặc điểm của các chủng, mà chưa ứng dụng những chủng vi sinh vật phân giải phốt phát này vào sản xuất phân vi sinh. Khi nghiên cứu về vi sinh vật đất, Alan (2000) [33] cho rằng, vi sinh vật đất đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thụ và quá trình biến đổi của các chất dinh dưỡng trong đất. Đối với phốt pho, vi sinh vật đất có ảnh hưởng nhiều đến quá trình biến đổi phốt pho, đặc biệt vi sinh vật có thể phân giải phốt pho từ các hợp chất phốt pho có trong đất. Ngoài ra, trong bản thân các loài vi khuẩn còn chứa một lượng phốt pho, đó là nguồn dinh dưỡng đáng kể cho cây trồng. Nhiều nghiên cứu về vi sinh vật đất nhận thấy, một ít lượng phốt pho có sẵn là nhân tố đóng vai trò quan trọng nhất trong quá trình phát triển của cây trồng trên đất đỏ ở phía Đông Nam Trung Quốc. Ngoài ra, nghiên cứu còn cho rằng, khả năng phân giải phốt phát của các vi sinh vật ở các loại đất là rất khác nhau. Họ cũng đã phân lập được những loài vi sinh vật phân giải phốt phát ở trong vườn cây ăn quả, trên đất đỏ ở Chang Chen, Trung Quốc.

José và đồng tác giả (2001) [53] cho rằng, các chủng vi khuẩn phân giải phốt phát khó tan được phân lập từ các nguồn khác nhau có hiệu lực phân giải phốt phát khó tan khác nhau và chất lượng của VK phân giải phốt phát khó tan tốt là các VK được phân lập từ đất, hợp chất các bon, nitrogen. Việc sử dụng vi sinh vật phân giải phốt phát khó tan, không những có tác dụng cải tạo đất, mà còn làm tăng lượng phốt pho cho cây trồng và đem lại kết quả tốt cho mùa vụ.

Timmusk và đồng tác giả (2005) [81] đã nghiên cứu, loại vi khuẩn có tên là *Paenibacillus* là loài không gây bệnh cho người được phân lập trong

rễ cây và trong đất, là loại gram dương, tế bào hình que, nó chuyển động nhờ roi peritrichous có khả năng phân giải phốt phát khó tan trong đất rất lớn, ngoài ra nó còn có khả năng sinh tổng hợp chất kích thích tăng trưởng thực vật. Qua nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy, cùng một chủng vi sinh vật có thể có nhiều chức năng như vừa có khả năng phân giải lân vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA. Các vi sinh vật có khả năng hoà tan phốt phát khó tan thành dễ tan bao gồm, các chi thuộc nấm sợi, tảo lam, xạ khuẩn, vi khuẩn, các nghiên cứu cho thấy, các chủng có nguồn gốc từ vi khuẩn có hoạt tính cao và theo thời gian ít bị mất đi hoạt tính.

#### **1.1.4. Nghiên cứu vi sinh vật đối kháng với nấm gây bệnh.**

Vi sinh vật đối kháng là các loại vi sinh vật sống trong đất hoặc trong cây (endophytes) có khả năng sinh các chất kháng sinh, làm hạn chế hoặc gây trở ngại cho sự sinh sống và phát triển của các loài nấm và sinh vật khác (như các loài vi khuẩn, tuyến trùng, xạ khuẩn...) gây bệnh cho cây.

Trên thế giới đã có rất nhiều nhà khoa học đi sâu vào nghiên cứu vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn nội sinh sống trong mô thực vật, có khả năng tạo ra chất kháng sinh quan trọng để phòng trừ một số bệnh trên cây trồng, trong đó có cây nông nghiệp và cây lâm nghiệp. Alexander Fleming (1928), tình cờ phát hiện ra quan hệ đối kháng giữa nấm *Penicillium notatum* với khuẩn *Staphylococcus aureus* và đã tìm ra chất kháng sinh đầu tiên là Penicillin. Hiện nay, trên thế giới có khoảng 13.000 chất kháng sinh tự nhiên, trong đó có hơn 3.000 chất do thực vật tạo ra, hơn 9.000 chất kháng sinh do VSV tổng hợp được và hàng ngàn dẫn chất là kháng sinh bán tổng hợp. Chanway (1996) [39] tiến hành phân lập và định danh các loài VK sống ở trong mô của thực vật của 2 loài thông: Thông radiata (*Pinus radiata*) và Thông đỏ (*Thuja plicata*). Chanway cũng cho rằng, VK nội sinh thúc đẩy quá trình sinh trưởng của cây chủ, vì đã tạo ra một hàng rào kiểm soát sinh học bằng việc tiêu diệt trực tiếp các mầm bệnh xâm nhiễm vào cây chủ hoặc tạo thành một hệ thống ngăn chặn sự xâm nhiễm của mầm bệnh.



Cơ chế tác động chính của nấm *Trichoderma* là ký sinh (Harman và Kubicek, 1998) [46] và tiết ra các kháng sinh ức chế các loài nấm gây bệnh (Sivasithamparam và Ghisalberti, 1998). Ngoài hiệu quả trực tiếp trên các tác nhân gây bệnh cây, nhiều loài *Trichoderma* còn định cư ở bề mặt rễ cây giúp hấp thụ các chất dinh dưỡng cho cây. Nhiều dòng nấm đã kích thích sự tăng trưởng của cây, gia tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng, cải thiện năng suất cây và giúp cây kháng được bệnh (Harman *et al.*, 2004) [47].

Joseph và đồng tác giả (1997) [54] đã ứng dụng VSV đối kháng nấm gây bệnh, bằng cách tiêm chủng VK vào cây để cây kích thích sinh trưởng và kiểm soát bệnh của cây trồng. Các thí nghiệm được thực hiện với 2 cây, là Cà chua và Dưa chuột đã đem lại hiệu quả ức chế một số loại mầm bệnh và giảm mức độ bị bệnh. Mầm bệnh được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum orbiculare*, *Erwinia teracheiphila* và thể khảm do virus ở cây Dưa chuột.

Yuparet (1999) [79] đã phân lập và tuyển chọn, một số loài VK sống trong mô của cây cỏ có khả năng sản xuất ra chất kháng sinh *L-Asparaginase*. Tác giả đã phân lập được 657 loài vi khuẩn từ những cây thân thảo, để sản xuất ra *L-Asparaginase*, có 220 loài vi khuẩn có hiệu lực mạnh đã được đưa vào thử nghiệm. Chúng khuẩn CMU- HB - 631, tạo ra chất kháng sinh *L-Asparaginase* lớn nhất trong môi trường CMC, pH=7. Sử dụng nguồn giống 0.2% số lượng vi khuẩn nuôi cấy trong tủ lắc ở nhiệt độ 25°C thời gian 48 giờ với tốc độ lắc 175 vòng/phút, vi khuẩn này sinh trưởng và sinh ra chất kháng sinh *L-Asparaginase*.

Zhang và đồng tác giả (2001) [82] đã nghiên cứu để tạo ra sức đề kháng trong cây lạc, nhằm làm chậm việc phát triển bệnh đốm lá bằng cách, sử dụng vi khuẩn kích thích sinh trưởng và kìm hãm sự phát triển của nấm bệnh. Araujo và đồng tác giả (2002), đã nghiên cứu các loài vi khuẩn sống trong mô thực vật, để tìm ra các chất kháng sinh, kiểm chế các nguồn bệnh ở cây trồng

bằng phương pháp sinh học nhằm làm giảm bớt tác động đến môi trường. Trong đó nhóm nghiên cứu đã phân lập vi sinh vật nội sinh trên các giống cam, quýt để tiêu diệt và ức chế các bệnh nấm trên các loài cây này, qua đó tìm được các biện pháp phòng trừ sinh học bệnh cho thực vật, thông qua quá trình trao đổi chất của các vi sinh vật nội sinh cây chủ.

Nghiên cứu của Xavier và Germida (2003) [78] chỉ ra rằng, nhiễm chủng vi khuẩn *Bacillus pabuli* đã làm tăng sự nảy mầm bào tử của nấm cộng sinh cây họ đậu *Glomus clarum* cũng như sự phát triển của cây họ đậu. Katsunori Noguchi (2004) cho rằng, một chế phẩm vi sinh vật khi bón vào đất được gọi là có hiệu quả khi thể hiện được các điểm sau: thay đổi tính chất vật lý của đất bao gồm cấu tạo, độ ẩm đất, thay đổi hóa tính đất thể hiện trên hàm lượng dinh dưỡng và chất hữu cơ tăng. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng VSV trong chế phẩm này còn có khả năng ức chế nấm gây bệnh cho một số loài cây trồng nông nghiệp.

Cơ chế tác động có thể từ một vài chất kích thích sinh trưởng hoặc sự tương tác giữa các VSV (Frey *et al.*, 2007) [43], một vài vi khuẩn như *Bacillus subtilis* được sử dụng như một loại kháng sinh sinh học chống lại sự tàn phá của nấm mốc trong sản xuất, với khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi cũng như sự nảy mầm bào tử. Bên cạnh đó, vi khuẩn liên kết với cây chủ sản sinh vài loại chất kháng sinh chẳng hạn như nystatin từ *Streptomyces noursei* tiêu diệt và hạn chế sự nảy mầm bào tử nấm gây bệnh.

Li và đồng tác giả (2011) [60] cho rằng vi khuẩn *Paenibacillus* có một khả năng độc đáo bảo vệ cây giống Cà chua từ bệnh héo xanh vi khuẩn. Héo xanh vi khuẩn là do *Ralstonia solanacearum*, một loại vi khuẩn gây bệnh cho thực vật. Chavez và đồng tác giả (2012), cho rằng vi khuẩn gây bệnh héo xanh *R. solanacearum* xâm nhập vào cây qua rễ, vi khuẩn vào trong bó mạch và các mạch xylem, khi nó phát triển, nhân lên, nó ngăn chặn việc vận chuyển nước và chất dinh dưỡng. Vi khuẩn *P. polymyxa* có thể ngăn chặn

bệnh héo xanh vi khuẩn này bằng cách chiếm hữu và hình thành một màng sinh học xung quanh rễ của cây giống cà chua, ngăn chặn lối vào của vi khuẩn gây bệnh héo xanh *R. solanacearum*.

#### **1.1.5. Nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ tự do.**

Vi sinh vật cố định nitơ là nhóm vi sinh vật có khả năng chuyển hóa khí nitơ dồi dào trong không khí (79%), thành dạng  $\text{NH}_4^+$  cung cấp cho cây. Có nhiều loài vi sinh vật có khả năng cố định nitơ từ không khí. Đáng chú ý có các loài: tảo lam (*Cyanobacterium*), vi khuẩn *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*; xạ khuẩn *Actinomyces*, *Klebsiella*. Phần lớn các loài vi khuẩn cố định đạm thường sống cộng sinh với các cây họ đậu, chúng xâm nhập vào rễ cây và sống cộng sinh trong đó, tạo thành các nốt sần ở rễ cây. Các loài vi khuẩn này, sử dụng chất hữu cơ của cây để sinh trưởng, đồng thời hút đạm từ không khí để cung cấp cho cây, một phần tích lũy lại trong cơ thể chúng. Vi khuẩn cố định N tự do gồm: Vi khuẩn cố định nitơ tự do hiếu khí: (*Azotobacter* và *Beijeriniskia* sp.); Vi khuẩn cố định nitơ kỵ khí (Vi khuẩn thuộc nhóm *Clostridium*).

Hellrigel và Uynfac (1986) đã tìm ra hai nhóm vi sinh vật cố định nitơ, đó là nhóm vi sinh vật cố định nitơ tự do và hội sinh, nhóm vi sinh vật cộng sinh cố định. Nhà bác học Ấn Độ Stackê (1893) đã phân lập được một loài vi khuẩn ở ruộng lúa nước pH rất chua có khả năng cố định nitơ phân tử, vi khuẩn được đặt tên là *Beijeriniskii*. Vi khuẩn *Beijeriniskii* có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que, gram âm không sinh nha bào, hiếu khí, một số loài có tiêm mao có khả năng di động được, kích thước tế bào dao động 0,5 – 2,0 x 1,0 – 4,5( $\mu\text{m}$ ), khuẩn lạc rất nhầy, lồi, không màu hoặc màu nâu tối khi già, không tạo nang xác. Vi khuẩn *Beijeriniskii* có khả năng đồng hóa tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường gluco nó có khả năng cố định được 5 – 10 mgN. Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijeriniskii* có tính chống chịu cao với acid, nó có thể phát triển ở môi trường

pH= 3, nhưng vẫn phát triển ở pH trung tính hoặc kiềm yếu, thích hợp ở độ ẩm 70 – 80% ở nhiệt độ 25 – 28<sup>0</sup>C.

Beyjeirinck (1901) [35] đã phân lập được từ đất một loài vi sinh vật có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho loài vi sinh vật này là *Azotobacter*. Vi khuẩn *Azotobacter* khi nuôi cấy ở môi trường nhân tạo thường biểu hiện tính đa hình, khi còn non có tiêm mao, có khả năng di động được nhờ tiêm mao. Là vi khuẩn hình cầu (song cầu khuẩn), gram âm không sinh nha bào, hảo khí, có kích thước tế bào dao động 1,5 – 5,5 (µm), khuẩn lạc màu trắng trong, lồi, nhày. Khi già khuẩn lạc có màu vàng lục hoặc màu nâu thẫm, tế bào được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác, gặp điều kiện thuận lợi nang xác này sẽ nứt ra và tạo thành các tế bào mới, vi khuẩn *Azotobacter* thích ứng với pH 7,2 – 8,2, nhiệt độ 28 – 30<sup>0</sup>C, độ ẩm 40 – 60%. *Azotobacter* đồng hóa tốt các loại đường đơn và đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucozo nó có khả năng đồng hóa được 8 – 18 mg N. Ngoài ra *Azotobacter* còn có khả năng tiết ra một số vitamin thuộc nhóm B như B1, B6..., một số acid hữu cơ như: acid nicotinic, acid pentotenic, biotin, auxin.

Các tác giả Maryenko (1964) [67] và Arun (2007) nghiên cứu cho rằng, mật độ vi khuẩn *Azotobacter* trong vùng gần rễ của cây trồng có mật độ cao hơn các vùng đất hoang. Họ đã phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật cố định nitơ tạo phân bón sinh học bón cho cây trồng như lúa, ngô, mía và rau. Kết quả thu được rất khả quan về sự tổng hợp nitơ từ khí quyển của các loại cây trồng này, qua đó đã thúc đẩy sự tăng trưởng của các loại cây trồng. Ngoài ra, tác giả còn khẳng định rằng, các loại phân bón sinh học có khả năng tổng hợp nitơ rất ổn định, không gây hại cho môi trường và đảm bảo chất lượng nông sản sạch.

Cây họ đậu có khả năng phục hồi và duy trì độ phì của đất, đã được con người biết đến từ rất lâu. Đặc tính quý giá của cây họ đậu có được là do cây có khả năng cộng sinh với một loại vi khuẩn sống trong nốt sần của rễ cây. Năm 1868 nhà khoa học người Hà Lan M.W. Beijerinck đã phân lập

được vi khuẩn sống cộng sinh trong nốt sần cây họ đậu, ông đặt tên là *Bacillus Radicola*. Cuối năm 1889 nhà khoa học người Đức B. Fank đề nghị đổi tên vi khuẩn này là *Rhizobium* thuộc chi *Rhizobium*. Loại vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí trời thành đạm hợp chất. Trong quá trình cộng sinh với cây họ đậu, vi khuẩn cung cấp hợp chất đạm cho đất và cây, còn cây cung cấp các sản phẩm quang hợp cho vi khuẩn. Hàng năm vi khuẩn nốt sần của cây họ đậu cung cấp cho đất khoảng 80 triệu tấn đạm, tương đương với lượng phân đạm hóa học mà các nhà máy trên thế giới sản xuất ra cùng thời điểm. Khả năng làm giàu đạm cho đất tùy thuộc vào các loại cây đậu đỗ: Như cây đậu đũa, cây đậu răng ngựa cố định được 45 - 552 kg N/ha/năm, cây Đậu Hà Lan cố định được 52 - 77 kg N/ha/năm, cây Đậu xanh cố định được 63 - 342 kgN/ha/năm, cây Đậu tương cố định được 179kgN/ha/năm, cây Medicago cố định được 504 kgN/ha/năm. Chế phẩm vi khuẩn nốt sần đã được sản xuất từ rất lâu trên thế giới. Năm 1896 ở Đức lần đầu tiên chế ra loại chế phẩm gọi là Nitrazin, ở Mỹ sản xuất ra chế phẩm "Nitroculture", ở Anh sản xuất loại chế phẩm Nitrobacterin. Tới nay hầu hết các nước đều sử dụng chế phẩm vi khuẩn nốt sần cho cây họ đậu, đặc biệt là cây đậu tương. Ngoài ra, còn có một số vi sinh vật khác cũng có khả năng cố định đạm khí trời khi sống cộng sinh với thực vật, đó là vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) cộng sinh với bèo hoa dâu có khả năng cố định được 20 - 30 kgN/ha/vụ ở lúa ngập nước. Bên cạnh đó còn có một số loài *Frankia* (xạ khuẩn) sống cộng sinh với 7 họ bao gồm 160 loài thực vật thân gỗ cũng hình thành nốt sần và có khả năng cố định đạm khí trời.

Nhà bác học người Nga Vinogradskii (1939) đã phân lập tuyển chọn được một loài vi khuẩn yếm khí, có khả năng cố định nitơ phân tử cao, tác giả đặt tên cho loài vi khuẩn này là vi khuẩn *Clostridium*. Vi khuẩn *Clostridium* đồng hóa tốt tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ, cứ 1 gam đường gluco thì đồng hóa được 5 - 12 mgN, đây là loài trực khuẩn gram dương, kích thước tế bào dao động 0,7 - 1,3 x 2,5 - 7,5 ( $\mu\text{m}$ ) khuẩn lạc thuộc nhóm S, màu

trắng đục, lồi, nhày. Vi khuẩn *Clostridium* ít mẫn cảm với môi trường, nhất là môi trường thừa P, K, Ca và có tính ổn định với pH, nó có thể phát triển ở pH 4,5 – 9, độ ẩm thích hợp 60 – 80%, nhiệt độ 25-30<sup>0</sup> C. Vi khuẩn *Clostridium* có rất nhiều loài khác nhau: *Clostridium butyrium*; *Clostridium beijerinckii*; *Clostridium pectinovorum*...

Theo Timmusk (1999) [80]; vi khuẩn *Paenibacillus* được phân lập trong rễ cây và trong đất có khả năng cố định nitơ tự do, thúc đẩy kích thích tăng trưởng thực vật sản xuất enzym thủy phân, sản xuất thuốc kháng sinh chống lại vi sinh vật gây hại cho con người và gây bệnh thực vật. Ngoài ra nó cũng có thể giúp cây hấp thu phốt pho và tăng cường độ xốp đất, vi khuẩn này có một vai trò quan trọng trong hệ sinh thái và tiềm năng trong công nghiệp.

Huo và đồng tác giả (2010) [50] cho rằng, vi khuẩn *Paenibacillus* là một loại vi khuẩn cố định đạm gram dương, kỵ khí, có kích thước bào tử 0,6 - 3,0 µm là một loại vi khuẩn chịu nhiệt độ cao có thể ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh vật bón cho các vùng khí hậu có nhiệt độ cao và đất cằn cỗi. Sartaj và Wani (2012) [73] đã nghiên cứu và cho rằng, vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* là thành phần không thể thiếu giúp cho sự màu mỡ của đất, chúng như những nhà máy nhỏ tổng hợp nitơ, auxin, cytokinin và các chất GA nhờ đó tăng sinh trưởng và năng suất cây trồng nông sản rất đáng kể. Khi nuôi cấy vi khuẩn *A. chroococcum* ở 28<sup>0</sup>C thì khả năng tổng hợp nitơ là lớn nhất. Tuy nhiên ở nhiệt độ 15<sup>0</sup>C - 25<sup>0</sup>C chủng vi khuẩn này vẫn có khả năng tổng hợp nitơ nhưng không cao. Khi ở nhiệt độ thấp 10<sup>0</sup>C - 15<sup>0</sup>C chủng vi khuẩn trên tổng hợp nitơ rất kém.

#### **1.1.6. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp.**

Phân bón vi sinh được sản xuất đầu tiên tại Đức từ những năm 1896 và đặt tên là Nitragin. Những năm sau việc sản xuất phân vi sinh được phát triển ở một số nước như ở Mỹ (1986), Canada (1905), Anh (1910) và Thụy điển (1914), những năm sau đó một số loại chế phẩm như *Rhizobium* cũng được phát triển. De và đồng tác giả (1988) [40] đã sản xuất chế phẩm nấm cộng

sinh dưới dạng viên nén bằng bào tử của các loại nấm *P. tinctorius* và *Scleroderma* spp, để nhiễm cho các loài cây lá kim và các loài thông, kết quả rất rõ khi đường kính của các cây con được nhiễm chế phẩm tăng hơn so với đối chứng là 75% sau 16-18 tháng tuổi.

Nhà nghiên cứu người Nam Phi Lubanza và đồng tác giả (2013) [61] cho rằng chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp bao gồm *Azospirillum* và *Rhizobium* có khả năng thúc đẩy sự phát triển và tăng sản lượng của cây trồng. Chế phẩm hỗn hợp vi sinh vật này có thể được sử dụng như phân bón hoá học, ngoài ra chúng không có ảnh hưởng xấu đến môi trường. Ứng dụng chế phẩm hỗn hợp vi sinh vật này giảm thiểu việc sử dụng phân bón hoá học, loại chế phẩm này đã được sử dụng thương mại ở một số nước phát triển.

Olubukola và Bernard (2012) [70] hai nhà khoa học người Mỹ đã nghiên cứu chế phẩm hỗn hợp các loài vi sinh vật khác nhau tạo phân bón. Phân bón hỗn hợp vi sinh vật gồm vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật, vi sinh vật đối kháng bệnh và vi khuẩn chống lại sự xâm hại của sâu bệnh. Tuy nhiên chế phẩm vi sinh vật này đang tìm cách tiếp cận thị trường, tác giả cũng đưa ra một số ví dụ về sự thành công khi sử dụng chế phẩm, ngoài ra, chế phẩm cũng được bàn cãi đến việc hợp tác quốc tế để sản xuất các loại chế phẩm sinh học không gây hại môi trường.

#### **1.1.7. Nghiên cứu về gieo trồng Thông nhựa.**

Thông nhựa có vùng phân bố khá rộng, từ miền Nam Trung Quốc, Lào, Campuchia, Thái Lan, Phillipin đến Indonesia và miền Đông Myanmar. Chúng được trồng từ rất lâu ở nhiều nước thuộc khu vực Đông Nam Á như Việt Nam, Lào, Campuchia, Philippines, Malaysia và Indonesia. Các nghiên cứu cho rằng, Thông nhựa thường phân bố ở phía nam đường xích đạo, trong dãy Barisian Sumatra, nó được tìm thấy ở độ cao 800-2000m, ở các vùng thảo nguyên, rừng cây lá rộng tái sinh sau khi bị người dân bản địa đốt. Các khu rừng Thông nhựa phát triển tốt nhất được tìm thấy xung quanh Hồ Toba ở miền Bắc. Thông nhựa còn là loài cây ưa sáng chịu

nhệt độ cao và chịu hạn tốt, chúng phát triển tốt trên cả đất cát và đất đỏ, tái sinh tự nhiên tốt, đặc biệt là khu vực rừng bị tàn phá do đốt. Ở Việt Nam, cây Thông nhựa là loài cây chủ yếu được trồng trên khu vực đất trống, đồi núi trọc hoặc rậm rạp, rừng Thông nhựa, có khả năng bảo vệ môi trường, chống xói mòn và sạt lở đất. Các nghiên cứu cho rằng trong 5 năm đầu cây Thông nhựa sinh trưởng chậm, sau đó sinh trưởng rất nhanh và sau 15 năm có thể thu hoạch nhựa.

Pousujja và đồng tác giả (1986) [71] tại Đan Mạch, nghiên cứu về bảo quản hạt giống, gieo ươm và trồng cây Thông nhựa ở khu vực châu Á. Hạt Thông nhựa thu về cần bảo quản lạnh, hạt có thể bảo quản lạnh được 2-3 năm, tác giả cho rằng, cây Thông nhựa phù hợp với những vùng đất khô bạc màu, độ ẩm thấp. Tại Indonesia, Hidayat và Christian (2003) [49], đã nghiên cứu về gieo ươm cây Thông nhựa ở vườn ươm, kết quả sau khi gieo ươm khoảng 7 ngày hạt giống bắt đầu nảy mầm, sau 12 – 15 ngày thì 80% số hạt giống đã nảy mầm hết, cây cao khoảng 5-7 cm cấy cây vào bầu. Khi gieo ươm cây trong vườn ươm, nhóm nghiên cứu có sử dụng nấm ngoại cộng sinh bón cho cây, sau thời gian 12- 18 tháng, lúc đó cây Thông nhựa đủ tuổi để đưa đi trồng rừng.

Theo Jungh (2012) [55], diện tích rừng Thông nhựa đang bị thu hẹp bởi bị tàn phá để trồng cây nông nghiệp. Chính phủ Ấn Độ có cảnh báo rằng, Thông nhựa là loài cần được bảo tồn và gây trồng rộng, với lợi ích sinh thái về bảo vệ môi trường mà rừng Thông nhựa mang lại, đặc biệt là rừng Thông nhựa khu vực ở Arunachal Pradesh, Ấn Độ đang bị cảnh báo nguy cơ mất rừng.

Những năm gần đây, Trung tâm nghiên cứu Lâm nghiệp quốc tế (CIFOR) thực hiện nghiên cứu lập địa và quản lý rừng trồng, trong đó có nghiên cứu quản lý lập địa rừng trồng thông nhựa. Các nghiên cứu được tiến hành ở các nước như Brazil, Công Gô, Nam Phi, Indonesia, Trung Quốc, Ấn Độ và Việt Nam. Kết quả cho rằng biện pháp xử lý lập địa khác nhau và các loại cây trồng khác nhau đã có ảnh hưởng rất khác nhau đến độ phì của đất,



trong đó xử lý lập địa để trồng cây thông nhựa khác nhau thì độ phì của đất rừng Thông nhựa khác nhau, năng suất rừng trồng Thông nhựa phụ thuộc lớn vào các biện pháp lâm sinh và xử lý lập địa khác nhau. Ngoài ra khi nhân giống gây trồng Thông nhựa nhiều nước đã sử dụng các loại nấm cộng sinh như *P. tinctorius*, *Boletus granulatus*, *Scleroderma* spp., *Thelephora terrestris*, *Cenococum graniforme*, *Amantita* spp., và *Rhizopogon* spp.... gây nhiễm vào đất ươm hạt, cây con sẽ có bộ rễ tốt và sinh trưởng nhanh.

## 1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU Ở TRONG NƯỚC

### 1.2.1. Nghiên cứu về nấm cộng sinh.

Phạm Quang Thu (2004) [26], chế phẩm nấm cộng sinh đã được thử nghiệm cho cây thông con, bạch đàn, keo, phi lao ở vườn ươm và cho thông ở rừng trồng bước đầu đã có kết quả tốt. Có khoảng hơn 1000 ha rừng trồng thông nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh tại một số khu vực thuộc tỉnh Bắc Giang và Lạng Sơn thuộc Công ty Lâm nghiệp Đông Bắc, cũng cho kết quả khả quan. Nhưng chế phẩm này còn ở dạng thô và chưa tổng hợp nhiều chủng vi sinh vật có ích.

Phạm Quang Thu và Đặng Như Quỳnh (2007) [28], đã điều tra thu thập được 33 loài nấm ngoại cộng sinh với thông và bạch đàn trong đó: có 16 loài cộng sinh với thông; 14 loài cộng sinh với bạch đàn và 3 loài cộng sinh với cả thông và bạch đàn. Đã phân lập thành công 16 loài trong đó: 7 loài cộng sinh với thông; 6 loài cộng sinh với bạch đàn; 3 loài cộng sinh với thông và bạch đàn.

Phạm Quang Thu và Đặng Như Quỳnh (2008) [29], đã nghiên cứu nấm cộng sinh với cây Bạch đàn, các tác giả cho rằng, có khoảng 400 loài nấm cộng sinh với Bạch đàn, tuy nhiên không phải lúc nào đất trồng rừng cũng có sẵn nấm ngoại cộng sinh thích hợp với Bạch đàn. Do đó các tác giả cần nghiên cứu tuyển chọn loài nấm cộng sinh tốt nhất. Theo đó tác giả đã tìm ra 4 loài sinh trưởng nhanh, 8 loài sinh trưởng trung bình và sinh trưởng chậm có 3 loài. Loài có sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất là *Macrolepiota rhacodes*; loài mọc chậm nhất là *Tricholoma ustale*; hầu hết các sợi nấm phân lập được đều mọc ở mức độ trung bình.

Trong giai đoạn 1970 đến 1985, Nguyễn Sỹ Giao và đồng nghiệp đã nghiên cứu tập trung chủ yếu về thành phần loài nấm cộng sinh đối với các loài thông. Tác giả đã nghiên cứu, chế phẩm nấm cộng sinh để nhiễm cho cây con ở vườn ươm chống bệnh vàng còi, có hiệu quả nhất định nhưng chưa thực sự sản xuất được chế phẩm ở dạng thương phẩm để gieo ươm hay gây trồng thông. Nấm cộng sinh cây thông có một vai trò hết sức quan trọng, đã được các nhà quản lý quan tâm từ rất sớm, 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. Khi gieo ươm thông tại vườn ươm, 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 lấy nguồn nấm cộng sinh có trong tự nhiên. Việc làm này như xem đơn giản, song nó cũng gây ra nhiều 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, chi phí rất lớn và gây ô nhiễm môi trường.

### **1.2.2. Nghiên cứu về VSV nội sinh sinh tổng hợp IAA kích thích tăng trưởng.**

Nguyễn Kim Anh và đồng tác giả (2008) [1], đã nghiên cứu phân lập được 8 chủng vi khuẩn *Azotobacter* từ 30 mẫu đất. Trong đó có 6 chủng có hoạt tính sinh tổng hợp IAA, chủng BK5 sinh tổng hợp IAA mạnh nhất lên tới 4,313 $\mu$ g/ml sau 3 ngày nuôi cấy và lên tới 6,24 $\mu$ g/ml sau 5 ngày nuôi cấy, ở nhiệt độ 28 – 30<sup>0</sup> C, lắc 200 vòng/ phút. Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành (2011) [15] đã phân lập vi sinh vật nội sinh từ cây mía có khả năng sinh IAA. Trong số 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. và 14 dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. đã được khảo sát thì có 2 dòng vi khuẩn A1 và G10 vừa có khả năng tổng hợp IAA vừa có khả năng cố định đạm đạt ở mức cao. Lượng IAA của dòng A1 đạt 17,748  $\mu$ g/ml; G10 đạt 2,710  $\mu$ g/ml và lượng đạm A1 đạt 8,098  $\mu$ g/ml; G10 đạt 8,772  $\mu$ g/ml. Trần Thanh Phong và Cao

Ngọc Diệp (2011) [16] đã phân lập được 49 dòng vi khuẩn nội sinh trên cây dứa, tuyển chọn được 9 dòng đều có 3 đặc tính tốt như cố định đạm, khả năng phân giải lân và sinh tổng hợp IAA. Nguyễn Thị Huỳnh Như và đồng tác giả (2013) [16] đã nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh trên cây chuối có khả năng sinh IAA. Trong khi đó các dòng vi khuẩn trên môi trường NFb cho kết quả tổng hợp IAA tốt hơn, hai dòng D1 và D5 cho kết quả cao nhất với nồng độ IAA lần lượt là 3,16 µg/ml và 3,07 µg/ml. So sánh mức độ tương đồng chuỗi nucleotide 16S rDNA, dòng N12 được xác định là vi khuẩn *Achromobacter* sp. với độ tương đồng 97%, dòng D1 là loài *Pseudomonas aeruginosa* với độ tương đồng 94%.

### **1.2.3. Nghiên cứu về vi sinh vật phân giải phốt phát**

Ở Việt Nam đã nghiên cứu về các VSV phân giải phốt phát như: Phạm Văn Toàn và đồng tác giả từ năm 1996 đến năm 1998, đã phân lập được 100 chủng có hoạt tính phân giải lân. Bón phân hữu cơ vi sinh vật làm cây sinh trưởng tốt hơn, làm tăng năng suất lúa 21,6% và đối với lạc là 23,7% [31]. Theo Phạm Văn Toàn và cộng sự (2004) [32] vi khuẩn nốt sần có tác dụng nâng cao năng suất lạc vỏ 13,8-17,5% ở các tỉnh phía Bắc và miền Trung. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sử dụng phân vi khuẩn nốt sần kết hợp với lượng đạm khoáng tương đương 30-40 kgN/ha mang lại hiệu quả kinh tế cao, năng suất lạc đạt trong trường hợp này có thể tương đương như khi bón 60 và 90 kgN /ha. Hiệu lực của phân vi khuẩn nốt sần thể hiện đặc biệt rõ nét trên vùng đất nghèo dinh dưỡng và vùng đất mới trồng lạc. Lợi nhuận do phân vi khuẩn nốt sần xác định đạt tăng 9,8 lần.

Phạm Việt Cường (2004) [2] đã phân lập được 80 chủng vi khuẩn phân giải lân trong đó có 24 chủng có khả năng phân giải phốt phát mạnh (đường kính vòng phân giải >10mm chiếm 30%), 34 chủng có khả năng phân giải phốt phát trung bình (đường kính vòng phân giải từ 6 – 10 mm chiếm 42,5%) và 22 chủng có khả năng phân giải phốt phát yếu (đường kính vòng phân giải dưới 5,5 mm chiếm 27,5%). Tác giả đã nghiên cứu sản xuất phân

bón vi sinh vật đa chủng (có vi sinh vật phân giải photphát) kết quả cho thấy đạm hữu cơ,  $P_2O_5$  dễ tan và  $K_2O$  dễ tan đều tăng lên sau 2 năm thí nghiệm. Cây cà phê có tốc độ tăng trưởng chiều dài cành, đường kính cành nhanh hơn, cặp lá hình thành nhiều hơn, hạn chế quả rụng, quả một nhân và tỷ lệ tươi/nhân thấp. Phạm Văn Toàn và đồng tác giả từ năm 1996 đến năm 1998, đã phân lập được 100 chủng có hoạt tính phân giải lân. Bón phân hữu cơ vi sinh vật làm cây sinh trưởng tốt hơn, làm tăng năng suất lúa 21,6% và đối với lạc là 23,7%.

Nguyễn Thị Thúy Nga và Phạm Quang Thu (2009) [14] với 30 mẫu đất rừng thu được ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam đã phân lập được 30 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải lân. Trong đó có 15 chủng có hiệu lực phân giải lân rất cao, chiếm 50% tổng số chủng phân lập được. Các chủng  $PGL_{RH3}$ , P9.2, P1.4, P1.1, có đường kính vòng phân giải photphát cao (có đường kính vòng phân giải > 2,2 cm). Kết quả phân tích định lượng cũng cho thấy chủng  $PGL_{RH3}$  có khả năng phân giải photpho dễ tiêu lớn nhất, tới 497.62ppmP, gấp khoảng 12 lần so với đối chứng. Sau đó là các chủng P1.4, P1.1, P7.1 phân giải được lượng photpho > 420ppmP. Định danh được 3 chủng, P1.1, P1.4 và  $PGL_{RH3}$  trong đó có 2 chủng trùng nhau đó là chủng P1.1, P1.4 là loài *Burkholderia cenocepacia*,  $PGL_{RH3}$  là loài *Burkholderia tropicalis*.

#### **1.2.4. Nghiên cứu về VSV đối kháng với nấm gây bệnh**

Phạm Văn Mạch (1991) [18] đã sử dụng các chủng *Tricoderma* spp. và xạ khuẩn *Streptomyces* spp. để phòng chống bệnh thối cổ rễ cây thông con ở vườn ươm. Các chủng nấm và xạ khuẩn được phân lập từ đất. Phạm Quang Thu và Trần Thanh Trắng (2002) [25] đã phân lập và tuyển chọn VK đối kháng với nấm gây bệnh cây thông con ở vườn ươm, với 12 loài cây dùng làm mẫu để phân lập VK đã phân lập được 70 chủng VK khác nhau và đã tuyển chọn được 11 chủng VK có hiệu lực đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ *F. oxysporum*. Các nhà khoa học thuộc lĩnh vực bảo vệ thực vật đối với các cây trồng nông nghiệp đã thu được những kết quả đáng khích lệ

trong việc phân lập và tuyển chọn các vi sinh vật có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh héo xanh các cây: lạc, cà chua, đậu... và một số nấm bệnh hại cây bông và một số loài nấm bệnh khác.

Nguyễn Thị Thúy Nga và Phạm Quang Thu (2006) [12] đã dùng nấm *Colletotrichum truncatum* thử nghiệm diệt trừ cỏ ngoại lai xâm hại rừng tại phòng thí nghiệm. Tác giả đã sử dụng bào tử vô tính nấm *C. truncatum* nồng độ  $10^4$ - $10^6$  bào tử /1ml dung dịch có khả năng gây bệnh cho Cỏ lào và cây Mai dương trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau 48 giờ nhiễm nấm, 100% cây bị bệnh và trên 50% diện tích lá bị chết hoại đối với Cỏ lào và gần 100% diện tích lá bị chết hoại đối với cây Mai dương.

Nguyễn Thị Thúy Nga và Phạm Quang Thu (2006) [13], cũng đã phân lập được 56 chủng vi khuẩn khác nhau từ 10 loài cây gỗ và đã tuyển chọn được 12 chủng VK có khả năng sinh kháng sinh ức chế sự phát triển của nấm gây bệnh sọc tím Luồng. Tùy thuộc vào đặc điểm của mỗi chủng mà có phương thức ức chế nấm bệnh khác nhau. Có chủng VK mọc trùm lên sợi nấm tiêu diệt hoàn toàn sợi nấm cũng có chủng tạo nên các vòng kháng nấm hiệu lực diệt nấm càng cao khi đường kính vòng kháng nấm càng lớn. Nguyễn Hoàng Nghĩa và Phạm Quang Thu (2006) [17] đề cao vai trò của vi khuẩn nội sinh cây keo lai trong việc kích kháng bệnh loét thân cành cây keo lai do nấm *Colletotrichum gloeosporioides*.

Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thúy Nga (2007) [27] đã phân lập được 113 chủng VK từ 15 mẫu bạch đàn không bị bệnh, trong đó có 22 chủng có đặc điểm hoàn toàn khác nhau. Tuyển chọn được 5 chủng VK có khả năng đối kháng với nấm *Cryptosporiopsis eucalypti* gây bệnh đốm lá bạch đàn, đường kính vòng ức chế từ 20,03 mm đến 22,0 mm. Vũ Văn Định (2009) [4] đã phân lập được 30 chủng khuẩn nội sinh cây keo lai ở 5 cấp bệnh khác nhau, trong đó có 3 chủng khuẩn đối kháng với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* đó là chủng BO3, PO1, XO2. Trong quá trình nghiên cứu sử dụng vi sinh vật nội sinh để tăng cường tính kích kháng đối với

bệnh khô cành ngọn Keo tai tượng, Vũ Văn Định (2012, 2014) [5], [6], đã phân lập được 40 chủng vi sinh vật nội sinh có khả năng kháng nấm *C. gloeosporioides*. Từ kết quả thử hiệu lực các chủng vi sinh vật nội sinh với nấm khô cành ngọn keo lai *C. gloeosporioides*, tác giả đã chọn được 5 chủng có hiệu lực kháng nấm rất mạnh, (P01, KPT, LC, X02, B03), các chủng này đều có vòng ức chế lớn hơn 20 mm.

Lê Như Kiều và đồng tác giả (2010) [8], phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra bệnh héo xanh lác và vùng để sản xuất các chế phẩm vi sinh đối kháng ứng dụng trong sản xuất lác và vùng. 10 chủng vi khuẩn phân lập và tuyển chọn được có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum*, an toàn đối với cây trồng và động vật máu nóng. Trong đó, chủng CX5 thuộc chi *Bacillus* và PX1 thuộc chi *Pseudomonas* vừa có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn do *R. solanacearum* trên cả lác và vùng. Chủng CX5 làm giảm tỉ lệ vùng chết héo là 66.64% và lác là 74.41% so đối chứng; với chủng vi khuẩn PX1 tỉ lệ này là 71.31% và 61.3%, vừa có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng, do đó chúng có tiềm năng cao trong sản xuất chế phẩm vi sinh đối kháng. Cũng theo Lê Như Kiều và đồng tác giả (2011) [10], đã tuyển chọn được 06 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat là TC1, QN1, MS1, YC1, MI2; các chủng này đều có độc tính cao, gây chết 100% cây cao su trong điều kiện thí nghiệm nhà lưới; hai chủng vi khuẩn C6 là *Bacillus subtilis* và S1 là *Bacillus amyloliquefaciens* đảm bảo an toàn sinh học và có khả năng đối kháng với 06 chủng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat đã chọn, đường kính vòng ức chế tương ứng từ 13-15 mm và 14 -16 mm. Chủng vi khuẩn C6 và S1 có khả năng làm giảm tỉ lệ chết cây cao su vườn ươm từ 100% xuống còn 10,8% và 15,5% trong điều kiện nhà lưới.

#### **1.2.5. Nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ tự do.**

Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không chỉ với cây trồng mà ngay cả đối với vi sinh vật, nguồn dự trữ nitơ trong tự nhiên rất lớn chỉ tính riêng trong không khí nitơ chiếm khoảng 78,16% thể tích. Người ta ước tính

trong bầu không khí bao trùm lên 1ha đất đai chứa khoảng 8 triệu tấn nitơ, lượng nitơ này có thể cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng hàng chục triệu năm nếu như cây trồng đồng hóa được chúng. Trong cơ thể các loại vi sinh vật chứa khoảng 4,1015 tỷ tấn nitơ. Cây trồng cũng như các loại động vật và người không có khả năng đồng hóa trực tiếp nguồn nitơ tự do từ không khí nhưng tất cả nguồn nitơ trên cây trồng đều không tự đồng hóa được mà phải nhờ vi sinh vật. Hàng năm, cây trồng lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitơ, bằng cách bón phân con người đã trả lại cho đất khoảng hơn 40%, lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitơ do hoạt động sống của vi sinh vật. Ở nước ta phân bón vi sinh đã được nghiên cứu từ những năm 1960, tuy nhiên lượng phân bón vi sinh được sản xuất những năm sau này chưa đáp ứng được nhu cầu của sản xuất.

Lai Chí Quốc và đồng tác giả (2012) [23] đã tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn cố định đạm (có khả năng hoà tan photphát và kali) được phân lập từ vật liệu phong hoá của vùng núi đá hoa cương tại núi cấm, tỉnh An Giang. 28 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Aleksandrov từ hai mươi mẫu vật liệu phong hoá của đá hoa cương đều có khả năng tổng hợp ammonium trong môi trường Burk's, trong đó có 5/28 dòng tổng hợp  $\text{NH}_4$  cao. Hỗn hợp vi sinh vật của một số dòng như, *Rhizobium tropici*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium multihospitium* đã giúp cho các loài như hành lá và mồng tơi phát triển chiều cao, tăng trọng lượng và năng suất.

Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp (2012) [21], đã phân lập và mô tả đặc điểm hình thái của 31 chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ cây ngô trên môi trường không có đạm Nfb. Cả 31 chủng phân lập được đều có khả năng sinh tổng hợp IAA, tuyển chọn được 9 chủng có phản ứng tốt với sự sinh trưởng, tích lũy chlorophyll, N, P và dương tính với gen nifH (C6, C10, C13, C14, C18, C23, C29, C30, C31). Trong số đó đã giải trình tự gen 16S được 3 chủng C14, C23, C31 là những chủng cho hoạt tính cố định đạm, khả năng sản xuất IAA cao và dương tính với gen nifH đó là các chủng

*Pseudomonas nitroreducens* C14, *Burkholderia cenocepacia* C23, *Pseudomonas entomophila* C31. Khi nhiễm các chủng này vào hệ rễ cây làm tăng số lá 23 – 33%; chiều dài lá 18,8 – 38,5%, chiều cao cây 29,5 – 44,2%; đường kính gốc thân 24,3 – 31,5%; chiều dài rễ 24,2 - 25,9%; khối lượng rễ 21,9 – 27%; sinh khối tươi 41,8-53,5%, sinh khối khô 48,8 – 58,8% ; tích lũy diệp lục tổng số tăng 69,4 - 84,9%; tích lũy N trong lá tăng 35,4 – 54,2%; tích lũy P tăng 30,5 – 36,1% so với đối chứng.

Đinh Thuý Hằng và Trần Triết (2009) [7] đã nghiên cứu quá trình cố định nitơ trong rừng ngập mặn Cần Giờ có sự tham gia của các vi sinh vật, các tác giả cho rằng, trầm tích trong rừng ngập mặn thường bị hạn chế về nitơ và photpho. Nitơ ở dạng khí hoà tan là nguồn dự trữ lớn tại vùng sinh thái này, do vậy các vi sinh vật cố định nitơ có vai trò vô cùng quan trọng ở đây. Tại rừng ngập mặn Cần Giờ đã xác định được hàm lượng nitơ tổng số cao nhất ở 2-3 cm bề mặt trầm tích và giảm dần theo độ sâu, thể hiện sự đóng góp của nitơ rửa trôi từ đất liền đối với trầm tích bề mặt và vai trò của vi sinh vật cố định nitơ bản địa trong việc duy trì nguồn nitơ ở lớp trầm tích dưới bề mặt. Thông qua phương pháp khử acetylene, nitrogenase được xác định hầu như không có hoạt tính ở trầm tích bề mặt mà tập trung chủ yếu ở độ sâu dưới 5 cm, là nơi có môi trường thiếu ôxy. Phân tích gen xác định mức độ đa dạng cao của VSV cố định nitơ ở cả lớp trầm tích bề mặt và lớp trầm tích sâu dưới 5 cm, trong đó các nhóm vi khuẩn kỵ khí như *Desulfovibrio* hay *Geobacter* chiếm ưu thế. Điều này cho thấy sự khác biệt rõ rệt của quần thể VSV cố định nitơ ở rừng ngập mặn so với các vùng rễ lúa hay các cây họ đậu, nơi có các loài hiếu khí (*Rhizobium*, *Agrobacter* ...) chiếm ưu thế.

#### **1.2.6. Sử dụng chế phẩm vi sinh vật hỗn hợp.**

Phân bón vi sinh là các sản phẩm có chứa vi sinh vật ở dạng đang hoạt động hoặc ở dạng ngủ, các sản phẩm này thường chứa các vi sinh vật có ích như có khả năng cố định đạm, phân giải photphát, kích thích tăng trưởng



thực vật. Phạm Quang Thu (2004) [26] nghiên cứu chế phẩm hỗn hợp bao gồm bào tử hữu tính nấm *P. tinctorius* và một số vi sinh vật chức năng khác. Chế phẩm dạng này đã được một số cơ sở sản xuất mua và sử dụng nhằm cho bạch đàn PN<sub>2</sub> gây trồng trên các lập địa thoái hoá, rất nghèo chất dinh dưỡng, cho kết quả sinh trưởng về đường kính và chiều cao khác biệt rõ rệt với công thức đối chứng. Hiện nay có khoảng hơn 1000 ha bạch đàn được nhiễm chế phẩm nấm cộng sinh trồng tại một số khu vực thuộc công ty Lâm nghiệp Đông Bắc ở tỉnh Bắc Giang và Lạng Sơn. Phạm Quang Thu (2011) khi đánh giá hiệu quả của phân bón hỗn hợp (trong đó có vi khuẩn phân giải phốt phát) kết quả thu được 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; còn đối với Keo tai tượng chiều cao tăng 1,6 lần, đường kính cổ rễ tăng 2 lần, trọng lượng khô tăng 1,6 lần. Ngoài ra tạo được mối quan hệ giữa cây chủ và VK giúp cho cây kháng bệnh tốt hơn. Riêng đối với Thông caribe chế phẩm hỗn hợp có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và tỷ lệ bị bệnh: chiều cao tăng gấp 1,2 lần, tỷ lệ bị bệnh giảm từ 30% xuống còn từ 2- 3%.

Theo Phạm Văn Toàn và đồng tác giả (2004) [32]. Kết quả thử, khảo nghiệm cho thấy phân VSV đa chủng, chức năng có khả năng gia tăng sinh khối và năng suất cây trồng Nông nghiệp. Sự tăng năng suất được xác nhận ngay cả khi giảm 10-30% lượng dinh dưỡng khoáng N,P. Số liệu tổng kết kết quả khảo nghiệm đồng ruộng diện rộng và mô hình trình diễn tại một số địa phương cho thấy phân VSV đa chủng chức năng có khả năng gia tăng sinh khối và năng suất cây trồng. Sự tăng năng suất được xác nhận ngay cả khi giảm một phần dinh dưỡng khoáng (N,P). Kết quả khảo nghiệm cũng xác định phân vi sinh vật đa chủng không những đem lại lợi ích về mặt cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng mà còn có tác dụng tích cực trong việc hạn chế bệnh vùng rễ ở các cây trồng thử nghiệm. VSV chức năng có tác dụng tăng năng suất và giảm tỷ lệ bệnh vùng rễ trung bình 36,58% và 77,48% đối với

khoai tây; 19,7 3 % và 62,57% đối với lạc, 16,42% và 77,63% đối với cà chua, tăng 13,5% năng suất đối với tiêu.

Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thuý Nga (2011) [30] đã nghiên cứu sử dụng vi sinh vật và cây che phủ nhằm nâng cao năng suất của cây Keo lai và cải tạo đất sau luân kỳ bạch đàn. Kết quả bón lót 20g vi sinh + trồng cốt khí, Keo lai cho đường kính tại vị trí 1,3m của cây Keo lai tăng 22%, chiều cao vút ngọn của cây Keo lai tăng khoảng 12%, tỷ lệ sống đạt 98%. Độ pH đất trở lại trung tính, hàm lượng mùn tăng từ 2 đến 3 lần, hàm lượng lân tổng số tăng gấp 2 lần, lượng đạm tổng số tăng 3 lần. Tăng 4 chủng vi sinh vật cố định nito với mật độ bào tử tăng từ  $2 \times 10^2$  đến  $6 \times 10^4$  CFU/1 gam đất. Vi sinh vật phân giải lân tăng 2 chủng với mật độ bào tử tăng từ  $2 \times 10^2$  đến  $8 \times 10^4$  CFU/1 gam đất. Mật độ bào tử chủng vi nấm tăng từ  $8 \times 10^2$  đến  $6 \times 10^5$  CFU/1 gam đất, với số lượng tăng 3 chủng. Các chủng xạ khuẩn tăng 3 chủng với mật độ bào tử tăng từ  $1,3 \times 10^2$  đến  $8 \times 10^5$  CFU/1 gam đất. Tăng 7 chủng vi khuẩn với mật độ bào tử tăng từ  $1 \times 10^3$  đến  $2,5 \times 10^7$  CFU/1 gam đất. Phạm Quang Thu và đồng tác giả (2010) sản xuất chế phẩm viên nén MF1 và MF2, khi bón 40g MF1 cho cây thông ở rừng trồng kết quả tăng chiều cao là 16% và đường kính là 40% so với đối chứng, bón 40g chế phẩm MF2 cho cây bạch đàn ở rừng trồng kết quả tăng chiều cao 55% và đường kính 38% so với đối chứng. Ở cả 2 loại chế phẩm đều giảm tỷ lệ bị bệnh của cây trồng.

Lê Như Kiều và đồng tác giả (2011) [9] nghiên cứu, tổ hợp của các chủng VSV để sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho cây chè. Kết quả thu được 4 chủng vi sinh vật có ích và an toàn sinh học, đó là các chủng A11 có khả năng cố định nito, chủng KT7 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, chủng PI6 có khả năng phân giải lân, chủng ĐK 14 có khả năng ức chế nấm gây bệnh thối cổ rễ. Chế phẩm vi sinh vật đa chủng đã làm giảm tỷ lệ chết ở cây chè lên đến 50,6%.

Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp (2011) [20] bón phân hữu cơ – vi sinh bổ sung 150 kg N/ha cải thiện năng suất, chất lượng Cây Dứa và cả hàm lượng dưỡng chất trong đất tương đương với bón 300 kg N/ha. Phân hữu cơ – vi sinh không những tạo thành một lớp thực bì vừa hạn chế bốc thoát nước, giữ ẩm vào mùa khô vừa hạn chế độc tính của đất phèn mà còn là loại phân bón tốt cho cây Dứa, tiết kiệm được 50% lượng phân đạm hóa học và cải thiện năng suất cây Dứa.

Lê Như Kiều và đồng tác giả (2012) [11] cũng nghiên cứu phân vi sinh đa chức năng cho cây cao su kết quả năng suất mủ cao su so với bón phân NPK từ 31,34% đến 46,26%, giảm sử dụng phân khoáng 20 - 40% NPK. Năng suất mủ cao su tăng 15,6% so với đối chứng bón vô cơ.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015) [3], đã nghiên cứu phân lập được 36 dòng VK từ các mẫu rễ cây Khoai lang trồng ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tất cả các dòng vi khuẩn này đều có dạng hình que và có khả năng chuyển động. Thực hiện các phép thử sinh hóa đã xác định được các dòng KL9, KL11, KL39a, KL39b là các vi khuẩn nội sinh có đủ 3 đặc tính tốt là cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA. Khi giải trình tự đoạn gen 16S-DNA của 4 dòng vi khuẩn này, nhận diện được chủng KL9 là loài *Burkholderia sprentiae* độ tương đồng 99%; dòng KL39a là loài *Burkholderia ambifaria* độ tương đồng 99%; dòng KL39b là loài *Enterobacter cloacae* độ tương đồng 99%; dòng KL11 là loài *Klebsiella pneumoniae* độ tương đồng 99%. Bốn dòng vi khuẩn có các đặc tính tốt này được đề nghị đưa vào sản xuất phân vi sinh cho cây khoai lang trồng trên đất phèn vùng Hòn Đất.

Chế phẩm xử lý phụ phế phẩm nông nghiệp, chế phẩm sinh học nấm đối kháng *Trichoderma* ngoài tác dụng sản xuất phân bón hữu cơ sinh học, hay sử dụng như một loại thuốc bảo vệ thực vật thì còn có tác dụng để xử lý ủ phân chuồng, phân gia súc, vỏ cà phê, chất thải hữu cơ như rơm, rạ, rác thải hữu cơ rất hiệu quả. Chế phẩm sinh học BIMA (có chứa *Trichoderma*

sp.) của Trung Tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh, chế phẩm Vi-ĐK của Công ty thuốc sát trùng Việt Nam đang được nông dân TP. Hồ Chí Minh và khu vực Đồng bằng Sông Cửu Long, Đông Nam Bộ sử dụng rộng rãi trong việc ủ phân chuồng bón cho cây trồng. Việc sử dụng chế phẩm sinh học này đã đẩy nhanh tốc độ ủ hoai phân chuồng từ 2 – 3 lần so với phương pháp thông thường, giảm thiểu ô nhiễm môi trường do mùi hôi thối của phân chuồng. Người nông dân lại tận dụng được nguồn phân tại chỗ, vừa đáp ứng được nhu cầu ứng dụng tăng khả năng kháng bệnh cho cây trồng do tác dụng của nấm đối kháng *Trichoderma* có chứa trong phân. Các chế phẩm sinh học của Viện Sinh học nhiệt đới như BIO-F, chế phẩm sinh học chứa các vi sinh vật do nhóm phân lập và tuyển chọn: xạ khuẩn *Streptomyces* sp., nấm mốc *Trichoderma* sp. và vi khuẩn *Bacillus* sp.. Những vi sinh vật trên trong chế phẩm sinh học có tác dụng phân huỷ nhanh các hợp chất hữu cơ trong phân lợn, gà và bò, gây mất mùi hôi. Trước đó, chế phẩm sinh học BIO-F đã được sử dụng để sản xuất thành công phân bón hữu cơ vi sinh từ bùn đáy ao, vỏ cà phê và xử lý rác thải sinh hoạt. Chế phẩm sinh học ứng dụng phòng trừ sâu bệnh VINEEM 1500 EC là sản phẩm của Công ty thuốc sát trùng Miền Nam, được chiết xuất từ nhân hạt Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) có chứa hoạt chất Azadirachtin, có hiệu lực phòng trừ nhiều loại sâu hại trên cây trồng như lúa, rau màu, cây công nghiệp, cây ăn trái, cây cảnh. Bằng kỹ thuật công nghệ sinh học, các nhà khoa học Viện khoa học nông nghiệp Việt Nam đã nghiên cứu và sản xuất ra 7 loại chế phẩm thuộc nhóm thuốc trừ sâu sinh học như chế phẩm vi sinh BT (*Bacillus thuringiensis*) có nguồn gốc vi khuẩn, phổ diệt sâu rộng và hữu hiệu đối với các loại sâu như sâu cuốn lá, sâu tơ, sâu xanh, sâu khoang, sâu ăn tạp. Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng (Đại học Cần Thơ) cũng đã nghiên cứu và đưa ra 02 chế phẩm sinh học Biobac và Biosar có khả năng phòng trừ 02 bệnh thường gặp trên lúa là đốm vằn và cháy lá.

### 1.2.7. Nghiên cứu về gieo trồng Thông nhựa

#### ➤ *Phân bố Thông nhựa:*

Ở nước ta cây Thông nhựa phân bố từ Bắc vào Nam: Quảng Ninh, Sơn La, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Quảng Nam, Bình Thuận, Kon Tum, Lâm Đồng. Thông nhựa là cây gỗ lớn, cao tới 20 - 25m, đường kính thân 40 - 50 cm. Thông nhựa là loài cây ưa sáng, và chịu hạn. Cây sinh trưởng trên cả đất cát, đất đỏ, đất nhẹ, dễ thoát nước; đất phong hoá từ đá mẹ sa thạch, sa phiến thạch. Tuy nhiên, Thông nhựa cũng có thể mọc trên đất đồi núi trọc, cằn cỗi, sỏi đá, nghèo kiệt, khô hạn, cây thích ứng với các loại đất chua pH (3,5-5).

#### ➤ *Nhân giống Thông nhựa:*

Cần thu hạt Thông nhựa từ những nón đã chín đầy đủ của cây mẹ ở độ tuổi 18-35, sinh trưởng khoẻ, hình thái đẹp, cao to, không bị sâu bệnh và chưa chích nhựa. Thời vụ thu hái hạt giống ở các tỉnh phía Bắc thường từ giữa tháng 8 đến giữa tháng 9. Khi gieo thông nhựa, sử dụng các loại nấm cộng sinh như *P. tinctorius*, *Scleroderma* spp., gây nhiễm vào đất ươm hạt, cây con sẽ có bộ rễ tốt và sinh trưởng nhanh. Trên thực tế hiện nay gieo Thông nhựa các cơ sở sản xuất phải sử dụng 10% đất mặt rừng thông đã khép tán để trộn với thành phần ruột bầu để có nguồn nấm cộng sinh. Việc làm này đã gây nên nhiều bất lợi như sau: nấm cộng sinh không được tuyển chọn, mang theo sâu, bệnh đặc biệt bệnh lở cổ rễ và bệnh rom lá thông, hệ sinh thái của rừng thông khép tán bị ảnh hưởng nghiêm trọng, chi phí rất lớn. Theo Nguyễn Sỹ Giao, (1996) [69] tỷ lệ cây con bị chết ở vườn ươm do nấm *Fusarium* spp, gây ra ước tính từ 40% đến 50%. Theo Nguyễn Xuân Quát, (1985) [22] tiêu chuẩn yêu cầu chất lượng cây con Thông nhựa đem đi trồng, áp dụng đúng tiêu chuẩn của Bộ Lâm nghiệp, cây đem trồng trên đất có trắng cây bụi, trắng cỏ cao hoặc trắng cỏ thấp, hay trọc trụi ở các vùng có chế độ mưa mùa khác nhau, đều cho tỷ lệ sống cao và sinh trưởng phát triển tốt. Bốn đặc điểm về môi trường và yêu cầu dinh dưỡng của cây con Thông

nhựa ở tuổi vườn ươm là thành phần cơ giới, mùn, độ chua và lân của đất hay hỗn hợp ruột bầu, trong đó độ chua và lân là 2 chỉ tiêu quan trọng nhất.

➤ *Trồng và chăm sóc Thông nhựa:*

Cây Thông nhựa con 1- 1,5 tuổi, đạt chiều cao 20-25 cm là có thể đưa trồng, thời vụ trồng thông nhựa ở các tỉnh phía Bắc thích hợp nhất là vào khoảng cuối mùa đông, đầu mùa xuân, lúc này nhiệt độ ấm dần và có mưa phùn. Thông nhựa, được trồng với mục đích chủ yếu là lấy nhựa, đồng thời còn đáp ứng yêu cầu phủ xanh đất trống, đồi núi trọc, bảo vệ đất, chống xói mòn, rừng cây Thông nhựa thuần loài, trồng để khai thác nhựa, mật độ ổn định ở giai đoạn trưởng thành khoảng 1.000 cây/ha. Để phòng bệnh vàng còi và bệnh rơm lá thông ở thông con cần xử lý hạt bằng thuốc diệt nấm và vi khuẩn.

### **1.2.8. Nghiên cứu đất thoái hoá, bạc màu.**

Thoái hoá đất đai là dấu hiệu chung của sự suy giảm nhất thời hoặc thường xuyên khả năng sản xuất của đất đai (UNEP, 1992). Hoặc có thể định nghĩa thoái hoá đất là những quá trình thay đổi các tính chất lý, hoá, sinh học của đất dẫn đến đất giảm hoặc mất khả năng thực hiện chức năng của mình. Những loại đất xấu, đất bạc màu, đất thoái hoá thường mang những nhược điểm gây hại cho cây trồng như đất bị mất tầng canh tác, nghèo kiệt dinh dưỡng, đặc biệt là nghèo chất hữu cơ, bị khô hạn, chai cứng hoặc bị ngập úng nước, bị chua hoá, mặn hoá... do vậy mà hiệu quả sản xuất thấp. Để có thể tiếp tục canh tác được trên vùng đất bạc màu đưa lại hiệu quả kinh tế cần phải cải tạo đất bạc màu bằng các biện pháp tổng hợp như luân canh cây trồng, thâm canh hợp lý, phân bón, thuỷ lợi...

### **Nhận xét**

Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong hệ sinh thái Nông lâm nghiệp, bao gồm các nhóm chính sau: nhóm VSV đất cố định nitơ tự do cung cấp cho cây trồng và dinh dưỡng khoáng cho đất, nhóm VSV tạo ra chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA cho cây, nhóm VSV phân giải các hợp chất

phốt phát khó tan thành dễ tan, nhóm VSV đối kháng với nấm gây bệnh. Qua những kết quả nghiên cứu về hiệu quả sử dụng chế phẩm vi sinh vật ở Việt Nam và nước ngoài cho thấy, phân bón hữu cơ vi sinh có tác dụng tốt đến sự sinh trưởng, phát triển, năng suất cây trồng, giảm giá thành, nâng cao hiệu quả trồng trọt và cải tạo môi trường đất canh tác. Tuy nhiên, theo các chuyên gia, nghiên cứu triển khai chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp ở nước ta còn hạn chế do các cơ sở thực nghiệm về công nghệ sinh học còn nhỏ hẹp, tản mát, số lượng ít ỏi, hầu hết các nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm hay sản xuất thử cho các mô hình chứ ít được thương mại hóa. Ngoài ra, các sản phẩm hiện đang lưu hành ngoài thị trường chưa đảm bảo về mật độ và hoạt lực của chủng vi sinh do VSV là những tế bào sống cần có điều kiện thích hợp về chất mang, điều kiện ngoại cảnh. Các chế phẩm VSV chưa được chọn lọc và tập hợp nhiều chủng VSV có ích, không những thế các chủng VSV hầu hết chỉ có 1 công dụng nhất định, đồng thời, quá trình vận chuyển các loại chế phẩm, bảo quản đến người sử dụng không đảm bảo. Một vấn đề khác không kém phần quan trọng là người nông dân chưa được tập huấn nên chưa hiểu thấu đáo về vai trò và cách sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh. Dựa trên nguồn tài nguyên dồi dào về than bùn, phosphorit và các phụ phẩm nông nghiệp ở nước ta, cần khuyến khích sử dụng các nguyên liệu này làm chất nền và chất phụ gia để phát triển phân bón vi sinh, chế phẩm vi sinh, dùng chúng thay thế dần các loại phân hoá học trong nông nghiệp theo xu hướng chung của thế giới.

Mặc dù vậy các chế phẩm VSV ở nước ta chủ yếu phục vụ cho phát triển cây Nông nghiệp và cây ăn quả. Để phát triển cây Lâm nghiệp và cải tạo đất thoái hoá Lâm nghiệp là cần thiết và quan trọng trong việc phát triển kinh tế, xã hội và bảo vệ môi trường và đặc biệt là phát triển nghề rừng. Để đáp ứng yêu cầu trên cần sản xuất chế phẩm VSV đa chủng gồm nấm ngoại cộng sinh với cây Thông nhựa, phân lập và tuyển chọn những vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA, phân

lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng phân giải lân, vi sinh vật có khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh thối cổ rễ cây thông và vi sinh vật cố định nitơ. Đây là những chủng vi sinh vật có những đặc điểm tốt của các chủng vi sinh vật bản địa, trên cơ sở đó phân lập tuyển chọn các chủng có hoạt tính sinh học và thích nghi cao với điều kiện sinh thái là vùng đất thoái hoá ở miền Bắc Việt Nam. Qua đó nghiên cứu cơ sở khoa học tạo chế phẩm hỗn hợp vi sinh vật đa chủng, để gieo ươm và gây trồng Thông nhựa trên đất thoái hoá nghèo dinh dưỡng, nhằm tăng sinh trưởng và hạn chế bệnh của cây Thông nhựa, đáp ứng được nhu cầu tạo ra những cây con chất lượng cao cho công tác trồng rừng, tạo rừng Thông nhựa sinh trưởng phát triển tốt ít bị sâu bệnh hại. Chế phẩm vi sinh vật đa chủng góp phần tăng độ ẩm đất, tăng mật độ vi sinh vật trong đất cải tạo đất bạc màu làm giảm quá trình thoái hóa đất, và sa mạc hóa ở miền Bắc Việt Nam.



## CHƯƠNG 2. ĐỊA ĐIỂM – THỜI GIAN – VẬT LIỆU - NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

### 2.1. Địa điểm nghiên cứu

#### 2.1.1. Địa điểm thí nghiệm

- Luận án được tiến hành tại phòng thí nghiệm, Trung tâm nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam.
- Thử nghiệm chất lượng chế phẩm được tiến hành tại vườn ươm Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
- Thử nghiệm chất lượng chế phẩm tiến hành bón chế phẩm cho cây Thông nhựa tại Quảng Ninh.

#### 2.1.2. Đặc điểm vị trí địa lý khu vực nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm.

Vị trí địa lý Đông Triều, tỉnh Quảng Ninh:

Đông Triều là huyện cửa ngõ phía Tây của tỉnh, nằm ở phía Tây tỉnh Quảng Ninh (Toạ độ 21<sup>0</sup>01' đến 21<sup>0</sup> 13' vĩ độ Bắc và từ 106<sup>0</sup>26' đến 106<sup>0</sup>43' kinh độ Đông). Thị trấn huyện lỵ từ cách thành phố Hạ Long 78km, cách thành phố Uông Bí 25km, cách Hà Nội 90km. Phía Bắc giáp huyện Sơn Động và Lục Nam tỉnh Bắc Giang bằng vòng cung núi Đông Triều. Phía Tây giáp thị xã Chí Linh, tỉnh Hải Dương, ranh giới là sông Vàng Chua. Phía Nam giáp huyện Kinh Môn, thuộc Hải Dương, ranh giới là Kinh Thầy và sông Đá Bạc. Phía Đông Nam giáp huyện Thủy Nguyên thuộc thành phố Hải Phòng, ranh giới cũng là sông Đá Bạc và huyện Kinh Môn tỉnh Hải Dương. Phía đông giáp thành phố Uông Bí, ranh giới là sông Tiên Yên.

Khí hậu Đông Triều, tỉnh Quảng Ninh:

Khí hậu Đông Triều tương đối ôn hòa, nhiệt độ trung bình năm là 23<sup>0</sup>C, độ ẩm 81%, lượng mưa trong là 1809mm, thấp hơn nhiều huyện trong tỉnh. Có hai hướng gió mùa chính: (1) Gió Đông Nam: Xuất hiện vào mùa mưa thổi từ biển vào mang theo hơi nước và gây ra mưa lớn. (2) Gió mùa Đông Bắc: Xuất hiện vào mùa khô từ tháng 10 năm trước đến tháng 4 năm sau, gió Đông Bắc về thường lạnh và mang theo gió rét. Bão: Hàng năm,

thường chịu ảnh hưởng trực tiếp của 3-5 tiếp của 3-5 cơn bão với cấp gió từ cấp 8 đến cấp 10, giạt trên cấp 10.

Tài nguyên rừng:

Năm 2014, Đông Triều hiện có 17.415,56 ha đất có rừng, tỷ lệ che phủ của rừng đạt 43,9%, trong đó đất rừng sản xuất 6034,01 ha chiếm 34,65% diện tích đất có rừng, rừng phòng hộ có 10870,15 ha chiếm 62,42% diện tích rừng, rừng đặc dụng có 511,4 ha chiếm 2,94% diện tích rừng. Cụ thể: rừng phòng hộ tập trung ở các xã An Sinh, Tràng Lương, Bình Khê, Hồng Thái Đông, Hồng Thái Tây. Rừng đặc dụng có ở xã Tràng Lương. Rừng sản xuất tập trung ở xã An Sinh, Tràng Lương, Bình Khê, Hồng Thái Đông, Hồng Thái Tây, Mạo Khê, Thuỷ An, Nguyễn Huệ, Hoàng Quế, Yên Thọ.

## **2.2. Thời gian và vật liệu nghiên cứu**

### **2.2.1. Thời gian nghiên cứu**

- Nội dung nghiên cứu được tiến hành từ năm 2010 đến 2015.

### **2.2.2. Vật liệu nghiên cứu**

- Cành Thông nhựa đường kính 1- 2cm thu từ những cây Thông nhựa khoẻ mạnh, sinh trưởng tốt, tại rừng Thông nhựa Đông Triều, Quảng Ninh.

- 30 mẫu đất rừng thu được ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam, trong đó 10 mẫu thu tại Đông Triều Quảng Ninh, 10 mẫu thu tại Ba Vì Hà Nội, 10 mẫu thu tại Đại Lải Vĩnh Phúc. Độ sâu tầng đất thu mẫu từ 10 – 20 cm.

- Tập đoàn nấm ngoại cộng sinh được lưu trữ tại Trung tâm Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

- Apatit, mùn, đất sét ...

## **2.3. Nội dung nghiên cứu.**

### **2.3.1. Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi sinh vật**

- Tuyển chọn nấm cộng sinh có hiệu lực cộng sinh cao.

- Phân lập và tuyển chọn VSV nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ.

- Phân lập và tuyển chọn VSV phân giải phốt phát khó tan và cố định nitơ tự do.

### **2.3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.**

- Đặc điểm hình thái học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.
- Đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao (nghiên cứu môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, pH môi trường nuôi cấy).
- Định loại các chủng vi sinh vật.

### **2.3.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng.**

- Nghiên cứu sự tương tác của các vi sinh vật trong cùng chế phẩm,
- Nghiên cứu giá thể tạo chế phẩm,
- Nghiên cứu hoạt tính của các loại VSV trong chế phẩm,
- Nghiên cứu mật độ VSV tối ưu và thời gian bảo quản của chế phẩm.

### **2.3.4. Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.**

- Đánh giá hiệu quả của chế phẩm với cây Thông nhựa

Thử nghiệm cây Thông nhựa tại vườn ươm.

Thử nghiệm cây Thông nhựa tại rừng trồng.

- Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới đất thoái hoá, bạc màu.

Phân tích các chỉ tiêu lý hoá của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.

Phân tích các chỉ tiêu VSV của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.

## **2.4. Phương pháp nghiên cứu.**

### **2.4.1. Phương pháp nghiên cứu tuyển chọn chủng VSV.**

#### **2.4.1.1. Phương pháp tuyển chọn nấm ngoại cộng sinh có hiệu lực cao.**

Thí nghiệm nuôi trồng cây Thông nhựa, trong bình thuỷ tinh ở môi trường nhân tạo:

- Xử lý hạt Thông nhựa, bằng một số hóa chất: theo phương pháp Normand & Fortin (1982) sử dụng 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hoặc có thể sử dụng cồn 70% hoặc NaOCl 5%. Để đạt hiệu quả cao đã tiến hành khử trùng bề mặt bằng phương pháp kép, lần đầu xử lý hạt bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% từ 5-30 phút và sau đó dùng HgCl<sub>2</sub> 1% khử trùng trong 5 phút, rửa sạch lại bằng nước cất 2-3 lần.

- Khi hạt đã được khử trùng sử dụng các dụng cụ vô trùng cấy hạt trên các đĩa petri có sẵn môi trường PDA, (Malajczuk và Hartney 1986 [62] nhằm loại bỏ nấm tạp và vi khuẩn xâm hại trước khi đưa vào các bình tam giác hoặc ống nghiệm đã được cấy nấm. Sau khoảng 2-3 ngày lựa chọn những hạt nứt nanh không nhiễm nấm và khuẩn cho vào bình tam giác đã cấy sẵn nấm.
- Thí nghiệm với 8 chủng nấm cộng sinh, mỗi chủng thử trên 30 bình tam giác mẫu đối chứng chỉ có môi trường PDA không có nấm cộng sinh. Đánh giá hiệu lực của nấm cộng sinh thông qua khả năng sinh trưởng của cây con so với cây con đối chứng, bằng cách đo chiều cao cây con sau 30 ngày, nhằm tuyển chọn loài có hiệu lực cao với Thông nhựa (Wong và đồng tác giả 1989) [83].

Kết quả thu được được xử lý trên phần mềm SPSS 15.0.

*2.4.1.2. Phương pháp phân lập, tuyển chọn vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa sinh tổng hợp IAA và đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ cây thông.*

\* Phân lập VSV nội sinh

Chọn cây Thông nhựa khỏe mạnh, sinh trưởng tốt, không bị bệnh, cắt cành bánh tẻ đường kính cành 1 – 1,5 cm và chiều dài cành khoảng 7- 8 cm. Rửa sạch mẫu trên vòi nước sạch. Ngâm các mẫu này trong cồn 70%, thời gian 1 phút để khử trùng, lấy ra rửa sạch bằng nước cất, khử trùng tiếp bằng HgCl<sub>2</sub> 1% ngâm trong 1 phút, rồi rửa lại bằng nước cất 3- 4 lần. Sau đó lấy ra và hơ nhanh qua ngọn lửa đèn cồn. Cắt cành mẫu thành những miếng nhỏ có kích thước 0,5 – 1mm<sup>2</sup>. Tiến hành ngâm những miếng nhỏ này trong ống nghiệm chứa môi môi trường PBS (Phosphate buffered saline), ở mỗi ống nghiệm cho 1 gam mẫu. Đưa các mẫu này vào lắc ở 200 vòng/phút với nhiệt độ 28<sup>0</sup>C trong thời gian 24 giờ. Phân lập VK, được thực hiện theo phương pháp pha loãng tới hạn, pha đến nồng độ 10<sup>-5</sup>. Dùng pipet lấy 10 µl dung dịch pha loãng ở nồng độ 10<sup>-2</sup> cho đến 10<sup>-5</sup> nhỏ vào hộp lồng chứa môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), trang đều trên mặt thạch, ở mỗi nồng độ thực hiện trên 3 hộp lồng, đặt các hộp lồng này trong tủ định ôn ở 28<sup>0</sup>C. Theo dõi sự

xuất hiện của các khuẩn lạc sau 48 giờ, đếm số lượng chủng vi khuẩn có trong hộp lồng dựa vào sự khác nhau về hình thái, màu sắc, kích thước, mô tả đặc điểm của các chủng vi sinh vật nội sinh. Tiến hành tách từng khuẩn lạc riêng rẽ cấy truyền trên các đĩa petri chứa môi trường PDA mới để nhận được tế bào vi khuẩn thuần.

\* Phương pháp tuyển chọn VSV nội sinh cây thông sinh tổng hợp IAA cao.

+) Phương pháp định tính: Các chủng VSV sau khi làm thuần được nuôi cấy lắc, trên môi trường NB (nutrient broth) ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau 4 ngày, lấy dịch vi sinh vật trên, nuôi cấy trong môi trường GPB (với tỷ lệ 1ml dịch với 10ml môi trường GPB) ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút, trong 2 ngày. Ly tâm ở tốc độ 5000 vòng /phút trong 10 phút để loại bỏ khuẩn. Lấy dịch trong đã ly tâm pha với thuốc thử Salkowski với hàm lượng 1ml dịch với 4ml thuốc thử (thuốc thử Salkowski được pha 0,5M FeCl<sub>3</sub> 2ml và HClO<sub>4</sub> 35% 98ml). Nếu thấy dịch đổi màu hồng do IAA thô đã được sinh ra.

+) Định lượng IAA: Định lượng IAA bằng đồ thị chuẩn IAA. Chuẩn bị các ống nghiệm có chứa sẵn 10ml nước cất, hút ở mỗi ống nghiệm lần lượt là 0, 50, 100, 200, 400, 600,... 1400, 1600µl nước cất bỏ đi, đồng thời bổ xung lượng dịch IAA tương ứng (nồng độ IAA là 0,05%), đối chứng là 2ml nước cất bổ xung 8ml thuốc thử. Dựa vào chỉ số OD (mật độ quang) và nồng độ IAA trong dung dịch để dựng đồ thị đường chuẩn IAA tinh khiết. Lấy dịch đã ly tâm pha với thuốc thử hàm lượng (1ml dịch với 4ml thuốc thử Salkowski), so màu trên máy so màu bước ở sóng 530nm và tính kết quả theo đồ thị chuẩn IAA tinh khiết. (Thí nghiệm được lặp lại 3 lần).

\* Phương pháp tuyển chọn chủng VSV nội sinh đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy kép trên cùng một đĩa Petri. Vi khuẩn nội sinh đã thuần được cấy vào chính giữa hộp lồng có chứa môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) (mỗi chủng khuẩn được thử

nghiệm trên 10 hộp lồng và được lặp lại 3 lần). Nuôi trong tủ định ôn có nhiệt độ 28<sup>0</sup>C. Sau 2 ngày cấy nấm gây bệnh thối cổ rễ thông *F. oxysporum* ở 3 điểm gần mép hộp lồng đã cấy vi khuẩn, theo dõi sự phát triển của vi khuẩn và nấm bệnh. Sau 7 và 10 ngày đánh giá hiệu lực của vi khuẩn đối với nấm gây bệnh *F. oxysporum* bằng việc đo đường kính vòng ức chế (Jinwn Kim, 2000) [51]. Vòng ức chế của vi khuẩn đối với nấm bệnh được tính theo công thức:

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

V(mm) là đường kính trung bình vòng ức chế;

D(mm) là đường kính trung bình tính theo 2 chiều của vòng ức chế được tính từ tâm hộp lồng đến mép ngoài khuẩn lạc *F. oxysporum*;

d(mm) là đường kính trung bình của khuẩn lạc vi khuẩn tính theo 2 chiều vuông góc.

Hiệu lực đối kháng được tính theo 4 cấp:

Hiệu lực yếu ( $V \leq 5\text{mm}$ );

Hiệu lực trung bình ( $5\text{mm} < V(\text{mm}) \leq 10\text{mm}$ );

Hiệu lực cao ( $10\text{mm} < V(\text{mm}) \leq 20\text{mm}$ ) và

Hiệu lực rất cao ( $V(\text{mm}) > 20\text{mm}$ ).

2.4.1.3. Phương pháp phân lập, tuyển chọn các chủng VSV phân giải photphat khó tan và vi sinh vật cố định nitơ tự do

\* Phương pháp phân lập vi sinh vật phân giải photphat khó tan.

Lấy 10g đất hòa với 90ml nước cất dùng khuấy từ khuấy đều trong 10 phút, để lắng. Phân lập vi khuẩn phân giải photphat khó tan cũng được thực hiện theo phương pháp pha loãng tới hạn, pha đến nồng độ 10<sup>-5</sup>. Dùng pipet lấy 10 µl dung dịch pha loãng ở nồng độ 10<sup>-2</sup> cho đến 10<sup>-5</sup> nhỏ vào hộp lồng chứa môi trường phân giải lân (có chứa hợp chất lân khó tan Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>) với tỷ lệ 0,5%) và nuôi trong tủ ấm 25-30<sup>0</sup>C trong 3-5 ngày. Quan sát thấy VK mọc rải rác trên hộp lồng, môi trường ban đầu có màu trắng đục, nếu là VK phân giải lân sẽ tạo ra môi trường xung quanh nó một vòng rất trong, tách riêng từng chủng tạo ra các vòng trong suốt sang môi trường dinh dưỡng mới và

ghi ký hiệu cho từng chủng. Sau khi cấy xong cất giữ mẫu trong tủ định ôn ở nhiệt độ 25°C (Marx và Kenney 1982) [64]; Marx, 1991 [66]; Kuek, 1994 [57].

\* Phương pháp tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân giải photphat khó tan.

+) Phương pháp xác định, định tính: Cấy các chủng vi khuẩn phân lập được lên môi trường phân giải lân có chứa  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , nuôi vi khuẩn trong tủ định ôn có nhiệt độ 25 - 30°C trong 5 - 8 ngày. Để tuyển chọn được các chủng có hiệu lực phân giải lân cao tiến hành đo đường kính vòng phân giải lân theo 2 chiều vuông góc, lấy trung bình. Hiệu lực phân giải được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải ( $D_{TB}$ ):

Hiệu lực thấp:  $D_{TB} \leq 5 \text{ mm}$ ;

Hiệu lực trung bình:  $5 \text{ mm} < D_{TB} \leq 10 \text{ mm}$ ;

Hiệu lực cao:  $D_{TB} > 10 \text{ mm}$ ,

+) Phương pháp xác định, định lượng hàm lượng lân dễ tiêu: Các chủng phân giải lân đã được phân lập thuần khiết đưa vào nuôi trong môi trường Pikovskaya không có Agar. Cấy vi khuẩn vào các bình môi trường đã khử trùng, tiến hành lắc ở 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C. Sau khi nuôi khuẩn được 120 giờ, tiến hành ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 20 phút để lọc bỏ VK phân giải lân lấy dịch trong, so màu ở bước sóng 430 nm, dung dịch đối chứng là môi trường Pikovskaya không có Agar.

\* Phương pháp phân lập vi sinh vật cố định nitơ tự do.

Từ các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải photphat khó tan phân lập được từ phương pháp trên, cấy trên môi trường nitrogen – free mineral media (NFMN) nuôi trong tủ ấm 25-30°C trong 3-5 ngày, quan sát thấy VK mọc rải rác trên hộp lồng, có màu trắng trong, khuẩn bóng. Tiến hành cấy riêng từng chủng tạo ra các vòng trong suốt sang môi trường Yeast Mannitol Agar (YMA) để tạo độ thuần, nuôi giữ mẫu trong tủ định ôn ở nhiệt độ 25°C.

\* Phương pháp tuyển chọn vi sinh vật cố định nitơ.

Khi đã phân lập được các chủng vi sinh vật cố định nitơ, chúng ta tuyển chọn chúng bằng cách nuôi cấy trong môi trường NFMN không có Agar, từ 3 – 5 ngày, ở nhiệt độ 28°C, lắc 200 vòng/phút. Ly tâm dịch ở 5000vòng/ phút trong 20 phút để lọc bỏ vi khuẩn lấy dịch trong kiểm tra hàm lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl. Các chủng có khả năng cố định nitơ mạnh dựa vào phản ứng màu với thuốc thử Nessler.

**2.4.2. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học các chủng VSV.**

2.4.2.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hoá của các chủng vi sinh vật.

\* Phương pháp nghiên cứu chủng nấm thuộc loài *Pisotlitus tinctorius*

+ Chụp ảnh mẫu, tiến hành mô tả đặc điểm hình thái bên ngoài về màu sắc tán nấm, phiến nấm, cuống nấm, các dấu hiệu như vòng nấm, bao nấm, tàn dư trên tán nấm, theo (Largent *et al.*, 1977) [58].

+ Sử dụng các dụng cụ như kính hiển vi quang học, lam kính, lamén, dung dịch shear để soi bào tử, chụp ảnh và mô tả bào tử của nấm.

\* Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái vi khuẩn

Chuẩn bị lam kính, nhuộm màu vi sinh vật và quan sát vi sinh vật bằng kính hiển vi điện tử quét JSM 5410-LV (Jeol, Nhật), mô tả bào tử, chụp ảnh lưu mẫu. Nhuộm màu vi khuẩn bằng thuốc nhuộm rose bengal và quan sát bằng kính hiển vi điện tử có độ phóng đại 10.000 lần, mô tả hình dáng, đo kích thước bào tử và chụp ảnh. Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm *Breed* hoặc đếm trực tiếp bằng phương pháp pha loãng tới hạn  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$

\* Phương pháp xác định đặc điểm sinh hoá của vi khuẩn:

+ Xác định gram vi khuẩn: Nhỏ 1 giọt KOH 3 % lên lam kính, lấy một vòng que cấy sinh khối tế bào nuôi trong 24 giờ, đánh tan khối tế bào trong giọt KOH, dùng que cấy nhấc lên, nếu thấy có độ dính là vi khuẩn gram âm, không có độ kết dính là vi khuẩn gram dương. Phương pháp



nhuộm gram, làm tiêu bản vết bôi với chủng vi sinh vật thuần khiết sau 24 giờ nuôi cấy, cố định trên ngọn lửa đèn cồn. Nhuộm tiêu bản bằng dung dịch tím kết tinh (Crystal violet) trong 1 phút, rửa bằng nước cất với dòng chảy nhẹ. Cố định tiêu bản bằng dung dịch Lugol (KI+I) trong 1 phút, rửa bằng nước cất với dòng chảy nhẹ và thấm khô. Rửa tiêu bản bằng cồn trong 30 giây cho đến khi vừa mất màu. Nhuộm màu bổ sung bằng safranin (Farlin acid) trong 1 phút, rửa nhẹ bằng nước cất để khô tự nhiên. Soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100 lần. Nếu tế bào bắt màu xanh tím là Gram dương, màu hồng là gram âm.

+ Xác định khả năng hình thành bào tử: Kiểm tra chủng vi khuẩn có khả năng hình thành bào tử bằng phương pháp nội soi bào tử bằng sức nhiệt: Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch 72 giờ, sau đó hòa tan hoàn toàn một vòng que cấy sinh khối tế bào vi khuẩn Gram dương trong ống nghiệm chứa 4,5 ml nước muối sinh lý. Tiến hành ủ các ống này trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 80<sup>0</sup>C trong 15 phút. Sau đó gạt dịch trong các ống nghiệm đã sức nhiệt lên đĩa thạch petri có chứa môi trường HKTS 1% đã khử trùng, ủ ở 30<sup>0</sup>C trong 24 – 48 giờ. Nếu trên đĩa thạch xuất hiện khuẩn lạc chứng tỏ vi khuẩn vẫn phát triển trở lại và khẳng định chủng đó có khả năng hình thành bào tử và ngược lại.

*2.4.2.2. Phương pháp nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối của các chủng vi sinh vật có ích.*

\* Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối vi khuẩn.

+ Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng vi sinh vật nội sinh cây thông sinh tổng IAA: VK được nuôi cấy ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường: môi trường 1: gi đường, môi trường 2: GPB (Glucose Phosphate Broth), môi trường 3: PBS (Phosphate Buffered Saline). Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

+ Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng VSV đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây thông: Vi khuẩn được nuôi cấy ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường: môi trường 1: PD (Potato dextrosed), môi trường 2: King's B (Pseudomonas Agar Base), môi trường 3: PBS (Phosphate Buffered Saline). Sau 72 giờ xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

+ Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng VSV phân giải photphat khó tan: Các chủng vi khuẩn phân giải photphat được nuôi cấy ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường dinh dưỡng: môi trường 1: PD; môi trường 2: nước chiết khoai tây có thêm một số thành phần nguyên tố khoáng và môi trường 3: Pikoskaya. Sau 72 giờ xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

+ Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng VSV cố định nitơ tự do: Vi khuẩn được nuôi cấy ở 28<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường dưỡng: môi trường 1: Asby, môi trường 2: NFMN, môi trường 3: AT. Sau 72 giờ xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

\* Phương pháp xác định thời gian nhân sinh khối các chủng VSV.

VK được nuôi cấy trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên, ở 28<sup>0</sup>C, lắc ở 200 vòng/phút. Sau các thời gian 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ và 144 giờ lấy mẫu ra xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

\* Xác định nhiệt độ môi trường nhân sinh khối các chủng VSV.

Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên, lắc 200 vòng/phút; nuôi ở các nhiệt độ 17<sup>0</sup>C, 20<sup>0</sup>C, 23<sup>0</sup>C, 25<sup>0</sup>C, 28<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C, 33<sup>0</sup>C và 35<sup>0</sup>C. Sau thời gian nuôi cấy 72 giờ, xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

\* Xác định độ pH môi trường nhân sinh khối, của các chủng VSV.

Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên. Điều chỉnh pH môi trường ở các trị số 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 ; 8. Nuôi cấy ở 28<sup>0</sup>C, lắc 200 vòng/phút, sau thời gian 72 giờ, xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

#### ***2.4.2.3. Phương pháp định danh một số loài có hiệu lực cao***

##### ***Tách chiết ADN***

Các chủng VSVNS được nuôi cấy 2 ngày trên môi trường thích hợp. Lấy 1 vòng que cấy khăn ty vào ống eppendorf vô trùng, thêm 500 µl 2×SSC vào mỗi ống. Lắc đều và giữ ở 99<sup>0</sup>C trong 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Hút bỏ phần dịch và tiến hành rửa tế bào 1 lần bằng nước cất vô trùng. Thêm khoảng 100 µl hạt thủy tinh có đường kính 0,2-0,5 mm (Roth, Đức), 100 µl dung dịch phenol/chloroform (tỷ lệ 1:1) và 100 µl nước cất vô trùng. Lắc ở 1.400 vòng/phút trong 10 phút trên máy Thermocomfort (Eppendorf, Đức) sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong phía trên có chứa ADN làm khuôn cho phản ứng PCR.

ADN sau khi tách chiết được giữ ở điều kiện -20<sup>0</sup>C.

##### ***Định danh VSVNS bằng giải trình tự***

Phân đoạn rADN của VSVNS được khuếch đại trên thiết bị GeneAmp<sup>®</sup> PCRSystem 9700 (PE Applied Biosystem, Mỹ) với chương trình nhiệt được thiết lập với pha biến tính ở 94<sup>0</sup>C trong 2 phút kế tiếp là 35 chu kỳ nhiệt (94<sup>0</sup>C trong 30 giây, 52<sup>0</sup>C trong 30 giây và 72<sup>0</sup>C trong 1 phút). Quá trình khuếch đại được hoàn tất ở 72<sup>0</sup>C trong 7 phút và sau đó sản phẩm PCR được bảo quản ở 10<sup>0</sup>C.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được tinh chế bằng QIAEX II (Qiagen, Đức) theo khuyến cáo của hãng. Trình tự ADN được đọc bằng phương pháp “dideoxy chain termination” với việc sử dụng kit AmpliTaq (Amersham) theo hướng dẫn của hãng. Máy đọc trình tự, model 377 của hãng Applied Biosystem được sử dụng. Các chuỗi ADN được so sánh với

GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide đặt tại National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Mỹ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999).[45]

### **2.4.3. Phương pháp nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng.**

*2.4.3.1. Phương pháp nghiên cứu sự tương tác của các vi sinh vật trong cùng hỗn hợp.*

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy kếp trên cùng một đĩa Petri. Trên mỗi đĩa petri có chứa môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) được vạch chia làm 4 phần. Trên mỗi phần đĩa Petri được cấy một loại vi khuẩn khác nhau (thí nghiệm trên 10 Petri, và được lặp lại 3 lần), nuôi trong tủ định ôn có nhiệt độ 28<sup>0</sup>C. Sau các thời gian 3 ngày, 6 ngày và 9 ngày, kiểm tra sự tồn tại của chúng bằng cách đo đường kính khuẩn lạc theo 2 chiều vuông góc.

*2.4.3.2. Phương pháp nghiên cứu giá thể tạo chế phẩm.*

Bào tử hữu tính nấm *P. tinctorius*, sinh khối dung dịch các chủng vi sinh vật: VSV sinh IAA, VSV phân giải lân. VSV đối kháng với nấm bệnh và VSV cố định nitơ (dung dịch các chủng vi sinh vật khi nhân sinh khối mật độ bào tử đạt tối thiểu là > 10<sup>7</sup>) cùng trộn với các chất mang đưa vào thử nghiệm với 10 kg nguyên liệu với các thành phần ở 4 công thức theo bảng dưới đây:

\* Nghiên cứu chất mang tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng dùng bón cho cây Thông nhựa rừng trồng:

Công thức	Bột apatit (%)	Mùn (%)	Đất sét (%)	Potassium polyacrylamide (%)	BT nấm Pt (g) (%)	DDVK sinh IAA (%)	DDVK VK PGL (%)	DDVK ĐK nấm gây bệnh (%)	DDVK cố định ni tơ (%)
CT1	40	40		10	0,025	2,5	2,5	2,5	2,5
CT2	35	35		10	0,05	5	5	5	5
CT3		35	35	10	0,05	5	5	5	5
CT4		40	40	10	0,025	2,5	2,5	2,5	2,5

\* Nghiên cứu chất mang tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng dùng cho cây con  
Thông nhựa tại vườn ươm:

<b>Công thức</b>	<b>Bột apatit (%)</b>	<b>Mùn (%)</b>	<b>Đất sét (%)</b>	<b>BT nấm Pt (g) (%)</b>	<b>DD VK sinh IAA (%)</b>	<b>DDVK PGL (%)</b>	<b>DDVK ĐK nấm gây bệnh (%)</b>	<b>DDVK cố định nitơ (%)</b>
CT1	45	45		0,025	2,5	2,5	2,5	2,5
CT2	40	40		0,05	5	5	5	5
CT3		40	40	0,05	5	5	5	5
CT4		45	45	0,025	2,5	2,5	2,5	2,5

Sau khi tạo chế phẩm đa chủng vi sinh vật, tiến hành đánh giá sự tồn tại tế bào của các chủng vi sinh vật ở các công thức phối trộn khác nhau trong các chế phẩm hỗn hợp. Sau khi phối trộn chế phẩm vi sinh vật được 2 tuần, dùng chế phẩm vi sinh vật đó phân lập trở lại các chủng vi sinh vật, bằng phương pháp pha loãng tới hạn và cấy trang trên môi trường thích hợp với từng loại vi sinh vật.

#### 2.4.3.3. Phương pháp kiểm tra lại hoạt tính của các chủng vi sinh vật trong chế phẩm.

Tiến hành phân lập lại từ chế phẩm vi sinh vật đa chủng với các môi trường khác nhau: Môi trường NB với vi sinh vật sinh tổng hợp IAA; môi trường Pikovskaya đối với VSV phân giải phốt phát khó tan, môi trường Kings' B đối với vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh và môi trường NFMN với vi sinh vật cố định nitơ tự do sau thời gian 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 16 tuần, kiểm tra sự tồn tại của các vi khuẩn và hoạt tính của các chủng vi khuẩn.

#### 2.4.3.4. Phương pháp nghiên cứu thời gian bảo quản của chế phẩm.

Chế phẩm đa chủng VSV được thử nghiệm bảo quản theo 2 cách:

- + Bảo quản ở nhiệt độ phòng,
- + Bảo quản trong điều kiện phòng nhiệt độ (15 – 20<sup>0</sup>C).

Sau thời gian 1,5 tháng, 3 tháng, 4,5 tháng và 6 tháng tiến kiểm tra sự tồn tại của các chủng vi sinh vật.

#### ***2.4.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu***

##### ***2.4.4.1. Phương pháp đánh giá hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng với cây Thông nhựa***

\* Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đối với cây Thông nhựa ở vườn ươm.

- Thí nghiệm được tiến hành trên Thông nhựa, với 5 công thức, mỗi công thức 40 cây con, thí nghiệm lặp lại 3 lần, thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ. Bầu trồng cây có kích thước 11 x 15 cm. Thành phần ruột bầu: bao gồm đất bột (lấy tại Đại Lải, Vĩnh Phúc) và các lượng chế phẩm khác nhau. Khử trùng đất bằng phơi dưới nắng trực tiếp 3 ngày.

Công thức 1: đất trộn 1% lân, như đóng bầu trong sản xuất (đối chứng)

Công thức 2: bón 1 gam chế phẩm VSV đa chủng/bầu,

Công thức 3: bón 2 gam chế phẩm VSV đa chủng /bầu,

Công thức 4: bón 3 gam chế phẩm VSV đa chủng /bầu,

Công thức 5: bón 2 gam chế phẩm MF1/bầu, (chế phẩm dành cho cây thông của đề tài CNSH).

- Thu thập số liệu ở các mốc thời gian 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng và 8 tháng: đo chiều cao, đo đường kính gốc, xác định tỷ lệ bị bệnh, tỷ lệ cộng sinh của cây con ở các công thức thí nghiệm.

\* Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đối với cây Thông nhựa ở rừng trồng.

Thí nghiệm được tiến hành với Thông nhựa ở rừng trồng 0,5 ha với 5 công thức, mỗi công thức 50 cây được trồng theo khối 5 hàng mỗi hàng 10 cây, khoảng cách 3 x 2m, thí nghiệm lặp lại 3 lần.

- Công thức 1: bón 200 g NPK(20.20.15)/cây như trồng rừng thông thường

- Công thức 2: bón 20 gam chế phẩm VSV đa chủng/cây

- Công thức 3: bón 40 gam chế phẩm VSV đa chủng/cây

- Công thức 4: bón 60 gam chế phẩm VSV đa chủng/cây

- Công thức 5: đối chứng không bón gì

Thu thập số liệu ở các mốc thời gian 1 tuổi và 1,5 tuổi: đo chiều cao, đo đường kính gốc, xác định tỷ lệ sống ở các công thức thí nghiệm.

2.4.4.2. *Đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến đất thoái hoá bạc màu.*

Tiến hành lấy mẫu đất của các công thức thí nghiệm: Đất được lấy ở độ sâu tầng đất 5- 15cm. Mỗi mẫu đất được lấy ở 5 điểm của một công thức (trong đó 4 điểm ở 4 góc và 1 điểm giữa công thức), cách xa gốc cây Thông nhựa 20cm.

\* Phương pháp phân tích các chỉ tiêu lý, hoá của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.

- Phân tích chỉ tiêu mùn (%) theo phương pháp Walkley- Black.
- Phân tích chỉ tiêu Đạm (%) theo phương pháp Kjeldhall.
- Phân tích chỉ tiêu  $P_2O_5$  (%) theo phương pháp Trắc quang/Photometry.
- Phân tích chỉ tiêu  $K_2O$  (mg/100g đất) theo phương pháp Quang kế/Flame photometer.

\* Phương pháp phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.

- Phương pháp xác định thành phần và mật độ các chủng VSV cố định nitơ: Sử dụng phương pháp pha loãng tới hạn ở cấp từ  $10^{-3}$  đến  $10^{-5}$ . Cây dung dịch huyền phù trên các đĩa có chứa môi trường NFMN nuôi ở nhiệt độ 25-28°C. Sau 2-3 ngày đếm số lượng khuẩn lạc, tách riêng từng chủng sang môi trường mới để tạo chủng thuần. Các chủng thuần khiết đưa vào nuôi cây trong môi trường NFMN không có Agar, từ 3 – 5 ngày, ở nhiệt độ 28°C, lắc 200 vòng/phút. Ly tâm dịch ở 5000vòng/ phút trong 20 phút để lọc bỏ vi khuẩn lấy dịch trong kiểm tra hàm lượng Nitơ bằng phương pháp Kjeldahl.
- Phương pháp xác định thành phần và mật độ vi sinh vật phân giải lân: Thực hiện theo phương pháp pha loãng tới hạn, pha đến nồng độ  $10^{-5}$ . Dùng pipet lấy 10 $\mu$ l dung dịch pha loãng ở nồng độ  $10^{-2}$  cho đến  $10^{-5}$  nhỏ vào hộp lồng chứa môi trường phân giải lân (có chứa hợp chất lân khó tan  $Ca_3(PO_4)$  với tỷ lệ 0,5%) và nuôi trong tủ ấm 25-30°C trong 3-5 ngày. Quan sát thấy vi khuẩn mọc rải rác trên hộp lồng, môi trường ban đầu có màu trắng đục, nếu là vi khuẩn phân giải lân sẽ tạo ra môi trường xung quanh nó một vòng rất

trong, tách riêng từng chủng tạo ra các vòng trong suốt sang môi trường dinh dưỡng mới và ghi ký hiệu cho từng chủng.

- Phương pháp xác định thành phần và mật độ tế bào vi nấm tổng số có trong đất: Sử dụng phương pháp pha loãng tới hạn ở cấp pha loãng thích hợp từ  $10^{-4}$  đến  $10^{-5}$ . Cây dung dịch huyền phù trên các đĩa thạch có chứa môi trường PDA- Rose Bengal (môi trường PDA có 30 - 50 $\mu$ g/ml Rose Bengal và 50-100  $\mu$ g/ml streptomycin); nuôi cấy ở nhiệt độ 25-30 $^{\circ}$ C. Sau 2-3 ngày đếm số lượng khuẩn lạc.

- Phương pháp xác định thành phần và mật độ xạ khuẩn tổng số: Sử dụng phương pháp pha loãng tới hạn ở cấp pha loãng thích hợp từ  $10^{-3}$  đến  $10^{-4}$ . Cây dung dịch huyền phù trên các đĩa thạch có chứa môi trường nước bột đậu tương và đường glucose sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 25-30 $^{\circ}$ C sau 2-3 ngày đếm số lượng khuẩn lạc.

- Phương pháp xác định thành phần và mật độ vi khuẩn tổng số có trong đất: Sử dụng phương pháp pha loãng tới hạn ở cấp pha loãng thích hợp từ  $10^{-5}$  đến  $10^{-6}$ . Cây dung dịch huyền phù trên các đĩa thạch có chứa môi trường (chiết đất và đường glucose) sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 25-30 $^{\circ}$ C sau 2-3 ngày đếm số lượng khuẩn lạc.

- Phương pháp xác định thành phần và mật độ nấm nội cộng sinh trong đất: tách bào tử nấm nội cộng sinh từ đất, sử dụng kỹ thuật sàng ướt qua rây kết hợp với ly tâm trong dung dịch đường sucrose 50% (Daniel và Skipper, 1982; Tommerup, 1992). Phân loại nấm nội cộng sinh, bào tử được quan sát mô tả, đo kích thước trên kính hiển vi quang học BX50, mô tả các đặc điểm hình dạng, màu sắc, vách tế bào, cấu trúc bề mặt, kích thước của bào tử.

\* Thu thập và tính toán số liệu đối với cả vườn ươm và rừng trồng.

- Tỷ lệ bị bệnh: là phần trăm số cây bị bệnh so với tổng số cây điều tra, được

tính theo công thức sau: 
$$Pb = \frac{n}{N} \times 100$$

Trong đó: Pb là tỷ lệ bị bệnh (%),



n là số cây bị bệnh,

N là tổng số cây điều tra

- Tỷ lệ cộng sinh: là phần trăm số cây cộng sinh so với tổng số cây điều tra,

được tính theo công thức sau:  $Pcs = \frac{ni}{Ni} \times 100$  Trong đó:

Pcs là tỷ lệ cộng sinh (%)

n là số cây cộng sinh,

Ni là tổng số cây điều tra.

**Nội nghiệp:** Kết quả thu được được xử lý trên phần mềm SPSS 15.0, xử lý số liệu, phân tích phương sai, so sánh trị trung bình giữa các công thức bằng phần mềm phần mềm Excel và Genstat 5.

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

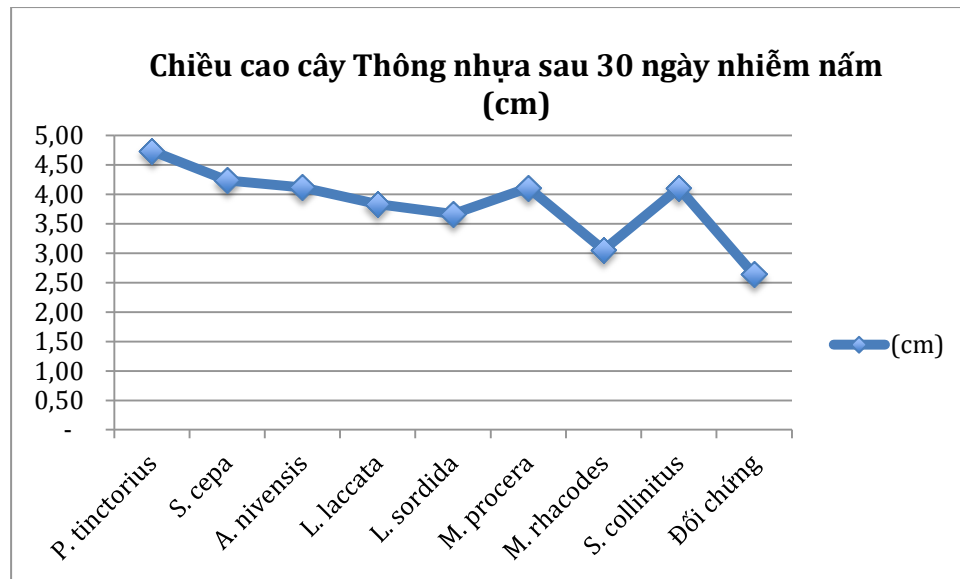
### 3.1. Kết quả tuyển chọn các chủng vi sinh vật có ích.

#### 3.1.1 Kết quả tuyển chọn nấm cộng sinh có hiệu lực cao cho cây Thông nhựa.

Tuyển chọn nấm cộng sinh dựa vào tập đoàn nấm ngoại cộng sinh được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu Bảo vệ thực vật rừng – Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam. Có 8 loài nấm dưới đây đã được đưa vào thử nghiệm cộng sinh với cây Thông nhựa bằng phương pháp invitro. Sau khi hạt Thông nhựa được khử trùng, nứt nanh cấy vào bình tam giác đã sẵn nấm cộng sinh. Các loài nấm cộng sinh khác nhau khi hình thành rễ nấm cộng sinh với rễ cây cũng khác nhau. Chiều cao của cây Thông nhựa sau thời gian 30 ngày nhiễm nấm cộng sinh khác nhau cho kết quả được trình bày tại Bảng 3.1.

**Bảng 3.1: Kết quả chiều cao cây Thông nhựa được nhiễm nấm khác nhau sau 30 ngày.**

STT	Ký hiệu chủng	Các loại nấm cộng sinh	$\overline{H_m}$ (cm)	Sai tiêu chuẩn
1	Pt1	<i>Pisolithus tinctorius</i>	4,7367	0,05615
2	Sc2	<i>Scleroderma cepa</i>	4,2360	0,04665
3	An2	<i>Agaricus nivensis</i>	4,1180	0,06564
4	Ll1	<i>Laccaria laccata</i>	3,8340	0,07449
5	Ls3	<i>Lepista sordida</i>	3,6633	0,04068
6	Mp4	<i>Macrolepiota procera</i>	4,1133	0,04016
7	Mr1	<i>Macrolepiota rhacodes</i>	3,0567	0,07451
8	Sc4	<i>Suillus collinitus</i>	4,1053	0,04682
		Đối chứng không có nấm	2,6367	0,07214



**Hình 3.1: Biểu đồ chiều cao cây Thông nhựa được nhiễm nấm sau 30 ngày**

Sau 30 ngày nhiễm nấm tiến hành đo chiều cao cây Thông nhựa, kết quả cho thấy sinh trưởng về chiều cao trung bình của các mẫu thí nghiệm so với đối chứng đã có sự khác biệt hoàn toàn, cùng trong môi trường dinh dưỡng như nhau nhưng khi có nấm ngoại cộng sinh thì quá trình chuyển hóa các chất cho cây tốt hơn, nấm đã giúp các rễ của cây hút các chất dinh dưỡng tốt và chúng tăng trưởng về chiều cao tốt hơn cây không được nhiễm nấm.

Hình 3.1 cho thấy, chủng nấm Pt1 thuộc loài *P. tinctorius* cộng sinh với cây Thông nhựa cho chiều cao là 4.7 cm (tăng 55% so với đối chứng) cao nhất trong 8 loài nấm cộng sinh đưa vào thử nghiệm. Tiếp theo là chủng *Scleroderma cepa* cho Thông nhựa chiều cao là 4.2 cm (tăng 50% so với đối chứng). Chủng *M. rhacodes* mang lại chiều cao thấp nhất so với 8 chủng trên nhưng có chiều cao vượt trội so với đối chứng là 23%. Kết quả trên cho thấy nấm cộng sinh là thành phần vô cùng quan trọng trong gieo trồng cây Thông nhựa. Chủng nấm Pt1 thuộc loài *P. tinctorius* được lựa chọn cho những nghiên cứu tiếp theo để sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng phục vụ gieo ươm và gây trồng cây Thông nhựa.

### 3.1.2. Kết quả phân lập và tuyển chọn VSV nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh

#### 3.1.2.1. Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa.

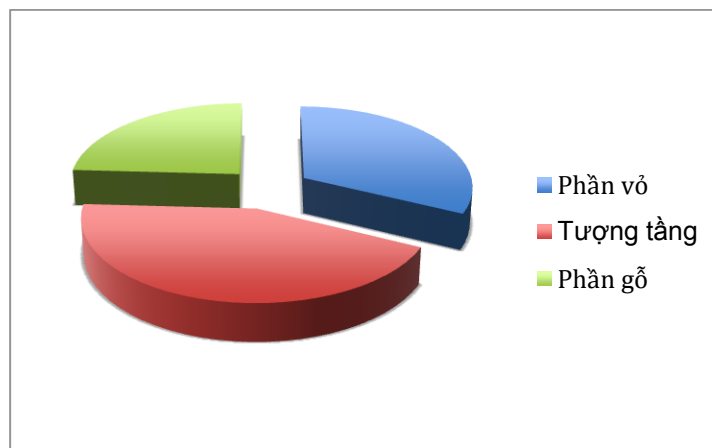
Với 10 mẫu cành thông từ những cây Thông nhựa khoẻ mạnh không bị bệnh thu được ở Đông Triều - Quảng Ninh và 10 mẫu cành Thông nhựa khoẻ mạnh không bị bệnh thu tại Đại Lải – Vĩnh Phúc. Kết quả phân lập VSVNS cây Thông nhựa được trình bày ở Bảng 3.2.

**Bảng 3.2: Kết quả phân lập chủng vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa**

S	Ký hiệu Mẫu	Số chủng	Ký hiệu chủng phân lập được		
			Phần vỏ	Tượng tầng	Phần gỗ
1	C1	3		CI2, CI3	CI4
2	C2	2	CI3		CI4
3	C3	5	CI4, CI5	CI3	CI7, CI6
4	C4	3	CI1, CI5	CI7	
5	C5	5	CI4	CI3, CI5, CI7	CI6
6	C6	4	CI1	CI7	CI2, CI5
7	C7	3	CI1	CI7, CI6	
8	C8	5	CI2	CI6, CI5, CI6	CI7
9	C9	2	CI1	CI4	
10	C10	4	CI1	CI2, CI <sub>I6</sub>	CI10
11	Q1	5	CI11, QI8	QI11	CI12, QI13
12	Q2	6	QI1, QI9	QI10, QI14, QI15	QI4
13	Q3	4	QI17	QI16, QI19	QI18
14	Q4	7	QI9, QI8	QI15, QI20, QI21	QI22, QI23
15	Q5	5	QI11, QI20	QI6, QI20	QI24
16	Q6	4	QI16	QI22, QI25	QI26
17	Q7	5	QI25	QI1, QI24	QI12, QI17
18	Q8	6	QI3, QI26	QI13, QI2, QI28	QI30

19	Q9	4	QI1, QI31	QI32	QI33
20	Q10	5	QI30, QI34	QI35, QI8	QI36
Tổng số		87	28	38	21

Số liệu ở Bảng 3.2 cho thấy, với 20 mẫu cành cây Thông nhựa đã phân lập được 87 chủng VK nội sinh trong đó có 38 chủng vi khuẩn có hình thái khác nhau. Các chủng vi khuẩn nội sinh này phân bố ở tất cả các phần của cây gỗ nhưng thành phần vi khuẩn phân bố không đồng đều ở các tầng của cây gỗ. Phần vỏ thu được 28 chủng (chiếm 32% tổng số chủng thu được), phần tượng tầng thu được 38 chủng (chiếm 42% tổng số chủng thu được), phần gỗ thu được 21 chủng (chiếm 24% tổng số chủng thu được). Như vậy số vi khuẩn nội sinh cây thông được tập trung chủ yếu ở phần tượng tầng của cây (Hình 3.2).



**Hình 3.2: Kết quả phân lập VSV NS cây Thông nhựa ở các vị trí khác nhau.**

Nhìn vào hình 3.2 cho thấy, vi sinh vật nội cây Thông nhựa đã tập trung chủ yếu ở phần tượng tầng của cây chiếm 42% tổng số vi sinh vật thu được, kết luận này cho thấy khi phân lập vi sinh vật nội sinh thực vật nên tập trung tại các vùng tượng tầng của cây.

Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng VSV phân lập được có khác nhau về màu sắc và sự phát triển của chúng, kết quả mô tả sơ bộ được trình bày tại Bảng 3.3.

**Bảng 3.3: Đặc điểm hình thái và tính chất nuôi cấy của một số chủng VKNS phân lập từ cây Thông nhựa.**

<b>ST T</b>	<b>Tên chủng</b>	<b>Đặc điểm của khuẩn lạc</b>
1	QI1	Màu trắng đục, khuẩn lạc dày, mịn, bóng, mọc đều
2	CI2	Màu nâu xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tua rua, hơi sần ở viền khuẩn lạc
3	CI3	Màu kem nhạt, khuẩn lạc mỏng, mọc tua, sần ở giữa khuẩn lạc.
4	CI4	Màu nâu vàng, Khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
5	CI5	Màu trắng sữa, khuẩn lạc bình thường, mọc tua ở 2 viền
6	CI6	Màu trắng sữa, khuẩn lạc mỏng, mọc mịn
7	CI7	Màu trắng đục, khuẩn lạc rất dày, mọc lan rộng
8	CI9	Màu trắng ngà, khuẩn lạc trung bình, mọc sun sun
9	CI10	Màu ngà vàng, khuẩn lạc mỏng, hình tròn đồng tâm
10	CI11	Màu vàng tươi, khuẩn lạc mỏng mọc mấp mô
11	CI12	Màu xanh nhạt, khuẩn lạc trung bình, khuẩn lạc xù xì
12	CI13	Màu trắng ngà, khuẩn lạc trung bình, mọc tua tua
13	QI8	Màu trắng đục khuẩn lạc dày, mọc sần tua ở viền.
14	QI9	Màu trắng hơi đục, khuẩn lạc dày, mọc mịn.
15	QI10	Màu vàng tươi khuẩn lạc bình thường, mọc hơi sần.
16	QI11	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tròn
17	QI12	Màu xanh nhạt, khuẩn lạc bình thường mọc mịn
18	QI13	Màu vàng sẫm khuẩn lạc bình thường, hơi khô ở giữa mọc các hạt sần.
19	QI14	Màu trắng đục, khuẩn lạc bình thường, hơi có tua ở viền.
20	QI15	Màu vàng, dày vừa phải, mọc lan rộng
21	QI16	Màu xanh lam khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
22	QI17	Màu vàng nghệ, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
23	QI19	Màu nâu nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.

24	QI20	Màu nâu đỏ khuẩn lạc bình thường, mọc sần hình răng cưa.
25	QI21	Màu nâu sẫm khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
26	QI23	Màu hồng nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
27	QI24	Màu tím nhạt nhạt, khuẩn lạc mỏng, hơi sần, mọc lan.
28	QI25	Màu vàng kem, khuẩn lạc dày, mọc mịn.
29	QI26	Màu kem khuẩn lạc dày, mọc đều mịn.
30	QI27	Màu vàng kem nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc chòm.
31	QI29	Màu nâu đất, khuẩn lạc mỏng, mọc mịn.
32	QI30	Màu trắng đục, mọc dày và bóng
33	QI31	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tròn
34	QI32	Màu vàng, dày vừa phải, mọc lan rộng
35	QI33	Màu trắng trong, dày, mọc sun sun
36	QI34	Màu đất, nuôi dài có sọc xanh thẫm ở giữa, khuẩn lạc bình thường, có sần ở viền
37	QI35	Màu trắng trong, mọc mỏng
38	QI36	Màu ngà vàng, mọc dày khuẩn lạc mọc mịn

Qua kết quả Bảng 3.3 cho thấy vi khuẩn nội sinh cây Thông nhựa rất phong phú, được đặc trưng với nhiều màu sắc khác nhau: từ màu trắng trong, trắng đục, đến vàng nhạt, vàng sẫm, xanh nhạt, xanh lam vv..., từ hình dạng và độ dày khuẩn lạc. Tuyến chọn các chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao và hiệu lực lớn trong đối kháng với nấm gây bệnh thối cổ rễ được tuyến chọn từ 38 chủng vi sinh vật này.

#### 3.1.2.2. Kết quả tuyến chọn vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA

Các chủng vi khuẩn đưa vào thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp IAA. Kết quả cho thấy 25/38 chủng có phản ứng dương tính với thuốc thử Salkowski. Các dịch của thuốc thử lần lượt chuyển đổi màu hồng, hàm lượng IAA thô đã được sinh ra. Tuy nhiên với hàm lượng sinh IAA của các chủng là khác nhau do vậy màu sắc của thuốc thử cũng khác nhau. Để định lượng được khả năng sinh tổng hợp IAA thí nghiệm được tiếp tục với các

ngiên cứu để xác định hàm lượng IAA được sinh ra ở mỗi chủng khuẩn. Dụng đồ thị đường chuẩn và xác định khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn kết quả được trình bày ở Bảng 3.4.

**Bảng 3.4: Khả năng sinh IAA của một số chủng VKNS cây Thông nhựa.**

STT	Tên chủng	Phản ứng với thuốc thử Salkowski	Hàm lượng IAA thu được (mg/l)
1	<b>QI1</b>	+	<b>11,872</b>
2	CI2	+	0,64
3	CI3	+	0,576
4	CI4	+	1,952
5	CI5	+	5,344
6	CI6	+	2,944
7	CI7	+	0,48
8	CI9	-	0
9	CI10	-	0
10	CI11	-	0
11	CI12	-	0
12	CI13	-	0
13	<b>QI8</b>	+	<b>15,328</b>
14	QI9	+	0,064
15	QI10	+	0,48
16	QI11	+	0,48
17	QI12	+	1,792
18	QI13	+	0,64
19	QI14	+	4,416
20	QI15	-	0
21	QI16	+	4,784
22	QI17	+	0
23	QI19	+	1,696



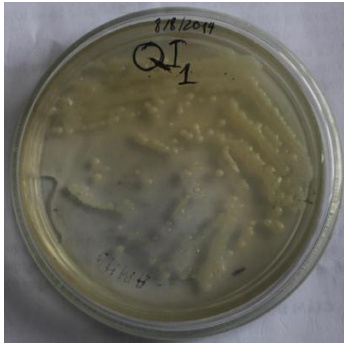
24	QI20	+	0,832
25	QI21	+	1,76
26	QI23	-	3,36
27	QI24	+	9,312
28	QI25	+	5,312
29	QI26	+	0,352
30	QI27	+	2,944
31	QI29	+	0,864
32	QI30	-	0
33	QI31	-	0
34	QI32	-	0
35	QI33	-	0
36	QI34	+	3,36
37	QI35	-	0
38	QI36	-	0

Chú thích:

(+) *Có phản ứng dương tính với thuốc thử Salkowski, lên màu tím hồng nghĩa là có sinh tổng hợp IAA*

(-) *Không có phản ứng với thuốc thử Salkowski nghĩa là không sinh tổng hợp IAA.*

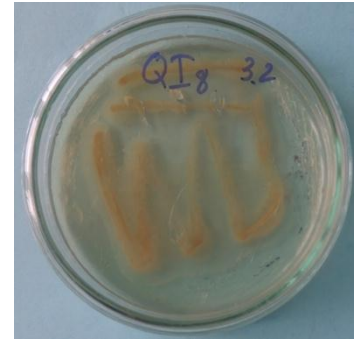
Qua kết quả Bảng 3.4, các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA, có 25 chủng phản ứng dương tính với thuốc thử, khi đưa vào thử nghiệm chúng đều có khả năng sinh tổng hợp IAA, nhưng khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng là khác nhau. Có những chủng rất mạnh như chủng QI8 (Hình 3.5), chủng QI1 (Hình 3.3), có khả năng tổng hợp được 15,382 và 11,872 mgIAA/l, tuy nhiên có những chủng chỉ có khả năng tổng hợp IAA nhưng kết quả tổng hợp được không đáng kể QI26 (Hình 3.6) chỉ tổng hợp được 0,352 mgIAA/l. Chủng QI1 và chủng QI8 được chọn đưa vào cho các nghiên cứu tiếp theo. Dưới đây là một số hình ảnh của các chủng vi khuẩn sinh IAA.



Hình 3.3: Chủng vi khuẩn QI8



Hình 3.4: Chủng vi khuẩn CI6



Hình 3.5: Chủng vi khuẩn QI8



Hình 3.6: Chủng vi khuẩn QI26



Hình 3.7: Chủng vi khuẩn QI24



Hình 3.8: Chủng vi khuẩn QI23



Hình 3.9: Hoá chất IAA xây dựng đường chuẩn



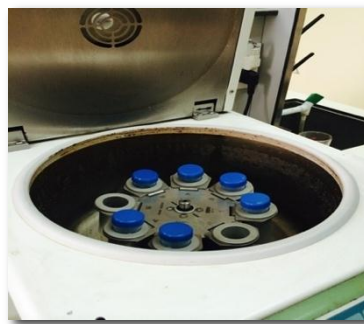
Hình 3.10: Đường chuẩn IAA.



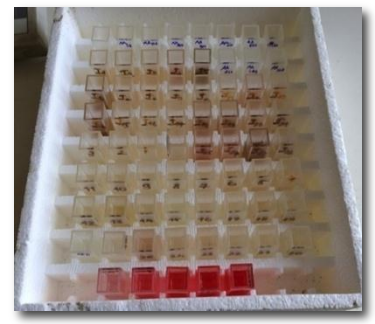
Hình 3.11: NCS phân lập VKNS



Hình 3.12: Nhân sinh khối chủng VK



Hình 3.13: Li tâm chủng VK



Hình 3.14: Ống nghiệm chứa dịch IAA .

3.1.2.3. Kết quả tuyển chọn VSV nội sinh cây Thông nhựa đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ.

Trong 38 chủng vi khuẩn được tìm thấy khi phân lập vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa, đưa vào thử nghiệm khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa. Kết quả thí nghiệm thu được sau 7 ngày và 10 ngày thử nghiệm, được trình bày ở Bảng 3.5.

**Bảng 3.5 : Hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ thông của VKNS cây Thông nhựa**

STT	Tên chủng	Đường kính ức chế (mm) sau 7 ngày	Đường kính ức chế (mm) sau 10 ngày
1	QI1	16,6	20,1
2	CI2	6,2	9,3
3	CI3	0	0
4	CI4	0	0
5	CI5	13,4	15,5
6	CI6	9,1	11,5
7	CI7	0	0
8	CI9	12,5	14,6
9	CI10	10,4	13,3
10	CI11	0	0
11	CI12	8,2	9,1
12	CI13	2,3	4,5
13	QI8	11,4	17,7
14	QI9	14,2	15,2
15	QI10	0	0
16	QI11	0	0
17	QI12	5,2	10,3
18	QI13	0	0
19	QI14	0	5,13

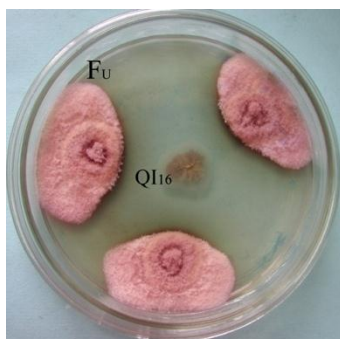
20	QI15	12,5	19
21	QI16	5,2	<b>20,5</b>
22	QI17	0	0
23	QI19	0	0
24	QI20	10,2	18,5
25	QI21	13,6	19,3
26	QI23	12,3	17,3
27	QI24	8,1	<b>22,1</b>
28	QI25	4,2	9,4
29	QI26	0	0
30	QI27	13,2	17,1
31	QI29	15,3	18,2
32	QI30	0	0
33	QI31	14,3	18,5
34	QI32	0	0
35	QI33	12,5	14,3
36	QI34	0	0
37	QI35	0	0
38	QI36	0	0

Trong 38 chủng vi khuẩn (VK) nội sinh cây thông có 23 chủng (chiếm 60% tổng số chủng phân lập) có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa, trong đó 3 chủng có khả năng ức chế và tiêu diệt nấm gây bệnh, đó là những chủng QI1, QI16, QI24, (đường kính vòng ức chế từ 20-22 mm). Có 13 chủng được phân lập không có khả năng ức chế bệnh, khi đưa vào thử nghiệm khuẩn và nấm bệnh cùng mọc tràn lan, hoặc nấm bệnh mọc trùm lên khuẩn, có 3 chủng có khả năng kháng nấm bệnh yếu, có 6 chủng có khả năng kháng nấm bệnh ở mức độ trung bình và 13 chủng có khả năng kháng và tiêu diệt nấm bệnh là rất tốt.

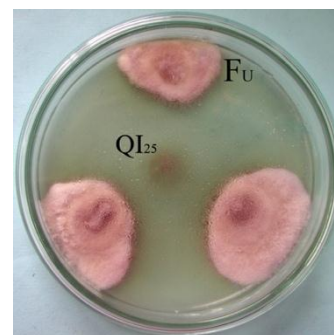
Thông qua nghiên cứu tuyển chọn VSV nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh cho thông, các chủng QI1, QI8, QI16, QI24 đã được lựa chọn vì các ưu điểm mà chúng mang lại. Chủng **QI1** có khả năng sinh tổng hợp IAA rất mạnh đạt 11,872 mg/l IAA, và chúng còn có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất mạnh đạt vòng ức chế 20,1mm sau 10 ngày thí nghiệm (Hình 3.15). Chủng **QI8** có khả năng sinh tổng hợp IAA rất mạnh đạt 15,328mg/l IAA và chúng còn có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng khá đạt vòng ức chế 17,7mm sau 10 ngày thí nghiệm. Chủng **QI16** có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất mạnh đạt vòng ức chế 20,5mm sau 10 ngày thí nghiệm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 4,784mg/l IAA (Hình 3.16). Chủng **QI24** có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa mạnh đường kính vòng phân giải lớn nhất là 22,1mm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 9,312/l IAA (Hình 3.15). ). Khi chỉ nuôi cấy chủng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa không có vi khuẩn kháng nấm, nấm gây bệnh đã mọc kín không có vòng đối kháng (Hình 3.12) Vì vậy 4 vi khuẩn QI1, QI8, QI16, QI24 được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



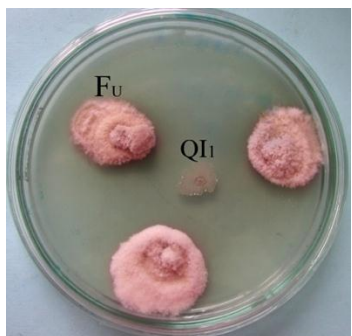
Hình 3.15: Chủng QI24 đối kháng nấm *F.oxysporum*



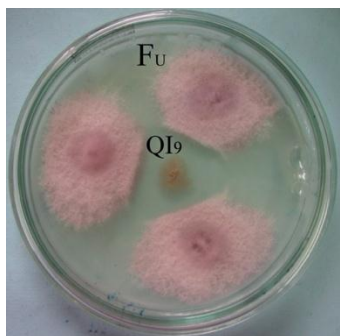
Hình 3.16: Chủng QI16 đối kháng nấm *F.oxysporum*



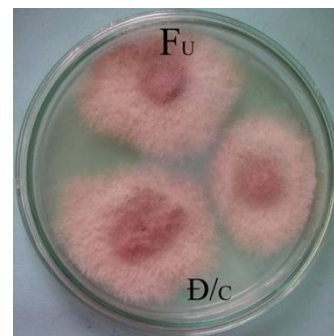
Hình 3.17: Chủng QI25 đối kháng nấm *F.oxysporum*



Hình 3.18: Chủng QI1 đối kháng nấm *F.oxysporum*



Hình 3.19: Chủng QI9 đối kháng nấm *F.oxysporum*



Hình 3.20: Nấm *Foxysporum* không cây VK

### 3.1.3. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải photphat khó tan.

#### 3.1.3.1. Phân lập vi sinh vật phân giải photphat khó tan

Từ 30 mẫu đất rừng thu được ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam đã phân lập 35 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải lân. Ký hiệu chủng, mật độ tế bào, thời gian hình thành vòng phân giải và một số đặc điểm hình thái của các chủng vi sinh vật phân giải lân được trình bày ở Bảng 3.6.

**Bảng 3.6: Đặc điểm hình thái và tính chất nuôi cấy của các chủng vi khuẩn phân giải lân**

TT	Ký hiệu chủng	Mật độ (CFU/g)	Thời gian (ngày)	Đặc điểm của khuẩn lạc
1	N1.1	$2,8 \times 10^6$	2	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng.
2	N1.2	$2,0 \times 10^4$	3	Màu vàng, dày vừa phải
3	N1.3	$5,0 \times 10^6$	2	Màu trắng trong, dày.
4	N2.1	$4,9 \times 10^6$	4	Màu vàng kem, mặt khuẩn lạc sần, mỏng, mọc zích zắc, hơi tua.
5	N2.3	$3,6 \times 10^7$	3	Màu vàng, khuẩn lạc dày, mọc tròn đều
6	N3.2	$3,0 \times 10^6$	2	Màu hơi hồng, khuẩn lạc mỏng
7	N4.2	$6,0 \times 10^7$	2	Màu trắng đục, mọc dày và bóng
8	N4.1	$6,0 \times 10^6$	3	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng
9	N5.1	$4,7 \times 10^7$	3	Màu vàng, mép gợn sóng, khuẩn lạc mỏng
10	N6.1	$5,0 \times 10^6$	3	Màu trắng đục, khuẩn lạc dày, mọc tròn đều
11	N9.2	$4,1 \times 10^7$	3	Màu hơi ngà xanh, khuẩn lạc dày
12	N10.2	$1,8 \times 10^7$	2	Màu trắng ngà, dày trung bình
13	B1.1	$3,2 \times 10^7$	3	Màu ngà vàng, dày trung bình
14	B2.1	$1,0 \times 10^6$	2	Màu trắng sau chuyển sang vàng, mỏng
15	B3.1	$5,5 \times 10^7$	3	Màu ngà vàng, khuẩn lạc mỏng
16	B4.3	$4,0 \times 10^7$	2	Màu vàng, khuẩn lạc dày

17	B5.1	$3,0 \times 10^7$	3	Màu vàng, khuẩn lạc mỏng
18	B6.1	$2,0 \times 10^6$	4	Màu đỏ, khuẩn lạc mỏng
19	B7.1	$3,2 \times 10^7$	4	Màu xanh, khuẩn lạc dày trung bình.
20	B7.2	$4,0 \times 10^6$	2	Màu vàng nhạt, khuẩn lạc dày.
21	B8.1	$6,1 \times 10^7$	2	Màu ngà vàng, hơi có vân, khuẩn lạc mỏng
22	B8.3	$3,0 \times 10^4$	4	Màu trắng đục, khuẩn lạc dày
23	B9.1	$4,5 \times 10^7$	3	Màu vàng sẫm, khuẩn lạc mỏng
24	B9.2	$1,0 \times 10^6$	3	Màu tím, khuẩn lạc trung bình
25	V1.1	$4,5 \times 10^7$	3	Màu trắng ngà, khuẩn lạc trung bình
26	V1.2	$1,0 \times 10^7$	2	Màu ngà vàng, khuẩn lạc mỏng
27	V2.2	$5,5 \times 10^7$	3	Màu vàng tươi, khuẩn lạc trung bình
28	V2.3	$4,0 \times 10^6$	3	Màu xanh nhạt, khuẩn lạc xù xì
29	V3.2	$2,9 \times 10^7$	4	Màu hồng, cứng, khuẩn lạc dày, khô, mọc múi
30	V4.2	$5,2 \times 10^7$	3	Màu trắng trong, khuẩn lạc mọc nhanh dày, bóng mịn
31	V5.1	$2,8 \times 10^6$	2	Màu trắng đục, mọc dày và bóng
32	V6.1	$7,2 \times 10^5$	3	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng.
33	V7.3	$3,2 \times 10^6$	2	Màu vàng, dày vừa phải
34	V8.2	$1,9 \times 10^5$	4	Màu trắng trong, dày.
35	V9.1	$2,6 \times 10^5$	3	Màu vàng, mặt khuẩn lạc sánh, mỏng

Qua Bảng 3.6 cho thấy 35 chủng vi sinh vật đã được phân lập có khả năng phân giải lân. Các chủng phân giải lân có màu sắc khá phong phú, màu trắng, vàng, xanh nhạt, xanh, xám, nâu, hồng v v.... Hình dạng của các chủng khuẩn cũng khác nhau khá rõ ràng, có loại khuẩn lạc dày, có loài khuẩn lạc mỏng, có loài mọc theo hình gợn sóng, có loài mặt khuẩn lạc nhẵn

neoh vv..., số lượng khuẩn lạc đạt được ở các chủng cũng có sự khác nhau. Chủng có số lượng khuẩn lạc cao như chủng B8.1, N4.2 có tới  $6,0 \times 10^7$  CFU/1g đất, V2.2 có  $5,5 \times 10^7$  CFU/1g đất. Một số chủng có số lượng khuẩn lạc rất ít đó là các chủng N1.2, B8.3 chỉ có số lượng khuẩn lạc từ  $2,5 - 3,5 \times 10^4$  CFU/1g đất (chỉ bằng 1/1000 so với chủng có số bào tử khuẩn lớn nhất). Như vậy có thể thấy rằng có những mẫu đất lượng khuẩn phân giải lân là rất lớn nhưng lại có những mẫu đất không có hoặc rất ít vi khuẩn phân giải lân. Các chủng vi sinh vật đã được phân lập, nuôi cấy thuần khiết và tuyển chọn chủng có hiệu lực cao.

### 3.1.3.2. Tuyển chọn các chủng VSV phân giải phốt phát khó tan.

+) Tuyển chọn thông qua phương pháp, đo đường kính vòng phân giải.

Với 35 chủng VSV có khả năng phân giải phốt phát khó tan thí nghiệm được tiến hành trên môi trường Pikovskaya ở các khoảng thời gian khác nhau là 1,3,5,7 ngày tiến hành đo đường kính vòng phân giải phốt phát khó tan kết quả được trình bày ở Bảng 3.7.

**Bảng 3.7: Khả năng phân giải phốt phát khó tan của VK theo thời gian.**

TT	Ký hiệu chủng VSV	Đường kính vòng phân giải tính theo thời gian (mm)			
		1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
1	N1.1	2,0	6,0	8,0	12,5
2	N1.2	5,0	9,8	15,2	17,5
3	N1.3	1,5	6,5	8,3	9,5
4	N2.1	6,5	13,2	19,5	<b>23,0</b>
5	N2.3	5,0	12,0	17,5	<b>21,0</b>
6	N3.2	2,0	4,6	5,6	6,8
7	N4.2	4,2	10,5	16,0	8,9
8	N4.1	2,4	3,2	4,4	5,6



9	N5.1	8,0	14,0	16,4	17,0
10	N6.1	3,0	8,0	11,0	18,5
11	N9.2	2,4	4,2	5,0	8,5
12	N10.2	2,0	6,5	10,0	17,6
13	B1.1	3,0	7,0	12,5	16,6
14	B2.1	2,0	6,0	8,0	11,0
15	B3.1	5,0	9,8	17,2	17,5
16	B4.3	1,5	6,4	8,6	10,5
17	B5.1	0	2,4	4,1	4,4
18	B6.1	0	1,8	2,8	5,0
19	B7.1	5,0	10,4	16,6	17,1
20	B7.2	5,0	8,2	10,2	15,2
21	B8.1	2,0	5,3	8,2	9,3
22	B8.3	0	3,2	5,1	5,6
23	B9.1	2,0	6,1	8,0	8,0
24	B9.2	5,0	9,8	17,2	18,0
25	V1.1	1,5	6,3	6,6	7,8
26	V1.2	2,0	6,0	8,0	9,5
27	V2.2	0	2,0	4,6	5,3
28	V2.3	0	2,1	3,0	4,8
29	V3.2	0	6,0	9,0	19,2
30	V4.2	4,2	10,5	14,8	20,2
31	V5.1	0	1,5	2,6	2,6
32	V6.1	0	2,0	2,8	2,8
33	V7.3	0	2,2	4,0	8,8
34	V8.2	0	6,5	9,0	14,2
35	V9.1	4,0	10,3	12,8	14,6

Trong số 35 chủng VSV có khả năng phân giải phốt phát khó tan, có 18 chủng có khả năng phân giải lân cao, có đường kính vòng phân giải > 10 mm, (chiếm 51,4 % tổng số chủng phân lập được); có 8 chủng có khả năng phân giải phốt phát ở mức độ trung bình (chiếm khoảng 22,8 % tổng số chủng phân lập được); có 9 chủng có khả năng phân giải lân ở mức độ yếu (chiếm khoảng 27 % tổng số chủng phân lập được); có tới 13 chủng có khả năng phân giải lân rất cao đường kính vòng phân giải >15 mm.

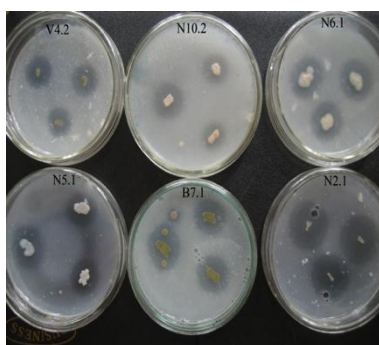
+) Kết quả tuyển chọn vi sinh vật phân giải phốt phát khó tan trên máy so màu Quang phổ có bước sóng 430nm

Như vậy số chủng vi sinh vật phân giải lân được phân lập, đều có khả năng phân giải lân, nhưng ở những mức độ khác nhau. Lấy 13 chủng có đường kính vòng phân giải cao nhất đưa vào nghiên cứu định lượng bằng so màu trên máy Quang phổ có bước sóng 430nm, tính lượng lân được sinh ra từ các chủng vi khuẩn. Kết quả được trình bày tại Bảng 3.8

**Bảng 3.8: Khả năng phân giải phốt phát khó tan của các chủng VK**

ST T	Ký hiệu chủng	ĐK vòng pg sau 7 ngày(mm)	Nồng độ lân để tiêu (ppm)
	Mẫu đối chứng không cấy vi khuẩn		43,95
1	N1.2	17,5	367,62
2	<b>N2.1</b>	<b>23.0</b>	420,13
3	<b>N2.3</b>	<b>21.0</b>	427,75
4	N5.1	17,0	288,00
5	N6.1	18,0	202,37
6	N10.2	17,6	271,32
7	B1.1	16,6	344,00
8	B3.1	17,5	305,63
9	B7.1	17,0	346,62
10	B7.2	15,2	374,00
11	B9.2	18,0	243,63
12	V3.2	19,2	335,26
13	V4.2	20,2	410,03

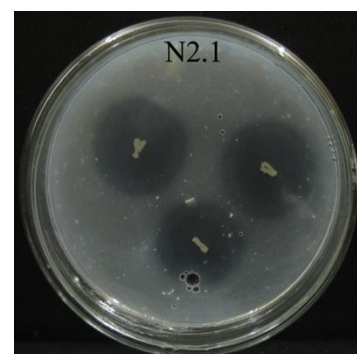
Có 2 chủng N2.3, N2.1 có đường kính vòng phân giải cao nhất từ 21-23mm và nồng độ lân dễ tiêu > 420ppm gấp khoảng 10 lần so với đối chứng. Các chủng vi khuẩn khi được phân tích định tính đường kính vòng phân giải của lượng lân dễ tiêu đã cho kết quả khá chính xác. Kết quả này một lần nữa lại được khẳng định, khi đưa 13 chủng có vòng phân giải cao nhất vào phân tích định lượng bằng so màu trên máy quang phổ có bước sóng 430nm ít có sự khác biệt khi dùng kết quả của phân tích định tính, các chủng có vòng phân giải lớn đồng thời cũng là những chủng có hàm lượng lân dễ tiêu lớn. Dựa trên đường kính vòng phân giải và nồng độ lân dễ tiêu được phân giải đã tuyển chọn được 2 chủng có hoạt tính phân giải lân cao nhất, là những chủng N2.3 (Hình 3.26) và chủng N2.1 (Hình 3.23) đưa vào thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Dưới đây là một số hình ảnh khuẩn lạc chủng vi khuẩn phân giải photphat khó tan (Hình 3.21 – 3.26):



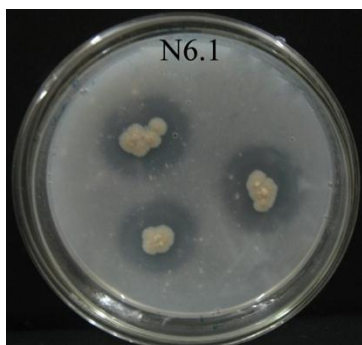
**Hình 3.21: Các chủng VK phân giải photphat khó tan**



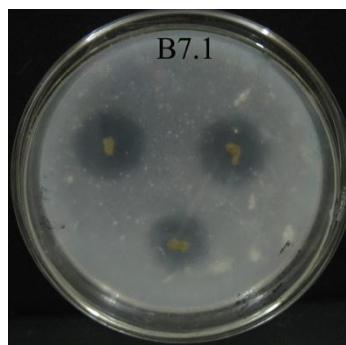
**Hình 3.22: Chủng vi khuẩn N5.1**



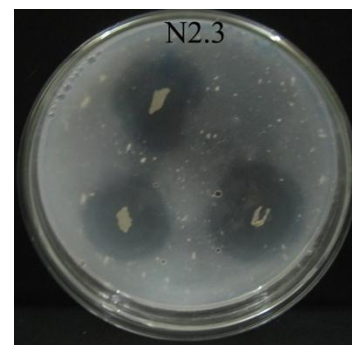
**Hình 3.23: Chủng vi khuẩn N2.1**



**Hình 3.24: Chủng vi khuẩn N6.1**



**Hình 3.25: Chủng vi khuẩn B7.1**



**Hình 3.26: Chủng vi khuẩn N2.3**

### 3.1.3.3. Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitơ

Với 35 chủng vi khuẩn phân giải lân được phân lập từ đất thu thập ở các tỉnh phía Bắc, tiếp tục thử nghiệm khả năng cố định nitơ. Kết quả tuyển

chọn các chủng có khả năng cố định nitơ mạnh dựa vào phản ứng màu với thuốc thử Nessler bằng phương pháp Kjeldahl. Thử nghiệm khả năng cố định nitơ của các chủng được trình bày tại Bảng 3.9.

**Bảng 3.9: Khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn.**

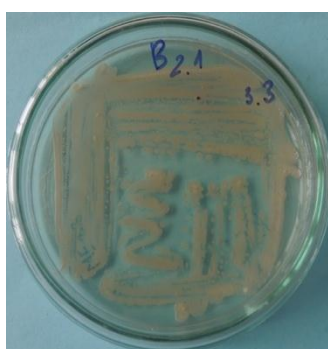
TT	Ký hiệu chủng	Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/ml)	Mức độ cố định nitơ
1	N1.1	2,05	Trung bình
2	N1.2	0	Không cố định N <sub>2</sub>
3	N1.3	1,08	Yếu
4	N2.1	3,12	Mạnh
5	N2.3	3,04	Mạnh
6	N3.2	0	Không cố định N <sub>2</sub>
7	N4.2	0	Không cố định N <sub>2</sub>
8	N4.1	1,76	Yếu
9	N5.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
10	N6.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
11	N9.2	1,32	Yếu
12	N10.2	2,12	Mạnh
13	B1.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
14	B2.1	1,02	Yếu
15	B3.1	2,08	Trung bình
16	B4.3	2,14	Trung bình
17	B5.1	1,34	Yếu
18	B6.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
19	B7.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
20	B7.2	0	Không cố định N <sub>2</sub>
21	B8.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
22	B8.3	2,14	Trung bình

23	B9.1	1,34	Yếu
24	B9.2	0	Không cố định N2
25	V1.1	3,05	Mạnh
26	V1.2	2,76	Trung bình
27	V2.2	1,08	Yếu
28	V2.3	2,14	Trung bình
29	<b>V3.2</b>	<b>3,34</b>	Mạnh
30	<b>V4.2</b>	<b>4,18</b>	Mạnh
31	V5.1	0	Không cố định N2
32	V6.1	1,46	Yếu
33	V7.3	0	Không cố định N2
34	V8.2	0	Không cố định N2
35	V9.1	3,21	Mạnh

Thông qua kết quả ở Bảng 3.9 cho thấy khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn là rất khác nhau. Có 21/35 chủng (chiếm 60%) các chủng có khả năng cố định nitơ. Tuy nhiên ở những chủng có khả năng cố định nitơ này cũng có sự khác biệt đáng kể, có 7 chủng (chiếm 33% những chủng có khả năng cố định nitơ) với hoạt tính cố định nitơ mạnh  $> 3,0 \text{ mg/ml NH}_4^+$ ; có 8 chủng cố định nitơ với hoạt tính yếu  $< 2 \text{ mg/ml NH}_4^+$ ; có 6 chủng với hoạt tính cố định nitơ ở mức độ trung bình trong khoảng 2- 3  $\text{mg/ml NH}_4^+$ . Dựa vào kết quả ở bảng trên, 2 chủng V2.3 và V4.2 được chọn đưa vào các nghiên cứu tiếp để đưa vào sản xuất phân vi sinh đa chủng.

Qua việc nghiên cứu tuyển chọn chủng vi khuẩn vừa có khả năng phân giải phốt phát khó tan vừa có khả năng cố định nitơ, kết quả cho thấy: Chủng N2.1 có khả năng phân giải phốt phát khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 23 mm nồng độ lân dễ tiêu đạt 420,13ppm và có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 3,12  $\text{mg/ml NH}_4^+$  (Hình 3.27) Chủng N2.3 có khả năng phân giải phốt phát khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 21 mm nồng độ lân dễ

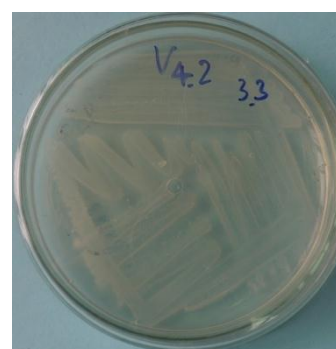
tiêu đạt 427,75 ppm và có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 3,04 mg/ml  $\text{NH}_4^+$  (Hình 3.32). Chủng V3.2 (Hình 3.28) có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 3,34 mg/ml  $\text{NH}_4^+$  và có khả năng phân giải phốt phát khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 19,2 mm nồng độ lân dễ tiêu đạt 335,26 ppm. Chủng V4.2 có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 4,18 mg/ml  $\text{NH}_4^+$  và có khả năng phân giải phốt phát khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 20,2 mm nồng độ lân dễ tiêu đạt 410,03 ppm (Hình 3.29). Với những ưu điểm trên 4 chủng N2.1, N2.3, V2.3 và V4.2 được lựa chọn đưa vào các nghiên cứu tiếp.



Hình 3.27: Chủng vi khuẩn  
B2.1



Hình 3.28: Chủng vi  
khuẩn V3.2



Hình 3.29: Chủng vi khuẩn  
V4.2



Hình 3.30: Chủng vi khuẩn  
B8.3



Hình 3.31: Chủng vi khuẩn  
N2.1



Hình 3.32: Chủng vi khuẩn  
N2.3

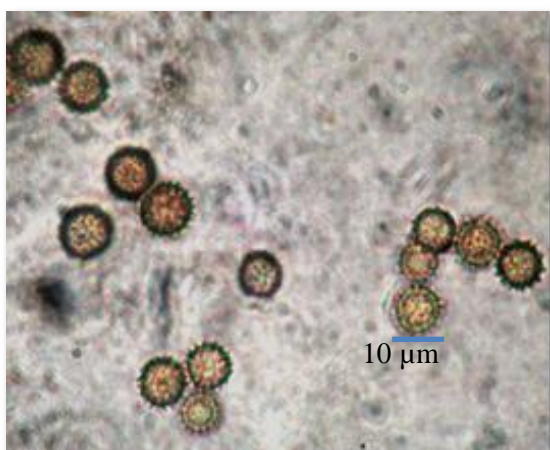
### 3.2. Đặc điểm hình thái và sinh học các chủng VSV có hiệu lực cao

#### 3.2.1. Đặc điểm hình thái các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.

##### 3.2.1.1 Đặc điểm hình thái của nấm cộng sinh có hiệu lực cộng sinh cao.

Qua nghiên cứu nấm *P.tinctorius* cộng sinh cây Thông nhựa cho thấy đặc điểm của loài có thể quả hình cầu hoặc gần cầu, có đường kính từ 2,9 - 17,5cm, màu nâu, có các vết nứt màu đen trên tán, thể quả có cuống và rễ màu vàng, cuống dài 1,5-4,5cm, đường kính 1,2-3,5cm, cuống nấm thuần dài cắm

sâu vào lòng đất (Hình 3.34). Khi chín nứt ra, ở phía trên để lại bên trong một khối bột màu vàng. Soi trên kính hiển vi cho thấy bào tử của nấm *P. tinctorius* có hình cầu, có gai xung quanh, kích thước bào tử 8-12 $\mu$ m (Hình 3.33). Nấm thường mọc tập trung 2- 3 thể quả gần nhau ở rừng thông, mọc cách gốc cây thông khoảng 1 – 2m, rừng có độ tàn che tán 0,4 – 0,6.



**Hình 3.33 : Bào tử nấm *P. tinctorius***

**Hình 3.34: Thể quả nấm *P.tinctorius***

**3.2.1.2. Đặc điểm hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn hiệu lực cao.**

Từ kết quả tuyển chọn các chủng VSV có ích được trình bày ở trên, 8 chủng vi khuẩn có hoạt tính tốt nhất đã được tuyển chọn nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hoá. Trong đó 2 chủng QI1 và chủng QI8 sinh tổng hợp IAA cao nhất. Chủng QI16 và chủng QI24 tạo vòng phân giải kháng nấm bệnh có đường kính lớn nhất. Chủng N2.1 và chủng N2.3 có khả năng phân giải phot phát khó tan lớn nhất. Chủng V3.2 và chủng V4.2 khả năng cố định nitơ cao nhất.

Từ các phương pháp đã trình bày ở trên 8 chủng vi khuẩn được thử nghiệm gram, nhuộm tế bào mô tả hình ảnh đo kích thước kết quả được trình bày ở Bảng 3.10.

**Bảng 3.10: Hình thái tế bào và gram của các chủng vi khuẩn có ích.**

STT	Chủng	Gram	Hình dạng tế bào	Kích thước tế bào ( $\mu\text{m}$ )
1	QI1	-	Hình que dài, có râu đầu, một bên đầu nhọn.	1,4 x 4,1
2	QI8	-	Hình hạt gạo dài, một đầu bằng, một đầu nhọn.	1,6 x 2,7
3	QI16	+	Hình que ngắn, hai đầu tế bào đều nhau.	1,8 x 2,8
4	QI24	-	Hình que ngắn, có lớp định nhày, hai đầu đều nhau.	0,9 x 2,2
5	N2.1	-	Hình que dài, có lớp lông mịn bao phủ, một bên đầu hơi nhọn, một bên đầu bằng.	1,1 x 3,1
6	N2.3	+	Hình hạt gạo ngắn, hai đầu tế bào đều nhau.	1,8 x 2,8
7	V3.2	-	Hình que cong cong, một đầu hơi nhọn	0,7 x 1,5
8	V4.2	-	Hình que dài, hai bên đầu bằng, phình to hơn ở giữa	0,9 x 3,2

Kết quả của bảng 3.10 cho thấy, hình dạng tế bào của các chủng vi khuẩn cũng khá khác biệt chiếm phần lớn là các tế bào vi khuẩn hình que có các kích thước và hình dạng khác nhau, có 2 chủng có hình hạt gạo dài, đây là hình dạng phổ biến. Trong khi đó có 1 chủng có hình dạng tế bào hình que cong, đây là một loại hình dạng tế bào hiếm gặp hơn 2 hình dạng của các loại còn lại.



### 3.2.2. Đặc điểm sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao.

#### 3.2.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn sinh tổng hợp IAA.

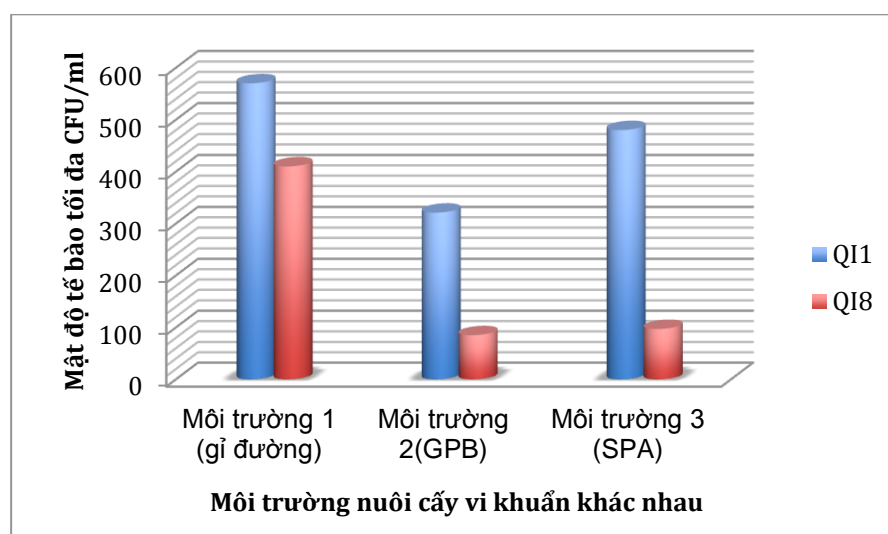
Mỗi chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tốt chúng đều phải có một môi trường phù hợp nhất định. Thử nghiệm với các loại môi trường khác nhau giúp phát hiện môi trường nuôi dưỡng thích hợp nhất với từng loại vi khuẩn. Khi thử nghiệm môi trường phù hợp chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA với 3 loại môi trường đưa vào thử nghiệm: môi trường gi đường, môi trường GPB, môi trường SPA. Kết quả sự phát triển của các chủng khuẩn được trình bày ở Bảng 3.11.

**Bảng 3.11: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp IAA của chủng QI1 và QI8.**

T	Môi trường dinh dưỡng	Chủng QI1		Chủng QI8	
		MĐ TB (CFU/ml)	HL IAA thô (mg/l)	MĐ TB (CFU/ml)	HL IAA thô (mg/l)
1	Môi trường gi đường	$5,7 \times 10^8$	12,52	$8,5 \times 10^7$	9,35
2	Môi trường GPB	$3,21 \times 10^8$	10,25	$4,1 \times 10^8$	11,41
3	Môi trường SPA	$4,7 \times 10^8$	9,74	$9,7 \times 10^7$	10,20

Các chủng khuẩn được cấy vào 3 môi trường khác nhau, ban đầu chúng đều ở dạng dịch trong và lỏng, sau thời gian nuôi 120 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 28<sup>0</sup>C, các dịch khuẩn trở nên đục và đặc sánh, như vậy trên cả 3 môi trường dinh dưỡng các chủng khuẩn đều có khả năng sinh trưởng và phát triển. Nhưng qua kết quả ở Bảng 3.11 cho thấy có sự khác nhau đáng kể về mật độ tế bào của các chủng khi được nuôi ở các môi trường khác nhau. Chủng QI1 đạt mật độ tế bào hữu hiệu cực đại là  $5,7 \times 10^8$  (CFU/ml) và hàm lượng IAA được sinh ra là cao nhất đạt 12,52mg/l khi nuôi cấy ở môi trường gi đường. Tuy nhiên chủng QI8 phát triển tốt nhất trên môi trường GPB đạt mật độ tế bào tối ưu là  $4,1 \times 10^8$  (CFU/ml) và hàm lượng IAA được sinh ra là cao nhất đạt 11,41mg/l. Tuy vậy mật độ tế bào tối ưu của chủng QI8 phát triển kém hơn (đạt 72%) so với mật độ tối ưu của chủng QI1. Ngoài ra môi trường gi đường có giá cả cạnh tranh so với các

môi trường GPB, vì thế chủng QI1 được chọn trong sản xuất chế phẩm đa chủng VSV. Mật độ tế bào tối ưu của 2 chủng vi khuẩn QI1 và chủng QI8 được nuôi cấy trên môi trường khác nhau thể hiện thông qua hình 3.35.



**Hình 3.35: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng QI1 và QI8.**

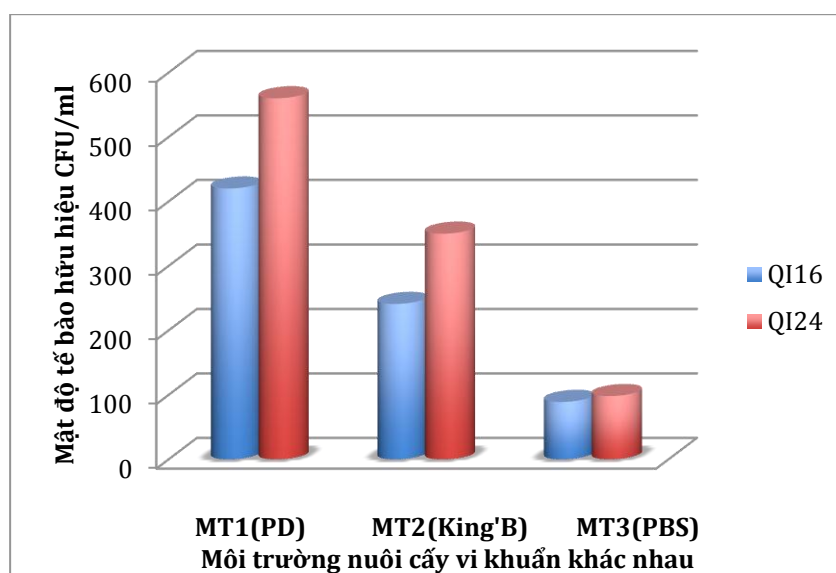
3.2.2.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến mật độ tế bào chủng vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ.

Dựa vào kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh ở trên, chủng vi khuẩn QI16 và QI24 đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ thông được đưa vào nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn này tại các môi trường khác nhau, môi trường 1: PD, môi trường 2: King'B, môi trường 3: PBS, kết quả được trình bày tại Bảng 3.12

**Bảng 3.12: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và khả năng ức chế nấm gây thối cổ rễ thông của chủng QI16 và QI24.**

TT	Môi trường dinh dưỡng	Chủng QI16		Chủng QI24	
		MĐ TB (CFU/ml)	ĐK vòng ức chế (mm)	MĐ TB (CFU/ml)	ĐK vòng ức chế (mm)
1	Môi trường 1 (PD)	$4,2 \times 10^8$	21,5	$5,6 \times 10^8$	22,5
2	Môi trường 2 (King'B)	$2,41 \times 10^8$	20,5	$3,5 \times 10^8$	20,5
3	Môi trường 3 (PBS)	$8,9 \times 10^7$	19,7	$9,8 \times 10^7$	22,3

Kết quả nuôi cấy trên 3 môi trường khác nhau cho thấy ở cả 2 chủng đều phát triển trên cả 3 môi trường, tuy nhiên có sự khác nhau rõ rệt của mật độ bào tử ở những môi trường khác nhau, ở môi trường 1 (PD) cả 2 chủng đều có kết quả vượt trội. Chủng QI16 kháng nấm bệnh, đạt mật độ tế bào là  $4,2 \times 10^8$  (CFU/ml) khi nuôi cấy ở môi trường 1 (PD), và chỉ đạt  $2,41 \times 10^7$  (CFU/ml) khi nuôi cấy ở môi trường 2 (King'B), bằng 42% so với khi nuôi cấy ở môi trường 1, và mật độ tế bào kém hơn hàng trăm lần khi nuôi cấy ở môi trường 3 (PBS). Chủng QI24 phát triển tốt nhất trên môi trường 1 (PD) đạt mật độ tế bào là  $5,6 \times 10^8$  (CFU/ml) gấp khoảng 50 lần so với khi nuôi cấy ở môi trường 3 (PBS). Chủng này cũng phát triển khá tốt trên môi trường 2 và phát triển tốt nhất trên môi trường 1. Chúng tôi chủng QI24 khá thích nghi khi thay đổi môi trường sống. Mặt khác 2 chủng QI16 và QI24 đều phát triển rất tốt trên môi trường PD nhưng chủng QI24 có khả năng phát triển vượt trội hơn. Ngoài ra môi trường PD là loại môi trường phổ thông khi nuôi cấy khuẩn lactic, giúp khuẩn phát triển tốt và giá thành cạnh tranh tốt so với các loại môi trường khác. Môi trường phù hợp của chủng vi khuẩn QI16 và QI24 được thể hiện thông qua Hình 3.36.



**Hình 3.36: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng QI16 và QI24.**

3.2.2.3. Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn phân giải phot phát khó tan.

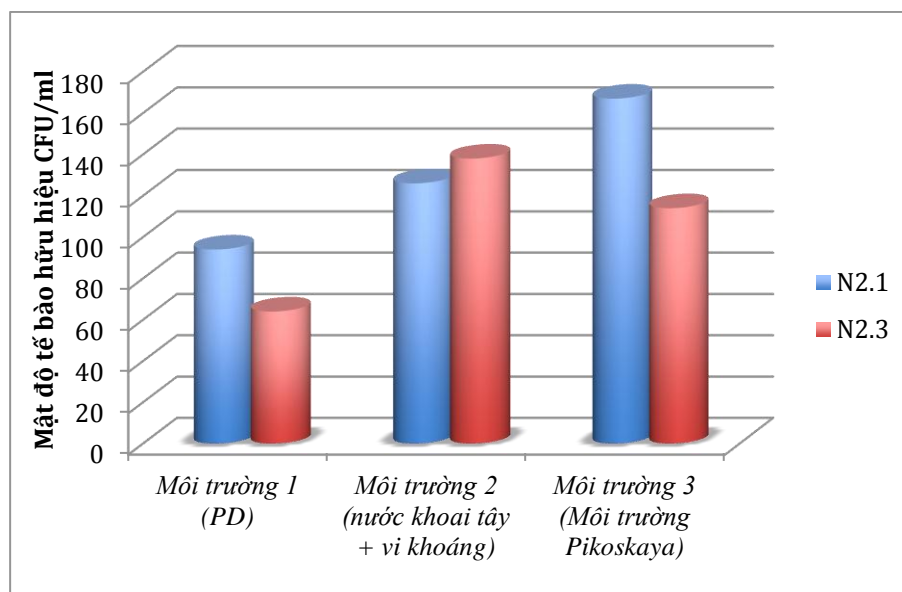
Với kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân giải phot phát khó tan ở trên, chọn 2 chủng N2.1 và N2.3 đưa thử nghiệm với 3 loại môi trường khác nhau kết quả được trình bày tại Bảng 3.13.

**Bảng 3.13: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và khả năng phân giải phot phát khó tan của chủng N2.1 và N2.3.**

TT	Môi trường dinh dưỡng	Chủng N2.1		Chủng N2.3	
		Mật độ tế bào (CFU/ml)	Nồng độ lân dễ tiêu (ppm)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	Nồng độ lân dễ tiêu (ppm)
1	MT1 (PD)	$9,4 \times 10^8$	380,12	$6,4 \times 10^8$	401,23
2	MT2 (nước khoai tây + vi khoáng)	$12,6 \times 10^8$	402,13	$13,8 \times 10^8$	307,19
3	MT3 (Pikoskaya)	$16,7 \times 10^8$	428,04	$11,4 \times 10^8$	418,45

Nhìn vào Bảng 3.13 cho thấy, chủng N2.1 đều phát triển rất tốt trên cả 3 môi trường, điều này chứng tỏ rằng chủng này dễ nuôi cấy thích nghi với nhiều loại môi trường khác nhau. Tuy nhiên chúng đạt mật độ tế bào đạt cực đại khi được nuôi cấy ở môi trường 3 (môi trường Pikoskaya) mật độ tế bào là  $16,7 \times 10^8$  CFU/ml, nhưng mật độ ở môi trường 1 (PD) chúng chỉ đạt  $9,4 \times 10^8$  CFU/ml (mật độ tế bào thấp hơn một số mũ so với môi trường 3). Chủng N2.3 cũng phát triển được trên 3 loại môi trường, nhưng phát triển yếu hơn chủng N2.1, chủng N2.3 đạt mật độ tế bào cực đại khi nuôi cấy trên môi trường 2 (nước khoai tây + vi khoáng). Sự chênh lệch về mật độ tế bào của cả 2 chủng đưa vào nghiên cứu là không đáng kể, tuy nhiên môi trường tối thích của chủng N2.1 là môi trường Pikoskaya, của chủng N2.3 là môi trường nước khoai tây + vi khoáng. Dù được nuôi cấy trên 3 môi trường

khác nhau, nhưng cả 2 chủng đều có hoạt lực phân giải photphat khó tan là khá tốt, kết quả khá rõ ràng khi được thể hiện thông qua hình Hình 3.37.



**Hình 3.37: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng N2.1 và N2.3.**

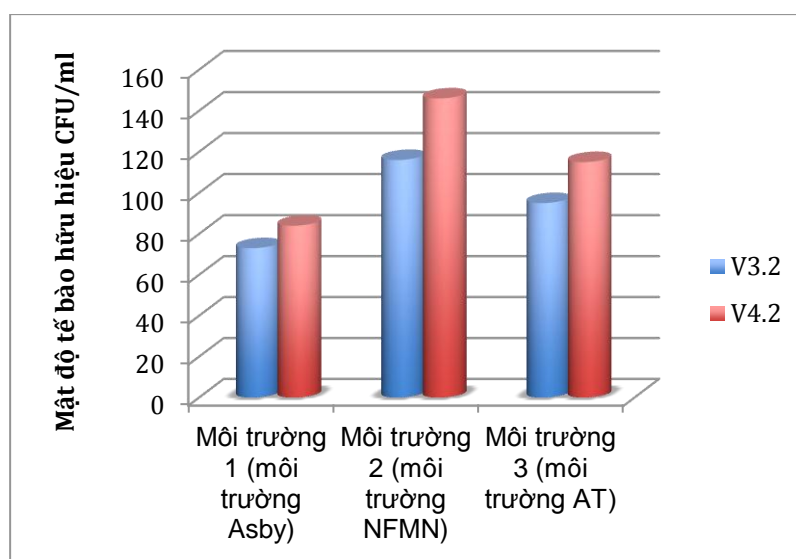
3.2.2.4. Ảnh hưởng của môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn cố định  $N_2$ .

Với kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitơ ở trên chủng V3.2 và chủng V4.2 được đưa nuôi cấy thử nghiệm với 3 loại môi trường khác nhau, môi trường 1: Asby, môi trường 2: NFMN, môi trường 3: AT, kết quả được trình bày tại Bảng 3.14.

**Bảng 3.14: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và khả năng cố định nitơ của chủng V3.2 và chủng V4.2.**

T	Môi trường dinh dưỡng	V3.2		V4.2	
		Mật độ tế bào (CFU/ml)	Hàm lượng $NH_4^+$ (mg/ml)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	Hàm lượng $NH_4^+$ (mg/ml)
1	MT1 (Môi trường Asby)	$7,3 \times 10^8$	3,01	$8,4 \times 10^8$	4,00
2	MT2 (môi trường NFMN)	$11,6 \times 10^8$	3,24	$14,6 \times 10^8$	4,15
3	MT3 (môi trường AT)	$9,5 \times 10^8$	3,18	$11,5 \times 10^8$	3,89

Số liệu ở Bảng 3.14 cho thấy, 2 chủng V3.2 và V4.2 đưa vào thử nghiệm ở các môi trường khác nhau nhưng chúng đều phát triển tốt và đạt cực đại khi được nuôi trên môi trường NFMN, tuy ở các môi trường khác chúng đều phát triển nhưng mật độ tế bào không đạt cực đại. Cụ thể chủng V4.2 khi nuôi ở môi trường 1 mật độ tế bào đạt là  $8,4 \times 10^8$  CFU/ml (chỉ bằng 57%) khi nuôi cấy môi trường 2 mật độ tế bào tối đa là  $14,6 \times 10^8$  CFU/ml. Tuy 2 chủng đều đạt mật độ tế bào đạt cực đại khi được nuôi cấy ở môi trường 2 (Môi trường NFMN), nhưng mật độ tế bào của chủng V3.2 nhỏ hơn (chiếm 80%) mật độ tế bào của chủng V4.2. Thông qua đó cũng là một gợi ý cho luận án lựa chọn chủng V4.2 để phát triển chế phẩm vi sinh vật đa chủng. Dù được nuôi ở 3 loại môi trường khác nhau nhưng 2 chủng đều vẫn giữ nguyên hoạt tính cố định nitơ tốt. Kết quả khá rõ ràng khi được thể hiện ở Hình 3.38



**Hình 3.38: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng của chủng V3.2 và chủng V4.2.**

### 3.2.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn.

Tốc độ phát triển của các loài VK là khác nhau theo thời gian, có loài phát triển rất nhanh ở thời gian đầu và chậm lại ở thời gian sau, nhưng cũng có loài phát triển chậm ở thời gian đầu và tăng tốc rất nhanh ở thời gian sau. Vì vậy nghiên cứu thời gian đạt mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng VK là cần thiết,

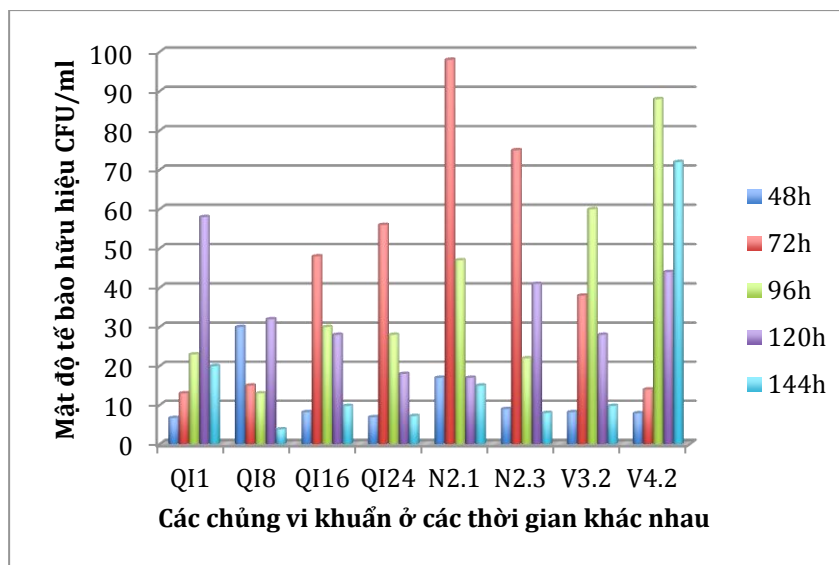
để thuận lợi cho việc nhân sinh khối VK sản xuất chế phẩm, kết quả thí nghiệm ở các thời gian nuôi cấy khác nhau được trình bày ở Bảng 3.15.

**Bảng 3.15: Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn có ích.**

T T	Thời gian	Mật độ tế bào của các chủng VK (CFU/ml)							
		QI <sub>1</sub>	QI <sub>8</sub>	QI <sub>16</sub>	QI <sub>24</sub>	N2.1	N2.3	V3.2	V4.2
1	48 giờ	6,7 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>	6,9 x 10 <sup>7</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	9,0 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>	7,9 x 10 <sup>7</sup>
2	72 giờ	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	4,8 x 10 <sup>8</sup>	5,6 x 10 <sup>8</sup>	9,8 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>
3	96 giờ	2,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	4,7 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	6,0 x 10 <sup>8</sup>	8,8 x 10 <sup>8</sup>
4	120 giờ	5,8 x 10 <sup>8</sup>	3,2 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	1,7x 10 <sup>8</sup>	4,1 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	4,8 x 10 <sup>6</sup>
5	144 giờ	2,0 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>7</sup>	9,8 x 10 <sup>7</sup>	7,2 x 10 <sup>7</sup>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	8,0 x 10 <sup>8</sup>	9,8 x 10 <sup>7</sup>	7,2 x 10 <sup>7</sup>

Với các thời gian nhân sinh khối các chủng VK khác nhau thì mật độ tế bào đạt được là khác nhau, trong 8 chủng đưa vào nghiên cứu kết quả cho thấy phần lớn các chủng đều theo quy luật thời gian tăng thì mật độ tế bào tăng, đạt cực đại ở thời gian nhất định, sau đó mật độ tế bào lại giảm dần. Trong 2 ngày đầu (48 giờ) nuôi cấy mật độ tế bào VK có trong 1ml dung dịch ở cả 8 chủng đều đạt thấp, chỉ từ 2,9 - 17 x 10<sup>7</sup> CFU/ml. Sau (72 giờ) có tới 4 chủng đạt mật độ tế bào tối đa là các chủng QI16, QI24, V2.1, V2.3, với mật độ tế bào hữu đạt được là từ 4,8 – 9,8 x 10<sup>8</sup> CFU/ml, sau đó mật độ tế bào giảm nhẹ sau ngày thứ 5 và thứ 6 (144 giờ) chỉ còn 3,8 – 7,2 x 10<sup>7</sup> CFU/ml. Với khoảng thời gian 96 giờ có 2 chủng cố định nitơ có mật độ tế bào đạt cực đại. Tuy nhiên ta thấy chủng QI8 đạt mật độ tế bào chỉ bằng 55% so với mật độ tế bào chủng QI1 cùng trong thời gian 5 ngày (120 giờ). Chủng QI16 đạt mật độ tế bào tối đa bằng 86% so với tế bào chủng QI24, chủng V2.3 đạt mật độ tế bào tối đa bằng 76% so với mật độ tế bào chủng V2.1 chủng V3.2 đạt mật độ tế bào tối đa bằng 68% so với mật độ tế bào chủng V4.2 cùng trong thời gian 3 ngày (72 giờ). Như vậy kết luận rằng, không nhất thiết phải nuôi vi khuẩn quá dài chúng chỉ đạt mật độ tối đa khi nuôi cấy tại một thời gian nhất định và mật độ tế bào sẽ có biểu hiện đi

xuống nếu thời gian được nuôi kéo dài thêm, kết quả này rất rõ khi được thể hiện ở Hình 3.39.



**Hình 3.39: Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối tới sinh trưởng của các chủng vi khuẩn.**

#### 3.2.2.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK.

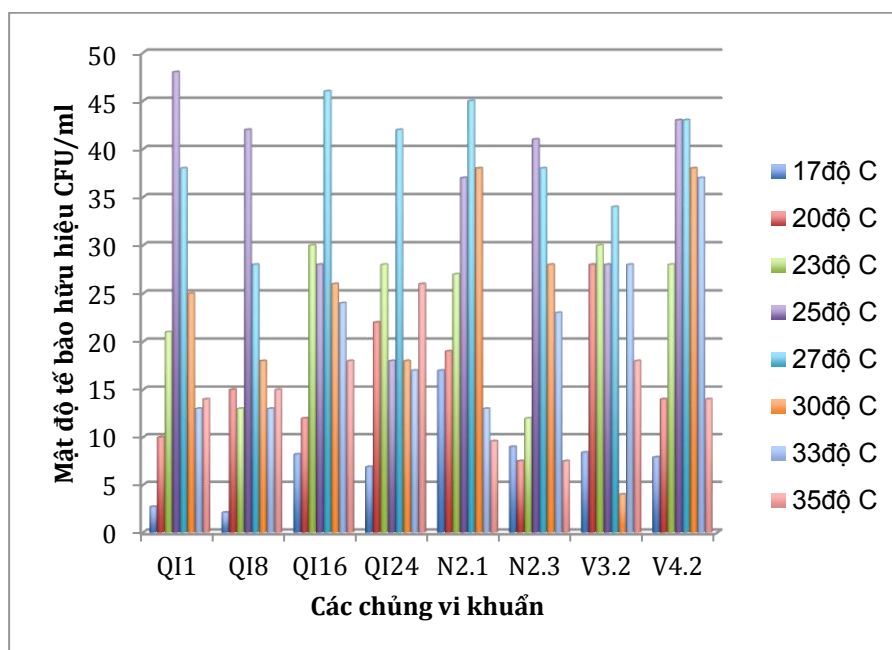
Sự phù hợp của nhiệt độ môi trường đến từng chủng VK biểu hiện ở khả năng sinh trưởng của chúng (mật độ tế bào hữu hiệu trên 1 ml dung dịch nuôi cấy là lớn nhất), ở mỗi loài VK thì sự phù hợp với các nhiệt độ là khác nhau để đảm bảo được mật độ tế bào hữu hiệu tối ưu. Thí nghiệm được thực hiện trên 8 chế độ nhiệt độ khác nhau 17<sup>0</sup>C, 20<sup>0</sup>C, 23<sup>0</sup>C, 25<sup>0</sup>C, 28<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C, 33<sup>0</sup>C và 35<sup>0</sup>C, kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.16

**Bảng 3.16: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nhân sinh khối đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn.**

T	t <sup>0</sup> C	Mật độ tế bào của các chủng VK (CFU/ml)							
		QI <sub>1</sub>	QI <sub>8</sub>	QI <sub>16</sub>	QI <sub>24</sub>	N2.1	N2.3	V3.2	V4.2
1	17 <sup>0</sup> C	2,7 x 10 <sup>7</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	8,2 x 10 <sup>7</sup>	6,9 x 10 <sup>7</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	9,0 x 10 <sup>7</sup>	8,4 x 10 <sup>7</sup>	7,9 x 10 <sup>7</sup>
2	20 <sup>0</sup> C	1,0 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>	7,5 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>
3	23 <sup>0</sup> C	2,1 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	2,7 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>
4	25 <sup>0</sup> C	4,8 x 10 <sup>8</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	3,7 x 10 <sup>8</sup>	4,1 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	4,3 x 10 <sup>8</sup>
5	27 <sup>0</sup> C	3,8 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>7</sup>	4,6 x 10 <sup>8</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>	4,5 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>	3,4 x 10 <sup>8</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>
6	30 <sup>0</sup> C	2,5 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	2,6 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>8</sup>	3,8 x 10 <sup>8</sup>
7	33 <sup>0</sup> C	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	2,3 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	3,7 x 10 <sup>8</sup>
8	35 <sup>0</sup> C	1,4 x 10 <sup>8</sup>	1,5 x 10 <sup>8</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	2,6 x 10 <sup>8</sup>	9,6 x 10 <sup>7</sup>	7,5 x 10 <sup>7</sup>	1,8 x 10 <sup>8</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>



Thông qua kết quả ở bảng 3.16 cho thấy dù ở mức nhiệt độ nghiên cứu nào chủng khuẩn cũng phát triển nhưng sự phát triển mật độ tế bào cho kết quả vô cùng khác nhau, để phân biệt được rõ ràng xem kết quả Hình 3.40.



**Hình 3.40: Ảnh hưởng của nhiệt độ nhân sinh khối tới sinh trưởng của các chủng VK.**

Nhìn vào kết quả ở biểu đồ trên cho thấy cho thấy ở ngưỡng nhiệt độ 25°C - 27°C phần lớn các chủng vi khuẩn phát triển tốt. Ở các ngưỡng nhiệt độ thấp hơn dù các chủng vi khuẩn có phát triển nhưng rất chậm. Như chủng QI1 ở khung nhiệt độ lạnh 17°C mật độ tế bào hữu hiệu chỉ đạt  $2,7 \times 10^7$  CFU/ml, tuy nhiên khi ở mức nhiệt độ tối thích là 25°C chúng phát triển (gấp 200 lần) so với khung nhiệt độ 17°C độ mật tế bào hữu hiệu  $4,8 \times 10^8$  CFU/ml. Chủng sinh tổng hợp IAA, QI8 phát triển tốt nhất đạt tế bào cực đại khi được nuôi trong điều kiện 25°C, tuy nhiên mật độ tế bào thấp hơn so với chủng QI1. Vì vậy chủng QI1 là sự lựa chọn tốt nhất để đưa vào nghiên cứu sản xuất chế phẩm đa chủng VSV.

Khi nghiên cứu chủng QI16 và chủng QI24 cho thấy, 2 chủng vi khuẩn kháng nấm này phát triển tốt nhất khi được nuôi ở khoảng nhiệt độ 25°C - 27°C. Tuy nhiên chúng đạt mật độ tế bào tối đa khi được nuôi ở 27°C và tế bào giảm dần khi nuôi ở mức nhiệt độ cao hơn. Chủng QI16 có số

lượng tế bào tối đa cao hơn chủng QI24, tuy nhiên chủng QI24 lại có biên độ phát triển rộng, phát triển tốt hơn chủng QI16 thích hợp với dải biên độ nhiệt độ rộng từ 20<sup>0</sup>C - 35<sup>0</sup>C. Trong khi chủng QI16 chỉ thích hợp với nhiệt độ 25<sup>0</sup>C - 30<sup>0</sup>C. Thông qua kết quả này chủng QI24 được ưu thế hơn, nên lựa chọn chủng vi khuẩn QI24 kháng nấm gây bệnh vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng.

So sánh giữa 2 chủng vi khuẩn phân giải lân N2.1 và N2.3 thông qua biểu đồ trên cho thấy, có sự khác biệt rõ rệt khi nuôi cấy ở các thang nhiệt độ khác nhau. Chủng N2.1 đạt mật độ tế bào tối thích khi chúng được nuôi trong điều kiện môi trường 27<sup>0</sup>C, đạt mật độ tế bào hữu hiệu là 4,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Trong khi chủng N2.3 đạt mật độ tế bào tối thích khi chúng được nuôi trong điều kiện môi trường 25<sup>0</sup>C, đạt mật độ tế bào hữu hiệu là 4,1 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Ngoài ra, ở các mức nhiệt độ thấp, chúng phát triển chậm đến khi đạt cực đại ở một mức nhiệt độ nhất định. Chủng N2.1 có ưu thế để lựa chọn vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng.

Thông qua kết quả ở hình 3.40 cho thấy, 2 chủng cố định nitơ cũng có sự khác biệt về nhiệt độ tối thích, để chủng khuẩn đạt mật độ tế bào tối đa. Chủng V4.2 có biên độ nhiệt độ lớn, chúng có thể phát triển tốt trên dải nhiệt độ từ 25<sup>0</sup>C - 33<sup>0</sup>C. Tuy nhiên khi được nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ từ 25<sup>0</sup>C - 27<sup>0</sup>C tế bào hữu hiệu đạt cực đại 4,2 – 4,3 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Trong khi chủng V3.2, cũng phát triển tốt khi thử nghiệm nhưng nhiệt độ tối thích của chủng khuẩn này thấp hơn chủng V4.2. Chủng V3.2 chỉ phát triển tốt và đạt lượng tế bào cực đại khi được nuôi ở nhiệt độ 30<sup>0</sup>C. Chủng V4.2 được lựa chọn đưa vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng.

#### *3.2.2.7. Ảnh hưởng của độ pH môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK.*

Độ pH của môi trường nuôi cấy rất quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh. Thí nghiệm được thực hiện ở 7 cấp độ pH là: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 và 8. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.17

**Bảng 3.17: Ảnh hưởng của độ pH đến sinh trưởng của các chủng VK**

T	Độ pH	Mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng VK (CFU/ml)							
		QI1	QI8	QI16	QI24	N2.1	N2.3	V3.2	V4.2
1	pH=5	0	0	0	$2,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
2	pH=5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
3	pH=6	$1,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
4	pH=6,5	$2,3 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
5	pH=7	$6,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$9,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$
6	pH=7,5	$5,8 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
7	pH=8	$2,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$

Quá trình nhân sinh khối của vi sinh vật nói riêng và vi khuẩn nói chung, độ pH môi trường có ảnh hưởng lớn tới quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn, thể hiện ở mật độ tế bào hữu hiệu trong 1ml dung dịch mà chúng đạt được. Trong trường hợp độ pH thấp (pH = 5) thì mật độ tế bào trên 1 ml dung dịch của 8 chủng VK đạt được là có sự khác biệt, có 3 chủng gần như không phát triển 5 chủng còn lại tế bào phát triển nhưng mật độ rất thấp, chỉ đạt được  $2,9 \times 10^5$  CFU/ml –  $5,3 \times 10^6$  CFU/ml. Cả 8 chủng vi khuẩn này đều có mật độ tế bào cao hơn khi nuôi chúng ở những môi trường có độ pH khoảng từ 6,6 – 7,5.

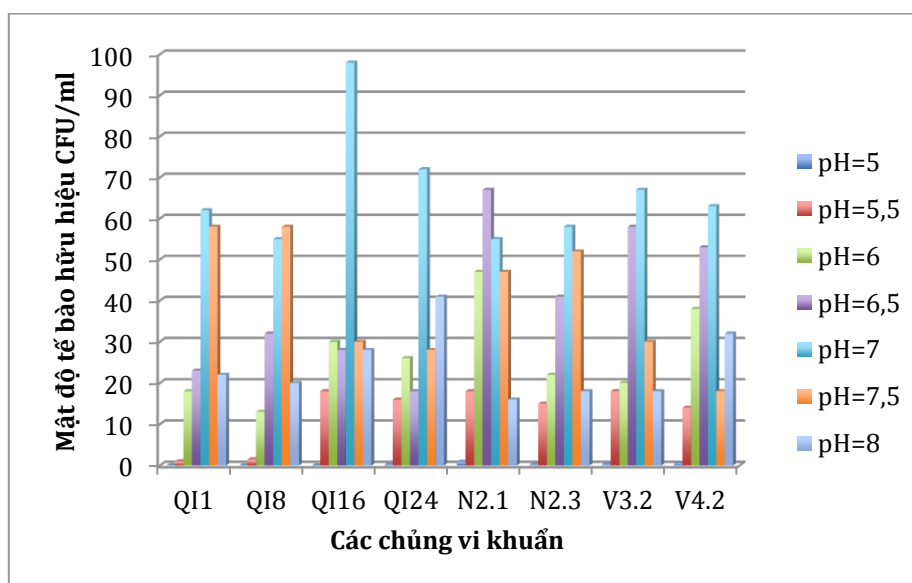
Chủng QI1 đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 7 – 7,5 mật độ tế bào đạt cực đại là  $5,8 – 6,2 \times 10^8$  CFU/ml, mật độ tế bào giảm dần khi pH tăng lên 8. Chủng QI8 cũng đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 7 – 7,5 mật độ tế bào đạt cực đại là  $5,5 – 5,8 \times 10^8$  CFU/ml, mật độ tế bào giảm dần khi pH tăng lên 8, chúng có xu hướng là phù hợp nhất khi pH = 7,5.

Chủng QI16 và QI24 đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 7 mật độ tế bào đạt cực đại là  $7,2 – 9,8 \times 10^8$  CFU/ml. Tuy nhiên chủng QI24 có biên độ thích hợp với dải pH rộng, chúng cho mật độ tế bào khá cao

khi pH từ 6 - 7,5. Tuy nhiên chủng QI<sub>16</sub> có biên độ dải pH hẹp chúng cho mật độ tế bào cao khi pH=7.

Chủng N2.1 đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 6,5 mật độ tế bào đạt cực đại là  $6,7 \times 10^7$  CFU/ml, mật độ tế bào giảm dần khi pH tăng lên 8. Chủng N2.3 đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 7 mật độ tế bào đạt cực đại là  $5,8 \times 10^8$  CFU/ml, mật độ tế bào giảm dần khi pH tăng lên 8.

Chủng V2.3 và V4.2 đạt mật độ tế bào cực đại khi được nuôi ở độ pH= 7 mật độ tế bào đạt cực đại là  $6,3 - 6,8 \times 10^8$  CFU/ml. Tuy nhiên chủng V4.2 có biên độ thích hợp với dải pH rộng, chúng cho mật độ tế bào khá cao khi pH từ 6 - 7. Tuy nhiên chủng V3.2 có biên độ dải pH hẹp chúng cho mật độ tế bào cao khi pH = 6,5. Ảnh hưởng của độ pH nuôi cấy lên sự phát triển của mật độ tế bào vi khuẩn được thể hiện ở Hình 3.41.



**Hình 3.41: Ảnh hưởng của độ pH đến sinh trưởng của các chủng vi khuẩn.**

### 3.2.3. Định danh đến loài các chủng VSV có hoạt tính cao.

Qua kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của 8 chủng vi khuẩn có hoạt tính cao, 4 chủng vi khuẩn đại diện cho 4 đặc điểm tốt nhất của chúng đã được lựa chọn để sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng. Với môi trường nuôi cấy đơn giản, mật độ tế bào phát triển tối đa, độ pH thích hợp, nhiệt độ hợp lý, 4 chủng vi khuẩn được lựa chọn là chủng QI1, QI24, N2.1, V4.2 là đưa vào định

đang đến loài. Thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp sinh học phân tử tại phòng thí nghiệm vi sinh, Viện Nghiên cứu Công nghệ Thực phẩm. DNA của các chủng vi khuẩn (QI1, QI24, N2.1, V4.2) được tách chiết, phân đoạn 16S rDNA của các vi khuẩn được khuếch đại PCR bằng cặp mồi 16S-8F và 16S1510R, sản phẩm PCR của các chủng VSV được thể hiện trên Hình 3.42.



**Hình 3.42: Sản phẩm PCR phân đoạn 16S rDNA trên bản gel của các chủng VK**

DNA của phân đoạn 16S được giải trình tự bằng phương pháp ‘dideoxy chain termination’, các chuỗi DNA của các chủng VSV được so sánh độ tương đồng với các chuỗi DNA của các chủng vi sinh vật khác trên ngân hàng Gen (Genbank). Kết quả xác định các chủng VSV được trình bày ở Bảng 3.18.

**Bảng 3.18: Xác định tên các chủng VSV dựa trên trình tự phân đoạn 16S rDNA**

TT	Chủng	Mã số trên Genbank	Độ tương đồng	Loài	Dữ liệu FIRI <sup>1</sup>
1	QI1	GU198115	100% (821/821 bp)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VT320
2	QI24	EU557030	100% (793/793 bp)	<i>Bacillus subtilis</i>	VT322
3	N2.1	CP000959	100% (795/795 bp)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	VT323
4	V4.2	EF100165	99.5% (791/795bp)	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	VT324

Qua Bảng 3.18 đã cho thấy, chủng QI1 có trình tự ADN tương đồng 100% với trình tự ADN mã số trên genbank GU198115 là loài *Pseudomonas fluorescens*. Chủng QI24 có trình tự ADN tương đồng 100% với trình tự ADN mã số trên genbank EU557030 là loài *Bacillus subtilis*. Chủng N2.1 có trình tự ADN tương đồng 100% với trình tự ADN mã số trên genbank CP000959 là loài *Burkholderia cenocepacia*. Chủng V4.2 có trình tự ADN tương đồng 99.5% với trình tự ADN mã số trên genbank EF100165 là loài *Azotobacter beijerinskii*.

Chủng QI1 được xác định là loài *P. fluorescens* sinh tổng hợp IAA rất mạnh tuy nhiên trong quá trình nghiên cứu nhận thấy rằng chủng này còn có khả năng kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa loài này có tế bào hình que dài, có râu đầu, một bên đầu nhọn, kích thước tế bào 1,4 x 4,1  $\mu\text{m}$  (Hình 3.43 – 3.45)

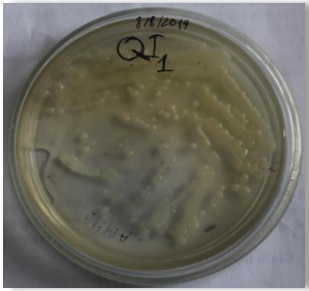
Chủng QI24, được xác định là loài *B. subtilis* đối kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ thông và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá tốt. Ngoài ra, chủng *B. subtilis* còn được biết đến như là nhân tố kích thích sự sinh trưởng của thực vật, giúp thực vật kháng lại một số bệnh nhằm tăng năng suất cây trồng (Woitke và cộng sự, 2004; Smith và cộng sự, 1999). Khi chủng *B. subtilis* được bón vào vùng rễ cây, chúng sẽ sống nội sinh với rễ và ngăn chặn hoặc loại trừ một số bệnh hại vùng rễ (Dekkers và cộng sự, 1998), bên cạnh đó, chủng này còn có khả năng kích thích, giải phóng ra một số chất dinh dưỡng từ đất cho cây (Nautiyal và cộng sự, 2000, Idriss và cộng sự, 2002). Chủng *B. subtilis*, còn có các ảnh hưởng khác đến sức sống của thực vật, giúp thực vật đối phó với các điều kiện không có lợi, từ ngoại cảnh như cây trồng ở vùng khô hạn hoặc vùng bị muối hoá có độ mặn cao (Bochow và cộng sự, 2001). Chủng *B. subtilis* còn có khả năng tạo ra các chất kháng sinh như polymyxin, difficidin, subtilin, mycobaccillin, và zwittermicin, trong đó 2 chất sau có tính kháng nấm mạnh nhất (Phạm Thị Minh Kiều và cộng sự 2009). Saman (2007), đã tách chiết được chất hoá học

từ dung môi ethyl acetate của chủng vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng kháng nấm *Sclerotium*. Chủng vi khuẩn *B. subtilis* có tế bào hình que ngắn, có lớp định nhày, hai đầu đều nhau, với kích thước 0,9 x 2,2 $\mu$ m (Hình 3.46 – 3.48)

Chủng N2.1 được xác định là loài *B. cenocepacia*, có khả năng phân giải lân rất mạnh, tuy nhiên trong quá trình nghiên cứu nhận thấy rằng chủng này còn có khả năng cố định nitơ khá tốt. Một số loài vi khuẩn trong chi *Burkholderia*, được xác định là những loài cố định đạm trong đó có loài *B. tropicalis* (Vasconcelos, 2006) và *B. tropica* (Reis và cộng sự, 2004). Như vậy chủng *B. subtilis* (N2.1) có ý nghĩa trong việc ứng dụng chúng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật nhằm tăng năng suất cây trồng. Chủng vi khuẩn *B. cenocepacia* có tế bào hình que dài, có lớp lông mịn bao phủ, một bên đầu hơi nhọn, một bên đầu bằng, với kích thước 1,1 x 3,1 $\mu$ m (Hình 3.49 – 3.51)

Chủng V4.2 được xác định là loài *A. beijerinckii* có khả năng cố định nitơ rất mạnh và có khả năng phân giải lân khá tốt, so sánh với kết quả nghiên cứu trước cho thấy Abbas Akbari và cộng sự (2007) đã phân lập và tuyển chọn một số chủng *Azospirillum sp* có khả năng sinh tổng hợp IAA kích thích sinh trưởng cây lúa mì. Kết quả là sự nhiễm các chủng *Azospirillum sp* đã làm tăng đường kính gốc lúa, chiều dài rễ, trọng lượng khô và số lượng lông rễ so với đối chứng. Như vậy chủng V4.2 có ý nghĩa trong việc ứng dụng chúng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật nhằm tăng năng suất cây trồng. . Chủng vi khuẩn *A. beijerinckii* có tế bào hình que dài, hai bên đầu bằng, phình to hơn ở giữa, với kích thước 0,9 x 3,2 $\mu$ m (Hình 3.52 – 3.55)

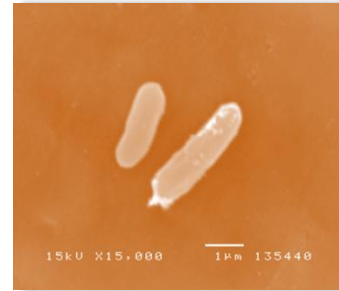
Cả 4 chủng vi khuẩn QI1, QI24, N2.1 và V4.2 lần lượt là các loài *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Azotobacter beijerinckii*, đều đạt là những chủng vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực sản xuất phân vi sinh, là những chủng an toàn sinh học đối với cây trồng và động vật máu nóng.



Hình 3.43: Khuẩn lạc chủng *P. fluorescens* (QI1)



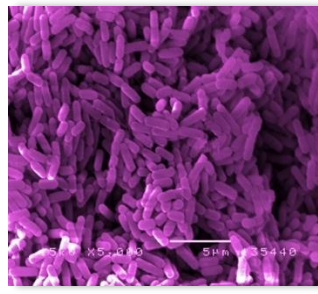
Hình 3.44: Tế bào chủng *P. fluorescens* (QI1)



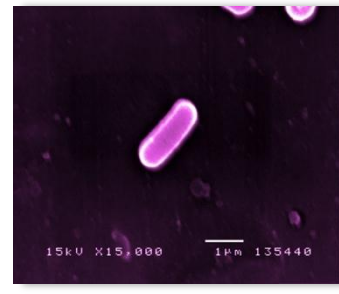
Hình 3.45: Tế bào chủng *P. fluorescens* (QI1)



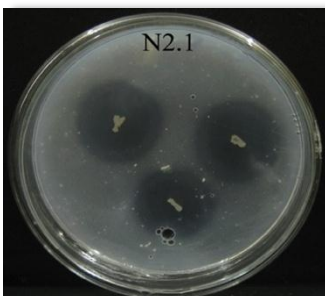
Hình 3.46: Khuẩn lạc chủng *B. subtilis* (QI24)



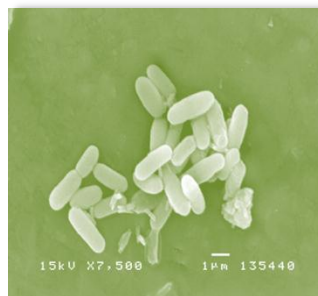
Hình 3.47: Tế bào chủng *B. subtilis* (QI24)



Hình 3.48: Tế bào chủng *B. subtilis* (QI24)



Hình 3.49: Khuẩn lạc chủng *B. cenocepacia* (N2.1)



Hình 3.50: Tế bào chủng *B. cenocepacia* (N2.1)



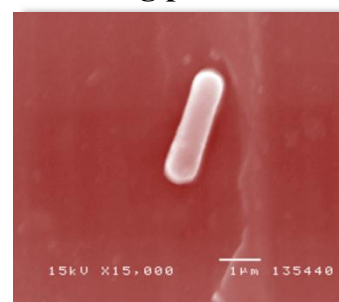
Hình 3.51: Tế bào chủng *B. cenocepacia* (N2.1) đang phân chia



Hình 3.52: Khuẩn lạc chủng *A. beijerinckii* (V4.2)



Hình 3.53: Tế bào chủng *A. beijerinckii* (V4.2)



Hình 3.54: Tế bào chủng *A. beijerinckii* (V4.2)



### 3.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm đa chủng VSV.

#### 3.3.1. Kết quả nghiên cứu sự tương tác của các VK trong cùng hỗn hợp.

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy kép trên trường PDA sau các thời gian 3 ngày, 6 ngày và 9 ngày, kết quả đo đường kính khuẩn lạc được trình bày ở Bảng 3.19

**Bảng 3.19: Đường kính khuẩn lạc của các chủng Vi khuẩn thử nghiệm trong cùng hỗn hợp**

TT	Chủng vi sinh vật	Đường kính khuẩn lạc (mm)		
		Sau 3 ngày	Sau 6 ngày	Sau 9 ngày
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (QI1)	20,54	22,67	23,56
2	<i>Bacillus subtilis</i> (QI24)	21,45	23,65	23,87
3	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (N2.1)	22,67	24,53	26,23
4	<i>Azotobacter beijerinckii</i> (V4.2)	21,05	23,13	25,2

Kết quả ở các Bảng 3.19 cho thấy, các chủng VSV vẫn tồn tại và phát triển bình thường trong cùng một môi trường nuôi cấy, đường kính khuẩn lạc của các chủng đều đạt mức độ cao sau 9 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, cũng có chủng vi khuẩn phát triển mạnh hơn các chủng còn lại, như chủng vi khuẩn cố định nitơ *Azotobacter beijerinckii* phát triển mạnh nhất đường kính khuẩn lạc của chúng lớn nhất đạt 26,23 sau 9 ngày nuôi cấy. Các chủng vi khuẩn khác cũng phát triển tốt khi được cấy vạch trên cùng trên môi đĩa môi trường (xem Hình 3.55).



**Hình 3.55: Các chủng vi khuẩn cùng tồn tại và phát triển trên môi trường**

#### 3.3.2. Kết quả nghiên cứu xác định giá thể tạo chế phẩm.

##### 3.3.2.1. Chế phẩm vi sinh vật đa chủng dùng cho rừng trồng.

Mỗi chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tốt chúng đều phải có một môi trường phù hợp nhất định. Thử nghiệm với các loại môi trường với tỷ lệ chất

mang khác nhau, để tìm ra môi trường chất mang thích hợp các vi sinh vật, giá thể được lựa chọn nghiên cứu là apatit, đất sét, mùn với chất giữ ẩm Potassium polyacrylamide. Kết quả mật độ vi sinh vật của chế phẩm VSV cho rừng trồng, tồn tại trong chất mang ở các công thức khác nhau sau 2 tuần phối trộn được trình bày tại Bảng 3.20.

**Bảng 3.20: Mật độ tế bào các chủng VSV sau 2 tuần phối trộn**

Stt	Chủng vi sinh vật	Mật độ bào tử ở các công thức thí nghiệm (CFU/1g)			
		CT1	CT2	CT3	CT4
1	<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pt)	$1,1 \times 10^7$	$9,2 \times 10^8$	$5,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (QI1)	$5,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
3	<i>Bacillus subtilis</i> (QI24)	$9,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
4	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (N2.1)	$9,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$
5	<i>Azotobacter beijerinckii</i> (V4.2)	$1,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$

Trong cả 4 công thức chất mang với các tỷ lệ phối trộn khác nhau, các chủng vi sinh đều tồn tại với mật độ khá. Kết quả cũng cho thấy, các chủng vi sinh vật vẫn tồn tại bình thường trong cùng một chế phẩm. Nhưng ở những công thức có tỷ lệ phối trộn chất mang khác và lượng vi khuẩn khác nhau cũng có mật độ tế bào vi khuẩn giữa các công thức khác nhau. Ở công thức 1 và 4 (khi đưa vào tạo chế phẩm 10% dung dịch VSV các loại) thành phần các loại vi sinh vật thấp hơn rất nhiều so với công thức 2 và 3 (khi đưa vào tạo chế phẩm 20% dung dịch VSV các loại). Như điển hình ở chủng *B. subtilis* (QI24) đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ có mật độ tế bào tối đa  $2,9 \times 10^8$  CFU/1g và  $2,2 \times 10^8$  CFU/1g chế phẩm đa chủng VSV, khi được trộn tỷ lệ theo công thức 2 và 3, trong khi ở công thức 4 mật độ tế bào tối đa chỉ đạt  $9,2 \times 10^7$  CFU/1g chế phẩm vi sinh. Như vậy mật độ tế bào vi sinh vật ban đầu đưa vào trộn chế phẩm cũng vô cùng cần thiết chúng phải đảm bảo mật độ cho phép thì chế phẩm vi sinh vật mới đảm bảo số lượng tế bào vi sinh vật.

Ở công thức 2 tất cả các chủng vi sinh vật đều có mật độ tế bào cao nhất, trong khi ở công thức 3 mật độ tế bào của cả 5 chủng vi sinh vật đã giảm đáng kể. Tuy ở công thức 2 và 3 đều đưa vào thí nghiệm mật độ vi sinh vật ban đầu là như nhau, như vậy chất mang có ảnh hưởng rất đáng kể. Thông qua đó có thể kết luận apatis rất phù hợp để làm chất mang sản xuất chế phẩm vi sinh vật. Qua phân tích ở trên cho thấy công thức chất mang phù hợp để sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho cây thông ở rừng trồng là **công thức 2**: Với 10kg nguyên liệu trong đó 35% bột apatit, 35% mùn, 10% Potassium polyacrylamide, 20% tổng số các loại VSV (trong đó 0,05% bào tử hữu tính nấm *P. tinctorius*, 5% sinh khối dung dịch VSV sinh IAA QI<sub>1</sub>, 5% sinh khối dung dịch VSV phân giải phát phát khó tan N2.1, 5% sinh khối dung dịch VSV đối kháng với nấm bệnh thối cổ rễ cây thông QI24 và 5% sinh khối dung dịch VSV cố định nitơ V4.2).

#### 3.3.2.2. *Chế phẩm vi sinh vật đa chủng dùng cho vườn ươm.*

Cũng như thí nghiệm sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho rừng trồng, sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho vườn ươm cũng cần lựa chọn chất mang và tỷ lệ sinh khối vi sinh vật phù hợp. Chế phẩm cho rừng trồng cần phải có một lượng chất giữ ẩm Potassium polyacrylamide nhất định, giúp cây phát triển trong điều kiện khắc nghiệt, khô hạn, trên vùng đất thoái hoá bạc màu. Tuy nhiên, khi tạo cây vườn ươm thành phần chất giữ ẩm Potassium polyacrylamide lại không cần thiết, vì vậy khi thiết kế công thức thí nghiệm sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho cây thông ở vườn ươm bao gồm apatit, đất sét, mùn và sinh khối các loại VSV khác nhau. Kết quả mật độ vi sinh vật của chế phẩm cho vườn ươm tồn tại trong chất mang, ở các công thức khác nhau sau 2 tuần phối trộn được trình bày tại Bảng 3.21.

**Bảng 3.21: Mật độ tế bào các chủng VSV sau 2 tuần phối trộn**

Stt	Chủng vi sinh vật	Mật độ bào tử ở các công thức thí nghiệm (CFU/1g)			
		CT1	CT2	CT3	CT4
1	<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pt)	$1,6 \times 10^7$	$8,2 \times 10^8$	$6,3 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (QI1)	$4,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
3	<i>Bacillus subtilis</i> (QI24)	$8,1 \times 10^6$	$3,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$
4	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (N2.1)	$7,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$4,4 \times 10^7$
5	<i>Azotobacter beijerinckii</i> (V4.2)	$5,4 \times 10^7$	$7,5 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$

Qua bảng 3.21 cho thấy, những công thức có tỷ lệ phối trộn chất mang khác và lượng vi khuẩn khác nhau cũng có mật độ tế bào vi khuẩn giữa các công thức khác nhau. Ở công thức 1 và 4 (khi đưa vào tạo chế phẩm 10% dung dịch VSV các loại) thành phần các loại vi sinh vật thấp hơn rất nhiều so với công thức 2 và 3 (khi đưa vào tạo chế phẩm 20% dung dịch VSV các loại). Như chủng *Azotobacter beijerinckii* (V4.2) cố định nitơ có mật độ tế bào tối đa đạt  $3,7 \times 10^8$  CFU/1g chế phẩm đa chủng VSV, khi được trộn tỷ lệ theo công thức 2, trong khi ở công thức 4 mật độ tế bào hữu hiệu chỉ đạt  $4,4 \times 10^7$  CFU/1g chế phẩm vi sinh. Cũng như khi tạo chế phẩm VSV đa chủng cho rừng trồng, khi tạo chế phẩm đa chủng VSV cho vườn ươm lượng vi sinh vật cần thiết là khoảng 20% VSV các loại để mật độ tế bào VSV trong chế phẩm đạt tối đa.

So sánh giữa mật độ tế bào đạt được giữa công thức 2 và 3 trên Bảng 3.21 cho thấy, ở công thức 2 tất cả các chủng vi sinh vật đều có mật độ tế bào tối đa cao hơn khi ở công thức 3, mật độ tế bào của cả 5 chủng vi sinh vật đã giảm đáng kể, mặc dù mật độ vi sinh vật ban đầu là như nhau, như vậy chất mang có ảnh hưởng rất đáng kể. Thông qua đó có thể kết luận apatis rất phù hợp để làm chất mang sản xuất chế phẩm vi sinh vật. Qua phân tích ở trên cho thấy công thức chất mang phù hợp là **công thức 2**: Với 10kg nguyên liệu trong đó 40% bột apatit, 40% mùn, 20% tổng số các loại

VSV (trong đó 0,05% bào tử hữu tính nấm *P. tinctorius*, 5% dung dịch VSV sinh IAA QI<sub>1</sub>, 5% dung dịch VSV phân giải phốt phát khó tan N2.1, 5% dung dịch VSV đối kháng với nấm bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa QI24 và 5% dung dịch VSV cố định nito V4.2).

### 3.3.3. Kết quả nghiên cứu hoạt tính các chủng VSV trong chế phẩm.

Việc nghiên cứu các hoạt tính của những chủng đó khi cùng tồn tại với nhau là vô cùng cần thiết và quan trọng. Tiến hành phân lập và tách riêng từng chủng, kiểm tra hoạt tính sinh học như khả năng sinh IAA của chủng *P. fluorescens* (QI1); khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông chủng *B. subtilis* (QI24); Khả năng phân giải phốt phát khó tan của chủng *B. cenocepacia* (N2.1); khả năng cố định nito của chủng *A. beijerinckii* (V4.2) sau khoảng thời gian 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần và 16 tuần phối trộn. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.22.

**Bảng 3.22: Hoạt tính sinh học của VSV sau khi hợp chủng.**

T	Chủng vi sinh vật	Sau 4 tuần		Sau 8 tuần		Sau 12 tuần		Sau 16 tuần	
		ĐK vòng pg (mm)	Hoạt tính (mg/ml)	ĐK vòng pg (mm)	Hoạt tính (mg/ml)	ĐK vòng pg (mm)	Hoạt tính (mg/ml)	ĐK vòng pg (mm)	Hoạt tính (mg/ml)
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (QI1)	-	11,52	-	10,55	-	9,74	-	9,71
2	<i>Bacillus subtilis</i> (QI24)	22,03	-	20,2	-	19,1	-	18,6	-
3	<i>Burkholderia cenocepacia</i> (N2.1)	23,2	415,0	21,4	374,3	20,7	345,0	20,2	312,1
4	<i>Azotobacter beijerinckii</i> -V4.2	-	4,06	-	3,98	-	4,01	-	3,54

Từ các Bảng số liệu trên cho thấy, hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn đều có hoạt lực giảm nhẹ dần theo thời gian. Tuy nhiên nhìn tổng thể ở bảng 3.22 cho thấy dù ở thời gian 16 tuần hoạt lực của chúng vẫn rất tốt và đảm bảo là những chủng vi khuẩn có hoạt lực mạnh, chúng vẫn phát huy được những khả năng của chúng. Như chủng *B. cenocepacia* (N2.1) phân giải phốt phát khó tan, sau 8 tuần đường kính vòng phân giải vẫn đạt là 20,2 mm, nồng độ lân dễ

tiêu đạt là 312,12 ppm chứng tỏ chúng vẫn có khả năng phân giải phốt phát khó tan rất mạnh. Chúng vi khuẩn *P.fluorescens* (QI1) sinh tổng hợp IAA, có kết quả tổng hợp IAA khá cao đạt 9,718 mg/l, như vậy thời gian 4 tháng, khả năng tổng hợp IAA của chúng vẫn tốt. Như vậy, có thể kết luận rằng khi dùng các chủng VSV có hoạt tính tốt để sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng là hoàn toàn có cơ sở khoa học và đạt kết quả tốt.

### 3.3.4. Kết quả nghiên cứu thời gian bảo quản của chế phẩm.

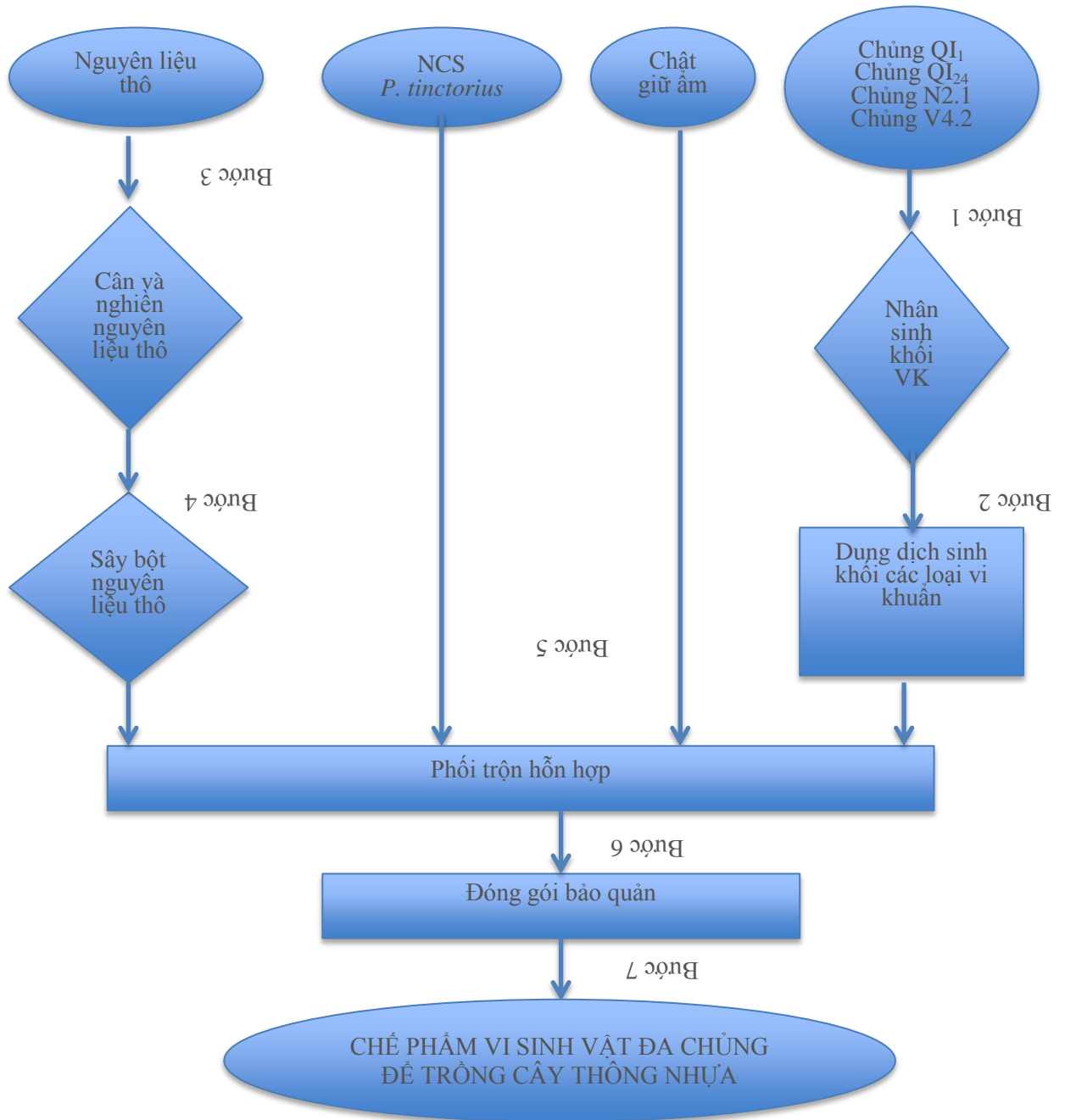
Mặc dù đã nghiên cứu được khả năng tồn tại cũng như hoạt tính của các vi sinh vật có ích, nhưng muốn biết được thời gian bảo quản của chế phẩm vi sinh vật để đưa ra khuyến cáo là cần thiết để giúp người dùng sử dụng chế phẩm một cách hiệu quả. Thí nghiệm tiến hành với 2 cách bảo quản khác nhau: bảo quản ở nhiệt độ phòng (thời gian thí nghiệm từ tháng 3 đến tháng 9 nhiệt độ trung bình là 27,8<sup>0</sup>C) và bảo quản trong phòng lạnh nhiệt độ 15 – 20<sup>0</sup>C và kiểm tra mật độ bào tử ở các mốc thời gian 1,5 tháng, 3 tháng, 4,5 tháng và 6 tháng, đưa ra kết luận tốt nhất về thời gian bảo quản chúng, kết quả được trình bày tại Bảng 3.23.

**Bảng 3.23: Sự tồn tại của các chủng VK trong các thời gian bảo quản**

STT	Tên chủng	Nhiệt độ	Mật độ tế bào VSV sau các thời gian bảo quản (CFU/1g)			
			1,5 tháng	3 tháng	4,5 tháng	6 tháng
1	<i>P. tinctorius</i> (Pt)	t <sup>0</sup> thường	9,7 x 10 <sup>7</sup>	8,4 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x 10 <sup>7</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>
		15 – 20 <sup>0</sup> C	9,8 x 10 <sup>7</sup>	8,7 x 10 <sup>7</sup>	7,3 x 10 <sup>7</sup>	4,6 x 10 <sup>7</sup>
2	<i>P. fluorescens</i> (QI1)	t <sup>0</sup> thường	2,3 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>	7,1 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>8</sup>
		15 – 20 <sup>0</sup> C	2,5 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>8</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>
3	<i>B. subtilis</i> (QI24)	t <sup>0</sup> thường	1,6 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>8</sup>	9,4 x 10 <sup>7</sup>	8,6 x 10 <sup>7</sup>
		15 – 20 <sup>0</sup> C	2,6 x 10 <sup>8</sup>	2,3 x 10 <sup>8</sup>	8,4 x 10 <sup>7</sup>	7,8 x 10 <sup>7</sup>
4	<i>B.cenocepacia</i> (N2.1)	t <sup>0</sup> thường	9,2 x 10 <sup>8</sup>	6,8 x 10 <sup>8</sup>	3,2 x 10 <sup>8</sup>	2,4 x 10 <sup>8</sup>
		15 – 20 <sup>0</sup> C	9,6 x 10 <sup>8</sup>	7,6 x 10 <sup>8</sup>	5,2 x 10 <sup>8</sup>	4,2 x 10 <sup>8</sup>
5	<i>A.bejerinski</i> (V4.2)	t <sup>0</sup> thường	1,2 x 10 <sup>8</sup>	8,9 x 10 <sup>7</sup>	6,9x 10 <sup>7</sup>	2.2 x 10 <sup>7</sup>
		15 – 20 <sup>0</sup> C	3,2 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	8,5x 10 <sup>7</sup>	7,3 x 10 <sup>7</sup>

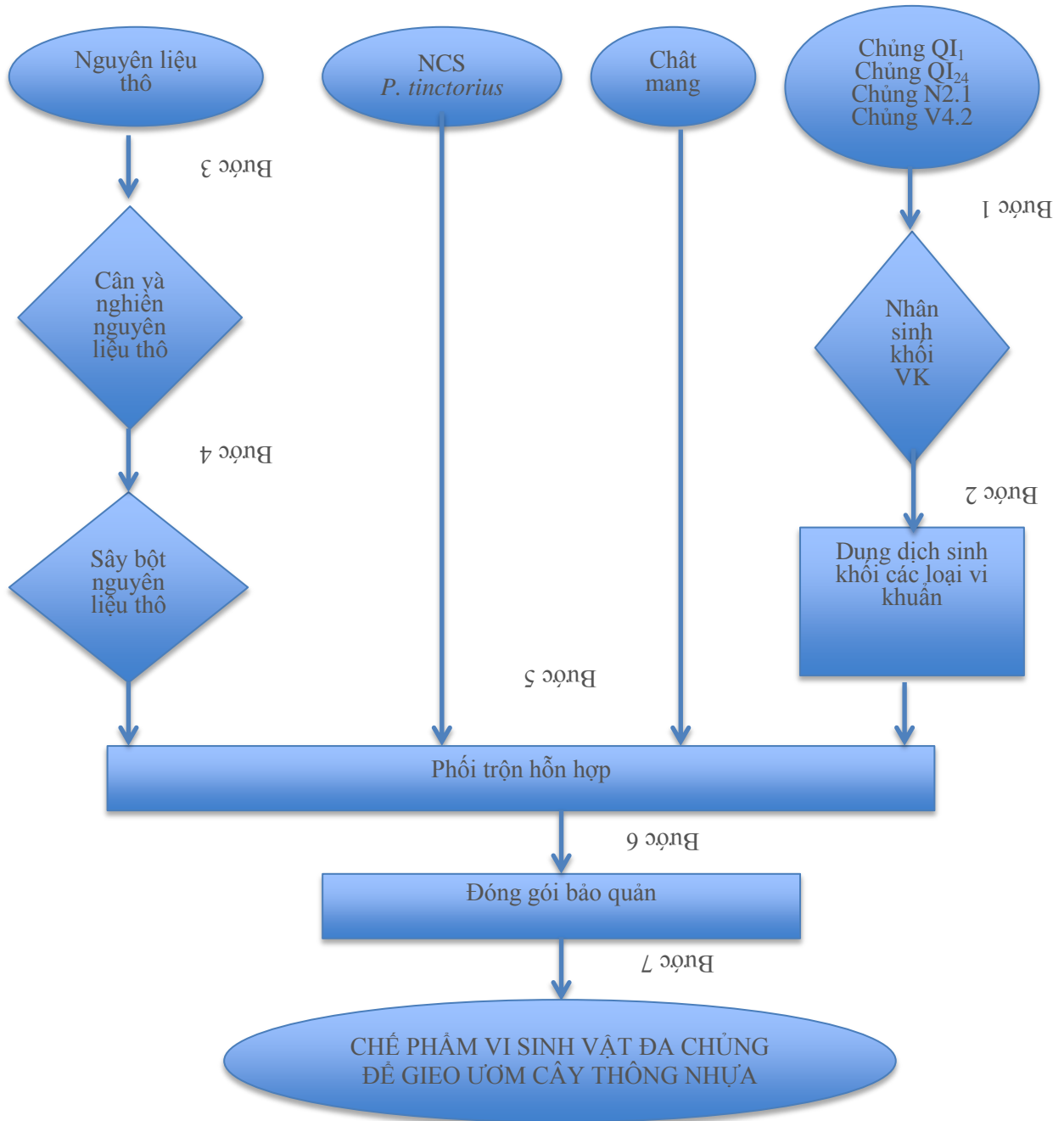
Kết quả ở các bảng trên cho thấy, dù ở 2 cách bảo quản khác nhau nhưng các chủng vi sinh vật vẫn tồn tại bình thường trong cùng chế phẩm, ít có sự khác nhau giữa các mật độ tế bào vi sinh vật. Tuy nhiên, khi được bảo quản trong nhiệt độ lạnh, mật độ bào tử của các chủng VSV sau 6 tháng bảo quản lớn hơn so với các chủng VSV bảo quản ở nhiệt độ phòng, nhưng sự chênh lệch không đáng kể, mặt khác trên thực tế sản xuất chế phẩm VSV để giảm chi phí và thuận lợi cho người sử dụng cách bảo quản chúng trong nhiệt độ phòng tính khả thi cao. Ngoài ra khi bảo quản chế phẩm đa chủng VSV trong nhiệt độ phòng, mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng vi sinh vật nhìn chung ít thay đổi sau các thời gian bảo quản khác nhau và có giảm nhẹ sau 6 tháng bảo quản. Như vậy kết luận chế phẩm đa chủng vi sinh vật có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng, trong thời gian 6 tháng.

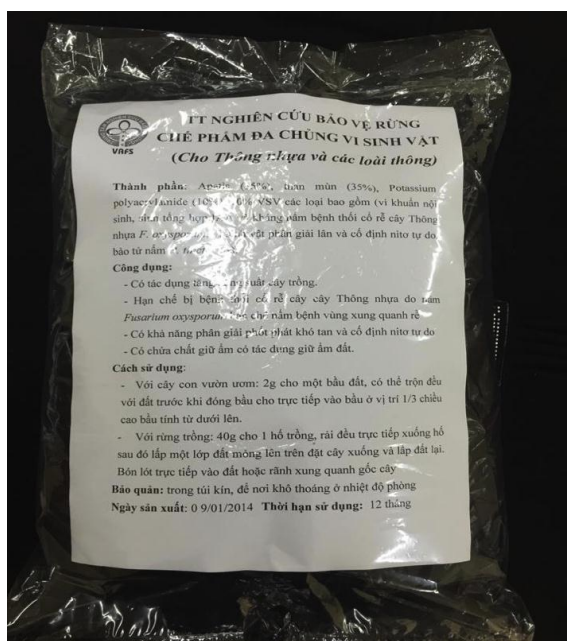
**Hình 3.56: Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng để trồng cây Thông nhựa.**





**Hình 3.57: Quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng để gieo ươm cây Thông nhựa**





**Hình 3.58: Chế phẩm đa chủng vi sinh vật**

### 3.4. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm VSV đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.

#### 3.4.1. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa.

##### 3.4.1.1. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa ở vườn ươm.

Số liệu đo đếm chiều cao, đường kính gốc, tỷ lệ bị bệnh, tỷ lệ cộng sinh cây Thông nhựa sau các thời gian khác nhau sử lý qua phần mềm Excel và Genstat 5, cho thấy có sự khác nhau đáng kể ở các công thức thí nghiệm, kết quả được trình bày tại Bảng 3.24.

**Bảng 3.24: Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến sinh trưởng của Thông nhựa *P. merkusii* ở vườn ươm.**

S	CT thí nghiệm	Sau 2 tháng		Sau 4 tháng		Sau 6 tháng		Sau 8 tháng		Pb (%)	Pcs (%)
		Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)		
1	CT1	5,95	1,22	7,88	1,66	12,28	2,26	17,43	2,95	22,2	23,5
2	CT 2	6,43	1,32	9,88	1,92	16,78	2,92	20,63	3,12	4,62	89,5
3	CT 3	7,14	1,74	11,58	2,24	18,38	3,57	22,54	4,12	3,10	90,0
4	CT 4	6,94	1,34	10,05	2,04	16,55	3,06	19,85	3,59	4,21	85,6
5	MF1	6,85	1,41	10,15	1,91	16,65	3,11	19,78	3,48	3,42	85,1
6	TB	6,66	1,41	9,91	1,96	16,13	2,99	20,05	3,45	7,51	40,6
7	Lsd	1,73	0,72	1,50	0,42	0,17	0,12	0,27	0,32	1,72	2,36
8	Fpr	0,050	0,080	0,05	0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Thông qua bảng số liệu trên cho thấy, sau các thời gian thí nghiệm có sự khác nhau đáng kể của các công thức bón chế phẩm đa chủng vi sinh vật với tỷ lệ khác nhau. Qua 2 tháng thí nghiệm, cây Thông nhựa của các công thức được bón chế phẩm đa chủng vi sinh vật cao hơn so với công thức đối chứng với  $F_{pr} < 0,05$  đã có sự sai khác về chiều cao của các công thức thí nghiệm. Tuy nhiên vì thời gian thí nghiệm ngắn nên cũng chưa có sự khác biệt hoàn toàn về đường kính gốc cây.

Sau thời gian 4 tháng, thí nghiệm tỷ lệ về chiều cao và đường kính gốc của cây Thông nhựa ở vườn ươm có sự khác biệt rõ ràng sau 4 tháng chiều cao cây Thông nhựa ở công thức 1 bón 1% lân như đóng bầu thông thường đạt 7,884 cm, trong khi tại công thức 3 (bón 2 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật) cho kết quả là 11,883 cm (tăng 47% so với đối chứng, tăng 17% so với công thức 2, tăng 15% so với công thức 4, đặc biệt cũng tăng 15% so với bón 2g MF1. Đường kính gốc của cây Thông nhựa sau 4 tháng, tại công thức 3 (bón 2 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật) cho kết quả là 2,24 mm (tăng 35% so với đối chứng, tăng 25% so với công thức 2, tăng 16% so với công thức 4, và cũng tăng 16% so với bón 2g MF1).

Sau 8 tháng thí nghiệm các công thức CT2 (bón 1g) chế phẩm và công thức CT4 (bón 3 g) chế phẩm đều cho kết quả khá cao tăng chiều cao cây Thông nhựa khoảng hơn 20% so với đối chứng, kể cả công thức bón chế phẩm viên nén MF1 cũng cho kết quả về chiều cao tăng 20 % so với đối chứng. Tuy nhiên tại công thức 3 bón (2g chế phẩm) chúng cho chiều cao vượt trội tăng 24% so với đối chứng và tăng hơn các công thức bón vi sinh mật độ khác từ 15 – 18%. Đường kính gốc cây Thông nhựa tại công thức 1 (đối chứng) sau 8 tháng đạt 2,95 mm, trong khi tại công thức 3 (bón 2g) chế phẩm đa chủng vi sinh vật cho kết quả là 4,12 mm (tăng 28% so với đối chứng, tăng 24% so với công thức 2, tăng 15 % so với công thức 4 và tăng 16% so với bón 2g MF1. Cây Thông nhựa được bón 2g chế phẩm sau 8 tháng có kết quả chiều cao và đường kính gốc là cao nhất.

Tỷ lệ bị bệnh của cây thông nhựa sau các thời gian thí nghiệm có sự khác nhau khá rõ. Công thức đối chứng tỷ lệ bị bệnh chiếm hơn 22%. Trong khi các công thức khác được bón chế phẩm có vi khuẩn kháng nấm bệnh tỷ lệ giảm hẳn chỉ còn từ 3 – 5 %, tỷ lệ này không đáng kể khi sản xuất cây con. Tỷ lệ cộng sinh còn rõ ràng hơn được bón nấm cộng sinh gần như các cây Thông nhựa đều cộng sinh nấm có ích để phát triển trong khi công thức đối chứng tỷ lệ cộng sinh là 0% (xem các hình 3.59, 3.60).



**Hình 3.59: Thí nghiệm nhiễm chế phẩm Thông nhựa sau 2 tháng**



**Hình 3.60: Thí nghiệm nhiễm chế phẩm cho Thông nhựa sau 8 tháng.**

3.4.1.2. *Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng tới cây Thông nhựa ở rừng trồng.*

Số liệu đo đếm chiều cao, đường kính gốc, tỷ lệ sống cây Thông nhựa sau các thời gian rừng 1 tuổi và 1,5 tuổi được xử lý qua phần mềm Genstat 5, qua phân tích xử lý số liệu kết quả cho thấy có sự khác nhau đáng kể ở các công thức thí nghiệm, kết quả được trình bày tại Bảng 3.25.

**Bảng 3.25: Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến sinh trưởng của Thông nhựa *P. merkusii* ở rừng trồng.**

ST T	Công thức thí nghiệm	Sau 1 năm tuổi		Sau 1,5 năm tuổi		Tỷ lệ sống trung bình (%)
		Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)	
1	CT1	24,29	8,48	29,18	11,41	90,0
2	CT 2	25,46	8,80	30,54	13,11	94,4
3	CT 3	28,89	11,39	34,62	13,92	98,9
4	CT 4	27,38	10,37	32,43	14,55	95,6
5	CT5	21,80	8,76	27,37	10,08	80,0
6	TB	25,51	9,66	30,83	12,61	91,8
7	Lsd	1,50	2,08	2,00	2,07	14,91
<b>8</b>	<b>Fpr</b>	<b>0,001</b>	<b>0,013</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,05</b>

Nhìn vào Bảng 3.25 trên cho thấy khi chiều cao cây Thông nhựa ở 1 tuổi có chỉ số Fpr = 0,001 như vậy đã có sự khác biệt khá rõ ràng giữa các công thức thí nghiệm. Như ở công thức 3 bón 40 g chế phẩm đa chủng VSV cây có chiều cao hoàn toàn vượt trội đạt 28,89 cm (tăng 6 %) so với kết quả công thức 4 bón 60g chế phẩm đa chủng VSV có kết quả gần sát nó là 27,38 cm. Cũng ở công thức 3 bón 40 gam chế phẩm đa chủng vi sinh vật còn có kết quả lớn hơn nhiều tăng 32,5 % so với công thức đối chứng không bón gì chiều cao chỉ đạt là 21,8 cm và tăng so với công thức đối chứng bón NPK là 19%. Cây 1 tuổi tuy chiều cao có kết quả khác biệt giữa các công thức bón vi sinh nhưng đường kính gốc trong thí nghiệm này cũng có sự khác nhau nhưng không rõ ràng với chỉ số Fpr = 0,013 và khoảng sai dị khá lớn Lsd=

2,08 cm. Đường kính gốc của cây Thông nhựa lớn nhất cũng tại công thức 3 đạt 1,14 cm (tăng từ 10 – 30 %) so với công thức đối chứng và các công thức khác) chỉ đạt từ 0,85 đến 1 cm.

Khi cây đạt 1,5 tuổi sự sai khác về tỷ lệ bón chế phẩm giữa các công thức thể hiện rõ ràng ở cả về chiều cao vút ngọn và đường kính gốc của cây. Với chỉ số  $F_{pr} < 0,001$  và khoảng sai dị  $Lsd = 2$  cm chỉ số về chiều cao vượt trội cũng ở công thức 3, bón 40 g chế phẩm đa chủng VSV đạt 34,62 cm (tăng 26% so với đối chứng không bón gì, tăng 19% so với công thức bón 1 đối chứng bón NPK, , tăng 15% so với công thức 2, bón 20 g chế phẩm đa chủng VSV, tăng 7% so với công thức 4 bón 60g chế phẩm đa chủng VSV). Đường kính gốc của cây Thông nhựa sau 1.5 tuổi tại công thức 4 (bón 60 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật) cho kết quả lớn nhất gần đạt 1,5 cm (tăng 44% so với đối chứng không bón gì, tăng 27% so với công thức 1, đối chứng bón NPK, tăng 10% so với công thức 2, bón 20 g chế phẩm đa chủng VSV, 4% so với công thức 3 bón 40g chế phẩm đa chủng VSV).

Tỷ lệ sống của cây thông nhựa sau các thời gian thí nghiệm có sự khác nhau khá rõ. Công thức đối chứng tỷ lệ sống đạt 80%. Trong khi các công thức khác được bón chế phẩm vi sinh vật đa chủng tỷ lệ sống đều đạt cao hơn đạt từ 90 đến 98%. Cao nhất là công thức 3 bón 40g chế phẩm đa chủng vi sinh vật có tỷ lệ sống cao nhất đạt 99%.



**Hình 3.61: Đất thoái hoá bạc màu trước khi trồng rừng thí nghiệm**



**Hình 3.62: Cây Thông nhựa sau 1.5 năm tuổi (hình a- đối chứng, hình b – bón chế phẩm đa chủng VSV).**

*3.4.2. Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến đất thoái hoá bạc màu.*

*3.4.2.1. Sự thay đổi tính chất của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.*

Phân tích tính chất của 5 công thức đất trồng thí nghiệm tại đất rừng thoái hoá bạc màu trước và sau khi thí nghiệm trồng Thông nhựa kết quả được trình bày tại Bảng 3.26.

**Bảng 3.26: Tính chất đất trước và sau khi trồng Thông nhựa.**

STT	Tên mẫu		CT1	CT2	CT3	CT4	CT5
1	pH	Trước TN	3,15	3,25	3,20	3,27	3,31
	KCl	Sau TN	3,16	3,26	3,60	3,63	3,23
2	pH	Trước TN	5,21	5,24	5,11	5,37	5,31
	H <sub>2</sub> O	Sau TN	5,23	6,29	5,12	6,20	5,33
3	OM	Trước TN	1,65	1,79	1,75	1,42	1,59
	(%)	Sau TN	1,80	2,22	2,03	2,18	1,75
4	N <sub>ts</sub>	Trước TN	0,166	0,226	0,301	0,232	0,150
	(%)	Sau TN	0,360	0,386	0,362	0,292	0,213
5	C / N	Trước TN	3,40	3,77	3,16	3,67	5,96
		Sau TN	3,60	4,01	4,06	3,74	6,24
6	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sub>dt</sub>	Trước TN	15,08	17,09	14,81	12,63	13,17
	(mg.kg <sup>-1</sup> )	Sau TN	17,13	23,54	16,16	16,38	15,34
7	K <sub>2</sub> O <sub>dt</sub>	Trước TN	67,37	72,96	81,83	86,84	72,57
	(mg.kg <sup>-1</sup> )	Sau TN	63,28	73,17	91,63	90,53	75,84
8	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sub>TS</sub>	Trước TN	0,12	0,31	0,05	0,17	0,34
	(%)	Sau TN	0,13	0,33	0,15	0,09	0,28
9	K <sub>2</sub> O <sub>TS</sub>	Trước TN	0,62	0,68	0,86	0,91	0,93
	(%)	Sau TN	0,60	0,61	0,92	0,86	0,83

Sự khác nhau về tính chất của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm trồng cây Thông nhựa có bốn chế phẩm đa chủng VSV là rất rõ ràng. Như độ pH khi chưa trồng rừng và bón chế phẩm đất rất chua nhưng khi được trồng rừng và bón chế phẩm đất trở lại trung tính. Hàm lượng mùn trước thí nghiệm thì rất nghèo nhưng sau 1,5 năm trồng cây và bón chế phẩm VSV đa chủng đã được cải thiện, hàm lượng mùn tăng 1,2 lần như ở công thức 2, hàm lượng lân tổng số cũng tăng nhưng không đáng kể nhưng hàm lượng lân dễ tiêu thì tăng mạnh ở công thức 2 và công thức 3 tăng gần gấp 1,2 đến 1,3 lần. Nhưng ở công thức 5 (đối chứng) lượng lân tổng số tăng ít. Hàm



lượng đạm tổng số cũng tăng đáng kể ở hầu hết các công thức thí nghiệm. Công thức 1 sau khi thí nghiệm hàm lượng đạm tổng số tăng gần 1,5 lần so với trước khi thí nghiệm.

Qua Bảng 3.26 cho ta thấy tính chất của đất thoái hoá bạc màu được trồng rừng Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV tính chất vật lý đã thay đổi đất trở nên tơi xốp hơn. Như vậy chất lượng chế phẩm đa chủng vi sinh vật mang lại lợi ích khá cao, làm thay đổi tích cực tính chất của đất.

*3.4.2.2. Đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật của đất thí nghiệm trồng Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV.*

+) Thành phần và mật độ tế bào của các chủng vi sinh vật tổng số của các mẫu đất rừng, trước và sau khi thí nghiệm.

Phân tích chủng vi sinh vật tổng số của các mẫu đất rừng thoái hoá, bạc màu trước khi đưa vào thí nghiệm trồng cây và sau 1,5 năm trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV với các hàm lượng khác nhau, kết quả được trình bày ở Bảng 3.27

**Bảng 3.27: Thành phần và mật độ tế bào VSV tổng số của các mẫu đất rừng trước và sau khi thí nghiệm.**

Loại VSV	TN	CT1		CT2		CT3		CT4		CT5	
		SL chủng	SLVSV CFU/ 1 g đất	SL chủng	SLVSV CFU/ 1 g đất	SL chủng	SLVSV CFU/ 1 g đất	SL chủng	SLVSV CFU/ 1 g đất	SL chủng	SLVSV CFU/ 1 g đất
<b>VSV Cố định nito</b>	Trước TN	3	$2,3 \times 10^3$	2	$3,2 \times 10^3$	3	$2,4 \times 10^3$	2	$3,4 \times 10^2$	3	$7,4 \times 10^2$
	Sau TN	4	$8,4 \times 10^3$	3	$7,9 \times 10^4$	4	$2,1 \times 10^4$	3	$6,1 \times 10^4$	3	$4,6 \times 10^3$
<b>VSV PGL</b>	Trước TN	3	$6,3 \times 10^3$	2	$3,2 \times 10^2$	3	$3,5 \times 10^3$	3	$2,9 \times 10^3$	3	$3,5 \times 10^3$
	Sau TN	4	$7,1 \times 10^4$	3	$6,5 \times 10^4$	4	$3,8 \times 10^4$	5	$1,8 \times 10^4$	4	$9,2 \times 10^3$
<b>vi nấm</b>	Trước TN	2	$8,3 \times 10^2$	3	$3,2 \times 10^3$	3	$5,1 \times 10^3$	3	$1,2 \times 10^3$	3	$5,6 \times 10^3$
	Sau TN	5	$2,9 \times 10^4$	3	$1,2 \times 10^5$	3	$4,5 \times 10^5$	4	$1,6 \times 10^5$	3	$3,6 \times 10^5$
<b>xạ</b>	Trước	2	$7,5 \times 10^3$	2	$1,3 \times 10^2$	4	$2,5 \times 10^2$	2	$4,9 \times 10^3$	2	$9,2 \times 10^2$

<b>khuẩn</b>	TN										
	Sau TN	4	$6,3 \times 10^5$	3	$1,1 \times 10^5$	4	$4,8 \times 10^5$	2	$8,1 \times 10^5$	3	$4,7 \times 10^4$
<b>vi khuẩn</b>	Trước TN	3	$2,5 \times 10^4$	2	$3,7 \times 10^3$	3	$5,2 \times 10^3$	3	$4,5 \times 10^4$	2	$8,1 \times 10^3$
	Sau TN	5	$2,7 \times 10^5$	4	$4,2 \times 10^5$	5	$6,4 \times 10^6$	4	$2,5 \times 10^6$	3	$7,5 \times 10^6$

Trước khi trồng rừng thành phần và mật độ tế bào chủng cố định nitơ của các chủng/1g đất đạt được là rất thấp dao động trong khoảng từ  $7,4 \times 10^2$  đến  $3,2 \times 10^3$  CFU/1 gam đất. Thành phần các chủng cố định nitơ cũng ít, thu được 13 chủng chủng trong 5 mẫu đất. Qua phân tích trên cho thấy rằng với 5 mẫu đất trên đất thoái hoá bạc màu, nghèo chất dinh dưỡng hàm lượng vi sinh vật cố định nitơ thấp, và chủng loại ít. Sau 1,5 năm trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV đã tiến hành phân tích đất cho 5 công thức thí nghiệm nêu trên đã thu được 18 chủng cố định nitơ với số lượng bào tử tăng đáng kể đạt mật độ tế bào VSV cao nhất là  $7,9 \times 10^4$  CFU/1 gam đất ở công thức 2. Ở công thức 3 khi được bón 40 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật và trồng cây Thông nhựa mật độ tế bào cũng đạt  $2,1 \times 10^4$  CFU/1 gam đất tăng gấp 100 lần so ban đầu là  $2,4 \times 10^3$  CFU/1 gam đất.

Các chủng VSV phân giải lân được phân lập từ trong 5 mẫu đất chưa trồng rừng đưa vào phân tích chỉ thu được 14 chủng phân giải lân. Mật độ bào tử của các chủng thu được cũng rất khác nhau như ở công thức 2 số lượng bào tử thu được là ít nhất chỉ đạt  $3,2 \times 10^2$  CFU/ 1gram đất, trong khi ở công thức 1 số lượng bào tử đạt là  $6,3 \times 10^3$ CFU/ 1gram đất. Sau 18 tháng các trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV kết quả phân tích vi sinh vật phân giải lân của 5 công thức thí nghiệm số chủng vi khuẩn đã tăng đáng kể từ 14 chủng trước khi thí nghiệm đã tăng lên 20 chủng. Nhưng sự khác nhau khá rõ ở các công thức thí nghiệm bón các hàm lượng vi sinh khác nhau. Như ở công thức 5 (đối chứng) mật độ vi khuẩn khi được trồng cây che phủ có số lượng bào tử tăng không đáng kể từ  $3,5 \times 10^3$  đến  $6,2 \times 10^3$  CFU/1 gam đất, trong khi

ở công thức 3 khi được bón 40g chế phẩm đa chủng VSV mật độ vi khuẩn đã tăng nhiều so ban đầu, từ  $3,5 \times 10^3$  đến  $3,8 \times 10^4$  CFU/1 gam đất.

Khi phân tích kết quả về mật độ tế bào vi nấm của các chủng/1g đất đạt được là rất thấp dao động trong khoảng từ  $8,3 \times 10^2$  đến  $5,6 \times 10^3$  CFU/1 gam đất. Thành phần các chủng nấm thu được 12 chủng trong 5 mẫu đất. Qua phân tích trên cho thấy rằng với 5 mẫu đất thì hàm lượng vi sinh vật thấp, và chủng loại ít. Sau 18 tháng trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV tiến hành phân tích đất cho 5 công thức thí nghiệm nêu trên đã thu được 18 chủng vi nấm với số lượng bào tử tăng đáng kể. Ở công thức 3 khi được bón 40 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật và trồng cây Thông nhựa mật độ vi nấm đã tăng gấp 100 lần so ban đầu, từ  $4,1 \times 10^3$  đến  $4,5 \times 10^5$  CFU/1 gam đất.

Tuy nhiên khi phân tích mật độ, thành phần của nấm tổng số ở hầu hết các công thức trước khi thí nghiệm trồng rừng đều thấy xuất hiện sự có mặt của nấm gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa *Fusarium oxysporum*, sau khi trồng rừng được bón chế phẩm VSV đa chủng ở các công thức 2, công thức 3 và công thức 4 không thấy xuất hiện sự có mặt loài nấm này. Như vậy có thể chứng minh rằng sự góp mặt của vi khuẩn ức chế nấm gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa trong chế phẩm vi sinh vật đa chủng đã góp phần ức chế hoặc tiêu diệt loại nấm gây bệnh này.

Các chủng xạ khuẩn thu được với số lượng ít mật độ tế bào chỉ giao động  $1,3 \times 10^2$  đến  $7 \times 10^3$ CFU/ 1gram đất. Sau 18 tháng các công thức được bón chế phẩm đa chủng VSV và trồng Thông nhựa tiến hành phân tích xạ khuẩn của 5 công thức thí nghiệm trên đã thu được 16 chủng xạ khuẩn với số lượng bào tử tăng đáng kể. Như ở công thức 4 khi được bón 60 g chế phẩm đa chủng vi sinh vật, mật độ xạ khuẩn đã tăng gấp 100 lần so ban đầu, từ  $4,9 \times 10^3$  đến  $8,1 \times 10^5$  CFU/1 gam đất.

Các chủng vi khuẩn được phân lập trước và sau khi thí nghiệm trồng rừng có chủng loại và số lượng là rất ít, số lượng mật độ tế bào chỉ giao

động  $3,7 \times 10^3$  đến  $4,5 \times 10^4$ CFU/ 1gram đất. Sau 18 tháng trồng rừng và bón chế phẩm đa chủng VSV tiến hành phân tích vi khuẩn của 5 công thức thí nghiệm cho thấy số lượng chủng VK đã tăng đáng kể từ 13 chủng trước khi thí nghiệm đã tăng lên 22 chủng sau khi trồng cây và bón chế phẩm. Ở hầu hết các công thức khi được bón chế phẩm đa chủng VSV số lượng và thành phần phần tế bào các chủng vi khuẩn đều tăng lên. Ở công thức 4 khi bón 60 g chế phẩm đa chủng VSV mật độ vi khuẩn đã tăng nhiều nhất trong 5 công thức và so ban đầu, từ  $4,5 \times 10^4$  đến  $2,5 \times 10^7$  CFU/1 gam đất.

+) Thành phần và mật độ tế bào của chủng nấm nội cộng sinh của các mẫu đất rừng.

Kết quả phân tích các chủng nấm nội cộng sinh của các mẫu đất rừng thoái hoá bạc màu trước và sau khi thí nghiệm trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV được trình bày ở Bảng 3.28:

**Bảng 3.28: Số lượng chủng loại Nấm nội cộng sinh của đất thoái hoá, bạc màu trước và sau khi trồng Thông nhựa.**

T	CT	Trước thí nghiệm		Sau thí nghiệm	
		Ký hiệu chủng	Mật độ NCS/1gdất	Ký hiệu chủng	Mật độ NCS /1gdất
1	CT 1	CQ1.1; <i>Glomus</i> sp1	26	<i>Glomus</i> sp3, <i>Glomus</i> sp1, <i>Acauspora</i> sp1, CQ1.1	96
2	CT 2	<i>Acauspora</i> sp1, <i>Glomus</i> sp1	28	CQ2.1, <i>Glomus</i> sp1, <i>Acauspora</i> sp1	82
3	CT 3	CQ2.1	54	CQ2.1, CQ3.2, <i>Glomus</i> sp1, <i>Acauspora</i> sp1, <i>Acauspora</i> sp2, <i>Glomus</i> sp2	74
4	CT 4	CQ4.1, <i>Acauspora</i> sp1, <i>Glomus</i> sp1.	40	CQ4.1, CQ4.2, <i>Acauspora</i> sp1, <i>Glomus</i> sp1, <i>Gigaspora</i> sp1	90

5	CT 5	<i>Acauspora</i> sp1, <i>Glomus</i> sp3,	36	<i>Acauspora</i> sp1, <i>Glomus</i> sp3, <i>Gigaspora</i> sp2	41
---	------	---	----	---	----

Phân tích nấm nội cộng sinh trong 5 mẫu, cho 5 công thức trước khi thí nghiệm bón chế phẩm và trồng cây kết quả thu được 10 chủng nấm nội cộng sinh khác nhau. Số lượng các chủng và mật độ bào tử nấm nội cộng sinh trong mỗi mẫu đất khác nhau là không giống nhau, nhưng nhìn chung là chủng loại và mật độ bào tử ít. Tuy nhiên sau khi trồng rừng và bón chế phẩm đa chủng VSV đã có kết quả rất khả quan mật chủng loại nấm nội cộng sinh tăng đột biến đạt 21 chủng. Số lượng bào tử cũng được cải thiện rất nhiều như ở công thức 1 và công thức 3 thu được 90-96 bào tử/100 gam đất. Các chủng nấm nội cộng sinh xuất hiện ở các mẫu đất khác nhau rất khác nhau có chủng xuất hiện ở nhiều mẫu đất như chủng *Acauspora* sp1 và chủng *Glomus* sp1. Ở công thức 3 khi bón 40 g chế phẩm đa chủng VSV mật độ nấm nội cộng sinh tăng về chủng loại rất nhiều, phân tích đã thu được 6 chủng nấm nội cộng sinh khác nhau.

Thông qua phân tích các chỉ số vi sinh của 5 công thức đất thoái hoá bạc màu cho thấy, thành phần về số lượng và chủng loại các loại VSV nói chung và các loại VSV có ích nói riêng đều rất nghèo nàn, có thể nói sự có mặt của các vi sinh vật ở đây là rất hiếm. Nhưng khi được bón chế phẩm đa chủng VSV và trồng cây Thông nhựa tính chất của đất đã thay đổi khi có sự góp mặt của khá nhiều thành phần và chủng loại VSV có ích. Đặc biệt hầu hết các mẫu đất trước thí nghiệm đều có sự góp mặt của nấm *Fusarium oxysporum*, sau khi bón chế phẩm VSV đa chủng và trồng rừng Thông nhựa 18 tháng tuổi không thấy xuất hiện loại nấm gây bệnh này. Như vậy có thể kết luận rằng khi được bón chế phẩm VSV đa chủng thành phần và chủng loại vi nấm tổng số, vi khuẩn tổng số, xạ khuẩn tổng số, nấm nội cộng sinh tăng lên rõ rệt và không thấy xuất hiện nấm *F.oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa đó cũng là yếu tố cải thiện đất thoái hoá bạc màu.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

#### 1.1. Tuyển chọn vi sinh vật và đặc điểm sinh học của chúng.

Tuyển chọn được bộ chủng giống vi sinh vật có hoạt lực sinh học cao đó là:

- Chủng Pt1 thuộc loài nấm *Pisolithus tinctorius* cộng sinh Thông nhựa cho chiều cao cây Thông nhựa 4.7 cm tăng 55% so với đối chứng.
- Chủng QI1 là loài *P. fluorescens* có khả năng tổng hợp IAA đạt 11,872mg/l và ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa với đường kính vòng ức chế là 20,1 mm. Nhân sinh khối chủng QI1 điều kiện tối ưu là môi trường gi đường, thời gian 120 giờ (5 ngày), nhiệt độ 25<sup>0</sup>C, độ pH thích hợp 7- 7,5.
- Chủng QI24 được xác định là loài *B. subtilis* vừa có khả năng đối kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ Thông nhựa, sau 10 ngày có đường kính vòng ức chế nấm gây bệnh là 22 mm, vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 5,312mg/l. Nhân sinh khối chủng QI24 với điều kiện tối ưu là môi trường PD, thời gian 72 giờ (3 ngày), nhiệt độ 27<sup>0</sup>C, độ pH thích hợp 7.
- Chủng N2.1 là loài *B. cenocepacia* có khả năng phân giải photphat khó tan, đường kính vòng phân giải là 23,5mm, sinh nồng độ lân dễ tiêu là 420 ppm, vừa có khả năng cố định nitơ đạt 2,12 mg/ml NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Nhân sinh khối chủng N2.1 với điều kiện tối ưu là môi trường Pikoskaya, thời gian 72 giờ (3 ngày), nhiệt độ 27<sup>0</sup>C- 30<sup>0</sup>C, độ pH thích hợp 6,5.
- Chủng V4.2 là loài *A. beijerinckii* có khả năng cố định nitơ đạt 4,18 mg/ml NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, vừa có khả năng phân giải photphat khó tan, đường kính vòng phân giải là 17,2mm, sinh nồng độ lân dễ tiêu 271,32 ppm. Nhân sinh khối chủng V4.2 với điều kiện tối ưu là môi trường nuôi cấy NFMN, thời gian 96 giờ (4 ngày), nhiệt độ 25<sup>0</sup>C- 27<sup>0</sup>C độ pH thích hợp 6,5 – 7.

### **1.2. Tạo chế phẩm vi sinh vật đa chủng.**

- Sản xuất được 2 chế phẩm vi sinh vật sử dụng cho vườn ươm và rừng trồng từ các chủng vi sinh vật tuyển chọn có hiệu quả cao bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng.

### **1.3. Tác dụng của chế phẩm VSV đa chủng đến cây Thông nhựa và đất thoái hoá, bạc màu.**

- Xác định được công thức sử dụng chế phẩm vi sinh vật cho bầu ươm là 2g/bầu, chiều cao cây vườn ươm tăng 28% so với đối chứng không bón gì, tăng 24% so với đóng bầu thông thường có 1% lân, tỷ lệ bị bệnh giảm chỉ còn 3-5%.

- Xác định được công thức sử dụng chế phẩm vi sinh vật cho rừng trồng Thông nhựa là 40 g/cây, cho chiều cao cây Thông nhựa ở rừng trồng, đạt 34,62 cm tăng 26% so với đối chứng không bón phân, tăng 19% so với đối chứng bón phân NPK (20.20.15), đường kính gốc của cây Thông nhựa sau 1.5 tuổi đạt 1,5 cm tăng 44% so với đối chứng không bón phân, tăng 27% so với đối chứng bón phân NPK (20.20.15).

- Hiệu quả của chế phẩm vi sinh vật đa chủng đến đất thoái hoá bạc màu: Đất trở nên tơi xốp hơn với hàm lượng mùn tăng 1,2 lần, hàm lượng lân tổng số tăng 1,3 lần. Tất cả các chỉ tiêu về thành phần và mật độ vi sinh vật đều tăng lên rõ rệt và không thấy xuất hiện nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa.

### **2. Kiến nghị.**

- Cần nhân rộng mô hình sản xuất và sử dụng chế phẩm vi sinh vật đa chủng cho cây Thông nhựa và các loài cây trồng khác trong Lâm nghiệp cũng như trong các ngành trồng trọt khác, mang lại hiệu quả kinh tế và bảo vệ môi trường.

- Cần thời gian để theo dõi sự sinh trưởng và phát triển mô hình rừng trồng Thông nhựa khi được bón chế phẩm ở các giai đoạn tiếp theo.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Thu (2009), Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật phân giải lân có hiệu lực cao và đặc điểm sinh học của chúng để sản xuất phân vi sinh cho cây lâm nghiệp. *Tạp chí khoa học lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, số 3, tr 1038 – 1045.
- Nguyễn Thị Thuý Nga (2015), Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi khuẩn nội sinh tạo chất kích thích sinh trưởng Indole-3-acetic axit (IAA) và đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ cây thông. *Tạp chí khoa học lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, số 3, tr 3948 - 3959.
- Nguyễn Thị Thuý Nga (2015), Nghiên cứu tạo chế phẩm đa chủng VSV và đánh giá hiệu quả của chế phẩm đối với sản xuất cây con Thông nhựa (*Pinus merkusii*) ở vườn ươm. *Tạp chí khoa học lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, số 3, tr 3960 – 3968.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tham khảo tiếng Việt Nam

1. Nguyễn Kim Anh, Phạm Thị Ngọc Anh, Lê Thị Thuý, Nguyễn Thị Quỳnh Như, Đậu Thị Tính (2008), Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Azotobacter* có hoạt tính Nitrogenaza và sinh tổng hợp IAA (Indol axetic axit) từ đất thôn Bình Kỳ - Hoà Quý – Ngũ Hành Sơn – Thành Phố Đà Nẵng. *Hội nghị nghiên cứu khoa học lần thứ 6*, Đại học Đà Nẵng.
2. Phạm Việt Cường (2004), Nghiên cứu sản xuất phân bón vi sinh đa chủng chức năng cho cây công nghiệp ở quy mô Pilot. *Hội nghị báo cáo khoa học*.
3. Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015), Phân lập và xác định đặc tính vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai lang (*Ipomoea batatas*) trồng trên đất phèn ở huyện Hòn đất, tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, số 36 tr 6-13.
4. Vũ Văn Định (2009), Tăng cường khả năng kháng bệnh cảm ứng cho cây keo lai bằng sử dụng VSV nội sinh. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 18, tr 91-96.
5. Vũ Văn Định (2012), Vai trò của vi khuẩn nội sinh trong sự kích kháng nấm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* trên Keo tai tượng trồng ở một số vùng miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 1, tr 876-880.
6. Vũ Văn Định (2014), Nghiên cứu ứng dụng Vi sinh vật nội sinh để tăng cường tính kích kháng đối với bệnh khô cành ngọn Keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd) ở miền Bắc Việt Nam. Luận án tiến sĩ, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
7. Đinh Thuý Hằng, Trần Triết (2009), Quá trình cố định nitơ trong rừng ngập mặn Cần Giờ và các vi sinh vật tham gia. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, Đại Học Sư phạm Đà Nẵng số 7, tr 101-106.
8. Lê Như Kiều, Trần Quang Minh, Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Huân (2010). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh lác và vùng. *Tạp chí Khoa học và Công*

nghệ, tập 48, số 3, tr. 33 – 41.

9. Lê Như Kiều, Nguyễn Văn Huân, Lê Thị Thanh Thủy (2011), Nghiên cứu khả năng tổ hợp của các chủng vi sinh vật để sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho chè. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 02(23), tr. 133 – 138.

10. Lê Như Kiều, Nguyễn Thị Thanh Tâm, Lê Thị Thanh Thủy (2012), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng nấm *Botryodiplodia theobromae* Pat gây bệnh chết khô cành cây cao su. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 16/ 2012, 74 – 78.

11. Lê Như Kiều, Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Toàn, Lã Tuấn Anh, Đặng Thương Thảo (2012), Đánh giá hiệu quả phân hữu cơ vi sinh đa chức năng đặc chủng cho cao su giai đoạn kiến thiết cơ bản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 2 (32), tr. 60 - 65

12. Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Thu (2006), Bước đầu nghiên cứu phòng trừ Cỏ dại ngoại lai xâm hại rừng bằng Nấm *Colletotrichum truncatum* (Schewein) Andrus & Moore. *Tạp chí khoa học lâm nghiệp – Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, số 4, tr 210 – 214.

13. Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Thu (2006), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh thực vật để phòng trừ nấm *Fusarium equiseti* gây bệnh sọc tím ở cây Luồng, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, số 84.

14. Nguyễn Thị Thuý Nga, Phạm Quang Thu (2009), Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật phân giải lân có hiệu lực cao và đặc điểm sinh học của chúng để sản xuất phân vi sinh cho cây lâm nghiệp. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*, số 3 tr 1038-1045

15. Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011), Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. Và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía. *Tạp chí khoa học Đại Học Cần Thơ*, số 18a tr 161-167.

16. Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Nguyễn Minh Đới, Trần Nguyễn Nhật Khoa và Thái Trần Minh Phương (2013), Phân lập các dòng vi

khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*, số 27 tr 24-31.

17. Nguyễn Hoàng Nghĩa và Phạm Quang Thu, (2006), Vai trò của Vi sinh vật nội sinh trong cơ chế kháng bệnh loét thân cành, do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Gây bệnh hại đối với Keo, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 96, tr 70- 73.

18. Phạm Văn Mạch (1991), Góp phần nghiên cứu bệnh thối nhũn (*Damping off*) cây con thông nhựa (*Pinus caribaea Morelet*) tại một số vùng ở miền Bắc Việt Nam. *Luận án phó Tiến sĩ*, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

19. Trần Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp (2011), Phân lập và đặc tính vi khuẩn nội sinh trong cây khóm (*Ananas Comosus* L.) trồng trên đất phèn huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ* số 9 tr 125-132

20. Trần Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp (2011), Hiệu quả phân hữu cơ vi sinh bón cho cây Khóm trồng trên đất phèn huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ* số 19b tr 179-186.

21. Trần Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp (2012), Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ cây ngô tại một số địa điểm của tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí khoa học, Đại Học Cần Thơ* số 24b tr 234 - 241

22. Nguyễn Xuân Quát (1985), Thông nhựa ở Việt Nam - yêu cầu chất lượng cây con và hỗn hợp ruột bầu ương cây để trồng rừng. *Luận án Phó Tiến sĩ khoa học nông nghiệp*, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

23. Lai Chí Quốc, Nguyễn Thị Đơn, Cao Ngọc Điệp năm (2012). Tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn cố định đạm (Có khả năng hoà tan lân và kali) phân lập từ vật liệu phong hoá của vùng núi đá hoa cương tại núi cấm, tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ* số 24a tr 60-69.

24. Phạm Quang Thu (1999), *Ứng dụng nấm cộng sinh để sản xuất cây con vườn ươm*, *Tạp chí Công nghệ thực phẩm và Nông nghiệp* số 9, tr 414-415.

25. Phạm Quang Thu, Trần Thanh Trắng (2002), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm gây bệnh vệt rồng cây Thông con, *Thông tin KHKT Lâm nghiệp*, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam số 3 tr 2 – 5.
26. Phạm Quang Thu (2004), Sản xuất phân vi sinh đa chủng, chức năng cho một số loài cây trồng lâm nghiệp keo, Bạch đàn, *Thông quy mô Pilot, Báo cáo khoa học - Viện Khoa học lâm nghiệp Việt Nam*.
27. Phạm Quang Thu, Nguyễn Thị Thúy Nga (2007), Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh để phòng trừ nấm *Cryptosporiopsis Eucalypti Sankaran & Sutton* Gây bệnh cháy lá bạch đàn. *Thông tin khoa học kỹ thuật Lâm nghiệp*, số 4, tr 479 - 485.
28. Phạm Quang Thu, Đặng Như Quỳnh (2007). Thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với bạch đàn và thông. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 18, tr 73-80.
29. Phạm Quang Thu, Đặng Như Quỳnh (2008), Đặc điểm sinh trưởng của hệ sợi và sự hình thành rễ nấm của một số loài nấm ngoại cộng sinh với bạch đàn trong nuôi cấy thuần khiết. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. số 9, tr 84-90.
30. Phạm Quang Thu, Nguyễn Thị Thúy Nga (2011), Sử dụng vi sinh vật đất kết hợp cây che phủ nhằm nâng cao năng suất của cây Keo lai và cải tạo đất sau luân kỳ bạch đàn. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 4 tr 1993-2002.
31. Phạm Văn Toàn (1998), Nghiên cứu áp dụng các giải pháp công nghệ mới nhằm mở rộng việc sản xuất và ứng dụng phân bón vi sinh VSV cố định Ni tơ, phân giải lân trong nông, lâm nghiệp, *Báo cáo khoa học - Viện Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam*.
32. Phạm Văn Toàn, Trần Tú Thủy, Nguyễn Thu Hà, Phạm Bích Hiên, Hoàng Minh Tâm, Nguyễn Văn Thắng, Trinh Văn My (2004), Nghiên cứu sản xuất và sử dụng phân bón vi sinh vật đa chủng, chức năng cho một số cây trồng nông, lâm và công nghiệp, *Tuyển tập các công trình khoa học kỹ thuật nông nghiệp*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr. 213-227.

### **Tài liệu tham khảo tiếng nước ngoài**

33. Alan E. Richardson (2000), Protection for using soil microorganism to improve the acquisition of phosphorus, *Australian journal of plant physiology* 897-906.
34. Azcorn, R., Barea, J.M. (1975), Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants, *Plant Soil*, 43: 609-619.
35. Beijerinck, M.W. (1901), Über ologonitrophile mikroben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.* 41: 561-582.
36. Brakel, J., Hilger F. (1965), Etude qualitative et quantitative de la synthese de substances de nature auxinique par *Azotobacter chroococcum* *in vitro*. *Bull. Inst. Agron. Stns. Rech. Gembloux*, 33: 469-487.
37. Chandramohan D, Mahadevan A. (1968a). Epiphytic microorganisms and IAA synthesis. *Planta* 81: 201- 205
38. Chandramohan D, Mahadevan A. (1968b). Indole acetic acid metabolism in soils. *Soil Biol.Biochem* 4: 112 - 115
39. Chanway C.P., (1996). Endophytes: *They are not just fungi*, *Canadian Journal of Botany* 74: 321-322.
40. De La Cruz RE, Bartolome HT & Aggangan NS. (1988), Pilot testing of mycorrhizal tablets for pines and *Eucalyptus* in the Philippines. In: *Proceedings UNESCO Regional Workshop on Development and Production of Mycorrhizal Inoculants*. Biotech, UPLB College Lagun Philippines.
41. Eklund, E. (1970), Secondary effects of some *Pseudomonads* in the rhizosphere of peat grown cucumber plant. In: Pharis R.P., Reid D.M., eds, *Hormonal Regulation of Development*. Vol 3, Springer-Verlag, N.Y., p. 613.
42. Fries N. (1978). Basidiospore germination in some mycorrhiza forming hymenomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 70: 319-324.
43. Frey, K. E., D. I. Siegel, and L. C. Smith (2007), Geochemistry of west Siberian streams and their potential response to permafrost degradation, *Water Resour. Res.*, 43, 03406 - 03412.

44. Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. (2006) Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*, *Plant Soil*, 280, 239–252.
45. Hall, T. A. (1999), “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp. 95-98.
46. Harman, G. E. & C. P. Kubicek. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, London, UK.
47. Harman, G. E., R. Petzoldt, A. Comis & J. Chen. (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94:147-53.
48. Hennequin, J.R., Blachere, H. (1966), Recherches sur la synthese de phytohormones et de composes phenoliques par *Azotobacter* et des bacteries de la rhizosphere. *Ann. Inst. Pasteur*, 3: 89-102.
49. Hidayat Jajat và Christian P.Hansen. (2003) Flora of Cambodia and Species Monographs Botanical Work by CTSP. Forest Gene Conservation Strategy, CTSP, FA, DANIDA. No 1-8.
50. Huo, Z., X. Yang, W. Raza, Q. Huang, Y. Xu, and Q. Shen. (2010). Investigation of factors influencing spore germination of *Paenibacillus polymyxa* ACCC10252 and SQR-21. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(2): 527-536.
51. Jinwi Kim (2000), isolation and purification of antifungal compound and lactamase inhibitor from endophytic bacteria, MS thesis, SNU.
52. Johri JK, Surange S, Nautiyal CS (1999), Occurrence of Salt, pH, and Temperature-Tolerant, Phosphate-Solubilizing Bacteria in Alkaline Soils. *Cur Microbiol* 4, 39:89.

53. José Mariano Iguala, Angel Valverdea, Emilio Cervantesa and Encarna Velázquezb (2001), Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study, 24, 561-568.
54. Joseph W. Kloepper, Sadik Tuzun, Geoffrey W. Zehnder, and Gang Wei. (1997), Multiple Disease Protection by Rhizobacteria that Induce Systemic Resistance—Historical Precedence, The American Phytopathological Society; 4; 136-137
55. Jungh et de Vries (2012), *Pinus merkusii* Jungh et de Vries - a vulnerable gymnosperm needs conservation. Department of Forestry, North Eastern Regional Institute of Science & Technology (Deemed University), Nirjuli - 791109, Arunachal Pradesh, India.
56. Jyotishman Deka, Sanjeeb Bharali , Anup Kr Das , Om Prakash Tripathi and Mohamed Latif Khan. (2013) Mapping the Potential Distribution of *Pinus Merkusii* Jungh Et De Vries. A Vulnerable Gymnosperm in Eastern Arunachal Pradesh Using Maximum Entropy Model.
57. Kuek C. (1994), Issues concerning the production and use of inocula of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. *Managerment of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 4, 221-230.
58. Largent D. (1977), *How to Identify Mushrooms to Genus VI: Modern Genera*. Mad River Press Inc., Eureka.
59. Le Tacon F& Bouchard D. (1986), Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecologica Applicata* 7: 398-402.
60. Li, B., R. Yu, Q. Tang, T. Su, X. Chen, B. Zhu, Y. Wang, G. Xie, and G. Sun. (2011). Biofilm formation ability of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* and their inhibitory effect against tomato bacterial wilt. *African Journal of Microbiology Research*. 5(25): 4260-4266.
61. Lubanza Ngoma, Boipelo Esau and Olubukola Oluranti Babalola (2013), Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria

for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng, South Africa. *African Journal of Biotechnology* 12(26) 4105 – 4114.

62. Malajczuk. N & Hartney.V. J. (1986), Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *F. ucutyptus laiiitil-* (iutensis with ectomycorrhizal fungi, and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/ vermiculite carrier. *Australian Forest Research* 16, 199- 206

63. Marques D, Esteves AI, Xavier J, Almeida M, Humanes M (2006), Marine Sponge *Cliona celata* as a potential bioindicator In: Alpoim MC, Morais PV, Santos MA, Cristovao AJ, Centeno J, Collery P, Libbey J (eds). *Metal ions in biology and medicine*, vol.9. Eurotext, Paris. pp. 451- 456.

64. Marx DH & Kenney DS. (1982), Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: Schenck NC (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society, St Paul, 131-146.

65. Marx DH, Cordell CE, Maul SB & Ruehle JL. (1989), Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seeding nurseries. *New Forests* 3: 45-56

66. Marx DH. (1991), The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: *Ecophysiology of Ectomycorrhizae of Forest Trees*. The Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings No. 7, 54-90.

67. Maryenko, V.G. (1964), Zavisimost lurozaja kukuruzy l balansa azota *Azotobacter chroococcum* Vusbvijah monobakterialnoj kultury (Dependence of maize yield and nitrogen balance on *Azotobacter chroococcum* in the conditions of monobacterial cultivation). Dokl ISHA. No. 99 pp. 399-406, 2: 357-360.

68. Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C., (2002), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science* 83, 137–145.

69. Nguyen Sy Giao (1996), Remarks on *Mycorrhiza* of some tree species in



- VietNam. Proc. Inter. *Workshop BIO- REFOR*. Bangkok, 1996.
70. Olubukola O. Babalola and Bernard R. Glick. (2012), Indigenous African agriculture and plant associated microbes: Current practice and future transgenic prospects. *Scientific Research and Essays* 2431- 2439.
71. Reungchai Pousujja. (N.C.) Jens Granhof and R.L. Willan (1986), *Pinus merkusii* Jungh. & De Vriese. *Including Pinus merkusiana Cooling and Gaussen*.
72. Ruben Puga-Freitas, Samir Abbad, Agnès Gigon, Evelyne Garnier-Zarli, and Manuel Blouin. (2012), Control of Cultivable IAA-Producing Bacteria by the Plant *Arabidopsis thaliana* and the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Applied and Environmental Soil Science*, 9, 307415 – 307419.
73. Sartaj, A. Wani, (2012). “Effect of balanced NPKS, biofertilizer (*Azotobacter*) and vermicompost on the Yield and Quality of Brown sarson (*Brassica rapa* L.)”, M. Sc Thesis, Sher-e-Kashmir University of Agriculture Sciences and Technology, Kashmir, Shalimar, Srinagar.
74. S. Fracchia, Sampedro, J.M. Scervino, I.Garcia-Romera, J.A. Ocampo và A. Godeas. (2004). Influence of Saprobe Fungi and Their Exudates on Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Balaban, Philadelphia/ Rehovot*, 36, 169- 182.
75. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. (2007), Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31, 425 – 448.
76. Stijn Spaepen and Jos Vanderleyden. (2010), Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*
77. Seed leaflet No 60 January (2002), *Pinus merkussi* Jungh, etde Vriese.
78. Xavier LJC, Germida JJ. (2003) Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity, *Soil Biol Biochem* 35, 471-478
79. Yuparet Puangmali (1999). Isolation and selection of some Herbal. Endophytic Bacteria Capable of Producing L-Asparaginase.
80. Timmusk, S., B. Nicander, U. Granhall, and E. Tillberg. (1999), Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*. 31(13), 1847-1852.

81. Timmusk, S., N. Grantcharova, E. Gerhart, and H. Wagner. (2005), *Paenibacillus polymyxa* Invades Plant Roots and Forms Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11), 7292-7300.
82. Zhang S, Reddy MS, Kokalis-Burelle N, Wells LW, Nightengale SP, Kloepper JW (2001) Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Dis* 85, 879–884
83. Wong, K. K. Y., Piche, Y., Montpetit, D . & Fotin, J. A. (1989), Colonization of *Pinus banksiana* roots by *Laccaria bicolor* variants structural characterization. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 28, 557-567.
84. [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)