

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

=====

NGUYỄN THỊ THUÝ NGA

TÓM TẮT LUẬN ÁN

**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**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP

**Công trình được hoàn thành tại: VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM**

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

Phản biện 1: .....

.....

Phản biện 2 .....

.....

Phản biện 3: .....

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện khoa học  
Lâm nghiệp Việt Nam

vào hồi giờ ngày tháng năm 2016

## 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.

# 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, diện tích rừng trồng thông các loại là khoảng 400.000 ha (chiếm gần 12% tổng diện tích rừng trồng trong cả nước). Loài thông được trồng chủ yếu là Thông nhựa (*Pinus merkusii*), cây Thông nhựa mang lại giá trị lớn về mặt kinh tế, xã hội.

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. 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 : nấm cộng sinh không được tuyển chọn; mang theo mầm 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, và chi phí lớn. Ở nước ta hiện nay 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 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%. 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 xung 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.

Hiện nay trên thị trường phân bón nước ta, có một số thương hiệu phân vi sinh nhưng 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 hóa 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 ươm và trồng Thông nhựa (Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese) trên đất thoái hóa ở Miền Bắc Việt Nam”.

## 2. MỤC TIÊU

### 2.1. Mục tiêu tổng quát

- Xác định cơ sở khoa học sản xuất được chế phẩm vi sinh vật đa chủng (gồm nấm ngoại cộng sinh, vi khuẩn sinh IAA 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.

### 2.2. 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.

## 3. 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.

- Lần đầu tiên phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn *Burkholderia cenocepacia*, *Azotobacter beijerinckii* có khả năng phân giải photphat 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.

# 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 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) 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. Theo Marx và đồng tác giả (1989) 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.

### 1.1.2. Nghiên cứu về VSVNS 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 VSV 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) cho rằng, vi khuẩn *Azotobacter* có thể sản sinh ra axit indol-3-acetic (IAA) là chất tăng trưởng thực vật. Chandramohan và Mahadevan (1968b) đã phân lập được vi khuẩn sinh IAA tăng trưởng thực vật từ cây Bông. 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) cho rằng, VSV nội sinh như những nhà máy khổng lồ, sản xuất IAA tăng kích thích sinh trưởng thực vật. Ruben và đồng tác giả (2012) cho rằng, có mặt của các vi sinh vật sinh IAA sẽ làm tăng sản lượng cây trồng một cách rõ rệt.

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

Johri và đồng tác giả (1999), 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. Alan (2000) 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. José và đồng tác giả (2001) nghiên cứu, các chủng vi khuẩn phân giải phốt phát được phân lập từ các nguồn khác nhau có hiệu lực phân giải phốt phát khác nhau. Việc sử dụng vi sinh vật phân giải phốt phát, 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.

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

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) 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. Joseph và đồng tác giả (1997) đã ứng dụng VSV đối kháng nấm gây bệnh, bằng cách tiêm chủng VK vào 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. Yuparet (1999) 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*.

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

Các tác giả Maryenko (1964) 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 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. Theo Timmusk (1999) 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

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

De và đồng tác giả (1988) 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 (2012) 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. Olubukola và Bernard (2012) 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.

#### **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, 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*, *Cenococcum 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.

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. Phạm Quang Thu (2004), 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. 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), 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.

### 1.2.2. Nghiên cứu về VSVNS sinh tổng hợp IAA kích thích tăng trưởng.

Nguyễn Kim Anh và đồng tác giả (2008), 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. Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành (2011) 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. Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp (2011) 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) đã nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh trên cây chuối có khả năng sinh IAA.

### 1.2.3. Nghiên cứu về vi sinh vật phân giải photphat

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 đôi với lạc là 23,7%.

Nguyễn Thị Thúy Nga và Phạm Quang Thu (2009) 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<sub>RH3</sub>, P9.2, P1.4, P1.1, có đường kính vòng phân giải photphat cao (có đường kính vòng phân giải > 2,2 cm).

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

Nguyễn Thị Thúy Nga và Phạm Quang Thu (2006), 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. Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thúy Nga (2007) 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. Lê Như Kiều và đồng tác giả (2010), phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra bệnh héo xanh lạc và vùng để sản xuất các chế phẩm vi sinh đối kháng ứng dụng



trong sản xuất lạc và vừng. 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.

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

Lai Chí Quốc và đồng tác giả (2012) đã tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn cố định đạm (có khả năng hoà tan phốt phát và kali) được phân lập từ vật liệu phong hoá của vùng núi đá hoa cương tại núi cấm, tỉnh An Giang. Trần Thanh Phong và Cao Ngọc Diệp (2012), 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.

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

Phạm Quang Thu (2004) nghiên cứu chế phẩm hỗn hợp bao gồm bào tử hữu tính nấm *P. tinctorius* và một số vi sinh vật chức năng khác. Phạm Quang Thu và Nguyễn Thị Thuý Nga (2011) 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, cho đường kính 1,3m tăng 22% chiều cao vút ngọn của cây Keo lai tăng khoảng 12%, tỷ lệ sống đạt 98%. Lê Như Kiều và đồng tác giả (2011) 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, chủng KT7, chủng PI6, chủng ĐK 14, chế phẩm vi sinh vật đa chủng đã làm giảm tỷ lệ chết ở cây chè lên đến 50,6%. 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.

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

Ở nước ta cây Thông nhựa phân bố từ Bắc vào Nam, 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, 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 rơm lá thông, hệ sinh thái của rừng thông khép tán bị ảnh hưởng nghiêm trọng, chi phí rất lớn. Theo Nguyễn Sỹ Giao, (1996) 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) 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 mọc 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. 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.

### **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, thủy 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 phát 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, tốn kém, 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. 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, 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. Chế phẩm vi sinh vật đa chủng 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 này còn 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. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

- Cành Thông nhựa đường kính 1 – 2cm thu từ những cây Thông nhựa khoẻ mạnh, sinh trưởng tốt.
- 30 mẫu đất rừng thu được ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam
- Tập đoàn nấm ngoại cộng sinh được lưu trữ tại Trung tâm nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
- Apatit, mùn, đất sét...

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu.**

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

- Phương pháp tuyển chọn nấm ngoại cộng sinh có hiệu lực cao theo phương pháp của (Wong và đồng tác giả 1989).
- Phân lập VSV nội sinh cây Thông nhựa trên môi trường PDA, tuyển chọn VSV nội sinh, sinh IAA bằng thuốc thử Salkowski xây dựng đồ thị đường chuẩn IAA so màu bước ở sóng 530nm.
- Tuyển chọn chủng VSV nội sinh đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ theo phương pháp nuôi cấy kép trên cùng một đĩa Petri.
- Phân lập các chủng VSV phân giải photphat khó tan theo phương pháp của Marx và Kenney 1982; Marx 1991; Kuek 1994.
- Tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân giải photphat khó tan trên môi trường Pikovskaya không có agar.
- Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật cố định nitơ tự do môi trường NFMN không có Agar.

#### *2.2.2. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học chủng có hiệu lực cao.*

- Quan sát VSV bằng kính hiển vi điện tử quét JSM 5410-LV (Jeol, Nhật). Đếm tế bào đếm trực tiếp bằng buồng đếm *Breed* hoặc đếm trực tiếp bằng phương pháp pha loãng tới hạn  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , kiểm tra gram âm và gram dương vi khuẩn.
- Xác định môi trường thích hợp nhân sinh khối VK sinh tổng hợp IAA trên 3 môi trường: gi đường, GPB (Glucose Phosphate Broth), PBS (Phosphate Buffered Saline).
- Xác định môi trường thích hợp nhân sinh khối VK đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây Thông nhựa trên 3 môi trường: PD (Potato Dextrose), King's B (Pseudomonas Agar Base), PBS (Phosphate Buffered Saline).
- Xác định môi trường thích hợp nhân sinh khối VK phân giải photphat khó tan trên 3 môi trường: PD; nước chiết khoai tây có thêm một số thành phần nguyên tố khoáng và Pikoskaya.
- Xác định môi trường thích hợp nhân sinh khối VK cố định nitơ tự do trên 3 môi trường: Asby, NFMN, AT.
- Từ các môi trường nhân sinh khối thích hợp, xác định thời gian nuôi cấy tối ưu được thử nghiệm ở mốc thời gian 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ và 144 giờ,
- Từ các môi trường nhân sinh khối thích hợp, xác định nhiệt độ nuôi cấy thích hợp trên cơ sở thử nghiệm ở các khoảng nhiệt độ:  $17^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $23^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $28^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $33^{\circ}\text{C}$  và  $35^{\circ}\text{C}$ .

- Từ các môi trường nhân sinh khối thích hợp, xác định trị số pH môi trường tối ưu trên cơ sở thử nghiệm ở các trị số pH : 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 và 8.
- Định danh một số loài có hiệu lực cao với việc sử dụng môi kit AmpliTaq (Amersham). Các chuỗi ADN được so sánh với GeneBank thông qua giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide.

### 2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tạo chế phẩm đa chủng VSV.

- 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 kép trên cùng một đĩa Petri.
- Nghiên cứu giá thể tạo chế phẩm VSV cho cây Thông nhựa khi trồng rừng với mật độ tế bào tối thiểu là  $> 10^7$ ) 4 công thức theo bảng dưới đây:

Công thức	Bột apatit (%)	Mùn (%)	Đất sét (%)	Potassium polyacrylamide (%)	BT nấm Pt (g) (%)	DDVK sinh IAA (%)	DD 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 giá thể tạo CP VSV cho cây con Thông nhựa ở vườn ươm;

Công thức	Bột apatit (%)	Mùn (%)	Đất sét (%)	BT nấm Pt (g) (%)	DD VK sinh IAA (%)	DDVK PGL (%)	DDVK ĐK nấm gây bệnh (%)	DDVK cố định ni tơ (%)
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

- Nghiên cứu thời gian bảo quản của chế phẩm được thực hiện theo 2 công thức: Bảo quản ở nhiệt độ phòng và bảo quản trong điều kiện phòng nhiệt độ (15 – 20<sup>0</sup>C).

### 2.2.4. Phương pháp đánh giá hiệu quả chế phẩm:

- Ảnh hưởng của chế phẩm tới cây Thông nhựa tại vườn ươm thí nghiệm với 5 công thức, CT1 đất trộn 1% lân, (đối chứng), CT2 bón 1 gam chế phẩm VSV/bầu, CT3 bón 2 gam chế phẩm VSV/bầu, CT4 bón 3 gam chế phẩm VSV/bầu, CT5 bón 2 gam chế phẩm MF1/bầu.
- Ảnh hưởng chế phẩm tới cây Thông nhựa tại rừng trồng thí nghiệm với 5 công thức; CT1: bón 200 g NPK/cây, CT2: bón 20 gam/cây chế phẩm VSV, CT3: bón 40 gam/cây chế phẩm VSV, CT4: bón 60 gam/cây chế phẩm VSV, CT5: đối chứng không bón gì.
- Ảnh hưởng của chế phẩm VSV đa chủng đến đất thoái hoá bạc màu, phân tích các chỉ tiêu lý, hoá, chỉ tiêu vi sinh vật của đất trồng trước và sau khi thí nghiệm.

**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 bảng 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.

Sau 30 ngày nhiễm nấm bằng phương pháp invitro 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. Chủng nấm Pt1 thuộc loài *Pisolithus 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. Chủng nấm Pt1 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 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 đặc điểm khuẩn lạc của các chủng VSV phân lập được có khác nhau về màu sắc và sự phát triển của chúng, tuyển 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 tuyển chọn từ 38 chủng vi sinh vật này.

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

Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng VK kết quả được trình bày ở bảng 3.1

**Bảng 3.1: 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	QI1	+	11,872
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	QI8	+	15,328
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	+	1,696
23	QI19	+	0,832
24	QI20	+	1,76
25	QI21	+	3,36
26	QI23	-	0
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

(+) 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 3.1, 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, chủng QI1, 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 chỉ tổng hợp được 0,352 mgIAA/l. Chủng QI1 và chủng QI8 được chọn đưa vào cho các nghiên cứu tiếp theo. Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn sinh IAA với màu sắc khác nhau (Hình 3.1-3.6).



Hình 3.1: Chủng VK QI1

Hình 3.2: Chủng VK CI6

Hình 3.3: Chủng VK QI8

Hình 3.4: Chủng VK QI26

Hình 3.5: Chủng VK QI24

Hình 3.6: Chủng VK QI23

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

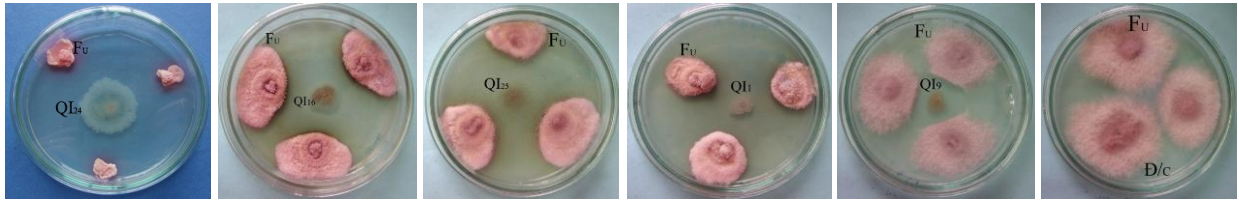
Trong 38 chủng vi khuẩn được tìm thấy khi phân lập vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa, đưa vào thử nghiệm khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 3.2.

**Bảng 3.2 : Hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ thông của VKNS**

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	20,5
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	22,1
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 gây bệnh *F. oxysporum*. Chủng QI1 có khả năng sinh tổng hợp IAA rất mạnh đạt 11,872 mg/l và chúng còn có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất mạnh đạt vòng ức chế 20,1mm (Hình 3.10). 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 mạnh đạt vòng ức chế 17,7mm (Hình 3.11). Chủng QI16 có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất mạnh đạt vòng ức chế 20,5mm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 4,784mg/l (Hình 3.8). Chủng QI24 có đường kính vòng phân giải lớn nhất là 22,1mm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 9,312/l (Hình 3.7). Khi chỉ nuôi cây 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 đôi kháng (Hình 3.12). Vì vậy 4 vi khuẩn QI1, QI8, QI16, QI24 được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.7:  
Chủng QI24  
đôi kháng nấm  
*F. oxysporum*

Hình 3.8:  
Chủng QI16  
đôi kháng nấm  
*F. oxysporum*

Hình 3.9:  
Chủng QI25  
đôi kháng nấm  
*F. oxysporum*

Hình 3.10:  
Chủng QI1 đôi  
kháng nấm *F.*  
*oxysporum*

Hình 3.11:  
Chủng QI9  
đôi kháng nấm  
*F. oxysporum*

Hình 3.12:  
Nấm *F.*  
*oxysporum*  
Đ/c

### 3.1.3. Kết quả phân lập và tuyển chọn VSV 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 photphat khó tan. 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 photphat khó tan.

+) Tuyển chọn thông qua phương pháp, đo đường kính vòng phân giải ở các khoảng thời gian khác nhau kết quả được trình bày ở Bảng 3.3.

**Bảng 3.3: Khả năng phân giải photphat khó tan của vi khuẩn 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	23,0
5	N2.3	5,0	12,0	17,5	21,0
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 photphat khó tan, có 18 chủng có khả năng phân giải lân mạnh, có đường kính vòng phân giải > 10 mm, có 13 chủng có khả năng phân giải lân rất mạnh đường kính vòng phân giải >15 mm.

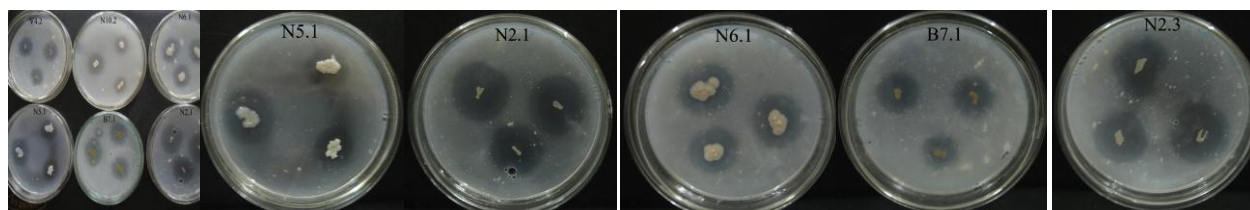
+) Kết quả so màu trên máy Quang phổ có bước sóng 430nm

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, kết quả được trình bày tại Bảng 3.4.

**Bảng 3.4: Khả năng phân giải photphat khó tan của các chủng VK**

STT	Ký hiệu chủng	ĐK vòng pg sau 7 ngày(mm)	Nồng độ lân dễ tiêu (ppm)
	Mẫu đối chứng không cấy vi khuẩn		43,95
1	N1.2	17,5	367,62
2	N2.1	23,0	420,13
3	N2.3	21,0	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

Chủng N2.3, chủng 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 (Hình 3.18). 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 và chủng N2.1 (Hình 3.15) đưa vào thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.13:  
Chủng VK pg  
phốt phát

Hình 3.14:  
Chủng VK  
N5.1

Hình 3.15:  
Chủng VK  
N2.1

Hình 3.16:  
Chủng VK N6.1

Hình 3.17:  
Chủng VK  
B7.1

Hình 3.18:  
Chủng VK N2.3

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

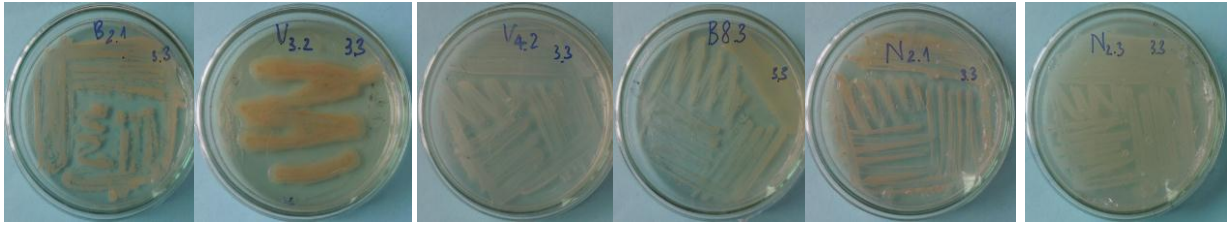
Với 35 chủng vi khuẩn phân giải lân được phân lập từ đất thu thập ở các tỉnh phía Bắc, tiếp tục thử nghiệm khả năng cố định nitơ. Kết quả khả năng cố định nitơ của các chủng được trình bày tại Bảng 3.5.

**Bảng 3.5: 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	Mạnh
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 N <sub>2</sub>
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	V3.2	3,34	Mạnh
30	V4.2	4,18	Mạnh
31	V5.1	0	Không cố định N <sub>2</sub>
32	V6.1	1,46	Yếu
33	V7.3	0	Không cố định N <sub>2</sub>
34	V8.2	0	Không cố định N <sub>2</sub>
35	V9.1	3,21	Mạnh

Chủng N2.1 có khả năng phân giải photphat 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 mg/ml NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(Hình 3.23). Chủng N2.3 có khả năng phân giải photphat 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 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(Hình 3.24). Chủng V3.2 có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 3,34 mg/ml NH<sub>4</sub><sup>+</sup> và có khả năng phân giải photphat khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 19,2 mm nồng độ lân dễ tiêu đạt 335,26 ppm (Hình 3.20). Chủng V4.2 có khả năng cố định nitơ mạnh đạt 4,18 mg/ml NH<sub>4</sub><sup>+</sup> và có khả năng phân giải photphat khó tan, đường kính vòng phân giải đạt 20,2 mm nồng độ lân

để tiêu đạt 410,03 ppm (Hình 3.21), các chủng N2.1, N2.3, V2.3 và V4.2 được lựa chọn đưa vào các nghiên cứu tiếp.



Hình 3.19:  
Chủng vi khuẩn  
B2.1

Hình 3.20:  
Chủng vi  
khuẩn V3.2

Hình 3.21:  
Chủng vi  
khuẩn V4.2

Hình 3.22:  
Chủng vi  
khuẩn B8.3

Hình 3.23:  
Chủng vi  
khuẩn N2.1

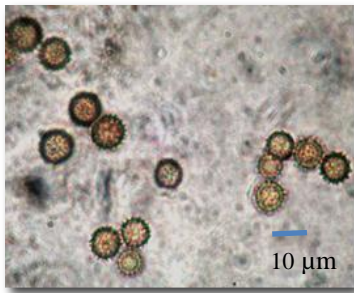
Hình 3.24:  
Chủng vi  
khuẩn N2.3

### 3.2. Đặc điểm hình thái và sinh học các chủng vi sinh vật 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.

Đặc điểm của loài *P. tinctorius* có thể quả hình cầu hoặc gần cầu, có đường kính từ 2,9 -17,5 cm, bào tử có hình cầu, có gai xung quanh, kích thước bào tử 8-12µm (Hình 3.25). 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 3.25 : Bào tử nấm *P. tinctorius*



Hình 3.26: Thể quả nấm *P.tinctorius*

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

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 3.6.

**Bảng 3.6: Hình thái tế bào và gram của các chủng vi khuẩn có ích.**

STT	Chủng	Gram	Hình dạng tế bào	Kích thước tế bào (µm)
1	QI <sub>1</sub>	-	Hình que dài, có râu đầu, một bên đầu nhọn.	1,4 x 4,1
2	QI <sub>8</sub>	-	Hình hạt gạo dài, một đầu bằng, một đầu nhọn.	1,6 x 2,7
3	QI <sub>16</sub>	+	Hình que ngắn, hai đầu tế bào đều nhau.	1,8 x 2,8
4	QI <sub>24</sub>	-	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

### 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.

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 12,52mg/l. Tuy vậy mật độ tế bào tối ưu của chủng QI8 phát triển kém hơn (đạt 72%) so với mật độ tối đa của chủng QI1.

#### 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.

Chủng QI16 và QI24 đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ thông được đưa vào nghiên cứu, Chủng QI16, đạt mật độ tế bào là  $4,2 \times 10^8$  (CFU/ml) khi nuôi cấy ở môi trường PD. Chủng QI24 phát triển tốt nhất trên môi trường 1 (PD) đạt mật độ tế bào là  $5,6 \times 10^8$  (CFU/ml), 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.

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

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 Pikoskaya, mật độ tế bào là  $16,7 \times 10^8$  CFU/ml, nhưng mật độ ở môi trường PD chúng chỉ đạt  $9,4 \times 10^8$  CFU/ml (mật độ chỉ đạt khoảng 55% so với môi trường 3).

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

Chủng V4.2 khi nuôi ở môi trường PD mật độ tế bào đạt là  $8,4 \times 10^8$  CFU/ml (chỉ bằng 57%) khi nuôi cấy môi trường 2 (Môi trường NFMN) mật độ tế bào tối đa là  $14,6 \times 10^8$  CFU/ml. Chủng V3.2 cũng đạt mật độ tế bào tối đa khi nuôi ở môi trường NFMN nhưng mật độ tế bào tối đa bằng 80% tế bào tối đa của chủng V4.2.

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

Sau 72 giờ có 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  $4,8 - 9,8 \times 10^8$  CFU/ml, sau đó mật độ tế bào giảm nhẹ sau ngày thứ 5 và thứ 6 (144 giờ) chỉ còn  $3,8 - 7,2 \times 10^7$  CFU/ml.

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

Chủng QI1 nhiệt độ tối thích là  $25^{\circ}\text{C}$  chúng phát triển gấp 200 lần so với khi nuôi  $17^{\circ}\text{C}$  độ mật tế bào tối đa đạt  $4,8 \times 10^8$  CFU/ml. Chủng QI8 phát triển tốt nhất đạt tế bào cực đại khi được nuôi trong điều kiện  $25^{\circ}\text{C}$ , 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.

Chủng QI16 và chủng QI24 phát triển tốt nhất khi được nuôi ở khoảng nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C} - 27^{\circ}\text{C}$ . 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. Chủng QI24 kháng nấm gây bệnh được lựa chọn vào sản xuất chế phẩm vi sinh vật đa chủng.

Chủng N2.1 đạt mật độ tế bào tối thích khi chúng được nuôi trong điều kiện môi trường 27°C. Trong khi chủng N2.3 đạt mật độ tế bào tối đa khi chúng được nuôi trong điều kiện môi trường 25°C.

Chủng V4.2 có biên độ nhiệt độ lớn, chúng có thể phát triển tốt trên dải nhiệt độ từ 25°C - 33°C. Trong khi chủng V3.2, cũng phát triển tốt nhưng thấp hơn chủng V4.2. 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.

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 x 10<sup>8</sup> CFU/ml, 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 x 10<sup>8</sup> CFU/ml, 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 x 10<sup>8</sup> CFU/ml. Tuy nhiên chủng QI24 có biên độ thích hợp với dải pH rộng.

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 x 10<sup>7</sup> CFU/ml. 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 x 10<sup>8</sup> CFU/ml.

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 x 10<sup>8</sup> CFU/ml.

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

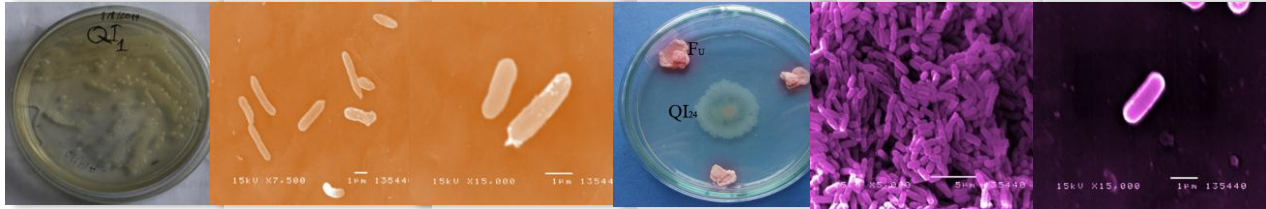
Thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp sinh học phân tử tại phòng thí nghiệm vi sinh, Viện Nghiên cứu Công nghệ Thực phẩm. DNA của các chủng vi khuẩn (QI1, QI24, N2.1, V4.2) được tách chiết, phân đoạn 16S rDNA của các vi khuẩn được khuếch đại PCR bằng cặp mồi 16S-8F và 16S1510R. DNA của phân đoạn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

**Bảng 3.7: 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 3.7 đã cho thấy, chủng QI<sub>1</sub> có trình tự ADN tương đồng 100% với trình tự ADN mã số trên genbank GU198115 là loài *Pseudomonas fluorescens*. Chủng QI<sub>24</sub> 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 beijerinckii*.





Hình 3.27: KL  
chủng (QI<sub>1</sub>)  
*P. fluorescens*

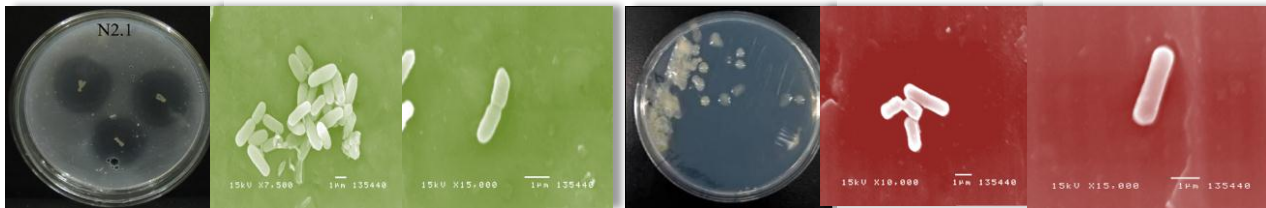
Hình 3.28: Tế  
bào chủng  
(QI<sub>1</sub>)  
*P. fluorescens*

Hình 3.29: Tế  
bào chủng  
(QI<sub>1</sub>)  
*P. fluorescens*

Hình 3.30: KL  
chủng (QI24)  
*B. subtilis*

Hình 3.31: TB  
chủng (QI24)  
*B. subtilis*

Hình 3.32: TB  
chủng (QI24)  
*B. subtilis*



Hình 3.33:  
Khuẩn lạc  
chủng (N2.1)  
*B.cenocepacia*

Hình 3.34: Tế  
bào chủng  
(N2.1)  
*B.cenocepacia*

Hình 3.35: TB  
(N2.1)  
*B.cenocepacia*

Hình 3.36:  
Khuẩn lạc  
chủng (V4.2)  
*A. beijerinckii*

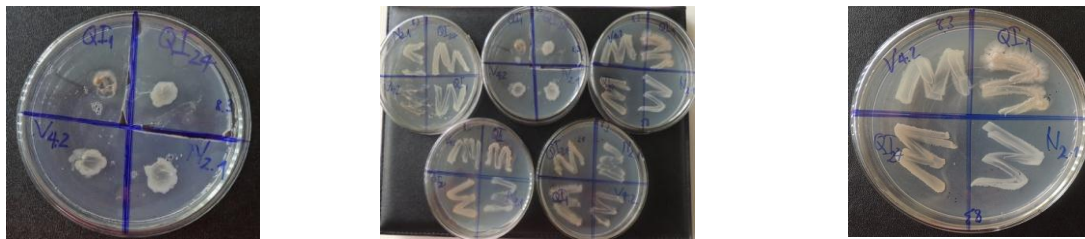
Hình 3.37: Tế  
bào chủng  
(V4.2)  
*A.beijerinckii*

Hình 3.38: Tế bào  
chủng (V4.2)  
*A. beijerinckii*

### 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 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 (Hình 3.39).



Hình 3.39 Hình ảnh các chủng VK cùng tồn tại và phát triển trên môi trường

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

- 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 QI1, 5% sinh khối dung dịch VSV phân giải phot phốt 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).

- Chế phẩm vi sinh vật đa chủng dùng cho vườn ươm 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 phot phát khó tan N2.1, 5% dung dịch VSV đối kháng với nấm bệnh thối cỏ rễ cây thông QI24 và 5% dung dịch VSV cố định nitơ V4.2).

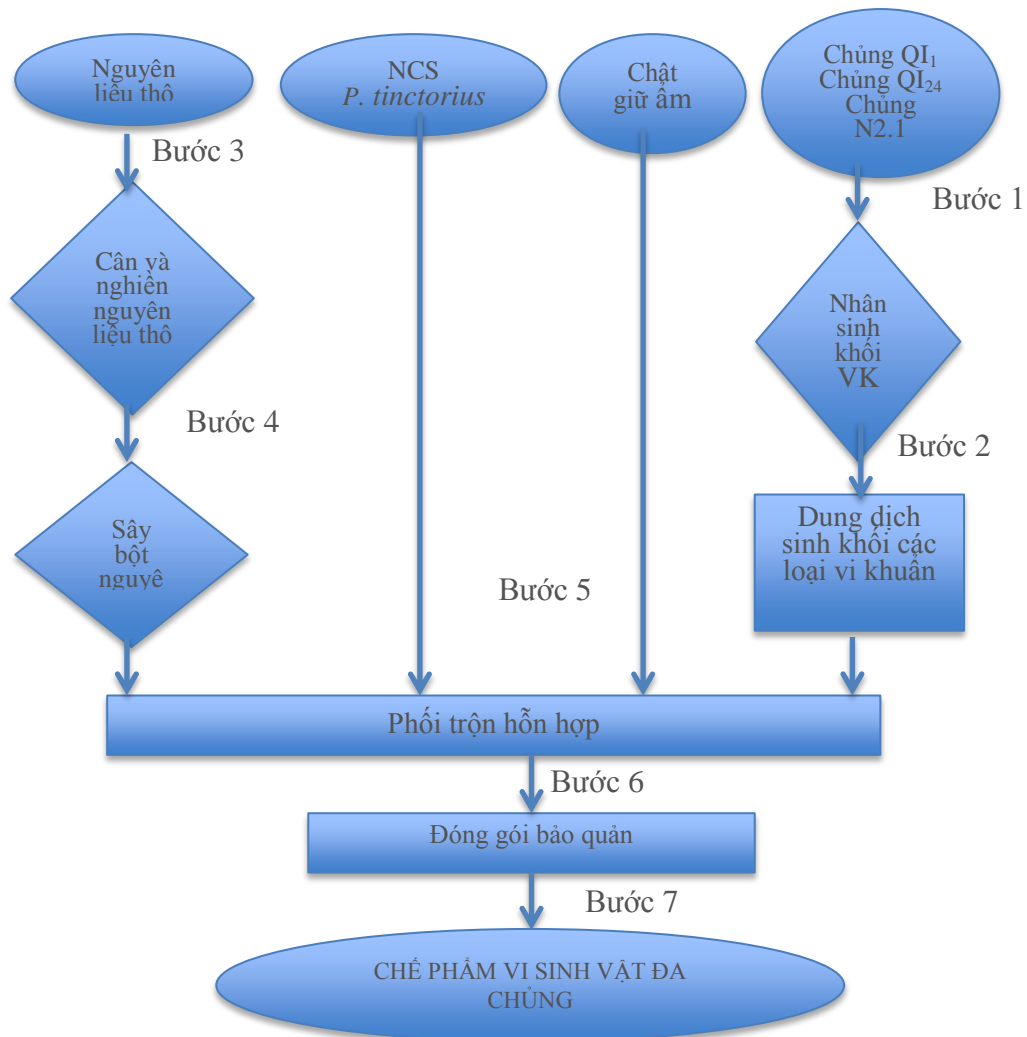
### 3.3.3. Kết quả nghiên cứu hoạt tính các chủng VSV trong chế phẩm.

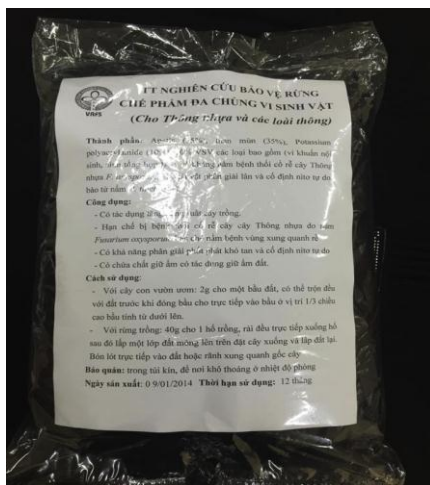
Hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn đều có hoạt lực giảm nhẹ dần theo thời gian. Như chủng *B. cenocepacia* (N2.1) phân giải phot phát khó tan, sau 8 tuần đường kính vòng phân giải vẫn đạt là 20,2 mm, nồng độ lân dễ tiêu đạt là 312,12 ppm chứng tỏ chúng vẫn có khả năng phân giải phot phát khó tan rất mạnh. Chủng 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.

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

Khi bảo quản chế phẩm đa chủng VSV ở hai thang nhiệt độ khác nhau là nhiệt độ phòng và điều kiện nhiệt độ phòng từ 15 – 20<sup>0</sup>C 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.

Hình 3.40: Quy trình SX CP VSV đa chủng để gieo ươm và trồng Thông nhựa





**Hình 3.41: Chế phẩm đa chủng vi sinh vật**

### 3.4. Kết quả ảnh hưởng của CP VSV đa chủng tới cây Thông nhựa và đất thoái hoá.

#### 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 kết quả được trình bày tại Bảng 3.8.

**Bảng 3.8: Hiệu quả của CP VSV đến sinh trưởng của Thông nhựa ở vườn ươm**

ST T	Công thức thí nghiệm	Sau 2 tháng		Sau 4 tháng		Sau 6 tháng		Sau 8 tháng		TLB TB tháng (%)	TLCS TB tháng (%)
		Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)	Hvn (cm)	Dg (mm)		
1	CT1 đ/c	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	<b>0,050</b>	<b>0,080</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

Sau thời gian 4 tháng, chiều cao cây Thông nhựa 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). 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 công thức 3 bón (2g chế phẩm) cũng cho chiều cao tăng 24% so với đối chứng và tăng hơn các công thức 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). Cây Thông nhựa được bón 2g chế phẩm sau 8 tháng có kết quả chiều cao và đường kính gốc là cao nhất.



### 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 3.9.

**Bảng 3.9: Hiệu quả của CP VSV đến sinh trưởng của Thông nhựa 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	<b>1,50</b>	<b>2,08</b>	<b>2,00</b>	<b>2,07</b>	<b>14,91</b>
8	Fpr	<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, 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%. 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 Fpr < 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%.

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

Phân tích tính chất lý hóa 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 với hàm lượng mùn tăng 1,2 lần, hàm lượng lân tổng số tăng 1,2 đến 1,3 lần, hàm lượng đạm tổng số tăng gần 1,5 lần so với trước khi thí nghiệm.

Như vậy chất lượng chế phẩm đa chủng vi sinh vật mang lại lợi ích khá cao, làm thay đổi tích cực tính chất lý hóa 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.

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 thu được 13 chủng chủng trong 5 mẫu đất. Sau 1,5 năm trồng cây Thông nhựa và bón chế phẩm đa chủng VSV 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.

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. 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, với 12 chủng trong 5 mẫu đất. Sau 18 tháng 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. 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.

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 thu được 10 chủng xạ khuẩn với số lượng bào tử tăng đáng kể.

Sau 18 tháng trồng rừng và bón chế phẩm đa chủng VSV tiến hành phân tích vi khuẩn của 13 công thức thí nghiệm cho thấy số lượng chủng VK đã tăng đáng kể từ 8 chủng trước khi thí nghiệm đã tăng lên 22 chủng.

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

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. Như vậy có thể kết luận rằng khi được bón chế phẩm đa chủng VSV thành phần và chủng loại nấm nội cộng sinh tăng lên rõ rệt, đó cũng là yếu tố cải thiện đất thoái hoá bạc màu.

## KẾT LUẬN

### 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 phốt phát 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 phốt phát 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 đống 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 đất trở lại trung tính. 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.