

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ VI SINH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VÀ PHÂN HỮU CƠ VI SINH

Trần Minh Hiền, Trần Thị Kim Cúc, Mai Thanh Trúc, Ngô Thị Bích Ngọc, Đỗ Trung Bình ,ctv.

Abstract

Farmers have adopted the strategy of increasing crop yields by applying large amounts of chemical fertilizers and pesticides. At present, however, the negative effects of heavy applications of chemical inputs, in terms of production, environment, and quality deterioration are becoming apparent. Organic wastes are utilized in agriculture commonly used to improve soil quality and also to manage organic wastes for a sustainable land use.

Using effective microorganism for inoculants bio-fertilizers and bio-fertilizer that have been encouraged to development by Vietnam's Agricultural Ministry and Researchers, improving soil properties, increasing soil fertility, maintain growth and crop yield and reducing environmental pollution.

*From soil and agriculture organic wastes, a group of microbe was selected including: two strains of nitrogen fixation bacteria (*Azotobacter* sp.), three strains of phosphorus solubilization microbe (*Bacillus* sp., *Candida* sp., *Klebsiella* sp.) and five strains of cellulose degradation micro-organisms. (one bacteria, two actinomycete, two fungi - *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp.); and 04 antimicrobial resistance in fungi (*Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. and *Sclerotium* spp.) included: 02 *Bacillus* sp. (HB5 và HB7) and *Trichoderma* sp (Tr4 và Tr58).*

*A combination of 3 or 5% inoculants (nitrogen fixation bacteria, phosphorus solubilization microbe) and treated organic waste with 1:10 ratios was the best treatment to produce organic bio-fertilizer. This research was selected five the best treatments for steril carrier-based inoculants containing effective microorganism. 06 the production process was proposed such as: nitrogen fixing microbial fertilizer; phosphate solubilizing microbial fertilizer; cellulose degrading microbial fertilizer; *Bacillus* sp. inoculant resists to fungi; *Trichoderma* sp. inoculant resists to fungi and multistrain inoculants biofertilizer.*

1. Đặt vấn đề

Công nghệ vi sinh đã đóng góp cho nền nông nghiệp thế giới những thành tựu to lớn, trở thành một trong những ngành mũi nhọn tham gia giải quyết các mục tiêu bảo vệ tài nguyên đất đai và nâng cao độ phì nhiêu, tăng năng suất cây trồng và chất lượng nông sản.

Ngành nông nghiệp Việt Nam mỗi năm tiêu thụ trên 9 triệu tấn phân hóa học để bảo đảm sản lượng, nhưng hiệu quả sử dụng phân bón thấp, nhiều vùng đất đang có xu hướng suy thoái độ phì, sâu bệnh phát triển mạnh, chất lượng nông sản chưa cao. Vì vậy việc nghiên cứu ứng dụng các nguồn gen vi sinh vật tốt để sản xuất các chế phẩm vi sinh, phân vi sinh vật, phân hữu cơ vi sinh và hữu cơ sinh học đang là xu hướng tích cực trong chiến lược phát triển một nền nông nghiệp theo hướng hữu cơ hiệu quả và bền vững. Tuy nhiên, ngành công nghệ vi sinh nói chung ở Việt Nam còn rất non trẻ so với các nước có nền nông nghiệp tiên tiến, do đó nghiên cứu tuyển chọn làm giàu nguồn gen vi sinh vật hữu ích có chất lượng cao phục vụ cho sản xuất nông nghiệp đang là vấn đề cấp thiết.

Hiện nay, hầu hết các sản phẩm vi sinh vật đều được sản xuất từ một loại vi sinh vật, hay phối hợp nhiều chủng có tác dụng hỗ trợ cho nhau cùng phát huy tác dụng chuyên biệt của chúng như: (Cố định đạm cộng sinh – Nitragin, Rhizoda; Cố định đạm hội sinh, tự do – Azogin, Rhizolu; Phân giải hợp chất photpho khó tan – Phosphobacterein, phân hữu cơ vi sinh cố định đạm, phân giải lân, phân hữu cơ vi sinh đa chức năng gồm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân, kích thích sinh trưởng hoặc kết hợp với chủng vi sinh có khả năng hạn chế bệnh trong đất hại cây trồng) và hiệu quả sử dụng của các chế phẩm này ở các địa phương thì khác nhau. Nguyên nhân của hiện tượng này là do sự phong phú, đa dạng của hệ vi sinh vật đất và tác động qua lại nhiều chiều của các vi sinh vật với nhau, của vi sinh khác nhau với cây trồng và điều kiện môi trường. Vì vậy, để góp phần làm giàu bộ giống vi sinh vật có ích và có khả năng đối kháng với nấm bệnh hại cây trồng thì việc “*Ứng dụng công nghệ vi sinh sản xuất chế phẩm vi sinh và phân hữu cơ vi sinh*” tại một số tỉnh phía Nam là hết sức cần thiết, qua đó mở rộng khả năng ứng dụng sản phẩm sinh học nhằm cải thiện độ phì đất, nâng cao năng suất chất lượng nông sản và bảo vệ môi trường.

Mục tiêu đề tài:

- Tiếp tục làm giàu nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp với các chủng giống vi sinh vật có hoạt lực phân giải cellulose, cố định đạm tự do, phân giải lân cao; và vi sinh vật có khả năng đối kháng với một số nấm gây bệnh hại cây trồng, thích ứng với điều kiện một số tỉnh phía Nam làm nguồn giống vi sinh vật tạo cơ sở cho sản xuất và ứng dụng phân bón vi sinh vật.
- Xây dựng quy trình sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh và phân bón hữu cơ vi sinh góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng phân bón hóa học và phát triển nền nông nghiệp bền vững.

1.1 Vai trò của vi sinh vật cố định Nitơ đối với cây trồng

Hiện nay, sử dụng phân đạm vô cơ khá tốn kém mà không phải lúc nào việc tăng năng suất cây trồng cũng bù lại được, nếu chế độ bón phân không hợp lý thì cây trồng chỉ hấp thu được một phần, còn phần lớn mất đi do quá trình rửa trôi trong đất và khử nitrat. Sử dụng vi sinh vật như một tác nhân sinh học có lợi trong sản xuất nông nghiệp là một trong những xu hướng có tiềm năng phát triển thành công nghệ vi sinh trên khắp thế giới. Từ các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy các chế phẩm vi sinh vật có tác dụng nâng cao hiệu quả sử dụng phân bón, giảm thiểu thuốc hóa học bảo vệ thực vật và góp phần tích cực vào việc xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

Nghiên cứu ở Anh đã ước tính được lượng phân khoáng chỉ hoàn lại 27% lượng đạm mà cây trồng lấy đi, còn các loại phân xanh, phân chuồng chỉ bù lại khoảng 30%. Phần lớn lượng N cung cấp cho cây trồng là kết quả hoạt động của nhiều nhóm vi sinh vật. nổi bật hơn cả trong số những vi sinh vật cố định N cho đất là *Azotobacter*, *Azospirillum*, vi khuẩn lam và *Rhizobium*. Đó là cơ sở để sản xuất các loại phân đạm sinh học như nitragin, azotobacterin, azogin. Nhiều nước trên thế giới đã sản xuất ở quy mô công nghiệp hoặc thủ công phân vi sinh azotobacterin, là dịch nuôi cấy vi khuẩn cố định N. *Azotobacter* được hấp phụ vào than bùn hoặc các loại đất giàu chất hữu cơ đã trung hòa và bổ sung thêm một ít phân lân và K. Theo tài liệu của Brantxevits (1934)

cho biết, xử lý vi khuẩn *Azotobacter* cho hạt giống trước khi gieo đã làm tăng hoạt lực các enzym ascobinoxidaza, peroxydaza, catalaza và thể hiện mạnh nhất trong thời kỳ sinh trưởng đầu tiên của cây. Bón *Azotobacter* cho đất đã làm tăng hoạt lực polyphenoloxydaza trong cây. Những loại emzym này là chỉ tiêu quan trọng đánh giá cường độ oxy hóa khử của cây, liên quan trực tiếp đến tính chống chịu của cây đối với nhiều loại nấm bệnh (*Fusarium*, *Alternaria*). Nghiên cứu của Ali S. (1998), Murty M.G (1998) khi nhiễm *Azospirillum* vào đất trồng lúa cho thấy chúng có tác dụng kích thích sinh trưởng, phát triển và tích lũy khoáng cho lúa. Nghiên cứu của Trần Ngọc Sơn và cs (2001) cho thấy rằng, khi bón phân sinh học cho cây đậu nành có thể giảm được khoảng 40 kg N/ha, trong khi đó các đặc tính nông học và năng suất của cây đậu nành không khác biệt so với bón phân hóa học. Mặt khác, hàm lượng N và sự hấp thu N,P,K của cây được nâng cao một cách có ý nghĩa. Hiện nay, nitragin được sản xuất dưới những dạng khác nhau như hấp phụ vào than bùn, vào đất hoặc ở dạng dịch thể. Tuy nhiên, khó khăn hiện nay là việc đảm bảo duy trì chất lượng của nitragin do *Rhizobium* là loại vi khuẩn không tạo bào tử nên rất dễ bị chết trong quá trình bảo quản ở điều kiện nhiệt độ bình thường.

Đối với Việt Nam, các hình thức sản xuất hiệu quả thường là tạo giống từ các phòng thí nghiệm và chuyển trực tiếp xuống các cơ sở sản xuất để nhân giống trong các môi trường đơn giản chứa đường và nước chiết đậu.

Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam đã có những nghiên cứu, hợp tác trong và ngoài nước và đã phân lập nhiều chủng vi khuẩn cố định đạm hiệu quả rất cao. Kết quả nghiên cứu gần đây của Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam cho thấy khi có áo hạt với chế phẩm *Rhizobium* (1 kg/ha) thì chỉ cần bón 10 kg N/ha bổ sung cho đất cát nghèo dinh dưỡng của huyện Bắc Bình và huyện Tuy Phong, tỉnh Bình Thuận và huyện Gò Dầu tỉnh Tây Ninh (2007-2008), năng suất lạc tương đương và cao hơn khi bón 50 đến 60 kg N/ha với ure trên cùng nền phân bón P và K. Ước tính nếu 30-50% diện tích trồng lạc trên cả nước được nhiễm chế phẩm vi sinh thì tiết kiệm được 7.380-11.070 tấn phân ure mỗi năm. Điều này cho thấy chúng ta có thể tiết kiệm chi phí phân bón từ 40-70 tỉ đồng mỗi năm. Ngoài ra những tác động tích cực của việc giảm lượng phân đạm sử dụng cho các loại đất có thành phần cơ giới nhẹ này cũng giúp giảm thiểu tác động xấu đến môi trường do việc ô nhiễm nguồn nước do nitrat.

1.2 Vai trò của vi sinh vật phân giải lân khó tan

Việc sử dụng phân lân hóa học đã làm tăng sản lượng cây trồng một cách rõ rệt. Việc bón phân lân hóa học thích hợp cũng có ý nghĩa trong việc cải tạo các vùng đất chua, nhưng bón phân lân vào đồng ruộng có hiệu quả hay không còn phụ thuộc vào sự có mặt của các nhóm vi sinh vật có khả năng phân giải hợp chất P khó tan thành dạng dễ hòa tan. Đây là cơ sở để tạo các chế phẩm lân sinh học. Theo Lê Văn Tri thì việc sử dụng phân lân sinh học làm tăng hiệu suất chuyển hóa lân lên 30-40%. Theo tài liệu của Sở Nghiên cứu phân bón thuộc Viện Di truyền Nông nghiệp Trung Quốc, loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng phân giải P khó tan được sử dụng để tạo chế phẩm bón cho lúa, ngô làm tăng năng suất 10%. Ngoài ra, phân lân sinh học còn có tác dụng tốt đối với môi trường, làm giàu độ mùn cho đất, tăng khả năng hấp thụ P đối với cây trồng.

1.3 Vai trò của vi sinh vật phân giải cellulose

Đối với các chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose đã có nhiều công trình nghiên cứu theo hướng sử dụng các chủng có hoạt lực mạnh để phân giải rác thải làm phân bón cho cây trồng nói chung và cây lúa nói riêng.

Thạc sĩ Lê Hồng Phú -Đại học Bách Khoa đã chọn là chủng nấm mốc *Aspergillus niger* (chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose rất mạnh), nhằm tạo ra chế phẩm enzym có hoạt tính phân giải mạnh pectin và cellulose để thực hiện đề tài “Chế biến vỏ cà phê thành phân hữu cơ”. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Văn Ty và cộng sự (trường ĐHKHTN Hà Nội) đã có nghiên cứu áp dụng công nghệ sinh học trong sản xuất phân bón vi sinh-hữu cơ từ nguồn phế thải hữu cơ và tạo ra chế phẩm vi sinh (EMUNI) sử dụng trong công nghiệp xử lý phế thải. Võ Thanh Liêm đã nghiên cứu qui trình biến mụn dừa thành đất sạch bằng cách xả chất và các tạp chất trong mụn dừa, dùng phương pháp hóa học để tách chất chát (lignin) trong dừa, đồng thời xử lý và cho ra một gốc hóa học khác ở dạng muối dễ tiêu. Sau đó mụn dừa đã xử lý sẽ được sấy khô đem xay và đóng gói vào bao. Ông còn nghiên cứu để cho ra loại đất sinh học cũng từ mụn dừa, thay vì xử lý bằng hóa học, ông dùng phương pháp vi sinh để phân giải chất chát trong mụn dừa thành dạng muối vi lượng, có tác dụng như một loại phân bón, khi trộn vào đất sẽ giúp đất trở nên tơi xốp hơn.

Nghiên cứu của Lưu Hồng Mẫn và cs (1997) ở Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, sử dụng đối tượng là nấm mốc *Trichoderma* sp. xử lý rơm rạ sau 30-45 ngày và bón phối trộn với phân lân sinh học cho hiệu quả đối với nền đất sét nặng, năng suất lúa (giống IR60) tăng 18,6% khi bón kết hợp 50% phân vô cơ và 50% phân lân sinh học. Kết quả cũng cho thấy, khả năng chống chịu sâu bệnh của cây lúa cũng cao hơn và quần thể vi sinh vật đất được cải thiện.

1.4 Vai trò của vi sinh vật đối kháng

Hướng phòng trừ bệnh sinh học đã và đang được nhiều các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và cho ra các chế phẩm sinh học có nhiều triển vọng. Đây là một trong những phương pháp phòng chống có hiệu quả khả quan. Hiện nay, để phòng trừ các loại nấm gây bệnh hại cây trồng, giúp cây trồng phát triển tốt hơn, làm cho tác nhân gây bệnh không kháng thuốc, an toàn với môi trường sinh thái, phù hợp với xu hướng an toàn nông nghiệp hiện nay. Tìm ra các chủng vi sinh vật có khả năng kháng nấm bệnh là biện pháp phổ biến của công tác phòng trừ sinh học. Cơ chế đối kháng với vi sinh vật gây bệnh là chủng vi sinh vật có thể tiết ra chất kháng sinh, cạnh tranh về dinh dưỡng hoặc tấn công trực tiếp lên tơ nấm gây bệnh, hay tiết ra những chất kích thích sinh trưởng giúp cho cây trồng tăng khả năng kháng bệnh.

Bacillus là một tác nhân sinh học đầy tiềm năng trong việc phòng trừ bệnh hại cây trồng. Chúng có khả năng đối kháng các loại vi nấm gây bệnh với phổ tác động rộng, không gây hại cho con người và cây trồng. Mặt khác, *Bacillus* còn tham gia vào quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ khó phân hủy thành những chất hữu cơ đơn giản cho cây trồng dễ sử dụng, giúp cải tạo đất, không chế và tiêu diệt một số loại vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng bởi các chức năng sinh học chuyên biệt của chúng. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* nằm trong nhóm vi khuẩn có khả năng đối kháng với một số nấm gây bệnh cho cây. Trong các vi sinh vật đối kháng, vi khuẩn *Bacillus* được chứng minh có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm như: *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Pythium* và *Phytophthora* và một số vi khuẩn khác nhờ vào khả năng sinh ra các chất

kháng sinh (Lê Đức Mạnh và ctv, 2003; Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thu Hoa, 2005; Nguyễn Xuân Thành và ctv 2003, Võ Thị Thứ, 1996).

Trichoderma là một loại vi nấm được phân lập từ đất, thường hiện diện ở vùng xung quanh hệ thống của rễ cây. Đây là loại nấm hoại sinh có khả năng ký sinh và đối kháng trên nhiều loại nấm bệnh cây trồng. Nhờ vậy, nhiều loài *Trichoderma* spp. đã được nghiên cứu như là một tác nhân phòng trừ sinh học và đã được thương mại hóa thành thuốc trừ bệnh sinh học, phân sinh học và chất cải tạo đất (Harman & ctv, 2004). Theo Harman (2001) cho rằng, tùy theo dòng nấm *Trichoderma*, việc sử dụng trong nông nghiệp đã tỏ ra có nhiều thuận lợi nhờ: Tập đoàn khuẩn lạc nấm sẽ phát triển nhanh và tạo thành cộng đồng vi sinh vật xung quanh vùng rễ cây; Có khả năng phòng trị, cạnh tranh hoặc tiêu diệt các tác nhân gây bệnh giúp cải thiện sức khỏe của cây; Kích thích sự phát triển của rễ nhờ tiết ra các chất điều hòa sinh trưởng. Tính đối kháng với các nấm hại này bằng cách cạnh tranh dinh dưỡng, ký sinh với nấm hại hoặc tiết kháng sinh, enzyme phân hủy vách tế bào nấm gây bệnh cây trồng; sản sinh đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp dễ bay hơi và không bay hơi, một vài chất loại này ức chế vi sinh vật (VSV) khác mà không có sự tương tác vật lý. Cơ chế tác động chính của nấm *Trichoderma* là ký sinh (Harman & Kubicek, 1998) và tiết ra các kháng sinh (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998) trên các loài nấm gây bệnh. Ngoài hiệu quả trực tiếp trên các tác nhân gây bệnh cây, nhiều loài *Trichoderma* còn định cư ở bề mặt rễ cây giúp thay đổi khả năng biến dưỡng của 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 và ctv, 2004).

Marra và ctv. (2006), Lu và ctv. (2004) đã khảo sát mối tương tác 3 chiều giữa cây trồng – nấm bệnh – nấm đối kháng dựa trên phân tích protein (proteomics) và hệ thống gene biểu hiện khác nhau ở các tương tác. Kết quả cho thấy sự hiện diện của nấm đối kháng giúp các PR - protein trong cây có tương tác 3 chiều với các tác nhân gây bệnh khác, thay đổi cả về chất và lượng khi cây trồng bị nấm bệnh tấn công. Vinale và ctv (2008) nhận định hiệu quả đối kháng trên cây đạt được là do mối quan hệ 3 chiều này. Về khía cạnh vi sinh, các độc chất do nấm bệnh tiết ra hại cây như cyclophilins cũng bị hóa giải khi có sự hiện diện của nấm đối kháng (Dương Minh, 2010).

1.5 Một số loại phân hữu cơ sinh học, hữu cơ vi sinh, chế phẩm vi sinh đang sử dụng phổ biến tại Việt Nam

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 BVTV 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 hoại 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 (protein và cellulose), 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 cải tạo đất

Viện Công nghệ Sinh học (Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã nghiên cứu và sản xuất thành công chế phẩm sinh học giữ ẩm cho đất có tên là Lipomycin-M. Thành phần chính là của Lipomycin-M là chủng nấm men *Lipomyces* PT7.1 có khả năng tạo màng nhầy trong điều kiện đất khô hạn, giúp giảm thoát nước, duy trì độ ẩm cho đất trong điều kiện địa hình không có nước tưới thời gian dài, góp phần nâng cao tỷ lệ sống của cây trồng, hỗ trợ tốt cho việc phủ xanh đất trống đồi trọc. Chế phẩm sinh học này được xem là một giải pháp cải tạo đất bền vững cho môi trường sinh thái.

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, hoa kiểng.

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* var.) 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.

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 mác, 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 vi sinh vật là những tế bào sống cần có điều kiện thích hợp về chất mang, ngoại cảnh. Đồng thời, quá trình vận chuyển, bảo quản đến tay 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.

Chính phủ Việt Nam đã sớm nhận thấy được vai trò quan trọng này, vì vậy từ năm 1994, Thủ tướng Chính phủ đã ra Chỉ thị số: 644/TTg ngày 5 tháng 11 năm 1994 chỉ đạo việc quản lý: sản xuất, kinh doanh và chất lượng phân bón vi sinh, trong đó đã nhấn mạnh: “Đề tiến tới một nền Nông nghiệp sạch, giữ cho đất trồng màu mỡ, cần phải sử dụng hợp lý các loại phân và thuốc hoá học trừ sâu. 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.”

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nội dung 1: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật để sản xuất chế phẩm và phân hữu cơ vi sinh

2.1.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose

Vật liệu:

Từ 51 mẫu thực vật hoai mục, mụn xơ dừa, bã bùn mía, đất, đất mùn, các phân hữu cơ và các chế phẩm vi sinh tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật.

Phương pháp nghiên cứu:

Định danh sơ bộ: mô tả khuẩn lạc, quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi (nhuộm gram), các đặc tính sinh lý học (khả năng di động, vi sinh vật yếm khí hoặc kỵ khí, catalase, oxidase, khả năng lên men đường)

Đánh giá chi tiết:

- ❖ Nhóm vi sinh vật cố định đạm tự do (Azotobacter):
 - Khả năng phát triển môi trường chọn lọc Ashby
 - Xác định khả năng cố định đạm của VK Azotobacter: Định lượng khả năng tổng hợp đạm bằng phương pháp Kjeldahl sau khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường dịch thể sáu ngày.
- ❖ Nhóm vi sinh vật phân giải lân:
 - Khả năng phát triển trên môi trường phân giải lân Pikovskaya
 - Đo vòng phân giải
 - Định lượng khả năng phân giải lân theo 10TCN 298-97
- ❖ Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose: Phân lập vi khuẩn trên môi trường Môi trường I₁ (g/l), môi trường I₂ (g/l), môi trường I₃ (g/l), môi trường I₄ (g/l), môi trường Huchison-Clayton (g/l), môi trường nước thịt pepton, môi trường CMC
 - Phân lập xạ khuẩn phân giải cellulose trên các môi trường: Môi trường II₁, môi trường II₂, môi trường II₃ (ISP-4), môi trường II₄, môi trường II₅(Gause), môi trường II₆, môi trường II₇ (ISP-6).

- Phân lập vi nấm phân giải cellulose trên các môi trường: Môi trường III₁ (Czapek), môi trường III₂, môi trường III₃ (khoai tây đường), môi trường III₄.
- ❖ Xác định hoạt tính enzyme cellulaza bằng phương pháp khuếch tán qua thạch đo đường kính vòng phân giải.
- ❖ Xác định đặc tính của các giống vi sinh vật theo khóa phân loại Bergey 1936(có chỉnh sửa bổ sung 1975, Nguyễn Lâm Dũng, 1983)

2.1.2 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với một số nấm bệnh

Vật liệu:

Phân lập từ sáu mươi bảy (67) mẫu đất được thu nhận từ các xã Bình Long, Phú Long, Bù Đăng, Thanh Phú tỉnh Bình Phước, Phú Giáo tỉnh Bình Dương.

Phương pháp nghiên cứu:

- Đánh giá hoạt tính phân giải cellulose, tinh bột. (Lê Văn Nhung và cộng sự, 1998)
- Đánh giá hoạt tính phân giải Gelatin. (Nguyễn Lâm Dũng, 1983)
- Đánh giá sơ bộ hoạt tính đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* sp., nấm *Trichoderma* sp. đối với nấm gây bệnh (Nguyễn Thân, 2004).

2.2 Nội dung 2: Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm vi sinh làm nguyên liệu hữu cơ để sản xuất phân hữu cơ vi sinh

2.2.1 Đánh giá và chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose

Vật liệu:

- Chất mang: cám gạo, cám tổng hợp, bột bắp, bánh dầu, bã bùn mía, mụn dừa.
- Chủng VSV đã được tuyển chọn tại nội dung 1.

Phương pháp:

Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh cố định đạm, phân giải lân

Trên nền chất mang

NT1: 100% Than bùn + 5% CaCO₃ + vi lượng + VSV2

NT2: 60% Than bùn + 5% CaCO₃ + vi lượng + phụ gia + VSV2

NT3: 60% Than bùn + 5% CaCO₃ + 20% Nguyên liệu nền +30% phụ gia + vi lượng + VSV2

Ghi chú: Nguyên liệu nền: 20% BBM+ 80% MD đã qua sơ chế với CaCO₃ và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose. Chọn công thức tốt nhất sản xuất chế phẩm.

VSV2: nhóm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân.

Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh phân giải cellulose

Trên nền chất mang:

NT1: 50% cám gạo + 50% cám tổng hợp

NT2: 50% cám gạo + 10% cám tổng hợp + 20% bột bắp + 20% bánh dầu + VS1

NT3: 40% cám tổng hợp + 40% Nguyên liệu nền + 20% phụ gia + VS1

Ghi chú: Nguyên liệu nền: 20%BBM+ 80MD đã qua sơ chế với $CaCO_3$ và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose

VS1: Nhóm vi sinh phân giải cellulose (vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm *Trichoderma*). Chọn công thức tốt nhất sản xuất chế phẩm

2.2.2 Đánh giá và chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh vật có khả năng đối kháng với một số nấm bệnh

i. Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm *Bacillus*, đối kháng với nấm bệnh hại tiêu

Vật liệu:

Sử dụng chất mang là bã bùn mía (BBM), cám Bình Đông, than bùn, bùn ao nuôi thủy sản

Phương pháp:

Chuẩn bị chất mang

- Tiến hành phối trộn 03 nghiệm thức (NT) chất mang:

NT 1: 50% bã bùn mía + 10% cám Bình Đông + 40% than bùn

NT 2: 20% bùn ao nuôi thủy sản + 80% than bùn

NT 3: 20% bùn ao nuôi thủy sản + 20% bã bùn mía + 60% than bùn

- Bổ sung vào mỗi nghiệm thức 5% vôi, thêm nước đủ ẩm cho các nghiệm thức thí nghiệm.

- Phân phối các chất mang vào vật chứa (túi nilon có thể khử trùng) 200 g/túi. Khử trùng chất mang bằng autoclave

Ghi chú: 2 chủng VSV x 4 lần lặp lại = 8 túi/nghiệm thức.

- Xác định pH, ẩm độ khô kiệt và sức chứa nước lớn nhất có trong chất mang bằng các phương pháp thông thường.

ii. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn men giống đến mật độ vi khuẩn có trong chất mang (F2)

Vật liệu:

Sử dụng chủng *Bacillus* đã phân lập và tuyển chọn ở nội dung 1

Phương pháp:

- Mật độ vi khuẩn ban đầu có trong mỗi túi chất mang (220 g) đạt 10^7 đã thực hiện phối trộn tỉ lệ 1:10 trên nền chất mang tuyển chọn
- Kiểm tra mật độ *Bacillus* có trong chất mang theo định kỳ 07, 40, 90 và 180 ngày sau cấy (NSC), trên môi trường PTA theo phương pháp Koch.
- Đánh giá hoạt lực đối kháng của *Bacillus* có trong chế phẩm theo phương pháp đục 3 giếng cách mép hộp petri 1 cm và ở chính giữa hộp (cho chủng nấm bệnh vào giếng ở giữa).

iii. Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm *Trichoderma* đối kháng với nấm bệnh hại tiêu

Vật liệu:

Sử dụng chất mang là phân trùn, mật dừa (MD), bột bắp, cám gạo.

Phương pháp:

Chuẩn bị chất mang

- Tiến hành phối trộn 04 nghiệm thức (NT) chất mang:

NT 1: 20% phân trùn + 60% mật dừa + 10% bột bắp + 10% cám gạo,

NT 2: 20% bã bùn mía + 60% mật dừa + 10% bột bắp + 10% cám gạo,

NT 3: 20% than bùn + 20% phân trùn + 40% mật dừa + 10% bột bắp + 10% cám gạo

NT 4: 80% mật dừa + 10% bột bắp + 10% cám gạo

- Thêm nước đủ ẩm cho các nghiệm thức thí nghiệm, trộn đều, đóng gói, 4 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức chất mang và mỗi chủng nấm, 200 g/gói. Hấp khử trùng bằng autoclave.
- Men sinh khối được nuôi cấy trên bề mặt môi trường thạch sau 05 ngày chuyển sinh khối vào chất mang đã khử trùng. Mật độ bào tử nấm ở thời điểm bắt đầu nghiên cứu chủng *Trichoderma* đạt 10^8 CFU/g, lượng nước rỉ đường 30 g/L khử trùng thêm vào mỗi nghiệm thức thử nghiệm là 30% sức chứa nước lớn nhất (SCNLN).
- Kiểm tra mật độ *Trichoderma* có trong chất mang theo định kỳ 07, 30, 90 và 180 ngày sau cấy (NSC) trên môi trường thạch cứng nước chiết giá theo phương pháp Koch.

2.3 Nội dung 3: Đánh giá hoạt lực của chế phẩm vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm bệnh

Vật liệu:

- Hom tiêu Vĩnh Linh để đánh giá hoạt lực
- Ba (03) chủng nấm gây bệnh hại hồ tiêu: *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp. do Bộ môn Bảo vệ Thực vật Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM cung cấp.

Phương pháp:

Hom tiêu Vĩnh Linh được chăm sóc và theo dõi trong điều kiện nhà lưới 1 tuần trước khi nhiễm nấm bệnh vào đất.

Chọn các hom tiêu có độ đồng đều dùng vào thử nghiệm. Phân phối các hom tiêu theo các lô thí nghiệm dưới các công thức được bố trí gồm 4 đối chứng và 9 công thức thử nghiệm. Mỗi công thức lặp lại 6 lần, mỗi lần 3 bịch, mỗi bịch một hom tiêu.

Đánh giá hoạt lực của chế phẩm *Bacillus*

1. Đối chứng không nhiễm nấm bệnh và chế phẩm (ĐC)
2. Đối chứng với nấm *Fusarium* (ĐC Fu)
3. Đối chứng với nấm *Sclerotium* (ĐC Scl)
4. Đối chứng với nấm *Phytophthora* (Đc Phy)
5. B1 + Phy
6. B1 + Scl
7. B1 + Fu
8. B2 + Phy
9. B2 + Fu
10. B2 + Scl
11. B1 + B2 + Phy
12. B1 + B2 + Fu
13. B1 + B2 + Scl

* Ghi chú: B1: *Bacillus* sp. HB5

B2: *Bacillus* sp. HB7

Đánh giá hoạt lực của chế phẩm *Trichoderma*

1. Đối chứng không nhiễm nấm bệnh và chế phẩm (ĐC)
2. Đối chứng với nấm *Fusariums* spp. (Đc Fu)
3. Đối chứng với nấm *Sclerotium* spp. (Đc Scl)
4. Đối chứng với nấm *Phytophthora* spp. (Đc Phy)
5. Tr4 + Phy
6. Tr4 + Scl
7. Tr4 + Fu
8. Tr58 + Phy
9. Tr58 + Fu
10. Tr158 + Scl
11. HHTr + Phy

12. HHTr + Fu

13. HHTr +Scl

*Ghi chú: Tri4. : *Trichoderma* spp. 4

Tri58. : *Trichoderma* spp. 58

* Phương pháp lây nhiễm nấm bệnh

Sau khi theo dõi sự phát triển của hom tiêu trong nhà lưới 1 tuần. Tiến hành nhiễm nấm gây bệnh vào đất. Mật độ nấm bệnh 10^6 CFU/mL, mật độ chế phẩm đối kháng 10^8 CFU/g

* Phương pháp nhiễm chế phẩm đối kháng

Sau khi nhiễm nấm bệnh 2 ngày, tiến hành bón chế phẩm vi khuẩn đối kháng. Cân 1 g chế phẩm đối kháng có mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/g cho vào 2 lỗ. Đối với các công thức thí nghiệm có hỗn hợp chế phẩm HB5 và HB7 thì cân mỗi loại chế phẩm 1 lượng 0,5 g, trộn đều, phân phối vào 2 lỗ.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ lá cây bị nhiễm bệnh ở các giai đoạn 06, 12, 30 NSXL (ngày sau xử lý) và tỷ lệ cây chết 60 NSXL.

Phương pháp tính tỷ lệ bệnh (TLB %), và hiệu quả kỹ thuật phòng trừ bệnh (Q %), (Vũ Triệu mân, Lê Lương Tê, 1998).

$$TLB \% = A/B * 100$$

Trong đó: A – Số lượng cá thể bị bệnh (cây, cơ quan bị bệnh)

B- Tổng số cá thể điều tra

$$Q \% = (B_1 - B_2) / B_1 * 100$$

Trong đó: B₁ mức độ bệnh ở lô đối chứng không phòng trừ

B₂- mức độ bệnh ở lô phòng trừ

2.4 Nội dung 4: Đánh giá chất lượng phân hữu cơ vi sinh

Vật liệu:

- + Men giống vi sinh chúng tôi sử dụng giống vi khuẩn cố định đạm tự do (VK1), cố định đạm hội sinh (VK2), phân giải lân (VK3)
- + Giá thể phân hữu cơ vi sinh: bã bùn mía và mụn xơ dừa đã qua sơ chế

Phương pháp:

Sản xuất men vi sinh

- + Bước 1: Nhân giống cấp 1, các chủng vi sinh được nhân giống trên môi trường chuyên biệt theo phương pháp Koch trong 5 ngày.
- + Bước 2: Nhân sinh khối dạng chìm chuyên sinh khối vi sinh vật từ môi trường đặc sang nhân sinh khối trong môi trường lỏng (canh trùng hay môi trường chìm), lắc 150 vòng/phút trong 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau đó kiểm tra mật độ vi khuẩn.

- + Bước 3: Nhân sinh khối trên môi trường xốp (chất mang của men giống hay còn gọi là môi trường bán rắn), canh trùng nhân sinh khối được chuyển qua môi trường xốp (than bùn + phụ phẩm đã qua sơ chế của đề tài + phụ gia + vi lượng). Sau 15 ngày kiểm tra mật độ vi khuẩn trong men giống trên các môi trường chuyên biệt theo tiêu chuẩn ngành. Tất cả các khâu nhân giống đều trong điều kiện vô trùng.

Phối trộn men vi sinh vật và nguyên liệu hữu cơ để sản xuất phân hữu cơ vi sinh

Hai nguồn nguyên liệu hữu cơ chính là bã bùn mía và mụn xơ dừa được xử lý sơ bộ bằng CaCO_3 và dolomite kết hợp với nhóm vi sinh vật phân giải cellulose trong 1 tháng. Sau đó, hỗn hợp trên được phối trộn với nhóm vi sinh vật cố định đạm và phân giải lân.

Công thức thí nghiệm :

NT1	Nguyên liệu nền	+ 1% men VS2
NT2	Nguyên liệu nền	+ 3% men VS2
NT3	Nguyên liệu nền	+ 5% men VS2

**Ghi chú: Nguyên liệu nền: 20%BBM+ 80MD đã qua sơ chế với CaCO_3 và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose*

VS2: nhóm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân

Các thí nghiệm đều lặp lại 4 lần cho mỗi công thức, trọng lượng đồng ủ là 30kg

Chỉ tiêu theo dõi:

- Phân tích thành phần dinh dưỡng (N_{TS} , P_2O_5 , K_2O , C_{TS}), tỷ lệ C/N đầu và kết thúc xử lý
- Theo dõi các chỉ tiêu VSV (cố định đạm, phân giải lân) ở giai đoạn đầu, kết thúc xử lý và giai đoạn bảo quản.

2.5 Nội dung 5: Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật và phân bón Hữu cơ vi sinh

Từ các kết quả nghiên cứu tốt nhất tại nội dung 1, 2 và 3 và 4 xây dựng các quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật và phân bón Hữu cơ vi sinh.

❖ **Phương pháp xử lý số liệu** : Dùng phần mềm excel, xử lý thống kê theo phương pháp Genstat.

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Nội dung 1: Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật để sản xuất chế phẩm và phân hữu cơ vi sinh

3.1.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose

i. Vi sinh vật (VSV) cố định đạm

Đã phân lập và nuôi cấy thuần khiết được 5 chủng Azotobacter là: A1, A13, A14, A15 và A53.

Xác định khả năng tổng hợp đạm:

Định lượng khả năng tổng hợp đạm bằng phương pháp Kjeldahl sau một tuần nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường dịch thể .

Bảng 1. Lượng đạm tổng số có trong dung dịch nuôi cấy

Chủng vi khuẩn	A1	A13	A14	A15	A53
Hàm lượng đạm tổng số (mg/l)	1,44	1,08	3,61	3.26	0.83

Chủng A14 có khả năng tổng hợp đạm cao nhất (3,61mg/l). Chủng A14 và A15 là hai chủng phát triển tốt nhất trên môi trường nuôi cấy. Chủng A1 và A13; chủng A14 và A15 có khả năng tổng hợp đạm tương đương nhau trên môi trường nuôi cấy.

ii. Vi sinh vật phân giải lân

Đã xác định sơ bộ được 5 chủng vi sinh vật có triển vọng với các đặc điểm được mô tả ở Bảng 2 (phụ lục 2) và hàm lượng lân được hoà tan sau 15 ngày nuôi cấy được xác định theo 10TCN 298-97 được trình bày ở Bảng 3. Qua nghiên cứu cho thấy các chủng 43, 48, 49 có khả năng phân giải lân cao hơn các chủng 20, 21.

Bảng 3. Lượng lân dễ tiêu có trong dung dịch nuôi cấy (ppm)

Ký hiệu chủng vi khuẩn	20	21	43	48	49
Hàm lượng lân dễ tiêu đối chứng (ppm)	0,45	0,48	0,47	0,46	0,42
Hàm lượng lân dễ tiêu thí nghiệm (ppm)	2,57	2,92	4,16	4,08	3,75
Số lần tăng so với đối chứng	5,70	6,14	8,90	8,84	8,97

iii. Vi sinh vật phân giải cellulose

Đã xác định được 10 chủng có hoạt lực phân giải cellulose tương đối tốt bao gồm:

- Vi khuẩn: các chủng 21 và 50
- Xạ khuẩn: các chủng 2, 7, 25, D32, D28
- Nấm: các chủng D32, 11, D27, D25 (*Trichoderma sp.*), 47 (*Aspergillus sp.*)

3.1.2 Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng

Qua phân lập và tuyển chọn sơ bộ từ 67 mẫu đất, chọn được sáu (06) chủng *Bacillus* sp. được kí hiệu: HB1; HB2; HB4; HB5; HB6; HB7; và bảy (07) chủng nấm *Trichoderma* sp. với các chủng số 4, 50, 53, 58, 66, Tc1 và HT1 (Mô tả hình dạng khuẩn lạc và hình thái tế bào vi sinh vật được trình bày ở Phụ lục 3).

Tiếp tục đánh giá hoạt lực sinh học của các chủng đã phân lập được theo các bước sau:

- Bước 1: Đánh giá hoạt tính phân giải cellulose, hoạt tính phân giải tinh bột, hoạt tính phân giải protein (gelatine)
- Bước 2: Đánh giá hoạt lực đối kháng của các chủng vi sinh với nấm *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp.

Kết quả đã chọn được hai (02) chủng *Bacillus* sp.: HB5 và HB7 và hai (02) chủng nấm *Trichoderma* sp.: T4 và Tr58.

3.2 Nội dung 2: Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm vi sinh làm nguyên liệu hữu cơ để sản xuất phân hữu cơ vi sinh

3.2.1 Đánh giá và chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose

Để đảm bảo chất lượng men giống tốt. Ngoài việc chọn lựa các chủng vi sinh có hoạt lực tốt, có tính thích nghi cao, thì việc tìm chọn chất mang thích hợp để vi sinh tồn tại, phát triển và nguyên liệu dễ kiếm, giá thành rẻ là một việc làm hết sức quan trọng. Vì mỗi chủng vi sinh thích hợp trên một môi trường khác nhau. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm kiểm tra mật độ vi sinh trên các nền chất mang như sau:

Chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh cố định đạm, phân giải lân

Sau khi nhân giống bước 1 và bước 2, kiểm tra mật độ vi sinh. Chuyển canh trùng vào các chất mang đã khử trùng theo các công thức 1, 2 và 3, kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Mật độ vi khuẩn trên các nền chất mang khử trùng (CFU/g)

TT	Chủng vi sinh		CT1	CT2	CT3
1	CĐĐ	tự do	$4,8 \times 10^6$	$5,6 \times 10^8$	$1,64 \times 10^9$
		hội sinh	$3,4 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$2,82 \times 10^9$
2	PGL	vi khuẩn	$1,2 \times 10^6$	$4,20 \times 10^7$	$1,70 \times 10^9$

Ghi chú: nền chất mang:

CT1: 100%Than bùn + 5% $CaCO_3$ + vi lượng + VS2

CT2: 60% Than bùn + phụ gia + 5% $CaCO_3$ + vi lượng + VS2

CT3: 60%Than bùn + 20% NLN + 5% $CaCO_3$ +30% phụ gia + vi lượng + VS2

Nguyên liệu nền: 20%BBM+ 80MD đã qua sơ chế với CaCO₃ và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose

CĐĐ: Cố định đạm ; PGL: phân giải lân

Nhận xét:

Trên các nền chất mang khác nhau, mật độ vi khuẩn là khác nhau. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất trên nền chất mang 60%Than bùn + 20% NLN + 5%CaCO₃ +30% phụ gia + vi lượng + VS2 (CT3), 10⁹ CFU/g. Trên nền chất mang CT3 mật độ vi khuẩn hội sinh tỏ ra thích hợp hơn nên đạt số lượng cao nhất 2,82 x 10⁹ CFU/g > vi khuẩn phân giải lân 1,7 x 10⁹ CFU/g > cố định đạm tự do 1,64 x 10⁹ CFU/g. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do nền chất mang 3 thành phần có mụn xơ dừa nên có khả năng hấp thụ được nhiều cạnh trùng hơn và gói chế phẩm tốt hơn, do vậy tạo điều kiện thông thoáng cho vi sinh tồn tại và phát triển vì các chủng vi sinh tham gia thí nghiệm đều là loại hảo khí.

Chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose

Các chủng vi sinh phân giải cellulose được nuôi cấy qua các bước 1, 2 sau khi kiểm tra mật độ, vi sinh được cấy chuyển lên các môi trường xốp (chất mang) khác nhau. Kết quả được trình bày Bảng 5.

Bảng 5. Mật độ vi sinh phân giải cellulose trên các chất mang khác nhau (CFU/g)

TT	Chủng vi sinh	CT1	CT2	CT3
1	Vi khuẩn H50	1,1 x10 ⁶	1,3 x 10 ⁹	4,2 x10 ⁸
	Vi khuẩn H55			4,2 x10 ⁷
2	Xạ khuẩn 7	1,3 x10 ⁶	4,5 x10 ⁸	2,8 x10 ⁷
	Xạ khuẩn 21	1,5 x10 ⁶	2,0 x 10 ⁸	4,6 x 10 ⁷
	Xạ khuẩn 51	2,1 x10 ⁷	6,0 x 10 ⁷	1,8 x10 ⁹
3	Nấm Tri 10	2,3 x10 ⁶	9,6 x10 ⁶	6,3x 10 ⁶
	Nấm Tri11	2,1 x10 ⁶	4,3 x10 ⁶	2,5 x10 ⁷
	Nấm D25	2,5 x10 ⁶	1,1 x10 ⁷	3,6 x10 ⁷
	Nấm D32	2,6 x10 ⁶	3,7 x10 ⁹	4,9 x 10 ⁹

Ghi chú: nền chất mang:

CT1: 50% cám gạo + 50% cám tổng hợp + VS1

CT2: 50% cám gạo +10% cám tổng hợp + 20%bột bắp + 20%bánh dầu + VS1

CT3: 40% cám tổng hợp+ 40% NLN + 20% phụ gia + VS1

Nguyên liệu nền: 20%BBM+ 80MD đã qua sơ chế với CaCO₃ và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose

Nhận xét:

Qua Bảng 5, trên các nền chất mang khác nhau số lượng vi sinh tồn tại là khác nhau. Chất mang là cám cho mật độ vi sinh còn lại là ít nhất chỉ đạt 10^6 CFU/g. Tuy nhiên, các chủng nấm tỏ ra thích hợp hơn các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn, đặc biệt xạ khuẩn 51 tỏ ra thích nghi nhất đạt $2,1 \times 10^7$ CFU/g. Tất cả các chủng vi sinh phân giải cellulose đều thích hợp hơn đối với chất mang CT3: 40% cám tổng hợp+ 40% NLN + 20% phụ gia và đều đạt làm chế phẩm phân vi sinh trên nền chất mang khử trùng. Qua kiểm tra hoạt lực của chủng vi khuẩn H50 và H55 nhận thấy, chủng H50 cho mật độ vi khuẩn nhiều hơn chủng H55 $4,2 \times 10^8 > 4,2 \times 10^7$, nhưng chủng H55 cho vòng phân giải lớn hơn H50. Vì vậy có thể chọn 1 trong 2 chủng này để sản xuất men giống. Trong 3 chủng xạ khuẩn 7, XK 25 và XK 51, chủng XK 51 tỏ ra ưu thế hơn đạt $1,8 \times 10^9$ và chủng nấm D32 $4,9 \times 10^9$ CFU/g cơ chất.

Tóm lại, chọn chất mang CT3 và các chủng vi khuẩn H55, XK 51, Nấm D32 làm chế phẩm phân vi sinh phân giải cellulose trên nền chất mang khử trùng.

3.2.2 Đánh giá và chọn lọc chất mang cho chế phẩm vi sinh vật có khả năng đối kháng

i. Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm *Bacillus* đối kháng với nấm bệnh hại tiêu

Bảng 6. Mật độ *Bacillus* sp. trung bình trong chất mang theo thời gian

Chủng <i>Bacillus</i> sp.	NSC	7	40	90	180
	NT	Mật độ VK (10^8 CFU/g)			
Chủng VK HB5	NT1	2,26	2,35	2,26	1,25
	NT2	0,92	1,22	0,92	0,15
	NT3	1,26	1,97	1,26	0,49
Chủng VK HB7	NT1	9,80	3,84	2,74	1,73
	NT2	2,85	1,05	0,95	0,16
	NT3	4,20	1,81	1,22	0,45
Prob.	VK	< 0,001	< 0,001	0,006	0,006
	ChM	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	VK*ChM	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CV (%)		0,8	1,9	3,5	7,5
LSD _{0,05}	VK	0,16	0,11	0,10	0,10
	ChM	0,19	0,13	0,13	0,12
	VK*ChM	0,27	0,18	0,18	0,17

* Ghi chú: NT: Nghiệm thức
 NT 1: 50% bã bùn mía + 10% cám Bình Đông + 40% than bùn
 NT 2: 20% bùn ao nuôi thủy sản + 80% than bùn
 NT 3: 20% bùn ao nuôi thủy sản + 20% bã bùn mía + 60% than bùn
 VK: vi khuẩn
 NSC: ngày sau cấy
 ChM: chất mang

Nhận xét:

Kết quả tính thống kê ở mức 0,05 (Bảng 6) mật độ 02 chủng *Bacillus* sp. có trong 03 nền chất mang là khác nhau và giảm mạnh ở thời điểm 180 NSC. Các thời điểm 07, 40, 90 NSC mật độ vi khuẩn còn trong các nền chất mang khác nhau đều đạt 10^8 CFU/g và đạt TCVN trên nền chất mang đã khử trùng. Tại thời điểm 180 NSC chỉ có chất mang (NT 1) của hai chủng VK đều đạt 10^8 CFU/g. Nền chất mang NT1 cho mật độ vi khuẩn đạt cao nhất trong các nghiệm thức ở tất cả các thời điểm kiểm tra 07, 40, 90 và 180 NSC đồng thời có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức chất mang 2 và 3. Nền chất mang NT 1 có mối quan hệ tương hỗ có ý nghĩa thống kê với mật độ vi khuẩn. Chứng tỏ nền chất mang NT1 (50% bã bùn mía + 10% cám Bình Đông + 40% than bùn) thích nghi nhất cho sự tồn tại của các chủng *Bacillus* HB5 và HB7. Đây cũng chính là công thức phối trộn chất mang thích hợp nhất cho việc sản xuất chế phẩm sinh học *Bacillus* trên nền chất mang khử trùng theo TCVN trong thí nghiệm này.

Nền chất mang NT 3 có số lượng tế bào vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê với nền chất mang NT2 ở tất cả các thời điểm khảo sát.

Hai chủng HB5 và HB7 có số lượng tế bào khác nhau có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm khảo sát. Số lượng tế bào HB7 > HB5 có ý nghĩa thống kê.

Các tổ hợp chất mang khác nhau có mối tương tác chặt chẽ với 2 chủng *Bacillus* HB5 và HB7. Chúng đều cho số lượng VK khác nhau có ý nghĩa thống kê tại các thời điểm kiểm tra chất lượng chế phẩm.

❖ Nghiên cứu tỉ lệ phối trộn men giống đến mật độ vi khuẩn tồn tại trong chất mang

Thành phần, tỷ lệ phối trộn chất mang, men giống, ẩm độ và kỹ thuật khử trùng là những yếu tố ảnh hưởng rất nhiều đến chất lượng, giá thành sản phẩm, khả năng sản xuất và áp dụng trên diện rộng. Vì vậy, chúng tôi tiến hành phối trộn men giống theo tỷ lệ 1/10 trên nền chất mang không khử trùng. Kết quả được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Mật độ *Bacillus* sp. trong chất mang không khử trùng theo thời gian (F2)

Chủng VK	Ngày sau cấy			
	7	40	75	180
	Mật độ (10^7 CFU/g)			
HB5	3,35	2,99	1,19	0,65

HB7	5,07	3,83	1,80	1,13
Prob.	0,001	< 0,001	0,002	0,003
CV (%)	2,2	3,2	3,8	10,9
LSD_{0.05}	0,11	0,16	0,24	0,17

Nhận xét:

Trên cùng một thành phần chất mang (50% bã bùn mía + 10% cám Bình Đông + 40% than bùn) 02 chủng *Bacillus* HB5 và HB7 có số lượng tế bào tồn tại theo thời gian là khác nhau. Chủng HB7 luôn có số lượng tế bào nhiều hơn chủng HB5 có ý nghĩa thống kê ở tất cả cả thời điểm kiểm tra và chúng đều đạt số lượng tế bào trên nền chất mang không khử trùng theo TCVN. Kết quả này có ý nghĩa rất quan trọng vì chúng ta có thể sản xuất được phân hữu cơ vi sinh ở cả những nơi không có trang thiết bị chuyên biệt và tiết kiệm lượng men giống đáng kể và góp phần hạ giá thành sản phẩm mang lại hiệu quả khả quan cho việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên diện rộng.

ii. Đánh giá và chọn lọc chất mang tốt nhất cho sản xuất chế phẩm *Trichoderma* đối kháng với nấm bệnh hại cây tiêu

Bảng 8. Mật độ tế bào nấm *Trichoderma* sp. trong chất mang theo thời gian

Chủng <i>Trichoderma</i> sp.	ChM	NSC	30	90	180
			Mật độ VK (10 ⁸ CFU/g)		
Tr4	NT1		1,93	1,23	0,57
	NT2		1,88	1,10	0,55
	NT3		1,68	0,90	0,54
	NT4		2,3	1,825	1,41
Tr58	NT1		0,85	0,65	0,33
	NT2		1,225	0,9	0,37
	NT3		1,225	0,95	0,45
	NT4		1,9	1,5	1,12
Prob.	ChM		< 0,001	< 0,001	< 0,001
	Tri		< 0,001	< 0,001	< 0,001
	ChM*Tri		< 0,001	0,002	< 0,001
CV (%)			4,8	3,1	2,9
LSD _{0.05}	ChM		0,1639	0,1437	0,0416
	Tri		0,1159	0,1016	0,0294

ChM*Tri	0,2317	0,2033	0,0588
---------	--------	--------	--------

* Ghi chú:

ChM NT 1: 20% phân trùn, 60% mật dừa, 10% bột bắp, 10% cám gạo

ChM NT 2 : 20% bã bùn mía, 60% mật dừa, 10% bột bắp, 10% cám gạo

ChM NT 3 : 20% than bùn, 20% phân trùn, 40% mật dừa, 10% bột bắp, 10% cám gạo

ChM NT 4 : 80% mật dừa, 10% bột bắp, 10% cám gạo

Nhận xét:

Kết quả tính thống kê ở mức 0,05 tại Bảng 8 mật độ 02 chủng *Trichoderma* sp. có trong 04 nền chất mang nhận thấy:

- Các nền chất mang khác nhau có số lượng bào tử nấm khác nhau và tăng theo thứ tự chất mang 4 > chất mang 1 > chất mang 2 > chất mang 3 với chủng Tr4 và giữa các nền chất mang khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với chủng Tr4. Chủng Tr58 mật độ bào tử nấm tăng theo thứ tự chất mang 4 > chất mang 3 ≥ chất mang 2 > chất mang 1.
- Giữa hai chủng nấm tham gia thí nghiệm, chủng *Trichoderma* số 4 (Tr4) có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chủng 58 (Tr58) về số lượng bào tử.
- Giữa các chủng nấm tham gia thí nghiệm với các nền chất mang có tương tác khác biệt ý nghĩa thống kê.
- Chủng nấm Tr4: nền chất mang NT4 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về số lượng bào tử nấm so với nghiệm thức của chất mang 1, 2 và 3. Đồng thời nền chất mang NT1 và NT3 cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Ngược lại, số lượng bào tử nấm có trong nền chất mang 2 và 3 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.
- Chủng nấm Tr58: nền chất mang NT4 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về số lượng bào tử nấm so với nghiệm thức của chất mang 1, 2 và 3. Đồng thời nền chất mang 2 và 3 cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chất mang 1. Ngược lại, số lượng bào tử nấm có trong nền chất mang 2 và 3 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.
- So sánh tương tác giữa từng nền chất mang khác nhau với hai chủng Tr4 và Tr58 nhận thấy trên các nền chất mang khác nhau đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về số lượng bào tử nấm.
- Xét về mặt hiệu quả kinh tế trên các nền chất mang khác nhau đều có chung bột bắp và cám gạo chỉ khác nhau về giá thành chất mang như: phân trùn với mật dừa (phân trùn 1.500 đồng/kg, mật dừa 1.000 đồng/kg). Ta nhận thấy nền chất mang 4 có hiệu quả kinh tế nhất. Tuy nhiên, ở các địa phương khác nhau có các phụ phẩm khác nhau đều có thể tận dụng để sản xuất phân hữu cơ vi sinh.

3.3 Nội dung 3: Đánh giá hoạt lực của các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm bệnh (phụ lục 4)

Nhận xét:

Kết quả nhiễm nấm bệnh và nhiễm nấm bệnh kết hợp bón chế phẩm *Bacillus* sp. đối kháng với bệnh do nấm *Phytophthora* spp. và *Fusarium* spp. và *Sclerotium* spp. được trình bày tại Bảng 9. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 0,05 ở nghiệm thức chỉ nhiễm nấm bệnh so với vừa nhiễm nấm bệnh vừa bón chế phẩm *Bacillus* sp. đối kháng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các chế phẩm riêng lẻ HB5 và HB7 hay hỗn hợp HB5 + HB7. Hiệu quả bón chế phẩm *Bacillus* sp. đối kháng tăng 71 - 88% sau 30 ngày xử lý.

Bảng 9. Tỷ lệ bệnh trên lá cây tiêu sau khi nhiễm nấm và hiệu quả của chế phẩm đối kháng *Bacillus* sp. sau 30 ngày nhiễm bệnh

CP- <i>Bacillus</i>	Tỷ lệ bệnh trên lá cây tiêu sau khi nhiễm nấm (%)			Hiệu quả của chế phẩm đối kháng <i>Bacillus</i> sp. (%)		
	Ph	Fu	Scle	Ph	Fu	Scle
ĐC-Ph	48,06	22,64	11,8			
HB5	6,75	4,19	2,77	85,27	81,74	73,45
HB7	5,01	4,74	2,77	81,84	78,55	73,80
HH (HB5+HB7)	5,62	3,56	3,01	88,18	84,33	71,48
CV%	15,2	18,1	20,5			
LSD_{0,05}	5,72	2,95	2,52			

Ghi chú: *Phytophthora* sp : Ph; *Fusarium* spp. : Fu; *Sclerotium* spp. : Scle

Bảng 10. Tỷ lệ bệnh trên lá cây tiêu sau khi nhiễm nấm và hiệu quả của chế phẩm đối kháng *Trichoderma* sp. sau 30 ngày nhiễm bệnh

CP- <i>Trichoderma</i>	Tỷ lệ bệnh trên lá cây tiêu sau khi nhiễm nấm (%)			Hiệu quả của chế phẩm đối kháng <i>Trichoderma</i> sp. (%)		
	Ph	Fu	Scle	Ph	Fu	Scle
ĐC-Ph	48,06	22,64	11,8			
Tr4	4,93	4,99	4,12	89,75	78,01	61,52
Tr58	4,04	4,62	4,15	91,57	79,49	63,75
HH (Tr4+Tr58)	50,3	3,56	3,67	89,34	84,36	66,37

CV%	17,0	15,8	25
LSD_{0,05}	5,14	2,18	2,66

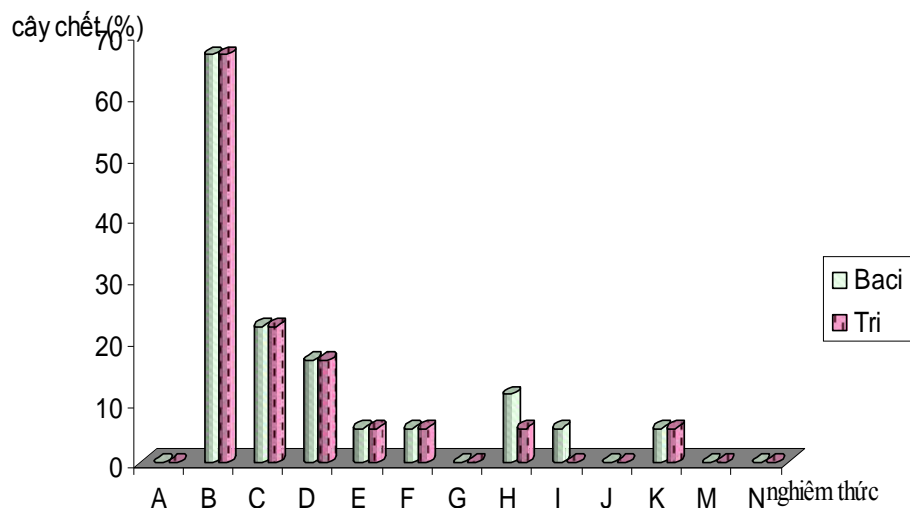
Ghi chú: *Phytophthora sp* : Ph; *Fusarium spp.* : Fu; *Sclerotium spp.* : Scle

Nhận xét:

Qua kết quả Bảng 10 khi nhiễm nấm bệnh *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.*, *Sclerotium spp.* và dùng chế phẩm *Trichoderma* Tr4., Tr58, hỗn hợp HH (Tr4+58) bón cho cây tiêu cũng tương tự như hiệu quả của chế phẩm *Bacillus sp.* bón cho cây tiêu nhằm ngăn cản sự phát triển của nấm bệnh. Tốc độ lá bị bệnh chậm lại vào ngày 18 sau xử lý và gần như dừng lại ở 30 ngày sau xử lý.

Số lá cây tiêu bị bệnh khi nhiễm nấm *Phytophthora spp.* nhiều hơn nhiễm nấm *Fusarium spp.* cuối cùng là nhiễm nấm *Sclerotium spp.*. Các nghiệm thức có nhiễm nấm bệnh và bón chế phẩm *Trichoderma sp.* đều có số lá cây tiêu bị bệnh ít hơn nghiệm thức chỉ nhiễm nấm bệnh (nghiệm thức đối chứng). Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 0,05 về số lá cây bị bệnh ở nghiệm thức đối chứng nhiễm nấm bệnh so với các nghiệm thức vừa nhiễm nấm bệnh vừa bón chế phẩm đối kháng *Trichoderma* riêng lẻ Tr4, Tr58 và hỗn hợp Tr4 + 58.

Khả năng làm cho lá cây bị bệnh do nấm *Phytophthora spp.* nhiều hơn *Fusarium spp.* và *Sclerotium spp.*. Ngược lại, hiệu quả bón chế phẩm *Trichoderma sp.* đối kháng với nấm gây bệnh *Phytophthora spp.* cao hơn so với bệnh do nấm *Fusarium spp.* và *Sclerotium spp.*. Hiệu quả bón chế phẩm *Trichoderma sp.* đối kháng tăng 61 - 91% sau 30 ngày xử lý.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ cây chết vì bị bệnh (%)

* Ghi chú

Baci: chế phẩm *Bacillus*

Nhận xét:

Biểu đồ 1 cho thấy tỷ lệ cây bị nhiễm bệnh *Phytophthora* spp. chết cao hơn so với bệnh do nấm *Fusarium* spp. và *Sclerotium* spp.. Với các nghiệm thức nhiễm nấm bệnh và bón chế phẩm đối kháng *Bacillus* sp. và *Trichoderma* sp. làm cho tỷ lệ cây chết ít hơn (cây chết vì bệnh từ 17 - 67% và khi có bón chế phẩm tỷ lệ cây chết chỉ còn từ 0 - 11% Như vậy, hiệu quả của chế phẩm đối kháng là số cây chết giảm đi nhiều. Hiệu quả của chế phẩm *Trichoderma* Tr58 đối với nấm *Phytophthora* spp. hơn chế phẩm *Bacillus* HB7 (tỷ lệ cây chết khi nhiễm *Trichoderma* Tr58 là 5,56% và *Bacillus* HB7 là 11,11%).

3.4 Nội dung 4: Đánh giá chất lượng của phân hữu cơ vi sinh

Bước 1: Nhân và kiểm tra chất lượng men VSV

Bảng 11. Kết quả kiểm tra chất lượng men vi sinh

(cfu/ml,g)

STT	Vi khuẩn	Môi trường lỏng (sau 5 ngày)	Môi trường xốp (sau 15 ngày)
1	Cố định đạm tự do	$1,68 \times 10^9$	$1,64 \times 10^9$
2	Cố định đạm hội sinh	$1,60 \times 10^9$	$1,63 \times 10^9$
3	Phân giải lân	$1,82 \times 10^9$	$1,80 \times 10^9$

Nhận xét:

Men giống sau 15 ngày sản xuất, có mật độ vi khuẩn không thay đổi đáng kể so với canh trùng và đều đạt số lượng vi sinh theo tiêu chuẩn vi sinh vật trên nền chất mang có khử trùng 10^9 CFU/ml-g.

Bước 2: Nghiên cứu tỷ lệ phối trộn men VSV với chất mang để sản xuất phân hữu cơ vi sinh

CT1	Nguyên liệu nền	+ 1% VS2
CT2	Nguyên liệu nền	+ 3% VS2
CT3	Nguyên liệu nền	+ 5% VS2

*Ghi chú: Nguyên liệu nền: 20% BBM+ 80% MD đã qua sơ chế với $CaCO_3$ và dolomite + vi sinh vật phân giải cellulose

VS2: nhóm vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân

Nhận xét:

Kết quả được trình bày tại Bảng 12 cho thấy khi lượng men giống tăng từ 1 đến 3 và 5%, mật độ vi sinh trong đồng ủ tăng. Sau ngày sản xuất 1 tháng, mật độ các chủng vi sinh giảm dần theo thời gian nhưng vẫn đạt tiêu chuẩn phân bón trên nền chất mang không khử trùng ở tất cả các công thức (đạt 10^6 đến 10^8 CFU/g). Qua kết quả cũng chỉ

rõ khi tăng lượng men giống từ 1% đến 5% thì mật độ vi khuẩn gia tăng một lượng đáng kể từ 10^6 đến 10^8 CFU/g (tăng từ 1 triệu lên 100 triệu CFU/g chất mang) .

Ở mức 3 và 5% men giống đảm bảo tốt hơn cho chất lượng phân khi cần tồn trữ trong một thời gian dài hơn.

Ẩm độ là một trong những chỉ tiêu quan trọng có ảnh hưởng đến chất lượng của phân hữu cơ vi sinh, đặc biệt nó ảnh hưởng đến mật độ vi sinh có trong đồng ủ. Mỗi chủng loại vi sinh khác nhau có khả năng thích ứng khác nhau với nhu cầu ẩm độ. Đối với các chủng vi khuẩn không có khả năng sinh bào tử thì cần ẩm độ cao hơn những chủng có khả năng sinh bào tử. Trong thí nghiệm này chúng tôi duy trì ẩm độ của các công thức thí nghiệm trong thời gian bảo quản là 30% .

Bảng 12. Mật độ vi sinh có trong phân hữu cơ vi sinh sau 1 tháng

(CFU/g)

	Vi khuẩn	CT1	CT2	CT3
15 ngày	VK 1	$1,24 \times 10^6$	$1,24 \times 10^7$	$2,72 \times 10^8$
sau sản	VK 2	$1,32 \times 10^6$	$1,32 \times 10^7$	$3,69 \times 10^8$
xuất	VK 3	$1,68 \times 10^6$	$1,68 \times 10^7$	$5,12 \times 10^8$
30 ngày	VK 1	$0,89 \times 10^6$	$1,09 \times 10^7$	$2,12 \times 10^8$
sau sản	VK 2	$0,98 \times 10^6$	$1,11 \times 10^7$	$3,15 \times 10^8$
xuất	VK 3	$1,05 \times 10^6$	$1,35 \times 10^7$	$4,98 \times 10^8$

Ghi chú: *Cổ định đạm tự do (VK 1), cố định đạm hội sinh (VK 2), phân giải lân (VK 3)*

Bảng 13. Một số chỉ tiêu hoá học sau thời gian bảo quản 1 tháng

TT	Công thức	N%	C%	K ₂ O%	P ₂ O ₅ %	C/N%
1	CT1 BDSX	1,83	20,9	1,49	3,97	11,42
	SSX	1,68	20,5	1,42	3,86	11,04
2	CT2 BDSX	1,83	20,9	1,49	3,97	11,42
	SSX	1,77	20,6	1,38	3,82	11,52
3	CT3 BDSX	1,83	20,9	1,49	3,97	11,42
	SSX	1,80	20,7	1,35	3,79	11,44

Ghi chú : BDSX = Bắt đầu sản xuất ; SSX = Sau sản xuất 1 tháng

Nhận xét:

Đạm tổng số trong các công thức thí nghiệm giảm nhẹ sau 1 tháng sản xuất phân hữu cơ vi sinh. Tuy nhiên ở các công thức có lượng men giống tăng lên thì mức độ đạm giảm ít hơn do trong thành phần chất mang của men có một lượng đạm nhỏ (Bảng 6).

Lượng C% giảm nhẹ sau 1 tháng, do ẩm độ trong đồng ủ vẫn thích hợp cho quá trình chuyên hoá C ở giai đoạn này. Tuy nhiên mức độ giảm C% hơi ít hơn ở công thức có thêm 5% men giống một phần do thành phần chất mang cũng có hàm lượng C.

Lượng lân tổng số giảm dần theo tỷ lệ men giống vi sinh - CT3 (giảm 0,18% P₂O₅) do các vi sinh vật phân giải lân trong đồng ủ vẫn tồn tại và phát triển, nên chúng vẫn tiếp tục quá trình chuyển hoá lân. Vì vậy, cần phải lưu ý chỉ tiêu này khi tồn trữ phân hữu cơ vi sinh trong thời gian dài để duy trì mật độ vi khuẩn phân giải lân và hàm lượng lân khi cần bón thêm lân cho cây trồng.

Tóm lại: Qua kết quả kiểm tra chế phẩm vi sinh sau 1 tháng sản xuất được trình bày tại Bảng 5 và 6 đạt các chỉ tiêu như: pH_{H₂O} = 6,23, pH_{KCl} = 5,93, ẩm độ = 30%, mật độ vi sinh vật có ích (10⁶ đến 10⁸ CFU/g) và các chỉ tiêu N%, P₂O₅%, K₂O % và C% thì thích hợp để làm phân hữu cơ vi sinh. Các công thức phối trộn 1-3 và 5% men giống vi khuẩn cố định đạm và phân giải lân đều thích hợp để làm phân hữu cơ vi sinh (theo tiêu chuẩn phân hữu cơ vi sinh - QĐ số 71/200/QĐ-BNN (ngày 2/12/2004) - hàm lượng hữu cơ ≥ 15%; C ≥ 8,5%; ẩm độ ≤ 30%, pH_{KCl} 5-7; VSV sống có ích ≥ 1.10⁶ CFU/g phân bón). Trong đó, để đảm bảo chất lượng phân về mật độ vi sinh trong thời gian bảo quản 3-6 tháng nên chọn công thức có 5% men giống vi sinh vật cố định đạm và phân giải lân.

3.5 Nội dung 5: Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật và phân bón Hữu cơ vi sinh

Từ các kết quả nghiên cứu tại nội dung 1,2,3,4 chúng tôi xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật và phân bón Hữu cơ vi sinh (trình bày tại Phụ lục 5)

4. Kết luận và đề nghị

4.1 Kết luận

- Ở thời điểm kết thúc đề đã phân lập và thử hoạt tính, định danh sơ bộ được 2 chủng vi khuẩn cố định đạm *Azotobacter* sp., 3 chủng VSV phân giải lân (*Bacillus* sp., *Candida* sp., *Klebsiella* sp.), 5 chủng VSV phân giải cellulose trong đó (1 chủng vi khuẩn, 2 chủng xạ khuẩn, 2 chủng nấm- *Trichoderma* sp. và *Aspergillus* sp.) có hoạt lực sinh học tốt.
- **Sản xuất phân hữu cơ:** Nguyên liệu đã qua sơ chế = (phân hữu cơ) + 3 hoặc 5% men giống (VS2) vi sinh cố định đạm, phân giải lân + phụ gia + vi lượng đạt tiêu chuẩn làm phân hữu cơ vi sinh (đạt tiêu chuẩn theo QĐ số 71/200/QĐ-BNN (ngày 2/12/2004).
- Tất cả các chủng *Bacillus* đều có khả năng phân giải tốt cellulose, tinh bột và protein và có hoạt lực đối kháng của chúng với nấm bệnh.
- Nền chất mang NT1 (50% bã bùn mía + 10% cám Bình Đông + 40% than bùn) có số lượng tế bào *Bacillus* cao nhất ở cả 02 chủng HB5 và HB7 và đạt tiêu chuẩn phân bón Việt Nam trên nền chất mang khử trùng sau 06 tháng sản xuất (chế phẩm vi sinh).
- Trên nền chất mang khử trùng thì mật độ VSV của chủng HB5 và chủng HB7 có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chủng HB5 và HB7 có mật độ tế bào đạt 10⁸

CFU/g ở tỉ lệ phối trộn 1:10 sau 75 ngày sản xuất và sau 180 ngày sản xuất là 10^6 CFU/g, đạt tiêu chuẩn phân bón Việt Nam trên nền chất mang không khử trùng (phân hữu cơ vi sinh).

- Chất mang NT2 (20% bùn ao nuôi thủy sản + 80% than bùn) có hiệu quả kinh tế nhất đối với chế phẩm *Bacillus*
- Chế phẩm *Bacillus* HB5 và HB7 hạn chế sự phát triển của nấm bệnh hại cây tiêu.
- *Trichoderma* chủng số 4 và chủng 58 có đặc tính đối kháng tốt nhất với 3 chủng nấm bệnh *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. và *Sclerotium* spp.
- Trên các nền chất mang khác nhau chủng Tr4 và Tr58 đều có số lượng tế bào đạt tiêu chuẩn Việt Nam trên nền chất mang khử trùng (10^8 CFU/g) và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, chủng Tr4 có mật độ tế bào cao hơn chủng Tr58.
- Nền chất mang NT 4 (80% mặt dừa, 10% bột bắp, 10% cám gạo) có hiệu quả kinh tế nhất và có số lượng tế bào nấm cao nhất với cả 2 chủng nấm Tr4 và Tr58.
- Hoạt lực đối kháng của chế phẩm Tr4 và Tr58 trên nền chất mang NT4 sau 06 tháng sản xuất không thay đổi.

4.2 Đề nghị

- Định danh đến tên loài của các chủng vi sinh vật có hoạt lực sinh học cao của đề tài.
- Khảo sát thêm một số đặc tính sinh học của các chủng vi sinh vật có hoạt lực sinh học cao của đề tài nhằm ứng dụng vào công nghệ sản xuất enzym.
- Đánh giá khả năng đối kháng của các chế phẩm nấm *Bacillus* sp. và *Trichoderma* sp. cho các cây trồng khác.
- Ứng dụng các chế phẩm cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose xử lý phụ phế phẩm trong nông nghiệp làm phân bón và phân hữu cơ vi sinh
- Đề nghị được công nhận kết quả nghiên cứu là tiến bộ khoa học kỹ thuật.

Lời cảm ơn

Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí nghiên cứu của:

- Đề tài cấp cơ sở năm 2006 – 2007: “Xử lý phụ phế phẩm trong Nông nghiệp làm phân bón”.
- Đề tài cấp Bộ năm 2008 – 2011: “Nghiên cứu dịch hại phát sinh từ đất và biện pháp quản lý cây trồng tổng hợp cho cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.)

Tài liệu tham khảo

Bae, Y.S., Knudsen, G.R. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Biological Control*, 32: 236-242.

- Bemtez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- Dương Minh, 2010. Vai trò của nấm *Trichoderma* trong việc phòng trừ bệnh cây. p. 438-447. Một số kết quả nghiên cứu có khả năng ứng dụng từ nấm. Hội nghị khoa học công nghệ toàn quốc về bảo vệ thực vật lần thứ 3. NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Vitebo. A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2: 43-56.
- Hoàng Đại Tuấn, 2001 . Dự án “Hồi thiện công nghệ sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh từ phế thải, phụ phẩm mía đường”
<http://members.lycos.fr/microbio/systematique/Bacillusdoc/bacilUI.html>
<http://vi.wikipedia.org/wiki/Piperaceae>.
- Lê Đức Mạnh, Ngô Tiến Hiền, Lê Đức Ngọc, 2003. Nghiên cứu thu nhận và bảo quản Protease từ chế phẩm lên men bề mặt của vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Đề tài nghiên cứu khoa học.
- Lê Thị Hồng Mai, 1989. Sinh tổng hợp và một số đặc tính của cellulase (typ CMC-aza). Luận án phó tiến sĩ sinh học.
- Lê Văn Nhung và cộng sự, 1998. Nghiên cứu và áp dụng công nghệ sinh học trong sản xuất phân bón vi sinh – hữu cơ từ nguồn phế thải hữu cơ rắn (Báo cáo tổng kết đề tài cấp nhà nước, MS: KHCN-02-04) – Hà Nội.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S.L., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J.K. 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions with constitutive and inducible GFP reporter systems. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 3073-3081.
- Lương Bảo Uyên, 2001 . Đề tài Thạc sĩ “Sử dụng mật dứa làm phân hữu cơ sinh”.
- Lưu Đức Phẩm và Hồ Sương, 1978. Vi sinh vật tổng hợp. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Mai Thanh Trúc, 2001 . Đề tài cử nhân “Sử dụng nguồn mật dứa làm phân bón”
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, P., Woo, S.L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turra, D., Pogliano, V., Scala, P., Lorito, M. 2006. Study of three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*, 50: 307-321.
- Nguyễn Đường và Nguyễn Xuân Thành , 1999. Giáo trình sinh học đất – Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- Nguyễn Kim Vân và cộng sự, 2010. Kết quả nghiên cứu chế phẩm sinh học phòng trừ các bệnh hại cây có nguồn gốc trong đất ở miền Bắc Việt Nam. p. 449-457. Hội nghị khoa học công nghệ toàn quốc về bảo vệ thực vật lần thứ 3. NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.
- Nguyễn Lân Dũng, 1983. Thực tập vi sinh vật. Nhà xuất bản Quốc gia, Hà Nội.
- Nguyễn Lân Dũng, 1984. Vi sinh vật và sự chuyển hóa các chất cacbon, nitơ. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

- Nguyễn Thân, 2004. Chọn lọc nhân sinh khối nấm *Trichoderma* đối kháng với nấm *phytophthora* sp gây hại cây trồng. luận văn thạc sĩ Khoa học Nông nghiệp.
- Nguyễn Thanh Hiền, 2003. Phân hữu cơ, phân vi sinh và phân ủ - Nhà xuất bản Nghệ An
- Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Lâm Dũng, 2006. Khả năng sinh tổng hợp chitinaza của chủng vi khuẩn *Bacillus* Q3 có hoạt tính kháng nấm cao. Đề tài khoa học.
- Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thu Hoa, 2005. Nghiên cứu sử dụng bào tử *Bacillus subtilis* làm chế phẩm phòng và điều trị nhiễm khuẩn đường Tai – Mũi – Họng. Đề tài nghiên cứu. Trường Đại Học Y dược TP HCM.
- Nguyễn Vinh Trường, Edward C.Y. Liew và Lester W Burgess, 2007. Hình thức sinh sản hữu tính của *Phytophthora capsici* Leonian, tác nhân gây bệnh chết héo hồ tiêu. Viện Bảo vệ thực vật, Cục Bảo vệ thực vật. Tạp chí chuyên ngành bảo vệ thực vật. Số 3/2007.
- Nguyễn Xuân Thành, Lê Văn Hưng, Phạm Văn Toàn, 2003. Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường. NXB Nông Nghiệp
- Philippe Douillet, 2002. Strains of *Bacillus* for biological control of pathogenic fungi. The United States Patent and Trademark office.
- Tôn Nữ Tuấn Nam, Trần Kim Loan, Đào Thị Lan Hoa, 2008. Kỹ thuật trồng, thâm canh, chế biến và bảo quản hồ tiêu. Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn - Trung Tâm Khuyến Nông Khuyến Ngư Quốc gia.
- Trần Kim Loan và cộng sự, 2010. Phòng trừ bệnh do nấm *Phytophthora* trên cây hồ tiêu và cây ca cao bằng chế phẩm sinh học *Trichoderma* (Tricô-VTN) tại Tây Nguyên. p. 473-480. Hội nghị khoa học công nghệ toàn quốc về bảo vệ thực vật lần thứ 3. NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ.
- Trần Thị Yên Hà , 1998. Thăm dò khả năng phân huỷ Lignin và cellulose của một số dòng nấm mèo. Luận án tốt nghiệp ĐHKHTN.
- Viện Nông hoá Thổ nhưỡng, 1998. Sổ tay đất nước phân bón. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Viện Nông hoá Thổ nhưỡng, 1998. Sổ tay đất nước phân bón. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Vinale, P., Sivasithamparna, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-Plant-Pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry, 40: 1-10.
- Võ Thị Thứ, 1996. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng ứng dụng của một số chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Luận án Phó Tiến Sĩ Khoa Học Sinh Học.
- Vũ Triệu Mân, Lê Lương Tề, 1998. Bệnh cây nông nghiệp. p. 21-69. NXB Nông nghiệp.
- Yedfidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. Lanchrymans in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied Environmental Microbiology, 69: 7343-7353.