BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

KỶ YẾU
HỘI NGHỊ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT NĂM 2020

Tiểu ban 3: Nông lâm

Lâm Đồng, tháng 08 năm 2020

DANH SÁCH TRÌNH BÀY BÁO CÁO TẠI HỘI NGHỊ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT NĂM 2020

Số TT	Tên đề tài	Họ và tên sinh viên	Lớp/ Khoa	Họ tên Giáo viên hướng dẫn	Trang
Tiểu ban Nông lâm (04 đề tài Nông Lâm)					
1.	Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế được nuôi trong vỏ cà phê đã qua xử lý	Nguyễn Thị Như Quỳnh ***(Chủ nhiệm)*** Lê Thị Tuyết Mai Lê Tấn Thịnh Nguyễn Duy Bảo	NHK41/ Khoa Nông Lâm	Lê Bá Lê	3
2.	Nghiên cứu nhân giống cây Thanh mai *(Myrica esculenta)* bằng phương pháp *in vitro*	Võ Thị Kim Nga ***(Chủ nhiệm)*** Nguyễn Thị Tuyết Nhi Chềnh Hếnh Phấn Phan Thị Nam Nhi	NHK41/ Khoa Nông Lâm	Phạm Ngọc Tuân	71
3.	Sử dụng dịch chiết thực vật để phòng trừ cỏ dại trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Lâm Đồng	Nguyễn Minh Quang ***(Chủ nhiệm)*** Nguyễn Phi Công Nguyễn Lâm Tuyết Huỳnh Trung Hậu	NHK41/ Khoa Nông Lâm	Trần Thị Minh Loan	103
4.	Tuyển chọn một số chủng vi sinh vật bản địa có tiềm năng trong phòng trừ tuyến trùng gây hại cây trồng tại Đà Lạt	Trần Thị Bích Thoa ***(Chủ nhiệm)*** Phạm Lê Thùy Diễm	NHK41/ Khoa Nông Lâm	Trần Thị Minh Loan	211

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ LỢI TRONG PHÂN TRÙN QUẾ ĐƯỢC NUÔI TRONG VỎ CÀ PHÊ ĐÃ QUA XỬ LÝ

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông Lâm

Lâm Đồng, tháng 6/2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT CÓ LỢI TRONG PHÂN TRÙN QUẾ ĐƯỢC NUÔI TRONG VỎ CÀ PHÊ ĐÃ QUA XỬ LÝ

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông lâm

Sinh viên thực hiện: 1. Nguyễn Thị Như Quỳnh Nam, Nữ: Nữ
2. Lê Thị Tuyết Mai

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: NHK41 – Khoa Nông lâm Năm thứ: 3 /Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Nông học

Người hướng dẫn: ThS. Lê Bá Lê

Lâm Đồng, tháng 6/2020

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này:

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn thầy Lê Bá Lê đã tận tình hướng dẫn, theo dõi và giúp đỡ chúng tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu này.

Xin chân thành cảm ơn cô Trần Thị Minh Loan đã luôn theo dõi, góp ý kiến, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài để chúng tôi có một kết quả nghiên cứu tốt nhất.

Xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu Trường Đại học Đà Lạt và các phòng ban đã tạo điều kiện cho chúng tôi được phát huy ý tưởng và sự sáng tạo của bản thân trong lĩnh vực nghiên cứu.

Xin gửi lời tri ân đến các thầy cô Khoa Nông Lâm đã dạy dỗ, truyền đạt và tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện và hoàn thành đề tài.

Xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè và những người đã luôn ở bên cạnh chúng tôi động viên, góp ý kiến để chúng tôi có một kết quả nghiên cứu tốt nhất.

Cuối cùng cảm ơn những nỗ lực, cố gắng trong toàn bộ quá trình thực hiện và hoàn thành đề tài nghiên cứu của tất cả thành viên trong nhóm.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn!

LỜI CAM ĐOAN

Nghiên cứu khoa học với đề tài "*Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế được nuôi trong vỏ cà phê đã qua xử lý*" là công trình nghiên cứu của chúng tôi dưới sự hướng dẫn của ThS. Lê Bá Lê.

Các kết quả nghiên cứu hoàn toàn trung thực, không sao chép hoặc man trá và chưa được công bố dưới bất cứ hình thức nào. Nếu có chúng tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm trước pháp luật và các quy định hiện hành.

Đà Lạt, ngày … tháng … năm …

Người cam kết

Nguyễn Thị Như Quỳnh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu đề tài 2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1 Vi sinh vật cố định đạm 3
1.1.1 *Azotobacter* 3
1.1.2 *Rhizobium* 4
1.1.3 *Beijerinckia* 4
1.1.4 *Azospirillum* 5
1.2 Vi sinh vật phân giải lân 5
1.2.1 Vi khuẩn 5
1.2.1.1 Bacillus 5
1.2.1.2 Pseudomonas 6
1.2.2 Nấm 6
1.2.2.1 Aspergillus 6
1.2.2.2 Penicillium 7
1.3 Vi sinh vật phân giải cellulose 7
1.3.1 *Lactobacillus* 7
1.3.2 *Sporocytophaga* 8
1.3.3 *Cytophaga* 8
1.3.4 *Cellvibrio* 9
1.3.5 *Sorangium* 9
1.3.6 Xạ khuẩn 9
1.4 Sinh trưởng và phát triển vi sinh vật 9
1.5 Trùn quế, vai trò của phân trùn 12
1.5.1 Trùn quế 12
1.5.2 Phân trùn 13
1.6 Vai trò của vi sinh vật trong đất 13
1.6.1 Cố định nitơ không khí nhờ vi sinh vật 15
1.6.2 Chuyển hóa lân khó tiêu thành lân dễ tiêu nhờ vi sinh vật 16
1.6.3 Phân giải cellulose trong đất nhờ vi sinh vật 17

1.7 Tổng quan tình hình nghiên cứu của đề tài 17
1.7.1 Tình hình nghiên cứu trong nước 17
1.7.2 Tình hình nghiên cứu ngoài nước 18
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 20
2.1 Đối tượng nghiên cứu 20
2.2 Vật liệu nghiên cứu 20
2.3 Phương pháp nghiên cứu 20
2.3.1 Thu thập mẫu phân trùn quế 20
2.3.2 Phương pháp pha loãng dung dịch để nuôi cấy 20
2.3.3 Phân lập các chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế 21
2.3.4 Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế 21
2.3.4.1 Cấy chuyền từ các đĩa phân lập 21
2.3.4.2 Nhân nuôi và làm thuần mẫu vi sinh vật 21
2.3.5 Thử nghiệm in vitro 22
2.3.6 Phương pháp đánh giá khả năng cố định đạm của chủng vi sinh vật được phân lập (Phương pháp cải biên Đoàn Văn Cung và cs, 1998) 23
2.3.7 Phương pháp đánh giá khả năng phân giải lân (P) khó tan của chủng vi sinh vật được phân lập (Phương pháp cải biên Đoàn Văn Cung và cs, 1998) 24
2.3.8 Phương pháp đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng vi sinh vật được phân lập 24
2.3.9 Quan sát vi sinh vật 24
2.3.10 Định lượng vi sinh vật 25
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 27
3.1 Phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế 27
3.2 Đặc điểm hình thái và khuẩn lạc của các chủng vi sinh vật phân lập được trong phân trùn quế 28
3.2.1 Chủng *Azotobacter* 28
3.2.2 Chủng *Bacillus* 30
3.2.3 Chủng *Aspergillus* 32
3.2.4 Chủng *Lactobacillus* 35
3.3 Mật độ vi sinh vật 36
3.3.1 Chủng *Azotobacter* 36
3.3.2 Chủng *Bacillus* 37
3.3.3 Chủng *Aspergillus* 38

3.3.4 Chủng *Lactobacillus* 38
3.4 Sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trên môi trường Getchinson 39
3.4.1 Chủng *Azotobacter* 39
3.4.2 Chủng *Bacillus* 41
3.4.3 Chủng *Aspergillus* 42
3.4.4 Chủng *Lactobacillus* 43
3.5 Đánh giá khả năng cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật 44
3.5.1 Khả năng cố định đạm của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế 44
3.5.2 Khả năng phân giải lân của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế 45
3.5.3 Khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế 47
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 48
4.1. Kết luận 48
4.2. Kiến nghị 48
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Cơ chế nhân đôi của tế bào vi sinh vật (OpenStax, 2019) 10
Hình 1.2 Đường cong tăng trưởng của quần thể vi sinh vật trong nuôi cấy không liên tục (Prescott và cs. 2002).....11
Hình 1.3 Quá trình cố định nitơ phân tử.....15
Hình 3.1 Một số khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar (A) và môi trường PDA (B) sau 5 ngày nuôi cấy mẫu phân trùn 27
Hình 3.2 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi 30
Hình 3.3 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi 32
Hình 3.4 Đặc điểm hình thái của chủng nấm khi quan sát dưới kính hiển vi 34
Hình 3.5 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi 36
Hình 3.6 Biểu đồ thể hiện hàm lượng nitơ trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày bổ sung vi sinh vật.....45
Hình 3.7 Biểu đồ thể hiện hàm lượng lân dễ tiêu trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày bổ sung vi sinh vật.....46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Sự phân bố của vi sinh vật trong 1g đất khô theo chiều sâu của đất 14
Bảng 2.1 Xây dựng thang chuẩn N 23
Bảng 3.1 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian 29
Bảng 3.2 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian 31
Bảng 3.3 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian 33
Bảng 3.4 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian 35
Bảng 3.5 Số lượng vi sinh vật cố định đạm *Azotobacter* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế 37
Bảng 3.6 Mật độ vi sinh vật phân giải lân *Bacillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế 37
Bảng 3.7 Mật độ vi sinh vật phân giải lân *Aspergillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế 38
Bảng 3.8 Số lượng vi sinh vật phân giải cellulose *Lactobacillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế.....39
Bảng 3.9 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Azotobacter* qua các thời gian nuôi cấy.....40
Bảng 3.10 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Bacillus* qua các thời gian nuôi cấy.....41
Bảng 3.11 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Aspergillus* qua các thời gian nuôi cấy.....42
Bảng 3.12 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Lactobacillus* qua các thời gian nuôi cấy.....43
Bảng 3.13 Diễn biến của môi trường nuôi cấy và mẫu thử qua các thời gian nuôi cấy 47

DANH MỤC NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

ATP:	Adenosintriphosphat
CFU:	Colony Forming Unit
Cs:	Cộng sự
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
PDA:	Potato Dextrose Agar
ppm:	parts per million
RNA:	Ribonucleic Acid

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN

CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Ảnh 4x6

Họ và tên: Nguyễn Thị Như Quỳnh

Sinh ngày: 05 tháng 09 năm 1999

Nơi sinh: Đăk Lăk

Lớp: NHK41 Khóa: 41

Khoa: Nông lâm

Địa chỉ liên hệ: Lớp NHK41

Khoa Nông Lâm – Trường Đại học Đà Lạt

Điện thoại: 0982188128 Email: 1710684@dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP

**** Năm thứ 1:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: 3.06/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích: Học bổng KKHT học kỳ II.

**** Năm thứ 2:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: 3.04/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích:

**** Năm thứ 3 – Học kỳ I:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: 3.11/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích:

Ngày tháng năm

Xác nhận của trường đại học	**Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài**
(ký tên và đóng dấu)	*(ký, họ và tên)*

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế được nuôi trong vỏ cà phê đã qua xử lý.

- Sinh viên thực hiện: Nguyễn Thị Như Quỳnh MSSV: 1710684

Lê Thị Tuyết Mai MSSV: 1710663

- Lớp: NHK41 Khoa: Nông lâm Năm thứ: 3 Số năm đào tạo: 4

- Người hướng dẫn: Th.S Lê Bá Lê

2. Mục tiêu đề tài:

Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose trong phân trùn quế nhằm mục đích tăng hiệu quả sử dụng phân bón hóa học, giảm lượng phân bón hóa học trong đất để tăng năng suất cây trồng, cải tạo đất và bảo vệ môi trường.

3. Tính mới và sáng tạo:

Nói đến hệ vi sinh đất thì từ lâu người ta đã tìm được rất nhiều chủng vi sinh vật có lợi và khả năng ứng dụng của chúng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong việc giải quyết những vấn đề liên quan đến môi trường. Phân trùn là một trong những loại phân chứa hệ vi sinh vật rất đa dạng. Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện nay vẫn không có nhiều nghiên cứu tập trung vào hệ vi sinh vật có trong phân trùn quế mặc dù khả năng hữu dụng của chúng rất cao. Trước đây, chỉ có một số ít nông dân nuôi trùn quế lấy phân bón cho cây. Về sau này, khi có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng xử lý chất thải hữu cơ của trùn quế thì việc sử dụng trùn quế đã phổ biến hơn nhưng người ta lại bỏ qua việc tận dụng hệ vi sinh vật có trong phân trùn để tạo nên các chế phẩm vi sinh hay phân bón hữu cơ vi sinh mang lại lợi ích cho nền nông nghiệp.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài "***Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế được nuôi trong vỏ cà phê đã qua xử lý***" nhằm mục tiêu tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose có hoạt tính sinh học cao.

4. Kết quả nghiên cứu:

Đã tuyển chọn được 4 chủng vi sinh vật từ phân trùn quế được nuôi trên môi trường vỏ cà phê là *Azotobacter*, *Bacillus*, *Aspergillus* và *Lactobacillus*.

Chủng *Azotobacter* có khuẩn lạc màu trắng đục, thuộc nhóm gram âm, có hình dạng như những chiếc que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ với mật độ là $2,8.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Beijerinsk và có khả năng cố định đạm, làm tăng lượng đạm trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 0,332mg/l lên 0,578mg/l.

Chủng *Bacillus* có khuẩn lạc màu hơi ngã vàng, vi khuẩn thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que, các tế bào vi khuẩn liên kết với nhau tạo thành chuỗi với mật độ là $2.5.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Pikovskaya và có khả năng phân giải lân, làm tăng lượng lân dễ tiêu trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 12,764mg/l lên 29,310mg/l.

Chủng *Aspergillus* có khuẩn lạc màu xanh lục, bọng có hình gần cầu, tỏa tia cùng với chuỗi bào tử rất dài khi già, bào tử hình cầu và bề mặt nhẵn với mật độ vi sinh vật là 2.10^{6} CFU/ml có khả năng phân giải lân, làm tăng lượng lân dễ tiêu trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 12,768mg/l lên 36,832mg/l.

Chủng *Lactobacillus* có khuẩn lạc màu trắng sữa, vi sinh vật này thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ với mật độ là $3,1.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar và có khả năng phân giải cellulose.

5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:

Từ kết quả này có thể làm tiền đề để nghiên cứu, phát triển và sản xuất chế phẩm sinh học để cung cấp cho cây trồng.

Bổ sung các chủng vi sinh vật phân lập được vào phế phụ phẩm nông nghiệp có thể tái chế chúng làm phân bón hay các chế phẩm sinh học thì người nông dân sẽ thu lại một khoản lợi nhuận không hề nhỏ đồng thời tránh được tình trạng ô nhiễm môi trường.

6. Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài

Ngày tháng năm

Sinh viên chịu trách nhiệm chính

thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài:

Ngày tháng năm

Xác nhận của trường đại học	**Người hướng dẫn**
(ký tên và đóng dấu)	*(ký, họ và tên)*

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Song song với sự phát triển của nền sản xuất công nghiệp, dịch vụ và khoa học kỹ thuật thì nền kinh tế nông nghiệp cũng đang có những bước đột phá mới. Nhu cầu lương thực, thực phẩm của con người tăng lên kéo theo sản xuất nông nghiệp tăng dẫn đến chất thải và rác thải tăng. Theo thống kê của Bộ Tài nguyên và Môi trường (2018), nước ta có tổng diện tích đất nông nghiệp là 27 289 454 km^2, với diện tích này hàng năm sẽ có một lượng lớn phế phụ phẩm nông nghiệp được thải ra. Tuy nhiên, nguồn nguyên liệu này đang bị lãng phí. Lượng chất thải ra này thường bị người nông dân vứt bừa bãi, điều này vừa khiến cho chúng ta lãng phí một loại nguyên liệu có thể giúp tăng năng suất cây trồng vừa gây ra ô nhiễm môi trường. Hiện nay, phần lớn nông dân, doanh nghiệp và hợp tác xã chưa biết tận dụng và ứng dụng các thành tựu khoa học để chế biến phế phụ phẩm nông nghiệp. Đặt ở trường hợp nếu lượng phế thải này được tận dụng và tái chế làm phân bón hay các chế phẩm sinh học thì người nông dân sẽ thu lại một khoản lợi nhuận không hề nhỏ đồng thời tránh được tình trạng ô nhiễm môi trường.

Nói đến hệ vi sinh đất thì từ lâu người ta đã tìm được rất nhiều chủng vi sinh vật có lợi và khả năng ứng dụng của chúng trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong việc giải quyết những vấn đề liên quan đến môi trường. Phân trùn là một trong những loại phân chứa hệ vi sinh vật rất đa dạng. Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện nay vẫn không có nhiều nghiên cứu tập trung vào hệ vi sinh vật có trong phân trùn quế mặc dù khả năng hữu dụng của chúng rất cao. Trước đây, chỉ có một số ít nông dân nuôi trùn quế lấy phân bón cho cây. Về sau này, khi có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng xử lý chất thải hữu cơ của trùn quế thì việc sử dụng trùn quế đã phổ biến hơn nhưng người ta lại bỏ qua việc tận dụng hệ vi sinh vật có trong phân trùn để tạo nên các chế phẩm vi sinh hay phân bón hữu cơ vi sinh mang lại lợi ích cho nền nông nghiệp.

Các nguyên tố như N, P hay các khoáng, mùn đều là những chất dinh dưỡng cần thiết của cây trồng. Tuy nhiên, không phải hợp chất nào cây trồng cũng có thể đồng hóa trực tiếp được. Với một số hợp chất khó tiêu, cần phải nhờ hoạt động của các vi sinh vật phân giải thì cây trồng mới có thể hấp thụ được. Đối với các hợp chất như NO_2 hay N_2 trong khí quyển thì cần phải có sự tác động của các vi sinh vật có khả năng cố định nitơ

thì cây trồng mới có thể đồng hóa được. Và hiện nay, lượng nitơ trong đất mà cây có thể sử dụng được ngày càng giảm dẫn đến năng suất cây trồng giảm. Một trong những nguyên tố thiết yếu đối với cây trồng là phospho. Cây trồng chỉ có thể hấp thụ được lân dễ tiêu, còn đối với lân khó tiêu phải nhờ đến các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải lân chuyển hóa thành lân dễ tiêu, khi đó cây trồng mới có thể sử dụng được.

Hoạt động đào bới của trùn tạo cho đất thoáng, tăng khả năng giữ nước cũng như thấm nước mưa. Nhờ thoáng khí, các vi sinh vật trong đất phát triển mạnh hơn và tạo cho đất có hoạt động sinh học. Tại những vùng có nhiều giun, chúng thải ra hàng trăm tấn phân mỗi năm trong diện tích một mẫu đất mà trong phân của chúng lại chứa hệ vi sinh vật có lợi đa dạng. Nhờ các chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose có trong phân trùn giúp cải tạo đất, chuyển hóa những chất khó tiêu thành chất dễ tiêu đồng thời tăng lượng đạm cho đất.

Với xu hướng nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi để bổ sung vào các phụ phẩm nông nghiệp tạo ra phân bón hữu cơ hay các chế phẩm vi sinh, chúng tôi thực hiện đề tài "***Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế được nuôi trong vỏ cà phê đã qua xử lý***" nhằm mục tiêu tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose có hoạt tính sinh học cao. Từ kết quả này có thể làm tiền đề để nghiên cứu, phát triển và sản xuất chế phẩm sinh học để cung cấp cho cây trồng.

2. Mục tiêu đề tài

Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose trong phân trùn quế nhằm mục đích tăng hiệu quả sử dụng phân bón hóa học, giảm lượng phân bón hóa học trong đất để tăng năng suất cây trồng, cải tạo đất và bảo vệ môi trường.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Vi sinh vật cố định đạm

1.1.1 *Azotobacter*

Năm 1901, *Azotobacter* được phân lập lần đầu tiên, đó là loài *Azotobacter chroococcum.* Từ đó đến nay, người ta tìm hiểu và phát hiện ra nhiều loài khác trong chi *Azotobacter* và đã hiểu biết đầy đủ hơn về hình thái, cũng như đặc tính sinh thái, sinh hóa của chúng.

Azotobacter là vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất, hiếu khí, không sinh bào tử, gram âm. Khi còn non tế bào thường có dạng hình que, kích thước khoảng 2,0 - 7,0 × 10 - 2,5μm, đứng riêng rẽ hay xếp thành từng đôi chồng chất, tế bào nhuộm màu đồng đều, có khả năng di động nhờ tiên mao mọc khắp cơ thể (chu mao). Khi già tế bào *Azotobacter* mất khả năng di động, kích thước thu nhỏ lại trông giống như hình cầu.

Azotobacter có thể sử dụng nhiều loại hợp chất hữu cơ làm nguồn thức ăn carbon. Khi sống trong điều kiện không có nitơ, *Azotobacter* sẽ dùng nitơ của không khí để biến thành nitơ của cơ thể sống. Khi sống trong môi trường đủ thức ăn nitơ hữu cơ hoặc vô cơ thì tác dụng cố định nitơ sẽ rất thấp hoặc không có. Còn khi sống trong môi trường thạch, khuẩn lạc lúc đầu không màu hoặc màu trắng đục, sau biến thành màu nâu tối, thậm chí đến màu đen nhưng không làm nhuộm màu môi trường. Ngoài ra, một số loài *Azotobacter* có khuẩn lạc màu vàng lục, màu hồng. Khuẩn lạc của *Azotobacter* nhầy, lồi hoặc tan, hoặc có dạng nhăn nheo.

Đất là môi trường thuận lợi cho sinh trưởng và phát triển của *Azotobacter*. Trong thành phần sinh vật đất, vi sinh vật chiếm tới 90%. Số lượng vi sinh vật trong mỗi gam đất có tới hàng triệu, hàng tỷ và tới vài chục tỷ tế bào. Vi khuẩn là nhóm chiếm số lượng lớn nhất trong đất (10^6– 10^{10} tế bào/gam đất) nhưng vì kích thước nhỏ (khoảng 1μm) nên chúng chỉ chiếm không quá 20% trọng lượng của vi sinh vật trong đất. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng *Azotobacter* thường xuyên có mặt ở vùng rễ của cây trồng. Tùy thuộc vào loại cây trồng, địa hình và điều kiện sinh thái mà số lượng của chúng thay đổi. Người ta cũng chứng minh được rằng *Azotobacter* không phát triển trên bề mặt rễ mà phát triển trong đất xung quanh rễ. Về khả năng cố định nitơ của *Azotobacter,* trung

bình khi tiêu thụ hết 1g các chất sinh năng lượng, *Azotobacter* có khả năng đồng hóa được khoảng 10 – 15mg nitơ phân tử cung cấp cho cây trồng.

Khả năng cố định của *Azotobacter* phụ thuộc vào từng nòi vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, pH, nhiệt độ nuôi cấy, tính chất của thức ăn carbon, sự có mặt của các nguyên tố vi lượng, các loài vi sinh vật cùng có mặt trong đất,... Khi phát triển với một số vi sinh vật khác, *Azotobacter* có hoạt tính cố định nitơ cao hơn khi cấy chúng riêng rẽ (Lê Xuân Phương 2009).

1.1.2 *Rhizobium*

Năm 1886, Hellriegel và Uynfac đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Các nhà khoa học đã chứng minh được khả năng của cây họ đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần sống ở vùng rễ cây họ đậu và đặt tên cho loài này là *Bacterium radicicola*. Cuối năm 1889, Frank đã phân lập được và đặt tên là *Rhizobium*.

Rhizobium có trong đất, có thể xâm nhiễm vào rễ cây họ đậu tạo thành nốt sần nên còn gọi là vi khuẩn nốt sần. Vi khuẩn *Rhizobium* thuộc loại hiếu khí, là vi khuẩn gram âm có dạng hình que, kích thước 0,5 – 0,9 x 1,2 – 3 μm. Khi được nuôi cấy trong môi trường thạch, khuẩn lạc có màu đục, nhầy, lồi. *Rhizobium* sử dụng nhiều loại đường, một vài axit hữu cơ, thậm chí cả polisaccarit làm nguồn cung cấp năng lượng. Chúng cũng có thể phát triển trong môi trường nghèo đạm, nguồn đạm thường là pepton, axit amin,.. Một số vi khuẩn *Rhizobium* còn có thể tự sản sinh được vitamin và chất kích thích sinh trưởng, một số khác lấy từ môi trường.

Rhizobium khi còn non có khả năng di động nhờ tiên mao, không sinh bào tử, sinh sản bằng cách phân bào. Chúng phát triển tốt ở nhiệt độ 28-30 độ C, pH 6.5-7.0 (Ngô Thế Dân và cs. 2014)

1.1.3 *Beijerinckia*

Beijerinckia được đặt tên theo tên của MW Beijerinck, nhà vi trùng học người Hà Lan (1851-1931). *Beijerinckia* là vi khuẩn dị dưỡng, hiếu khí, gram âm, không sinh bào tử, có hình que hoặc hình cầu, hình bầu dục. Khi được nuôi cấy trên môi trường agar, khuẩn lạc *Beijerinckia* màu nâu vàng hoặc nâu sáng, sắc tố không khuếch tán vào

môi trường, nhẵn, một số tạo thành chất nhờn có tính nhất quán hoặc dạng hạt. Là loài được tìm thấy trong đất, nước, đặc biệt là vùng nhiệt đới và á nhiệt đới. *Beijerinckia* được biết đến với vai trò vi sinh vật cố định đạm không cộng sinh. Vi khuẩn Beijerinckia có khả năng đồng hóa tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tốn 1g đường glucose nó có khả năng cố định được 5 – 10 mg N. Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijerinckia* chịu chua cao hơn nhiều so với *Azotobacter*, có thể phát triển cả trong môi trường có pH = 3, nhưng vẫn phát triển trong môi trường trung tính và kiềm yếu. Nhiệt độ phát triển từ 25-28ºC với độ ẩm 70 – 80% (Anderson 1966).

1.1.4 *Azospirillum*

Azospirillum là vi khuẩn cố định nitơ, gram âm, thuộc họ Spirillaceae. Chi Spirillum được báo cáo đầu tiên bởi Beijerinck (1925) và sau đó được nghiên cứu và phân loại lại thành Azospirillum, vì khả năng cố định nitơ khí quyển, được phát hiện và báo cáo bởi nhóm của Tiến sĩ Johanna Dobereiner ở Brazil, vào những năm 1970 (Tarrand và cs. 1978).

Tế bào *Azospirillum* có dạng hình cầu, hình que hay xoắn từ nửa vòng đến vài vòng, kích thước trung bình 0,9 – 1,2 µm. Khi nuôi cấy trên môi trường thạch khuẩn lạc có màu hồng sáng hoặc hồng đậm, gồ cao, có rìa. Khả năng cố định đạm của *Azospirillum* được biết đến là phổ biến nhất, bên cạnh đó nhiều nghiên cứu còn chỉ ra rằng *Azospirillum* còn có vai trò thúc đẩy tăng trưởng, tổng hợp phytohormones, cải thiện tính chống chịu của thực vật đối với các ức chế sinh học và phi sinh học (Fabricio và cs. 2015)

1.2 Vi sinh vật phân giải lân

1.2.1 Vi khuẩn

1.2.1.1 Bacillus

Theo Garrity (1835) chủng *Bacillus* đầu tiên được phát hiện bởi Christian Erenberg, đó là *Bacillus subtilis*. Ngày nay, nhiều loài trong chủng *Bacillus* được nghiên cứu và ứng dụng trong một số lĩnh vực y tế, nông nghiệp...Ví dụ như trường hợp sử dụng *Bacillus subtilis* để phòng và trị các bệnh về rối loạn đường tiêu hóa, các chứng viêm ruột, viêm đại tràng, tiêu chảy, …. Đa số các loài trong *Bacillus* là vô hại.

Bacillus là chủng vi sinh vật có kích thước 0,5 µm đến 20 µm, trực khuẩn hình que, gram dương, có thể sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí (trong trường hợp không có oxy). Như đã trình bày, *Bacillus* là một chi lớn của vi khuẩn gram dương, với hơn 200 loài, có khả năng sinh nội bào tử để chống chịu các điều kiện bất thường của môi trường sống. Vì vậy trong các hệ sinh thái tự nhiên, *Bacillus* phân bố rộng rãi: từ trên cạn đến dưới nước, từ nước ngọt đến nước mặn. Trong điều kiện sống bất lợi như dinh dưỡng trong môi trường cạn kiệt, môi trường tích lũy các sản phẩm trao đổi chất có hại hoặc nhiệt độ cao chúng sẽ tạo ra bào tử gần giống hình cầu để tồn tại trong một thời gian dài. Khi được nuôi cấy trong môi trường agar, khuẩn lạc nuôi cấy thường lớn, lan rộng và có hình dạng bất thường. Dưới kính hiển vi, các tế bào *Bacillus* xuất hiện dưới dạng hình que và một phần đáng kể của các tế bào thường chứa nội bào tử hình bầu dục ở một đầu, khiến chúng phình ra (Gordon 1973).

1.2.1.2 Pseudomonas

Một số vi sinh vật có khả năng tiết ra các hợp chất có khả năng hòa tan các hợp chất photpho vô cơ khó tan trong đất (lân khó tiêu) thành dạng hòa tan (lân dễ tiêu) cây có thể sử dụng được. Trong đó, *Pseudomonas* là một trong những chủng vi sinh vật được sử dụng phân giải lân phổ biến, gồm: *Pseudomonas sp, Pseudomonas radiobacter, P.gracilis...*(Bergey D.G 1984).

Theo Nguyễn Lân Dũng và cs. (2002) *Pseudomonas* là trực khuẩn gram âm, tế bào hình que, không sinh bào tử. Có một tiên mao (hoặc một chùm tiên mao) ở một đầu giúp chúng di chuyển. Chúng thường sinh ra sắc tố. *Pseudomonas* xuất hiện ở mọi nơi trong môi trường như đất, nước, trên cây và trong cơ thể động vật. Trong nông nghiệp, *Pseudomonas* được sử dụng để ủ phân.

1.2.2 Nấm

1.2.2.1 Aspergillus

Theo Samson (2014), *Aspergillus* là một trong những chủng nấm lớn nhất, chúng có mặt ở khắp nơi trên thế giới, có khoảng 250 loài, trong đó có khoảng 20-30 loài được phát hiện gây bệnh cho người, còn lại hầu hết các loài *Aspergillus* ít gây hại hơn. *Aspergillus* thường được tìm thấy trong đất và các môi trường khác, đặc biệt có nhiều

trên các vật liệu hữu cơ. Hầu hết các loài *Aspergillus* sinh sản vô tính bằng cách hình thành các bào tử vô tính. Một số loài thì sử dụng phương pháp sinh sản hữu tính.

Sợi nấm *Aspergillus* có vách ngăn, cuống bào tử đính dạng bình không phân nhánh. Bào tử có thể màu vàng (*Aspergillus flavus*), màu đen (*Aspergillus niger*) ... Cũng vậy, tùy vào loại mà khuẩn lạc của *Aspergillus* có nhiều màu sắc: mốc vàng, mốc đỏ, mốc hoa cau...

Nhiều loài *Aspergillus* được chứng minh có thể tổng hợp các enzyme như glucose oxidase, lysozyme, amylase, pectinase, protease và lactase, hữu ích trong các ngành công nghiệp sản xuất enzyme cũng như axit hữu cơ ở quy mô thương mại. Bên cạnh đó, một số loài *Aspergillus* được xem như một chất hấp phụ sinh học để khử độc và khử các mẫu nước thải. Không chỉ vậy, mà một số loài *Aspergillus* còn có thể làm tăng chất dinh dưỡng trong đất, vì vậy chúng được ứng dụng trong phân bón sinh học.

1.2.2.2 Penicillium

Theo Kirk và cs. (2008) *Penicillium* là một chi nấm có tầm quan trọng lớn trong môi trường tự nhiên cũng như sản xuất thực phẩm và thuốc. Hiện nay có khoảng hơn 300 loài được phát hiện. Tương tự như *Aspergillus*, *Penicillium* cũng có mặt ở mọi nơi trong môi trường. Hầu hết các loài *Penicillium* có lợi, một số gây bệnh. Một số loài *Penicillium: Penicillium camemberti, Penicillium chrysogenum....* Bên cạnh đó, *Penicillium* cũng là một trong nhóm các loài vi sinh vật có khả năng chuyển hóa hợp chất lân khó tan thành dạng dễ tiêu cho cây trồng sử dụng.

Khi được nuôi cấy trên môi trường thạch, các khuẩn lạc thường phát triển nhanh, có màu xanh lục, đôi khi màu trắng. Khuẩn ty *Penicillium* phân nhánh, có vách ngăn giữa hai tế bào với một lỗ nhỏ để các phần tử trong tế bào chất thông thương; cọng bào tử phân nhánh thể bình cấp 1,2,3,..và tận cùng bằng các đính bào tử trần dễ dàng phát tán trong không khí.

1.3 Vi sinh vật phân giải cellulose

1.3.1 *Lactobacillus*

Theo Makarova và cs. (2006) *Lactobacillus* là vi khuẩn gram dương, thường có dạng hình que, với kích thước khoảng 0,5-1,2 x 1-10 μm. Các tế bào vi khuẩn

Lactobacillus thường hình dạng chuỗi hoặc tồn tại đơn độc. Chúng tồn tại ở nhiều nơi trong tự nhiên, trong đất, nước, không khí, dạ dày, ruột người... Đa số chúng an toàn và có lợi đối với con người.

Nhiệt độ phát triển tối ưu của *Lactobacillus* là 30-40ºC. Nhưng chúng có thể sống và sinh trưởng trong phạm vi nhiệt từ 5-54ºC. Bên cạnh đó, *Lactobacillus* cũng có khả năng chịu đựng được trong môi trường axit.

Trong lĩnh vực y tế, một số loài *Lactobacillus* có khả năng làm giảm bệnh viêm ruột ở người, ngăn chặn rối loạn tiêu hóa... Trong lĩnh vực thực phẩm, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được ứng dụng tạo ra các sản phẩm có lợi cho sức khỏe như sữa chua, các sản phẩm lên men... Còn trong lĩnh vực nông nghiệp, *Lactobacillus* được được sử dụng để ủ phân chuồng và các chất hữu cơ giúp tạo ra phân bón hữu cơ một cách nhanh chóng.

1.3.2 *Sporocytophaga*

Sporocytophaga thuộc nhóm vi khuẩn linh hoạt, gram âm, hiếu khí. Tế bào có dạng thẳng, xoắn ốc hoặc que, có đầu tròn, kích thước 0,3 – 0,5 x 5 – 8 µm. Khi được nuôi cấy trên môi trường thạch, khuẩn lạc có màu vàng. Nhiệt độ tăng trưởng tối ưu của *Sporocytophaga* là 30ºC. Chúng sử dụng cellulose làm nguồn cacbon và năng lượng, là một chủng phân giải cellulose hiệu quả (William B. Whitman và cs. 1989).

1.3.3 *Cytophaga*

Theo Kirchman (2002) *Cytophaga* là vi khuẩn gram âm, dị dưỡng, hình que, không bào tử và chúng có thể chuyển động trượt để di chuyển nhanh trên các bề mặt. Vi khuẩn này thường được tìm thấy trong môi trường đất, biển, nước ngọt. Hầu hết *Cytophaga* sống tự do, một số ít thì gây bệnh cho động vật xương sống. Chúng sử dụng cellulose và phân giải cellulose hiệu quả. Khi ở môi trường nuôi cấy, vi khuẩn *Cytophaga* có dạng hình que, sau đó biến đổi thành dạng hình cầu và có nhiều màu sắc. Một số loài trong *Cytophaga* như *Cytophaga hutchinsonii, Cytophaga psychrophila*… Trong đó, *Cytophaga hutchinsonii* được biết đến là loài có khả năng phân giải cellulose.

1.3.4 *Cellvibrio*

Theo Blackall (1986) vi khuẩn *Cellvibrio* thường là gram âm và hiếu khí, những vi khuẩn này được biết đến có khả năng phân giải cellulose, xylan, tinh bột và chitin.

Một số loài *Cellvibrio* như: *Cellvibrio diazotrophicus, Cellvibrio Fibrivorans, Cellvibrio fulvus, Cellvibrio Gandavensis, Cellvibrio japonicus, Cellvibrio mixtus…* Trong đó phải kể đến *Cellvibrio japonicus*, chúng có khả năng tiết ra enzyme phân hủy thành tế bào thực vật mạnh. Vi khuẩn *Cellvibrio japonicus* lần đầu tiên được phân lập tại Nhật Bản vào năm 1952.

1.3.5 *Sorangium*

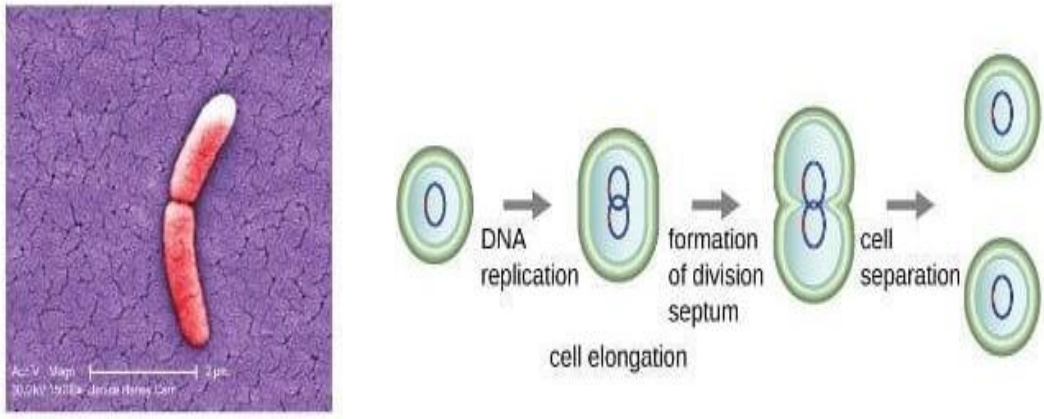
Sorangium là một vi khuẩn gram âm của nhóm myxobacteria. Tế bào hình que, hai đầu tròn hoặc thuôn nhọn, không có tiên mao. Chúng có nhân dạng hạt, có khả năng hình thành bào tử nhưng bào nang không định hình. Bào nang do nhiều tế bào kết hợp với nhau tạo thành khối nhầy không định hình. *Sorangium* có khả năng phân giải cellulose.

1.3.6 Xạ khuẩn

Theo Jeffrey (2008) xạ khuẩn (*Actinomyces*) là vi khuẩn Gram dương, có dạng sợi như nấm. Chúng là vi sinh vật hiếu khí có mặt khắp nơi trong tự nhiên. Xạ khuẩn còn được biết đến nhiều bởi các sản phẩm chuyển hóa, nổi bật là các loại kháng sinh như streptomycin, gentamicin, rifampicin và erythromycin. Ngoài ra, xạ khuẩn còn có vai trò quan trọng trong công nghiệp dược phẩm cũng như trong nông nghiệp. Streptomyces là giống chủ đạo trong xạ khuẩn, đây cũng là vi sinh vật sản sinh cellulase có khả năng phân giải cellulose được quan tâm nghiên cứu. Một số loài đáng chú ý thuộc giống này như *Streptomyces reticuli, Streptomyces drozdowiczii, Streptomyces lividans*…

1.4 Sinh trưởng và phát triển vi sinh vật

Cơ chế phổ biến của sự nhân lên của tế bào vi sinh vật là quá trình phân chia nhị phân. Trước khi phân chia, tế bào phát triển và tăng số lượng thành phần tế bào, chuẩn bị cho quá trình phân chia.



Hình 1.1 Cơ chế nhân đôi của tế bào vi sinh vật (OpenStax, 2019)

Quá trình sao chép DNA bắt đầu từ vị trí nhiễm sắc thể tròn, nhiễm sắc thể được gắn vào màng tế bào bên trong. Sau đó, quá trình sao chép tiếp tục diễn ra theo hướng ngược lại cho đến điểm cuối, 2 tế bào con được hình thành hoàn chỉnh. Quá trình phân chia trên được điều khiển bởi 1 protein FtsZ (OpenStax, 2019).

Trong tự nhiên, vi sinh vật không trải qua điều kiện môi trường hoàn hảo để phát triển. Tuy nhiên, trong phòng thí nghiệm, các điều kiện tối ưu này có thể được đáp ứng bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy không liên tục. Khi các vi sinh vật được nuôi cấy trong điều kiện môi trường không liên tục tức là sẽ không có chất dinh dưỡng nào được bổ sung từ ngoài vào cũng như không được lấy đi các sản phẩm trao đổi chất từ trong môi trường ra thì sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật sẽ tuân theo mô hình đường cong tăng trưởng. Đường cong trong mô hình tăng trưởng biểu thị mật độ vi sinh vật trong quần thể ở một khoảng thời gian.



Hình 1.2 Đường cong tăng trưởng của quần thể vi sinh vật trong nuôi cấy không liên tục (Prescott và cs. 2002)

Trong môi trường nuôi cấy không liên tục này, sự sinh trưởng của vi sinh vật trong nuôi cấy không liên tục bao gồm 4 pha cơ bản: pha tiềm phát (pha Lag), pha lũy thừa (pha Log), pha cân bằng và pha suy vong (Prescott và cs. 2002).

Pha tiềm phát (pha Lag): Tính từ khi vi sinh vật được cấy vào môi trường cho đến khi chúng bắt đầu sinh trưởng. Số lượng vi sinh vật trong pha này không tăng lên. Đây là giai đoạn thích nghi, chúng tiến hành tổng hợp mạch DNA và các enzyme chuẩn bị cho sự phân bào. Pha tiềm phát dài hay ngắn phụ thuộc vào bản thân từng loại vi sinh vật và tính chất của môi trường. Trong pha này, tế bào chưa phân chia mà tập trung phát triển và tích lũy thành phần tế bào để chuẩn bị cho quá trình phân chia sau đó.

Pha lũy thừa (pha Log): Sau pha Lag, tế bào vi sinh vật bước vào pha Log. Trong pha này, vi sinh vật phân chia mạnh mẽ, số lượng tế bào tăng theo lũy thừa và đạt đến cực đại. Thời gian thế hệ đạt tới hằng số, quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh mẽ nhất khi DNA, RNA, các thành phần hình thành tế bào và các chất cần thiết cho sự tăng trưởng được tạo ra để phân chia.

Pha cân bằng: Tốc độ sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật giảm dần. Do chất dinh dưỡng bắt đầu cạn kiệt, chất độc hại tăng trong môi trường nuôi cấy. Trong điều kiện ít thuận lợi hơn, sự cạnh tranh về chất dinh dưỡng tăng lên và các hoạt động trao đổi chất của tế bào cũng trở nên kém đi. Sự phát triển của tế bào vi sinh vật đạt đến cực đại và không có sự thay đổi theo thời gian do số lượng tế bào phân chia bằng số lượng tế bào chết.

Pha suy vong: Ở pha này, các chất dinh dưỡng cạn kiệt, các chất thải tăng lên. Số lượng tế bào trong quần thể giảm theo cấp số nhân và tăng trưởng. Các tế bào chết phân hủy trở thành các chất dinh dưỡng cho các tế bào vi sinh vật sống khác. Điều này giúp cho các tế bào vi khuẩn khác hoạt động được trong điều kiện môi trường cạn kiệt dinh dưỡng của giai đoạn suy vong và phát triển khi được cấy sang môi trường mới.

1.5 Trùn quế, vai trò của phân trùn

1.5.1 Trùn quế

Trùn quế có tên khoa học là *Perionyx excavatus*, chi Pheretima, họ Megascocidae (họ cự dẫn), ngành ruột khoang. Là loài trùn thường được tìm thấy ở vùng nhiệt đới Châu Á, thích sống ở môi trường đất ẩm ướt và có nhiều chất hữu cơ đang phân hủy. Chúng có kích thước tương đối nhỏ, thân hơi dẹt và dài khoảng 10-15cm, màu đỏ hoặc mận chín tùy độ tuổi.

Trùn quế thuộc nhóm trùn đào đất, chúng ăn chất hữu cơ và khoáng chất trong đất, nuốt thức ăn bằng môi ở lỗ miệng, lượng thức ăn mỗi ngày tương đương với trọng lượng cơ thể của chúng, sau đó thải phân trên khắp đường chúng đi. Điều đặc biệt là trong hệ tiêu hóa của chúng có chứa nhiều vi sinh vật cộng sinh có ích. Những vi sinh vật này theo phân ra khỏi cơ thể trùn quế nhưng vẫn hoạt động trong một thời gian dài. Điều này là nguyên nhân làm cho phân trùn có hàm lượng dinh dưỡng cao. Vì thế chúng rất có ích cho việc cải tạo đất (Edwards và cs. 1997).

Trùn quế có sức tiêu hóa lớn, theo nhiều nghiên cứu, tác dụng phân giải chất hữu cơ của trùn quế chỉ đứng sau vi sinh vật. Một tấn trùn quế có thể tiêu hóa 50 tấn phân gia súc trong 3 tháng. Vì vậy, nó được nhiều nước trên thế giới sử dụng để xử lý chất thải, làm sạch môi trường. Cũng nhờ trùn quế sau khi tiêu hóa thải phân, góp phần làm

tăng độ phì nhiêu cho đất. Từ đó cây trồng hấp thụ, sinh trưởng và phát triển tốt hơn, cũng giảm bớt được việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, bảo vệ môi trường.

Ngoài ra, protein chiếm 70% trọng lượng khô của trùn quế, hàm lượng đạm cũng như các axit amin, vitamin cần thiết cho gia súc, gia cầm và thủy sản. Nên hiện nay, bột trùn quế đang được đưa vào trộn với thức ăn chăn nuôi, được xem là một trong những phương án hàng đầu cung cấp protein chất lượng mà giá thành rẻ cho vật nuôi.

1.5.2 Phân trùn

Phân trùn là sản phẩm cuối cùng của quá trình phân giải chất hữu cơ của trùn. Chứa 100% phân trùn nguyên chất, trong phân còn có một số vi sinh vật có ích như vi khuẩn cố định đạm, vi khuẩn phân giải lân, phân giải cellulose và cả các chất xúc tác sinh học. Phân trùn dạng đất mùn, có màu nâu sẫm, chứa các chất khoáng cần thiết cho cây trồng như đạm, lân, kali, canxi, đồng, kẽm... ở dạng cây hấp thụ được ngay. Đồng thời làm đất tơi xốp, tăng khả năng giữ nước của đất và giữ ẩm lâu (Lê Minh Vương 2018).

Với những lợi ích của trùn quế mang lại, ngày nay trùn quế được nuôi với nhiều mục đích khác nhau như giúp phân giải rác thải hữu cơ, giúp đất tơi xốp, thoáng khí đồng thời người ta sử dụng phân trùn làm phân bón, một mặt để hạn chế sử dụng phân hóa học, giảm lượng tồn dư phân bón trong đất, giúp cây cho năng suất tốt hơn, mặt khác phân trùn cải tạo đất, bảo vệ môi trường.

1.6 Vai trò của vi sinh vật trong đất

Môi trường thích hợp nhất đối với vi sinh vật chính là đất. Hệ vi sinh vật trong đất rất đa dạng và phong phú, chúng được chia thành 5 nhóm chính là vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, tảo và nguyên sinh động vật. Tuy nhiên số lượng cũng như sự phong phú của các nhóm vi sinh vật này ở mỗi loại đất là khác nhau bởi chúng phụ thuộc vào độ ẩm, pH của đất, độ tơi xốp, thoáng khí, các chất dinh dưỡng trong đất và các loại dư lượng được thêm vào đất. Điều này cũng phần nào ảnh hưởng đến sự phân bố vi sinh vật ở các tầng đất khác nhau.

Bảng 1.1 Sự phân bố của vi sinh vật trong 1g đất khô theo chiều sâu của đất

CHIỀU SÂU ĐẤT (cm)	VI KHUẨN (CFU/g)	XẠ KHUẨN (CFU/g)	NẤM MỐC (CFU/g)	RONG TẢO (CFU/g)
3 - 8	9.750.000	2.080.000	119.000	25.000
20 - 25	2.179.000	245.000	50.000	5.000
35 - 40	570.000	49.000	14.000	500
65 - 75	11.000	5.000	6.000	100
135- 145	1.400	-	3.000	-

(*Nguồn: Araragi và cs. 1971*)

Theo số liệu thống kê ở bảng 1, cho thấy vi khuẩn là nhóm chiếm nhiều nhất về số lượng. Trung bình trong đất vi khuẩn chiếm khoảng 90 % tổng số, xạ khuẩn chiếm khoảng 8%, vi nấm 1% và 1% còn lại là tảo và nguyên sinh động vật.

Sự phát triển của vi sinh vật chính là nhân tố làm cho đất thêm phì nhiêu, màu mỡ. Để giúp cho cây nhận thêm đạm, các vi sinh vật cố định nitơ từ không khí (N_2) thành các hợp chất (NH_3, NH_4^+) cung cấp cho cây. Hàng năm số lượng nitơ cây trồng thu được bằng con đường này nhiều gấp 3 lần so với việc sử dụng phân bón hóa học (Nguyễn Lân Dũng, 2002). Một số nhóm vi sinh vật khác có khả năng tiết ra các hợp chất có thể hòa tan được những hợp chất phospho vô cơ khó tan trong đất (lân khó tiêu) thành dạng hòa tan (lân dễ tiêu) mà cả cây trồng và vi sinh vật đều có thể sử dụng được. Khi đưa vào đất những chất như cellulose và protein thì kết cấu của đất được cải thiện rõ rệt là nhờ vi sinh vật phân giải cellulose và protein phát triển mạnh mẽ, các sản phẩm phân giải được kết hợp cùng với các chất tiết ra trong quá trình sống của chúng đã liên kết các hạt đất với nhau tạo nên cấu trúc đất. Ngoài ra, các vi sinh vật sống trong đất tham gia tích cực vào quá trình phân giải chất hữu cơ biến chúng thành CO_2 và các chất vô cơ dùng làm thức ăn cho cây trồng (P, C, S, Ca…). Không những vậy, một số vi sinh vật thuộc *Pseudomonas* và *Azospirillum* còn có khả năng tiết ra Indole Acetic Acid

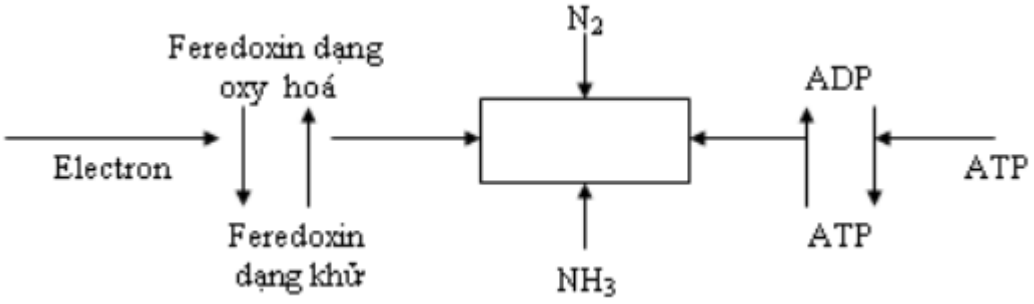
(IAA), là chất kích thích cho sự ra rễ của cây trồng (Chu Nguyên Thanh và cs. 2018; Trần Văn Chiêu và cs. 2010).

Tuy nhiên không phải vi sinh vật nào cũng có lợi đối với cây trồng, mà còn có những loài vi sinh vật gây bệnh cho cây, làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng nông sản.

1.6.1 Cố định nitơ không khí nhờ vi sinh vật

Vi khuẩn *Azotobacter* là vi khuẩn có khả năng cố định nitơ theo kiểu không cộng sinh. Đây là chủng được quan tâm cũng như ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất phân bón sinh học chứa vi sinh vật cố định nitơ.

Các vi khuẩn có khả năng cố định đạm sẽ tiết ra một loại enzyme tên là nitrogenase. Enzyme này bao gồm 2 thành phần khác nhau là thành phần I và thành phần II. Thành phần I là protein Fe và thành phần II là protein FeMo. Nitrogenase sẽ phá đứt mối liên kết 3 của phân tử nitơ (N≡N) theo cơ chế sau (Seefeldt và cs. 2009):



Hình 1.3 Quá trình cố định nitơ phân tử

Electron của các chất khử sẽ đi vào thành phần I (protein Fe) sau đó di chuyển sang thành phần II (protein FeMo) khi hai thành phần này liên kết với nhau, từ đây electron được hoạt hóa có thể phản ứng với N_2. Tương tự, N_2 cũng được hoạt hóa khi đi qua hai thành phần của enzyme nitrogenase. Còn hydro được hoạt hóa bởi các enzyme của hệ thống hydrogenase. ATP là năng lượng dùng trong quá trình này. Cuối cùng NH_3 được hình thành.

Quá trình cố định nitơ phân tử thực chất là quá trình khử N_2 thành NH_3 nhờ enzyme nitrogenase và năng lượng sinh học ATP.

1.6.2 Chuyển hóa lân khó tiêu thành lân dễ tiêu nhờ vi sinh vật

Phân giải lân hữu cơ khó tan

Nguồn gốc phân hữu cơ khó tan trong đất là xác động vật, thực vật, phân xanh, phân chuồng,...Thực chất cơ chế phân giải lân khó tan là các vi sinh vật có khả năng tiết enzyme phosphatase, xúc tác cho quá trình phân giải lân. Những vi sinh vật phân giải lân hữu cơ chủ yếu thuộc 2 chi: *Bacillus* và *Pseudomonas.* Các loài có khả năng phân giải mạnh là *B. megatherium, B. mycoides* và *Pseudomonas* sp.

Sự chuyển hoá các hợp chất phospho hữu cơ thành H_3PO_4 được thực hiện như sau:

Nucleoprotein → Nuclein → axit nucleic → H_3PO_4

Nucleoprotein có trong thành phần của nhân tế bào, nhờ sự tác động của vi sinh vật chúng tách ra làm 2 phần: protein và nuclein. Nuclein sẽ đi vào vòng chuyển hóa các hợp chất lân, cuối cùng tạo ra H_3PO_4.

Phân giải lân vô cơ khó tan

Lân vô cơ khó tan có nguồn gốc từ các quặng thiên nhiên như apatit, phosphorit... hoặc là được tạo ra do quá trình khoáng hóa lân hữu cơ. H_3PO_4 sau khi được vi sinh vật phân giải từ nucleoprotein thường kết hợp với kim loại trong đất tạo thành các muối phosphate khó tan như $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$,... Ở các dạng này cây không thể sử dụng trực tiếp. Theo nghiên cứu, đa số các vi sinh vật có khả năng phân giải lân vô cơ đều sinh CO_2 trong quá trình sống, CO_2 sẽ phản ứng với H_2O có trong môi trường tạo thành H_2CO_3. H_2CO_3 sẽ phản ứng với phosphate khó tan tạo thành phosphate dễ tan theo phương trình sau:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4H_2CO_3 + H_2O > Ca(H_2PO_4)_2 + H_2O + 2\ Ca(HCO_3)_2$$

Một số vi sinh vật có khả năng phân giải lân vô cơ: *Bacillus megaterium, B. butyricus, B. mycoides, Pseudomonas radiobacter...*

1.6.3 Phân giải cellulose trong đất nhờ vi sinh vật

Cellulose là hợp chất khá bền vững nên cơ chế phân giải cũng rất phức tạp. Tuy vậy, vẫn có nhiều loài vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose đã được biết tới như vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm... chúng có khả năng tiết ra enzyme cellulase. Vì vậy, phân giải cellulose cơ bản là quá trình sinh học được tạo ra và kiểm soát bởi của enzyme cellulase. Enzyme cellulase gồm 3 lớp enzyme: endoglucanase, exoglucanase, β-glucosidase. Endoglucanase sẽ cắt các cầu nối β-1,4-glycosid, sau đó exoglucanase phân tách các sợi cơ bản của tinh thể tạo thành cellobiose, cuối cùng β-glucosidase thủy phân cellulose thành glucose (Shewale 1982).

1.7 Tổng quan tình hình nghiên cứu của đề tài

1.7.1 Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu và ứng dụng phân trùn quế trong việc cải tạo môi trường đất còn khá ít, hầu như chỉ mới chú trọng vào khoảng 10 năm trở lại đây. Trước đây chủ yếu nghiên cứu ứng dụng của phân trùn quế làm thức ăn cho chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản và xử lý chất thải như theo Trần Hoàng Dũng (2001), sử dụng trùn quế (*Perionyx excavatus*) để xử lý mạt cưa thải sau trồng nấm, nên các nghiên cứu về vi sinh vật có tác dụng cải tạo đất đang được chú trọng nhiều hơn. Một số nghiên cứu có liên quan như:

Theo Nguyễn Thị Ngọc Dinh (2014), phân trùn quế ảnh hưởng đến năng suất của giống lúa ĐTL2 trong vụ xuân sản xuất theo hướng hữu cơ và cũng cho thấy phân trùn quế làm tăng các chỉ tiêu sinh lý như diện tích lá, khả năng tích lũy chất khô làm tăng năng suất lúa ĐTL2. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác đã cho thấy xạ khuẩn, nấm, vi khuẩn, còn ảnh hưởng đến việc phòng trừ bệnh như xạ khuẩn *Streptomyces toxytricini* có tiềm năng trong xử lý bệnh bạc lá lúa (Nguyễn Đình Hải 2012). Theo Chu Nguyên Thanh (2018), *Pseudomonas* phân lập từ vùng rễ cây bắp có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật. Trần Thị Xuân Phương (2017) cũng cho rằng vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định đạm và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Bên cạnh đó, nghiên cứu hoạt tính sinh học của *Bacillus* và *Pseudomonas* cũng cho thấy hiệu quả phòng trừ lân khó tan trong đất cũng khá cao (Nguyễn Thị Ngọc Sương 2016).

Nhìn chung các nghiên cứu về phân trùn quế ở Việt Nam trong việc cải tạo đất còn khá ít, việc nghiên cứu các chủng vi sinh vật cải tạo đất thường tập trung vào việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose, kích thích sinh trưởng có trong môi trường đất. Tuy nhiên, việc nghiên cứu các chủng vi sinh vật có ích trong phân trùn quế nhằm cải tạo môi trường đất là một hướng đi mới trong việc ứng dụng chế phẩm sinh học thay thế các sản phẩm hóa học, tạo điều kiện hướng tới nền nông nghiệp bền vững.

1.7.2 Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Ở nước ngoài, hầu hết các nước đều tập trung nghiên cứu về khả năng xử lý chất thải của trùn quế. Vào năm 1978, tại New York có tổ chức một hội nghị sử dụng trùn quế trong quản lý chất thải và môi trường mang tên là "*Tận dụng hệ VSV đất trong quản lý nước thải*" (Hartenstein và cs. 1979). Để cải thiện đất ở các đồng cỏ, một số nước như Đức, NewZealand đã phải nhập trùn từ Châu Âu về. Đối với các nước như Mỹ và Ấn Độ thì tiến hành nuôi trùn để xử lý các chất thải nhằm bảo vệ môi trường. Ví dụ điển hình là trại nuôi trùn quế của Công ty Oregon Soil ở tiểu bang Oregon của Mỹ với hơn 1 triệu con có khả năng mỗi ngày xử lý được 7,5 tấn rác thải. Tương tự, ở Ấn Độ sử dụng 500 triệu con trùn quế để xử lý 2000 tấn rác mỗi ngày, đồng thời cơ sở này cũng sử dụng trùn quế để xử lý phân người. Đây là trang trại thuộc dự án phát triển của chính phủ. Tại một số nước như Anh, Pháp, Hà Lan, Đức, Tây Ban Nha, Italia, Australia, Bỉ… việc sử dụng trùn quế để xử lý chất thải cũng rất phát triển. Tại trạm thực nghiệm Rothamsted, Harpenden, Anh mới đầu cũng chỉ tập trung vào nghiên cứu sử dụng trùn để xử lý các chất thải gia súc và cây trồng (Edwards 1988) nhưng tới thời điểm hiện nay thì đã có sự thay đổi, họ đã mở rộng mô hình nuôi trùn để xử lý các loại rác hữu cơ khác. Ngoài ra ở Hòa Kỳ, tại trường Đại học tiểu bang NY có nghiên cứu về trùn xử lý chất thải. Ban đầu nghiên cứu chỉ tập trung vào việc tận dụng bùn cống thải và phần chất khô của nó để sản xuất ra phân trùn (Neuhauser và cs. 1988), tuy nhiên sau đó đã được mở rộng hơn thành sản xuất vermicompost từ những thứ như thức ăn, giấy, bã bia và chất thải động vật.

Vì sự quan trọng của các chủng vi sinh vật nên đã có bảo tàng chủng vi sinh vật sử dụng cho nông nghiệp để tàng trữ các loài vi sinh hữu ích này. Trên thế giới có thể kể đến Bộ

thu thập vi sinh vật nông nghiệp Trung Quốc, Bộ thu thập Rhizobium tại Úc, Colombia, Malaysia, Thái Lan, Anh, Bộ thu thập vi sinh vật môi trường tại Hàn Quốc, Bộ thu thập Cyanobacteria tại Braxin, Bộ thu thập vi sinh vật nông nghiệp Hàn Quốc, Bộ thu thập vi sinh vật môi trường tại Hàn Quốc, Bộ thu thập vi sinh vật nông nghiệp tại Nga, nguồn gen vi sinh vật tại Mỹ (NRRL)… (*Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam* 2013).

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose trong phân trùn quế.

2.2 Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu bao gồm phân trùn quế, hóa chất và một số dụng cụ và thiết bị hỗ trợ trong phòng thí nghiệm.

Hóa chất: Peptone, Mannitol, K_2HPO_4, KNO_3, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.6H_2O$, NaCl, $FeCl_3.6H_2O$, asparagine, $CaCO_3$, glucoza, $Ca_3(PO_4)_2$, $(NH_4)_2SO_4$, KCl, cao nấm men, $MnSO_4$, $FeSO_4.7H_2O$, KH_2PO_4, $NaNO_3$, khoai tây, agar, bộ test nitrate, bộ test phosphate.

Thuốc nhuộm: Methylene Blue, tím Gentian, Lugol, Fuchsine.

Thiết bị hỗ trợ: Cân phân tích Adventurer, máy đo pH, box cấy, tủ sấy, tủ ấm, máy đếm khuẩn lạc, kính hiển vi, máy đo quang phổ.

Dụng cụ: Bình tam giác, ống nghiệm, đĩa petri, lamen, lam kính, pipet, quả bóp, ống đong, que cấy, que gạt, đèn cồn.

Một số vật liệu khác: Nước cất, cồn 96^o, giấy lọc, phân lân.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Thu thập mẫu phân trùn quế

Sử dụng mẫu phân trùn tại bể nuôi trùn quế của khoa Nông Lâm - Trường Đại học Đà Lạt. Tiến hành lấy mẫu phân trùn như sau: Lấy mẫu tại 6 điểm bao gồm 2 điểm ở tầng mặt, 2 điểm ở tầng giữa và 2 điểm ở tầng đáy trong bể nuôi trùn trộn lại sao cho đủ 1kg.

2.3.2 Phương pháp pha loãng dung dịch để nuôi cấy

Cân 10g phân trùn quế pha loãng với 90ml nước cất vô trùng trong bình tam giác 300ml đã tiệt trùng. Lắc đều dung dịch trong 10 phút sau đó để lắng 1 phút. Sau đó cấy chuyển tiếp vào tam giác thứ 2 bằng cách dùng pipet lấy 1ml dung dịch mẫu từ bình thứ nhất, cho vào bình tam giác thứ 2 rồi thêm 9ml nước cất. Rồi từ bình thứ 2 cấy chuyền

sang bình tam giác thứ 3, từ bình tam giác thứ 3 sang bình tam giác thứ 4… Mỗi lần cấy tiến hành lắc đều dung dịch. Cần cấy các tỷ lệ pha loãng như sau: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}.

2.3.3 Phân lập các chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế

Trước khi sử dụng cần hấp khử trùng đầu tuýp micropipette trong vòng 30 phút.

Sử dụng micropipet lấy ra 0,1ml dung dịch lần lượt từ các bình pha loãng thứ 8 (10^{-8}), bình thứ 9 (10^{-9}) và bình thứ 10 (10^{-10}) cấy vào các đĩa petri có chứa môi trường Asparagine – Mannitol – agar ở mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần.

Sử dụng micropipette lấy ra 0,1ml dung dịch từ các bình pha loãng thứ 3 (10^{-3}), bình thứ 4 (10^{-4}) và bình thứ 5 (10^{-5}) lần lượt cấy vào đĩa petri có chứa môi trường PDA, ở mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần.

Nuôi cấy vi sinh vật trong tủ ấm ở 25^{o}C.

2.3.4 Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế

2.3.4.1 Cấy chuyền từ các đĩa phân lập

Sau khi đã xác định được các chủng vi sinh vật cần tìm thì sẽ tiến hành cấy chuyền vi sinh vật từ các đĩa phân lập.

Chuẩn bị môi trường tăng sinh cho vi sinh vật là môi trường tổng hợp có chứa các yếu tố chọn lọc cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật đó. Môi trường được sử dụng ở đây bao gồm:

Vi sinh vật cố định đạm sử dụng môi trường Beijerinsk.

Vi sinh vật phân giải cellulose sử dụng môi trường Asparagine – Mannitol – agar.

Vi sinh vật phân giải lân sử dụng môi trường Pikovskaya.

Nấm sử dụng môi trường PDA.

2.3.4.2 Nhân nuôi và làm thuần mẫu vi sinh vật

Sử dụng que cấy đầu tròn lấy mẫu từ đĩa phân lập cấy vào đĩa môi trường phù hợp với chủng vi sinh vật đó. Đối với cấy vi khuẩn thì nhẹ nhàng và nhanh chóng lướt que cấy lên mặt thạch theo một trong các kiểu sau: Theo hình chữ chi trên toàn bộ mặt

thạch, theo những đường song song, theo 4 hình chữ chi 4 góc. Còn đối với nấm sẽ chạm nhẹ que cấy có chứa mẫu vào giữa đĩa môi trường. Môi trường được sử dụng ở đây bao gồm:

Vi sinh vật cố định đạm - Chủng *Azotobacter* sử dụng môi trường Beijerinsk.

Vi sinh vật phân giải lân - Chủng *Bacillus* sử dụng môi trường Pikovskaya.

Nấm - Chủng *Aspergillus* sử dụng môi trường PDA.

Vi sinh vật phân giải cellulose - Chủng *Lactobacillus* sử dụng môi trường Asparagine – Mannitol – agar.

Quan sát sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy qua các thời gian nuôi cấy: 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ.

Quan sát sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm trên môi trường nuôi cấy qua các thời gian nuôi cấy: 1 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày.

2.3.5 Thử nghiệm in vitro

Tiến hành nhân sinh khối các chủng vi sinh vật đã phân lập được trong môi trường lỏng Getchinson. Mỗi chủng vi sinh vật là một nghiệm thức với 5 lần lặp. Sau 5 ngày nuôi cấy sẽ khảo nghiệm hiệu quả chức năng của từng chủng vi sinh vật bằng cách:

Đối với vi sinh vật cố định đạm - Chủng *Azotobacter*: Quan sát sự thay đổi màu sắc của môi trường Getchinson. Sau 10 ngày tiến hành phân tích nồng độ NO_3^- có trong dung dịch bằng phương pháp trắc quang so màu. Tiến hành đồng thời với đối chứng.

Đối với vi sinh vật phân giải lân - Chủng *Bacillus* và chủng *Aspergillus*: Cho 0,01g phân lân vào ống nghiệm chứa môi trường nuôi cấy Getchinson có bổ sung vi sinh vật, sau 10 ngày tiến hành phân tích P hòa tan trong môi trường nuôi cấy (tiến hành đồng thời với đối chứng).

Đối với vi sinh vật phân giải cellulose - Chủng *Lactobacillus*: Cho một miếng nhỏ giấy lọc (1cm*1cm) vào ống nghiệm nghiệm chứa môi trường nuôi cấy Getchinson có bổ sung vi sinh vật (tiến hành đồng thời với đối chứng). Quan sát tác động của các vi sinh vật lên giấy lọc để đánh giá khả năng phân giải của vi sinh vật.

Đối chứng sử dụng môi trường nuôi cấy Getchinson không bổ sung vi sinh vật.

2.3.6 Phương pháp đánh giá khả năng cố định đạm của chủng vi sinh vật được phân lập (Phương pháp cải biên Đoàn Văn Cung và cs, 1998)

Xây dựng thang tiêu chuẩn.

Chuẩn bị các cốc đong 50ml lần lượt cho vào cốc đong số ml dung dịch tiêu chuẩn 10ppm N theo bảng 2 và sau đó thêm nước cất cho đủ 10ml dung dịch.

Bảng 2.1 Xây dựng thang chuẩn N

Số thứ tự (10ml)	0	1	2	3	4	5	6
Số ml dung dịch N tiêu chuẩn 10ppm N	0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Nồng độ (ppm)	0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05

Dùng pipet lấy 10ml các dung dịch dãy tiêu chuẩn.

Dùng pipet lấy 2ml mẫu trắng và mẫu cần xác định vào lần lượt các cốc đong 50ml và thêm vào mỗi cốc 8ml nước cất.

Sử dụng bộ test nitơ để tạo màu cho các dung dịch: Nhỏ 6 giọt thuốc thử số 1 vào cốc đong chứa dung dịch, lắc tròn. Tiếp theo nhỏ 6 giọt thuốc thử số 2 vào cốc đong, lắc tròn. Cho một muỗng lường thuốc thử số 3. Đậy nắp và lắc tròn trong vòng 15 giây. Cuối cùng cho 6 giọt thuốc thử số 4 vào lọ và lắc đều dung dịch. Đợi 5 phút rồi tiến hành đo màu.

Đo màu mẫu trắng và các mẫu cần xác định trên Spectrophotometer tại bước sóng 625nm.

Tính kết quả

Dựng đường chuẩn nitrat với nồng độ ppm N trong các bình tiêu chuẩn. Dựa vào số đo trên máy và số lần pha loãng của dung dịch mẫu suy ra nồng độ ppm N trong dung dịch mẫu.

2.3.7 Phương pháp đánh giá khả năng phân giải lân (P) khó tan của chủng vi sinh vật được phân lập (Phương pháp cải biên Đoàn Văn Cung và cs, 1998)

Xây dựng thang tiêu chuẩn.

Chuẩn bị các bình định mức 50ml lần lượt cho vào bình định mức số ml dung dịch tiêu chuẩn 50ppm P như sau: 0ml; 1,1ml; 1,2ml; 1,3ml; 1,4ml; 1,5ml; 1,6ml; 2,1ml; 2,2ml; 2,3ml; 2,4ml; 2,5ml; 2,6ml; 3,1ml; 3,2ml; 3,3ml; 3,4ml; 3,5ml; 3,6ml và sau đó thêm nước cất cho đến vạch định mức

Dùng pipet lấy 10ml các dung dịch dãy tiêu chuẩn.

Dùng pipet lấy 2ml mẫu trắng và mẫu cần xác định vào lần lượt các cốc đong 50ml và thêm vào mỗi cốc 8ml nước cất.

Sử dụng bộ test Phosphate để tạo màu cho các dung dịch: Nhỏ 6 giọt thuốc thử số 1 vào cốc đong chứa dung dịch, lắc tròn. Tiếp theo nhỏ 6 giọt thuốc thử số 2 vào cốc đong, lắc tròn. Cuối cùng thêm một muỗng lường thuốc thử số 3. Đậy nắp và lắc tròn. Sau đó mở nắp ra để yên 5 phút rồi tiến hành đo màu.

Đo màu mẫu trắng và các mẫu cần xác định trên Spectrophotometer tại bước sóng 780nm.

Tính kết quả

Dựng đường chuẩn Phosphate với nồng độ ppm P trong các bình tiêu chuẩn. Dựa vào số đo trên máy và số lần pha loãng của dung dịch mẫu suy ra nồng độ ppm P trong dung dịch mẫu.

2.3.8 Phương pháp đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng vi sinh vật được phân lập

Quan sát sự phân hủy của mẫu thử (giấy lọc) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy có chứa vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose qua các mốc thời gian: 1 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 15 ngày và 20 ngày.

2.3.9 Quan sát vi sinh vật

Sau 72 giờ nuôi cấy, tiến hành làm tiêu bản, sau đó nhuộm màu tiêu bản để quan sát hình thái của vi sinh vật dưới kính hiển vi.

Cách làm tiêu bản được tiến hành như sau: Chọn lam kính không bị xước, sử dụng cồn 70^{o} vệ sinh lam kính và hơ lam kính qua ngọn lửa đèn cồn trước khi sử dụng để tránh bị lẫn các vi sinh vật khác. Nhỏ một giọt nước cất lên lam kính. Lấy mẫu vi sinh vật và dàn đều mẫu trong giọt nước trên lam kính. Tiếp đó cố định tiêu bản bằng cách hơ trên ngọn lửa đèn cồn và tiến hành nhuộm tiêu bản.

Nhuộm tiêu bản: Đối với mẫu nấm thì áp dụng phương pháp nhuộm Methylene Blue, còn đối với mẫu vi khuẩn sẽ áp dụng phương pháp nhuộm Gram.

Nhuộm Gram dựa vào nguyên tắc: Vi khuẩn bắt màu Gram âm hay Gram dương do sự khác nhau về thành phần, cấu trúc vách tế bào của vi khuẩn. Vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày, nhiều acid teichoic, chúng không bị ảnh hưởng bởi sự tẩy màu bằng cồn, vẫn giữ nguyên được màu tím ban đầu. Vi khuẩn Gram âm có một lớp peptidoglycan gắn với lớp phospholipid kép, xen kẽ các protein ở màng ngoài, lớp màng này dễ bị phá hủy bởi cồn khi tẩy màu, do đó phức hợp tinh thể tím gentian - iot không bền, bị tẩy màu và màu được thay bởi các thuốc nhuộm khác. Cách tiến hành nhuộm Gram như sau: Nhuộm tiêu bản đã chuẩn bị trên bằng thuốc nhuộm tím trong 1 phút. Sau đó rửa nước, nhuộm lugol trong 1 phút. Rửa bằng cồn trong 30 giây, nhỏ từ từ giọt cồn cho đến khi tan hết màu, để nghiêng tiêu bản. Rửa nước, nhuộm Fuchsin trong 30 giây. Rửa nước, làm khô.

Còn đối với nhuộm Methylene Blue dựa vào nguyên tắc: Thuốc nhuộm xanh Methylen là thuốc nhuộm cation, màng tế bào mang điện tích âm nên khi cho thuốc nhuộm gây ra hiện tượng bắt màu do sự kết hợp của hai loại điện tích trái dấu. Cách tiến hành nhuộm Methylene Blue như sau: Nhỏ thuốc nhuộm xanh methylen lên vết bôi khoảng 30 giây – 1 phút. Sau đó rửa nước, đậy lamen lên.

Cuối cùng, sử dụng tiêu bản đã được nhuộm đi quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 100X để xác định các chủng vi sinh vật có trong mẫu.

2.3.10 Định lượng vi sinh vật

Sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc: đếm số lượng vi sinh vật căn cứ vào hình thái các khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc trưng trong đĩa petri, ứng với một thể tích huyền phù xác định cần nghiên cứu.

Có các môi trường Asparagine – Mannitol – agar, môi trường Beijerinsk, môi trường Pikovskaya, môi trường PDA, mỗi môi trường được phân vào 9 đĩa petri (tất cả đều đã được khử trùng), cấy vào dịch huyền phù vi sinh vật ở độ pha loãng khác nhau, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 25^{o}C. Sau thời gian nuôi cấy 3 ngày thì đem ra xác định số lượng vi sinh vật.

Kết quả thu được là số khuẩn lạc trung bình của 3 đĩa petri ở mỗi độ pha loãng với cùng điều kiện nuôi cấy. Vì có nhiều tế bào hình thành chung một khuẩn lạc do đó kết quả sẽ được trình bày dưới dạng CFU (Colony Forming Unit).

Số lượng tế bào vi sinh vật có được trong 1ml dung dịch mẫu ban đầu được tính theo công thức:

$$B = \frac{(A \times DF)}{V}$$

B: Số lượng CFU/ml dung dịch mẫu ban đầu.

A: Số khuẩn lạc trung bình ở độ pha loãng tương ứng.

DF: Độ pha loãng.

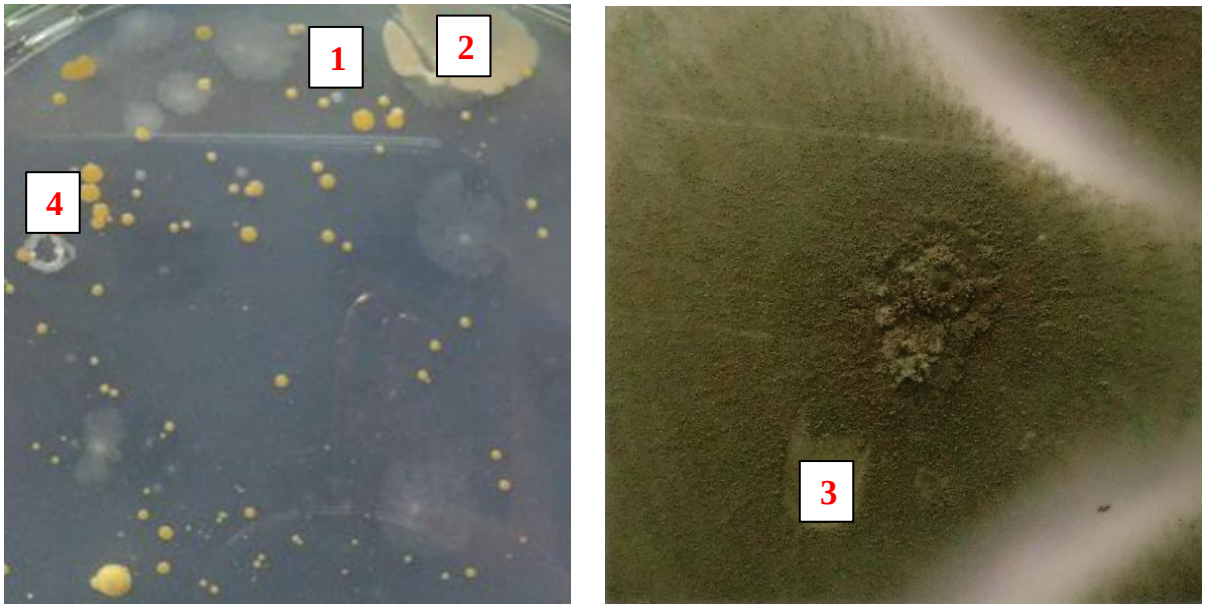
V: Số ml dung dịch huyền phù đưa vào đĩa.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có lợi trong phân trùn quế

Sau khi được cấy mẫu phân trùn quế trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar và PDA xuất hiện rất nhiều chủng vi sinh vật có thể bao gồm *Azotobacter, Rhizobium, Bacillus, Pseudomonas, Aspergillus…*

3 ngày sau khi nuôi cấy mẫu phân trùn quế vào môi trường Asparagine – Mannitol – agar bắt đầu có xuất hiện một số khuẩn lạc, tuy nhiên hình dáng và màu sắc chưa rõ ràng. Tại thời điểm 5 ngày sau khi nuôi cấy, xuất hiện 4 khuẩn lạc, có kích cỡ dao động từ 0,8mm đến 15mm, tuy biến động về đường kính khuẩn lạc lớn nhưng các khuẩn lạc có sự khác nhau rõ ràng về màu sắc và hình dạng khuẩn lạc.



(A) **(B)**

Hình 3.1 Một số khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar (A) và môi trường PDA (B) sau 5 ngày nuôi cấy mẫu phân trùn

(1) Khuẩn lạc 1 (2) Khuẩn lạc 2 (3) Khuẩn lạc 3 (4) Khuẩn lạc 4

4 khuẩn lạc thu được ở thời điểm 5 ngày có các đặc điểm hình thái rất khác biệt về màu sắc và kích thước. Các màu sắc ghi nhận được bao gồm khuẩn lạc màu trắng đục, khuẩn lạc có màu hơi ngã vàng, khuẩn lạc màu xanh lục và khuẩn lạc còn lại có màu trắng sữa. Các khuẩn lạc được miêu tả chi tiết như sau:

* Khuẩn lạc 1: Khuẩn lạc lồi có màu trắng đục, xuất hiện chất nhầy, kích thước khuẩn lạc khoảng 0,8mm. Dựa vào khóa phân loại của Egorov N.X (1983) dự đoán đây là chủng *Azotobacter*.

* Khuẩn lạc 2: Khuẩn lạc lồi màu hơi ngã vàng, có viền, đường kính khuẩn lạc khoảng 15mm. Chẩn đoán đây là chủng *Bacillus* dựa vào khóa phân loại Bergey (1989).

* Khuẩn lạc 3: Khuẩn lạc có hệ sợi màu xanh lục và màu trắng ở phía trên, phía dưới có màu vàng. Dựa vào khóa phân loại của Robert A. samson (1984) dự đoán đây là chủng *Aspergillus.*

* Khuẩn lạc 4: Khuẩn lạc lồi màu trắng sữa, tròn và kích thước khoảng 8mm. Theo Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và cs. (2019), chẩn đoán đây là chủng *Lactobacillus.*

Tiến hành chuẩn bị các môi trường thích hợp cho sự phát triển của những chủng vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân, phân giải cellulose cần phân lập. Tiếp đến cấy chuyền mẫu ra các môi trường đã chuẩn bị, gồm môi trường PDA, môi trường Beijerinsk, môi trường Pikovskaya, môi trường Asparagine – Mannitol – agar. Cấy chuyền 4 chủng vi sinh vật đã được dự đoán vào các môi trường phù hợp với sự sinh trưởng và phát triển của chúng như sau: Khuẩn lạc 1 được cấy vào môi trường Beijerinsk, khuẩn lạc 2 được cấy vào môi trường Pikovskaya, khuẩn lạc 3 cấy vào môi trường PDA và khuẩn lạc 4 được cấy vào môi trường Asparagine – Mannitol – agar.

3.2 Đặc điểm hình thái và khuẩn lạc của các chủng vi sinh vật phân lập được trong phân trùn quế

3.2.1 Chủng *Azotobacter*

Sau khi phân lập, tiến hành quan sát hình thái, đặc điểm khuẩn lạc của chủng được chẩn đoán là chủng *Azotobacter* có khả năng cố định đạm được nuôi cấy trên môi trường Beijerinsk trong khoảng thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ. Kết quả theo dõi sẽ được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian

THỜI GIAN NUÔI CẤY (giờ)	CẢM QUAN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY	ĐẶC ĐIỂM KHUẨN LẠC
24	Đục	Chưa phát triển trong môi trường
48	Đục	Bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng trong
72	Đục	Khuẩn lạc nhỏ dần chuyển sang màu trắng đục
96	Đục	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng đục
120	Hơi trong	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng đục

Qua quá trình quan sát trực tiếp dưới ánh sáng cho thấy các đĩa petri sau khi xuất hiện vi sinh vật cố định đạm thì màu sắc môi trường nuôi cấy có sự thay đổi sau 5 ngày nuôi cấy.

Vào thời điểm nuôi cấy được 24 giờ, môi trường nuôi cấy không có sự khác biệt so với ban đầu, không có sự xuất hiện của khuẩn lạc. Nguyên nhân là vì những vi sinh vật này được nuôi cấy trong môi trường mới nên cần có thời gian thích nghi, sau đó mới có khả năng sinh trưởng và phát triển bình thường. Đây chính là giai đoạn Tiềm phát (pha Lag) trong biểu đồ đường cong sinh trưởng của vi sinh vật (Prescott và cs. 2002).

Sau 48 giờ nuôi cấy, tuy môi trường nuôi cấy vẫn có màu trắng như ban đầu nhưng ở các đĩa đã bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc li ti màu trắng trong, hình tròn, nhẵn. Chứng tỏ vào thời gian này, vi sinh vật chưa phát triển mạnh.

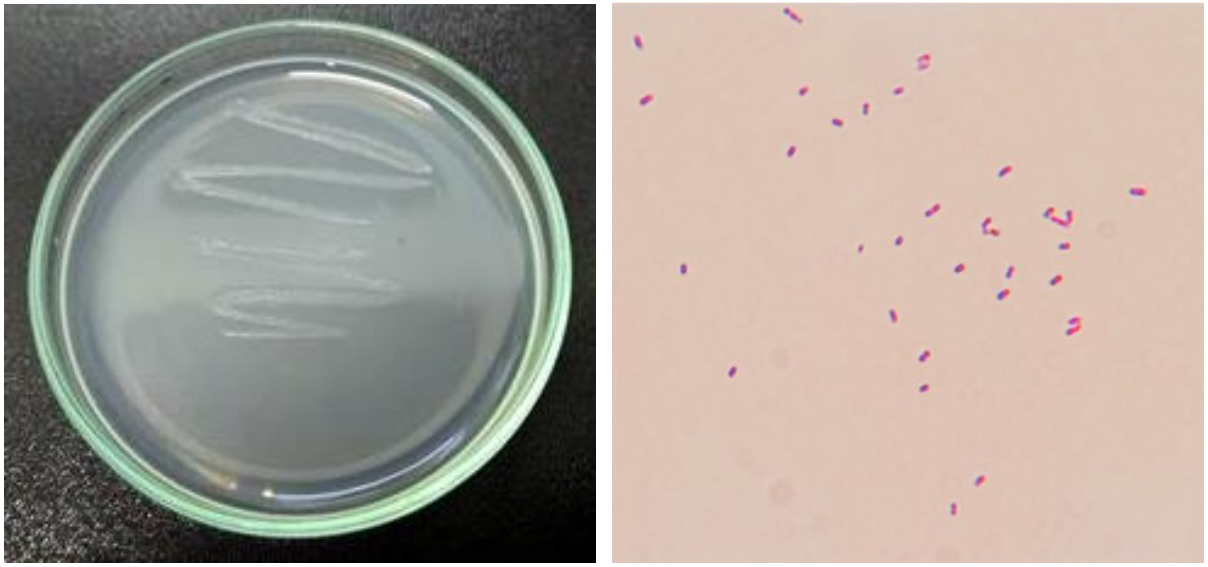
Sau 3 ngày nuôi cấy (72 giờ), những đốm khuẩn lạc trắng trong li ti đã phát triển lên thành khuẩn lạc nhỏ màu trắng đục, đồng thời số lượng khuẩn lạc có trên bề mặt đĩa cũng xuất hiện nhiều hơn.

96 giờ sau nuôi cấy, môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi, tuy nhiên số lượng khuẩn lạc nhiều hơn, đồng thời đường kính khuẩn lạc cũng lớn hơn. Đây là giai

đoạn các vi sinh vật sinh trưởng và phát triển mạnh theo hàm số mũ ở pha Log (Giai đoạn Logarit). Bề mặt môi trường nuôi cấy có chút nhầy.

Diễn biến này tiếp tục đến thời điểm 120 giờ sau nuôi cấy. Tại thời điểm này môi trường trở nên trong hơn lúc đầu. Nguyên nhân là vì tương ứng với số lượng khuẩn lạc tăng lên thì các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy giảm dần đến màu sắc của môi trường cũng sẽ thay đổi.

Sau 3 ngày nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ 25^{o}C, xuất hiện các đốm khuẩn lạc trên mặt đĩa petri có chứa môi trường Beijerinsk, tiến hành làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.



(a) Khuẩn lạc **(b) Tế bào**

Hình 3.2 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi

Khi nhuộm Gram và quan sát dưới vật kính 100X thấy rằng vi khuẩn này thuộc nhóm gram âm, có hình dạng như những chiếc que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ. Dựa vào đặc điểm hình thái trên so với khóa phân loại của Egorov N.X (1983) và nhiều tài liệu phân loại khác chúng tôi nhận định đây là chủng *Azotobacter*.

3.2.2 Chủng *Bacillus*

Sau khi phân lập, tiến hành quan sát hình thái, đặc điểm khuẩn lạc của chủng được chẩn đoán là chủng *Bacillus* có khả năng phân giải lân được nuôi cấy trên môi

trường Pikovskaya trong khoảng thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ. Kết quả theo dõi sẽ được thể hiện ở bảng 3.2.

Bảng 3.2 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian

THỜI GIAN NUÔI CẤY (giờ)	CẢM QUAN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY	ĐẶC ĐIỂM KHUẨN LẠC
24	Đục	Chưa phát triển trong môi trường
48	Đục	Bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng
72	Đục	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng dần ngã vàng
96	Đục	Khuẩn lạc nhỏ ngã vàng
120	Hơi trong	Khuẩn lạc lớn ngã vàng

Qua quá trình quan sát, cho thấy những đĩa petri sau khi xuất hiện vi sinh vật thì môi trường nuôi cấy cũng dần trong hơn, mức độ chuyển màu phụ thuộc vào thời gian nuôi cấy của vi sinh vật.

Vào thời điểm nuôi cấy được 24 giờ, môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi, vi sinh vật chưa phát triển nên trên bề mặt môi trường không có sự xuất hiện của khuẩn lạc.

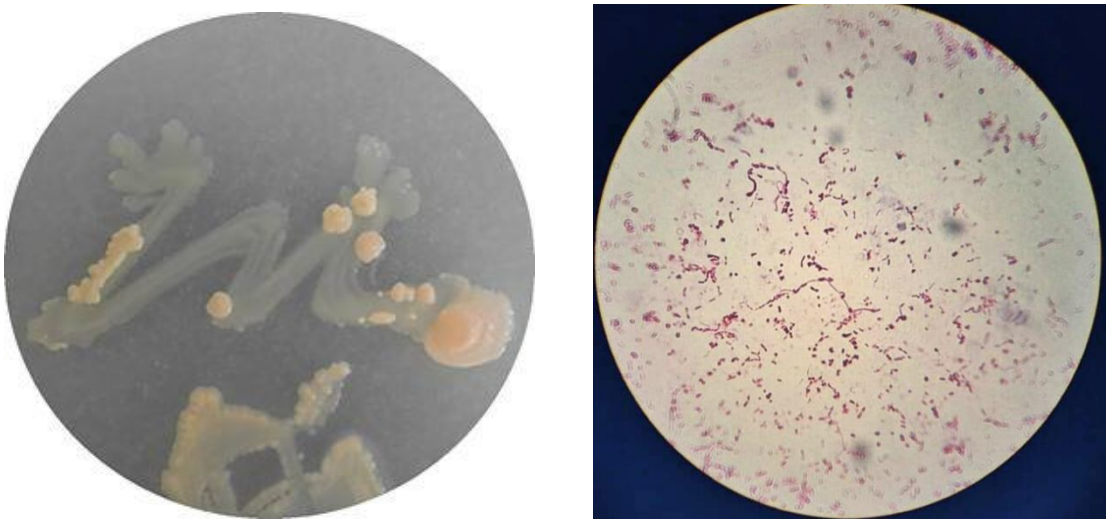
Sau 48 giờ nuôi cấy, ở bề mặt môi trường nuôi cấy đã bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc li ti màu trắng đục, hình tròn không đều. Vi sinh vật đang bắt đầu phát triển.

Sau 72 giờ nuôi cấy, xuất hiện nhiều đốm khuẩn lạc li ti hơn trên bề mặt môi trường, những khuẩn lạc màu trắng đã dần ngã vàng, khuẩn lạc lồi, có viền, đồng thời đường kính khuẩn lạc cũng lớn hơn. Môi trường nuôi cấy không có dấu hiệu thay đổi.

96 giờ sau nuôi cấy, đây là giai đoạn các vi sinh vật sinh trưởng và phát triển mạnh theo hàm số mũ ở pha Log (Giai đoạn Logarit). Số lượng khuẩn lạc trong môi trường nuôi cấy tiếp tục tăng. Màu khuẩn lạc ngã vàng.

Vào thời điểm 120 giờ sau nuôi cấy, màu sắc của môi trường đã có sự thay đổi, từ màu trắng đục (do $Ca_3(PO_4)_2$) dần trong hơn, do các vi sinh vật đã sử dụng chất dinh dưỡng trong môi trường để sinh trưởng và phát triển.

Sau 3 ngày nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ 25^oC, xuất hiện các đốm khuẩn lạc trên mặt đĩa petri có chứa môi trường Pikovskaya, tiến hành làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.



(a) Khuẩn lạc **(b) Tế bào**

Hình 3.3 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi

Khi nhuộm Gram và quan sát dưới vật kính 100X thấy rằng vi khuẩn thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que. Các tế bào vi khuẩn liên kết với nhau tạo thành chuỗi. So sánh với khóa phân loại Bergey (1989), nhận thấy đây là chủng *Bacillus.*

3.2.3 Chủng *Aspergillus*

Sau khi phân lập, tiến hành quan sát hình thái, đặc điểm khuẩn lạc của chủng được chẩn đoán là chủng *Aspergillus* có khả năng phân giải lân được nuôi cấy trên môi trường PDA trong khoảng thời gian 1 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày. Kết quả theo dõi sẽ được thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian

THỜI GIAN SAU NUÔI CẤY (ngày)	CẢM QUAN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY	ĐẶC ĐIỂM KHUẨN LẠC
1	Đục	Chưa phát triển trong môi trường
3	Đục	Xuất hiện khuẩn lạc màu trắng
5	Đục, xung quanh khuẩn lạc xuất hiện vòng tròn màu vàng	Khuẩn lạc có màu trắng và màu xanh, màu vàng phía dưới, đường kính khuẩn lạc lớn hơn
7	Đục, màu vàng xung quanh khuẩn lạc lan rộng theo sự phát triển của khuẩn lạc	Khuẩn lạc chuyển dần từ màu trắng sang màu xanh lục, phía dưới vẫn màu vàng, khuẩn lạc phát triển rõ rệt
10	Đục, vòng màu vàng xung quanh khuẩn lạc	Khuẩn lạc màu xanh lục, đường kính khuẩn lạc tiếp tục tăng
14	Vàng do khuẩn lạc	Khuẩn lạc từ màu xanh lục đã dần ngã màu xanh vàng

Vào thời điểm nuôi cấy được 24 giờ (1 ngày), môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi, bề mặt môi trường nuôi cấy chưa có dấu hiệu xuất hiện khuẩn lạc.

Sau 3 ngày nuôi cấy, bề mặt đĩa petri đã xuất hiện những đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng. Tuy nhiên chưa rõ vì chưa xuất hiện sợi nấm.

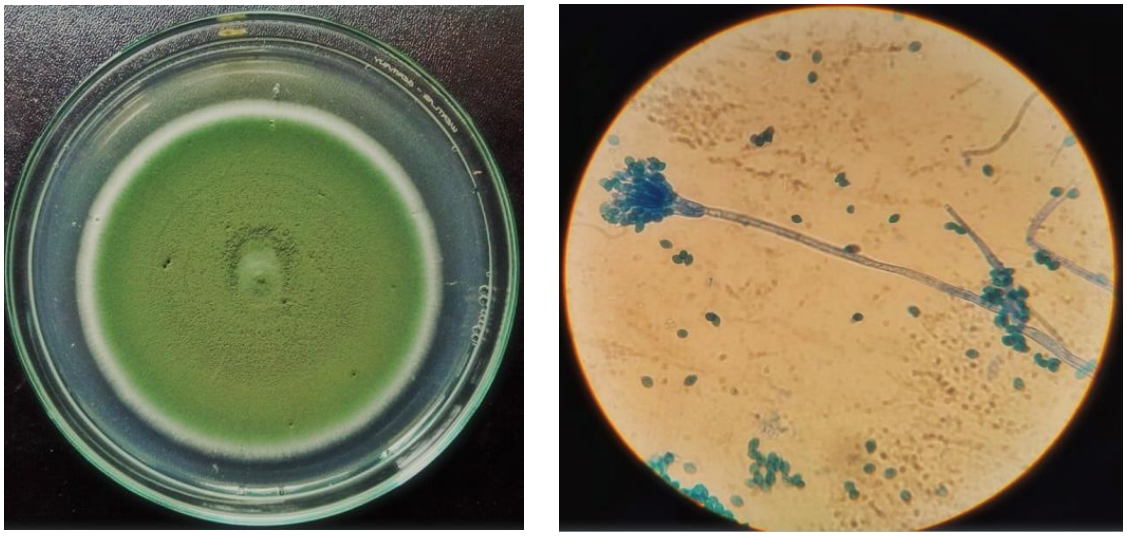
Sau 5 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc đã phát triển hơn, có màu trắng, hệ sợi phát triển, ở tâm khuẩn lạc có màu xanh lục. Mặt dưới của khuẩn lạc có màu vàng. Màu sắc môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi. Tuy nhiên xung quanh khuẩn lạc có xuất hiện vòng tròn màu vàng.

Tại thời điểm 7 ngày sau nuôi cấy, khuẩn lạc đang dần chuyển sang màu xanh lục. Khuẩn lạc bắt đầu lan rộng khắp bề mặt đĩa. Đồng thời màu vàng xung quanh khuẩn lạc cũng lan rộng theo.

10 ngày sau nuôi cấy, khuẩn lạc đã hoàn toàn chuyển sang màu xanh lục, hệ sợi ít hơn, thay vào đó là bào tử xuất hiện nhiều.

Tại thời điểm 14 ngày sau nuôi cấy, khuẩn lạc từ màu xanh lục dần ngã thành màu xanh vàng, lan rộng khắp đĩa. Thời điểm này, quan sát đĩa petri ta thấy bào tử xuất hiện nhiều và rất khó để quan sát được sợi nấm. Màu của môi trường nuôi cấy ở giai đoạn này là màu vàng của khuẩn lạc tạo nên.

Sau 3 ngày nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ 25^{o}C, xuất hiện các đốm khuẩn lạc trên mặt đĩa petri có chứa môi trường PDA, tiến hành làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.



(a) Khuẩn lạc **(b) Tế bào**

Hình 3.4 Đặc điểm hình thái của chủng nấm khi quan sát dưới kính hiển vi

Khi nhuộm Methylene Blue và quan sát dưới vật kính 100X thấy rằng bọng có hình gần cầu, tỏa tia cùng với chuỗi bào tử rất dài khi già. Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn. So sánh với khóa phân loại của Robert A. Samson (1984) nhận thấy đây là đặc điểm của chủng *Aspergillus*.

3.2.4 Chủng *Lactobacillus*

Sau khi phân lập, tiến hành quan sát hình thái, đặc điểm khuẩn lạc của chủng được chẩn đoán là chủng *Lactobacillus* có khả năng phân giải cellulose được nuôi cấy trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar trong khoảng thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ. Kết quả theo dõi sẽ được thể hiện ở bảng 3.4.

Bảng 3.4 Sự thay đổi của khuẩn lạc theo thời gian

THỜI GIAN NUÔI CẤY (giờ)	CẢM QUAN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY	ĐẶC ĐIỂM KHUẨN LẠC
24	Hơi đục	Chưa phát triển trong môi trường
48	Hơi đục	Bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng đục
72	Hơi đục	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng sữa
96	Hơi đục	Khuẩn lạc nhỏ màu trắng sữa
120	Hơi đục	Khuẩn lạc lớn màu trắng sữa

Vào thời điểm nuôi cấy được 24 giờ, môi trường nuôi cấy không có sự khác biệt với ban đầu, đồng thời trên bề mặt môi trường cũng chưa xuất hiện khuẩn lạc. Cũng như vi khuẩn cố định đạm, những vi sinh vật này được nuôi cấy trong môi trường mới nên cần có thời gian thích nghi, sau đó mới có khả năng sinh trưởng và phát triển bình thường.

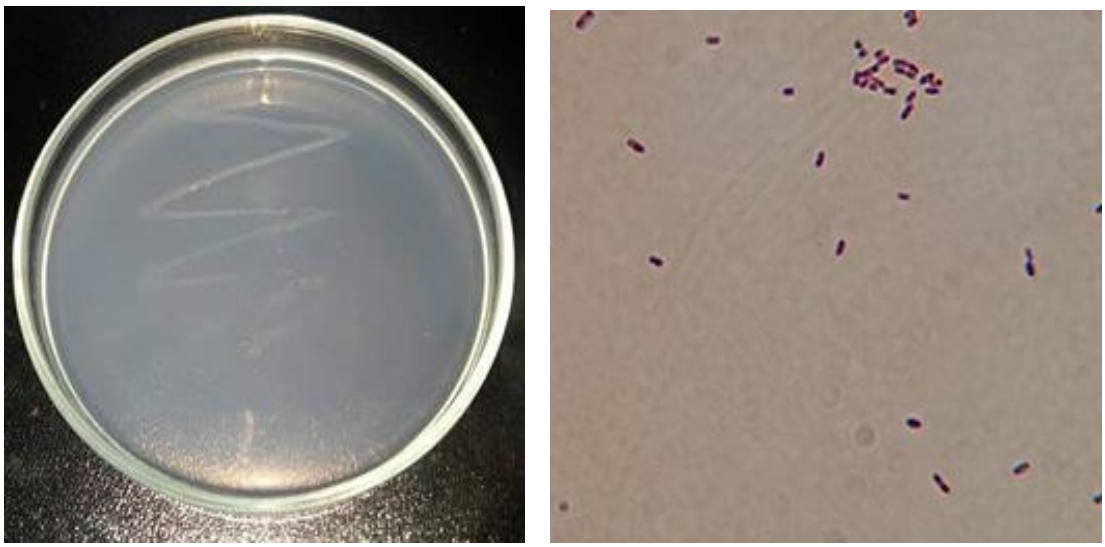
Sau 48 giờ nuôi cấy, bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng đục. Màu sắc môi trường không có sự thay đổi.

Sau 3 ngày nuôi cấy (72 giờ), những đốm khuẩn lạc li ti đã phát triển lên thành khuẩn lạc nhỏ màu trắng sữa, đồng thời số lượng khuẩn lạc trên bề mặt đĩa cũng tăng lên. Khuẩn lạc của vi sinh vật có hình tròn, lồi, bề mặt nhẵn.

96 giờ sau nuôi cấy, tại thời điểm này chỉ có số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường nuôi cấy thay đổi, khuẩn lạc xuất hiện nhiều hơn và có màu trắng sữa.

Diễn biến này tiếp tục đến thời điểm 120 giờ sau nuôi cấy và không có sự thay đổi.

Sau 3 ngày nuôi cấy vi sinh vật ở nhiệt độ 25^{o}C, xuất hiện các đốm khuẩn lạc trên mặt đĩa petri có chứa môi trường Asparagine – Mannitol – agar, tiến hành làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.



(a) Khuẩn lạc **(b) Tế bào**

Hình 3.5 Đặc điểm hình thái của chủng vi khuẩn khi quan sát dưới kính hiển vi

Khi nhuộm Gram và quan sát dưới vật kính 100X thấy rằng chủng vi sinh vật này thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ. Căn cứ vào đặc điểm phân loại của nhiều tài liệu khác nhau, ta nhận thấy chủng vi sinh vật này là chủng Lactobacillus.

3.3 Mật độ vi sinh vật

3.3.1 Chủng *Azotobacter*

Việc định lượng vi sinh vật được thực hiện với 3 lần lặp ở các độ pha loãng 10^8, 10^9 và 10^{10}. Thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc, số lượng chủng vi sinh vật cố định đạm *Azotobacter* có trong phân trùn quế được thể hiện ở bảng 3.5. Mật độ CFU/ml được yêu cầu trước khi xuất xưởng có trong chế phẩm sinh học không thấp hơn 1.10^8 (*Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón* 2019).

Bảng 3.5 Số lượng vi sinh vật cố định đạm *Azotobacter* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế

ĐỘ PHA LOÃNG	SỐ LƯỢNG KHUẨN LẠC TRUNG BÌNH	SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG DUNG DỊCH MẪU (CFU/ml)
10^8	112,7	$1,1.10^{11}$
10^9	64,3	$6,4.10^{11}$
10^{10}	27,5	$2,8.10^{12}$

Mật độ trung bình vi sinh vật cố định đạm trong các mẫu phân tích đạt khoảng $1,1.10^{11}$ CFU/ml đến $2,8.10^{12}$ CFU/ml dịch huyền phù. Nhìn chung số lượng vi khuẩn *Azotobacter* trong phân trùn quế khá cao. Mật độ vi khuẩn *Azotobacter* đạt $2,8.10^{12}$ CFU/ml dung dịch mẫu. Nếu so sánh với các chế phẩm sinh học khác thì số lượng vi sinh vật cố định đạm *Azotobacter* trong phân trùn quế đã đạt tiêu chuẩn.

3.3.2 Chủng *Bacillus*

Việc định lượng vi sinh vật được thực hiện với 3 lần lặp ở các độ pha loãng 10^8, 10^9 và 10^{10}. Thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc, số lượng chủng vi sinh vật phân giải lân Bacillus có trong phân trùn quế được thể hiện ở bảng 3.6.

Bảng 3.6 Mật độ vi sinh vật phân giải lân *Bacillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế

ĐỘ PHA LOÃNG	SỐ LƯỢNG KHUẨN LẠC TRUNG BÌNH	SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG DUNG DỊCH MẪU (CFU/ml)
10^8	32,7	$3,3.10^{10}$
10^9	29,5	3.10^{11}
10^{10}	25	$2,5.10^{12}$

Mật độ trung bình vi sinh vật phân giải lân trong các mẫu phân tích đạt khoảng $3,3.10^{10}$ CFU/ml đến $2,5.10^{12}$ CFU/ml dịch huyền phù. Nhìn chung số lượng vi khuẩn

Bacillus trong phân trùn quế khá nhiều. Mật độ vi khuẩn *Bacillus* đạt $2{,}5.10^{12}$ CFU/ml dung dịch mẫu. Theo quy định của Tiêu chuẩn phân bón thì số lượng vi sinh vật phân giải lân *Bacillus* trong phân trùn quế đã đạt tiêu chuẩn (*Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón* 2019).

3.3.3 Chủng *Aspergillus*

Việc định lượng vi sinh vật được thực hiện với 3 lần lặp ở các độ pha loãng 10^3, 10^4 và 10^5. Thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc, số lượng chủng vi sinh vật phân giải lân *Aspergillus* có trong phân trùn quế được thể hiện ở bảng 3.7.

Bảng 3.7 Mật độ vi sinh vật phân giải lân *Aspergillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế

ĐỘ PHA LOÃNG	SỐ LƯỢNG KHUẨN LẠC TRUNG BÌNH	SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG DUNG DỊCH MẪU (CFU/ml)
10^3	4	4.10^4
10^4	2	2.10^5
10^5	2	2.10^6

Mật độ trung bình vi sinh vật phân giải lân trong các mẫu phân tích đạt khoảng 4.10^4 CFU/ml đến 2.10^6 CFU/ml dịch huyền phù. Ở độ pha loãng 10^5 số lượng nấm *Aspergillus* đạt 2.10^6 CFU/ml dung dịch mẫu.

3.3.4 Chủng *Lactobacillus*

Việc định lượng vi sinh vật được thực hiện với 3 lần lặp ở các độ pha loãng 10^8, 10^9 và 10^{10}. Thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc, số lượng chủng vi sinh vật phân giải cellulose có trong phân trùn quế được thể hiện ở bảng 3.8.

Bảng 3.8 Số lượng vi sinh vật phân giải cellulose *Lactobacillus* trong 1ml dung dịch huyền phù chứa phân trùn quế

ĐỘ PHA LOÃNG	SỐ LƯỢNG KHUẨN LẠC TRUNG BÌNH	SỐ LƯỢNG VI SINH VẬT TRONG DUNG DỊCH MẪU (CFU/ml)
10^8	77,7	$7,8.10^{10}$
10^9	51	$5,1.10^{11}$
10^{10}	30,7	$3,1.10^{12}$

Mật độ trung bình vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu phân tích đạt khoảng $7,8.10^{10}$ CFU/ml đến $3,1.10^{12}$ CFU/ml dịch huyền phù. Nhìn chung số lượng vi khuẩn *Lactobacillus* trong phân trùn quế khá nhiều. Mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* đạt $3,1.10^{12}$ CFU/ml dung dịch mẫu. Theo quy định của Tiêu chuẩn phân bón thì số lượng vi sinh vật phân giải cellulose *Lactobacillus* trong phân trùn quế đã đạt tiêu chuẩn (*Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón* 2019).

3.4 Sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trên môi trường Getchinson

3.4.1 Chủng *Azotobacter*

Sau thời gian nuôi cấy chủng vi sinh vật cố định đạm *Azotobacter* trên môi trường Getchinson thu được kết quả biểu diễn ở bảng 3.9.

Bảng 3.9 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Azotobacter* qua các thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Đặc điểm khuẩn lạc	Cảm quan dịch nuôi cấy
24	Chưa phát triển trong môi trường	Trong
48	Xuất hiện đốm khuẩn lạc nhỏ li ti màu trắng đục ở đáy ống nghiệm	Trong
72	Số lượng khuẩn lạc nhiều hơn, khuẩn lạc nhỏ màu trắng đục	Hơi đục
96	Khuẩn lạc phát triển nhiều hơn, khuẩn lạc màu trắng đục	Đục
120	Mật độ khuẩn lạc tăng, khuẩn lạc màu trắng đục	Đục

Sau 24 giờ nuôi cấy, quan sát ống nghiệm dưới ánh sáng thấy rằng môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi so với ban đầu. Đồng thời chưa thấy sự phát triển của các vi sinh vật. Đây là giai đoạn các vi sinh vật làm quen với môi trường mới, chúng cần có thời gian thích nghi để sinh trưởng và phát triển bình thường.

48 giờ sau khi nuôi cấy, mặc dù môi trường nuôi cấy vẫn trong nhưng khi quan sát dưới ánh sáng thì đã thấy trong dịch nuôi cấy bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc li ti màu trắng đục. Đây là dấu hiệu cho thấy vi sinh vật đã bắt đầu phát triển trong môi trường nuôi cấy.

Thời điểm 3 ngày sau nuôi cấy, dịch nuôi cấy đã bắt đầu có sự thay đổi. Từ dung dịch trong đã chuyển sang vẫn đục. Các đốm khuẩn lạc cũng xuất hiện nhiều hơn so với 48 giờ sau cấy, màu khuẩn lạc thì không có sự thay đổi vẫn là màu trắng đục.

96 giờ sau cấy, màu sắc khuẩn lạc không có sự thay đổi tuy nhiên khuẩn lạc phát triển nhiều hơn, do đó môi trường nuôi cấy cũng đục hơn.

Qua 5 ngày sau nuôi cấy, mật độ khuẩn lạc tăng lên một cách rõ rệt, dung dịch nuôi cấy đục đi nhiều so với thời điểm ban đầu.

3.4.2 Chủng *Bacillus*

Sau thời gian nuôi cấy chủng vi sinh vật phân giải lân *Bacillus* trên môi trường Getchinson thu được kết quả biểu diễn ở bảng 3.10.

Bảng 3.10 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Bacillus* qua các thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Đặc điểm khuẩn lạc	Cảm quan dịch nuôi cấy
24	Bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc màu trắng đục	Trong
48	Mật độ khuẩn lạc tăng lên, khuẩn lạc màu trắng đục	Hơi đục
72	Khuẩn lạc phát triển nhiều hơn, khuẩn lạc hơi ngã vàng	Hơi đục
96	Số lượng khuẩn lạc tăng, khuẩn lạc hơi ngã vàng	Đục
120	Khuẩn lạc hơi ngã vàng	Đục

Ban đầu sau 24 giờ nuôi cấy, tuy môi trường nuôi cấy trong nhưng đã bắt đầu xuất hiện các đốm khuẩn lạc màu trắng đục.

Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ khuẩn lạc có trong dung dịch đã được tăng lên, tất cả khuẩn lạc đều có màu trắng đục, dung dịch nuôi cấy đã có dấu hiệu hơi đục.

Thời điểm 72 giờ sau nuôi cấy, khuẩn lạc phát triển nhiều hơn rõ rệt, dung dịch vẫn đục, màu của khuẩn lạc đã có sự thay đổi. Khuẩn lạc từ màu trắng đục dần ngã vàng.

Vào lúc 96 giờ sau nuôi cấy, dung dịch đục đi rõ rệt so với ban đầu, khuẩn lạc đã ngã vàng, số lượng khuẩn lạc trong dung dịch cũng tăng theo thời gian nuôi cấy.

Sau 5 ngày (120 giờ) sau nuôi cấy, khuẩn lạc ngã vàng kèm theo đó là môi trường nuôi cấy đục đi.

3.4.3 Chủng *Aspergillus*

Sau thời gian nuôi cấy chủng vi sinh vật phân giải lân *Aspergillus* trên môi trường Getchinson thu được kết quả biểu diễn ở bảng 3.11.

Bảng 3.11 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Aspergillus* qua các thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Đặc điểm khuẩn lạc	Cảm quan dịch nuôi cấy
24	Hệ sợi chưa phát triển, bào tử nhiều, khuẩn lạc màu trắng	Trong
48	Hệ sợi bắt đầu phát triển, bào tử nhiều, khuẩn lạc màu trắng và xanh lục	Trong
72	Hệ sợi phát triển mạnh, bào tử nhiều, khuẩn lạc màu xanh lục (phía trên) và hơi ngã vàng (phía dưới)	Trong
96	Hệ sợi phát triển mạnh, bào tử nhiều, khuẩn lạc màu xanh lục (phía trên) và hơi ngã vàng (phía dưới)	Trong
120	Hệ sợi phát triển, bào tử nhiều, khuẩn lạc màu xanh lục (phía trên) và hơi ngã vàng (phía dưới)	Trong

Vào thời điểm sau 1 ngày (24 giờ) nuôi cấy, môi trường nuôi cấy không có sự thay đổi so với ban đầu, khuẩn lạc màu trắng, hệ sợi của nấm vẫn chưa phát triển, tuy nhiên bào tử ở trên bề mặt dung dịch nuôi cấy rất nhiều.

Ngày thứ 2 (48 giờ) sau nuôi cấy, môi trường nuôi cấy vẫn không có sự khác biệt. Tuy nhiên hệ sợi đã bắt đầu phát triển, bào tử xuất hiện nhiều hơn. Khuẩn lạc từ màu trắng đang dần chuyển sang màu xanh lục.

72 giờ sau nuôi cấy là thời điểm môi trường nuôi cấy vẫn không có sự thay đổi. Dung dịch nuôi cấy vẫn trong, hệ sợi đang trong giai đoạn phát triển mạnh, bào tử xuất hiện nhiều hơn. Khuẩn lạc có sự thay đổi rõ rệt, mặt trên có màu xanh lục còn phía dưới có màu hơi ngã vàng. Màu sắc của khuẩn lạc này giống với màu khuẩn lạc khi nuôi cấy trong môi trường agar.

Đến ngày tiếp theo (96 giờ sau nuôi cấy), hệ sợi tiếp tục phát triển, bào tử xuất hiện nhiều trên bề mặt dung dịch nuôi cấy, màu sắc khuẩn lạc không có sự thay đổi so với thời điểm 72 giờ sau nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy trong.

120 giờ sau nuôi cấy, không có sự khác biệt so với thời điểm 96 giờ sau nuôi cấy.

3.4.4 Chủng *Lactobacillus*

Sau thời gian nuôi cấy chủng vi sinh vật phân giải cellulose *Lactobacillus* trên môi trường Getchinson thu được kết quả biểu diễn ở bảng 3.12.

Bảng 3.12 Diễn biến của môi trường và khuẩn lạc của chủng *Lactobacillus* qua các thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Đặc điểm khuẩn lạc	Cảm quan của dịch nuôi cấy
24	Chưa có sự phát triển của vi sinh vật	Trong
48	Xuất hiện ít đốm khuẩn lạc li ti màu trắng đục	Trong
72	Số lượng khuẩn lạc xuất hiện nhiều hơn, khuẩn lạc màu trắng đục	Hơi đục
96	Khuẩn lạc phát triển, khuẩn lạc màu trắng đục	Đục
120	Mật độ khuẩn lạc tăng lên rõ rệt, khuẩn lạc màu trắng đục	Đục

Sau 1 ngày (24 giờ) nuôi cấy, môi trường nuôi cấy chưa có dấu hiệu cho thấy sự phát triển của vi sinh vật, dung dịch nuôi cấy vẫn trong. Nguyên nhân đây là giai đoạn vi sinh vật thích nghi với môi trường mới.

Qua 2 ngày (48 giờ) sau nuôi cấy, quan sát dưới ánh sáng cho thấy trong dịch nuôi cấy đã bắt đầu xuất hiện vài đốm khuẩn lạc li ti màu trắng đục, tuy nhiên sự phát triển này chưa rõ ràng, do đó môi trường nuôi cấy vẫn không có sự khác biệt so với ban đầu.

Thời điểm 72 giờ sau nuôi cấy là giai đoạn vi sinh vật bắt đầu phát triển, do đó số lượng khuẩn lạc có trong dung dịch cũng nhiều hơn dẫn đến môi trường nuôi cấy bị vẫn đục. Màu sắc khuẩn lạc không có sự thay đổi.

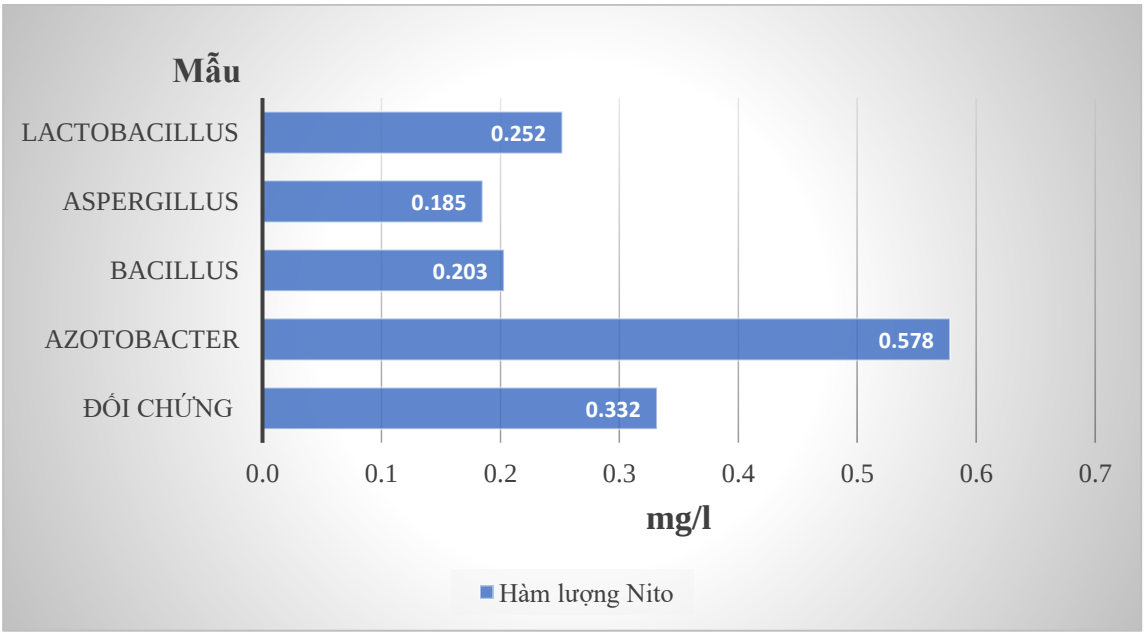
96 giờ sau nuôi cấy, môi trường nuôi cấy đục hơn do khuẩn lạc phát triển mạnh. Mật độ khuẩn lạc có trong dung dịch nhiều hơn rất nhiều so với thời điểm 72 giờ sau cấy. Khuẩn lạc màu trắng đục.

120 giờ sau nuôi cấy, mật độ khuẩn lạc trong dịch nuôi cấy tiếp tục tăng dẫn đến môi trường nuôi cấy đục hơn, khuẩn lạc có màu trắng đục.

3.5 Đánh giá khả năng cố định đạm, phân giải lân và phân giải cellulose của các chủng vi sinh vật

3.5.1 Khả năng cố định đạm của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế

Sau khi nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường Getchinson 10 ngày sẽ tiến hành đo hàm lượng nitơ có trong dịch nuôi cấy. Mục đích của thực nghiệm này là khảo sát hiệu lực khả năng cố định đạm của chủng *Azotobacter* đã phân lập được trong khoảng thời gian 10 ngày. Dựa vào thang đường chuẩn và số liệu đo mẫu thu được kết quả thể hiện ở biểu đồ (Hình 3.6).



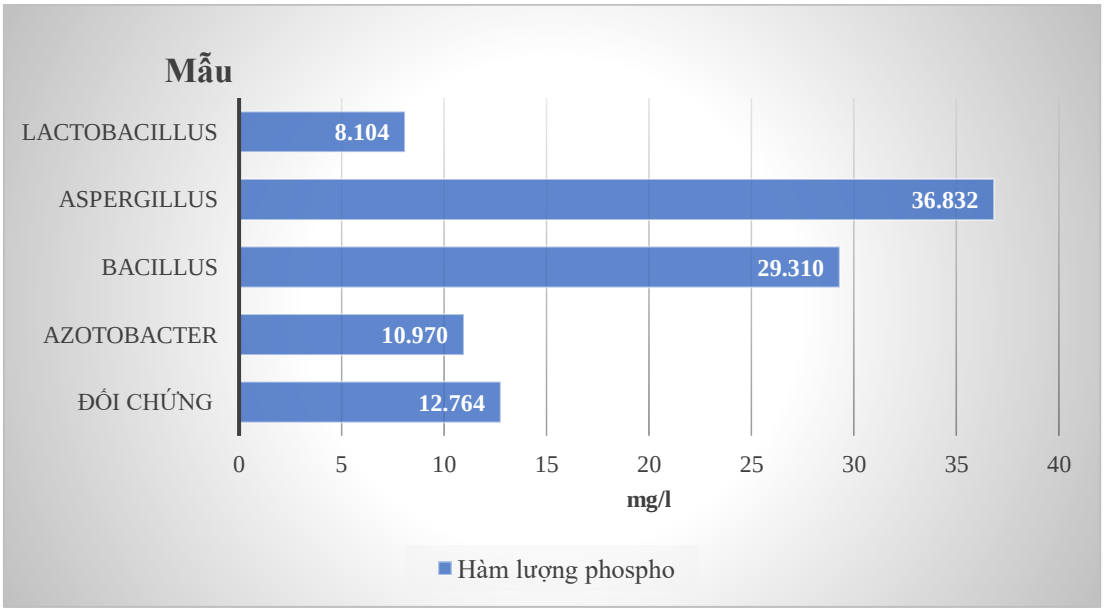
Hình 3.6 Biểu đồ thể hiện hàm lượng nitơ trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày bổ sung vi sinh vật

Quan sát biểu đồ, thấy rằng sau 10 ngày nuôi cấy, hàm lượng nitơ trong mỗi ống nghiệm có sự thay đổi rõ rệt so với ban đầu. Đối với ống nghiệm được bổ sung chủng *Azotobacter* vì *Azotobacter* là vi sinh vật có khả năng cố định đạm từ không khí, do đó sau 10 ngày nuôi cấy, hàm lượng nitơ trong dịch nuôi cấy tăng lên (0,246 mg/l so với đối chứng). Đối với ống nghiệm được bổ sung chủng *Bacillus* thì ngược lại, hàm lượng nitơ trong môi trường sau 10 ngày nuôi cấy giảm đi (0,129 mg/l), nguyên nhân là vì *Bacillus* đã thực hiện quá trình khử nitrat nhằm tách oxy để oxy hóa các hợp chất khác. Tương tự, đối với các chủng như *Aspergillus* và *Lactobacillus* cũng vậy, vì chúng không có khả năng cố định đạm, đồng thời lại sử dụng các hợp chất nitơ để thực hiện quá trình trao đổi chất cho tế bào nên hàm lượng nitơ trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày đã giảm đi. So với hàm lượng nitơ có trong dịch nuôi cấy ban đầu thì sau 10 ngày, hàm lượng nitơ trong ống nghiệm bổ sung chủng *Aspergillus* đã giảm đi 0,147 mg/l và *Lactobacillus* giảm 0,08mg/l.

3.5.2 Khả năng phân giải lân của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế

Sau khi nuôi cấy vi sinh vật phân giải lân trong môi trường Getchinson (có bổ thêm 0,01g phân lân) 10 ngày sẽ tiến hành đo hàm lượng lân dễ tiêu có trong dịch nuôi cấy. Mục đích của thực nghiệm này là khảo sát hiệu lực khả năng phân giải lân của các

chủng đã phân lập được trong khoảng thời gian 10 ngày. Dựa vào thang đường chuẩn P_2O_5 và số liệu đo mẫu thu được kết quả thể hiện ở biểu đồ (Hình 3.7).



Hình 3.7 Biểu đồ thể hiện hàm lượng lân dễ tiêu trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày bổ sung vi sinh vật

Quan sát biểu đồ (Hình 3.7), thấy rằng sau 10 ngày nuôi cấy, hàm lượng lân dễ tiêu trong mỗi ống nghiệm có sự thay đổi so với ban đầu (đối chứng). Hàm lượng lân dễ tiêu trong ống nghiệm được bổ sung chủng *Bacillus* và ống nghiệm được bổ sung chủng *Aspergillus* tăng lên rõ rệt sau 10 ngày nuôi cấy, nguyên nhân là vì cả hai chủng vi sinh vật này đều có khả năng phân giải lân khó tiêu thành lân dễ tiêu. Đối với ống nghiệm được bổ sung chủng *Bacillus*, hàm lượng lân dễ tiêu trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày tăng lên 16,546 mg/l so với hàm lượng lân dễ tiêu có sẵn trong môi trường nuôi cấy ban đầu. Còn ống nghiệm được bổ sung chủng *Aspergillus*, hàm lượng lân dễ tiêu tăng 24,068 mg/l so với mẫu đối chứng. Đối với hai chủng không có khả năng phân giải lân như *Azotobacter* và *Lactobacillus* thì hàm lượng lân dễ tiêu trong dịch nuôi cấy sau 10 ngày giảm. Vì P là nguyên tố khoáng chiếm tỷ lệ cao trong tế bào vi sinh vật (Lê Xuân Phương 2009) nên các cần sử dụng các hợp chất phospho để sinh trưởng và phát triển. Do vậy, hàm lượng lân dễ tiêu trong dịch nuôi cấy hai chủng *Azotobacter* và *Lactobacillus* đều giảm đi so với ban đầu (đối chứng).

3.5.3 Khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật được phân lập từ phân trùn quế

Sau 20 ngày nuôi cấy chủng vi sinh vật *Lactobacillus* trong môi trường Getchinson có bỏ thêm giấy lọc. Kết quả theo dõi được trình bày ở bảng 3.13.

Bảng 3.13 Diễn biến của môi trường nuôi cấy và mẫu thử qua các thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Cảm quan của môi trường nuôi cấy	Sự thay đổi của mẫu thử
1	Trong	Không có sự thay đổi
3	Hơi đục	Không có sự thay đổi
5	Đục	Vi sinh vật bắt đầu bám vào tờ giấy lọc, giấy lọc chưa có gì thay đổi
7	Đục	Các góc của giấy lọc bắt đầu bị rã
10	Đục	Xung quanh giấy lọc xuất hiện các sợi giấy lọc
15	Đục	Sợi giấy lọc bị phân giải xuất hiện nhiều hơn
20	Đục	Giấy lọc vẫn đang tiếp tục bị phân giải

Sự biến đổi của giấy lọc qua các thời gian nuôi cấy cho thấy chủng vi sinh vật *Lactobacillus* phân lập được từ phân trùn quế có khả năng phân giải cellulose.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

1. Đã tuyển chọn được 4 chủng vi sinh vật từ phân trùn quế được nuôi trên môi trường vỏ cà phê là *Azotobacter, Bacillus, Aspergillus* và *Lactobacillus*.

2. Chủng *Azotobacter* có khuẩn lạc màu trắng đục, thuộc nhóm gram âm, có hình dạng như những chiếc que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ với mật độ là $2,8.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Beijerinsk và có khả năng cố định đạm, làm tăng lượng đạm trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 0,332mg/l lên 0,578mg/l.

Chủng *Bacillus* có khuẩn lạc màu hơi ngã vàng, vi khuẩn thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que, các tế bào vi khuẩn liên kết với nhau tạo thành chuỗi với mật độ là $2.5.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Pikovskaya và có khả năng phân giải lân, làm tăng lượng lân dễ tiêu trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 12,764mg/l lên 29,310mg/l.

Chủng *Aspergillus* có khuẩn lạc màu xanh lục, bọng có hình gần cầu, tỏa tia cùng với chuỗi bào tử rất dài khi già, bào tử hình cầu và bề mặt nhẵn với mật độ vi sinh vật là 2.10^6 CFU/ml có khả năng phân giải lân, làm tăng lượng lân dễ tiêu trong môi trường nuôi cấy Getchinson từ 12,768mg/l lên 36,832mg/l.

Chủng *Lactobacillus* có khuẩn lạc màu trắng sữa, vi sinh vật này thuộc nhóm gram dương, có dạng hình que với hai đầu thuôn tròn và đứng riêng rẽ với mật độ là $3,1.10^{12}$ CFU/ml khi lên men trên môi trường Asparagine – Mannitol – agar và có khả năng phân giải cellulose.

4.2. Kiến nghị

1. Tiếp tục phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có lợi khác từ phân trùn quế.

2. Nghiên cứu sản xuất các chế phẩm sinh học từ những chủng vi sinh vật phân lập được từ phân trùn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Ngô Thế Dân, Nguyễn Ngọc Quyên, Nguyễn Kim Vũ, *Phân vi khuẩn nốt sần và cách sử dụng cho cây đậu đỗ*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
2. Nguyễn Thị Ngọc Dinh (2014), Ảnh hưởng của liều lượng phân trùn quế đến sinh trưởng, phát triển và năng suất giống lúa ĐTL2 trong vụ xuân sản xuất theo hướng hữu cơ tại Gia Lâm, Hà Nội.
3. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2002), *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Giáo dục.
4. Nguyễn Lân Dũng, Tuần hoàn sinh địa hóa học các yếu tố, 23 – 31.
5. Egorov N.X, 1983. *Thực hành vi sinh vật* (Nguyễn Lân Dũng dịch). NXB Mir Matxcova, Nhà xuất bản Khoa học - Kỹ thuật Hà Nội.
6. *Giáo trình giảng dạy trực tuyến Vi sinh vật đất,* Trường đại học Cần Thơ.
7. Đỗ Quý Hải, *Giáo trình hóa sinh*, Nhà xuất bản Đại học Huế.
8. Nguyễn Đình Hải (2012), Nghiên cứu chủng xạ khuẩn VN08A12- Streptomyces toxytricini có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bệnh bạc lá lúa và thân thiện với môi trường.
9. Nguyễn Thị Hồng, *Kỹ thuật nuôi trùn quế*, Nhà xuất bản Thanh Hóa.
10. Bạch Phương Lan (2004), Giáo trình vi sinh vật đất, Trường Đại học Đà Lạt.
11. Lê Xuân Phương (2009), *Vi sinh vật học môi trường*, Nhà xuất bản Đà Nẵng.
12. Lê Xuân Phương (2009), Sinh lý đại cương vi sinh vật.
13. Trần Thị Xuân Phương (2017), Tuyển chọn vi khuẩn Azotobacter có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế.
14. Nguyễn Thị Ngọc Sương (2016), Tạo chế phẩm sinh học từ giống vi khuẩn BACILLUS SPP và PSEUDOMONAS SPP có khả năng hòa tan lân.
15. QCVN 01-189:2019/BNNPTNT, 2019. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón, 51 – 62.
16. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Nguyễn Lê Hồng Diệp, Phan Thị Thu Sương (2019), Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn Lactobacillus có tiềm năng probiotic từ cây môn ngọt (*Colocasia esculenta* (L.) SCHOTT).

17. Nguyễn Kiều Băng Tâm, Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp.
18. Chu Nguyên Thanh (2018), Đánh giá khả năng kích thích tăng trưởng thực vật của hai chủng Pseudomonas phân lập từ vùng rễ cây bắp.
19. Trần Cẩm Vân, Bạch Phương Lan (1995), Công nghệ vi sinh và bảo vệ môi trường, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.
20. Lê Minh Vượng (2018), Cẩm nang kỹ thuật nuôi trùn quế và ứng dụng trùn quế trong nông nghiệp.
21. Đoàn Văn Cung và cs (1998), *Sổ tay phân tích Đất, Nước, Phân bón, Cây trồng*, Nhà xuất bản nông nghiệp.

Tài liệu nước ngoài

1. Anderson (1966), Identification of Beijerinckia from Pacific Northwest soils Journal of Bacteriology.
2. Bergey and John G Holt (1994), Bergey's manual of determinative bacteriology.
3. Blackall, Hayward, Sly (1986), Cellulolytic and dextranolytic gram-negative bacteria: revival of the genus Cellvibrio.
4. Elizabeth Pe'rez. Miguel Sulbara'n, Maria M. Ball, Luis Andre's Yarza'bal (2007), Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region, Soil Biology & Biochemistry 39, 2905 - 2914.
5. Edward, Dominguez, Neuhauser (1998), Growth and reproduction of Perionyx excavatus (Perr.) (Megascolecidae) as factors in organic waste management, Springer Science.
6. Gordon, Haynes, Pang (1973), The genus Bacillus. U.S. Department of Agriculture Agricultural Handbook no. 427, U.S. Department of Agriculture, Washington DC.
7. Jeffrey (2008), Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soil at Semongok, Sarawak, African Journal of biotechnology.
8. Kirchman (2002), The ecology of Cytophaga - Flavobacteria in aquatic environments, FEMS Microbiology Ecology.

9. Kirk, Canon, Minter (2008), Dictionary of the Fungi, Wd Linford, UK: CABI.
10. OpenStax (2019), Allied Health Microbiology.
11. Samson, Visagie, J. Houbraken (2014), Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus.
12. Vos, Garrity, Jones (2009), Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer Science.
13. J.G.Shewale, 1981, β- Glucosidase: Its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose, ScienceDirect.
14. David B. Wilson (2008), Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation, The NewYork Academy Of Sciences.
15. William B. Whitman, Paul DeVos, Svetlana Dedysh (1989), Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

PHỤ LỤC

Môi trường Asparagine – mannitol – agar ($g.l^{-1}$)

K_2HPO_4	1,0
KNO_3	0,5
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
$CaCl_2.6H_2O$	0,1
NaCl	0,1
$FeCl_3.6H_2O$	0,005 (vệt)
Asparagine	0,5
Mannitol	1,0
Agar	15,0
Nước cất	1 lít
pH	7,4

Môi trường Beijerinsk ($g.l^{-1}$)

Mannitol (glucose)	20,0
K_2HPO_4	0,2
$CaCO_3$	5,0
Agar	15,0

Môi trường Pikovskaya ($g.l^{-1}$)

Glucoza	10,0
$Ca_3(PO_4)_2$	5,0
$(NH_4)_2SO_4$	0,5
NaCl	0,2
$MgSO_4.7H_2O$	0,1

KCl	0,2
Cao nấm men	0,5
$MnSO_4$	vết
$FeSO_4.7H_2O$	vết
Agar	20g
Nước cất	1 lít

Môi trường Potato Dextrose Agar ($g.l^{-1}$)

Khoai tây	200,0
Glucoza	20,0
Agar	15,0
Nước cất	1 lít

Môi trường Getchinson ($g.l^{-1}$)

KH_2PO_4	0,1
$CaCl_2$	0,1
$MgSO_4$	0,3
NaCl	1,0
$FeCl_3.6H_2O$	0,01
$NaNO_3$	2,5
Nước cất	1 lít
pH	7,0 – 7,3

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1 4
ĐẶT VẤN ĐỀ 4
CHƯƠNG 2 6
TỔNG QUAN 6
2.1 TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI: 6
2.1.1 Tổng quan cây Thanh Mai 6
2.1.2 Tình hình nghiên cứu in vitro giống cây Thanh Mai trong và ngoài nước: ..12
2.2 NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT 12
CHƯƠNG 3 16
NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 16
3.1 VẬT LIỆU: 16
3.2 ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU: 16
3.3 NỘI DUNG NGHIÊN CỨU: 16
3.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU: 16
3.4.1Môi trường và điều kiện nuôi cấy: 16
3.4.2. Bố trí thí nghiệm: 16
4.4. XỬ LÝ SỐ LIỆU: 17
CHƯƠNG 4 18
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 18
4. 1: KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG KHOÁNG THÍCH HỢP CHO SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY THANH MAI IN VITRO 18
4.2. NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA BA ĐẾN SỰ TẠO CHỒI THANH MAI IN VITRO 19
4.3. KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA IBA ĐẾN SỰ TẠO RỄ CHO CÂY THANH MAI IN VITRO 21
4. 4 KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NAA ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY THANH MAI NUÔI CẤY IN VITRO 24
4.5 ĐÁNH GIÁ TỶ LỆ CÂY SỐNG SAU KHI ĐƯA RA VƯỜN ƯƠM 25
CHƯƠNG 5 27
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 27
1. KẾT LUẬN 27
2. KIẾN NGHỊ 27
TÀI LIỆU THAM KHẢO 28
PHỤ LỤC 31

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1. Hàm lượng dinh dưỡng của trái Thanh Mai

Bảng 2. thành phần hoạt chất của cây Thanh Mai

Bảng 4.1: Ảnh hưởng của môi trường khoáng MS và WPM đến chiều cao và chiều dài rễ của cây Thanh Mai *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy

Bảng 4. 2: Ảnh hưởng của BA đến sự tạo chồi Thanh Mai in vitro sau 19 tuần nuôi cấy

Bảng 4.3: Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro* cây Thanh Mai sau 19 nuôi cấy

Bảng 4.4. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng cây Thanh Mai sau 19 tuần nuôi cấy *in vitro*

Bảng 4.5. Tỷ lệ cây Thanh Mai in vitro sống sau 5 tuần chăm sóc ở điều kiện nhà kính

DANH MỤC NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

BA 6- benzylaminopurine

IBA Indolebutyric acid

MS Murashige- Skoog (1962)

NAA Naphtyl axetic acid

WPM Woody plant medium (Môi trường cây gỗ)

ĐC Đối chứng

LSNG Lâm sản ngoài gỗ

Chương 1
ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết, ý nghĩa lý luận và thực tiễn của đề tài nghiên cứu

Cây Thanh Mai (tên khoa học: *Myrica Esculenta*; tên khác: dâu rừng, dâu rượu; tên tiếng anh: Chinese Bayberry hoặc *Myrica rubra*). Chúng thuộc nhóm Actinorhizal plants (thực vật cộng sinh với khuẩn cố định đạm Frankia) rất hữu hiệu trong canh tác trên các vùng đất cạn kiệt Ni tơ. Được phân bố trên khắp trái đất ở cả vùng ôn đới và cận nhiệt đới. Là loài cây ăn quả đơn tính, thân gỗ có chiều cao khoảng 12 – 15 m, quả có dạng hạch, màu đỏ đến nâu sậm, có vị ngọt và chua. Cả về quả và thân của cây Thanh Mai, đều có nhiều công dụng. Ngoài việc làm gỗ, nhiên liệu, thức ăn cho người và gia súc, thì Thanh Mai còn là một cây dược liệu bởi khả năng cung cấp vitamin C, chiết xuất thô ở các bộ phận khác nhau của cây và các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được đánh giá hiệu quả khác nhau như thuốc giảm đau, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, chống bệnh đái tháo đường. Người Ấn Độ còn sử dụng vỏ cây để chữa ho, hen suyển, đau răng... Quả Thanh Mai được sử dụng ăn sống hoặc làm đồ uống giải nhiệt và chống lại bệnh kiết lỵ. Có hàm lượng dinh dưỡng được đánh giá cao (protein: 9,62 %; chất xơ: 5,22%...). Hiện nay, ngoài việc thu giá trị kinh tế từ quả, mà cây Thanh Mai còn làm cây Bonsai cây cảnh. Cây Thanh Mai có giá trị vô cùng to lớn về mọi mặt nhưng cây chưa được trồng và nhân giống phổ biến, chủ yếu là cây Thanh Mai trong tự nhiên rồi được người dân thu hoạch. Chính vì không được nhân giống và việc thu hái chỉ dựa nguồn tự nhiên nên số lượng cây Thanh Mai đang bị giảm dần trong tự nhiên. Bên cạnh đó, đặc tính sinh sản phát triển từ hạt nên việc tái sinh của cây Thanh Mai cũng bị hạn chế, vì lớp vỏ hạt quá dày khó có thể thấm nước vào bên trong, và việc hạt ở ngoài tự nhiên sẽ bị các yếu tố khác ảnh hưởng đến (nấm, côn trùng, sâu bệnh...) làm ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm.

2. Chính vì những vậy việc nhân giống cây Thanh Mai để bảo tồn giống là điều cấp thiết. Ngoài việc cho cây sinh sản từ hạt, ta có thể áp dụng các phương pháp hiện đại hiện nay như nuôi cấy *in vitro* để nhân giống. Chúng tôi đang thử nghiệm nuôi cấy *in vitro* trên cây Thanh Mai, việc nuôi cây thành công cây Thanh Mai, không những giải quyết các vấn đề về thương mại mà nó còn hướng đến bảo tồn sự đa dạng sinh học và phát triển rừng bền vững.

Mục tiêu của đề tài

Nghiên cứu nhân giống cây Thanh Mai (*Myrica Esculenta*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, nghiên cứu chọn loại môi trường nuôi cấy phù hợp, các chất kích thích sinh trưởng phù hợp và các yếu tố dinh dưỡng đối với giống cây Thanh Mai. Từ đó là cơ sở cho việc xây dựng mô hình nuôi cấy *in vitro* cho giống cây Thanh Mai góp phần giải quyết nhu cầu sản xuất giống Thanh Mai.

Chương 2
TỔNG QUAN

2.1 Tổng quan tình hình nghiên cứu liên quan đến đề tài:

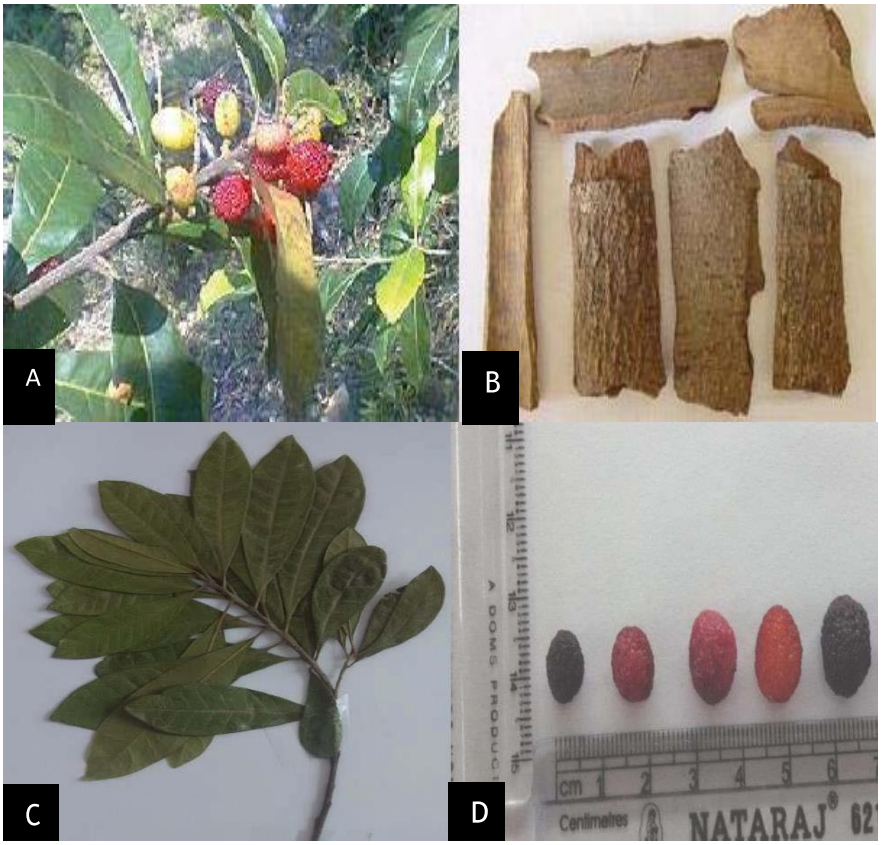
2.1.1 Tổng quan cây Thanh Mai

Các lâm sản ngoài gỗ (LSNG) đã nổi lên như một nguồn thu nhập sinh lợi và sinh thái bền vững ở tất cả các nơi trên thế giới (Tewari, Campbell, 1995; Hegde et al., 1996). Trong số các LSNG ở Himalaya, các loài thực vật hoang dã tỏ ra rất triển vọng cho nguồn thu nhập của người dân địa phương. Trong số 675 loài thực vật hoang dã ăn được ở Himalaya của Ấn Độ, 344 loài xuất hiện ở phía tây Himalaya, trong số đó có loài *Myrica esculenta*. *Myrica esculenta* (Thanh Mai), được biết đến với trái cây ăn được và các sản phẩm phụ khác, là một loài cây tạo thu nhập tiềm năng ở vùng Himalaya (Pandey *et al.*, 1993).

Chi *Myrica* bao gồm khoảng 97 loài cây nhỏ và cây bụi thuộc họ Myricaceae. Chúng được phân bố trên khắp trái đất ở cả vùng ôn đới và cận nhiệt đới (Yanthan, Misra, 2013) ví dụ như loài *Myrica australiasica* F. Muell ở Úc và *M. persylvanica* Mirb. ở Bắc Mỹ, một số loài được xếp vào nhóm dược liệu như loài *M. esculenta* trong hệ thống y học Ấn Độ (Singh *et al.*, 1986).

Cây Thanh Mai (*M. esculenta*) là một cây dược liệu có giá trị kinh tế, có thể sử dụng với nhiều công dụng khác nhau (Maikhuri *et al.*, 1994). Chúng thuộc nhóm Actinorhizal plants (thực vật cộng sinh với khuẩn cố định đạm Frankia) nó hữu ích trong canh tác trên các vùng đất cạn kiệt Ni tơ (Yanthan, Misra, 2013). Quả Thanh Mai đã được công nhận về giá trị dinh dưỡng và dược liệu bởi khả năng cung cấp vitamin C và các hợp chất pholyphenolic như tannin, phenol, flavonoid và flavonol (Panthari *et al.*, 2012). Các bộ phận khác của cây cũng được sử dụng vào các mục đích khác nhau như làm gỗ, nhiên liệu, thức ăn gia súc, thuộc da và thuốc nhuộm màu vàng (Jeeva *et al.*, 2011).

Mặc dù là cây đa năng, việc trồng cây rất hạn chế và hầu hết việc sử dụng truyền thống và thương mại của cây trồng Thanh Mai phụ thuộc hoàn toàn vào các nguồn thu từ tự nhiên (Kala, 2007). Số lượng cá thể đang bị giảm dần trong tự nhiên do tình trạng phá rừng, tái sinh kém trong tự nhiên. Nhân giống, trồng trọt, khai thác một cách có hiệu quả và bảo tồn trong tự nhiên là phương pháp tối ưu giúp khôi phục và phát triển số lượng cá thể trong giai đoạn hiện nay.



Hình 2.1. Hình thái cây Thanh Mai. (A) Cây (B) vỏ (C) lá (D) quả

Quan sát đặc điểm hình thái của cây *M. esculenta* (Hình. 1A) cho thấy cây gỗ trung bình đến lớn có chiều cao khoảng 12-15 m với đường kính thân khoảng 92,5 cm (Kirtikar, Basu, 1999). Vỏ ngoài màu xám đậm thô, thẳng đứng nhăn trong khi vỏ bên trong có màu nâu đậm với bề mặt nhẵn (Hình. 1B); nhiều vết nứt, vị đắng và mùi khó chịu (Singh *et al.*, 1986). Lá có hình ngọn giáo, lá có màu xanh lục đậm ở phía dưới và nhạt hơn ở phía trên, chiều dài lá khoảng 9-12 cm và rộng từ 3-3,5cm (Parmar, Kaushal, 1982). Nhụy hoa nhỏ, đơn độc và không cuống, lá đài và cánh hoa thường bị tiêu biến, cụm hoa kiểu đuôi sóc (catkin), dài 4,2 cm, mang khoảng 25 hoa nhỏ như sợi chỉ (Sahu *et al.*, 2013); trong khi đó, cụm nhị hoa có dạng chùm (Gusain, Khanduri, 2016). Mùa hoa bắt đầu từ tháng 2 và kéo dài cho đến tuần thứ hai của tháng 4, cao điểm nhất của mùa hoa là tuần thứ 3 của tháng thứ 3 và quả của chúng được quan sát trong tuần thứ 3 của tháng 5 và kéo dài đến cuối tháng 5 (Jeeva *et al.*, 2011). Quả của chúng dạng quả hạch, màu đỏ đến màu nâu sậm, hình elip hoặc hình bầu dục và đường kính từ 2-7 mm, có hình trứng, vị ngọt và chua.

Công dụng

Công dụng y học cổ truyền của cây Thanh Mai là cơ sở cho các nhà khoa học nghiên cứu xác minh tính hiệu quả của nó thông qua những phân tích dược lý hiện đại. Một số chiết xuất thô ở các bộ phận khác nhau của cây và các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được đánh giá hiệu quả khác nhau như thuốc giảm đau, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, chống bệnh đái tháo đường, làm lành vết thương, giảm stress, chống viêm gan, chống khối u, hạ huyết áp. Một số thử nghiệm trên mô hình động vật *in vitro* và *in vivo* đã kiểm chứng các công dụng trên. Người Ấn Độ ở vùng nông thôn Uttakhand, sử dụng vỏ cây Thanh Mai để chữa ho mãn tính, hen suyễn và loét (Gangwar *et al.*, 2010), trong khi đó, hít bột của vỏ cây có thể chữa được đau đầu (Kumari *et al.*, 2011). Vỏ cây được sắc thuốc giúp giải nhiệt và chữa đau răng, chữa cảm lạnh (Pandey *et al.*, 2016). Quả được sử dụng để ăn sống hoặc dùng làm đồ uống giải khát giúp thanh nhiệt và chống lại bệnh kiết lỵ (Kayang, 2007).

Giá trị dinh dưỡng

Các báo cáo phân tính, đánh giá hàm lượng dinh dưỡng của Quả Thanh Mai cho thấy chúng có chứa nhiều chất xơ, protein, chất béo, carbonhydrate và nhiều khoáng chất khác như Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu (Seal, 2011). Các kết quả được báo cáo trong Bảng 1 cho thấy việc sử dụng quả có thể cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng thiết yếu nếu được tiêu thụ đủ số lượng.

Các chất có hoạt tính sinh học

Phân tích các chất có hoạt tính sinh học được thực hiện trên quả, lá và vỏ cây Thanh Mai cho thấy sự hiện diện của các thành phần hoạt chất khác nhau. Các hoạt chất bao gồm các nhóm alkaloids, glycosides, diarylheptanoids, ionones, steroids, saponin, triterpenoids vàcác hợp chất dễ bay hơi Bảng 2 (Singh *et al*, 2009).

Bảng 2.1. Hàm lượng dinh dưỡng của trái Thanh Mai (Sood, Shri, 2018)

Thông số	Giá trị
Tro (%)	2.18 ± 0.02
Lượng nước (%)	72.33 ± 0.23
Chất béo (%)	4.93 ± 0.06
Chất xơ (%)	5.22 ± 0.08
Protein (%)	9.62 ± 0.03
Carbohydrates (%)	78.03 ± 0.14
Năng lượng (Kcal/g)	395.04 ± 0.54
Chất khoáng (mg/g):	
Canxi	4.63 ± 0.06
Magie	8.4 ± 0.20
Kali	7.75 ± 0.11
Photpho	0.24 ± 0.25
Natri	0.81 ± 0.013
Mangan	0.032 ± 0.0001
Kẽm	0.216 ± 0.0016
Sắt	0.404 ± 0.0021
Đồng	0.004 ± 0.0002

Bảng 2.2. Thành phần hoạt chất của cây Thanh Mai (Sood, Shri, 2018)

Hoạt chất	Vật liệu thực vật
Tanin và Phenolic	
Tannin, ascorbic acid	Quả
Gallic acid	Vỏ, quả, lá
Catechin, cholorogenic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, trans-cinnamic acid, ellagic acid	Quả
Ethyl-β-D-glucopyranoside; 3-hydroxybenzaldehyde, isovanillin, 4-(hydroxymethyl) phenol, 4-methoxybenzoic acid	Lá
Castalagin, epigallocatechin-3-*O*-gallate; epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin- 3-*O*-gallate; 3-*O*-galloylepigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-3-*O*-gallate	Vỏ
Flavonoids:	
Myricetin	Vỏ, quả, lá
Quercetin	Lá
Flavonoid Glycosides:	
Myricitrin (myricetin 3-*O*-rhamnoside)	Vỏ, lá
Flavone 4'-hydroxy-3',5,5'-trimethoxy-7-O-β-D-glucopyranosy) (1→4)-α-L- rhamnopyranoside; flavone 3',4'-dihydroxy-6-methoxy-7-O-α-L-rhamnopyranoside	Lá
myricetin-3-*O*-(3"-*O*galloyl)-α-L-rhamnoside; myricetin-3-*O*-(2"-*O*galloyl)-α-L galactopyranosideside; myrecetin 3-*O*-(2"-*O*-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside	Vỏ
Steroids:	
β–sitosterol	Vỏ, lá
Taraxerol	Vỏ
Stigmasterol	Vỏ

β-rosasterol, daucosterol	Lá
β-sitosterol-β-D-glucopyranoside	Lá
Ionones:	
Corchoionoside C; (6*S*,9*R*)-roseoside	Lá
Diarylhetanoids:	
Myricanol	Vỏ, lá
Myricanone	Vỏ, lá
16 bromomyricanol	Vỏ
5-*O*-*β*-D-glucopyranosyl myricanol	Lá
Terpenes:	
3-*epi*-ursolic acid; 3-*O*-(*E*)-caffeoylursonic acid	Lá
Lupeol; oleanolic acid;	Vỏ
Triterpene diol (3β,28-dihydroxytaraxerane)	Vỏ
3β,30-dihydroxy-taraxerane-23-oic acid; 3β,28,30-trihydroxy-taraxara-23-oic acid; 3β,12α,28,30-tetrahydroxytaraxeran-23-oic acid	Vỏ
Monoterpinoidal glycosides: myresculoside (4-hydroxy-1,8-cineole 4-*O*-*β*- dapiofuranosyl (1→6)-*β*-D-glucopyranosie); (1*S*,2*S*,4*R*)-2-hydroxy-1,8-cineole *β*-D- glucopyranoside	Lá
Triterpinoidal glycosides: arjunglucoside	Lá
Proanthocyanidin:	
Proanthocyanidin acetate, proanthocyanidin methyl-ether	Vỏ
prodelhinidin	Vỏ
Volatile compounds:	
Nerolidol, α-pinene, α-selinene, β-caryophyllene, β-selinen, α-caryophyllene, α-cadinol, linalool	Lá
n-Hexadecanol; eudesmol acetate; palmitic acid; cis-β-caryophyllene; n-pentadecanol; n-octadecanol	Vỏ
Saponin:	
Arjunolic Acid	Lá
Khác:	
Amino acids: L-Hydroxyproline, iso-leucine, valine, 2-aminobutyric acid, L-cystein hydroxyl, L-cystein hydroxychloride, alanine, leucine, tryptophan, glutamic acid, tyrosine, threonine, lysine monochloride	Quả
2-Furancarboxyaldehyde, 2,5-furandionedihydro-3-methylene, furfural, oxirane, myo-inositol, 1-ethyl-4-methylcyclohexane, methyl-d-lyxofuranoside	Quả

Điều kiện sinh thái quan trọng của các loài thuộc chi Myrica là nhóm không thuộc họ đậu nhưng có khả năng cộng sinh với nấm *Frankia* spp. (nhóm vi sinh vật cộng sinh cố định đạm). Nốt sần tương tự ở cây họ đậu được tìm thấy trên các đối tượng *Myrica gale* thuộc chi Myrica trong nghiên cứu của Bond và cộng sự, 1954. Loài *Myrica gale* được sử dụng làm thức ăn cho gia súc (Singh, 1982). Loài này cũng được sử dụng làm gỗ bởi tỷ lệ sinh khối/tro chiếm tỷ lệ cao tương tự như các loài dùng làm gỗ khác *Alnus nepalensis*, *Aesculus indica*, *Juglans regia*... (Pandey, 2002).

Sự tái sinh của các loài thực vật được dùng làm lương thực hoặc thực phẩm trong tự nhiên nói chung và cây Thanh Mai nói riêng đều kém bởi trình trạng khai thác quá mức và mất dần điều kiện sinh thái cần thiết cho quá trình tái sinh (Sundriyal, Sundriyal, 2001).

Với nhu cầu ngày càng tăng của cây giống cho chương trình trồng rừng, điều quan trọng là phải sàng lọc và đánh giá khả năng nảy mầm và khả năng sống sót của chúng (Wang, 1991). Trong trường hợp cây hoang dại ăn được, cây giống trưởng thành là một vấn đề vì tất cả các địa điểm có thể tiếp cận được đều được tìm kiếm bởi các cư dân thu gom thực vật và bán chúng trên thị trường. Hơn thế nữa, việc nghiên cứu nảy mầm của các loài cây hữu ích về mặt kinh tế cần được ưu tiên chú ý để đưa chúng vào các chương trình trồng rừng.

Cây giống Thanh Mai được thu nhận trong điều kiện tự nhiên càng lúc càng ít, loài này thường tái sinh bằng hạt trong tự nhiên. Tuy nhiên, lớp vỏ bên ngoài quá dày khiến nước khó thấm vào bên trong, do đó, tỷ lệ nảy mầm là rất thấp (Bhatt, Dhar, 2004).

M. esculenta biểu hiện cụ thể qua môi trường sống, chúng sống dưới tán rừng thông nên đây là môi trường thích hợp cho chúng tái sinh và tỉ lệ nảy mầm cao của hạt thu được dưới điều kiện này (Rawal *et al*, 2003). Các nghiên cứu trên các loài đơn tính (cây cái và cây đực riêng), cho thấy khi phạm vi khu phân bố bị thu hẹp và môi trường sống nghèo nàn, xu thế cho thấy tỉ lệ cây đực thường nhiều hơn cây cái (Rawal *et al*, 2003).

Khả năng nảy mầm thấp của hạt cây Thanh Mai trong điều kiện tự nhiên là rất thấp so với các loài cây rừng khác, do đó nhân giống thông qua nuôi cấy mô, cắt cành, giâm hom, ghép cây là phương thức chủ yếu cho quá trình nhân rộng quy mô loài cây này.

2.1.2 Tình hình nghiên cứu *in vitro* giống cây Thanh Mai trong và ngoài nước:

Tình hình nghiên cứu *in vitro* cây Thanh Mai trên thế giới:

Thanh Mai là cây ăn quả đơn tính và cây cái có giá trị hơn về mặt kinh tế so với cây đực. Do đó, vi nhân giống dường như là cách duy nhất để nhân nhanh các cây đã chọn. Việc nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được thực hiện đầu tiên bởi Mandwani, 1994. Trong khi đó, Bhatt và Dhar, 2004 đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường, chất điều hòa auxin-cytokinin đến ảnh hưởng quá trình tăng trưởng chồi và ra rễ ở các chồi Thanh Mai giống cái.

Tình hình nghiên cứu *in vitro* cây Thanh Mai trong nước:

Ở nước ta chưa có một công bố nhân giống vô tính *ex vitro* cây Thanh Mai hoặc nghiên cứu nhân giống vô tính *in vitro*. Theo phương pháp nhân giống truyền thống giâm hom ngoài vườn ươm có những hạn chế như: phụ thuộc vào thời tiết và mùa vụ, cây con thường bị nhiễm bệnh dẫn đến sinh trưởng phát triển kém và thoái hóa, hệ số nhân giống thấp, cây con không đồng nhất và số lượng không đủ nhiều để trồng trên quy mô lớn. Ứng dụng công nghệ sinh học - nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống cây Thanh Mai có thể khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống. Kết quả của nghiên cứu này góp phần xây quy trình nhân giống *in vitro* cây Thanh Mai.

2.2 Nuôi cấy mô tế bào thực vật

Trong 5 thập kỷ qua đã có nhiều báo cáo về kỹ thuật vi nhân giống. Vi nhân giống là sự nhân giống vô tính với số lượng của cây trồng thông qua nuôi cấy mô *in vitro*. Kỹ thuật nuôi cấy này đã được ứng dụng rộng rãi trong việc nhân giống các loài cây cảnh và những loài khác trên toàn thế giới.

Nhân giống *in vitro* hay nuôi cấy mô tế bào thực vật đều là thuật ngữ mô tả phương thức nuôi cấy các bộ phận của thực vật trong ống nghiệm có chứa môi trường dinh dưỡng xác định ở điều kiện vô trùng. Môi trường nuôi cấy có các chất dinh dưỡng thích hợp như muối khoáng, vitamin, các hormon sinh trưởng và đường. Kỹ thuật nuôi cấy mô cho phép tái sinh chồi hoặc cơ quan từ các mô như lá, thân, hoa hoặc rễ.

Các loại môi trường trong nuôi cấy mô thực vật:

Mức độ thành công của việc nuôi cấy mô tế bào hoặc nuôi cấy cơ quan đều liên quan đến nhiều yếu tố. Yếu tố quan trọng là lựa chọn thành phần dinh dưỡng và chất điều tiết sinh trưởng. Trong hai đến ba thập kỷ qua đã có nhiều báo cáo về thành phần của các môi trường cơ bản. Hiện nay, có hơn 50 công thức môi trường khác nhau được sử dụng cho nuôi cấy *in vitro* nhiều loại cây khác nhau. Trong đó môi trường MS được sử dụng phổ biến nhất, có cải biên bằng sự thay đổi thành phần các vi lượng.

Môi trường dinh dưỡng bao gồm các loại muối vô cơ, nguồn cacbon, vitamin và chất điều tiết sinh trưởng. Một số thành phần khác có thể được bổ sung thêm như nitơ vô cơ, acid vô cơ và chất chiết cây trồng. Các muối khoáng được sử dụng như là thành phần của môi trường nuôi cấy mô tế bào. Hầu hết các môi trường chứa ít nhất 30 m*M* nitơ vô cơ và kali vô cơ. Muối amonium có thể được sử sụng từ 2 -20 m*M*. Ảnh hưởng của muối amonium có thể thay đổi từ ức chế đến hiệu quả. Nồng độ $CaSO_4$, photphat và muối Mg từ 1-3 m*M* là thích hợp. Ngoài ra trong môi trường cũng cần bổ sung thêm một số khoáng vi lượng.

Môi trường Murashige and Skoog – môi trường nuôi cấy mô rất phổ biến:

Môi trường MS được phát triển bởi 2 nhà khoa học thực vật Toshio Murashige và Skoog Folke K. vào năm 1962. Trong quá trình nghiên cứu một loại hormone mới, môi trường MS được sử dụng để nuôi cấy trên cây thuốc lá. MS với các số như 0 và 20 được sử dụng để đánh dấu hàm lượng đường.

Trong nuôi cấy mô, môi trường MS (Murashige - skoog, 1962) được sử dụng là môi trường căn bản trong nhiều nghiệm thức thí nghiệm khác nhau như đối với các loài cây thân thảo: Cây Lan gấm (*Anoectochilus formosanus Hayata*) (Trần Văn Minh, 2003), hoa Cẩm chướng (*Dianthus* spp.) và các cây thân gỗ thuộc họ cam quýt như : Cam (*Citrus sinensis*), Chanh (*Citrus limona*), Quýt (*Citrus reticulata*), Bưởi (*Citrus grandis*), cây Lê (*Pyrus communis* L (Europe, America)), *Pyrus bretsmeideri* Rehd (china)), cây Măng cụt (*Garcinia mangostana* L.) (Trần Văn Minh, 2003).

Môi trường Woody Plant Medium:

Woody Plant Medium ban đầu được xây dựng bởi Lloyd and McCown vào năm 1981 cho việc nuôi cấy chồi cho cây Nguyệt Quế núi Mountain Laurel (Kalmia latifolia). Kể từ đó, nó được sử dụng rộng rãi cho việc nhân giống của nhiều loài thực vật thân gỗ. Công thức là hỗn hợp dinh dưỡng của các muối vô cơ, vitamin và axit amin. Woody Plant Medium cung cấp tất cả các yếu tố đa lượng và vi lượng và được sử dụng là môi trường căn bản trong nhiều nghiệm thức thí nghiệm khác nhau như đối với các loài cây như trong trường hợp cây Anh đào (*Prunus avium* L.), Cây Populus (*Populus* spp.), cây Bơ *(Persea americana* Mill.)

Vai trò các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy.

Đối với cây trồng, các chất vô cơ đóng vai trò rất quan trọng. Ví dụ, Mg là một phần của phân tử diệp lục, Ca là thành phần của màng tế bào, N là thành phần quan trọng của amino axít, vitamin, protein và các axít nucleic. Tương tự, Fe, Zn và Mo cũng là thành phần của một số enzym. Các môi trường khác nhau có hàm lượng và thành phần chất khoáng khác nhau, ví dụ thành phần và nồng độ khoáng của môi trường White hoặc Knop khá nghèo nàn, nhưng lại rất giàu ở môi trường MS và B5. Muối khoáng là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật:

Muối khoáng là các vật liệu (nguồn N, S, P....) cho sự tổng hợp các chất hữu cơ.

Nitơ, lưu huỳnh, phốt-pho là các thành phần không thể thiếu của các phân tử protein, các axít nucleic và nhiều chất hữu cơ khác. Canxi và axít boric được tìm thấy chủ yếu ở thành tế bào, đặc biệt là canxi có nhiệm vụ quan trọng giúp ổn định màng sinh học.

Đóng vai trò như một thành phần không thể thiếu của nhiều enzym (là các cofactor): Magie, kẽm, sắt... và nhiều nguyên tố vi lượng là những phần quan trọng của các enzym.

Các ion của các muối hoà tan đóng vai trò quan trọng ổn định áp suất thẩm thấu của môi trường và tế bào, duy trì thế điện hoá của thực vật. Ví dụ, K và C rất quan trọng trong điều hoà tính thấm lọc của tế bào, duy trì điện thế và tham gia hoạt hoá nhiều enzym.

Trong môi trường, các muối khoáng được chia thành các nguyên tố vi lượng và đa lượng:

Các chất dinh dưỡng đa lượng bao gồm sáu nguyên tố: nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) và sulphur (S) tồn tại dưới dạng muối khoáng, là thành phần của các môi trường dinh dưỡng khác nhau. Tất cả các nguyên tố này là rất cần thiết cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật. Môi trường nuôi cấy phải chứa ít nhất 25 mmol/L nitrate và potassium. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy nguồn N cung cấp trong môi trường dưới cả 2 dạng nitrate và amonium (2-20 mmol/L) là tốt hơn cả. Trong trường hợp chỉ dùng amonium, thì cần phải bổ sung thêm một acid dạng mạch vòng (cycle acids), tricarboxylic acid hoặc một số acid khác nữa (dạng muối), như: citrate, succinate, hoặc malate sao cho mọi ảnh hưởng độc do nồng độ của amonium vượt quá 8 mmol/L trong môi trường được giảm bớt. Khi các ion nitrate và amonium cùng hiện diện trong môi trường nuôi cấy, thì ion sau được sử dụng nhanh hơn. Các nguyên tố chính khác, như: Ca, P, S và Mg, nồng độ thường dùng trong khoảng 1-3 mmol/L.

Các chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật:

Thực chất hormone là những phân tử tín hiệu được sản sinh trong cây, xuất hiện với nồng độ rất thấp (10^{-6} đến 10^{-5}). Hormone điều tiết các quá trình của tế bào cục bộ, và di chuyển tới các tế vị trí khác, tới các vị trí chức năng khác của cây. Hormone ảnh hưởng đến biểu hiện gen, phiên mã, phân chia và phát triển tế bào; có vai trò quyết định sự hình thành của hoa, cành, lá, sự rụng lá, sự phát triển và chín của quả. Ở thực vật không giống như động vật ở chỗ là chúng thiếu các tuyến sản xuất và tiết ra hormone, thay vào đó, mỗi tế bào sẽ sản xuất ra hormone. Do đó, sẽ định hình sự phát triển của cây, hạt, thời gian ra hoa, hoa đực hay hoa cái, già hóa của lá, của quả,.... Nếu thiếu hormone thì các tế bào sẽ không được biệt hóa, nghĩa là phát triển không có định dạng gì hết. Người ta còn gọi chất điều hòa thực vật là Phytohormone, chúng còn được tìm thấy trong các thực vật bậc thấp như tảo, các vi sinh vật như nấm, vi khuẩn, trong trường hợp này chúng không đóng vai trò chất chuyển hóa thứ cấp có nghĩa là vai trò nội tiết gián tiếp. Lưu ý hormone không phải là chất dinh dưỡng, chỉ đóng vài trò điều tiết sinh trưởng.

Chương 3
NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Vật liệu:

Vật liệu là mẫu *in vitro* của cây Thanh Mai trong phòng mô, được kế thừa từ các cây Thanh Mai nhân lên từ hạt Thanh Mai sau khi khử thành công và nuôi cấy trong môi trường WPM trong các nghiên cứu trước.

3.2 Địa điểm nghiên cứu:

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô và Nhà kính thuộc khoa Nông Lâm, trường Đại học Đà Lạt

3.3 Nội dung nghiên cứu:

+ Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Thanh Mai *in vitro*

+ Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây Thanh Mai *in vitro*

+ Khảo sát ảnh hưởng của IBA, NAA đến sự tạo rễ cây Thanh Mai *in vitro*

+ Đánh giá tỷ lệ cây sống sau khi đưa ra vườn ươm

3.4. Phương pháp nghiên cứu:

3.4.1Môi trường và điều kiện nuôi cấy:

Môi trường **MS (**Murashige and Skoog**)** (Phụ lục 1) và **WPM** (Lloyd and McCown, 1981) (phụ lục 2) là môi trường được sử dụng trong nghiên cứu nhân giống in vitro, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất như: BA (6-Benzyl adenine), IBA (β-Indole butyric acid), NAA(α-naphthaleneaceticd).

Các thành phần khác: Đường sucrose (30 g/l), Agar (8.5 g/l). Môi trường được điều chỉnh về pH= 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng ở 1atm (121^0C) trong 25 phút. Điều kiện nuôi cấy, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 34 µmol.m-2.s-1, nhiệt độ 25 ± 2°C và độ ẩm không khí 75 - 85%.

3.4.2. Bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm 1. *Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Thanh Mai* in vitro*:* Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân in vitro của cây Thanh Mai (hình 2.1), môi trường thí nghiệm là 2 loại môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) và WPM (Lloyd and McCown, 1981) có bổ sung 0.5 BA, 30 g/l sucrose, 8.5 g/l

agar, pH=5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu với 3 lần lặp lại. Sau 12 tuần nuôi cấy tiến hành lấy số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao mẫu (cm), chiều dài rễ/mẫu.

Chỉ tiêu Môi trường	Chiều cao (cm)	Chiều dài rễ (cm)
MS + 0,5 BA	B2	B3
WPM + 0,5 BA	B4	B5

Thí nghiệm 2. *Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi*: Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro* của cây Thanh Mai (hình 2.1) thu được từ thí nghiệm trước. Môi trường thí nghiệm là WPM có bổ sung nồng độ BA thay đổi từ 0; 0,5; 1; 1,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 8.5 g/l agar, pH=5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu với 3 lần lặp lại, sau 19 tuần nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao mẫu (cm), số chồi/mẫu.

Thí nghiệm 3. *Khảo sát ảnh hưởng của IBA, NAA đến sự tạo rễ* in vitro: Vật liệu nuôi cấy là những chồi ngọn *in vitro* cây Thanh Mai (hình 2.1) thu được từ thí nghiệm trước. Môi trường thí nghiệm là WPM có bổ sung mg/l IBA, NAA, 30 g/l sucrose, 8.5 g/l agar, Ph=5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu với 3 lần lặp lại, sau 19 tuần nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao mẫu (cm), chiều dài rễ (cm).

Thí nghiệm 4. *Đánh giá tỷ lệ cây sống sau khi đưa ra vườn ươm*: Cây con *in vitro* Thanh Mai sau 2 tháng nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh được đưa ra vườn ươm chăm sóc, sau 5 tuần đánh giá tỷ lệ cây sống (%). Giá thể trồng gồm xơ dừa và đất đen với tỷ lệ 1: 1, độ ẩm 90% trong 15 ngày đầu, cây con thuần hóa trong điều kiện ánh sáng tự nhiên, mức độ che bóng 50%, không bổ sung phân trong suốt thời gian nghiên cứu.

4.4. Xử lý số liệu:

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê MstatC version1.2, 1989

Chương 4
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4. 1: Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Thanh Mai *in vitro*

Bảng 4.1: ảnh hưởng của môi trường khoáng MS và WPM đến chiều cao và chiều dài rễ của cây Thanh Mai *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu / Môi trường	Chiều cao (cm)	Chiều dài rễ (cm)
MS + 0.5 BA	3.59 b	0 b
WPM + 0.5 BA	5.73 a	1.43 a

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P <= 0,005

Ảnh hưởng của môi trường khoáng MS và WPM đến chiều cao và chiều dài rễ của đốt thân *in vitro* Thanh Mai sau 12 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4.1. Kết quả cho thấy môi trường khoáng WPM có ảnh hưởng tốt lên chiều cao mẫu trung bình cao 5.73 cm đồng thời giúp tạo rễ ở các mẫu với chiều dài trung bình 1.43cm sau 12 tuần nuôi cấy, đối với môi trường MS, mẫu chỉ cao trung bình 3.59 cm và không tạo rễ cho mẫu. Bên cạnh đó các đoạn thân và lá của mẫu ở môi trường WPM dài và to hơn so với đoạn thân và lá của mẫu ở môi trường MS.

Như vậy môi trường khoáng WPM (Lloyd and McCown, 1981) là môi trường có ảnh hưởng tốt đến chiều cao và sự tạo rễ của đốt thân in vitro Thanh Mai hơn so với môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962).



WPM MS

Hình 4.1: Mẫu ở hai nghiệm thức sau 12 tuần nuôi cấy

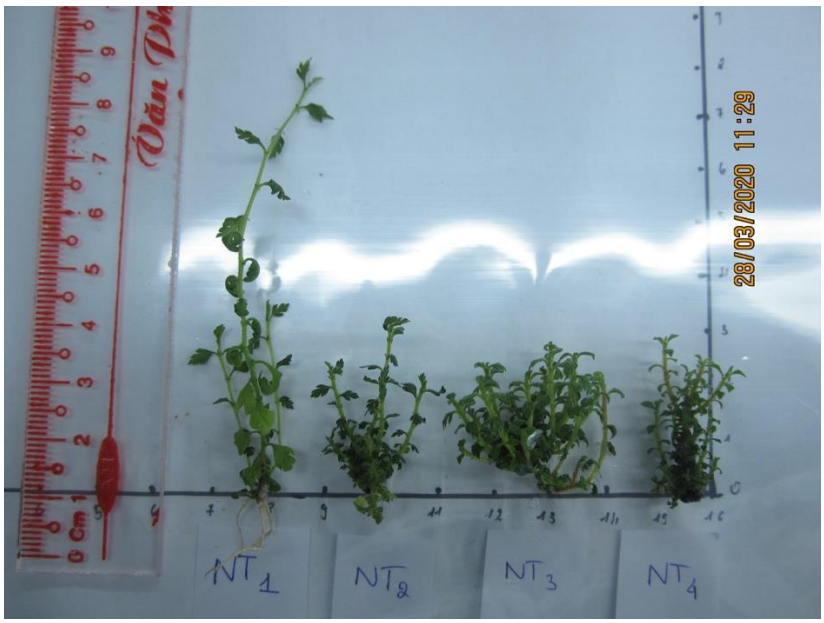
4.2. Nghiên cứu sự ảnh hưởng của BA đến sự tạo chồi Thanh Mai *in vitro*

Tốc độ nhân nhanh chồi của nhiều loài cây thân gỗ nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào loại và nồng độ chất điều tiết sinh trưởng đặc biệt là các chất thuộc nhóm cytokinin bổ sung vào môi trường. Nghiên cứu của Whitehead và Giles (1977) nuôi cấy thành công cây *Populus nigra* và *Populus yunnanensis* với chất kích thích sinh trưởng là BA (0,2mg/l); Raj và ctv, (1983) với cây *Populus alba*, *P.grandidentata*, *P. tremula* với nồng độ BA là 0,4 mg/l, *Pinus wallichiana* (Mathur và Nadgauda, 1999) sử dụng BA với nồng độ 2,5 µM; Naik và ctv, (1998) với cây Pomegranate (*Punica granatum* L.cv. Ganesh) với nồng độ 0,5 mg/l BA trong môi trường MS cho kết quả tốt nhất. Trong thí nghiệm ở cây Thanh Mai cũng có những kết quả tương tự trên môi trường WPM.

Bảng 4. 2: Ảnh hưởng của BA đến sự tạo chồi Thanh Mai in vitro sau 19 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	Chiều cao (cm)	Số chồi/ mẫu
0.0	6.08 a	1.20 b
0.5	2.39 b	8.33 a
1.0	2.06 b	13.0 a
1.5	2.11 b	7.80 a
LSD (0.05)	*3.02*	*5.396*

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P <= 0,005



Hình 4.2. Chồi của Thanh Mai sau 19 tuần nuôi cấy in vitro

Bảng 4. 2 cho thấy, khi tăng nồng độ từ 0 đến 1.0mg/l thì hệ số tạo chồi Thanh Mai cũng tăng lên, cụ thể hệ số tạo chồi là 1.2 chồi/ mẫu ở môi trường 0mg/l BA và tăng lên 13 chồi/mẫu ở môi trường bổ sung 1mg/l BA. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ BA thì hệ số tạo chồi Thanh Mai lại giảm xuống, cụ thể hệ số tạo chồi ở môi trường có 1.5mg/l BA là 7.8 chồi/mẫu.

Đối với chỉ tiêu chiều cao chồi, ở môi trường với nồng độ 0 mg/l BA cho chiều cao cây cao nhất với hệ số là 6.080 cm, tiếp đó chiều cao cây giảm dần từ nồng độ 0.5 đến 1mg/l BA, cụ thể hệ số chiều cao là 2.060cm ở môi trường có bổ sung 1.0mg/l BA, nhưng chiều cao cây lại tăng lên lại ở môi trường bổ sung 1.5mg/l BA với hệ số chiều cao là 2.107cm.

Qua kết quả trên cho thấy, BA ở nồng độ 1.0mg/l BA sẽ kích thích khả năng tạo chồi Thanh Mai cao, nhưng lại hạn chế thúc đẩy sinh trưởng chiều cao của thân. Và khi tăng nồng độ lên ngưỡng 1.5mg/l BA thì có xu hướng hạn chế khả năng tạo chồi và kích thích thúc đẩy sinh trưởng chiều cao của cây.

Biểu hiện khác biệt về các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của chồi Thanh Mai nuôi cấy trong môi trường WPM có bổ sung các nồng độ BA khác nhau cho thấy khi tăng nồng độ BA lên cao, số lượng chồi hình thành trên mẫu cấy giảm. Các nghiên cứu của Kang, (1994) trên cây Nho đã ghi nhận là khi trong môi trường chứa nồng độ BA thấp

sẽ làm chồi cây tăng dài ra nhưng lại là nguyên nhân làm giảm sự tăng sinh số chồi bên. Ngược lại, khi nồng độ BA bổ sung vượt quá ngưỡng tối ưu cũng làm giảm số lượng cũng như chất lượng chồi hình thành (Kang, 1994). Nồng độ cytokinin cao sẽ làm giảm số lượng chồi sinh sản, đặc biệt khi sử dụng nồng độ BA cao sẽ cho chất lượng chồi không tốt, chồi hình thành dạng hoa thị hoặc những nốt nhỏ ở cuối gốc. Nồng độ BA có ảnh hưởng đến chất lượng của chồi hình thành ở trong thí nghiệm của chúng tôi cũng phù hợp với những nhận định nói trên. Như vậy, môi trường WPM có bổ sung 1mg/l BA là thích hợp nhất cho việc tạo chồi Thanh Mai *in vitro* trong bốn nghiệm thức trên

4.3. Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ cho cây Thanh Mai in vitro

Để tạo được rễ cây thường được cấy vào môi trường có auxin như IBA, NAA, nồng độ và thời gian xử lý phụ thuộc vào từng loại cây, ghi nhận được qua cây *Acacia mangium* (Monteuuis, 2000). IBA, NAA là những auxin thông dụng được xử lý kích thích ra rễ thứ cấp ức chế hình thành chồi thứ cấp và chồi phụ. Negussie (1997) đã thành công khi sử dụng IBA với nồng độ 1mg/l và NAA với nồng độ 0.5 mg/l để cho ra rễ cây *Juniperus excelsa.*

IBA là auxin thông dụng cho việc tạo rễ đối với một số cây như *Artocarpus heterophyllus* (Rahman và Blake, 1988), *Morus nigra* (Yadav và ctv, 1990). Tùy theo đối tượng cây trồng khác nhau mà chúng ta sử dụng kết hợp hoặc riêng rẽ các auxin.

Chồi có thể tạo rễ một cách bình thường trong quá trình nhân giống mà không cần tách biệt làm hai giai đoạn tạo chồi và tạo rễ. Tuy nhiên điều này hiếm khi thấy ở các đối tượng cây gỗ khi nuôi cấy *in vitro*.

IBA, NAA và IAA là những auxin thông dụng được xử lý kích thích ra rễ thứ cấp ức chế hình thành chồi thứ cấp và chồi phụ. Ở nồng độ thấp, auxin kích thích tạo rễ thứ cấp nhưng ở nồng độ cao chúng ức chế việc tạo rễ mà lại kích thích việc tạo callus (Pierik, 1987).

Trong 19 tuần nuôi cấy trong môi trường có bổ sung auxin, chồi Thanh Mai hình thành nên rễ thể hiện ở bảng 4.3 và các hình 4.2).

Bảng 4.3: Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro* cây Thanh Mai sau nuôi cấy

IBA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)
0	4.59 b	0.73 b
0.5	7.71 a	4.39 a
1	4.06 b	1.18 b
1.5	2.6 b	0.57 b
LSD (0.05)	2.52	1.45

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P <= 0,005

Kết quả ở bảng 4.3 cho thấy, mẫu cây ở môi trường không bổ sung và có bổ sung chất kích thích sinh trưởng đều tạo rễ. Tuy nhiên ở những môi trường không bổ sung và bổ sung ở nồng độ khác nhau thì sự tạo rễ khác nhau. Ở nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l IBA có tỷ lệ mẫu cho chiều dài rễ cao nhất (4.39 cm) , trong khi đó, ở môi trường không có IBA, môi trường có bổ sung 1 mg/l IBA và bổ sung 1.5 mg/l IBA thì tỷ lệ chiều dài rễ thấp hơn. Khi nồng độ IBA tăng lên 1 mg/l IBA và 1.5 mg/l IBA thì chiều dài rễ bị kìm hãm và ngắn hơn so với môi trường bổ sung 0.5 mg/l IBA



Hình 4.3. Rễ của Thanh Mai sau 19 tuần nuôi cấy in vitro

Kết quả ở bảng 4.3 cũng cho thấy, chiều cao của chồi Thanh Mai ở các nghiệm thức trên cũng có sự khác biệt rõ rệt. Chiều cao ở môi trường có bổ sung 0.5 mg/l IBA cao nhất (7.71 cm), khi nồng độ IBA tăng lên 1 mg/l IBA và 1.5 mg/l IBA thì chiều cao bị kìm hãm và thấp hơn so với môi trường bổ sung 0.5 mg/l IBA

Qua đây cho thấy, IBA ở nồng độ thấp (0.5 mg/l IBA) thì kích thích tăng chiều cao của chồi và chiều dài rễ, nhưng khi nồng độ IBA tăng cao thì có tác dụng ngược lại, ức chế sự tăng trưởng chiều cao của chồi và chiều dài rễ.

Hiện nay trên thế giới và trong nước chưa thấy công bố nào nghiên cứu tạo rễ *in vitro* cây Thanh Mai. IBA là một chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin có tác dụng kích thích tạo rễ, tùy theo từng đối tượng cây trồng mà có những độ thích hợp cho việc tạo rễ khác nhau, và tỷ lệ tạo rễ cũng phụ thuộc vào từng loại cây trồng. Ở nhiều loài cây dược liệu, khi gia tăng nồng độ của IBA thường dẫn đến việc hình thành rễ bị ức chế (Hossain et al., 1992). Rout et al., (1999) đã báo cáo cảm ứng ra rễ từ các chồi con của cây *Plumbago zeylanica* trên môi trường ½ MS có bổ sung 0,25 mg/l IBA với 2% sucrose. Cây Sâm bố chính tạo rễ *in vitro* đạt 100% khi môi trường nuôi cây có bổ sung 0,1 – 1 mg/l IBA (Phan et al., 2017). Nguyen (2003) khi nghiên cứu tạo rễ *in vitro* loài *Anoectochilus formosanus*, kết quả cho thấy, tất cả chồi cây ở môi trường không có chất kích thích sinh trưởng đều tái sinh rễ 100%. Mustafa & Atalay (2015) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Việt quất, kết quả tạo rễ cao nhất chỉ đạt 60%. Nguyen et al., (2018) nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Lá bép, kết quả cho thấy, tỷ lệ tạo rễ *in vitro* cao nhất chỉ đạt 40%. Như vậy, môi trường WPM có bổ sung 0.5 mg/l IBA thích hợp cho việc tạo rễ in vitro cây Thanh Mai.

4. 4 Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng của cây Thanh Mai nuôi cấy *in vitro*

Bảng 4.4. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự sinh trưởng cây Thanh Mai sau 19 tuần nuôi cấy *in vitro.*

Nghiệm thức NAA(mg/l)	Chiều cao (cm)	Số chồi/mẫu	Chiều dài rễ/mẫu (cm)
0	4.25a	1.33b	2.92
0.5	3.92ab	4.50a	4.92
1.0	4.42a	2.83ab	4.67
1.5	2.75b	3.50ab	2.88
LSD (0.05)	1.41	2.34	2.79

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P <= 0,005

Kết quả ở bảng trên cho thấy, mẫu cây ở môi trường không bổ sung và có bổ sung NAA đều cho cây Thanh Mai nuôi cấy invitro sinh trưởng. Tuy nhiên ở những môi trường không bổ sung và bổ sung ở nồng độ khác nhau thì sự sinh trưởng khác nhau.

Ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/l NAA có tỷ lệ mẫu cho chiều dài rễ cao nhất (4.92 cm) trong khi đó, ở nghiệm thức không bổ sung NAA, có bổ sung 1 mg/l NAA và bổ sung 1.5 mg/l NAA thì tỷ lệ chiều dài rễ thấp hơn.



Hình 4.4. Rễ cây Thanh Mai sau 19 tuần nuôi cấy *in vitro* trong môi trường bổ sung NAA

Kết quả ở bảng 4.4 cũng cho thấy, số chồi Thanh Mai ở các nghiệm thức trên cũng có sự khác biệt rõ rệt. Tỷ lệ tạo chồi ở môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA nhiều nhất , khi nồng độ NAA tăng lên 1 mg/l NAA và 1,5 mg/l NAA thì số chồi ít hơn. Môi trường không bổ sung NAA có tỷ lệ tạo chồi là thấp nhất.

Như vậy, ở môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA kích thích cho số chồi và chiều dài rễ của chồi là cao nhất, nhưng khi nồng độ NAA tăng cao thì có tác dụng ngược lại, ức chế tăng trưởng cả chiều cao và chiều dài rễ của Thanh Mai nuôi cấy *in vitro*. Trong khi đó môi trường không bổ sung NAA cho tỷ lệ tạo chồi và chiều dài rễ là thấp nhất.

4.5 Đánh giá tỷ lệ cây sống sau khi đưa ra vườn ươm

Cây con in vitro khi đã phát triển hoàn chỉnh có đầy đủ thân, lá và rễ sẽ được chuyển ra vườn ươm. Đây là giai đoạn khó khăn trong kỹ thuật nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô. Cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ, ẩm độ... nên khi chuyển ra giá thể vườn ươm với các điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn như dinh dưỡng thấp, ánh sáng có cường độ mạnh, nhiệt độ cao, ẩm độ thấp... cây con dễ bị stress, dễ mất nước và mau bị héo. Mặt khác trong môi trường tự nhiên có rất nhiều vi khuẩn và nấm gây bệnh làm thối và chết cây.

Bảng 4.5. Tỷ lệ cây Thanh Mai in vitro sống sau 5 tuần chăm sóc ở điều kiện nhà kính.

	Số lượng cây *in vitro*	Số cây *in vitro* sống sau 5 tuần	Tỷ lệ cây sống
Lần 1	50	39	78 (%)
Lần 2	50	44	88 (%)
Lần 3	50	42	84 (%)

Kết quả nghiên cứu tỷ lệ sống sót của cây Thanh Mai in vitro có nguồn gốc từ nuôi cấy hạt khi chuyển ra trồng ngoài điều kiện vườn ươm cho thấy tỷ lệ sống đạt khoản từ 78% đến 88%. Đây là tỷ lệ sống khá cao, điều này cho thấy cây đã thích nghi được với điều kiện bên ngoài, tuy nhiên cần nghiên cứu thêm loại giá thể phù hợp cho sự thích nghi với điều kiện bên ngoài của cây Thanh Mai nhằm nâng cao tỷ lệ sống sót của cây Thanh Mai trong vườn ươm.



Hình 4.5. Cây Thanh Mai sau 5 tuần đưa ra vườn ươm

Chương 5
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Từ kết quả của thí nghiệm nhận thấy Môi trường WPM (Lloyd and McCown), 1981 bổ sung 30 g/l đường và 8.5 g/l agar pH=5.8 là loại môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của chồi Thanh Mai *in vitro*.

Môi trường WPM có bổ sung 1 mg/l BA; 30 g/l đường và 8.5 g/l agar; pH=5.8 là tốt nhất cho sự tạo chồi Thanh Mai *in vitro*.

Đối với nghiệm thức ra rễ cây Thanh Mai *in vitro*, trên môi trường WPM có bổ sung 0.5 mg/l IBA là tốt nhất cho sự tạo rễ của cây Thanh Mai in vitro. Tương tự, trên môi trường WPM có bổ sung 0.5 mg/l NAA là tốt nhất cho sự tạo rễ cây Thanh Mai *in vitro*.

Việc thuần hóa cây con Thanh Mai in vitro ngoài vườn ươm, tỷ lệ sống sót của cây Thanh Mai *in vitro* có nguồn gốc từ nuôi cấy hạt khi chuyển ra trồng ngoài điều kiện vườn ươm cho thấy tỷ lệ sống đạt khoản từ 78% đến 88%.

2. Kiến nghị

Cần tiến hành thêm nhiều nghiên cứu trong phòng thí nghiệm nhằm tăng tỷ lệ nhân nhanh cũng như giúp cây dễ thuần hóa thích nghi nhanh với điều kiện vườn ươm như các thí nghiệm về Quang tự dưỡng…

Cần nghiên cứu thêm loại giá thể phù hợp cho sự thích nghi với điều kiện bên ngoài của cây Thanh Mai nhằm nâng cao tỷ lệ sống sót của cây Thanh Mai trong vườn ươm.

Tiến hành triển khai việc trồng cây Thanh Mai ra ngoài rừng tự nhiên với các độ tàn che khác nhau nhằm tìm được mật độ tối ưu của cây Thanh Mai trồng xen trong rừng Thông 3 lá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng việt

1. Đinh Trung Chánh, 1998. *Vi nhân giống cây Dó Bầu (Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte*) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng*. Luận văn thạc sĩ Nông nghiệp. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
2. Trần Hợp, 2002. *Tài nguyên cây gỗ Việt Nam*. NXB nông nghiệp.
3. Trương Mai Hồng, 1997. *Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống in vitro cây Cẩm lai Bà Rịa (Dalbergia bariensis Pierre)*. Luận văn thạc sĩ Nông nghiệp. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
4. Mai Xuân Lương, 2003. *Giáo trình Sinh Lý Thực Vật.* Khoa đào tạo sau đại học, Trường Đại Học Đà Lạt.
5. Trần Văn Minh, 2003. *Công nghệ Sinh học Thực Vật*. Giáo trình cao học - Nghiên cứu sinh, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.
6. Trần Văn Minh, 1996. *Những phương pháp nâng cao tính đa dạng di truyền cây ăn trái.*
7. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997. *Bảo tồn nguồn gen cây rừng*. NXB nông nghiệp.
8. Ly Meng Seang, 2003. *Ứng dụng công nghệ tế bào thực vật trong nhân nhanh cây Giá Tỵ (Tectona grandis Linn. F) in vitro*. Luận văn thạc sĩ nông nghiệp. Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
9. Nguyễn Văn Uyển, 1984. *Nuôi cấy mô tế bào phục vụ công tác giống cây trồng.* NXB Nông nghiệp Hà Nội.
10. Mai Xuân Lương – *Giáo trình Sinh Lý Thực Vật* – Khoa đào tạo sau đại học - Trường Đại Học Đà Lạt – 2003
11. Ninh Khắc Bản, 2003. Điều tra đánh giá và biện pháp phát triển bền vững nguồn tài nguyên thực vật phi gỗ tại Vườn Quốc Gia Hoàng Liên, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* - số 3/2003.

Tài liệu tiếng anh

12. Ahenkan A., Boon E., 2010. Commercialization of non-timber forest products in Ghana: Processing, packaging and marketing. *Food Agric. and Env.*, 8: 962-969.
13. Balic M.J., Mendelsohn R., 1992. Assessing the economic value of traditional medicine from tropical rain forests. *Conserv. Biol.* 6, 128–130.
14. Bhatt I.D., Dhar U., 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. Ex D.Don: A high value wild edible of Kumaun Himalaya. *Afr. J. Biotechnol.* 3(10): 534-554.
15. Bhatt, I. D., & Dhar, U. (2004). Factors controlling micropropagation of Myrica esculenta buch.–Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology*, *3*(10), 534-540.
16. de Beer J.H., McDermott M., 1989. *The Economic Value of Non-Timber Forest Products in South- East Asia.* Amsterdam, The Netherlands Committee for IUCN
17. Gangwar K.K., Deepali, Gangwar R.S., 2010. Ethnomedicinal plant diversity in Kumaun Himalaya of Uttarakhand, *India Nat Sci* (8): 66-78.
18. Gusain Y.S., Khanduri V.P., 2016. *Myrica esculenta* wild edible fruit of Indian Himalaya: need a sustainable approach for indigenous utilization. *Eco Env Cons* (22): 267-270.

19. Hegde R., Suryaprakash S., Achpth L., Bawa K.S., 1996. Extraction of non-timber forest products in the forest of Biligiri Rangan Hills, India. I: Contribution to rural income. *Economic Botany* 50:243–251.
20. Heinzman, R., Reining C., 1990. Sustained Rural Development. Extractive forest reserves in the Northern Peten of Guatemala. *Tri Working paper* 37.
21. Jeeva S., Lyndem F.B., Sawian J.T., Laloo R.C., Mishra B.P., 2011. *Myrica esculenta* Buch.-Ham. ex D. Don.- a potential ethnomedicinal species in a subtropical forest of Meghalaya, northeast India. *Asian Pac J Trop Biomed* (1): 174-177.
22. Kala C.P., 2007. Prioritization of cultivated and wild edibles by local people in the Uttaranchal hills of Indian Himalaya. *Indian J Tradit Know* (6): 239-243.
23. Kayang H., 2007. Tribal Knowledge on wild edible plants of Meghalaya, Northeast India. *Indian J Tradit Know* (6):177-181.
24. Kirtikar K.R., Basu B.D., 1999. Indian Medicinal Plants. 2nd ed. Vol. III. New Delhi: International book distributors. p. 1699.
25. Kumari P., Joshi G.C., Tewari L.M., 2011. Diversity and status of ethnomedicinal trees of Almora district in Uttarakhand, India. *Int J Biodivers Conserv* (3): 298-326.
26. Maikhuri R.K., Semwal R.L., Singh A., Nautiyal M.C., 1994. Wild fruits as a contribution to sustainable rural development: A case study from the Garhwal Himalaya. *Int J Sustain Dev World Ecol* (1): 56-68.
27. Marshall E., Newton A.C., Schreckenberg K., 2005. Commercialization of Non-Timber Forest Products: First Steps in Analysing the Factors Influencing Success, *Int Fores Rev*, 5: 128-135.
28. Mendelsohn R., 1994. Non-timber forests products. In: Pancel, L. (Ed.), Tropical Forestry Handbook, vol. 02. Springer, Germany, 1425–1448.
29. Nandwani D., 1994. Clonal propagation of *M. esculenta* (Box- berry) A fruit bearing tree of north-east India. *Gartenbauwissenchaft (Horticultural Science)* 59(6): 264-267.
30. Ndoye O., Ruiz Pérez M., Eyebe A., 1998. The markets of nontimber forest products in the humid forest zone of Cameroon. Overseas Development Institute, London: ODI Rural Development. *Forestry Network Paper No. 22c.*
31. Pandey B. 2002. Ecology of *Myrica esculenta* Buch. Ham. Ex D. Don with special reference to natural regeneration and source dependent variation in propagation response. Ph.D. Thesis, Department of Botany, Kumaun University, Nainital.
32. Pandey G., Sharma B.D., Hore D.K., Rao N.K., 1993. Indigenous minor fruits' genetic resources and their marketing status in north-eastern hills of India. *Journal of Hill Research* 6:1–4.
33. Panthari P., Kharkwal H., Kharkwal H., Joshi D.D., 2012. Myrica nagi: A review on active constituents, Biological and therapeutic effects. *Int J Pharm Pharm Sci* (4): 38-42.
34. Parmar C., Kaushal M.K., 1982. *Myrica nagi*. In: Parmar C, Kaushal MK, editors. Wild Fruits of the Sub-Himalayan Region. New Delhi: Kalyani Publishers. p. 49-53
35. Peters C.M., Gentry A.H., Mendelsohn R.O. 1989. Valuation of an Amazonian. *Forest Nature*, 339: 655-656
36. Rawal R.S., Pandey B., Dhar U., 2003. Himalayan forest database- thinking beyond dominanta. *Current Science* 84(8): 990-994.

37. Sahu S., Sahu C.R., Yadav A., Rathod P., Chaturvedi S., Tripathi R., 2013. Review on Myrica esculenta A popular plant of Himalayan region. *J Chem Pharm Sci* (6): 93-7.
38. Seal T., 2011. Nutritional composition of wild edible fruits in Meghalaya state of India and their ethnobotanical Importance. *Res J Bot* (6):58-67.
39. Shiva M.P., Verma S.K., 2002. *Approaches to Sustainable Forest Management and Biodiversity Conservation: With Pivotal Role of Non-timber Forest Products*. Dehra Dun: Centre for Minor Forest Products, Valley Offset Printers.
40. Singh J., Lan V.K., Trivedi V.P., 1986. Pharmacognostic evaluation of Katphala (The bark of *Myrica esculenta* Buch–Ham). *Anc Sci Life* (6): 85-7.
41. Singh N., Khatoon S., Srivastava N., Rawat A., Mehrotra S., 2009. Qualitative and quantitative standardization of *Myrica esculenta* Buch.-Ham. Stem bark by use of HPTLC. *J Plana Chromat* (22): 287-91.
42. Singh, R.B., 1982. Fodder trees in India. Oxford and IBH publ., New Delhi.
43. Sood P., Shri R., 2018. A Review on Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Aspects of Myrica esculenta, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2-13.
44. Sundriyal M., Sundriyal R.C., 2001. Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: nutritive value of selected species. *Economic Botany*. 55 (3): 377- 390.
45. Tewari D.D., Campbell J.Y., 1995. Developing and sustaining non-timber forest products: some policy issues and concerns with special reference to India. *Journal of Sustainable Forestry* 3(1):53–79.
46. Uma S., Murali K.S., Uma Shaanker R., Ganeshaiah K.N., Bawa K.S., 1996. Extraction of non timber forest products in the forest of Biligiri Rangan Hills, India. 3. Productivity, extraction and prospects of sustainable harvest of Amla (*Phyllanthus emblica*). *Economic Botany* 50:270–279
47. Wang B.S.P., 1991. Tree and shrub seed. In: bradnock, W.T. (ed) Advances in Research and Technology of seed, Dehradun, India. p. 34 - 43
48. Yanthan M., Misra A.K., 2013. Molecular approach to the classification of medicinally important actinorhizal genus *Myrica*. *Indian J Biotechnol* 12:133-136.
49. Toshio Murashige, Skoog Folke K., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, *physiologia plantarum*, vol. 15 (3), 473 – 497
50. Lloyd G, McCown B., 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30, 421 – 427

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Môi trường MS (Murashige-skoog, 1962).

Khoáng đa lượng (Macronutrients (mg/l)):	
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1650mg/l
Calcium chloride ($CaCl_2$*$2H_2O$)	440mg/l
Magnesium sulfate ($MgSO_4$*$7H_2O$)	370mg/l
Kali nitrate (KNO_3)	1990mg/l
Potassium phospate (KH_2PO_4)	70mg/l
Khoáng vi lượng (Micronutrients (mg/l)):	
Boric Acid (H_3BO_3)	6.2mg/l
Na_2EDTA*$2H_2O$	37.2mg/l
KI	0.83 mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	0.025mg/l
Cupric Sulfate ($CuSO_4$*$5H_2O$)	0.25mg/l
Ferrous sulfate ($FeSO_4$*$7H_2O$)	27.8mg/l
Manganese sulfate($MnSO_4$*$4H_2O$)	22.3mg/l
Zinc Sulfate ($ZnSO_4$*$7H_2O$)8.6mg/l	
Sodium molybdate (Na_2MoO_4*$2H_2O$)	0.25mg/l
Vitamin:	
myo-Inositol	100mg/l
Nicotinic Acid	0.01mg/l
Pyridoxine*HCl	0.01mg/l
Thiamine *HCl	0.01mg/l
Glycine	2.0mg/l
Agar	7.0g/l
Sucrose	30g/l

**Phụ lục 2: Môi trường WPM(*Lloyd and McCown)*

Khoáng đa lượng (Macronutrients (mg/l)):	**Nồng độ**
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	400mg/l
Calcium chloride ($CaCl_2$*$2H_2O$)	96mg/l
Magnesium sulfate ($MgSO_4$*$7H_2O$)	370mg/l
Potassium sulfate (K_2SO_4)	990mg/l
Potassium phospate (KH_2PO_4)	170mg/l
Calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2$*$4H_2O$	556mg/l
Khoáng vi lượng (Micronutrients (mg/l)):	
Boric Acid (H_3BO_3)	6.2mg/l
Na_2EDTA*$2H_2O$	37.2mg/l
Cupric Sulfate ($CuSO_4$*$5H_2O$)	0.25mg/l
Ferrous sulfate ($FeSO_4$*$7H_2O$)	27.8mg/l
Manganese sulfate($MnSO_4$*$4H_2O$)	22.3mg/l
Zinc Sulfate ($ZnSO_4$*$7H_2O$)	8.6mg/l
Sodium molybdate (Na_2MoO_4*$2H_2O$	0.25mg/l
Vitamin:	
myo-Inositol	00mg/l
Nicotinic Acid	0.5mg/l
Pyridoxine*HCl	0.5mg/l
Thiamine *HCl	1.0mg/l
Glycine	2.0mg/l

Agar	7.0g/l
Sucrose	30g/l

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT THỰC VẬT ĐỂ PHÒNG TRỪ CỎ DẠI TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM TẠI LÂM ĐỒNG

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông lâm

Lâm Đồng, tháng 6 /2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

< SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT THỰC VẬT ĐỂ PHÒNG TRỪ CỎ DẠI TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM TẠI LÂM ĐỒNG >

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông lâm

Sinh viên thực hiện: Nguyễn Minh Quang — Nam, Nữ: Nam

Nguyễn Phi Công — Nam

Nguyễn Lâm Tuyết — Nữ

Huỳnh Trung Hậu — Nam

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: NHK41, Nông lâm — Năm thứ: 3 /Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Nông học

Người hướng dẫn: <TS. Trần Thị Minh Loan >

Lâm Đồng, tháng 6/2020

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài nghiên cứu khoa học này:

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Cô Trần Thị Minh Loan đã hướng dẫn tận tình, luôn theo dõi và giúp đỡ chúng tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu này.

Xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu Trường đại học Đà Lạt và các phòng ban đã tạo điều kiện cho chúng tôi được phát huy sự sáng tạo và ý tưởng của bản thân trong đề tài nghiên cứu khoa học này.

Xin Gửi lời tri ân đến thầy cô Khoa Nông lâm đã truyền đạt kiến thức, dạy dỗ, động viên, đóng góp ý kiến và tạo điều kiện cho chúng tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học và hoàn thành đề tài thuận lợi.

Cuối cùng là cảm ơn những nỗ lực và cố gắng của các thành viên trong nhóm trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn!

LỜI CAM ĐOAN

Nghiên cứu khoa học với đề tài "***Sử dụng dịch chiết thực vật để phòng trừ cỏ dại trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Lâm Đồng***" là công trình nghiên cứu của chúng tôi dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Thị Minh Loan.

Các kết quả nghiên cứu hoàn toàn trung thực, không sao chép hoặc gian trá và chưa được công bố dưới bất kỳ hình thức nào. Nếu có chúng tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn trước pháp luật và các quy định hiện hành.

Đà Lạt, ngày 25 tháng 6 năm 2020

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3

1.1 Tác hại của cỏ dại đối với cây trồng 3

1.2 Đặc điểm nguồn gốc các loài cây lấy dịch chiết 4

1.2.1 Cây bạch đàn 4

1.2.2 Cây thông 5

1.2.3. Cây dưa leo 6

1.3. Các biện pháp phòng trừ cỏ dại 7

1.3.1 Biện pháp vật lý 7

1.3.2 Biện pháp cơ học 7

1.3.3 Biện pháp hóa học 10

1.3.4 Biện pháp sinh học 12

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 18

2.1. Vật liệu nghiên cứu và địa điểm nghiên cứu 18

2.1.1 Vật liệu nghiên cứu 18

2.1.2 Thời gian và địa điểm nghiên cứu 18

2.2. Phương pháp nghiên cứu 18

2.2.1. Thu thập và tuyển chọn mẫu 18

2.2.2. Chuẩn bị và tiến hành chiết 18

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của ngưỡng nhiệt chiết đến khả năng nảy mầm của cỏ dại 19

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ dại 19

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 21

3.1: Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm hạt cỏ xuyến chi 21

3.1.1: Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ởngưỡng nhiệt độ 80^{o}C 21

3.1.2. Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ở ngưỡng nhiệt độ chiết 100^{o}C 22

3.1.3. Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ở ngưỡng nhiệt độ chiết 120^{o}C 25

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi 27

3.2.1. Ảnh hưởng của dịch chiết lá của thông ở các ngưỡng nhiệt độ chiết khác nhau đến khả năng kháng cỏ xuyến chi 27

3.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá tùng ở các ngưỡng nhiệt độ chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm cỏ xuyến chi 29

3.2.3. Ảnh hưởng của dịch chiết dưa leo ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm cỏ xuyến chi 31

3.2.4: Ảnh hưởng của dịch chiết bạch đàn ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi 32

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 35

4.1. Kết luận 35

4.2 Kiến nghị 35

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1 Các loài côn trùng có khả năng phòng trừ cỏ dại 14

Bảng 3.1 Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 80^{o} 21

Bảng 3.2: Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 100^{o}C 23

Bảng 3.3 Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 120^{o}C 25

Bảng 3.4. Ảnh hưởng dịch chiết lá thông đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm 27

Bảng 3.5: Bảng ảnh hưởng dịch chiết của tùng đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm 29

Bảng 3.6. Ảnh hưởng dịch chiết của dưa leo đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm 31

Bảng 3.7. Bảng ảnh hưởng dịch chiết của bạch đàn đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm 33

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Cỏ trên đồng ruộng *(Nguồn: Lê Duy Ninh, 2018)* 3

Hình 1.2 phun thuốc diệt cỏ hóa học *(Nguồn: Thúy Hà, 2015)* 4

Hình 3.1: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 80^{o}C sau 7 ngày gieo 22

Hình 3.2: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 100^{o}C sau 7 ngày gieo 24

Hình 3.3: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 120^{o}C sau 7 ngày gieo 26

Hình 3.4: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết thông ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo 28

Hình 3.5: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết tùng ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo 30

Hình 3.6: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết dưa leo ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo.....32

Hình 3.7: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo 34

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BVTV – Bảo vệ thực vật.

NSG – Ngày sau gieo.

TMO - (6S,7E,9S)-6,9,10-trihydroxy-4,7- megastigma dien-3-one.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN

CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Ảnh 4x6

Họ và tên: Nguyễn Minh Quang

Sinh ngày: 05 tháng 11 năm 1999

Nơi sinh: Lâm Đồng

Lớp: NHK41 Khóa: 41

Khoa: Nông Lâm

Địa chỉ liên hệ: Lớp NHK41

Khoa nông Lâm, Trường Đại học Đà Lạt

Điện thoại: 0919717934 Email: 1710683@dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP

**** Năm thứ 1:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL: 2.14/4

Sơ lược thành tích:

**** Năm thứ 2:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL:1.86/4

Sơ lược thành tích:

**** Năm thứ 3:*** **Học kỳ 1**

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL: 2.23/4

Sơ lược thành tích:

Ngày 25 tháng 06 năm 2020

Xác nhận của trường đại học

(ký tên và đóng dấu)

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Sử dụng dịch chiết thực vật để phòng trừ cỏ dại trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Lâm Đồng

- Sinh viên thực hiện: Nguyễn Minh Quang

- Lớp: NHK41 Khoa: Nông Lâm Năm thứ: 3 Số năm đào tạo: 4

- Người hướng dẫn: TS. Trần Thị Minh Loan

2. Mục tiêu đề tài:

Tìm ra dịch chiết loài thực vật có trong tự nhiên có tiềm năng phòng trừ cỏ dại hại cây trồng để giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

3. Tính mới và sáng tạo:

Đóng góp vào quy trình phóng trừ cỏ dại bằng biện pháp sinh học tại Lâm Đồng, giúp hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến cây trồng chính

4. Kết quả nghiên cứu:

Xác định được 4 loài thực vật (lá cây bạch đàn, thông, tùng và cây dưa leo) có tiềm năng làm dịch chiết để phòng trừ cỏ xuyến chi tại Lâm Đồng

5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:

6. Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài *(ghi rõ tên tạp chí nếu có)* hoặc nhận xét, đánh giá của cơ sở đã áp dụng các kết quả nghiên cứu *(nếu có)*:

Ngày 25 tháng 06 năm 2020

Sinh viên chịu trách nhiệm chính

thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài *(phần này do người hướng dẫn ghi):*

Ngày 25 tháng 06 năm 2020

Xác nhận của trường đại học	**Người hướng dẫn**
(ký tên và đóng dấu)	*(ký, họ và tên)*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều năm nay, cỏ dại luôn là mối quan tâm của các nhà trồng trọt, cỏ dại gây những thiệt hại nặng nề, ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng cây trồng. Cỏ dại cạnh tranh trực tiếp với cây trồng về nước, ánh sáng, không gian và chất dinh dưỡng. Ngoài ra, chúng còn gây ra thiệt hại gián tiếp về chất do giảm số lượng hạt giống, ô nhiễm hạt giống, làm khó khăn trong quá trình làm đất và thu hoạch (Anderson, 1983; Aston và Monaco, 1991). Cỏ dại có thể làm giảm tới 60 % năng suất cây trồng (Zumdahl, 2010), tổng sản phẩm nông nghiệp bị mất hàng năm gây ra từ nhiều nguồn trong đó cỏ dại chiếm tới 45%, sâu bọ chiếm khoảng 30%, còn lại bệnh hại chiếm khoảng 20% và những tác nhân khác làm làm giảm năng suất cây trồng là 5% (Rao, 2000). Nói chung, cứ tăng 1kg cỏ dại tương ứng với việc giảm 1kg cây trồng (Rao, 2000). Ước tính cỏ dại gây thiệt hại nhiều nhất trong nông nghiệp toàn cầu với thiệt hại khoảng 40 tỷ đô la mỗi năm (Monaco và ctg., 2002).

Thuốc diệt cỏ còn có thể gây độc cho vi sinh vật trong đất (Grossbart & Davies, 1976) gây suy giảm chất dinh dưỡng, độ phì nhiêu nhiêu của đất và hệ thống vi sinh vật đối kháng. Điều này có tác động trực tiếp đến nông nghiệp, bởi cây trồng sinh trưởng và phát triển phụ thuộc vào chất lượng đất. Toàn thế giới, thuốc diệt cỏ được tiêu thụ chiếm 47,5% trong tổng số 2 triệu tấn thuốc trừ sâu mỗi năm. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc diệt cỏ sẽ làm ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của người sử dụng (Sopeña và ctg., 2009). Theo nghiên cứu về chi phí và ảnh hưởng gián tiếp về thuốc hóa học ở Mỹ đã cho thấy: 45.000 trường hợp ngộ độc và gây tử vong, thiệt hại 12 triệu USD về chăn nuôi, 135 triệu USD do ong bị ngộ độc làm quá trình thụ phấn giảm, thiệt hại 70 triệu USD về mùa màng, 11 triệu USD thiệt hại về cá và động vật hoang dã và 140 triệu USD do các hoạt động y tế công cộng của thuốc trừ sâu được sử dụng trong nông nghiệp (Pimentel và ctg. 1980).

Lượng thuốc bảo vệ thực vật hóa học ở Việt Nam sử dụng khá lớn, đặc biệt là thuốc cỏ đã ảnh hưởng rất lớn đến hệ sinh thái đất, dẫn đến ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và động vật. Trong danh mục thuốc BVTV ở Việt Nam hiện nay có khoảng 217 hoạt chất với 664 tên thương phẩm đăng ký phòng trừ cỏ dại trên các loại cây trồng và đất trồng trọt. Theo thống kê từ Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (NN&PTNT), từ năm 2013 đến nay, Việt Nam nhập khẩu trung bình mỗi năm từ 500 – 700 triệu USD cho chi phí nhập khẩu thuốc bảo vệ thực vật. Thuốc diệt cỏ chiếm 48% (19.000 tấn), thuốc trừ sâu và trừ bệnh chiếm khoảng 32% (16.400 tấn). Theo số liệu của Viện Tài

nguyên môi trường quốc tế, lượng thuốc bảo vệ thực vật dùng trong 1 ha cây trồng/ năm: tại Việt Nam là 2kg/ha thì ở Thái Lan là 1,8kg/ha; tại Bangladesh là 1,1kg/ha; tại Senegal là 0,2kg/ha…

Hiện nay, tỉnh Lâm Đồng cũng như các tỉnh khác, để xử lý cỏ dại đa phần các nông dân sẽ sử dụng phương pháp hóa học với các hoạt chất: Glyphosate, gramoxone, Cyclone, Surefire, ...để phòng trừ cỏ dại. Những hoạt chất này có hiệu quả nhanh, tiện lợi, phổ biến, dễ dàng mua ở các cửa hàng thuốc bảo vệ thực vật. Tuy nhiên, nếu dùng biện pháp hóa học một cách quá máy móc, tùy tiện, thiếu hiểu biết và thiếu cơ sở khoa học sẽ đưa lại những hậu quả tai hại ngay trước mắt cũng như lâu dài.

Vì vậy để giảm thiểu những vấn đề tiêu cực của việc sử dụng biện pháp hóa học thì ta có thể thay thế bằng biện pháp sinh học. Hiện nay việc tìm ra các biện pháp thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học là rất cần thiết. Sử dụng dịch chiết của các loại thực vật có sẵn trong tự nhiên để phòng trừ tuyến trùng vừa tiết kiệm được chi phí sử dụng đồng thời không lãng phí tài nguyên thiên nhiên và ít ảnh hưởng đến môi trường và con người. Chính vì lý do đó mà đề tài "Sử dụng dịch chiết thực vật để phòng trừ cỏ dại trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Lâm Đồng" đã được thực hiện nhằm mục tiêu tìm ra dịch chiết loài thực vật có trong tự nhiên có tiềm năng phòng trừ cỏ dại hại cây trồng để giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tác hại của cỏ dại đối với cây trồng

Cỏ dại là loại thực vật không mọc theo mục đích của con người, cỏ dại làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm của cây trồng vì rễ của chúng chủ yếu là phân bố trên tầng đất mặt nên dễ dàng hút chất dinh dưỡng và cạnh tranh ánh sáng, nước của cây trồng khiến cây trồng không đủ chất dinh dưỡng, không gian để quang hợp tốt nhất làm cho cây sinh trưởng, phát triển kém cho ra năng suất và chất lượng sản phẩm thấp.

Ngoài ra cỏ dại còn là nơi trú ẩn cho các loại sâu bệnh hại, các loại cỏ dại cùng họ có những đặc điểm giống với cây trồng là nguồn ký chủ phụ thích hợp nhất cho sâu bệnh phát triển, đối với đồng ruộng mà có nhiều cỏ dại sẽ làm độ ẩm và nhiệt độ thay đổi đây là môi trường thuận lợi cho sâu bệnh hại có thể phát triển (Ký Văn Ngọt, 2016).



(A) lúa cỏ thường rất dễ rụng khi gặp các tác nhân cơ học bất kỳ

(B) Một số giống lúa cỏ thường gặp trên đồng ruộng

(C) Một số giống lúa cỏ có đuôi



Hình 1.1 Cỏ trên đồng ruộng *(Nguồn: Lê Duy Ninh, 2018)*



Hình 1.2 phun thuốc diệt cỏ hóa học *(Nguồn: Thúy Hà, 2015)*

1.2 Đặc điểm nguồn gốc các loài cây lấy dịch chiết

1.2.1 Cây bạch đàn

1.2.1.1 Nguồn gốc

Bạch đàn là chi thực vật có hoa *Eucalyptus* trong họ Đào kim nương (Myrtaceae). Có hơn 700 loài bạch đàn, hầu hết có bản địa tại Australia, một số nhỏ được tìm thấy ở New Guinea và Indonesia, một số ít được tìm thấy ở vùng bắc Philippines và Đài Loan. Các loài bạch đàn đã được trồng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới gồm châu Mỹ, châu Âu, châu Phi, vùng Địa Trung Hải, Trung Đông, Trung Quốc, bán đảo Ấn Độ... và cả Việt Nam. *Eucalyptus amygdalina* (Labille) là cây cao nhất được biết đến, cây cao nhất đạt tới chiều cao 480 feet, vượt quá chiều cao thậm chí cả Cây lớn California (*Sequoia gigantea*). Nhiều loài mang lại gỗ có giá trị, các loại dầu khác, kino, …

1.2.1.2 Đặc điểm hình thái

Cây Bạch Đàn là cây thân gỗ trung bình – lớn, có chiều cao đạt từ 5 – 30m trong vòng 5 đến 10 năm. Phần thân có lớp vỏ màu nâu xám, thường bong tróc thành từng mảnh. Lõi gỗ có màu vàng sẫm và thường bị lộ ra do lớp vỏ bong tróc.

Lá bạch đàn có dáng thon dài và cong hình lưỡi liềm. Nhìn rất giống lá của cây cừ tràm. Màu lá thường xanh hơi đốm trắng hoặc xanh đậm. Theo khoa học thì trong các phiến lá cây bạch đàn có chứa tinh dầu thành phần Eucalyptol – đây là một loại dầu gió được dùng rất phổ biến. Hoa có cuống ngắn, trái nhỏ, bên trong có rất nhiều hạt nhỏ màu nâu (Huy Hoàng, 2019).

Trong dịch chiết của cây có chứa tanin, nhựa và tinh dầu (3 đến 6% tính trên lá khô kiệt). Thành phần chủ yếu trong dịch chiết lá bạch đàn Xineola, Tanin, Saponozit trong đó thành phần gây độc để ức chế cỏ dại là Tanin và Saponozit chủ yếu ở trong lá cây bạch đàn (Nguyễn Hồng Sơn, 2000)

1.2.1.3 Đặc điểm sinh thái

Cây bạch đàn là loại cây dễ trồng, phát triển nhanh trong thời gian ngắn. Có thể khai thác sau 5 – 10 năm canh tác. Bạch đàn có thể sống tốt trên những nơi đất nghèo dinh dưỡng, cằn cỗi. Loài này thường được trồng tập trung thành rừng hoặc mọc hoang dại trong những khu dân cư. Trồng nhiều khắp các vùng đồng bằng cho đến vùng bình nguyên và cao nguyên. Loại cây này có tính chất làm xấu chất đất nên chỉ trồng tại những nơi có chất đất kém, đất bỏ hoang, rừng, …

1.2.2 Cây thông

1.2.2.1 Nguồn gốc

Họ thông (danh pháp khoa học: Pinaceae), là một họ thực vật trong bộ thông (*Pinales*), bao gồm nhiều loài thực vật có quả nón với giá trị thương mại quan trọng như tuyết tùng, lãnh sam, thiết sam, thông rụng lá, thông và vân sam. Họ này bao gồm những cây thân gỗ, thân có nhựa thơm, tán thường hình tháp. Nó là họ lớn nhất trong bộ này nếu tính theo sự đa dạng về loài, với khoảng 220-250 loài (phụ thuộc vào quan điểm phân loại học) trong 11 chi, và là lớn thứ hai sau họ Hoàng đàn (Cupressaceae) về khu vực phân bố địa lý. Thông Đà Lạt hay còn gọi là thông năm lá, có tên khoa học là *Pinus dalatensis*.

1.2.2.2 Đặc điểm hình thái

Thông là cây thân gỗ to, có tán hình nón thưa, thường xanh, cao đến hơn 30m và đường kính thân 0,6 - 0,8m. Ở cây non, vỏ thân nứt dọc, nhưng ở cây già vỏ bong từng mảng. Các cành ngắn mọc thành cụm trên đầu cành. Mỗi cành ngắn mang 5 lá ở đỉnh, hình kim, dài 6 – 11cm, rộng 0,6 - 0,7mm, mặt cắt mang hình tam giác đều, cạnh có răng cưa nhỏ, hai mặt bên, mỗi mặt mang 2 - 5 hàng lỗ khí. Nón đơn tính, cùng gốc; nón cái thành thục hình trụ, dài 5,5 – 10 cm, đường kính 2,5 – 4 cm; gồm 25 - 50 vảy dài 2,5cm, rộng 1,5 - 2,5cm, mái vảy ở tận cùng. Khi chín vảy màu xám đen. Hạt hình trứng, màu nâu, dài 0,8 – 1 cm, đường kính 0,4 - 0,5 cm, mang cánh dài 1,5 cm ở phía trên đỉnh.

1.2.2.3 Đặc điểm sinh thái

Hạt thông chín vào tháng 2-3. Chưa thấy tái sinh bằng hạt ở núi Ngọc Linh, cũng như ở các nơi khác, sinh trưởng chậm. Mọc trong rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa ẩm, trên núi trung bình, ở độ cao 1500–2000 m. Trên đất vàng alit hay đất xám đen, tầng mỏng phong hóa từ đá granite hay đá cát.

1.2.3. Cây dưa leo

1.2.3.1 Nguồn gốc

Dưa leo có tên khoa học là *Cucumis sativus*, là một cây trồng phổ biến trong họ bầu bí Cucurbitaceae, là loại rau ăn quả thương mại quan trọng, nó được trồng lâu đời trên thế giới và trở thành thực phẩm của nhiều nước, được sử dụng trong bữa ăn của các gia đình như một loại rau ăn mát và giòn. Dưa chuột có nguồn gốc từ Nam Á, hiện tại đã phát triển trên hầu hết các châu lục: Trung Quốc, Nga, Nhật Bản, Mỹ, Hà Lan, Thổ Nhĩ Kỳ, Ba Lan, Ai Cập và Tây Ban Nha... Có nhiều giống dưa chuột khác nhau được giao dịch trên toàn cầu.

Dưa leo là cây rau ăn quả được trồng phổ biến tại Việt Nam, trong đó có giống dưa leo Phụng Tường (Lang và ctg, 2007). Sau khi thu hoạch các bộ phận như rễ, thân, lá sẽ được thu gom và để tự phân hủy trên đất. Việc thu gom và tiêu hủy này sẽ có tác động ít nhiều đến môi trường xung quanh trong đó có sự phát triển của một số loại cỏ dại xung quanh đấy.

Trước đây, đã có báo cáo là dịch trích của thân, lá giống dưa leo Phụng Tường này đã ức chế sự nảy mầm và phát triển của cỏ lồng vực nước và có chứa những chất hòa tan trong methanol có ảnh hưởng ức chế đến một số loài cỏ dại (Thi và ctg., 2008). Điều này đã chứng tỏ rằng cây dưa leo có thể chứa những allelochemicals.

1.2.3.2 Đặc điểm hình thái

Bộ rễ dưa leo phát triển rất yếu, rễ chỉ phân bố ở tầng đất mặt 30-40 cm. Bộ rễ chính tương đối phát triển, phân bố chủ yếu ở tầng canh tác ở độ sâu từ 0 đến 30 cm, rộng 50 - 60 cm.

Cây dưa leo là cây thân thảo hằng niên, thân dài, có nhiều tua cuốn để bám khi bò. Chiều dài thân tùy điều kiện canh tác và giống, các giống canh tác ngoài đồng thường chỉ dài từ 0.5-2,5 m. Thân trên lá mầm và lóng thân trong điều kiện ẩm độ cao có thể thành lập nhiều rễ bất định. Thân tròn hay có góc cạnh, có lông ít nhiều tùy giống. Thân chánh thường phân nhánh; cũng có nhiều dạng dưa leo hoàn toàn không thành lập nhánh ngang. Sự phân nhánh của dưa còn chịu ảnh hưởng của nhiệt độ ban đêm.

Lá dưa leo gồm có lá mầm và lá thật: Lá mầm nhú ra đầu tiên có hình trứng tròn dài làm nhiệm vụ quang hợp tạo vật chất nuôi cây và lá mới. Lá thật là những lá đơn to mọc cách trên thân, dạng lá hơi tam giác (hình chân vịt 5 cạnh) 2 mặt phiến lá đều có lông, với cuống lá dài 5-15cm; rìa nguyên hay có răng cưa.

Hoa: Đơn tính đồng hay biệt chu. Hoa cái mọc ở nách lá thành đôi hay riêng biệt; hoa đực mọc thành cụm từ 5-7 hoa. Hoa có màu vàng, thụ phấn nhờ côn trùng, bầu noãn của hoa cái phát triển rất nhanh ngay trước khi hoa nở.

Trái: lúc còn non có gai xù xì, khi trái lớn gai từ từ mất đi. Trái từ khi hình thành đến khi thu hoạch có màu xanh đậm, xanh nhạt, có hay không có hoa văn (sọc, vệt, chấm), khi chín trái chuyển sang màu vàng sậm, nâu hay trắng xanh.

1.2.3.3 Đặc điểm sinh thái

Dưa leo thuộc nhóm ưa nhiệt, nhiệt độ ngày thích hợp cho dưa tăng trưởng là 30^{o}C. và nhiệt độ ban đêm 18-21^{o}C. Dưa có phản ứng với độ dài ngày khác nhau tùy theo giống, thông thường ngày ngắn kích thích cây ra lá và trái. Yêu cầu về độ ẩm đất của dưa leo rất lớn. Dưa chịu hạn rất yếu, thiếu nước cây sinh trưởng kém và tích lũy chất cucurbitacin làm trái trở nên đắng.

1.3. Các biện pháp phòng trừ cỏ dại

1.3.1 Biện pháp vật lý

Biện pháp vật lý là một trong các biện pháp phòng trừ cỏ dại đã được áp dụng từ xưa đến nay, biện pháp này vẫn còn hiệu quả trong việc diệt trừ cỏ dại. Trước khi có các công cụ thô sơ để diệt trừ cỏ dại con người dùng tay để nhổ cỏ, nhưng việc nhổ cỏ bằng tay thì tốn nhiều thời gian và công sức.

Làm cỏ bằng tay là phương pháp vật lý sử dụng tay hoặc những dụng cụ như cuốc, liềm. Phù hợp với các loại cỏ 1 đến 2 năm, đối với cỏ lưu niên chỉ làm đứt rễ và hình thành nhiều chồi khác trong đất. Làm làm cỏ bằng tay hữu ích đối với trường hợp cỏ lưa thưa, tuy nhiên tốn rất nhiều thời gian và công sức.

Khi sử dụng cuốc thì hiệu quả đối với cỏ lưu niên, thường được áp dụng chung với biện pháp nhổ cỏ bằng tay. Tuy nhiên cỏ vẫn có thể phát triển trở lại và phương pháp này vẫn tốn nhiều thời gian và công sức.

Phương pháp cheeling là phương pháp làm cỏ bằng cây sử dụng thêm một dụng cụ như thuồng, liềm để cắt cỏ trên mặt đất làm cho phần còn lại không phát triển được không hiệu quả đối với cỏ nằm sát mặt đất (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

1.3.2 Biện pháp cơ học

Làm đất là loại bỏ cỏ từ đất làm cho chúng chết. Làm đất có thể làm cho cây trồng yếu đi do tổn thương đến vùng rễ, giảm tính cạnh tranh và hồi phục từ cây trồng. Làm đất cũng có nghĩa là chôn vùi đất. Ngoài việc kiểm soát cỏ dại, làm đất còn ảnh hưởng đến đất và cây trồng ảnh hưởng đến những thành phần còn lại của cây trồng bên dưới đất. Làm đất

thường sử dụng các công cụ thời nguyên thủy, nay được cải biến như ngày nay. Ngày nay, làm đất sử dụng máy móc (máy cày, máy xới…) hoặc động vật. Trước khi trồng cây, người nông dân thường có công đoạn chuẩn bị đất (việc chuẩn bị bao gồm cày, bừa, làm bằng phẳng) việc này nhằm làm mầm cỏ dại trong đất được xới lên, phơi dưới ánh nắng mặt trời và chết dần.

Đối với cỏ lưu niên thì phương pháp làm đất có tác dụng làm tổn thương phần ngọn và phần nằm trong đất của cỏ. Phương pháp làm đất này đã thành công với nhiều loại cỏ một năm, cỏ hai năm và cỏ lâu năm có rễ cái và cây con không phát triển. Khi cây đã trưởng thành, hệ thống rễ lan rộng, tích lũy dinh dưỡng trong rễ làm cho phương pháp làm đất khó khăn hơn và ít hiệu quả và sự kết hợp càng chặt chẽ của cỏ trong đất sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả của phương pháp làm đất (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

Cỏ dại tạo ra vô số hạt, rơi trên mặt đất và ở đó cho đến khi nảy mầm. Một số cỏ dại tạo ra các bộ phận thực vật dưới lòng đất như củ, thân rễ và rễ sưng, nghỉ ngơi để tồn tại và lan rộng. Các phương pháp cơ học của kiểm soát cỏ dại nhằm mục đích làm giảm sự phát tán của cỏ dại để giảm số lượng và khả năng cạnh tranh của chúng. Các phương pháp cơ học khác nhau như làm đất mùa vụ, làm đất trước cấy ghép và làm đất sau hạn chế được sử dụng cho mục đích này. Những việc này không chỉ tiêu diệt cỏ dại và hạt cỏ dại mà còn tiết kiệm chất dinh dưỡng của đất bằng cách giảm thiểu sự phát triển của chúng trong đất và do đó làm giảm cơ hội phát triển của cỏ dại trong vụ mùa.

Theo Nguyễn Hữu Trúc (2011), sau gieo trồng nếu quần thể cây trồng phát triển mạnh mẽ sẽ không có không gian dành cho cỏ phát triển. Các bước cần để xác lập một quần thể cây trồng là:

- Chọn cây trồng và giống phù hợp.
- Chọn giống có tỷ lệ nảy mầm cao.
- Xử lý đất và hạt giống trước khi gieo.
- Số lượng hạt giống gieo tối hảo.
- Lựa chọn thời gian trồng và có phương pháp phù hợp, tiến hành dặm cây chết sớm.

Một biện pháp canh tác khác đó là giảm khoảng cách hàng và khoảng cách giữa các cây trong hàng, tăng lượng hạt giống sử dụng để tăng mật độ cây trồng, làm tăng tính cạnh tranh của cây trồng với cỏ dại bởi độ che phủ hoặc ngăn cản sự phát triển của cỏ dại. Mật độ cây trồng cao hơn mật độ thông thường sẽ hạn chế tác động ánh sáng trực tiếp lên cỏ dại nên có khả năng ngăn cỏ dại nảy mầm. Tuy nhiên mật độ cây trồng còn phụ thuộc vào

nhiều yếu tố như sự phát triển, hướng lá, thời gian và những đặc điểm khác của cây (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

Các biện pháp canh tác khác như luân canh, đa canh, xen canh cũng được sử dụng nhiều trong nông nghiệp. Luân canh cây trồng làm giảm được tác hại nghiêm trọng của cỏ dại so với độc canh. Đối với từng loại cây trồng khác nhau sẽ có từng loại cỏ dại đặc thù riêng mà những loài này ít ảnh hưởng đến những loại cây trồng khác. Nếu canh tác độc canh có thể làm gia tăng mật độ của các loại cỏ dại này. Do đó, làm cho bệnh hại và côn trùng gây hại tăng, khả năng chống chịu của cây trồng giảm và tạo điều kiện cho cỏ dại phát triển. Tác dụng của việc luân canh cây trồng trong công tác quản lý cỏ dại dựa trên cơ sở thay đổi cây trồng thích hợp qua từng vụ, nên làm thay đổi kiểu nguồn cạnh tranh, sự cảm nhiễm, xáo trộn và thay đổi cơ học đất tạo môi trường không thuận lợi ngăn ngừa sự gia tăng của các loại cỏ đặc biệt (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

Đa canh là một biện pháp canh tác phổ biến trong nông nghiệp, chủ yếu là ở các nước đang phát triển. Hệ thống đa canh giúp cây trồng ít nhiễm cỏ dại hơn so với độc canh. Đa canh khoai mì với ngô có hiệu quả trong quản lý cỏ dại. Hiệu quả của phương pháp trong việc quản lý cỏ dại phụ thuộc lớn vào việc lựa chọn cây trồng.

Xen canh giúp cây trồng cạnh tranh cỏ dại tốt hơn, ngoài ra xen canh còn làm giàu chất hữu cơ trong đất, giảm xói mòn và cải thiện sức thấm của nước. Một số biện pháp xen canh thường dùng là xen canh cây họ đậu với cây ngô, lúa miến, mía, kê, cây đa niên như chè, cà phê và một số cây lấy gỗ.

Biện pháp làm đất tối thiểu cũng là một phương pháp đang được khuyến khích sử dụng hiện nay trong nông nghiệp. Cày đất sâu sẽ làm khó khăn cho quá trình làm cỏ và ảnh hưởng đến biện pháp quản lý cỏ dại. Do đó, chỉ nên làm đất tối thiểu cày đất vừa đủ sâu đảm bảo yêu cầu tối thiểu của cây trồng phát triển (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

Có thể ngăn chặn sự phát triển của cỏ dại bằng cách ngăn chặn cỏ dại tiếp xúc trực tiếp với ánh nắng mặt trời. Sau khi cày, bừa xới đất sẽ phủ màng phủ nông nghiệp đồng thời phơi đất mấy ngày để vừa ngăn chặn cỏ dại quang hợp và phát triển vừa tiêu diệt mầm cỏ dại trong đất.

Các phương pháp khác như lựa chọn giống cây trồng phù hợp, mật độ và khoảng cách trồng, làm đất, các phương pháp làm cỏ cơ học kết hợp với nhổ cỏ bằng tay là những phương pháp phổ biến và có hiệu quả trước khi thuốc diệt cỏ hóa học ra đời vào cuối những năm 1940. Một số các nghiên cứu đã tập trung vào việc tối ưu hóa việc sử dụng các phương

pháp nhiệt và cơ học chống lại cỏ dại trong hàng. Thực hiện các phương pháp mới như làm cỏ bằng robot áp dụng cho những cây trồng theo băng giúp cây phát triển tốt (Melander, 2006).

Phương pháp nhiệt, đốt cháy, khè lửa là phương pháp khá thuận lợi và rẻ tiền vào mùa khô và ít tốn kém, có thể dùng để: tiêu diệt mầm cỏ dại tích lũy trong đất, đốt cháy thân cỏ trưởng thành khô trên mặt đất, nhiệt độ cao sẽ diệt những thân cỏ ở các vị trí mà các phương pháp làm cỏ, làm đất khác không sử dụng được. Cây chết khi bị khè lửa sẽ làm cho lá và mầm cây bị hủy hoại không còn khả năng phát sinh và phát triển. Biện pháp khè lửa diệt tốt nhất là lúc cỏ còn non và cây trồng đã phát triển ổn định. Có thể sử dụng biện pháp khè lửa để tiêu diệt các chùm cỏ đa niên, khè lửa nhiều lần có thể tiêu diệt cỏ đa niên có chùm rễ sâu (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

1.3.3 Biện pháp hóa học

Thuốc diệt cỏ là những thuốc có nguồn gốc hóa học dùng để phòng trừ các loại thực vật làm cản trở đến sinh trưởng, phát triển của cây trồng. Ngày nay, sản lượng nông nghiệp cao là nhờ sự phụ thuộc vào thuốc diệt cỏ vì chúng được xem là thành phần không thể thiếu trong nông nghiệp nói chung và quản lý cỏ dại nói riêng.

Thuốc diệt cỏ hoạt động bằng cách ức chế sự phân chia tế bào, quang hợp, hô hấp, axit amin hoặc bằng cách gây biến dạng hormone tăng trưởng thực vật tự nhiên (Ross và Childs 1996). Phương pháp ứng dụng bao gồm phun lên tán lá, áp dụng cho đất và áp dụng trực tiếp vào hệ thống thủy canh. Có thể được phân loại các thuốc trừ cỏ dựa trên nhiều yếu tố khác nhau như: theo cách tác động, theo cách xâm nhập, theo tính chọn lọc của thuốc.

Theo tính chọn lọc của thuốc, thuốc diệt cỏ có thể phân chia thành các thuốc trừ cỏ chọn lọc và không chọn lọc. Thuốc trừ cỏ chọn lọc có thể dùng để kiểm soát một số loài cỏ mà không gây hại cho cây trồng hay các loài thực vật khác. Ngược lại, thuốc trừ cỏ không chọn lọc có khả năng kiểm soát bất cứ loài thực vật nào bao gồm cả cây trồng. (Nguyễn Hữu Trúc, 2011).

Theo cách xâm nhập, thuốc diệt cỏ tiếp xúc chỉ gây hại tới những bộ phận của cỏ tiếp xúc với thuốc và thường chỉ diệt những phần trên mặt đất của cỏ dại. Những thuốc cỏ dạng này chỉ có tác động cục bộ. Thuốc chỉ có tác dụng với cỏ hàng năm, không có thân ngầm trong đất. Các loại thuốc cỏ monosodium methanearsonate, disodium methanearsonate và dalapon là những loại thuốc đầu tiên diệt cỏ lá được sử dụng để kiểm soát cỏ dại trong cây

có múi, đặc biệt là cây cỏ johnsongrass và vase grass (Lange và ctg., 1975) ... Thuốc trừ cỏ nội hấp còn được gọi là thuốc trừ cỏ có tác động lên toàn bộ các bộ phận của cây. Thuốc dịch chuyển khắp trong cây và gây độc cho cỏ dại sau khi xâm nhập qua lá hoặc qua rễ. Những thuốc này có hiệu lực diệt cỏ lâu năm, cỏ thân ngầm (cỏ tranh, cỏ gấu). Có thể dùng bón, tưới vào đất hoặc phun lên lá ví dụ, amitrole, picloram và 2,4-D. Theo con đường tác động, một số thuốc vừa có tác động cả qua lá và qua rễ, một số thuốc khác chỉ tác động qua lá hoặc qua rễ và một số thuốc chỉ tác động qua các phần xanh của cây.

Theo thời điểm sử dụng, thuốc diệt cỏ được chia thành các nhóm

- Tiền nảy mầm: là những thuốc tác động diệt cỏ khi hạt chưa mọc thành cây, mầm cỏ vừa mới nhú ra khỏi hạt, chưa nhô lên khỏi mặt đất.

- Hậu nảy mầm: tác động diệt cỏ sau khi cỏ đã mọc, khi cây cỏ còn nhỏ hoặc đã lớn. Ngoài ra còn một số loại thuốc trừ cỏ có thế diệt hạt cỏ từ khi sắp mọc, đang mọc cho đến khi đã mọc gọi là thuốc hậu nảy mầm sớm, đây là loại thuốc này thường là hỗn hợp của thuốc tiền và hậu nảy mầm, thường dùng khi phần lớn cỏ đã mọc được 1 đến 2 lá, còn một số sắp mọc hoặc đang mọc.

Còn theo phạm vi tác động của cỏ dại thì thuốc được chia thành các nhóm

- Thuốc chọn lọc: diệt được một số hoặc nhiều loài cỏ mà không gây hại cho cây trồng. Có thể sử dụng trên cây trồng đã mọc. Tính chọn lọc do các đặc điểm khác nhau về hình thái, cấu tạo và sinh lý giữa cây trồng và cây cỏ. Khả năng chọn lọc của thuốc trừ cỏ cũng chỉ có tính tương đối.

- Thuốc không chọn lọc: diệt được hầu hết các loài thực vật đang thời kỳ sinh trưởng dinh dưỡng, kể cả cây trồng. Những thuốc này nông dân hay gọi là thuốc khai hoang, dùng để diệt cỏ trong vườn cây ăn trái, bờ ruộng, bãi cỏ hoang cần khai phá.

Thuốc diệt cỏ tổng hợp, hữu cơ, chọn lọc xuất hiện lần đầu tiên ở Pháp vào năm 1932 với bằng sáng chế của dinitro-o-cresol (DNOC) để kiểm soát chọn lọc cỏ dại hàng năm trong ngũ cốc.

Một số hoạt chất có khả năng diệt cỏ như là: Glyphosate được sử dụng để tiêu diệt tất cả các thảm thực vật. Nó thường được sử dụng để tiêu diệt các loại cỏ dại cùng một lúc, bao gồm tất cả các loại cỏ; Glufosinate thường được sử dụng để diệt cỏ trên bãi cỏ để tiếp tục lại từ dâud cho vườn vì tàn dư hóa học không tồn tại lâu trong đất. Cỏ mới sau đó có thể được trồng trong vòng một hoặc hai tuần sau khi xử lý. Glufosinate được dùng trực tiếp

vào cỏ và có thể hoạt động trong vòng hai ngày; Axit Pelargonic Axit Pelargonic đốt cháy và giết chết cỏ ngay sau khi tiếp xúc; ...

Một số loại thuốc diệt cỏ đã được báo cáo là an toàn đối với các loại giun gladiolus như Alachlor; AlachlorCIPC, Trifuralin,2, 3, 4, 5-Tetachloro-1,4-Benzenedicard oxylic Acid, Dimethyl Ester (DCPA), Oryzalin, Pronamide và Diuron (Bing, 1977, 1978; Jenkins và ctg., 1968; Raulston và Waters, 1971; Waters, 1967; Waters và Raulston, 1972; Gilreath, 1984).

1.3.4 Biện pháp sinh học

Thuốc diệt cỏ sinh học thường là dùng các sinh vật như côn trùng, các loài cá và động vật ăn cỏ, vi sinh vật, cây trồng có khả năng cạnh tranh cao hạn chế sự xâm nhập và cạnh tranh của cỏ dại.

Hiện tượng đối kháng thực vật hay cỏ dại (allelopathy) là một cơ chế mà cỏ dại có thể bị các cây trồng lân cận ức chế phát triển (Bell and Koeppe, 1972). Việc phân lập những chất ức chế cỏ dại (allelochemical) từ dịch trích mô của những vật liệu cây tươi hoặc khô đã được nghiên cứu (Rice, 1984; Narwhal, 1999). Trong tự nhiên một số lượng lớn cây có ảnh hưởng ức chế trên sự phát triển của những cây trồng lân cận hoặc vụ mùa tiếp theo bằng cách phóng thích những allelochemicals vào trong đất thông qua hiện tượng rĩ từ những mô cây sống hoặc bởi sự phân hủy xác bã thực vật (Stonard and Miller, 1995; Duke và ctg., 2000).

Thuật ngữ *Allelopathy* có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp, từ *allelon* có nghĩa là "của nhau" và *pathos* có nghĩa là đau khổ. Thuật ngữ *Allelopathy* được nhà sinh lý học thực vật Hans Molisch, đại học Vienna, Áo vào năm 1937 định nghĩa lần đầu tiên. Định nghĩa này được trình bày như sau: "Tính đối kháng của cây trồng (Allelopathy) như là sự tương quan hóa sinh giữa các thực vật với nhau (kể cả vi sinh vật)". Sau đó, Rice (1984) đã định nghĩa lại là: "Tính đối kháng là một tác động trực tiếp hay gián tiếp và có lợi hoặc bất lợi bởi 1 cây trồng lên cây trồng khác, thông qua việc sản sinh các hợp chất hóa học vào môi trường sống".

Allelopathy có thể nằm trong thực vật ở bất kì cơ quan nào. Các hóa chất có tiềm năng đối kháng tồn tại ở hầu hết các mô thực vật như là lá, hoa, quả, thân, rễ và hạt. Các con đường như bay hơi, tiết dịch gốc, lọc và phân hủy tàn dư thực vật được các chất đối kháng giải phóng trực tiếp vào môi trường, điều này đã được chứng minh trong khoảng 90 loài thực vật (Rice, 1984; Putnam, 1986).

Các con đường giải phóng chất ức chế vào môi trường:

Bay hơi: Thực vật đối kháng giải phóng hóa chất qua các lỗ hở nhỏ trong lá của chúng dưới hình thức thả hơi độc, các thực vật khác bị ức chế sự phát triển hoặc bị chết do quá trình hô hấp bởi chất này thoát ra ngoài môi trường. Ngoài ra, các loại cây trồng xung quanh hấp thụ sương rơi xuống đất do trong sương đã được ngưng tụ các chất độc dẫn đến cây kém phát triển hoặc chết.

Rò rỉ: Hầu hết tất cả các loài thực vật đều rụng lá. Một số loài khi rụng lá thì trong lá lưu giữ hóa chất đối kháng hoặc hóa chất bảo vệ. Khi những chiếc lá này rơi xuống mặt đất, giải phóng các chất bảo vệ thực vật cũng như là các chất đối kháng. Lá có xu hướng giải phóng các hợp chất ức chế mạnh vào mùa thu đối với lá tươi và lá rụng vào mùa xuân thì yếu hơn. Các bộ độc tố thực vật (Phytotoxins) tan trong nước có thể lọc từ rễ, các bộ phận của cây trên mặt đất hoặc chúng có thể chủ động tiết ra từ rễ sống.

Tiết dịch: Thông qua bộ rễ của chúng mà một số loài thực vật giải phóng chất bảo vệ vào đất. Ức chế sự phát triển của các loại cây xung quanh loài thực vật đẩy bởi các chất tiết đó ra gây.

Một số chất ức chế phá vỡ sự phân chia tế bào làm cho cây trồng tăng trưởng chậm hoặc ức chế sự nảy mầm. Một số chất can thiệp vào bộ máy hô hấp và các quá trình trao đổi năng lượng khác, nhiều chất làm ảnh hưởng đến dinh dưỡng của thực vật như các chất ức chế trong nước và sự hấp thu các chất dinh dưỡng. Thông thường, các chất ức chế này làm giảm sự phát triển của thực vật xung quanh.

Để kiểm soát, sự kết hợp đất của toàn bộ cây có thể tạo ra sự phân phối hợp lý bất kể phần thực vật tạo ra hóa chất. Số lượng này rất quan trọng cho các mục đích kiểm soát và nếu dự đoán các tác động cụ thể trong lĩnh vực này, tổng số lượng và nồng độ phải được xác định (Putnam, 1985). Có bằng chứng cho thấy sản xuất allelochemical có thể lớn hơn khi thực vật chịu áp lực môi trường (Putnam, 1983, 1985; Rice, 1979). Sản xuất bị ảnh hưởng bởi cường độ ánh sáng, chất lượng và thời gian, với số lượng lớn hơn được sản xuất với ánh sáng cực tím (UV) cao và ngày dài (Aldrich, 1984).

Ở Úc người ta đã phát hiện nấm Stromatinia cepivora (Berk.) Whetzel có thể trừ được cỏ Allium Triquetrum L. (Tehran Chan và ctg., 2014). Nói về sự thành công này, hai loại thuốc đã được sản xuất công nghiệp tại Mỹ (Templeton, 1982) đó là nấm Phytophthora palmivora và Colletotrichum gloeosporioides cho việc kiểm soát cỏ Morrenia odorata trên vườn cam và cỏ Aeschynomena virginica trên lúa và đậu nành. Hiện nay, có khoảng trên 7 loài được khai thác sử dụng là: côn trùng, cá ăn cỏ, ốc, động vật có xương sống, mối,

nấm và các vi sinh vật khác. Côn trùng và động vật ăn cỏ không xương sống khác đã và đang được nghiên cứu để diệt cỏ dại được trình bày ở bảng 1:

Bảng 1. Các loài côn trùng có khả năng phòng trừ cỏ dại

Tên loài	Số họ sử dụng	Số loài sử dụng	Số loài có khả năng thiết lập quần thể	Số loài thành công
Coleoptera	7	109	66 (61%)	33 (30%)
Lepidoptera	21	82	46 (56%)	15 (18%)
Hemiptera và Homoptera	8	19	15 (79%)	8 (42%)
Diptera	6	35	25 (71%)	4 (11%)
Thysanoptera	2	4	2 (50%)	1 (25%)
Hymenoptera	3	4	3 (75%)	2 (50%)
Orthoptera	1	1	1 (100)	0 (0%)
Acarina	3	5	3 (60%)	2 (40%)
Fungi	4	8	8 (100%)	5 (63%)
Nematodes	1	1	1 (100%)	0 (0%)

(Nguồn: Julien, 1992)

Năm 1992, Julien đã đưa ra một danh sách những loài động vật ăn cỏ không có xương sống và được phóng thích để kiểm soát cỏ dại ngoại lai ở nhiều quốc gia trên thế giới. Động vật ăn cỏ không xương sống có khoảng 259 loài đã được áp dụng trong đó có 254 loài côn trùng và 5 loài nhện. Có khoảng 161 loài (chiếm 62%) có khả năng thiết lập quần thể ở một hoặc nhiều vùng khi được phóng thích.

Bọ cánh cứng: đã và đang được nghiên cứu diệt cỏ dại. Vào năm 1943 bọ cánh cứng được giới thiệu có triển vọng kiểm soát cỏ dại, và đây là một trường hợp kinh điển về kiểm soát sinh học thành công (Huffaker, 1959; Van Driesche và ctg., 2010).

Nấm - Fungi: Trong kiểm soát sinh học tiêu diệt cỏ dại nấm là tác nhân quan trọng đã được tìm thấy trong cấp phân loại phụ Basidiomycota và Deuteromycotina. Watson (1991) đã tóm tắt việc sử dụng nấm gây bệnh nhằm kiểm soát cỏ dại ở những vùng mới và cho sự phát triển thuốc có bằng nấm (Candida Tan, 1991).

Ở nước ngoài các biện pháp phòng trừ cỏ dại đã phát triển từ rất lâu và thông qua nhiều biện pháp khác nhau như công nghệ, hóa học, sinh học, ... Trong đó công nghệ và sinh học là các biện pháp đang rất được quan tâm và phát triển. Một trong số các biện pháp là sử dụng hệ thống robot kiểm soát cỏ dại cho cây cà chua hay sử dụng các hợp chất hữu cơ để phòng trừ cỏ dại. Các biện pháp phòng trừ cỏ dại chủ yếu là các phương pháp hóa học phương pháp này chủ yếu là sử dụng thuốc diệt cỏ dưới các dạng khác nhau.

Hiện nay hai hoạt chất hữu cơ là Metolachlor, S- metolachlor là các hợp chất hữu cơ được sử dụng rộng rãi như là một loại thuốc diệt cỏ. Theo một khảo sát của USDA, metolachlor là một trong những loại thuốc diệt cỏ được sử dụng rộng rãi nhất ở Hoa Kỳ, hơn 45.000 pound được sử dụng vào năm 1996, được áp dụng cho 30% diện tích trồng ngô và 5% diện tích trồng đậu nành (Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ, 1997). Metolachlor được đăng ký sử dụng trong hơn 70 loại cây trồng trên toàn thế giới. Metolachlor thường được sử dụng trong hỗn hợp với các loại thuốc diệt cỏ khác như atrazine để mở rộng phổ của các loài cỏ dại được kiểm soát (Jooste và Biljon, 1976; Swain và ctg, 1978). S- metolachlor là một dang của metolachlor sau khi được tăng đồng phân S – đồng phân làm tăng hoạt tính của thuốc diệt cỏ (Moser và ctg, 1983).

Ngoài các hợp chất trên, còn có pinoxaden là một hợp chất hóa học được sản xuất tổng hợp từ nhóm phenylpyrazoles , được sử dụng làm thuốc diệt cỏ. Pinoxaden là hoạt chất dùng để kiểm soát cỏ dại trong ngũ cốc ở tây nam Ba Lan, được phát hiện và phát triển bởi Syngenta Crop Protection.

Một số nghiên cứu cho thấy các loại tinh dầu khác nhau được chiết từ các loại cây trồng khác nhau có thể sử dụng để làm thuốc diệt cỏ sinh học, một nghiên cứu ở Iran đã cho thấy rằng các chất ức chế sự nảy mầm, tăng trưởng và phát triển (allelopathic) của cỏ dại có trong tinh dầu của cây bạch đàn (Eucalyptus), cây tùng Lawson Cypress, cây hương thảo (Rosemary) và cây xoan (White cedar) đối với 3 loại cỏ. Kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh rằng sự nảy mầm bởi các loại cỏ dại bị ức chế mạnh mẽ bởi các loại tinh dầu, cho thấy việc sử dụng tinh dầu có thể áp dụng như một biện pháp sinh học để kiểm soát cỏ dại như chất ức chế nảy mầm hạt cỏ dại và chúng có thể làm giảm việc sử dụng

thuốc diệt cỏ hóa học". Các tinh dầu này đã ảnh hưởng tới sự nảy mầm, phần trăm nảy mầm của các hạt cỏ, ức chế được một số loại cỏ dại và có thể sử dụng các loại tinh dầu này làm thuốc diệt cỏ sinh học và giúp kiểm soát cỏ dại tốt hơn trong tương lai (Sadrollah Ramezani và ctg, 2008).

Trong thành phần lá cây bạch đàn có một số thành phần gây độc như tanin và saponozit có khả năng phòng trừ một số loại cỏ dại, gây ức chế sự phát triển của chúng và giảm tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ. Một số nhà khoa học của trường đại học Punjab, Chandigarh, Ấn Độ đã có những thử nghiệm với các nồng độ khác nhau của dầu cây bạch đàn (0,0012, 0,003, 0,006, 0,012, 0,03 và 0,06%) trên các loại cỏ thử nghiệm được thu thập và cho thấy được thành phần có trong bạch đàn có thể làm giảm sự nảy mầm của các loại cỏ thử nghiệm.

Theo nghiên cứu của Hồ Lệ Thi và Hisashi Kato-Noguchi (2018) về cách phân lập, định danh chất đối kháng cỏ dại từ cây dưa leo (*Cucumis sativus*) giống Phụng Tường, chất chiết từ phụ phẩm cây dưa leo sau khi thu hoạch có thể được sử dụng cho việc kiểm soát cỏ sinh học trong hệ thống quản lý cỏ dại. Sự tách quang phổ của dịch trích methanol của cây dưa leo đã giúp phân lập và định danh một chất đối kháng cỏ dại hữu hiệu, đó là (6S,7E9S)-6,9,10-trihydroxy-4,7-megastigma dien-3-one. Chất này đã ức chế sự phát triển rễ và thân của cải xoong, rau diếp, cỏ túc hình và cỏ lồng vực nước ở những nồng độ lớn hơn 3 mM.

Nghiên cứu về ứng dụng của một số loài cây độc có thể tiết ra các chiết dịch có thể phòng trừ cỏ dại của nhóm nghiên cứu Nguyễn Hồng Sơn (2000) đã nghiên cứu thành phần hoạt chất và đánh giá khả năng ứng dụng dịch chiết của một số loài cây độc để phòng trừ các loài cỏ dại chủ yếu là nhóm cỏ hòa thảo, nhóm cỏ lá rộng và nhóm cỏ cối lác trong điều kiện phòng thí nghiệm với các nồng độ dịch chiết khác nhau 1%, 5%, 10% phun vào các giai đoạn tiền nảy mầm của cỏ dại, hậu nảy mầm sớm và hậu nảy mầm.

Nguyễn Công Thành (2016), đã sử dụng nấm *Puccinia chondrilla* để kiểm soát sự phát triển của cỏ dại có tên là Skeleton và cỏ *chondrilla juncea* tại Úc. Bào tử nấm thường có sẵn để phun lên loại cỏ này". Ở Việt Nam, có một nghiên cứu sử dụng thuốc diệt cỏ sinh học Thaxtomin A một loại thuốc diệt cỏ sinh học phòng trừ cỏ trên ruộng lúa có thể phòng trừ cỏ lá rộng hiệu quả hơn đối với họ cỏ lác.

Nhìn chung, việc nghiên cứu về các hoạt chất phòng trừ cỏ dại có nguồn gốc từ thực vật còn chưa nhiều. Việc áp dụng các loài thực vật ở địa phương để chiết ra các loại dịch

chiết có khả năng phòng trừ các loại cỏ dại giúp đạt được hiệu quả cao hơn và giảm được chi phí. Các nghiên cứu đã cho thấy ngày nay người ta luôn quan tâm đến việc bảo vệ môi trường tạo ra các loại thuốc có nguồn gốc tự nhiên.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu và địa điểm nghiên cứu

2.1.1 Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là toàn bộ thân cây dưa leo, lá cây thông, tùng và bạch đàn

Hạt cỏ xuyến chi

2.1.2 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ tháng 2/2020 đến tháng 6/2020

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm khoa Nông lâm, Đại học Đà Lạt.

Mô tả: Sử dụng phương pháp chiết thông thường để chiết dịch từ các lá cây bạch đàn, tùng thông và dưa leo.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập và tuyển chọn mẫu

Lựa chọn mẫu đối với cây bạch đàn, tùng và thông: lá những cây được chọn là những lá ở lưng chừng tán, lá không quá non và cũng không quá già và bị khô ở cuống lá hoặc phiến lá. Chọn những lá còn tươi, không bị bệnh hại, không bị khô và các triệu chứng bệnh lý thông thường. Đối với dưa leo: chọn những cây không bị bệnh hại ở vùng rễ như bệnh về tuyến trùng, nấm thối gốc, thối rễ. Lấy toàn bộ thân, cành lá và rễ của cây dưa leo để làm nguyên liệu chiết.

Mẫu lá và thân cây sau khi được thu thập, tiến hành sấy ở nhiệt độ 80^{o}C cho đến khi khối lượng không đổi. Sau khi sấy khô, lá và các bộ phận của thân cây được bảo quản trong túi nilon sạch buộc kín để không bị hút ẩm.

2.2.2. Chuẩn bị và tiến hành chiết

Mẫu lá và thân cây sau khi được sấy khô, tiến hành băm nhỏ thành kích thước khoảng 0,2-0,5cm, cho vào túi nilon sạch buộc kín.

Tiến hành chiết bằng phương pháp đun thông thường với dung môi là nước máy ở các ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C. Các tiến hành như sau:

- Sử dụng bình tam giác dung tích 250ml làm bình chiết
- Cân 15g lá khô xay nhỏ cho vào bình tam giác
- Cho thêm 150ml nước máy vào bình, ngâm cho thấm đều nước
- Cho bình tam giác lên bếp đun bình cầu ở các ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C cho đến khi thể tích của dung dịch đạt 15ml.

Thu dịch chiết và để nguội ở nhiệt độ thường, cho vào bình nút mài và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của ngưỡng nhiệt chiết đến khả năng nảy mầm của cỏ dại

Sử dụng dịch chiết thu được của các loại cây thông, tùng, dưa leo bạch đàn ở các ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C để đánh giá khả năng phòng trừ cỏ dạiCác thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong điều kiện phòng thí nghiệm với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại là 1 khay có chứa 50 hạt cỏ xuyến chi đã được ủ để kích thích nảy mầm. Mỗi một thí nghiệm gồm các nghiệm thức nhưa sau:

Nghiệm thức 1: Đối chứng (dùng nước máy để xử lý hạt)

Nghiệm thức 2: Hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của lá thông

Nghiệm thức 3: Hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của lá tùng

Nghiệm thức 4: Hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của cây dưa leo

Nghiệm thức 5: Hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của lá bạch đàn.

Cách tiến hành như sau:

Mô tả: Chuẩn bị đất cho vào khay đất, tưới đủ ẩm, sau đó cho một lớp giấy mỏng lên để tiến hành gieo hạt cỏ.

Cỏ dại: Hạt cỏ xuyến chi được thu thập từ khuôn viên trường Đại học Đà Lạt, sau đó được loại bỏ những hạt lép, những hạt chưa đạt độ chín. Những hạt cỏ đủ độ chín được tiến hành ủ trong tối trong vòng 24 giờ. Chuẩn bị khay để gieo hạt cỏ xuyến chi.

Cân 15g giá thể mụn xơ dừa và trấu vào khay trải đều sau đó phun ẩm bằng nước cho đến độ ẩm đồng ruộng khoảng 40%. Cho 1 lớp giấy mềm lên trên bề mặt giá thể, bỏ 50 hạt cỏ xuyến chi đã ủ vào và cho thêm 1 lớp giấy mềm đậy lên hạt cỏ.

Phun 5ml dịch chiết lá bạch đàn, thông, tùng và dưa leo lên hạt cỏ cho ướt hạt. Phủ lên khay hạt cỏ là nilon tối để kích thích nảy mầm của hạt.

Đếm số hạt cỏ xuyến chi nảy mầm hàng ngày tính từ thời điểm gieo hạt cỏ cho đến thời điểm 7 ngày sau gieo. Số hạt nảy mầm của ngày hôm sau được tính cộng dồn bằng số hạt cỏ nảy mầm của các ngày trước theo công thức sau

$$Tỷ\ lệ\ nảy\ mầm\ (\%) = \frac{số\ hạt\ nảy\ mầm}{tổng\ số\ hạt\ cỏ)}$$

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ dại

Thử nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ chiế đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm được thực hiện bởi các loại cây thu thập trong điều kiện tự nhiên đó là các loại lá của cây tùng, thông, bạch đàn và thân cây dưa leo tại Đà Lạt.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại được bố trí vào 1 khay gồm 50 hạt giống cỏ xuyến chi.

Các nghiệm thức thí nghiệm bao gồm:

Nghiệm thức 1: Đối chứng (dùng nước máy để xử lý hạt)

Nghiệm thức 2: Dịch chiết ở ngưỡng nhiệt 80^{o}C

Nghiệm thức 3: Dịch chiết ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C

Nghiệm thức 4: Dịch chiết ở ngưỡng nhiệt độ 120^{o}C

Tiến hành thí nghiệm như sau:

Hạt cỏ dại là cỏ xuyến chi đã già, thu hoạch ngoài tự nhiên, cho vào khay có lót khăn giấy mềm đã làm ẩm, ủ trong vòng 24 giờ (để hạt trong tối).

- Mỗi khay thí nghiệm được cho vào 15g giá thể là hỗn hợp của mùn xơ dừa và trấu đã qua xử lý, tiến hành làm ẩm giá thể cho đến độ ẩm đồng ruộng 40% để tạo sự thuận lợi nhất cho hạt cỏ nảy mầm.
- Cho 50 hạt cỏ xuyến chi đã qua ủ lên giá thể.
- Phủ lên trên hạt cỏ là lớp giấy mềm, tưới nước cho đủ ẩm hạt cỏ và giá thể.
- Lấy 5 ml dung dịch chiết của từng loại lá cây bạch đàn, tùng, thông và dưa leo cho vào bình phun tia, phun đều lên bề mặt các khay đựng hạt cỏ.
- Khay đối chứng được phun 5ml nước lấy từ nguồn nước máy

Theo dõi tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi sau 1 ngày gieo đến hết ngày thứ 7 sau gieo.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1: Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm hạt cỏ xuyến chi

3.1.1: Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ởngưỡng nhiệt độ 80^{o}C

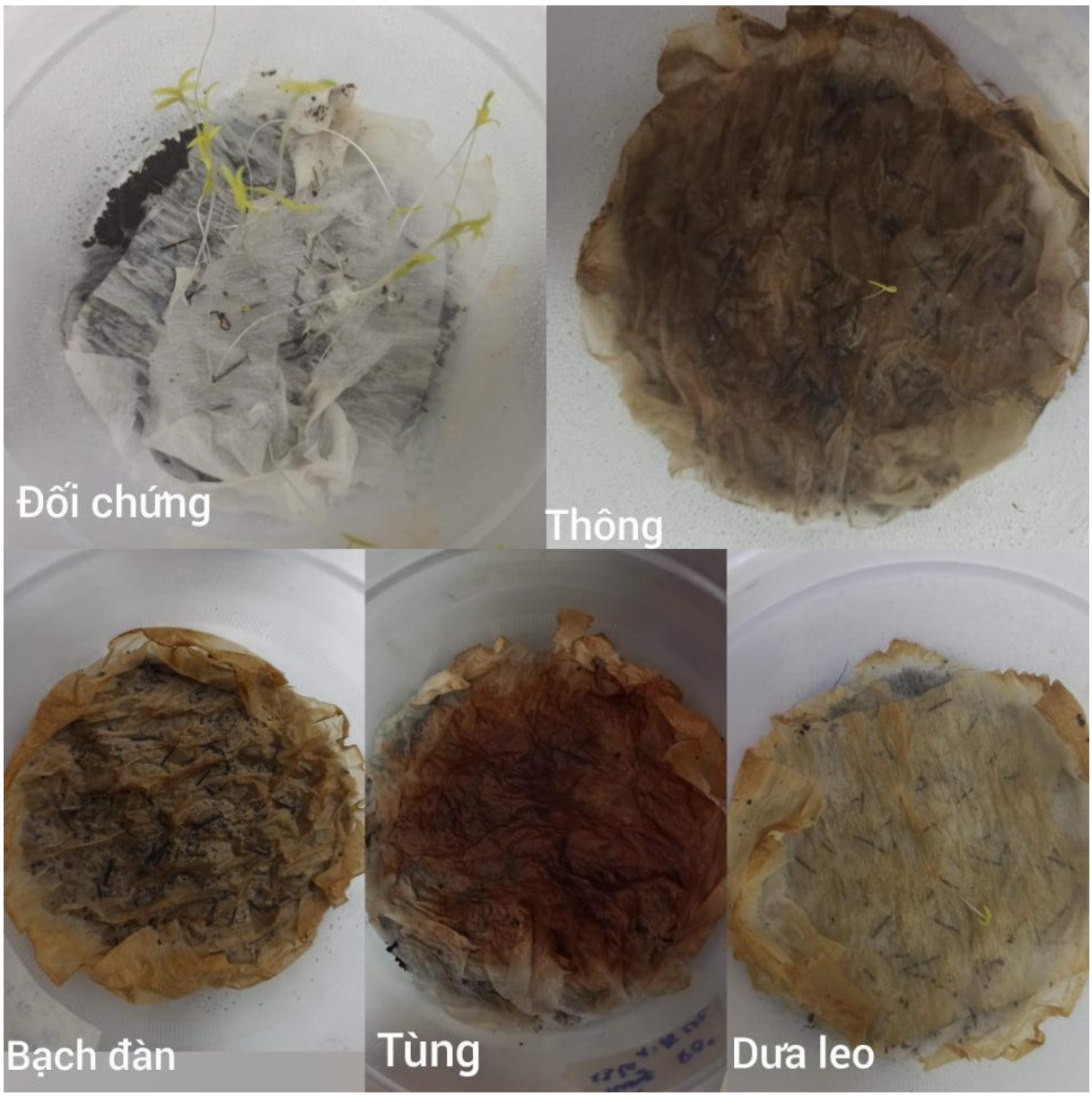
Kết quả khảo sát tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết của cây thông, tùng, dưa leo và bạch đàn ở ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C được trình bày ở bảng 3.1

Bảng 3.1 Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 80^{o}C.

Nghiệm thức	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
Đối Chứng	2,67a	18,00a	25,33a	49,33a	63,33a	63,33a	64,00a
Thông	0,00b	0,67b	1,33b	2,67b	3,33b	3,33b	4,00b
Tùng	0,00b	0,00b	0,67b	1,33b	2,00b	2,67b	3,33b
Dưa leo	0,00b	0,67b	0,67b	2,00b	3,33b	5,33b	8,00b
Bạch đàn	0,00b	0,00b	0,00b	1,33b	1,33b	1,33b	1,33b

Kết quả bảng 3.1cho thấy dịch chiết của cây bạch đàn có khả năng kiểm soát cỏ dại tốt nhất, thể hiện là tỉ lệ hạt cỏ xuyến chi nảy mầm sau 7 ngày theo dõi là thấp nhất. Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi ở nghiệm thức sử dụng dịch chiết cây dưa leo là cao nhất đạt 8,0% sau 7 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên, tỉ lệ nảy mầm này cũng thấp hơn rất nhiều so với tỉ lệ nảy mầm của đối chứng điều này chứng minh dịch chiết các chất từ thông, tùng, dưa leo, bạch đàn chứa một số chất ức chế nảy mầm (allelochemical).

Nhìn chung, dịch chiết của cây thông, bạch đàn, dưa leo ở ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C đều có khả năng ức chế nảy mầm đối với cỏ xuyến chi nên có tiềm năng như một loại thuốc bảo vệ thực vật phòng trừ cỏ dại. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.1



Hình 3.1: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 80^{o}C sau 7 ngày gieo.

3.1.2. Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ở ngưỡng nhiệt độ chiết 100^{o}C

Kết quả khảo sát tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết của cây thông, tùng, dưa leo và bạch đàn ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C được trình bày ở bảng 3.2

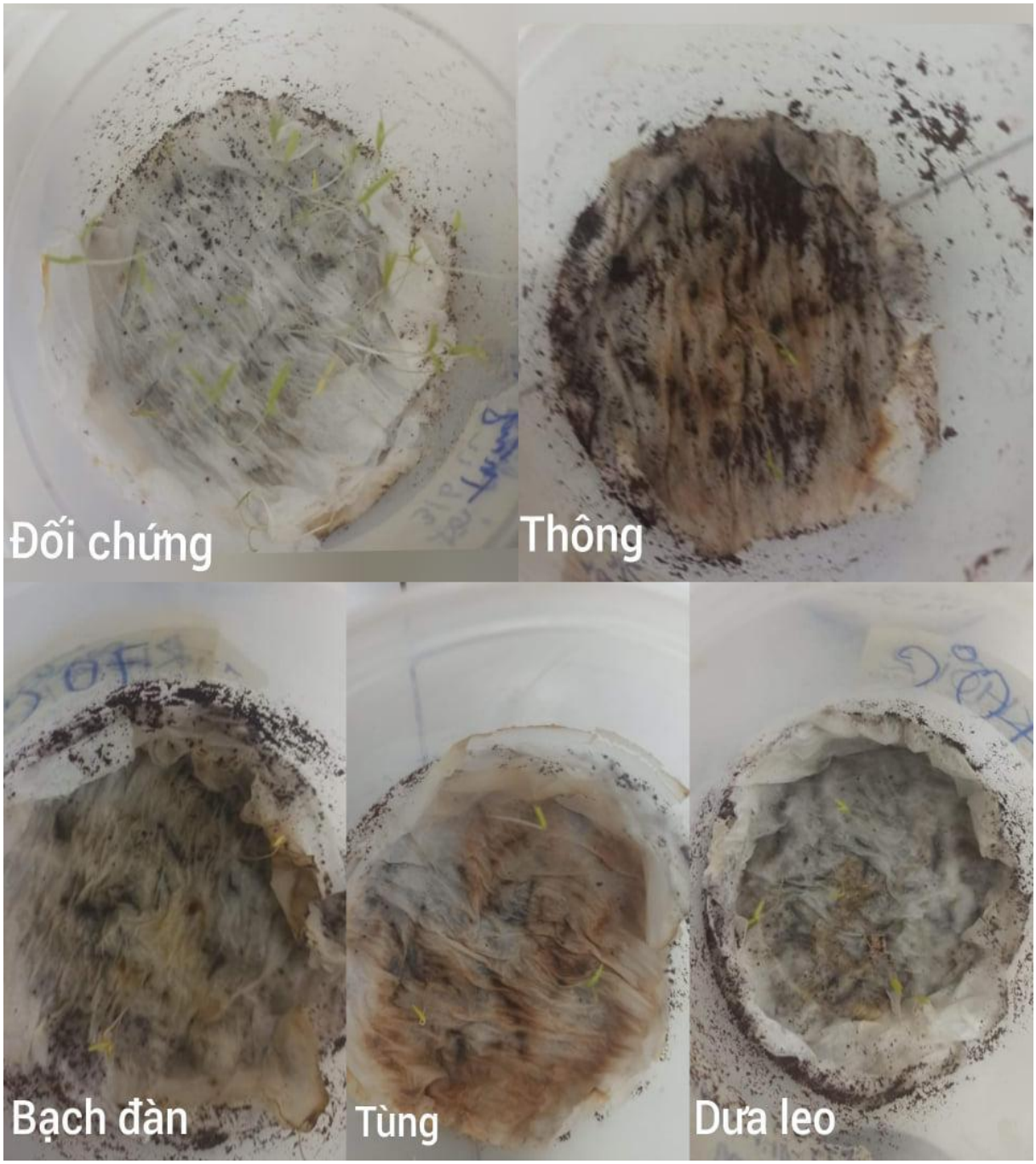
Bảng 3.2: Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 100^{o}C.

Nghiệm thức	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
DC	9,33a	30,00a	42,67a	54,00a	60,67a	60,67a	61,33a
Thông	2,00b	2,00b	4,00b	4,67b	5,33b	5,33b	6,00b
Tùng	1,33b	1,33b	2,00b	2,00b	2,67b	3,33b	4,00b
Dưa leo	1,33b	6,67b	10,00b	11,33b	13,33b	13,33b	13,33b
Bạch đàn	1,33b	2,00b	2,67b	5,33b	7,33b	8,00b	8,00b

Kết quả thí nghiệm cho thấy dịch chiết của các loại thực vật các nhau ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ dại. Sau 1 ngày gieo, tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi ở nghiệm thức đối chứng đạt cao nhất, tiếp theo là dịch chiết của lá thông. Sau 2 ngày gieo, tỉ lệ nảy mầm của dịch chiết dưa leo cao hơn hẳn so với dịch chiết của thông, bạch đàn và tùng.

Các ngày thí nghiệm tiếp theo tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi ở nghiệm thức sử dụng dịch chiết thí nghiệm thức sử dụng dịch chiết dưa leo cao nhất, tiếp theo là nghiệm thức sử dụng dịch chiết bạch đàn và lá thông. Nghiệm thức sử dụng dịch chiết lá tùng có tỉ lệ hạt xuyến chi nảy mầm thấp nhất. Như vậy, ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C, dịch chiết của lá tùng có hiệu quả nhất trong việc ức chế nảy mầm của cỏ xuyến chi.

Nhìn chung, dịch chiết của cây thông, bạch đàn, dưa leo ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C đều có khả năng ức chế nảy mầm đối với cỏ xuyến chi nên có tiềm năng như một loại thuốc bảo vệ thực vật phòng trừ cỏ dại. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.2



Hình 3.2. Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 100^{o}C sau 7 ngày gieo

3.1.3. Ảnh hưởng của các loại dịch chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi ở ngưỡng nhiệt độ chiết 120°C

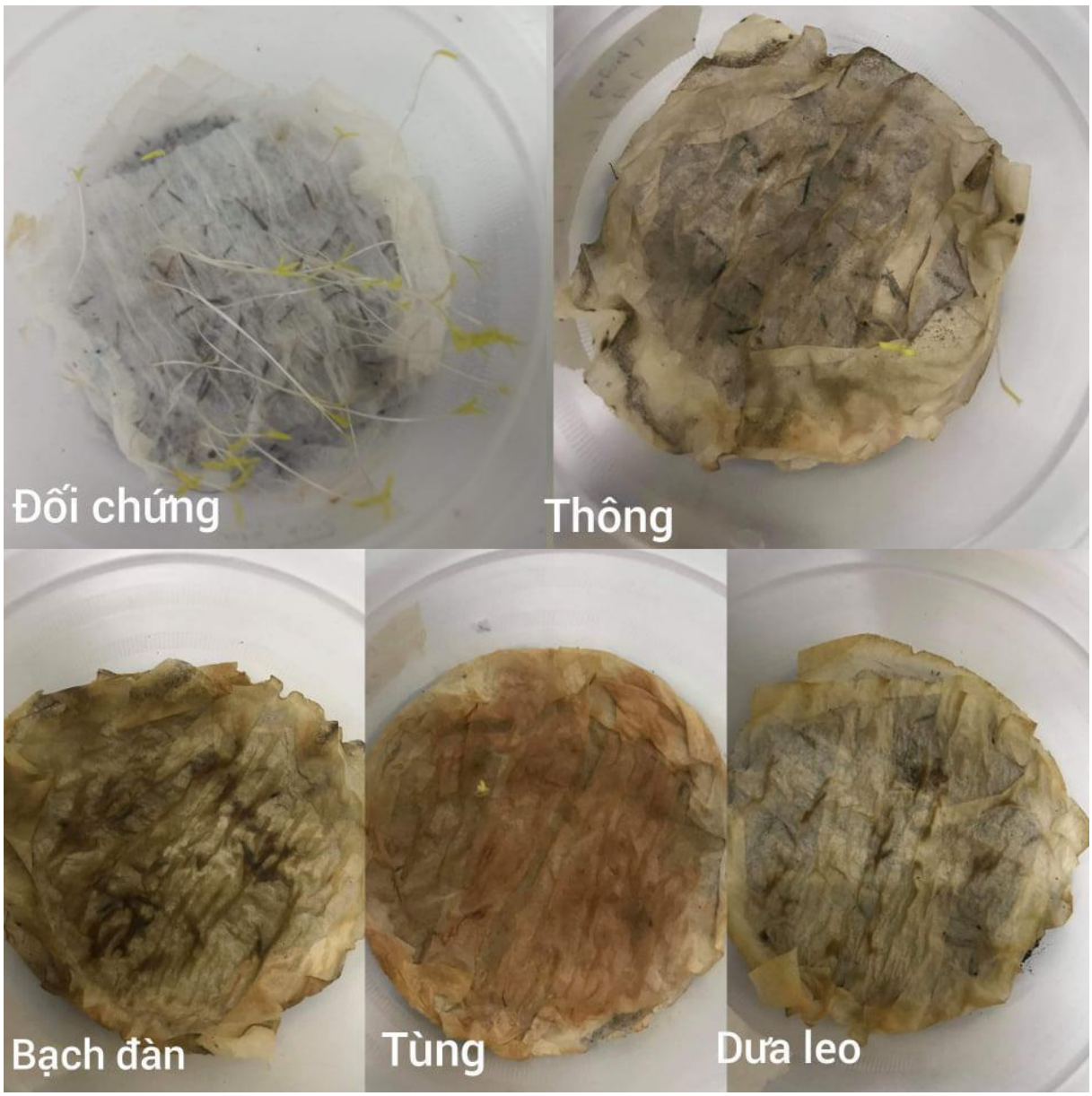
Kết quả khảo sát tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết của cây thông, tùng, dưa leo và bạch đàn ở ngưỡng nhiệt độ 120°C được trình bày ở bảng 3.3

Bảng 3.3 Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi trên các loại dịch chiết khác nhau ở ngưỡng nhiệt độ chiết 120°C

Nghiệm thức	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
DC	2,67a	24,67a	30,00a	53,33a	63,33a	63,33a	64,67a
Thông	0,00b	0,67b	1,33b	2,67b	3,33b	4,00b	4,00b
Tùng	0,00b	0,00b	0,00b	0,67b	0,67b	1,33b	2,00b
Dưa leo	0,00b	0,67b	0,67b	0,67b	1,33b	1,33b	2,00b
Bạch đàn	0,00b	0,00b	0,00b	0,67b	1,33b	2,00b	2,00b

Ở ngưỡng nhiệt độ 120°C, dịch chiết của lá thông, tùng, bạch đàn và dưa leo đều có khả năng ức chế nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi. Thời gian ức chế nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi của dịch chiết lá tùng và bạch đàn kéo dài nhất, thể hiện là sau 3 ngày gieo, dịch chiết của bạch đàn và tùng ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi.

Dịch chiết của cây thông, bạch đàn, dưa leo ở ngưỡng nhiệt độ 120°C đều có khả năng ức chế nảy mầm đối với cỏ xuyến chi nên có tiềm năng như một loại thuốc bảo vệ thực vật phòng trừ cỏ dại. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở hình 3.3



Hình 3.3: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở 120^{o}C sau 7 ngày gieo.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi

3.2.1. Ảnh hưởng của dịch chiết lá thông ở các ngưỡng nhiệt độ chiết khác nhau đến khả năng kháng cỏ xuyến chi

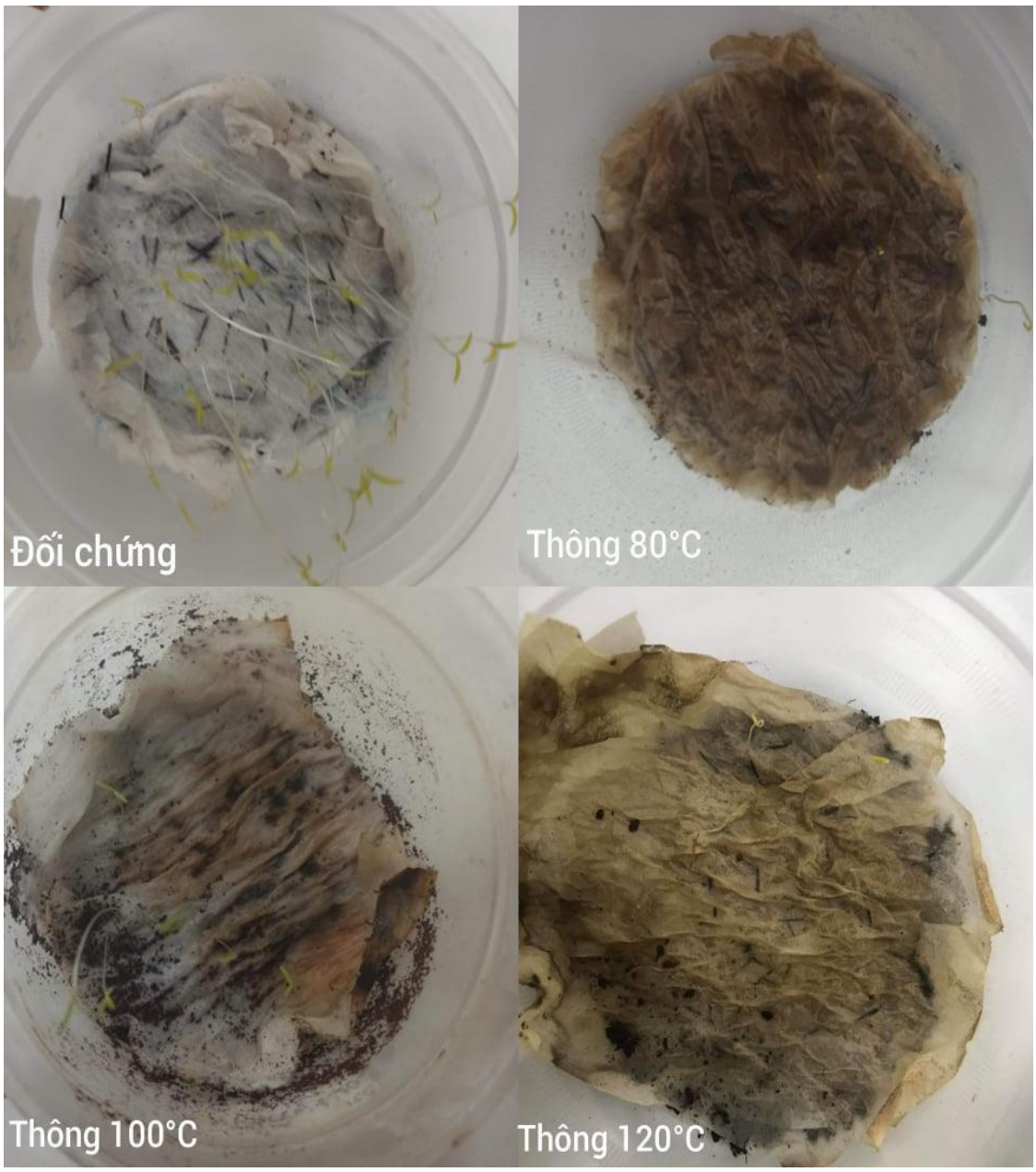
Kết quả thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lá thông ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được trình bày ở bảng 3.4

Bảng 3.4. Tỉ lệ nảy mầm của cỏ xuyến chi khi xử lý bằng dịch chiết lá thông ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau

Nghiệm thức	Tỉ lệ nảy mầm hạt cỏ xuyến chi (%)						
	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
Đối chứng	2,67ns	18,00 a	25,33a	49,33a	63,33 a	63,33a	64,00a
80^{o}C	0,00	0,67 b	1,33 b	2,67 b	3,33b	3,33b	4,00b
100^{o}C	2,00	2,00 b	4,00 b	4,67 b	5,33b	5,33b	6,00b
120^{o}C	0,00	0,67 b	1,33 b	2,67 b	3,33b	4,00b	4,00b

Ghi chú: NSG: Ngày sau gieo; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt về mặt thống kê với p>=95%; ns: không có sự khác biệt.

Dịch chiết lá thông có khả năng ức chế sự nảy mầm của cỏ xuyến chi, ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C có hiệu lực thấp nhất với tỷ lệ hạt cỏ xuyến chi nảy mầm cao nhất. Ở ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C và 120^{o}C có tỷ lệ hạt nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi gần như bằng nhau.



Hình 3.4: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết thông ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo.

3.2.2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá tùng ở các ngưỡng nhiệt độ chiết khác nhau đến khả năng nảy mầm cỏ xuyến chi

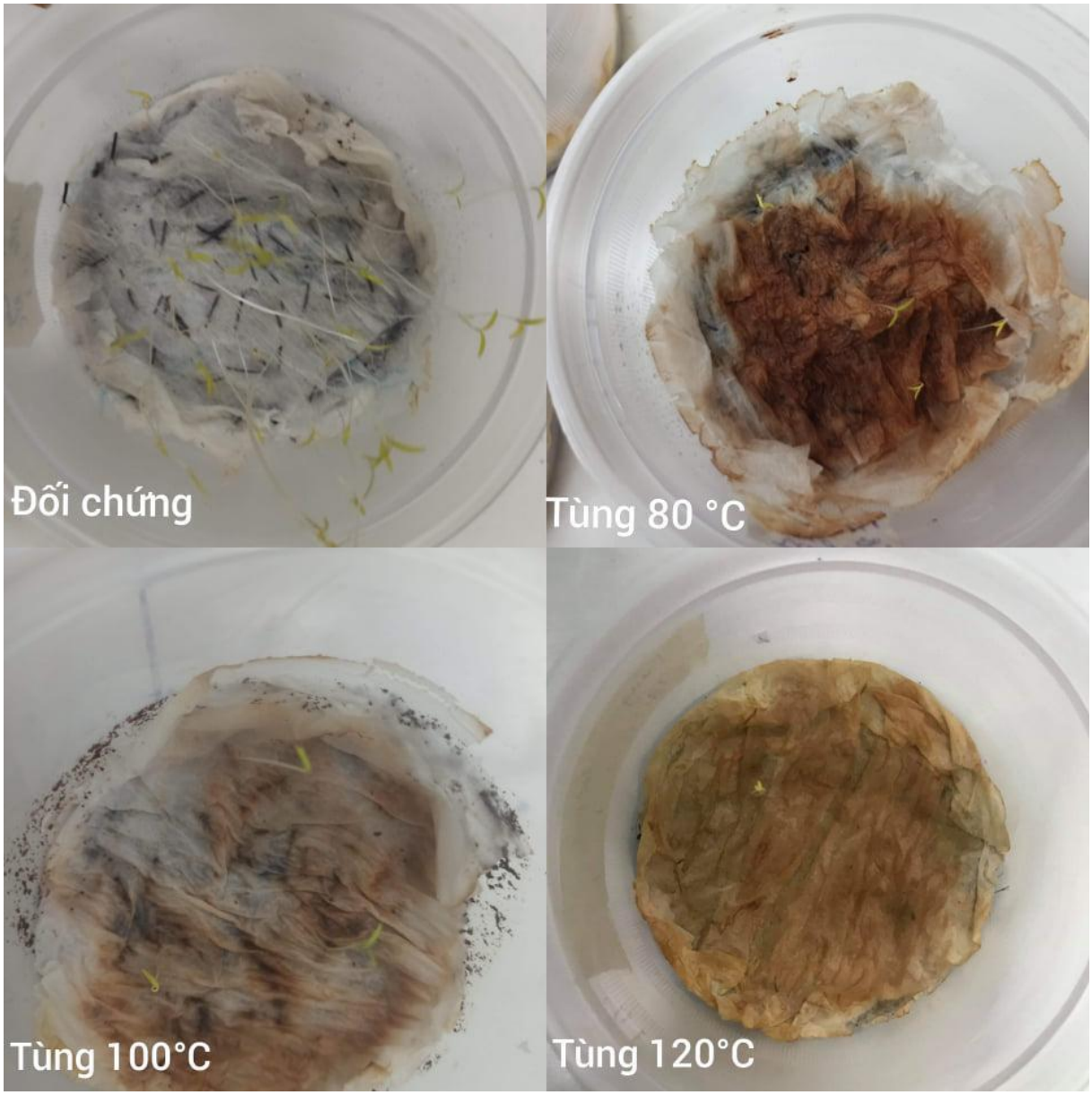
Kết quả thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lá tùng ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được trình bày ở bảng 3.5

Bảng 3.5: Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến cho được xử lý bằng dịch chiết của lá tùng ở các ngưỡng nhiệt khác nhau

Nghiệm thức	Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi (%)						
	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
Đối chứng	2,67ns	18,00a	25,33a	49,33a	63,33a	63,33a	64,00a
80^{o}C	0,00	0,00b	0,67b	1,33b	2,00b	2,67b	3,33b
100^{o}C	1,33	1,33b	2,00b	2,00b	2,67b	3,33b	4,00b
120^{o}C	0,00	0,00b	0,00b	0,67b	0,67b	1,33b	2,00b

Ghi chú: NSG: Ngày sau gieo; ns; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt về mặt thống kê

Dịch chiết lá tùng có khả năng ức chế sự nảy mầm của cỏ xuyến chi, ở ngưỡng nhiệt độ 120^{o}C dịch chiết có hiệu lực ức chế tỷ lệ nảy mầm cao nhất với tỷ lệ hạt cỏ nảy mầm thấp nhất. Ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C dịch chiết của tùng có hiệu lực thấp nhất thể hiện ở tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi sau 7 ngày gieo.



Hình 3.5: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết tùng ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo.

3.2.3. Ảnh hưởng của dịch chiết dưa leo ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm cỏ xuyến chi

Kết quả thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết dưa leo ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được trình bày ở bảng 3.6

Bảng 3.6. Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của dưa leo ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau

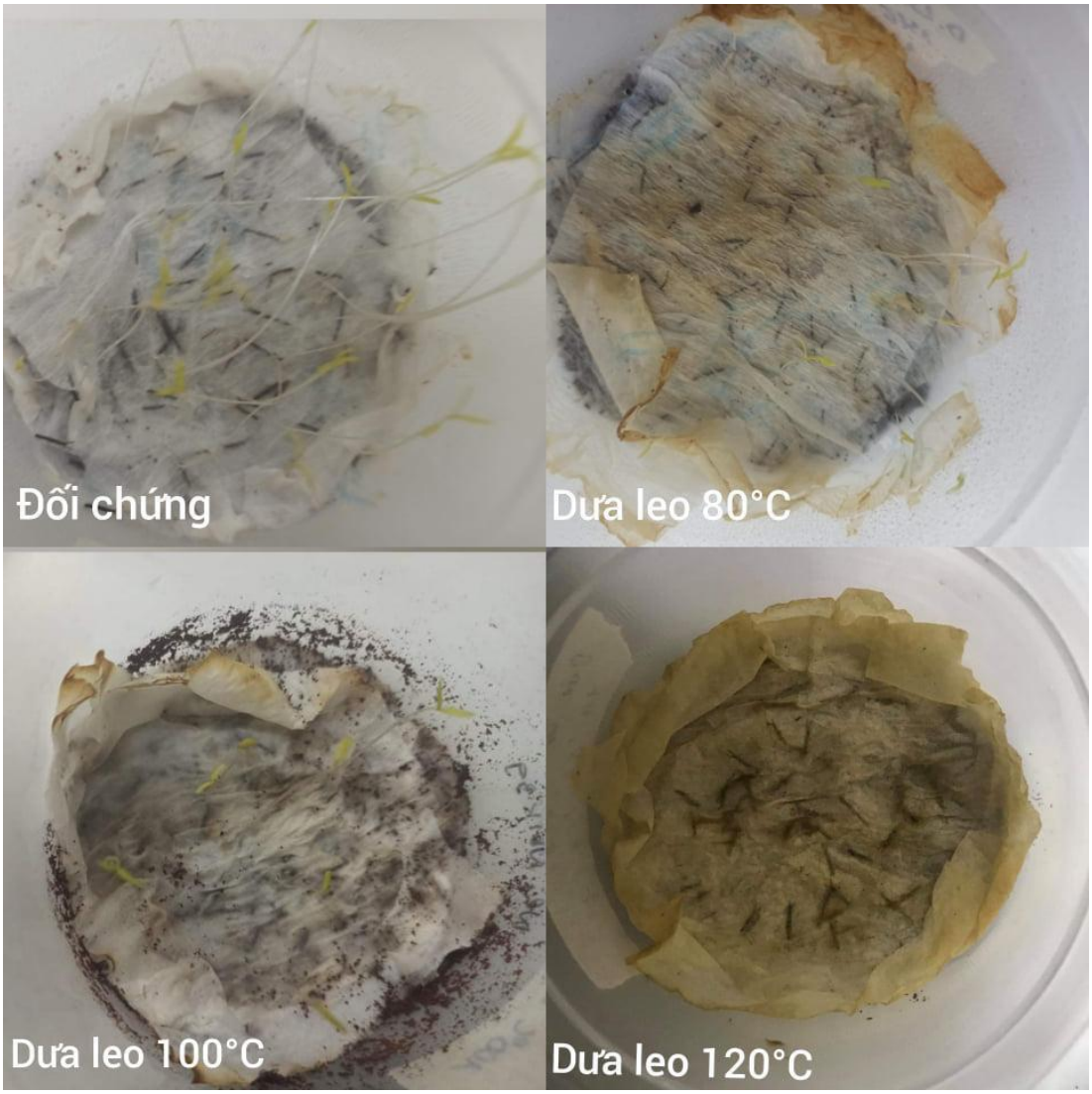
Nghiệm thức	Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi (%)						
	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
Đối chứng	2,67ns	18,00a	25,33a	49,33a	63,33a	63,33a	64,00a
80^{o}C	0,00	0,67b	0,67b	2,00b	3,33b	5,33b	8,00ab
100^{o}C	1,33	6,67b	10,00b	11,33b	13,33ab	13,33ab	13,33ab
120^{o}C	0,00	0,67b	0,67b	0,67b	1,33b	1,33b	2,00b

Ghi chú: NSG: Ngày sau gieo

Dịch chiết dưa leo có khả năng ức chế sự nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi, ở ngưỡng 120^{o}C dịch chiết có hiệu lực cao nhất với tỷ lệ hạt cỏ xuyến chi nảy mầm thấp nhất.

Ở ngưỡng 100^{o}C dịch chiết cho kết quả khác hoàn toàn so với đối chứng, dịch chiết có hiệu lực ức chế sự nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi thấp nhất thể hiện với tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi cao nhất sau 7 ngày gieo.

Ở ngưỡng nhiệt độ 120^{o}C tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi thấp hơn nhiều so với dịch chiết ở ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C và 100^{o}C điều này thể hiện rằng ở nhiệt độ 120^{o}C khả năng chiết (6S,7E,9S)-6,9,10-trihydroxy-4,7- megastigma dien-3-one (TMO) là tốt nhất trong ba khoảng nhiệt độ trên. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hồng Sơn khi chứng minh rằng dịch chiết của cây dưa leo cũng có khả năng trong phòng trừ cỏ xuyến chi, dịch chiết được đun ở các ngưỡng 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C.



Hình 3.6: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết dưa leo ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo.

3.2.4: Ảnh hưởng của dịch chiết lá bạch đàn ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi

Kết quả thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lá bạch đàn ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được trình bày ở bảng 3.7

Bảng 3.7. Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi được xử lý bằng dịch chiết của lá bạch đàn ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau

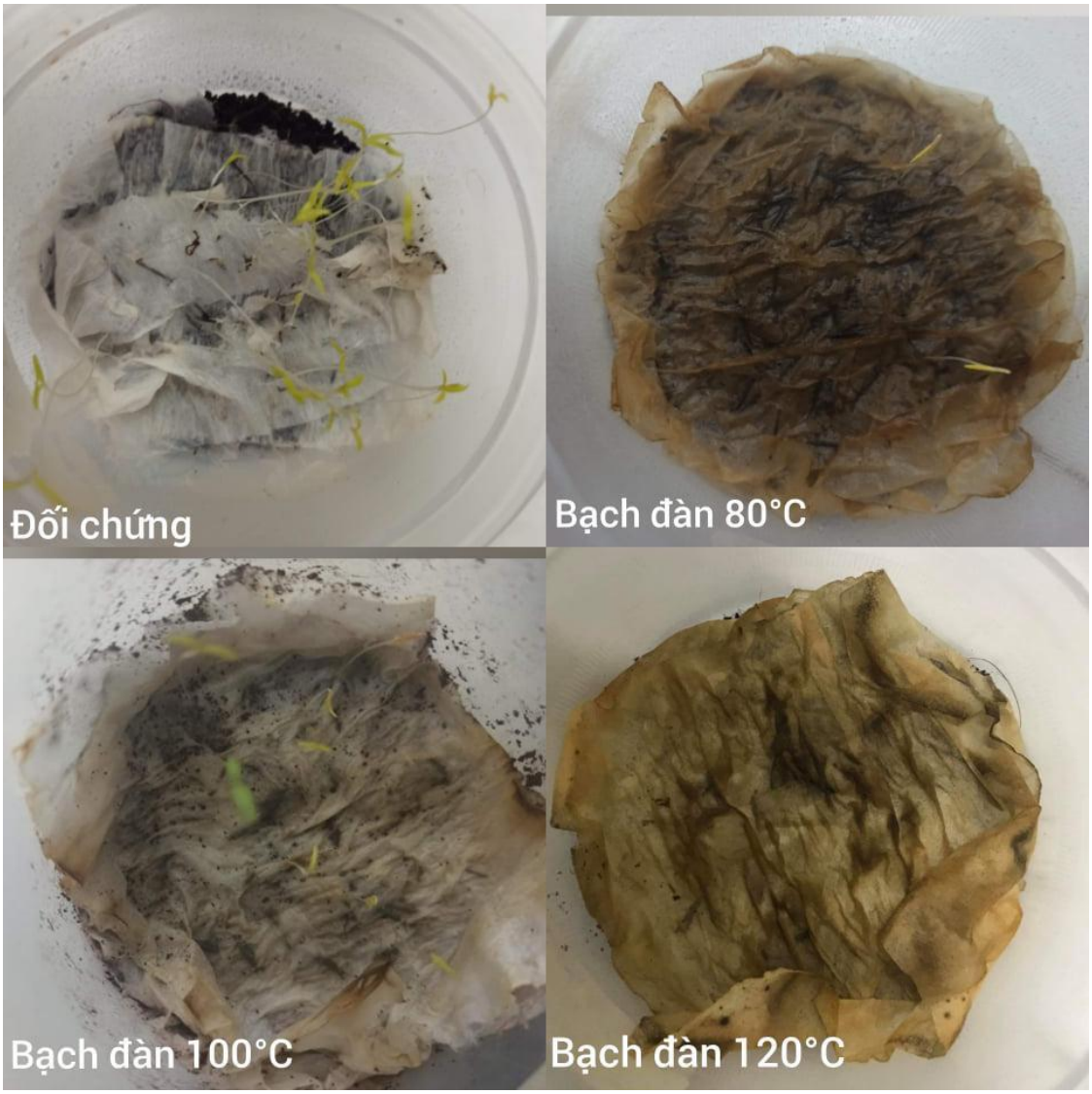
Nghiệm thức	Tỉ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi (%)						
	1 NSG	2 NSG	3 NSG	4 NSG	5 NSG	6 NSG	7 NSG
Đối chứng	2,67ns	18,00a	25,33a	49,33a	63,33a	63,33a	64,00a
80^{o}C	0,00	0,00b	0,00b	1,33b	1,33b	1,33ab	1,33ab
100^{o}C	1,33	2,00b	2,67b	5,33b	7,33b	8,00b	8,00b
120^{o}C	0,00	0,00b	0,00b	0,67b	1,33b	2,00b	2,00b

Dịch chiết bạch đàn có khả năng ức chế sự nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi, ở ngưỡng 80^{o}C dịch chiết có hiệu lực cao nhất với tỷ lệ hạt cỏ xuyến chi nảy mầm thấp nhất. Ở ngưỡng 100^{o}C dịch chiết có hiệu lực ức chế sự nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi thấp nhất, thể hiện với tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi cao nhất sau 7 ngày gieo.

Ở ngưỡng 100^{o}C dịch chiết cho kết quả khác hoàn toàn so với đối chứng, tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi thấp nhất sau 7 ngày gieo.

Tỷ lệ nảy mầm của hạt cỏ xuyến chi ở ngưỡng nhiệt độ 100^{o}C cao hơn so với ngưỡng nhiệt độ 80^{o}C và 120^{o}C, có thể nhận thấy nhiệt độ 80^{o}c và 120^{o}C thì khả năng chiết các chất trong lá, kể cả tinh dầu (alkaloid) trong lá nhiều hơn. Chính những alkaloid này có ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của cỏ xuyến chi. Dịch chiết bạch đàn ở nhiệt độ 80^{o}C và 120^{o}C ức chế hoàn toàn hạt cỏ xuyến chi nảy mầm trong 3 ngày sau gieo.

Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hồng Sơn khi chứng minh rằng dịch chiết của lá bạch đàn cũng có khả năng trong phòng trừ cỏ xuyến chi, dịch chiết được đun ở các ngưỡng 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C.



Hình 3.7: Hạt cỏ xuyến chi sau khi phun dịch chiết ở các khoảng nhiệt độ sau 7 ngày gieo.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ kết quả trên chúng tôi rút ra được những kết luận sau:

Nhiệt độ chiết 80^{o}C, 100^{o}C, 120^{o}C của các loại dịch chiết lá thông, tùng, bạch đàn và dưa leo đều có tác dụng ức chế sự nảy mầm của cỏ xuyến chi trong điều kiện phòng thí nghiệm và khác biệt so với đối chứng.

Dịch chiết bạch đàn ở ngưỡng nhiệt 80^{o}C và 120^{o}C có hiệu quả ức chế sự nảy mầm của cỏ xuyến chi lâu nhất, thời gian ức chế cỏ xuyến chi nảy mầm kéo dài trong thời gian 3 ngày.

4.2 Kiến nghị

- Chúng em mong tiếp tục nhận được sự hỗ trợ, giúp đỡ từ quý thầy cô, đặc biệt là kinh phí thực hiện đề tài.

- Với kết quả bước đầu nhóm mong muốn đề tài tiếp tục được thực hiện để chúng em có cơ hội học hỏi, nghiên cứu sâu hơn để tạo ra những sản phẩm tốt, giúp ích cho ngành Nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng việt

1. Hồ Lệ Thi và Hisashi Kato-Noguchi, 2018. Phân lập và định danh chất đối kháng cỏ dại (allelochemical) từ cây dưa leo. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, Số 3(88)/2018
2. Nguyễn Hồng Sơn, Quách Thị Minh Thu, Nguyễn Thị Thanh Thuỷ, Nguyễn Xuân Độ, Đỗ Ngọc Hải, Vũ Đình Lư, 2000. Nghiên cứu khả năng ứng dụng một số loài cây độc để phòng trừ cỏ dại.
3. Nguyễn Hữu Trúc, 2011. *Quản lý cỏ dại*. Đại học Nông lâm thành phố Hồ Chí Minh.

Tài liệu tiếng anh:

4. O'ConnellS, Christian T. Harms and James R. F. Allen, 1998. *Metolachlor, S-metolachlor and their within sustainable weed-management role*. Thiếu tên tạp chí
5. R. Kieloch, K. Domaradzki, J. Górniak, 2006. Pinoxaden – a new active ingredient for grass weed control in cereals of South-West Poland
6. Dilday. R. H., W. G. Yan, K. A. K. Moldenhauer and K. A. Gravois, 1998. Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weed, in: Allelopathy in rice, Edited by M. Olofsdotter, IRI, Los Banos, Laguna, Philippines, 1998, p.7-26.
7. N Setia, DR Batish, HP Singh 2007 – repository.ias.ac.in. Phytotoxicity of volatile oil from Eucalyptus citriodora against some weedy species, *Journal of Environmental*.
8. Sadrollah Ramezani, Mohammad Jamal Saharkhiz, Fahimeh Ramezani and Mohammad Hossein Fotokian (năm). Use of Essential Oil as Bioherbicides
9. WHO, 1990. Public health impact of pesticides used in agriculture.

Pimentel, D. David Andow, Rada Dyson-Hudson, David Gallahan, Stuart Jacobson, Molly Irish, Susan Kroop, Anne Moss, Ilse Schreiner, Mike Shepard, Todd Thompson and Bill Vinzant, environmental and social costs of pesticide; aperlinary assessment.

10. Andhra Pradesh G. Gaddeyyaand P. K. Ratna Kumar, 2014.Studies on weed infestation of some agricultural fields at Visakhapatnam district, Centre of Advanced Study, Dept. of Botany, Andhra University Visakhapatnam-530003, Andhra Pradesh, J*ournal of Crop and Weed*, 10(2):419-429(2014)
11. Buzina, H.F, and Haggag, W.M,2016. Weed Control in Clean Agriculture: A Review Métodos Alternativos de Controle não Químicos de Plantas Daninhas: Uma Revisão, daninha vol.34 no.2 Viçosa Apr./June 2016
12. Grossbard, E. and H.A. Davies, 1976.Specific Microbial Responses to Herbicides." Weed Res. 16: 163-169.
13. Melander, Bo 2006. Current achievements and future directions of physical weed control in Europe.
14. Ascard J. 1995. Ảnh hưởng của ngọn lửa cỏ dại đối với các loài cỏ dại ở sự phát triển khác nhau ở các giai đoạn.
15. Melissa Lewis 2017, Chemicals That Kill Grass. Thiếu tạp chí hoặc nhà xuất bản
16. Victoria Bailey,2017. *When to Put Down Scotts*, Turf Builder.
17. Homer M. LeBaron, Janis E. McFarland and Orvin C. Burnside, 2008. *The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*. Chapter 16 Benefits of Triazine Herbicides and Other Weed Control Technology in Citrus Management.
18. Mahonia Ecological Consulting, 2003. Aquatic Herbicide Management.
19. Svata M. Louda, Robert A. Masters, 1993. Biological Control of Weeds in Great Plains Rangelands. Thiếu nhà xuất bản

Tài liệu internet:

20. Phúc Hậu (2018), Thuốc diệt cỏ: Độc hại nhưng vẫn dùng https://www.sggp.org.vn/thuoc-diet-co-doc-hai-nhung-van-dung-542141.html, 2018
21. Nguyễn Công Thành (2016), Phát triển thuốc trừ cỏ sinh học trong sản xuất hữu cơ. http://iasvn.org/tin-tuc/Phat-trien-thuoc-tru-co-sinh-hoc-trong-san-xuat-huu-co-8874.html
22. http://www.botanical.com/botanical/mgmh/e/eucaly14.html
23. https://cutramhuyhoang.com/cay-bach-dan/#Dac_diem_sinh_thai_cua_cay_bach_dan
24. http://camnangcaytrong.com/cay-dua-chuot-dua-leo-cd29.htm

PHỤ LỤC

Thông qua xử lý bằng spss

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG 1	1.00	2.00	2.66667*	.94281	.022	.4925	4.8408
		3.00	.66667	.94281	.500	-1.5075	2.8408
		4.00	2.66667*	.94281	.022	.4925	4.8408
	2.00	1.00	-2.66667*	.94281	.022	-4.8408	-.4925
		3.00	-2.00000	.94281	.067	-4.1741	.1741
		4.00	.00000	.94281	1.000	-2.1741	2.1741
	3.00	1.00	-.66667	.94281	.500	-2.8408	1.5075
		2.00	2.00000	.94281	.067	-.1741	4.1741

		4.00	2.00000	.94281	.067	-.1741	4.1741
	4.00	1.00	-2.66667*	.94281	.022	-4.8408	-.4925
		2.00	.00000	.94281	1.000	-2.1741	2.1741
		3.00	-2.00000	.94281	.067	-4.1741	.1741
NSG 2	1.00	2.00	17.33333*	3.12694	.001	10.1226	24.5441
		3.00	16.00000*	3.12694	.001	8.7893	23.2107
		4.00	17.33333*	3.12694	.001	10.1226	24.5441
	2.00	1.00	-17.33333*	3.12694	.001	-24.5441	-10.1226
		3.00	-1.33333	3.12694	.681	-8.5441	5.8774
		4.00	.00000	3.12694	1.000	-7.2107	7.2107
	3.00	1.00	-16.00000*	3.12694	.001	-23.2107	-8.7893
		2.00	1.33333	3.12694	.681	-5.8774	8.5441

		4.00	1.33333	3.12694	.681	-5.8774	8.5441
	4.00	1.00	-17.33333*	3.12694	.001	-24.5441	-10.1226
		2.00	.00000	3.12694	1.000	-7.2107	7.2107
		3.00	-1.33333	3.12694	.681	-8.5441	5.8774
NSG 3	1.00	2.00	24.00000*	4.24264	.000	14.2165	33.7835
		3.00	21.33333*	4.24264	.001	11.5498	31.1169
		4.00	24.00000*	4.24264	.000	14.2165	33.7835
	2.00	1.00	-24.00000*	4.24264	.000	-33.7835	-14.2165
		3.00	-2.66667	4.24264	.547	-12.4502	7.1169
		4.00	.00000	4.24264	1.000	-9.7835	9.7835
	3.00	1.00	-21.33333*	4.24264	.001	-31.1169	-11.5498
		2.00	2.66667	4.24264	.547	-7.1169	12.4502

		4.00	2.66667	4.24264	.547	-7.1169	12.4502
	4.00	1.00	-24.00000*	4.24264	.000	-33.7835	-14.2165
		2.00	.00000	4.24264	1.000	-9.7835	9.7835
		3.00	-2.66667	4.24264	.547	-12.4502	7.1169
NSG 4	1.00	2.00	46.66667*	5.18545	.000	34.7090	58.6243
		3.00	44.66667*	5.18545	.000	32.7090	56.6243
		4.00	46.66667*	5.18545	.000	34.7090	58.6243
	2.00	1.00	-46.66667*	5.18545	.000	-58.6243	-34.7090
		3.00	-2.00000	5.18545	.710	-13.9577	9.9577
		4.00	.00000	5.18545	1.000	-11.9577	11.9577
	3.00	1.00	-44.66667*	5.18545	.000	-56.6243	-32.7090
		2.00	2.00000	5.18545	.710	-9.9577	13.9577

		4.00	2.00000	5.18545	.710	-9.9577	13.9577
	4.00	1.00	-46.66667*	5.18545	.000	-58.6243	-34.7090
		2.00	.00000	5.18545	1.000	-11.9577	11.9577
		3.00	-2.00000	5.18545	.710	-13.9577	9.9577
NSG 5	1.00	2.00	60.00000*	3.09121	.000	52.8717	67.1283
		3.00	58.00000*	3.09121	.000	50.8717	65.1283
		4.00	60.00000*	3.09121	.000	52.8717	67.1283
	2.00	1.00	-60.00000*	3.09121	.000	-67.1283	-52.8717
		3.00	-2.00000	3.09121	.536	-9.1283	5.1283
		4.00	.00000	3.09121	1.000	-7.1283	7.1283
	3.00	1.00	-58.00000*	3.09121	.000	-65.1283	-50.8717
		2.00	2.00000	3.09121	.536	-5.1283	9.1283

		4.00	2.00000	3.09121	.536	-5.1283	9.1283
	4.00	1.00	-60.00000*	3.09121	.000	-67.1283	-52.8717
		2.00	.00000	3.09121	1.000	-7.1283	7.1283
		3.00	-2.00000	3.09121	.536	-9.1283	5.1283
NSG 6	1.00	2.00	60.00000*	3.05505	.000	52.9550	67.0450
		3.00	58.00000*	3.05505	.000	50.9550	65.0450
		4.00	59.33333*	3.05505	.000	52.2884	66.3783
	2.00	1.00	-60.00000*	3.05505	.000	-67.0450	-52.9550
		3.00	-2.00000	3.05505	.531	-9.0450	5.0450
		4.00	-.66667	3.05505	.833	-7.7116	6.3783
	3.00	1.00	-58.00000*	3.05505	.000	-65.0450	-50.9550
		2.00	2.00000	3.05505	.531	-5.0450	9.0450

		4.00	1.33333	3.05505	.674	-5.7116	8.3783
	4.00	1.00	-59.33333*	3.05505	.000	-66.3783	-52.2884
		2.00	.66667	3.05505	.833	-6.3783	7.7116
		3.00	-1.33333	3.05505	.674	-8.3783	5.7116
NSG 7	1.00	2.00	60.00000*	3.16228	.000	52.7078	67.2922
		3.00	58.00000*	3.16228	.000	50.7078	65.2922
		4.00	60.00000*	3.16228	.000	52.7078	67.2922
	2.00	1.00	-60.00000*	3.16228	.000	-67.2922	-52.7078
		3.00	-2.00000	3.16228	.545	-9.2922	5.2922
		4.00	.00000	3.16228	1.000	-7.2922	7.2922
	3.00	1.00	-58.00000*	3.16228	.000	-65.2922	-50.7078
		2.00	2.00000	3.16228	.545	-5.2922	9.2922

		4.00	2.00000	3.16228	.545	-5.2922	9.2922
	4.00	1.00	-60.00000*	3.16228	.000	-67.2922	-52.7078
		2.00	.00000	3.16228	1.000	-7.2922	7.2922
		3.00	-2.00000	3.16228	.545	-9.2922	5.2922

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tùng qua xử lý số liệu bằng spss:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG 1	1.00	2.00	2.66667*	.66667	.004	1.1293	4.2040
		3.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
		4.00	2.66667*	.66667	.004	1.1293	4.2040

	2.00	1.00	-2.66667*	.66667	.004	-4.2040	-1.1293
		3.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
		4.00	.00000	.66667	1.000	-1.5373	1.5373
	3.00	1.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
		2.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
		4.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
	4.00	1.00	-2.66667*	.66667	.004	-4.2040	-1.1293
		2.00	.00000	.66667	1.000	-1.5373	1.5373
		3.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
NSG 2	1.00	2.00	18.00000*	2.98142	.000	11.1248	24.8752
		3.00	16.66667*	2.98142	.001	9.7915	23.5418
		4.00	18.00000*	2.98142	.000	11.1248	24.8752

	2.00	1.00	-18.00000*	2.98142	.000	-24.8752	-11.1248
		3.00	-1.33333	2.98142	.667	-8.2085	5.5418
		4.00	.00000	2.98142	1.000	-6.8752	6.8752
	3.00	1.00	-16.66667*	2.98142	.001	-23.5418	-9.7915
		2.00	1.33333	2.98142	.667	-5.5418	8.2085
		4.00	1.33333	2.98142	.667	-5.5418	8.2085
	4.00	1.00	-18.00000*	2.98142	.000	-24.8752	-11.1248
		2.00	.00000	2.98142	1.000	-6.8752	6.8752
		3.00	-1.33333	2.98142	.667	-8.2085	5.5418
NSG 3	1.00	2.00	24.66667*	4.21637	.000	14.9437	34.3896
		3.00	23.33333*	4.21637	.001	13.6104	33.0563
		4.00	25.33333*	4.21637	.000	15.6104	35.0563

	2.00	1.00	-24.66667*	4.21637	.000	-34.3896	-14.9437
		3.00	-1.33333	4.21637	.760	-11.0563	8.3896
		4.00	.66667	4.21637	.878	-9.0563	10.3896
	3.00	1.00	-23.33333*	4.21637	.001	-33.0563	-13.6104
		2.00	1.33333	4.21637	.760	-8.3896	11.0563
		4.00	2.00000	4.21637	.648	-7.7230	11.7230
	4.00	1.00	-25.33333*	4.21637	.000	-35.0563	-15.6104
		2.00	-.66667	4.21637	.878	-10.3896	9.0563
		3.00	-2.00000	4.21637	.648	-11.7230	7.7230
NSG 4	1.00	2.00	48.00000*	5.09902	.000	36.2416	59.7584
		3.00	47.33333*	5.09902	.000	35.5750	59.0917
		4.00	48.66667*	5.09902	.000	36.9083	60.4250

	2.00	1.00	-48.00000*	5.09902	.000	-59.7584	-36.2416
		3.00	-.66667	5.09902	.899	-12.4250	11.0917
		4.00	.66667	5.09902	.899	-11.0917	12.4250
	3.00	1.00	-47.33333*	5.09902	.000	-59.0917	-35.5750
		2.00	.66667	5.09902	.899	-11.0917	12.4250
		4.00	1.33333	5.09902	.800	-10.4250	13.0917
	4.00	1.00	-48.66667*	5.09902	.000	-60.4250	-36.9083
		2.00	-.66667	5.09902	.899	-12.4250	11.0917
		3.00	-1.33333	5.09902	.800	-13.0917	10.4250
NSG 5	1.00	2.00	61.33333*	2.82843	.000	54.8110	67.8557
		3.00	60.66667*	2.82843	.000	54.1443	67.1890
		4.00	62.66667*	2.82843	.000	56.1443	69.1890

	2.00	1.00	-61.33333*	2.82843	.000	-67.8557	-54.8110
		3.00	-.66667	2.82843	.820	-7.1890	5.8557
		4.00	1.33333	2.82843	.650	-5.1890	7.8557
	3.00	1.00	-60.66667*	2.82843	.000	-67.1890	-54.1443
		2.00	.66667	2.82843	.820	-5.8557	7.1890
		4.00	2.00000	2.82843	.500	-4.5224	8.5224
	4.00	1.00	-62.66667*	2.82843	.000	-69.1890	-56.1443
		2.00	-1.33333	2.82843	.650	-7.8557	5.1890
		3.00	-2.00000	2.82843	.500	-8.5224	4.5224
NSG 6	1.00	2.00	60.66667*	3.09121	.000	53.5383	67.7950
		3.00	60.00000*	3.09121	.000	52.8717	67.1283
		4.00	62.00000*	3.09121	.000	54.8717	69.1283

	2.00	1.00	-60.66667*	3.09121	.000	-67.7950	-53.5383
		3.00	-.66667	3.09121	.835	-7.7950	6.4617
		4.00	1.33333	3.09121	.678	-5.7950	8.4617
	3.00	1.00	-60.00000*	3.09121	.000	-67.1283	-52.8717
		2.00	.66667	3.09121	.835	-6.4617	7.7950
		4.00	2.00000	3.09121	.536	-5.1283	9.1283
	4.00	1.00	-62.00000*	3.09121	.000	-69.1283	-54.8717
		2.00	-1.33333	3.09121	.678	-8.4617	5.7950
		3.00	-2.00000	3.09121	.536	-9.1283	5.1283
NSG 7	1.00	2.00	60.66667*	3.19722	.000	53.2939	68.0395
		3.00	60.00000*	3.19722	.000	52.6272	67.3728
		4.00	62.00000*	3.19722	.000	54.6272	69.3728

	2.00	1.00	-60.66667*	3.19722	.000	-68.0395	-53.2939
		3.00	-.66667	3.19722	.840	-8.0395	6.7061
		4.00	1.33333	3.19722	.688	-6.0395	8.7061
	3.00	1.00	-60.00000*	3.19722	.000	-67.3728	-52.6272
		2.00	.66667	3.19722	.840	-6.7061	8.0395
		4.00	2.00000	3.19722	.549	-5.3728	9.3728
	4.00	1.00	-62.00000*	3.19722	.000	-69.3728	-54.6272
		2.00	-1.33333	3.19722	.688	-8.7061	6.0395
		3.00	-2.00000	3.19722	.549	-9.3728	5.3728

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Dưa leo qua xử lý số liệu bằng spss:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG 1	1.00	2.00	2.66667*	.66667	.004	1.1293	4.2040
		3.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
		4.00	2.66667*	.66667	.004	1.1293	4.2040
	2.00	1.00	-2.66667*	.66667	.004	-4.2040	-1.1293
		3.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
		4.00	.00000	.66667	1.000	-1.5373	1.5373
	3.00	1.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
		2.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
		4.00	1.33333	.66667	.081	-.2040	2.8707
	4.00	1.00	-2.66667*	.66667	.004	-4.2040	-1.1293
		2.00	.00000	.66667	1.000	-1.5373	1.5373

		3.00	-1.33333	.66667	.081	-2.8707	.2040
NSG 2	1.00	2.00	17.33333*	3.05505	.000	10.2884	24.3783
		3.00	11.33333*	3.05505	.006	4.2884	18.3783
		4.00	17.33333*	3.05505	.000	10.2884	24.3783
	2.00	1.00	-17.33333*	3.05505	.000	-24.3783	-10.2884
		3.00	-6.00000	3.05505	.085	-13.0450	1.0450
		4.00	.00000	3.05505	1.000	-7.0450	7.0450
	3.00	1.00	-11.33333*	3.05505	.006	-18.3783	-4.2884
		2.00	6.00000	3.05505	.085	-1.0450	13.0450
		4.00	6.00000	3.05505	.085	-1.0450	13.0450
	4.00	1.00	-17.33333*	3.05505	.000	-24.3783	-10.2884
		2.00	.00000	3.05505	1.000	-7.0450	7.0450

		3.00	-6.00000	3.05505	.085	-13.0450	1.0450
NSG 3	1.00	2.00	24.66667*	4.24264	.000	14.8831	34.4502
		3.00	15.33333*	4.24264	.007	5.5498	25.1169
		4.00	24.66667*	4.24264	.000	14.8831	34.4502
	2.00	1.00	-24.66667*	4.24264	.000	-34.4502	-14.8831
		3.00	-9.33333	4.24264	.059	-19.1169	.4502
		4.00	.00000	4.24264	1.000	-9.7835	9.7835
	3.00	1.00	-15.33333*	4.24264	.007	-25.1169	-5.5498
		2.00	9.33333	4.24264	.059	-.4502	19.1169
		4.00	9.33333	4.24264	.059	-.4502	19.1169
	4.00	1.00	-24.66667*	4.24264	.000	-34.4502	-14.8831
		2.00	.00000	4.24264	1.000	-9.7835	9.7835

		3.00	-9.33333	4.24264	.059	-19.1169	.4502
NSG 4	1.00	2.00	47.33333*	5.16398	.000	35.4252	59.2415
		3.00	38.00000*	5.16398	.000	26.0918	49.9082
		4.00	48.66667*	5.16398	.000	36.7585	60.5748
	2.00	1.00	-47.33333*	5.16398	.000	-59.2415	-35.4252
		3.00	-9.33333	5.16398	.108	-21.2415	2.5748
		4.00	1.33333	5.16398	.803	-10.5748	13.2415
	3.00	1.00	-38.00000*	5.16398	.000	-49.9082	-26.0918
		2.00	9.33333	5.16398	.108	-2.5748	21.2415
		4.00	10.66667	5.16398	.073	-1.2415	22.5748
	4.00	1.00	-48.66667*	5.16398	.000	-60.5748	-36.7585
		2.00	-1.33333	5.16398	.803	-13.2415	10.5748

		3.00	-10.66667	5.16398	.073	-22.5748	1.2415
NSG 5	1.00	2.00	60.00000*	2.98142	.000	53.1248	66.8752
		3.00	50.00000*	2.98142	.000	43.1248	56.8752
		4.00	62.00000*	2.98142	.000	55.1248	68.8752
	2.00	1.00	-60.00000*	2.98142	.000	-66.8752	-53.1248
		3.00	-10.00000*	2.98142	.010	-16.8752	-3.1248
		4.00	2.00000	2.98142	.521	-4.8752	8.8752
	3.00	1.00	-50.00000*	2.98142	.000	-56.8752	-43.1248
		2.00	10.00000*	2.98142	.010	3.1248	16.8752
		4.00	12.00000*	2.98142	.004	5.1248	18.8752
	4.00	1.00	-62.00000*	2.98142	.000	-68.8752	-55.1248

		2.00	-2.00000	2.98142	.521	-8.8752	4.8752
		3.00	-12.00000*	2.98142	.004	-18.8752	-5.1248
NSG 6	1.00	2.00	58.00000*	3.29983	.000	50.3906	65.6094
		3.00	50.00000*	3.29983	.000	42.3906	57.6094
		4.00	62.00000*	3.29983	.000	54.3906	69.6094
	2.00	1.00	-58.00000*	3.29983	.000	-65.6094	-50.3906
		3.00	-8.00000*	3.29983	.042	-15.6094	-.3906
		4.00	4.00000	3.29983	.260	-3.6094	11.6094
	3.00	1.00	-50.00000*	3.29983	.000	-57.6094	-42.3906
		2.00	8.00000*	3.29983	.042	.3906	15.6094
		4.00	12.00000*	3.29983	.007	4.3906	19.6094

	4.00	1.00	-62.00000*	3.29983	.000	-69.6094	-54.3906
		2.00	-4.00000	3.29983	.260	-11.6094	3.6094
		3.00	-12.00000*	3.29983	.007	-19.6094	-4.3906
NSG 7	1.00	2.00	56.00000*	3.85861	.000	47.1020	64.8980
		3.00	50.66667*	3.85861	.000	41.7687	59.5646
		4.00	62.00000*	3.85861	.000	53.1020	70.8980
	2.00	1.00	-56.00000*	3.85861	.000	-64.8980	-47.1020
		3.00	-5.33333	3.85861	.204	-14.2313	3.5646
		4.00	6.00000	3.85861	.159	-2.8980	14.8980
	3.00	1.00	-50.66667*	3.85861	.000	-59.5646	-41.7687
		2.00	5.33333	3.85861	.204	-3.5646	14.2313

		4.00	11.33333*	3.85861	.019	2.4354	20.2313
	4.00	1.00	-62.00000*	3.85861	.000	-70.8980	-53.1020
		2.00	-6.00000	3.85861	.159	-14.8980	2.8980
		3.00	-11.33333*	3.85861	.019	-20.2313	-2.4354

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Nhiệt độ 80^{o}C chạy qua SPSS:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG1	1.00	2.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
		3.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
		4.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061

	5.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
2.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
3.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
4.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395

	5.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
		2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
		3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
		4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
NSG2	1.00	2.00	17.33333*	2.69979	.000	11.3178	23.3488
		3.00	18.00000*	2.69979	.000	11.9845	24.0155
		4.00	17.33333*	2.69979	.000	11.3178	23.3488
		5.00	18.00000*	2.69979	.000	11.9845	24.0155
	2.00	1.00	-17.33333*	2.69979	.000	-23.3488	-11.3178
		3.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822
		4.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155
		5.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822

3.00	1.00	-18.00000*	2.69979	.000	-24.0155	-11.9845
	2.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488
	4.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488
	5.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155
4.00	1.00	-17.33333*	2.69979	.000	-23.3488	-11.3178
	2.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155
	3.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822
	5.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822
5.00	1.00	-18.00000*	2.69979	.000	-24.0155	-11.9845
	2.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488
	3.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155
	4.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488

NSG3	1.00	2.00	24.00000*	3.74759	.000	15.6498	32.3502
		3.00	24.66667*	3.74759	.000	16.3165	33.0168
		4.00	24.66667*	3.74759	.000	16.3165	33.0168
		5.00	25.33333*	3.74759	.000	16.9832	33.6835
	2.00	1.00	-24.00000*	3.74759	.000	-32.3502	-15.6498
		3.00	.66667	3.74759	.862	-7.6835	9.0168
		4.00	.66667	3.74759	.862	-7.6835	9.0168
		5.00	1.33333	3.74759	.729	-7.0168	9.6835
	3.00	1.00	-24.66667*	3.74759	.000	-33.0168	-16.3165
		2.00	-.66667	3.74759	.862	-9.0168	7.6835
		4.00	.00000	3.74759	1.000	-8.3502	8.3502
		5.00	.66667	3.74759	.862	-7.6835	9.0168

	4.00	1.00	-24.66667*	3.74759	.000	-33.0168	-16.3165
		2.00	-.66667	3.74759	.862	-9.0168	7.6835
		3.00	.00000	3.74759	1.000	-8.3502	8.3502
		5.00	.66667	3.74759	.862	-7.6835	9.0168
	5.00	1.00	-25.33333*	3.74759	.000	-33.6835	-16.9832
		2.00	-1.33333	3.74759	.729	-9.6835	7.0168
		3.00	-.66667	3.74759	.862	-9.0168	7.6835
		4.00	-.66667	3.74759	.862	-9.0168	7.6835
NSG4	1.00	2.00	46.66667*	4.58015	.000	36.4615	56.8719
		3.00	48.00000*	4.58015	.000	37.7948	58.2052
		4.00	47.33333*	4.58015	.000	37.1281	57.5385
		5.00	48.00000*	4.58015	.000	37.7948	58.2052

2.00	1.00	-46.66667*	4.58015	.000	-56.8719	-36.4615
	3.00	1.33333	4.58015	.777	-8.8719	11.5385
	4.00	.66667	4.58015	.887	-9.5385	10.8719
	5.00	1.33333	4.58015	.777	-8.8719	11.5385
3.00	1.00	-48.00000*	4.58015	.000	-58.2052	-37.7948
	2.00	-1.33333	4.58015	.777	-11.5385	8.8719
	4.00	-.66667	4.58015	.887	-10.8719	9.5385
	5.00	.00000	4.58015	1.000	-10.2052	10.2052
4.00	1.00	-47.33333*	4.58015	.000	-57.5385	-37.1281
	2.00	-.66667	4.58015	.887	-10.8719	9.5385
	3.00	.66667	4.58015	.887	-9.5385	10.8719
	5.00	.66667	4.58015	.887	-9.5385	10.8719

	5.00	1.00	-48.00000*	4.58015	.000	-58.2052	-37.7948
		2.00	-1.33333	4.58015	.777	-11.5385	8.8719
		3.00	.00000	4.58015	1.000	-10.2052	10.2052
		4.00	-.66667	4.58015	.887	-10.8719	9.5385
NSG5	1.00	2.00	60.00000*	2.56472	.000	54.2855	65.7145
		3.00	61.33333*	2.56472	.000	55.6188	67.0479
		4.00	60.00000*	2.56472	.000	54.2855	65.7145
		5.00	62.00000*	2.56472	.000	56.2855	67.7145
	2.00	1.00	-60.00000*	2.56472	.000	-65.7145	-54.2855
		3.00	1.33333	2.56472	.614	-4.3812	7.0479
		4.00	.00000	2.56472	1.000	-5.7145	5.7145
		5.00	2.00000	2.56472	.454	-3.7145	7.7145

3.00	1.00	-61.33333*	2.56472	.000	-67.0479	-55.6188
	2.00	-1.33333	2.56472	.614	-7.0479	4.3812
	4.00	-1.33333	2.56472	.614	-7.0479	4.3812
	5.00	.66667	2.56472	.800	-5.0479	6.3812
4.00	1.00	-60.00000*	2.56472	.000	-65.7145	-54.2855
	2.00	.00000	2.56472	1.000	-5.7145	5.7145
	3.00	1.33333	2.56472	.614	-4.3812	7.0479
	5.00	2.00000	2.56472	.454	-3.7145	7.7145
5.00	1.00	-62.00000*	2.56472	.000	-67.7145	-56.2855
	2.00	-2.00000	2.56472	.454	-7.7145	3.7145
	3.00	-.66667	2.56472	.800	-6.3812	5.0479
	4.00	-2.00000	2.56472	.454	-7.7145	3.7145

NSG6	1.00	2.00	60.00000*	2.98142	.000	53.3570	66.6430
		3.00	60.66667*	2.98142	.000	54.0236	67.3097
		4.00	58.00000*	2.98142	.000	51.3570	64.6430
		5.00	62.00000*	2.98142	.000	55.3570	68.6430
	2.00	1.00	-60.00000*	2.98142	.000	-66.6430	-53.3570
		3.00	.66667	2.98142	.828	-5.9764	7.3097
		4.00	-2.00000	2.98142	.518	-8.6430	4.6430
		5.00	2.00000	2.98142	.518	-4.6430	8.6430
	3.00	1.00	-60.66667*	2.98142	.000	-67.3097	-54.0236
		2.00	-.66667	2.98142	.828	-7.3097	5.9764
		4.00	-2.66667	2.98142	.392	-9.3097	3.9764
		5.00	1.33333	2.98142	.664	-5.3097	7.9764

	4.00	1.00	-58.00000*	2.98142	.000	-64.6430	-51.3570
		2.00	2.00000	2.98142	.518	-4.6430	8.6430
		3.00	2.66667	2.98142	.392	-3.9764	9.3097
		5.00	4.00000	2.98142	.209	-2.6430	10.6430
	5.00	1.00	-62.00000*	2.98142	.000	-68.6430	-55.3570
		2.00	-2.00000	2.98142	.518	-8.6430	4.6430
		3.00	-1.33333	2.98142	.664	-7.9764	5.3097
		4.00	-4.00000	2.98142	.209	-10.6430	2.6430
NSG7	1.00	2.00	60.00000*	3.69985	.000	51.7562	68.2438
		3.00	60.66667*	3.69985	.000	52.4229	68.9104
		4.00	56.00000*	3.69985	.000	47.7562	64.2438
		5.00	62.66667*	3.69985	.000	54.4229	70.9104

2.00	1.00	-60.00000*	3.69985	.000	-68.2438	-51.7562
	3.00	.66667	3.69985	.861	-7.5771	8.9104
	4.00	-4.00000	3.69985	.305	-12.2438	4.2438
	5.00	2.66667	3.69985	.488	-5.5771	10.9104
3.00	1.00	-60.66667*	3.69985	.000	-68.9104	-52.4229
	2.00	-.66667	3.69985	.861	-8.9104	7.5771
	4.00	-4.66667	3.69985	.236	-12.9104	3.5771
	5.00	2.00000	3.69985	.601	-6.2438	10.2438
4.00	1.00	-56.00000*	3.69985	.000	-64.2438	-47.7562
	2.00	4.00000	3.69985	.305	-4.2438	12.2438
	3.00	4.66667	3.69985	.236	-3.5771	12.9104
	5.00	6.66667	3.69985	.102	-1.5771	14.9104

5.00	1.00	-62.66667*	3.69985	.000	-70.9104	-54.4229
	2.00	-2.66667	3.69985	.488	-10.9104	5.5771
	3.00	-2.00000	3.69985	.601	-10.2438	6.2438
	4.00	-6.66667	3.69985	.102	-14.9104	1.5771

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Nhiệt độ 100^{o}C chạy qua SPSS:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG1	1.00	2.00	7.33333*	1.52023	.001	3.9460	10.7206
		3.00	8.00000*	1.52023	.000	4.6127	11.3873
		4.00	8.00000*	1.52023	.000	4.6127	11.3873

	5.00	8.00000*	1.52023	.000	4.6127	11.3873
2.00	1.00	-7.33333*	1.52023	.001	-10.7206	-3.9460
	3.00	.66667	1.52023	.670	-2.7206	4.0540
	4.00	.66667	1.52023	.670	-2.7206	4.0540
	5.00	.66667	1.52023	.670	-2.7206	4.0540
3.00	1.00	-8.00000*	1.52023	.000	-11.3873	-4.6127
	2.00	-.66667	1.52023	.670	-4.0540	2.7206
	4.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873
	5.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873
4.00	1.00	-8.00000*	1.52023	.000	-11.3873	-4.6127
	2.00	-.66667	1.52023	.670	-4.0540	2.7206
	3.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873
	5.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873

	5.00	1.00	-8.00000*	1.52023	.000	-11.3873	-4.6127
		2.00	-.66667	1.52023	.670	-4.0540	2.7206
		3.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873
		4.00	.00000	1.52023	1.000	-3.3873	3.3873
NSG2	1.00	2.00	28.00000*	3.39935	.000	20.4258	35.5742
		3.00	28.66667*	3.39935	.000	21.0925	36.2409
		4.00	23.33333*	3.39935	.000	15.7591	30.9075
		5.00	28.00000*	3.39935	.000	20.4258	35.5742
	2.00	1.00	-28.00000*	3.39935	.000	-35.5742	-20.4258
		3.00	.66667	3.39935	.848	-6.9075	8.2409
		4.00	-4.66667	3.39935	.200	-12.2409	2.9075
		5.00	.00000	3.39935	1.000	-7.5742	7.5742

3.00	1.00	-28.66667*	3.39935	.000	-36.2409	-21.0925
	2.00	-.66667	3.39935	.848	-8.2409	6.9075
	4.00	-5.33333	3.39935	.148	-12.9075	2.2409
	5.00	-.66667	3.39935	.848	-8.2409	6.9075
4.00	1.00	-23.33333*	3.39935	.000	-30.9075	-15.7591
	2.00	4.66667	3.39935	.200	-2.9075	12.2409
	3.00	5.33333	3.39935	.148	-2.2409	12.9075
	5.00	4.66667	3.39935	.200	-2.9075	12.2409
5.00	1.00	-28.00000*	3.39935	.000	-35.5742	-20.4258
	2.00	.00000	3.39935	1.000	-7.5742	7.5742
	3.00	.66667	3.39935	.848	-6.9075	8.2409
	4.00	-4.66667	3.39935	.200	-12.2409	2.9075

NSG3	1.00	2.00	38.66667*	6.09554	.000	25.0850	52.2484
		3.00	40.66667*	6.09554	.000	27.0850	54.2484
		4.00	32.66667*	6.09554	.000	19.0850	46.2484
		5.00	40.00000*	6.09554	.000	26.4183	53.5817
	2.00	1.00	-38.66667*	6.09554	.000	-52.2484	-25.0850
		3.00	2.00000	6.09554	.750	-11.5817	15.5817
		4.00	-6.00000	6.09554	.348	-19.5817	7.5817
		5.00	1.33333	6.09554	.831	-12.2484	14.9150
	3.00	1.00	-40.66667*	6.09554	.000	-54.2484	-27.0850
		2.00	-2.00000	6.09554	.750	-15.5817	11.5817
		4.00	-8.00000	6.09554	.219	-21.5817	5.5817
		5.00	-.66667	6.09554	.915	-14.2484	12.9150

	4.00	1.00	-32.66667*	6.09554	.000	-46.2484	-19.0850
		2.00	6.00000	6.09554	.348	-7.5817	19.5817
		3.00	8.00000	6.09554	.219	-5.5817	21.5817
		5.00	7.33333	6.09554	.257	-6.2484	20.9150
	5.00	1.00	-40.00000*	6.09554	.000	-53.5817	-26.4183
		2.00	-1.33333	6.09554	.831	-14.9150	12.2484
		3.00	.66667	6.09554	.915	-12.9150	14.2484
		4.00	-7.33333	6.09554	.257	-20.9150	6.2484
NSG4	1.00	2.00	49.33333*	3.57771	.000	41.3617	57.3050
		3.00	52.00000*	3.57771	.000	44.0284	59.9716
		4.00	42.66667*	3.57771	.000	34.6950	50.6383
		5.00	48.66667*	3.57771	.000	40.6950	56.6383

2.00	1.00	-49.33333*	3.57771	.000	-57.3050	-41.3617
	3.00	2.66667	3.57771	.473	-5.3050	10.6383
	4.00	-6.66667	3.57771	.092	-14.6383	1.3050
	5.00	-.66667	3.57771	.856	-8.6383	7.3050
3.00	1.00	-52.00000*	3.57771	.000	-59.9716	-44.0284
	2.00	-2.66667	3.57771	.473	-10.6383	5.3050
	4.00	-9.33333*	3.57771	.026	-17.3050	-1.3617
	5.00	-3.33333	3.57771	.373	-11.3050	4.6383
4.00	1.00	-42.66667*	3.57771	.000	-50.6383	-34.6950
	2.00	6.66667	3.57771	.092	-1.3050	14.6383
	3.00	9.33333*	3.57771	.026	1.3617	17.3050
	5.00	6.00000	3.57771	.124	-1.9716	13.9716

	5.00	1.00	-48.66667*	3.57771	.000	-56.6383	-40.6950
		2.00	.66667	3.57771	.856	-7.3050	8.6383
		3.00	3.33333	3.57771	.373	-4.6383	11.3050
		4.00	-6.00000	3.57771	.124	-13.9716	1.9716
NSG5	1.00	2.00	55.33333*	5.14674	.000	43.8657	66.8010
		3.00	58.00000*	5.14674	.000	46.5324	69.4676
		4.00	47.33333*	5.14674	.000	35.8657	58.8010
		5.00	53.33333*	5.14674	.000	41.8657	64.8010
	2.00	1.00	-55.33333*	5.14674	.000	-66.8010	-43.8657
		3.00	2.66667	5.14674	.616	-8.8010	14.1343
		4.00	-8.00000	5.14674	.151	-19.4676	3.4676
		5.00	-2.00000	5.14674	.706	-13.4676	9.4676

3.00	1.00	-58.00000*	5.14674	.000	-69.4676	-46.5324
	2.00	-2.66667	5.14674	.616	-14.1343	8.8010
	4.00	-10.66667	5.14674	.065	-22.1343	.8010
	5.00	-4.66667	5.14674	.386	-16.1343	6.8010
4.00	1.00	-47.33333*	5.14674	.000	-58.8010	-35.8657
	2.00	8.00000	5.14674	.151	-3.4676	19.4676
	3.00	10.66667	5.14674	.065	-.8010	22.1343
	5.00	6.00000	5.14674	.271	-5.4676	17.4676
5.00	1.00	-53.33333*	5.14674	.000	-64.8010	-41.8657
	2.00	2.00000	5.14674	.706	-9.4676	13.4676
	3.00	4.66667	5.14674	.386	-6.8010	16.1343
	4.00	-6.00000	5.14674	.271	-17.4676	5.4676

NSG6	1.00	2.00	55.33333*	5.23238	.000	43.6749	66.9918
		3.00	57.33333*	5.23238	.000	45.6749	68.9918
		4.00	47.33333*	5.23238	.000	35.6749	58.9918
		5.00	52.66667*	5.23238	.000	41.0082	64.3251
	2.00	1.00	-55.33333*	5.23238	.000	-66.9918	-43.6749
		3.00	2.00000	5.23238	.710	-9.6585	13.6585
		4.00	-8.00000	5.23238	.157	-19.6585	3.6585
		5.00	-2.66667	5.23238	.621	-14.3251	8.9918
	3.00	1.00	-57.33333*	5.23238	.000	-68.9918	-45.6749
		2.00	-2.00000	5.23238	.710	-13.6585	9.6585
		4.00	-10.00000	5.23238	.085	-21.6585	1.6585
		5.00	-4.66667	5.23238	.393	-16.3251	6.9918

	4.00	1.00	-47.33333*	5.23238	.000	-58.9918	-35.6749
		2.00	8.00000	5.23238	.157	-3.6585	19.6585
		3.00	10.00000	5.23238	.085	-1.6585	21.6585
		5.00	5.33333	5.23238	.332	-6.3251	16.9918
	5.00	1.00	-52.66667*	5.23238	.000	-64.3251	-41.0082
		2.00	2.66667	5.23238	.621	-8.9918	14.3251
		3.00	4.66667	5.23238	.393	-6.9918	16.3251
		4.00	-5.33333	5.23238	.332	-16.9918	6.3251
NSG7	1.00	2.00	55.33333*	5.64112	.000	42.7641	67.9025
		3.00	57.33333*	5.64112	.000	44.7641	69.9025
		4.00	48.00000*	5.64112	.000	35.4308	60.5692
		5.00	53.33333*	5.64112	.000	40.7641	65.9025

2.00	1.00	-55.33333*	5.64112	.000	-67.9025	-42.7641
	3.00	2.00000	5.64112	.730	-10.5692	14.5692
	4.00	-7.33333	5.64112	.223	-19.9025	5.2359
	5.00	-2.00000	5.64112	.730	-14.5692	10.5692
3.00	1.00	-57.33333*	5.64112	.000	-69.9025	-44.7641
	2.00	-2.00000	5.64112	.730	-14.5692	10.5692
	4.00	-9.33333	5.64112	.129	-21.9025	3.2359
	5.00	-4.00000	5.64112	.494	-16.5692	8.5692
4.00	1.00	-48.00000*	5.64112	.000	-60.5692	-35.4308
	2.00	7.33333	5.64112	.223	-5.2359	19.9025
	3.00	9.33333	5.64112	.129	-3.2359	21.9025
	5.00	5.33333	5.64112	.367	-7.2359	17.9025

	5.00	1.00	-53.33333*	5.64112	.000	-65.9025	-40.7641
		2.00	2.00000	5.64112	.730	-10.5692	14.5692
		3.00	4.00000	5.64112	.494	-8.5692	16.5692
		4.00	-5.33333	5.64112	.367	-17.9025	7.2359

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Nhiệt độ 120^{o}C chạy qua SPSS:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) NT	(J) NT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NSG1	1.00	2.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
		3.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
		4.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061

	5.00	2.66667*	.42164	.000	1.7272	3.6061
2.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
3.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
4.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
	2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
	5.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395

	5.00	1.00	-2.66667*	.42164	.000	-3.6061	-1.7272
		2.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
		3.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
		4.00	.00000	.42164	1.000	-.9395	.9395
NSG2	1.00	2.00	24.00000*	1.93218	.000	19.6948	28.3052
		3.00	24.66667*	1.93218	.000	20.3615	28.9718
		4.00	24.00000*	1.93218	.000	19.6948	28.3052
		5.00	24.66667*	1.93218	.000	20.3615	28.9718
	2.00	1.00	-24.00000*	1.93218	.000	-28.3052	-19.6948
		3.00	.66667	1.93218	.737	-3.6385	4.9718
		4.00	.00000	1.93218	1.000	-4.3052	4.3052
		5.00	.66667	1.93218	.737	-3.6385	4.9718

3.00	1.00	-24.66667*	1.93218	.000	-28.9718	-20.3615
	2.00	-.66667	1.93218	.737	-4.9718	3.6385
	4.00	-.66667	1.93218	.737	-4.9718	3.6385
	5.00	.00000	1.93218	1.000	-4.3052	4.3052
4.00	1.00	-24.00000*	1.93218	.000	-28.3052	-19.6948
	2.00	.00000	1.93218	1.000	-4.3052	4.3052
	3.00	.66667	1.93218	.737	-3.6385	4.9718
	5.00	.66667	1.93218	.737	-3.6385	4.9718
5.00	1.00	-24.66667*	1.93218	.000	-28.9718	-20.3615
	2.00	-.66667	1.93218	.737	-4.9718	3.6385
	3.00	.00000	1.93218	1.000	-4.3052	4.3052
	4.00	-.66667	1.93218	.737	-4.9718	3.6385

NSG3	1.00	2.00	28.66667*	2.02210	.000	24.1611	33.1722
		3.00	30.00000*	2.02210	.000	25.4945	34.5055
		4.00	29.33333*	2.02210	.000	24.8278	33.8389
		5.00	30.00000*	2.02210	.000	25.4945	34.5055
	2.00	1.00	-28.66667*	2.02210	.000	-33.1722	-24.1611
		3.00	1.33333	2.02210	.525	-3.1722	5.8389
		4.00	.66667	2.02210	.748	-3.8389	5.1722
		5.00	1.33333	2.02210	.525	-3.1722	5.8389
	3.00	1.00	-30.00000*	2.02210	.000	-34.5055	-25.4945
		2.00	-1.33333	2.02210	.525	-5.8389	3.1722
		4.00	-.66667	2.02210	.748	-5.1722	3.8389
		5.00	.00000	2.02210	1.000	-4.5055	4.5055

	4.00	1.00	-29.33333*	2.02210	.000	-33.8389	-24.8278
		2.00	-.66667	2.02210	.748	-5.1722	3.8389
		3.00	.66667	2.02210	.748	-3.8389	5.1722
		5.00	.66667	2.02210	.748	-3.8389	5.1722
	5.00	1.00	-30.00000*	2.02210	.000	-34.5055	-25.4945
		2.00	-1.33333	2.02210	.525	-5.8389	3.1722
		3.00	.00000	2.02210	1.000	-4.5055	4.5055
		4.00	-.66667	2.02210	.748	-5.1722	3.8389
NSG4	1.00	2.00	50.66667*	3.15524	.000	43.6363	57.6970
		3.00	52.66667*	3.15524	.000	45.6363	59.6970
		4.00	52.66667*	3.15524	.000	45.6363	59.6970
		5.00	52.66667*	3.15524	.000	45.6363	59.6970

2.00	1.00	-50.66667*	3.15524	.000	-57.6970	-43.6363
	3.00	2.00000	3.15524	.540	-5.0303	9.0303
	4.00	2.00000	3.15524	.540	-5.0303	9.0303
	5.00	2.00000	3.15524	.540	-5.0303	9.0303
3.00	1.00	-52.66667*	3.15524	.000	-59.6970	-45.6363
	2.00	-2.00000	3.15524	.540	-9.0303	5.0303
	4.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303
	5.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303
4.00	1.00	-52.66667*	3.15524	.000	-59.6970	-45.6363
	2.00	-2.00000	3.15524	.540	-9.0303	5.0303
	3.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303
	5.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303

	5.00	1.00	-52.66667*	3.15524	.000	-59.6970	-45.6363
		2.00	-2.00000	3.15524	.540	-9.0303	5.0303
		3.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303
		4.00	.00000	3.15524	1.000	-7.0303	7.0303
NSG5	1.00	2.00	60.00000*	2.69979	.000	53.9845	66.0155
		3.00	62.66667*	2.69979	.000	56.6512	68.6822
		4.00	62.00000*	2.69979	.000	55.9845	68.0155
		5.00	62.00000*	2.69979	.000	55.9845	68.0155
	2.00	1.00	-60.00000*	2.69979	.000	-66.0155	-53.9845
		3.00	2.66667	2.69979	.347	-3.3488	8.6822
		4.00	2.00000	2.69979	.476	-4.0155	8.0155
		5.00	2.00000	2.69979	.476	-4.0155	8.0155

3.00	1.00	-62.66667*	2.69979	.000	-68.6822	-56.6512
	2.00	-2.66667	2.69979	.347	-8.6822	3.3488
	4.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488
	5.00	-.66667	2.69979	.810	-6.6822	5.3488
4.00	1.00	-62.00000*	2.69979	.000	-68.0155	-55.9845
	2.00	-2.00000	2.69979	.476	-8.0155	4.0155
	3.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822
	5.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155
5.00	1.00	-62.00000*	2.69979	.000	-68.0155	-55.9845
	2.00	-2.00000	2.69979	.476	-8.0155	4.0155
	3.00	.66667	2.69979	.810	-5.3488	6.6822
	4.00	.00000	2.69979	1.000	-6.0155	6.0155

NSG6	1.00	2.00	59.33333*	2.63312	.000	53.4664	65.2003
		3.00	62.00000*	2.63312	.000	56.1330	67.8670
		4.00	62.00000*	2.63312	.000	56.1330	67.8670
		5.00	61.33333*	2.63312	.000	55.4664	67.2003
	2.00	1.00	-59.33333*	2.63312	.000	-65.2003	-53.4664
		3.00	2.66667	2.63312	.335	-3.2003	8.5336
		4.00	2.66667	2.63312	.335	-3.2003	8.5336
		5.00	2.00000	2.63312	.465	-3.8670	7.8670
	3.00	1.00	-62.00000*	2.63312	.000	-67.8670	-56.1330
		2.00	-2.66667	2.63312	.335	-8.5336	3.2003
		4.00	.00000	2.63312	1.000	-5.8670	5.8670
		5.00	-.66667	2.63312	.805	-6.5336	5.2003

	4.00	1.00	-62.00000*	2.63312	.000	-67.8670	-56.1330
		2.00	-2.66667	2.63312	.335	-8.5336	3.2003
		3.00	.00000	2.63312	1.000	-5.8670	5.8670
		5.00	-.66667	2.63312	.805	-6.5336	5.2003
	5.00	1.00	-61.33333*	2.63312	.000	-67.2003	-55.4664
		2.00	-2.00000	2.63312	.465	-7.8670	3.8670
		3.00	.66667	2.63312	.805	-5.2003	6.5336
		4.00	.66667	2.63312	.805	-5.2003	6.5336
NSG7	1.00	2.00	60.66667*	2.34758	.000	55.4359	65.8974
		3.00	62.66667*	2.34758	.000	57.4359	67.8974
		4.00	62.66667*	2.34758	.000	57.4359	67.8974
		5.00	62.66667*	2.34758	.000	57.4359	67.8974

2.00	1.00	-60.66667*	2.34758	.000	-65.8974	-55.4359
	3.00	2.00000	2.34758	.414	-3.2307	7.2307
	4.00	2.00000	2.34758	.414	-3.2307	7.2307
	5.00	2.00000	2.34758	.414	-3.2307	7.2307
3.00	1.00	-62.66667*	2.34758	.000	-67.8974	-57.4359
	2.00	-2.00000	2.34758	.414	-7.2307	3.2307
	4.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307
	5.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307
4.00	1.00	-62.66667*	2.34758	.000	-67.8974	-57.4359
	2.00	-2.00000	2.34758	.414	-7.2307	3.2307
	3.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307
	5.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307

5.00	1.00	-62.66667*	2.34758	.000	-67.8974	-57.4359
	2.00	-2.00000	2.34758	.414	-7.2307	3.2307
	3.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307
	4.00	.00000	2.34758	1.000	-5.2307	5.2307

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT BẢN ĐỊA CÓ TIỀM NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI TUYẾN TRÙNG

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông lâm

Lâm Đồng, tháng 7/2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2020

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT BẢN ĐỊA CÓ TIỀM NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI TUYẾN TRÙNG

Thuộc nhóm ngành khoa học: Nông lâm

Sinh viên thực hiện: Trần Thị Bích Thoa Nam, Nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: NHK41 – khoa Nông lâm Năm thứ: 3 /Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Nông học

Người hướng dẫn: TS. Trần Thị Minh Loan

Lâm Đồng, tháng 7 /2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện không sao chép của người khác. Những kết quả và số liệu trong công trình Nghiên cứu khoa học này chưa từng được công bố trong bất cứ công trình nghiên cứu nào. Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm trước nhà trường về sự cam đoan này.

Lâm Đồng, ngày tháng năm

Tác giả

Trần Thị Bích Thoa

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành công trình Nghiên cứu khoa học này tôi xin chân thành cảm ơn ban giám hiệu nhà trường Đại Học Đà Lạt, khoa Nông Lâm cùng toàn thể quý thầy cô đã tận tình giảng dạy trong suốt quá trình học tại trường.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến giảng viên hướng dẫn Trần Thị Minh Loan đã nhiệt tình giúp đỡ trong nghiên cứu, chỉ ra các lỗi sai để kịp thời khắc phục trong suốt quá trình thực hiện để hoàn thành công trình Nghiên cứu khoa học này.

Xin cảm ơn cô Cao Thị Làn đã giúp đỡ tôi trong khi thực hiện nghiên cứu này.

Tôi cũng gửi lời cảm ơn đến trường Đại Học Đà Lạt đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất về cơ sở vật chất, khoa học kỹ thuật trong suốt thời gian qua.

Cuối cùng tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, bạn bè và tất cả những người thân đã luôn quan tâm động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện công trình Nghiên cứu khoa học này.

Cảm ơn toàn bộ thầy cô trong khoa Nông lâm đã tạo cho tôi một môi trường tốt để học tập và sáng tạo.

Kính chúc quý thầy cô khoa Nông Lâm dồi dào sức khỏe, thành công trong sự nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG BIỂU ..... **i**
DANH MỤC HÌNH ẢNH ..... **ii**
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT ..... **iii**
MỞ ĐẦU **1**
1. ĐẶT VẤN ĐỀ 1
1. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU 2
2. PHẠM VI NGHIÊN CỨU 2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU **4**
1.1 TỔNG QUAN VỀ VI SINH VẬT 4
1.1.1 Vi sinh vật đất *4*
1.1.2 Sinh trưởng và phát triển vi sinh vật *5*
1.1.3 Những nghiên cứu trong và ngoài nước về sử dụng vi sinh vật đối kháng tuyến trùng *9*
1.2. CÁC CHỦNG VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG 14
1.2.1 Xạ khuẩn *14*
1.2.2. Nấm *Trichoderma* sp. *16*
1.2.2.1 Nấm *Trichoderma harzianum* *17*
1.2.2.2 Nấm *Trichoderma viride* *20*
1.3 TỔNG QUAN VỀ TUYẾN TRÙNG NỐT SƯNG 22
1.3.1 Vị trí phân loại tuyến trùng nốt sưng *22*
1.3.2. Một số loài gây hại phổ biến *22*
1.3.3 Đặc điểm sinh học và sinh thái tuyến trùng nốt sưng *23*
1.3.4 Tập quán sinh sống và gây hại cho cây trồng *24*
1.3.5. Biện pháp phòng trừ tuyến trùng *26*
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU **28**
2.1 ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU 28
2.1.1 Đối tượng nghiên cứu *28*
2.1.2 Vật liệu *28*
2.2 NỘI DUNG NGHIÊN CỨU 28

2.3 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 28
2.3.1 Chuẩn bị môi trường nuôi cấy Môi trường nuôi cấy cơ bản *28*
2.3.2 Thu thập, nhân nuôi và tuyển chọn mẫu vi sinh vật bản địa *30*
2.3.3 Nhân sinh khối và thử nghiệm *32*
2.3.4 Chuẩn bị mẫu cây bị tuyến trùng *32*
2.3.5 Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của các chủng vi sinh vật bản địa *33*
2.3.6 Chỉ tiêu theo dõi *33*
2.4 PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU 34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 35
3.1 KẾT QUẢ PHÂN LẬP CHỦNG VI SINH VẬT BẢN ĐỊA CÓ TIỀM NĂNG PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG TẠI LÂM ĐỒNG. 35
3.1.1 Phân lập các chủng vi sinh vật trong đất 35
3.1.2. Cấy thuần và định danh chủng vi sinh vật 37
XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES* SP 37
3.2 ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, SINH THÁI CỦA *T. HARZIANUM* VÀ *STREPTOMYCES* SP 41
3.2.1 Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. 41
3.2.2 Đặc điểm sinh học của *T. harzianum* 41
3.3 MẬT ĐỘ VI SINH VẬT 43
3.4. ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG *MELOIDOGYNE* SP. CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT BẢN ĐỊA TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM 44
CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 48
4.1. KẾT LUẬN 48
4.2. KIẾN NGHỊ 48

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 3.1: Đặc điểm khuẩn lạc của nấm và xạ khuẩn từ mẫu đất. 36
Bảng 3.2: Sự phát triển của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trên môi trường Gause 1. 41
Bảng 3.3: Sự phát triển của nấm *T. harzianum* trên môi trường PDA. 42
Bảng 3.4: Mật độ của hai chủng vi sinh vật bản địa. 43
Bảng 3.5: Tỷ lệ chết của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. sau khi xử lý bằng dịch huyền phù vi sinh vật. 46

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Các pha phát triển của vi sinh vật 6
Hình 1.2: Một số dạng nấm kiểm soát tuyến trùng 10
Hình 1.3: Nấm *P. chrysosporium* ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne incognita* J2 11
Hình 1.4: Nấm *P. chrysosporium* ký sinh con cái tuyến trùng *Meloidogyne incognita* J2 12
Hình 1.5: Nấm *T. harzianum* đối kháng tuyến trùng *M. javanica* 13
Hình 1.6: Xạ khuẩn *Streptomyces* sp. 15
Hình 1.7: Khuẩn lạc của một số chủng *Trichoderma* trên môi trường PDA (7 ngày) 16
Hình 1.8: Sợi nấm và cuống bào tử *T. harzianum* 18
Hình 1.9: Trứng và ấu trùng của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* bị *T. harzianum* ký sinh 19
Hình 1.10: Ấu trùng tuổi 2 (J2) của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* bị 20
Hình 1. 11: Nấm *T.viride* sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA 21
Hình 1.12: Vòng đời của tuyến trùng 24
Hình 1.13: Tuyến trùng ký sinh gây hại trên khoai tây 25
Hình 1.14: Tuyến trùng gây hại trên cà rốt 26
Hình 3.1: Nấm và vi khuẩn trên môi trường Gause 1 35
Hình 3.2: Hệ sợi của chủng xạ khuẩn dưới kính hiển vi 36
Hình 3.3: Hệ sợi của nấm dưới kính hiển vi 37
Hình 3.4: Xạ khuẩn *Streptomyces* trên môi trường Gause 1 38
Hình 3.5: Sợi nấm và bào tử xạ khuẩn *Streptomyces* dưới kính hiển vi 38
Hình 3.6: Nấm *T. harzianum* trên môi trường THSM 39
Hình 3.7: Sợi nấm, cuống sinh bào tử của nấm *T. harzianum* 40
Hình 3.8: Bào tử của nấm *T. harzianum* 40
Hình 3.9: Nấm *T. harzianum* trên môi trường PDA 43
Hình 3.10: Rễ cây cà chua bị tuyến trùng nốt sưng 44
Hình 3.11: Tuyến trùng thu được từ các nốt sưng của mẫu rễ cây 45
Hình 3.12: Phần đầu của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp 45
Hình 3.13: Tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. bị nấm *T. harzianum* tấn công 46

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

BCAs: Biological Control Agents

CFU: Colony Forming Unit

Ctg: Cộng sự

T. harzianum: Trichoderma harzianum

T. viride: Trichoderma viride

THSM: *Trichoderma harzianum* - selective media

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN

CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI



I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Trần Thị Bích Thoa

Sinh ngày: 26 tháng 05 năm 2019

Nơi sinh: Đà Lạt – Lâm Đồng

Lớp: NHK41 Khóa: 41

Khoa: Nông lâm

Địa chỉ liên hệ: Lớp NHK41, Khoa Nông lâm, trường Đại học Đà Lạt

Điện thoại: 0919793962 Email: bichthoatt.2605@gmail.com

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP:

**** Năm thứ 1:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL: 2.95/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích: Học bổng khuyến khích học tập học kỳ II.

**** Năm thứ 2:***

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL: 3.06/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích: Học bổng khuyến khích học tập học kỳ I, học bổng tập đoàn CJ Hàn Quốc.

**** Năm thứ 3:*** **Học kỳ 1**

Ngành học: Nông học Khoa: Nông lâm

Kết quả xếp loại học tập: ĐTBTL: 3.12/4.0 - Khá

Sơ lược thành tích: Học bổng khuyến khích học tập học kỳ I.

Ngày tháng năm

Xác nhận của trường đại học	**Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài**
(ký tên và đóng dấu)	*(ký, họ và tên)*

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Tuyển chọn một số chủng vi sinh vật bản địa có tiềm năng đối kháng với tuyến trùng

- Sinh viên thực hiện: Trần Thị Bích Thoa

- Lớp: NHK41 Khoa: Nông lâm Năm thứ: 3 Số năm đào tạo: 4

- Người hướng dẫn: TS. Trần Thị Minh Loan

2. Mục tiêu đề tài:

Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật bản địa có khả năng kiểm soát tuyến trùng gây hại cây trồng trong đất tại Lâm Đồng.

Đánh giá khả năng ứng dụng các chủng vi sinh vật bản địa đã phân lập trong việc hạn chế sự phát triển của tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

3. Tính mới và sáng tạo:

Tuyển chọn được hai chủng vi sinh vật bản địa: *Trichoderma harzianum* và *Streptomyces* sp. có khả năng đối kháng với tuyến trùng nốt sưng (*Meloidogyne* sp.) có trong đất trồng cà phê tại Lâm Đồng.

4. Kết quả nghiên cứu:

Phân lập được hai chủng vi sinh vật từ đất trồng cà phê tại Lâm Đồng là *T. harzianum* với mật độ $1,8.10^5$ CFU/g và xạ khuẩn *Streptomyces* sp. với mật độ $1,5.10^5$ CFU/g.

Chủng *T. harzianum* có khả năng kiểm soát tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. nhanh hơn chủng *Streptomyces* sp. vào thời điểm 120 giờ sau khi xử lý với hiệu quả 100% cao hơn xạ khuẩn *Streptomyces* sp. chỉ đạt 98,41%.

5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:

Đưa ra hai chủng vi sinh vật có trong đất trồng cà phê tại Lâm Đồng vào tập hợp chủng vi sinh vật có tiềm năng đối kháng với tuyến trùng nốt sưng (*Meloidogyne* sp.). Kết quả của đề tài có thể làm tài liệu tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo và bổ sung vào dẫn liệu biện pháp sinh học trong phòng trừ tuyến trùng nốt sưng tại Lâm Đồng nói chung và cả nước nói riêng

Ngày tháng năm

Sinh viên chịu trách nhiệm chính

thực hiện đề tài

(ký, họ và tên)

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài *(phần này do người hướng dẫn ghi):* Đề tài bổ sung dẫn liệu mới các chủng vi sinh vật bản địa có tiềm năng trong phòng trừ tuyến trùng nốt sưng hại cây rau tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu xác định được loài *Trichoderma harzianum* và *Streptomyces* sp. có hiệu quả phòng trừ ấu trùng tuổi 2 của tuyến trùng *Meloidogyne* sp. đạt 100% và 98% trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu có thể làm tài liệu tham khảo cho sinh viên chuyên ngành nông nghiệp trong học tập và nghiên cứu.

Ngày 02 tháng 7 năm 2020

Xác nhận của trường đại học

(ký tên và đóng dấu)

Người hướng dẫn

(ký, họ và tên)

Trần Thị Minh Loan

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Một trong những mối lo ngại hàng đầu của nền nông nghiệp thế giới nói chung và nền nông nghiệp Việt Nam nói riêng đó là bệnh tuyến trùng gây hại trong đất do những thiệt hại mà nó mang lại trong sản xuất. Sự ký sinh của tuyến trùng trên thực vật cản trở quá trình hút chất dinh dưỡng của cây, ngăn chặn dòng vận chuyển nước và dinh dưỡng khiến cây trồng kém phát triển, năng suất và phẩm chất cây trồng giảm sút, đồng thời tạo điều kiện cho sự xâm nhiễm của các loại nấm gây hại cho cây trồng dễ dàng xuất hiện. Các phát hiện mới đây đã cho thấy số lượng tuyến trùng đã tăng 300% trong thập kỷ qua trên nhiều cánh đồng cây trồng (Dieterich và Sommer, 2009). Chính những tác động tiêu cực đến sản xuất nông nghiệp, bệnh tuyến trùng gây hại thực vật đang là mối quan tâm hàng đầu cần thiết có giải pháp để phòng trừ.

Tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* đã xuất hiện và gây hại lên hầu hết các loại cây nông nghiệp trồng tại các vùng châu Á, châu Phi, châu Âu, Nam Mỹ và Trung Mỹ, ước tính tuyến trùng có thể làm giảm đến 10% năng suất cây trồng đối với khu vực Trinidad và trên 25% đối với cây trồng tại Malawi, Ecuador và Tanzania. Tại Việt Nam, tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* là đối tượng gây hại nặng và còn là loại tương hỗ giúp cho các loại nấm như *Fusarium spp, Phytophthora* gây bệnh vàng lá, héo rũ, thối rễ trên cây trồng. Hàng năm trên địa bàn tỉnh Lâm Đồng, cây trồng bị các loại bệnh cây khác nhau mà nguyên nhân gây bệnh là khác nhau, trong đó nguồn bệnh chủ yếu là từ nấm, tuyến trùng, vi khuẩn và virus. Theo thống kê, có từ 8000 đến 10000 ha cà phê bị nhiễm tuyến trùng nặng.

Đặc biệt hiện nay, biện pháp hóa học được khuyến cáo sử dụng với nhiều hoạt chất độc hại ethoprophos, carbosulfan, chlorpyrifos làm ảnh hưởng đến các sinh vật nói chung, các sinh vật có lợi và đặc biệt là nhóm vi sinh vật đất, làm giảm đa dạng sinh học và hệ sinh thái đất. Trong hệ sinh thái đất, vi sinh vật đất đa dạng về loài và chức năng. Các loại vi sinh vật này có khả năng sinh tổng hợp các chất để chuyển đổi các chất vô cơ và khó tiêu thành dạng hữu cơ và dễ tiêu cho cây trồng dễ dàng hấp thụ và sử dụng. Các vi sinh vật này còn có chức năng cộng sinh với nhau và với cây trồng để hỗ trợ sinh trưởng của cây trồng và nâng cao năng suất cây trồng. Ngoài ra,

trong đất luôn tồn tại một hệ vi sinh vật đối kháng với vi sinh vật, côn trùng và tuyến trùng gây hại, có tiềm năng lớn trong việc phòng trừ dịch hại.

Trong đất có rất nhiều loài vi sinh vật có khả năng đối kháng với tuyến trùng. Trên thế giới việc khai thác sử dụng các vi sinh vật này rất hiệu quả. Ở Việt Nam, sử dụng chế phẩm sinh học trong phòng trừ tuyến trùng khá phổ biến, các chế phẩm sinh học có nguồn gốc thực vật, động vật và vi sinh vật được sản xuất thành những chế phẩm thương mại khá phổ biến. Một trong những chế phẩm vi sinh vật khá phổ biến trên thị trường đó Trichoderma. Tuy nhiên, những chủng vi sinh vật này được nhập và được sản xuất ở những vùng sinh thái khác mà không phải vi sinh vật bản địa. Chính vì thế hiệu quả về mặt sinh học và sinh thái không cao. Do đó, việc sử dụng biện pháp sinh học được khuyến khích và chú trọng hơn bằng cách sử dụng các vi sinh vật đất có khả năng phòng trừ tuyến trùng. Nhiều loại sinh vật có khả năng làm tăng sinh trưởng của cây, tạo ra các chất độc tố có tiềm năng ngăn cản sự sinh sản, sinh trưởng của trứng và ấu trùng tuổi 2 của tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* do vậy có thể được đưa vào ứng dụng trong phòng trừ tuyến trùng (Siddiqui và ctg, 2012).

Chính vì vậy, **"Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi sinh vật bản địa có tiềm năng đối kháng với tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)"*** có vai trò quan trọng trong việc đóng góp, bổ sung vào sự phát triển các biện pháp bảo vệ thực vật sinh học để góp phần khống chế tuyến trùng nốt sưng lây lan trong đất, duy trì và phát triển sự đa dạng sinh học trong đất và hạn chế ô nhiễm môi trường.

1. Mục tiêu nghiên cứu

Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật bản địa có khả năng kiểm soát tuyến trùng gây hại cây trồng trong đất tại Lâm Đồng.

Đánh giá khả năng ứng dụng các chủng vi sinh vật bản địa đã phân lập trong việc hạn chế sự phát triển của tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2. Phạm vi nghiên cứu

Đặc điểm hình thái một số chủng vi sinh vật bản địa có khả năng kiểm soát tuyến trùng gây hại cây trồng trong đất tại Lâm Đồng.

Đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đối kháng tuyến trùng gây hại cây trồng trong đất tại Lâm Đồng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tổng quan về vi sinh vật

1.1.1 Vi sinh vật đất

Trong tự nhiên vi sinh vật có mặt ở khắp mọi nơi: trong đất, trong nước, trong không khí và trên bề mặt của các sinh vật khác. Môi trường đất là nơi có nhiều chất dinh dưỡng, là một hệ sinh thái đa dạng trải qua quá trình phong hóa hàng triệu năm đã trở thành môi trường sống lý tưởng cho các loại vi sinh vật phát triển. Các loài vi sinh vật này sinh trưởng và phát triển trong đất tạo thành một hệ vi sinh vật đất đa dạng sinh học. Hệ vi sinh vật đất bao gồm 90% vi khuẩn, 8% xạ khuẩn, 1% nấm và 1% còn lại là tảo, động vật nguyên sinh. Các loài vi sinh vật này có mối quan hệ tương hỗ, cạnh tranh, ký sinh hay cộng sinh nhằm mục đích sinh trưởng của chúng, phát triển quần xã vi sinh vật đất. Trong quá trình chúng tác động lẫn nhau cũng tác động đến cây trồng, trong đó bao gồm cả những tác động có lợi và có hại.

Vi sinh vật đất tham gia vào quá trình hình thành đất trồng trọt, cải thiện cấu trúc đất; phân giải cellulose, lân, pectin; chuyển hóa các hợp chất thành các chất đơn giản, chất dinh dưỡng; cố định nitơ,... Trong nông nghiệp, vi sinh vật chiếm 1 phần quan trọng trong việc ứng dụng tạo các sản phẩm phân bón vi sinh, chế phẩm sinh học phòng trừ sâu, bệnh hại, xử lý nguồn nước tưới, cải tạo đất và lên men thực phẩm giúp tăng giá trị nông sản.

Đất trồng trọt đóng vai trò quan trọng trong ngành nông nghiệp, tuy nhiên do việc lạm dụng sử dụng thuốc hóa học để phòng trừ sâu, bệnh hại nói chung và tuyến trùng nói riêng đã gây ảnh hưởng lớn đến hệ sinh thái và hệ vi sinh vật đất. Mặt khác quá trình sử dụng biện pháp hóa học tăng lên sẽ dẫn đến tính kháng thuốc cho các loài gây bệnh. Vì vậy, việc áp dụng các biện pháp sinh học vào việc phòng chống tuyến trùng là chiến lược quan trọng trong việc phòng trừ dịch hại tổng hợp trên cây trồng.

Các loại vi khuẩn đối kháng (VKĐK) đều thuộc hệ vi sinh vật sống ở vùng rễ cây trồng và sống hoại sinh trong đất (Schlegel, 1981). Trên thế giới đã có nhiều tác giả nghiên cứu về hiệu lực của VKĐK với các tác nhân gây bệnh cây (do vi khuẩn và nấm). Kết quả nghiên cứu cho thấy các loại VKĐK có thể bảo vệ cây trồng, chống

lại các vi sinh vật gây bệnh, đồng thời tạo điều kiện cho cây trồng sinh trưởng và phát triển tốt (Weller, 1988; Défago và Haas, 1990; Kloepper, 1993). VKĐK có khả năng cạnh tranh với nguyên tố dinh dưỡng sắt (Fe) (Scher, 1986). Một số chủng vi khuẩn được sử dụng như là: *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.,… VKĐK có thể sản sinh ra cyanide, quy nạp (làm tăng) tính chống chịu của cây, sản sinh ra chất kích thích sinh trưởng và có khả năng phân giải độc tố do vi sinh vật gây bệnh tiết ra (Utsumi và ctg 1988; Toyoda và ctg, 1988). VKĐK có khả năng cạnh tranh, chiếm chỗ rất thuận lợi ở vùng rễ của cây trồng (Bull và ctg, 1991, Lugtenberg và ctg, 1991; Parke, 1990; Schroth và Hancock,1982; Weller, 1988). VKĐK có khả năng phòng chống lại nhiều loài vi sinh vật gây bệnh cây chủ yếu, ngoài ra nó còn có tầm quan trọng chống lại những vi sinh vật thứ yếu hại cây, nghĩa là bản thân nó có khả năng chống lại những loài vi sinh vật gây bệnh mà những vi sinh vật đó thường làm giảm sự sinh trưởng phát triển của cây trồng (Defago và Haas, 1990; Gamliel và Katan, 1993).

Các loài nấm đối kháng (NĐK) được sử dụng trong phòng trừ bệnh hại cây thường là những loài có nguồn gốc trong đất, trong quá trình sinh sản NĐK sản sinh ra chất kháng sinh có tác dụng ức chế và tiêu diệt các loại nấm bệnh gây hại cho cây. Các loại NĐK thường được sử dụng là: *Penicillium sp., Trichoderma* sp., *Acremonium killense, Chaetomium globosum,…* NĐK xâm nhập vào bên trong sợi nấm gây bệnh bằng cách quấn chặt sợi nấm gây bệnh và thủy phân vách sợi nấm bệnh, sau đó NĐK phá hủy tế bào và tiêu diệt nấm bệnh. Ngoài ra các chất kháng sinh do NĐK tiết ra có khả năng kìm hãm sự phát triển của nấm bệnh, có thể ký sinh tiêu diệt nấm bệnh.

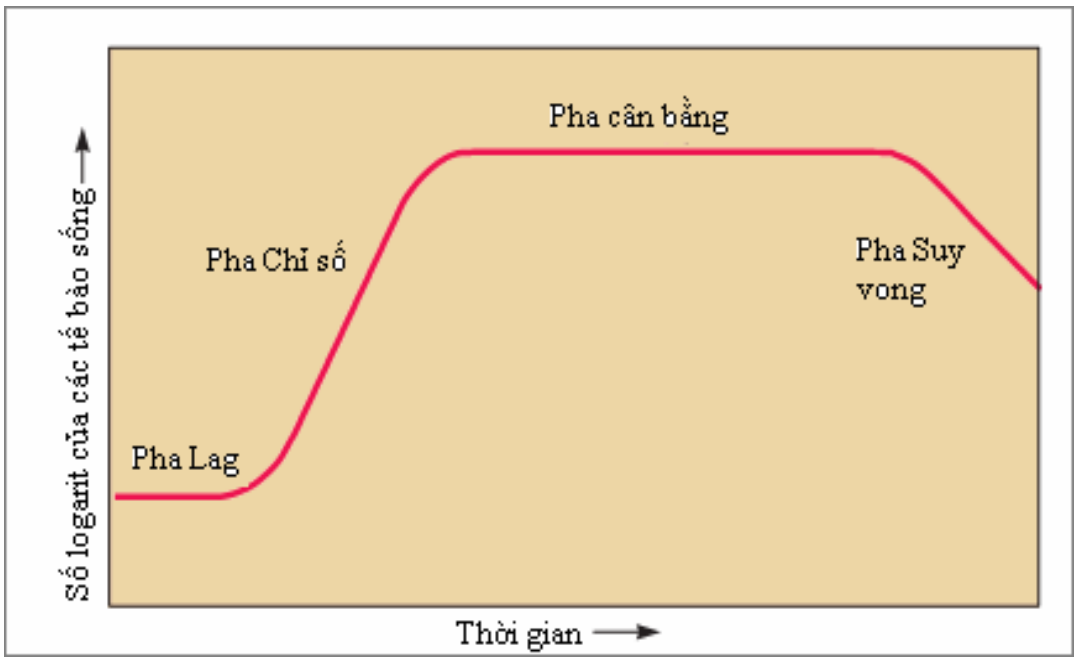
1.1.2 Sinh trưởng và phát triển vi sinh vật

Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính cơ sở của vi sinh vật. Sinh trưởng là sự tăng kích thước và khối lượng tế bào, còn phát triển (sinh sản) là sự tăng số lượng tế bào. Điều cần chú ý là khi nói về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn tức là đề cập đến sinh trưởng và phát triển của một số lượng lớn tế bào của cùng một loại. Bởi vì, việc nghiên cứu một cá thể tế bào vi khuẩn quá nhỏ là rất khó. Tuy nhiên sự tăng số lượng tế bào không phải bao giờ cũng diễn ra Song song với sự tăng sinh khối. Chẳng hạn, khi chất dinh dưỡng trong môi trường đã cạn, vi khuẩn tuy còn phân chia 1 - 2 lần nhưng cho 2 - 4 tế bào nhỏ hơn tế bào bình thường, trong pha mở đầu, sinh khối

vi khuẩn tăng lên, nhưng số tế bào không thay đổi, ngược lại, vào cuối pha logarit kích thước tế bào giảm đi nhưng số tế bào vẫn còn tăng.

Nuôi cấy tĩnh là phương pháp nuôi cấy mà trong suốt thời gian đó ta không thêm vào chất dinh dưỡng cũng không loại bỏ đi các sản phẩm cuối cùng của trao đổi chất (quần thể tế bào bị giới hạn trong một khoảng không gian nhất định). Sự sinh trưởng trong một hệ thống đóng" hay "hệ kín" như vậy tuân theo những quy luật bắt buộc không những đối với các cơ thể đơn bảo mà cả đối với các cơ thể đa bào.

Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của logarit số lượng tế bào theo thời gian gọi là đường cong sinh trưởng:



Hình 1.1: Các pha phát triển của vi sinh vật

(Nguồn: Willey và ctg, 2008)

Quá trình sinh trưởng của tế bào vi sinh vật trong hệ kín trải qua các giai đoạn:

* Pha lag (pha mở đầu = pha tiềm tàng)

Pha này tính từ lúc bắt đầu nuôi cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag vi khuẩn chưa phân chia (nghĩa là chưa có khả năng sinh sản) nhưng thể tích và khối lượng tế bào tăng lên rõ rệt do quá trình tổng hợp các chất, trước hết là các cao phân tử (protein, enzyme, acid nucleic.) diễn ra mạnh mẽ.

Độ dài của pha lag phụ thuộc trước hết vào tuổi của ống giống và thành phần môi trường. Thông thường tế bào càng già thì pha lag càng dài. Rõ ràng nguyên nhân của pha lag là sự khác biệt giữa các tế bào ở pha ổn định (hoặc bào tử) với các tế bào đang sinh trưởng logarit. Trong pha lag diễn ra việc xây dựng lại các tế bào nghỉ thành các tế bào sinh trưởng logarit (hoặc sinh trưởng theo lũy thừa). Khi chuyển các tế bào đang sinh trường logarit vào môi trường mới khác với môi trường trước đó ta vẫn thấy có sự xuất hiện pha lag. Nguyên nhân của pha lag trong trường hợp này chính là sự thích ứng của vi khuẩn với điều kiện nuôi cấy mới; sự thích ứng đó có liên quan đến việc tổng hợp các enzyme mới mà trước đây tế bào chưa cần. Các enzyme mới này được tổng hợp nhờ sự cảm ứng của các cơ chất mới.

Đặc trưng của hiện tượng sinh trưởng kép là đường cong sinh trưởng gồm hai pha lag và hai pha log. Sau khi kết thúc pha log thứ nhất tế bào lại mở đầu pha lag thứ hai và tiếp tục pha log thứ hai.

Hiện tượng sinh trưởng kép thường gặp khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường chứa nguồn cacbon gồm một hỗn hợp của hai chất hữu cơ khác nhau. Khi sinh trưởng tế bào sẽ đồng hóa trước tiên nguồn cacbon nào mà chúng thích nhất. Đồng thời cơ chất thứ nhất này đã kìm hãm các enzyme cần cho việc đồng hóa cơ chất thứ hai. Chỉ sau khi nguồn carbon thứ nhất đã cạn thì nguồn carbon thứ hai mới có thể cảm ứng tổng hợp nên các enzyme cân trong việc chuyển hóa nó.

Hiện tượng sinh trưởng kép không chỉ hạn chế ở các nguồn cacbon và năng lượng mà thấy các nguồn nitơ và photpho. Chẳng hạn *Aerobacter aerogenes* có thể sử dụng nguồn nitơ là amino acid, muối amoni và nitrate. Nếu khi cấy chuyền vi khuẩn từ môi trường nước thịt sang môi trường chứa muối amoni hoặc nitrate thì pha lag sẽ biểu hiện. Nếu từ môi trường nước thịt sang môi trường chứa hỗn hợp cả hai loại muối sẽ thấy có hiện tượng sinh trưởng kép. Các ion NH được đồng hoá trước đồng thời kiềm chế việc tổng hợp cảm ứng enzyme nitrate - reductase. Chỉ sau khi hết muối amoni trong môi trường thì muối nitrat mới được sử dụng (Nguyễn Lân Dũng, 2010).

Sinh trưởng kép là hiện tượng phổ biến và có thể giải thích bằng cơ chế kiềm chế nổi chung và đặc biệt bằng hiệu ứng glucose.

* Pha logarit (pha log)

Trong pha này vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa, nghĩa là sinh khối và số tế bào tăng theo phương trình:

$$N = N_0 \times 2^{ct} \text{ hay } X = X_0 \times e^{ut}$$

Kích thước của tế bào, thành phần hóa học, hoạt tính sinh lý... nói chung không thay đổi theo thời gian. Tế bào ở trạng thái động học và được coi như là những tế bào tiêu chuẩn".

* Pha ổn định (pha cân bằng)

Trong pha này quần thể vi khuẩn ở trạng thái cân bằng động học, số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào cũ chết đi. Kết quả là số tế bảo sống không tăng cũng không giảm. Tốc độ sinh trưởng phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Cho nên khi giảm nồng độ cơ chất (trước khi cơ chất bị cạn hoàn toàn) tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn cũng giảm. Do đó việc chuyển từ pha log sang pha ổn định diễn ra dần dần.

Nguyên nhân tồn tại của pha ổn định rõ ràng là do sự tích lũy sản phẩm độc của trao đổi cơ chất (các loại rượu, acid hữu cơ) và việc cạn chất dinh dưỡng (thường là chất dinh dưỡng có nồng độ thấp nhất). Nguyên nhân thứ nhất rất phức tạp và khó phân tích, nguyên nhân thứ hai đã được nghiên cứu kỹ hơn.

*Pha tử vong

Trong pha này số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo lũy thừa (mặc dù số lượng tế bảo tổng cộng có thể không giảm). Đôi khi các tế bào bị tự phân nhờ các enzyme của bản thân. Ở các vi khuẩn sinh bào tử quá trình phức tạp hơn do sự hình thành bảo tử.

Thực ra chưa có một quy luật chung cho pha tử vong. Sự chết của tế bào có thể nhanh hay chậm, có liên quan đến sự tự phân hay không tự phân. Do sức sống lớn bào tử bị chết chậm nhất (trong những điều kiện thích hợp như khô và nhiệt độ thấp bào tử có thể có khả năng sống vài trăm năm). Nguyên nhân của pha tử vong chưa thật rõ ràng, nhưng có liên quan đến điều kiện bất lợi của môi trường. Trong trường hợp môi trường tích lũy các acid nguyên nhân của sự chết tế bào tương đối dễ hiểu. Nồng độ chất dinh dưỡng thấp dưới mức cần thiết cho hậu quả làm giảm hoạt tính

trao đổi chất, phân hủy dần dần các chất dự trữ và cuối cùng dẫn đến sự chết của hàng loạt tế bảo. Ngoài đặc tính của bản thân chúng vi khuẩn, tinh chất của các sản phẩm trao đổi chất tích lũy lại cũng ảnh hưởng đến tiến trình của pha tử vong.

Một số enzyme thể hiện hoạt tính xúc tác cực đại trong pha tử vong như deaminase, decarboxylase, các amylase và protease ngoại bào. Ngoài chức phận xúc tác một số quy trình tổng hợp những enzyme nói trên chủ yếu xúc tác cho quá trình phân giải.

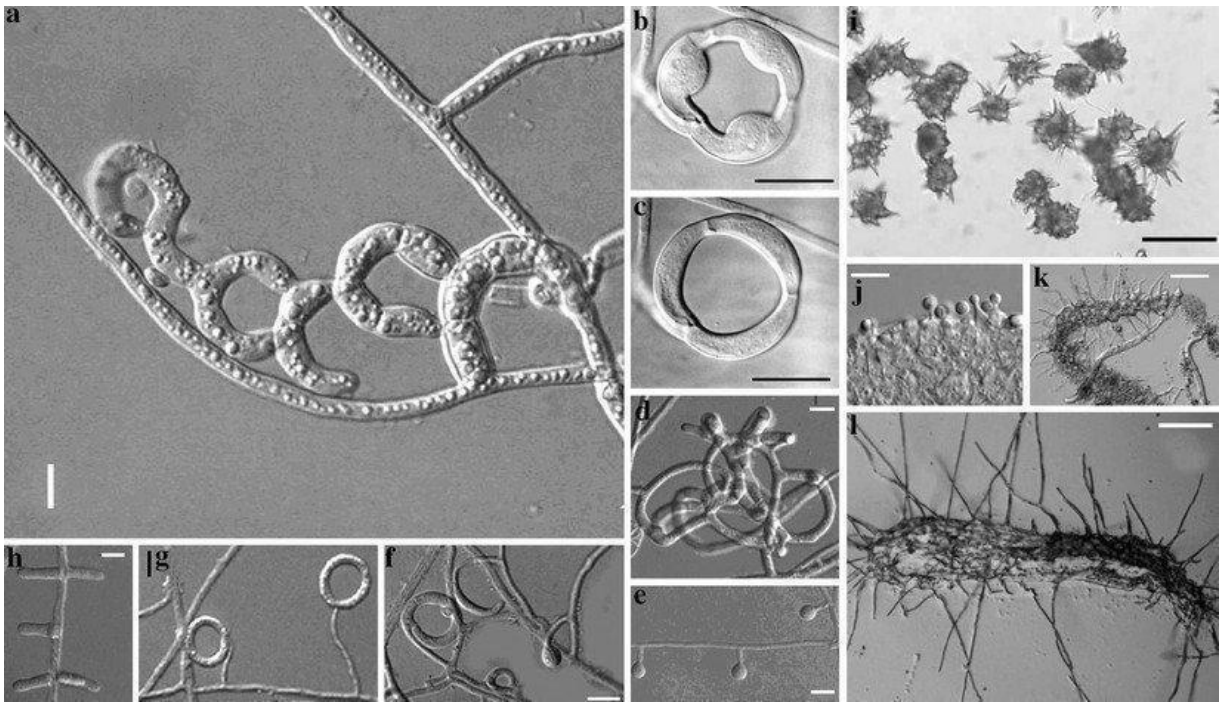
Tốc độ tử vong của tế bào có liên quan trực tiếp đến thực tiễn vi sinh vật học và kĩ thuật, đó là vấn để bảo quản các chủng vi sinh vật quan trọng về mặt lý thuyết (các chung và các chủng đặc biệt) và kỹ thuật (các chủng sinh chất kháng sinh, amino acid, vitamin... và lượng cao. Ngoài khả năng sống ta còn cần bảo quản cả các đặc tính di truyền của vi khuẩn với nhiều phương pháp bảo quản khác nhau, nhưng tất cả đều nhằm làm giảm trao đổi tối thiểu chủ yếu bằng cách giảm nhiệt độ và độ ẩm (Lê Xuân Phương, 2008).

1.1.3 Những nghiên cứu trong và ngoài nước về sử dụng vi sinh vật đối kháng tuyến trùng

Các vi sinh vật có khả năng kiểm soát tuyến trùng ký sinh thực vật thuộc về vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn. Chúng gây ra hành động đối kháng thông qua các cơ chế khác nhau. Vi khuẩn không gây bệnh đối kháng tuyến trùng bằng cách (1) gây ra kháng thực vật (kháng cảm ứng hoặc hệ thống), (2) thu hút tuyến trùng bằng các hợp chất tín hiệu gây ức chế, (3) thuần hóa rễ cây để ngăn chặn sự xâm nhập của bào tử. Một số vi khuẩn sản xuất các hợp chất độc hại giết chết tuyến trùng (ví dụ: nấm) ký sinh trên chúng (Sikora, 1992).

Nấm ký sinh tuyến trùng được phân lập từ trứng, ấu trùng hoặc con trưởng thành và được khảo nghiệm thành công làm giảm mật số con trưởng thành đáng kể. Các nổ lực nghiên cứu ở một số cây trồng đang tập trung sử dụng nấm phát hiện tại địa phương để kiểm soát dịch hại tại địa phương.

Ảnh hưởng của một số vi khuẩn *Rhizobacteria* và nấm đối kháng trong điều trị nốt rễ và bệnh tuyến trùng nốt sần trên cây đậu xanh đã được Khan và ctg. (2002) nghiên cứu.



Hình 1.2: Một số dạng nấm kiểm soát tuyến trùng

a: Dactylella dianchiensis, b.c: *Arthrobotrys brochopaga*, d: *A. oligospora*, e: *Monacrosporium ellipsosporum*, f: *M. candium*, g: *Monacrosporium sp.*

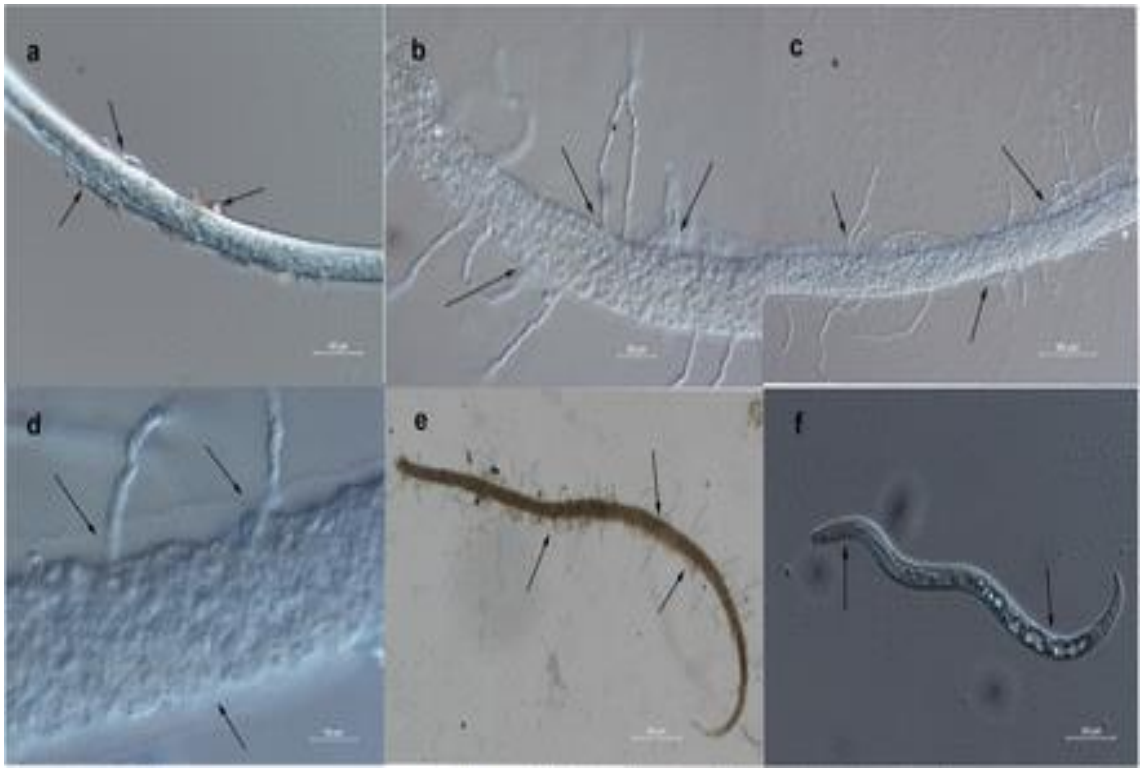
(Nguồn: Jinkui Yang và ctg, 2007)

Một số vi sinh vật được thương mại hóa, dễ dàng tạo sinh khối lớn trong quá trình lên men và dễ sử dụng ngoài đồng ruộng như các loại nấm ký sinh *Paecilomyces lilacinus* 251 đã được các công ty công nghệ sinh học ở Đức và Nam Phi cấp phép sản xuất để phục vụ thị trường Châu Âu và Mỹ trong việc kiểm soát tuyến trùng ký sinh (Bruckner, 2004).

Purpureocillium lilacinum là một loại nấm phổ biến và phân bố rộng trên thế giới (Samson, 1974) và đã được thử nghiệm rộng rãi nhất cho sự kiểm soát bệnh sần rễ và u nang tuyến trùng. Chúng được sử dụng chủ yếu trong điều kiện nhiệt đới như Philippines (Jatala, 1986), Cộng hòa Nam Phi (Neethling, 2002). Loài này có hiệu quả chống lại các tuyến trùng khác nhau gây bệnh thực vật và chủ yếu lây nhiễm trứng và con cái tuyến trùng (Amancho và Sasser, 1995; Borisov, 1998; Pandey và Trivedi, 1990; Silva và cs, 1992; Sosnowska, 2001; Zaki, 1994; Wang và cs, 2001). Hiện nay *P. lilaccinum* là loài nấm chỉ có mục đích thương mại để kiểm soát tuyến trùng và sâu bệnh ở Châu Âu và chủng nấm 251 thương mại được đăng ký bán ở một số nước (Atkins và ctg, 2005).

Hiện nay, số lượng thuốc bảo vệ thực vật được sử dụng để phòng trừ tuyến trùng và nấm có hại trên cây trồng ngày càng nhiều. Điều này gây nên áp lực lớn đối với vấn đề ô nhiễm môi trường và sức khỏe con người. Việc sử dụng các chế phẩm sinh học trong bảo vệ thực vật là rất cần thiết.

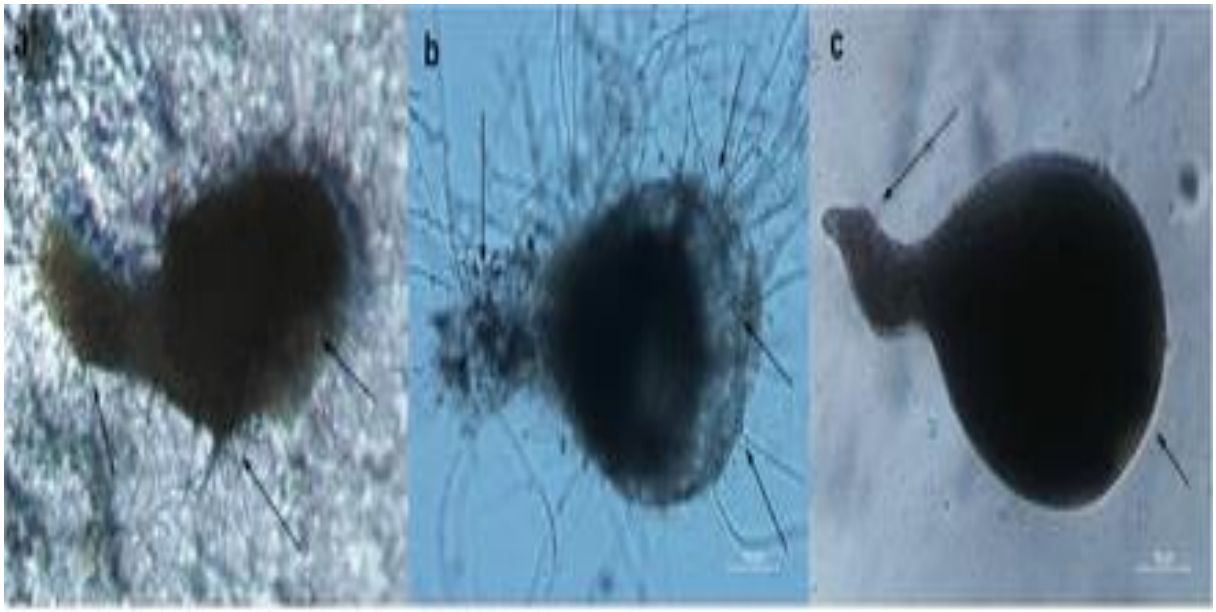
Nghiên cứu của Ngô Thị Thu Hà (2013) về phân lập nấm *Purpureocillinum lilacinum* phòng trừ tuyến trùng nốt sưng, tuy nhiên do chủng nấm phân lập được có tác dụng chậm, tốc độ sinh trưởng chậm nên khả năng ứng dụng thấp.



Hình 1.3: Nấm *P. chrysosporium* ký sinh tuyến trùng *Meloidogyne incognita* J2

(a) Các bào tử tiếp xúc với J2 (độ phóng đại 20X); (b) các bào tử tiếp xúc nhiều hơn và sợi nấm mọc ra từ cơ thể của J2 (độ phóng đại 40X); (c) nhiều sợi nấm được tạo ra từ các cơ thể của J2 (độ phóng đại 20X); (d) lớp biểu bì của J2 bị uốn cong và co lại (độ phóng đại 40X); (e) J2 được ký sinh bởi chủng *P. lilacinus* (độ phóng đại 20X). (f) đối chứng: J2 khỏe mạnh (độ phóng đại 20X).

(Nguồn: Du và ctg, 2020)

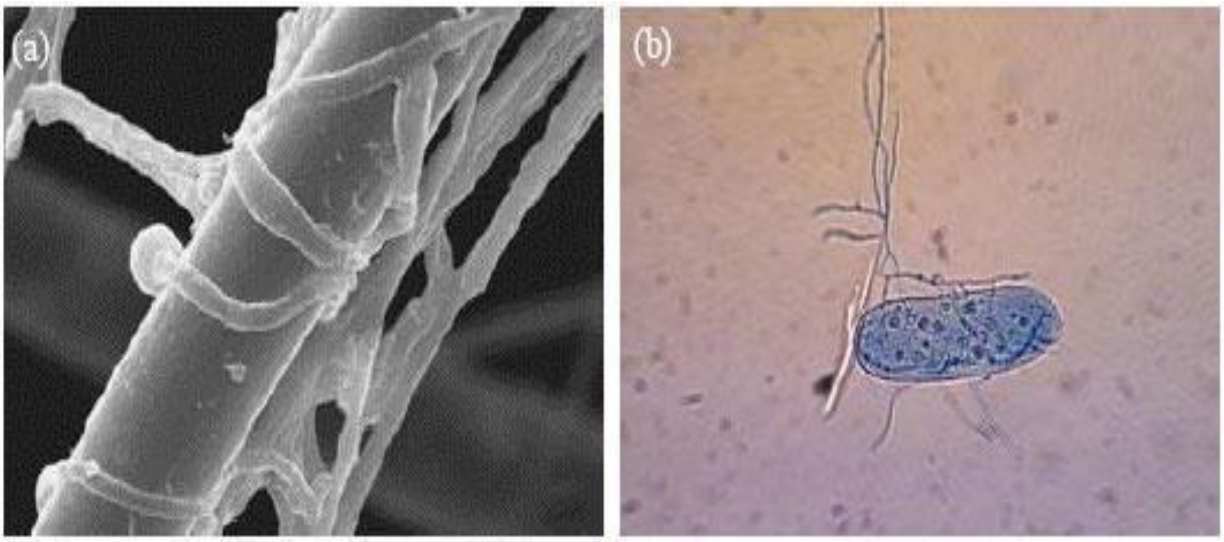


Hình 1.4: Nấm *P. chrysosporium* ký sinh con cái tuyến trùng *Meloidogyne incognita* J2

(a) Các bào tử tiếp xúc với cơ thể con cái trưởng thành và các sợi nấm mọc ra ngoài; (b) sợi nấm dày đặc xâm nhập cơ thể con cái trưởng thành, một phần đã bị phân hủy. (c) đối chứng: con cái trưởng thành. Tất cả các quan sát đều có độ phóng đại dưới 10x.

(Nguồn: Du và ctg, 2020)

Tại Việt Nam, Ngô Thị Xuyên (2000) bước đầu thử nghiệm 2 loại nấm đối kháng *P. lilacinus và Gliocladium* sp., diệt được ấu trùng tuổi 2 và trứng của *M. incognita* trên một số vùng rau Hà Nội. Ngoài ra, có thể sử dụng cùng với chế phẩm neem cũng hạn chế rất nhiều ảnh hưởng của tuyến trùng nốt sưng với cây trồng. Nấm đối kháng *T. harzianum,* được biết là có hiệu quả chống lại bệnh đất, cũng có hoạt tính đối với tuyến trùng nốt sưng. *T. harzianum* và *T. koningii,* tăng trưởng thực vật và giảm mật độ tuyến trùng *M. arenaria.* Ở Ấn Độ, nấm *T. harzianum* đã được tăng cường bổ sung với bánh neem đã hạn chế tác hại của tuyến trùng nốt sưng (Rao và ctg, 1997).



Hình 1.5: Nấm *T. harzianum* đối kháng tuyến trùng *M. javanica*

(a) Sợi nấm bao quanh tuyến trùng trưởng thành, (b) Trứng tuyến trùng trong khối trứng bị nấm *T. harzianum*.

(*Nguồn: Hadi Golzari và ctg, 2011*)

Số lượng nghiên cứu về các tác nhân phòng trừ sinh học trên tuyến trùng còn khá ít, chỉ dừng lại ở việc nghiên cứu một số chủng nấm ký sinh tuyến trùng và vi sinh vật đối kháng. Tiêu biểu và được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay là nấm đối kháng *Trichoderma* sp.

Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học SH-BV1 trong phòng trừ tuyến trùng ở cà rốt bao gồm nhiều thành phần từ thảo mộc trị tuyến trùng Saponin, Alkaloid, Azadirachtin và dầu thực vật có độc tính mạnh, nấm đối kháng *T. harzianum*, vi sinh vật ức chế bệnh *Bacillus subtilis* và một số thành phần khác cho thấy hiệu quả phòng trừ tuyến trùng trong đất đạt 68,2% ở Hải Dương và 78,2% ở Lâm Đồng (Nguyễn Thị Chúc Quỳnh và ctg, 2015).

Đã có một số nghiên cứu về chủng vi sinh vật đối kháng tuyến trùng được thực hiện tại Lâm Đồng bao gồm nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh vùng rễ cà phê và hồ tiêu của Trịnh Thị Thu Thủy (2010), phân lập một số chủng nấm đối kháng tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trên cà phê vối ở Đăk Lăk của Nguyễn Thanh Nguyên (2011).

Nhìn chung, số lượng nghiên cứu cũng như sự đa dạng về các chủng vi sinh vật phòng trừ tuyến trùng ở Việt Nam hiện còn ít, tập trung ở vài chủng nấm cơ bản có khả năng ký sinh chuyên hóa trên một vài đối tượng quan trọng. Các nghiên cứu về vi sinh vật bản địa ở Việt Nam tuy có nhưng chưa đi sâu vào tiềm năng phòng trừ tuyến trùng và nấm gây hại. Chính vì vậy việc áp dụng các tác nhân sinh học trong phòng trừ tuyến trùng và nấm gây hại nên có sử dụng các chủng vi sinh vật bản địa phân lập tại Lâm Đồng và nhân cao mật số nó trong đất để tăng cường hiệu quả phòng trừ tuyến trùng và nấm gây hại tại địa phương.

1.2. Các chủng vi sinh vật có khả năng phòng trừ tuyến trùng

1.2.1 Xạ khuẩn

Xạ khuẩn *Streptomyces* là một loại vi sinh vật thuộc nhóm vi khuẩn thật *(Eubacteria)* phân bố rộng rãi trong tự nhiên và được tìm thấy chủ yếu trong đất và thảm thực vật mục nát. Theo tiếng Hy Lạp, tên khoa học của xạ khuẩn – Actinomyces có nghĩa là tia (actino) và nấm (mycete) nên dù chúng là một loại vi khuẩn nhưng có cấu trúc hệ sợi phân nhánh. Hầu hết, các loài xạ khuẩn đều sinh sản bằng bào tử, dựa vào hình dạng và kích thước bào tử mà người ta có thể phân loại các loài xạ khuẩn. Xạ khuẩn *Streptomyces* có kích thước rất nhỏ, giống như vi khuẩn, chúng có nhân, không có màng nhân bao bọc và sinh sản bằng hình thức phân bào Amitoz.

Giới: Bacteria (Carl Woese, 1990)

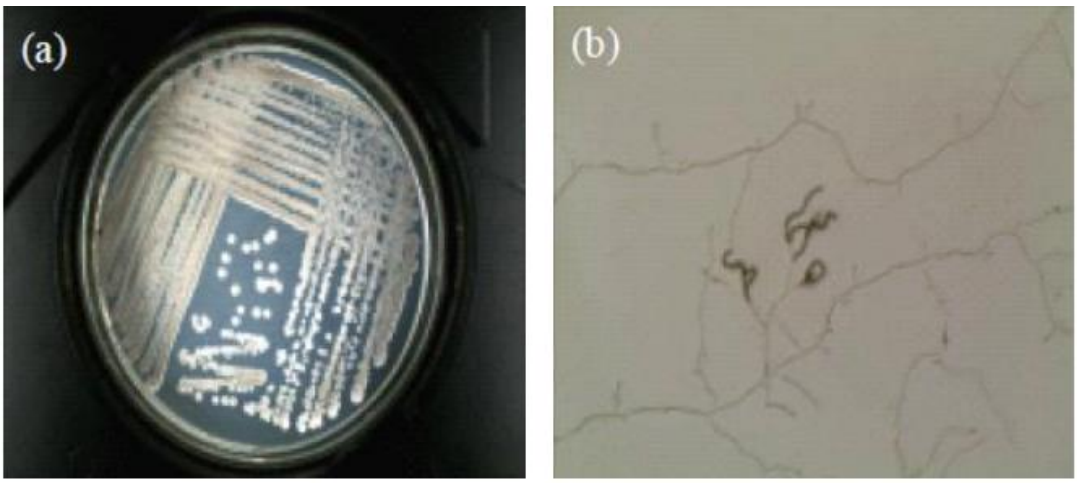
Ngành: Actinobacteria (Goodfellow, 2012)

Lớp: Actinobacteria (Stackebrandt và ctg, 1997)

Bộ: Actinomycetales (Buchanan, 1917)

Họ: Streptomycetaceae (Waksman và Henrici, 1943)

Chi: *Streptomyces* (Warsman và Henrici, 1943)



Hình 1.6: Xạ khuẩn *Streptomyces* sp.

(a) Khuẩn lạc của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trên môi trường Gause 1,

(b) Xạ khuẩn *Streptomyces* sp. dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X.

Hiện nay, khoa học đã mô tả được khoảng 500 loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành thuốc kháng sinh cho người và trong đất chúng thực hiện quá trình phân giải chất hữu cơ (Cellulose), khử nitrat, phân hủy tinh bột, adenine và L- tyrosine.. Trong số khoảng 8000 chất kháng sinh được công bố trên thế giới thì có 80% là do xạ khuẩn sản sinh ra (Lê Gia Hy, 1994).

Thay vì sử dụng thuốc hóa học, việc sử dụng chất kháng sinh do xạ khuẩn tiết ra có tác dụng bảo vệ môi trường sinh thái, dễ phân hủy, tác dụng nhanh và có tính chọn lọc cao. Ngoài ra, các chất kháng sinh do xạ khuẩn tiết ra còn có thể bảo vệ hạt giống khỏi các loại nấm bệnh hại khác. Năm 2002 tại Ấn Độ đã phân lập được chủng *Streptomyces* sp. 201 có khả năng sinh kháng sinh mới là z – methylheptyl iso – nicotinate, chất kháng sinh này có khả năng kháng được nhiều loại nấm gây bệnh như *Fusarium oxysporum, Fusarium solani…*

Trong các chất kháng sinh do xạ khuẩn tiết ra bao gồm cả chitinase và protease, các enzyme này đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế sự sinh trưởng và tiêu diệt tuyến trùng. Khi tuyến trùng xuất hiện trong môi trường sống của xạ khuẩn, chúng sẽ sinh sản mạnh mẽ và tiến đến bao lấy con trưởng thành để cạnh tranh dinh dưỡng tại vùng sống của tuyến trùng và tiết ra các enzyme phân hủy gây chết tuyến trùng.

1.2.2. Nấm Trichoderma sp.

Trichoderma sp. là một chi nấm có lợi thuộc họ Hypocreaceae, phân bố khắp trong đất và đặc biệt là ở vùng rễ. *Trichoderma* sp. phát triển mạnh trong môi trường khoai tây giàu dinh dưỡng (PDA) với điều kiện nhiệt độ 25 - 30˚C. Vị trí phân loại của *Nấm Trichoderma* sp.:

Giới: Fungi (Moore RT, 1980)

Ngành: Ascomycota (Cavalier, 1998)

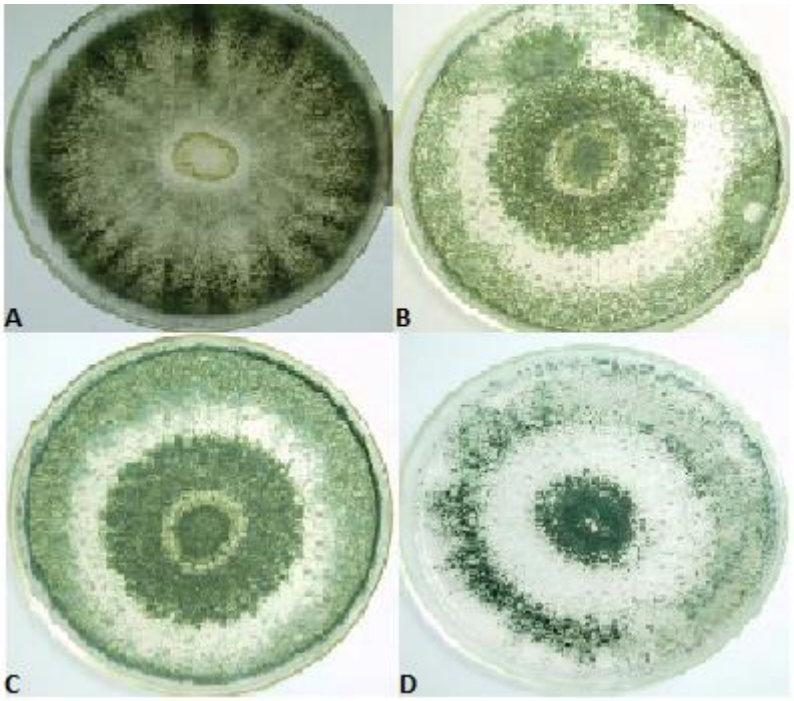
Lớp: Sordariomycetes (Spatafora, 1995)

Bộ: Hypocreales (Lindau, 1897))

Họ: Hypocreaceae (De Not, 1844)

Chi: *Trichoderma* (Pers, 1794)

Loài: *Trichoderma* sp. (Pers, 1794)



Hình 1.7: Khuẩn lạc của một số chủng *Trichoderma* trên môi trường PDA (7 ngày)

A: *T. atroviride,* B: *T. longibrachiatum,* C: *T. virens,* D: *T harzianum.*

(Nguồn: Zhang và Wang, 2012)

Trichoderma sp. không chỉ tạo ra chất kháng sinh mà còn tạo ra các enzyme có hoạt tính sinh học như chitinase, protease, cellobiose có khả năng phân giải thành tế bào của côn trùng và động vật đất. Ngoài ra, nấm *Trichoderma* có nhiều tác dụng như tiết ra chất có khả năng kìm hãm sự phát triển của các loại nấm, bệnh hại như một loại thuốc kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống với các loại vi sinh vật gây hại, ký sinh vào cơ thể sinh vật gây hại để giết chết chúng (Nguyễn Văn Đĩnh, 2007).

Trichoderma sp. có tác động tích cực đến cây trồng bằng cách tăng cường sức đề kháng cho thực vật, tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng, thúc đẩy tăng trưởng thực vật và cải thiện năng suất cây trồng.

Từ 70 năm trước, khả năng đối kháng của các loài *Trichoderma* đã được phát hiện. Từ đó, nấm đối kháng *Trichoderma* sp. đã được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Các chất kháng sinh do *Trichoderma* sp. tiết ra có thể ở dạng bay hơi hoặc không bay hơi, chúng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của các vi sinh vật cũng như tuyến trùng gây hại cây trồng. Trong số đó có một số loài nấm đã được nghiên cứu thành công trong phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh gây hại trên cây trồng, cụ thể là các loài như nấm *T. harzianum, T. reesei, T. longibrachiatum, T. koningii,...*

1.2.2.1 Nấm *Trichoderma harzianum*

T. harzianum được chứng minh là loài phổ biến nhất và có tính đa dạng di truyền nhất với sáu kiểu gen ITS khác nhau (Kullnig và ctg, 2000).

T. harzianum là một loại nấm hoại sinh trong đất, có khả năng sử dụng nguồn carbon và nitrogen trong đất. Nguồn carbon bao gồm monosaccharide, disaccharide và polysaccharide là các nhóm chất *T. harzianum* có thể sử dụng được nên trong môi trường nuôi cấy thường bổ sung một lượng lớn tinh bột và đường. Ngoài ra, *T. harzianum* sử dụng nguồn đạm NH_3. *T. harzianum* là loài có sự mẫn cảm với NaCl, khi có mặt NaCl sự sinh trưởng của *T. harzianum* bị kìm hãm nên trong môi trường nuôi cấy *T. harzianum* không cho NaCl vào là tốt nhất. *T. harzianum* yêu cầu về pH nhất định cho sự phát triển của chúng, pH tối thích là pH trung tính, nếu pH giảm

dưới 3,5 thì *T. harzianum* sẽ không phát triển. Tuy nhiên, trong môi trường lỏng và rắn có độ acid thích hợp thì sự nảy mầm bào tử của *T. harzianum* nhanh hơn.



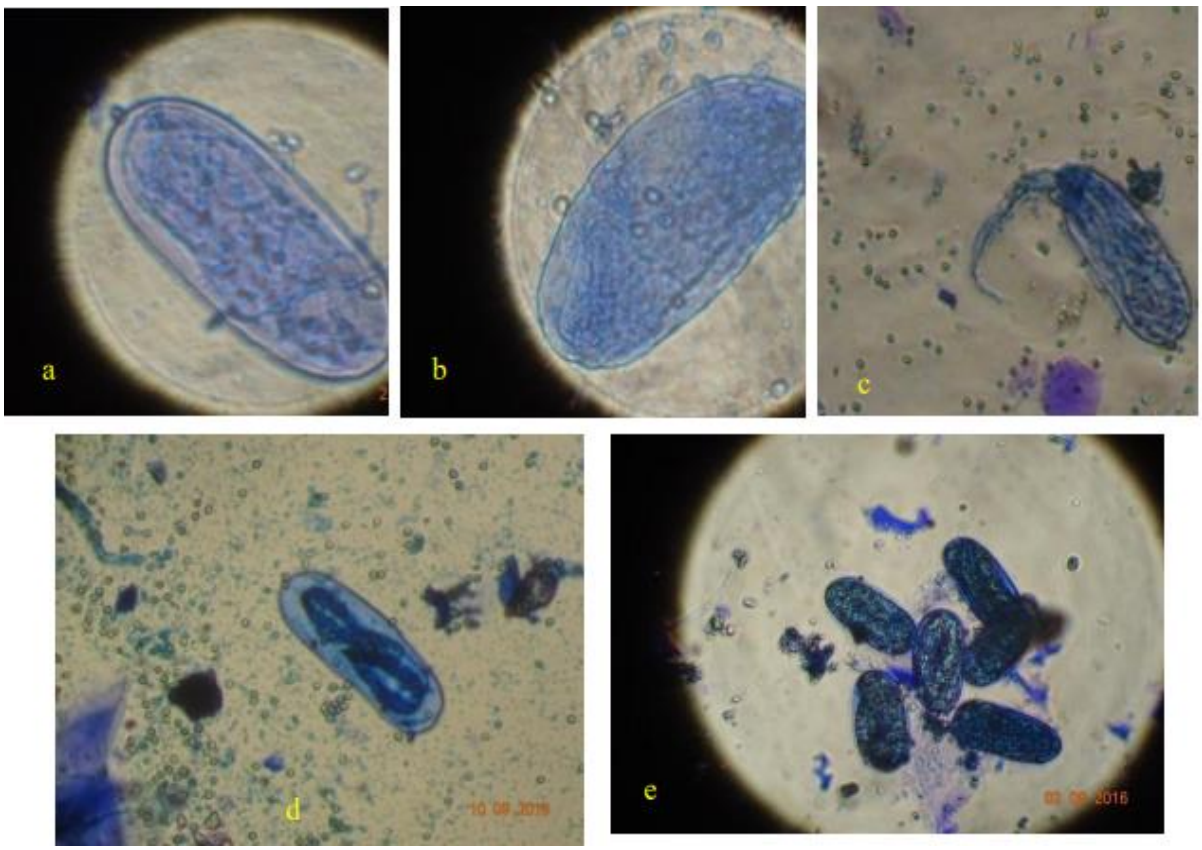
Hình 1.8: Sợi nấm và cuống bào tử *T. harzianum*

(Nguồn: Indiamart, 2001)

Cơ chế kiểm soát sinh học của *Trichoderma harzianum*

Trong điều kiện nhà kính, việc cấy hạt cà chua với *T. harzianum đã* làm giảm đáng kể mức độ bệnh do tuyến trùng *Meloidogyne javanica* gây ra; ảnh hưởng đến sự hình thành, phát triển và sinh sản của chúng (Sahebani và Hadavi, 2008) Ngoài ra, họ đã quan sát thấy số lượng trứng nở giảm đáng kể, do đó chứng minh rằng loài *Trichoderma* này có tiềm năng đáng kể như BCAs chống lại tuyến trùng thực vật này.

T. harzianum khống chế sự phát triển của tuyến trùng bằng cách tăng lượng enzyme chitinase và protease tạo điều kiện thuận lợi cho nó có thể xâm nhập vào trứng của tuyến trùng phá vỡ cấu trúc lớp vỏ chitin làm chúng không nở được, do đó chúng được xem là BCAs chống tuyến trùng vì có khả năng ảnh hưởng đến số lượng ấu trùng cảm nhiễm J2. Đất được xử lý với bào tử nấm *T. harzianum* sẽ lấn áp tuyến trùng. Cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống được xem như là một cơ chế, mặc dù nó không được chứng minh là hoạt động riêng rẽ (Silvan và Chet, 1989). Trong nguồn cơ chất, *T. harzianum* phát triển mạnh mẽ và nhanh chóng nhằm ức chế sự sinh trưởng của trứng tuyến trùng và cả con trưởng thành nên khi xử lý đất bằng *T. harzianum* cũng góp phần tiêu diệt tuyến trùng.

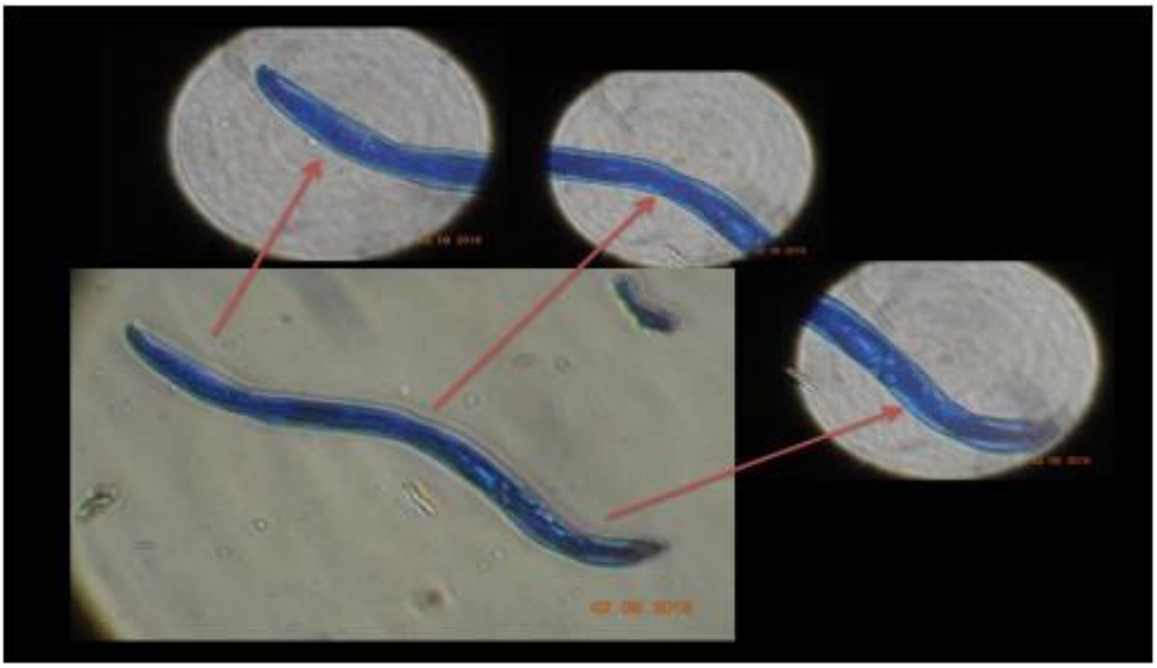


Hình 1.9: Trứng và ấu trùng của tuyến trùng *Meloidogyne incognita bị T. harzianum* ký sinh

a: Trứng bị *T. harzianum* xâm nhập và phôi trứng thoái hóa, b: Mạng lưới rộng lớn của sợi nấm bên trong trứng, c: *T. harzianum* ký sinh vào trứng chứa J2 đang sinh trưởng, d. Sự thay đổi hình thái của J2 trong trứng, e. Trứng trưởng thành không nở được.

(Nguồn: Uday và ctg, 2019)

T. harzianum trong đất có tuyến trùng sẽ phát triển hướng về trứng tuyến trùng, sau đó bao lấy trứng và từ từ tiết ra enzyme phân giải làm chết trứng trước khi nở. Đây là sự tương tác đặc hiệu của loài *Trichoderma.*



Hình 1.10: Ấu trùng tuổi 2 (J2) của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* bị *T. harzianum* ký sinh

(Nguồn: Uday và ctg, 2019)

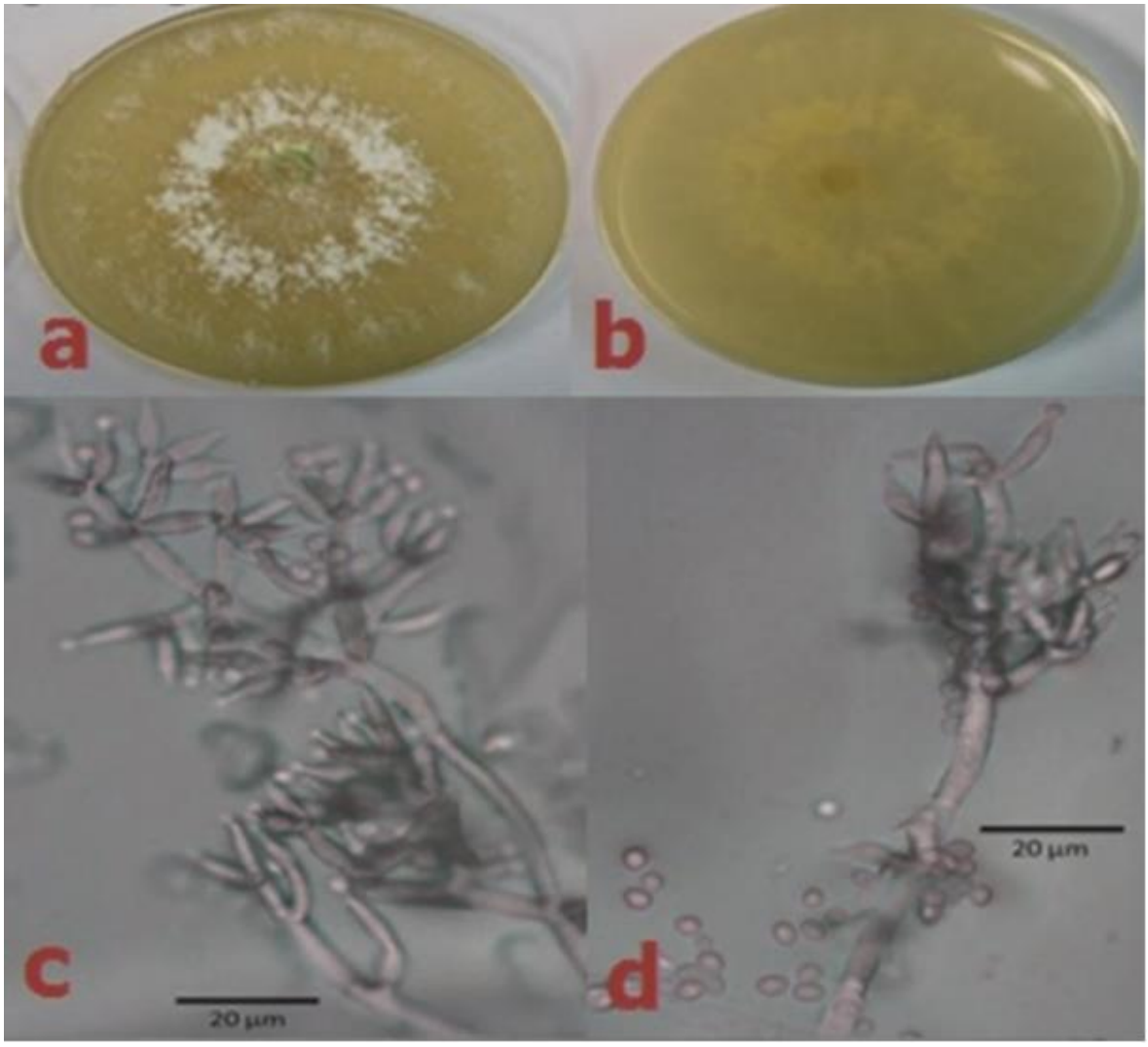
Các enzyme ngoại bào do *T. harzianum* tiết ra như: chitinase, cellulase, pectin, glucanse,… đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại các tác nhân gây bệnh.

1.2.2.2 Nấm *Trichoderma viride*

T. viride là một chủng nấm mốc thuộc họ Hypocreaceae (Pers, 1794) rất linh hoạt: gây bệnh cho cây hành tây, là tác nhân kiểm soát sinh học hỗ trợ nông nghiệp. Nó có thể sống nhờ vào các vật liệu hữu cơ đã chết *T. viride* là một loại nấm mốc tạo ra bào tử vô tính, bằng nguyên phân, là một kiểu sinh sản của *Hypocrea rufa* (Jaklitsch và ctg, 2006).

Đặc điểm khuẩn lạc: các sợi nấm màu trắng phát triển tạo thành các vòng tròn đồng tâm trên môi trường PDA sau khi nuôi cấy 4 ngày với nhiệt độ 25˚C. Đôi khi *T. viride* tạo ra mùi dừa đặc trưng sau khi nuôi cấy.

Đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi: sợi nấm thường phân nhánh rộng rãi và có sự sắp xếp tương đối lỏng lẻo, thể bình thường được ghép đơn hoặc 3 đỉnh với nhánh mọc từ các trục chính (Kubicek và Harman, 1998).



Hình 1. 11: Nấm *T.viride* sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA

(a) Khuẩn lạc của *T. viride* trên PDA, (b) Mặt dưới khuẩn lạc *T. viride, (c) (d) Bào tử và thể bình của* T. viride dưới kính hiển vi độ phóng đại 400X.

(Nguồn: Siddiquee, 2014)

Cũng như các loại nấm *Trichoderma* sp. Khác, *T. viride* cũng có khả năng tiết ra các enzyme có ích trong các quá trình phân giả và sinh tổng hợp các hợp chất trong đất. Trong số các loại enzyme *T. viride* tạo ra bao gồm cellulase và chitinase có khả năng phân giải cellulose và chitin. *T. viride* trở nên hữu ích nhờ hoạt tính diệt nấm như một biện pháp kiểm soát sinh học chống lại nấm gây bệnh thực vật. Nó đã được chứng mình là có khả năng kháng lại các mầm bệnh như *Rhizoctonia, Pythium* và thậm chí là *Armillaria* (Volk, 2006).

1.3 Tổng quan về tuyến trùng nốt sưng

1.3.1 Vị trí phân loại tuyến trùng nốt sưng

Tuyến trùng nốt sưng là loại sinh vật ký sinh thực vật thuộc ngành giun tròn, là sinh vật không xương sống thường gây hại ở bộ rễ của hầu hết các loại cây trồng cạn như: cây ăn quả, rau màu, cà phê, hồ tiêu,… Chúng có kích thước rất nhỏ, không thể quan sát bằng mắt thường và thường gây hại bằng cách xâm nhập vào các bộ phận sinh dưỡng của cây như rễ, thân, lá, hoa và quả để gây cản trở sinh trưởng của cây trồng. Vị trí phân loại của tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)*: Giới: Animalia (Linnaeus, 1758)

Ngành: Nematoda (Potts, 1932)

Lớp: Chromadorea (Inglis, 1983)

Phân lớp: Chromadoria (Pearse, 1942)

Bộ: Rhabditida (Chitwood, 1933)

Phân bộ: Tylenchida (Thorne, 1949)

Họ: Meloidogynidae (Skarbilovich, 1959)

Phân họ: Meloidogynae (Skarbilovich, 1959)

Giống: Meloidogyne (Goldi, 1889)

Loài: *Meloidogyne* (Goldi, 1889)

1.3.2. Một số loài gây hại phổ biến

Hiện nay đã thống kê được khoảng 90 loài tuyến trùng ký sinh gây hại thực vật thuộc chi này, trong đó nhiều loài gây hại nghiêm trọng làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng (Perry và ctg, 2009). Bốn loài gây hại chính trên toàn cầu bao gồm: *M. javanica, M. incognita, M. arenaria* và *M. hapla.*

M. incognita: là loại phổ biến nhất. Chúng gây nên hiện tượng stress nước và dinh dưỡng khiến cây kém phát triển, còi cọc, vàng lá và héo. Ở Việt Nam, loài này gây hại phổ biến ở cây cà phê, hồ tiêu, họ Cà, họ Đậu.

M. javanica: là loại tuyến trùng gây hại phổ biến thứ hai, gây hại mạnh mẽ trên cây trồng ở vùng nhiệt đới. Chúng gây hại trên hầu hết các loại cây trồng có vai trò kinh tế quan trọng như chè, nho, rau màu, cây ăn quả,… *M. javanica* được coi là loại dịch hại nông nghiệp vì nó vô cùng đa dạng gây hại rất nặng nề (Alford, 2012).

M. arenaria: đây là loài phổ biến thứ 3 trong nhóm tuyến trùng này. Loài này còn có một tên gọi là "tuyến trùng nốt rễ cây lạc" do chúng chuyên gây hại trên cây họ Đậu. Ngoài ra, *M. arenaria* còn được ghi nhận trên cây hồ tiêu tại Srilanka (Luc và ctg, 2005).

M. hapla: đây là loài phổ biến thứ 4. Đây là loài tuyến trùng gây hại chủ yếu ở các vùng ôn đới. Trên các loại rau màu đã ghi nhận được tỷ lệ nhiễm *M. hapla* chiếm 8%, bằng với tỷ lệ nhiễm của *M. arenaria.* Tuy nhiên chúng ít gây hại trên các loại cây ngũ cốc.

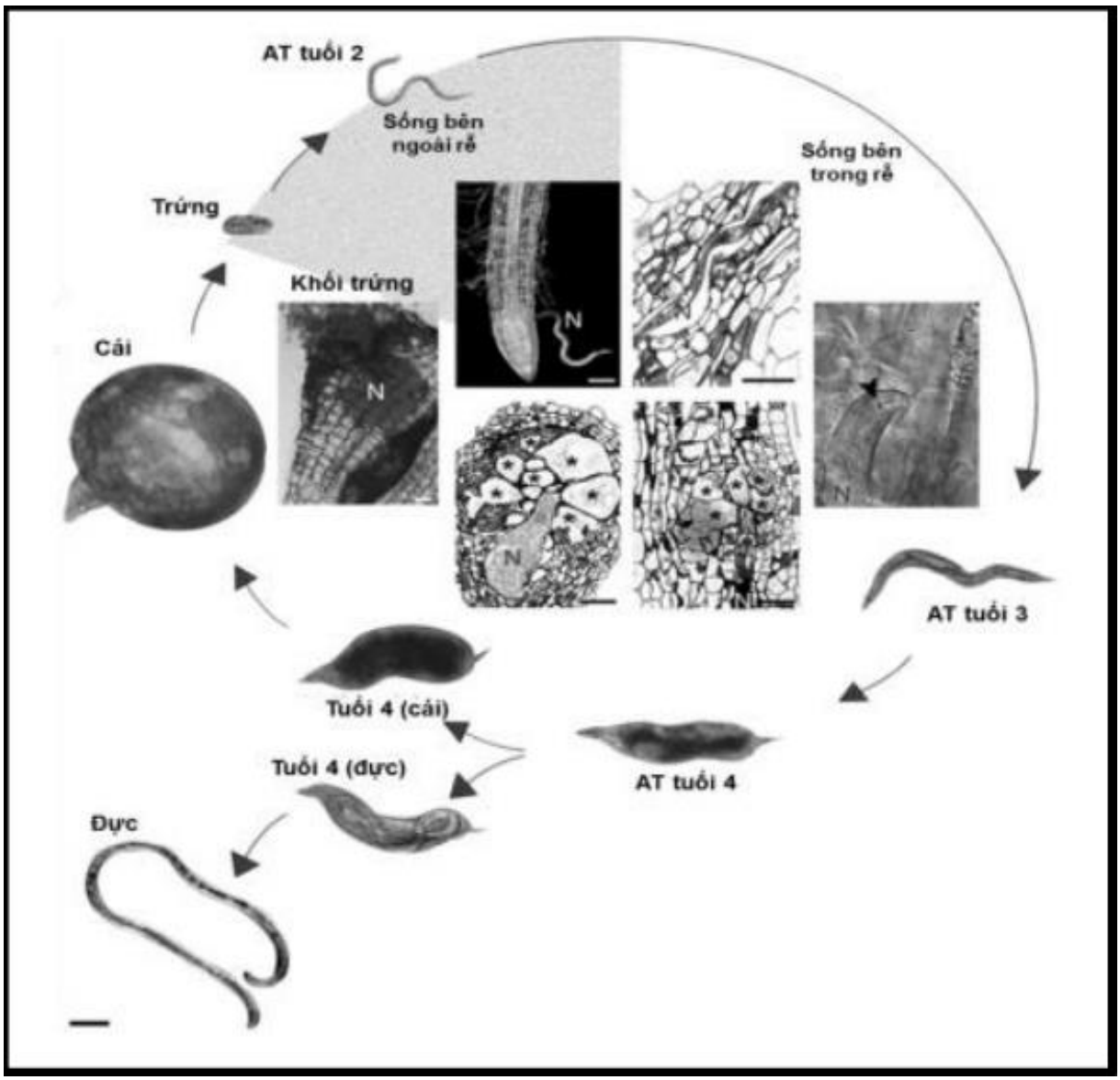
1.3.3 Đặc điểm sinh học và sinh thái tuyến trùng nốt sưng

Con cái trưởng thành hình quả lê hoặc hình cầu, dị hình sinh dục nằm sâu trong mô rễ. Đường kính cơ thể từ 0,5 – 0,7 mm với cổ cân đối, vulva (ở phía sau gần hậu môn). Vỏ cutin màu trắng nhạt, mỏng và phân đốt. Kim hút ngắn, kitin hóa trung bình, hai nhánh sinh dục được cuộn gấp lại. Trứng được đẻ bên ngoài cơ thể vào khối gelatin. Con đực hình giun sống tự do trong đất, dài 1 – 2mm, cơ thể thường ở dạng xoắn 180^0 quanh trục cơ thể khi cố định trong dung dịch nóng. Ấu trùng tuổi 2 (J2) có dạng cân đối hình giun, dài khoảng 0,4 – 0,5mm. Kim hút và vùng đầu kitin hóa yếu, đuôi hình chóp (Nguyễn Vũ Thanh, 2002).

Vòng đời của tuyến trùng nốt sưng trải qua các giai đoạn sau: trứng được con cái đẻ ra ngoài giữ lại trong bọc gelatin nằm bên ngoài cơ thể con cái và sát bề mặt nốt sưng, sau đó phôi phát triển và trứng nở thành ấu trùng tuổi 1 bên trong trứng (J1), khi J1 tiến hành lột xác lần thứ nhất trở thành ấu trùng cảm nhiễm tuổi 2 (J2).

Trong 24 giờ đầu sau khi xâm nhập, J2 ăn các tế bào khổng lồ và hạn chế hoạt động. Tiếp theo con tuổi 2 tiếp tục lột xác ăn trở thành ấu trùng tuổi 3 (J3) rồi đến tuổi 4 (J4) và cuối cùng trở thành tuyến trùng trưởng thành mà không cần tiêu thụ thức ăn. Trong 5 giai đoạn kể trên, J2 và con cái trưởng thành thường dùng để xác định loài (Nguyễn Vũ Thanh, 2002; Nguyễn Ngọc Châu, 2003). Khi trưởng thành,

con cái tiếp tục quá trình tiêu hóa thức ăn và phát triển cơ quan sinh sản. Con cái trưởng thành có tuổi thọ kéo dài đến 3 tháng và trong suốt quãng đời của mình chúng có thể sinh ra hàng trăm quả trứng. Vòng đời của tuyến trùng phụ thuộc vào nhiệt độ, nhiệt độ tối ưu cho chúng phát triển là khoảng 29˚C và có thể phát triển trong ngưỡng nhiệt độ 13 – 34˚C.



Hình 1.12: Vòng đời của tuyến trùng

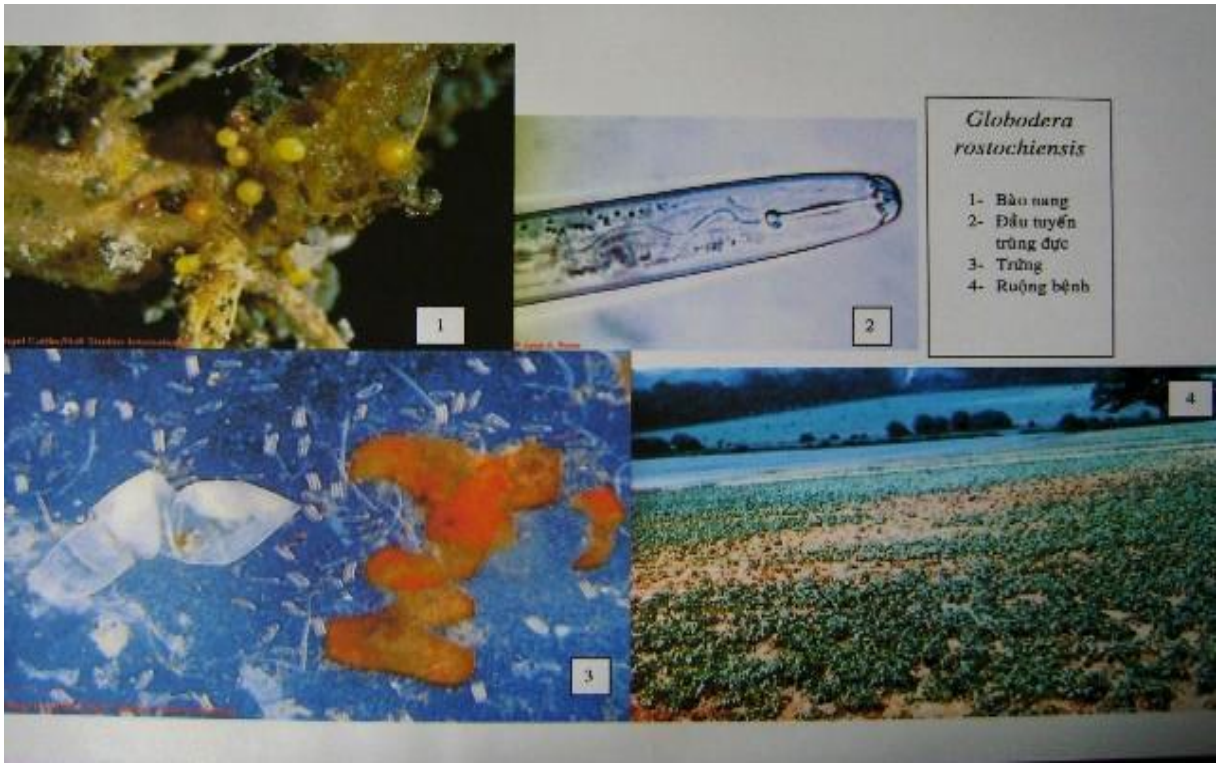
(*Nguồn: Manjunatha và ctv 2017*)

1.3.4 Tập quán sinh sống và gây hại cho cây trồng

J2 sau khi hình thành tiến hành xâm nhiễm vào bên cạnh nốt sưng hoặc tấn công vào mô phân sinh đỉnh của rễ mới tạo thành nốt sưng mới và bắt đầu quá trình lấy dinh dưỡng của chúng. Quá trình này bắt đầu khi phần đầu của tuyến trùng xâm nhập

vào tế bào nhu mô rễ và tiết ra enzyme tiêu hóa dẫn đến hình thành quá trình sinh lý, sinh hóa tạo nhóm tế bào khổng lồ chứa nhiều nhân. Đồng thời, các mô rễ xung quanh nơi tuyến trùng xâm nhập vào cũng phình to ra tạo thành nốt sưng. Khi bị tuyến trùng xâm nhiễm, cây bị ức chế sinh trưởng trở nên còi cọc, vàng úa, chết héo, rễ thối hỏng và trở thành trung gian hỗ trợ cho các loại nấm xâm nhiễm vào vết thương do tuyến trùng gây hại cho cây trồng.

Ấu trùng tuổi 2 trong trứng bên cạnh việc xâm nhiễm vào rễ có con được giải phóng vào đất, di chuyển, sinh trưởng và phát triển khi gặp điều kiện thuận lợi. Sau đó, chúng tiếp tục sinh sản, duy trì quần thể trong đất và gây hại cho cây trồng ở những mùa vụ sau trên ruộng.



Hình 1.13: Tuyến trùng ký sinh gây hại trên khoai tây

(Nguồn: Chi cục trồng trọt và BVTV tỉnh Lâm Đồng, 2013)



Hình 1.14: Tuyến trùng gây hại trên cà rốt

(Nguồn: Minkowski, 2003)

1.3.5. Biện pháp phòng trừ tuyến trùng

❖ **Biện pháp ngăn ngừa**

Ngăn ngừa là giải pháp ưu tiên sử dụng khi cây vừa có triệu chứng bệnh để hạn chế tác hại của tuyến trùng đến năng suất cây trồng ở mức thấp nhất, vì đây là giải pháp đơn giản nhất. Luân canh, xen canh các loại cây trồng miễn nhiễm với tuyến trùng hoặc ít chịu ảnh hưởng của tuyến trùng. Sử dụng giống tốt, sạch bệnh, có khả năng kháng bệnh. Trồng cỏ mục tiêu để phân tán lực lượng của tuyến trùng. Khi cỏ cao tiến hành cắt bớt phần ngọn bỏ tại vườn để giữ ẩm cho đất vào mùa khô và tạo độ tơi xốp cho đất.

❖ **Biện pháp canh tác:**

Tùy thuộc vào loại cây trồng và tuyến trùng ký sinh mà lựa chọn phương pháp canh tác phù hợp như: tưới ủ, làm ngập nước, làm khô ruộng, tăng cường bón phân hữu cơ hạn chế bón phân hóa học, gieo trồng sớm,….

Làm ngập nước: dẫn đến nồng độ oxy trong nước giảm và carbonat tăng do lượng vi sinh vật yếm khí giảm. Việc này gây ra các phản ứng sinh hóa bên trong lòng đất: phản ứng nitrat hóa, phản ứng tích lũy amoniac, giảm lượng sắt, mangan và

sulphate, tăng các loại acid hữu cơ, methane hydrosulphite (Nguyễn Ngọc Châu, 2003).

Làm khô ruộng: hầu hết, các loài tuyến trùng ký sinh đều có đặc tính mẫn cảm với độ ẩm môi trường, khi môi trường sống của chúng đang trong điều kiện lý tưởng lại chuyển sang khô đột ngột, độ ẩm tương đối thấp hay áp suất thẩm thấu thì chúng sẽ nhanh chóng chết trong vòng vài phút.

Phân hữu cơ: trong quá trình phân hủy chất hữu cơ, phản ứng này giải phóng các chất có thể gây độc cho tuyến trùng ký sinh như: acid acetic, propionic, butyric,…. Các chất độc này có thể tồn tại trong đất trong vài tuần đóng vai trò giết chết tuyến trùng ký sinh thực vật mà có thể không gây hại cho nhóm tuyến trùng sống tự do trong đất.

❖ **Biện pháp vật lý**

Tuyến trùng ký sinh thực vật đòi hỏi điều kiện nhiệt độ và môi trường sống nhất định để chúng phát triển, vì vậy có thể dựa vào yếu tố này để sử dụng các biện pháp như xử lý khói, xông đất (hơi nước nóng), phơi nắng, đốt đồng ruộng sau khi thu hoạch để nhiệt độ môi trường sống của chúng đạt đến 60˚C là có thể tiêu diệt tuyến trùng ký sinh thực vật.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm *Trichoderma*, xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trong đất vườn tại địa bàn tỉnh Lâm Đồng.

2.1.2 Vật liệu

- Hóa chất: KNO_3, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, NaCl, $FeSO_4.7H_2O$, tinh bột, Glucose, Rose bengal, Streptomycin sulfate, Methyl blue.
- Agar
- Cồn 96˚, cồn 70˚
- Nước cất
- Cám gạo
- Xơ dừa
- Thiết bị hỗ trợ:

● Ống đong, cốc đong, bình tam giác, đĩa petri, ống nghiệm, pipet, quả bóp, micropipet

● Que cấy, que gạt, đèn cồn

● Tủ cấy, tủ sấy, tủ ấm

● Kính hiển vi, cân phân tích

2.2 Nội dung nghiên cứu

- Nuôi cấy và phân lập một số chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng tuyến trùng trong đất trồng cây tại Lâm Đồng.
- Đánh giá khả năng phòng trừ tuyến trùng nốt sưng *(Meloidogyne* sp.*)* của hai chủng vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy cơ bản

Môi trường PDA:

Khoai tây	200g
Dextrose	20g
Agar	15g
Nước cất	1000ml
pH	5,6

Môi trường THSM:

$MgSO_4.7H_2O$	0,2g
K_2HPO_4	0,9g
NH_4NO_3	1,0g
KCl	0,15g
Rose bengal	0,15g
Glucose	3,0g
Agar	20g
Streptomycin	9,0ml
Nước cất	950ml

Môi trường được thanh trùng ở 121˚C trong 20 phút.

Môi trường xạ khuẩn (Gause 1):

KNO_3	1,0g
K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5g
NaCl	0,5g
$FeSO_4.7H_2O$	0,01g

Nước cất	1000ml
Tinh bột	20g
Agar	15g
pH	7,4

Hóa chất được hòa tan đều trong bình cho đủ thể tích 1 lít, dùng máy đo pH để điều chỉnh pH môi trường về ngưỡng thích hợp. Dùng dung dịch chuẩn NaOH 0,1M để điều chỉnh pH môi trường nếu pH dung dịch nuôi cấy thấp hơn ngưỡng pH môi trường thích hợp, dùng HCl 0,1N để điều chỉnh pH của môi trường nếu pH môi trường nuôi cấy cao hơn ngưỡng pH thích hợp. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật sau đó được thanh trùng ở 121˚C trong 15 phút và được phân phối vào các đĩa petri đã được khử trùng.

Môi trường Getchinson:

K_2HPO_4	0,1g
$CaCl_2$	0,1g
$MgSO_4$	0,3g
NaCl	1,0g
$FeCl_3.6H_2O$	0,01g
$NaNO_3$	2,5g
Nước cất	1000ml
pH	7,0 – 7,3

Hòa tan các chất lần lượt vào nước cất và định mức 1000ml. Môi trường không cần thanh trùng.

2.3.2 Thu thập, nhân nuôi và tuyển chọn mẫu vi sinh vật bản địa

Thu thập mẫu đất của các vùng trồng cà phê chính trên Lâm Đồng. Lựa chọn vườn đất trồng cà phê bị tuyến trùng, lấy đất xung quanh vùng rễ, mỗi gốc cà phê lấy

4 điểm ở 4 hướng khác nhau và cho vào túi nilon sạch, ghi ngày tháng, nơi lấy mẫu và người lấy mẫu. Mẫu đất được buộc kín, mang về và cất trữ trong tủ lạnh.

Sử dụng phương pháp pha loãng để pha loãng dung dịch nhân nuôi. Cân 10g mẫu đất đã qua xử lý cho vào 90ml nước cất khử trùng, dùng vortex hòa tan đất. Lấy 1ml dung dịch chuyển sang ống nghiệm có 9ml nước cất vô trùng và tiếp tục pha loãng tới nồng độ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}. Hút 0,1ml dịch pha loãng với nồng độ khác nhau (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường phân lập khác nhau. Với 3 lần lặp cho mỗi nồng độ, mỗi lần lặp sử dụng 3 đĩa. Dùng que gạt tràn đều dịch trên bề mặt thạch. Đặt đĩa thạch trong tủ ấm ở nhiệt độ 26˚C, sau 48 giờ thực hiện tính mật độ vi sinh vật, sau 96 – 168 giờ quan sát và tiến hành phân lập.

Môi trường nuôi cấy nấm là môi trường PDA. Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn là môi trường Gause I.

Phân lập xạ khuẩn bằng cách cấy dịch huyền phù đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau vào môi trường Gause I. Quan sát khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy, nhận diện khuẩn lạc xạ khuẩn, sau 96 – 168 giờ làm tiêu bản phòng ẩm và nhuộm bằng xanh metylen, quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi về các đặc điểm: cấu trúc hệ sợi xạ khuẩn, cấu trúc cuống sinh bào tử, hình dạng và cách sắp xếp bào tử. Tiến hành tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng kiểm soát tuyến trùng gây hại cây trồng.

Làm thuần mẫu bằng phương pháp cấy đỉnh sinh trưởng nấm. Đổ môi trường PDA vào đĩa petri. Cấy chuyền mẫu nấm từ đĩa từ đĩa phân lập sang đĩa sử dụng môi trường thích hợp. Đặt đĩa dưới kính lúp soi nổi và điều chỉnh tiêu điểm sợi nấm ở rìa tản nấm. Điều chỉnh nguồn sáng nhằm đạt độ tương phản tốt giữa môi trường và sợi nấm. Dùng que cấy dẹp đã khử trùng cấy mẫu thạch chứa đỉnh sinh trưởng của sợi nấm sang một đĩa môi trường thích hợp. Sử dụng phương pháp giữ giống trên thạch nghiêng để cấy chuyền và giữ giống trong điều kiện 3-5^{o}C. Quan sát hình thái và định danh sợi nấm. Cấy sợi nấm vào ống thạch nghiêng. Sau 72 giờ cho 5ml nước cất vô trùng vào ống. Dùng que cấy vô trùng gạt đều bào tử nấm sợi trong ống giống, sau đó lăn nhẹ để tạo thành dịch huyền phù. Dùng que cấy vô trùng lấy dịch huyền phù rồi cấy một điểm vào đĩa petri có chứa môi trường PDA. Quan sát từng ngày khuẩn lạc về các đặc điểm: tốc độ phát triển, màu sắc và sự biến đổi màu sắc của khuẩn lạc. Hình dạng khuẩn lạc, mép khuẩn lạc và sợi nấm, giọt tiết, sắc tố vào môi trường, quan

sát vi thể bằng cách làm tiêu bản phòng ẩm, sau 72 giờ lấy tiêu bản phòng ẩm ra và nhuộm bằng xanh metylen, quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi về các đặc điểm: cấu trúc hệ sợi nấm, cấu trúc cuống sinh bào tử, thể bình, hình dạng và cách sắp xếp bào tử. Tiến hành tuyển chọn các chủng nấm có khả năng kiểm soát tuyến trùng đã được biết và các chủng nấm thuộc nấm hoại sinh và bán hoại sinh hay nấm đối kháng, những nấm này có khả năng sinh độc hoặc bẫy để bắt tuyến trùng và không gây hại cho cây trồng.

2.3.3 Nhân sinh khối và thử nghiệm

Sau khi tuyển chọn được giống vi sinh vật bản địa có hiệu lực phòng trừ tuyến trùng, tiến hành nhân sinh khối và thử nghiệm trong phòng thí nghiệm.

Nhân sinh khối: trên môi trường lỏng Getchinson.

2.3.4 Chuẩn bị mẫu cây bị tuyến trùng

Phương pháp thu mẫu cây nhiễm tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp.

Tiến hành thu thập mẫu rễ cây cà chua có triệu chứng điển hình như: cây còi cọc, kém phát triển, khi nhổ lên rễ có xuất hiện các nốt sưng. Các mẫu cây được cho vào túi nilon, dán nhãn và mang về phòng thí nghiệm.

Phương pháp tách lọc tuyến trùng từ rễ

Tách chiết và đếm tuyến trùng trong rễ bằng phương pháp Baermann cải biên (*Modification of the Baermann Funnel technology*) (Hooper và ctg 2005): Chuẩn bị khay và lưới lọc có đường kính mắt lưới 2mm. Đặt lớp giấy lọc lên trên mặt lưới, cân 2g rễ, cắt ngắn khoảng 1-2cm rải đều trên lớp giấy mềm. Đổ nước theo mép khay sao cho nước vừa ướt rễ. Sau 48 giờ đổ nước dưới khay vào ống nghiệm. Để yên trong vòng 2 giờ cho tuyến trùng lắng xuống đáy, sau đó sử dụng pipet hút phần nước phía trên, chừa lượng nước còn lại khoảng 3ml. Lượng nước còn lại trong ống nghiệm được cho vào đĩa đếm tuyến trùng chuyên dụng và tuyến trùng được đếm dưới kính lúp soi nổi có độ phóng đại tối đa 40 lần.

2.3.5 Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ tuyến trùng của các chủng vi sinh vật bản địa

Đánh giá khả năng kiểm soát tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. bằng các chủng vi sinh vật bản địa thu được.

Thí nghiệm bao gồm đối chứng, nấm *T. harzianum*, xạ khuẩn *(Streptomyces* sp.*)* mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Theo dõi tỷ lệ chết của tuyến trùng trong phòng thí nghiệm ở điều kiện phòng sau 24, 48, 72, 96 và 120 giờ sau xử lý.

Thử nghiệm: Chuẩn bị các đĩa có chứa 21 tuyến trùng ký sinh thực vật. Cho vào mỗi đĩa 10ml dung dịch huyền phù có chứa vi sinh vật bản địa có khả năng phòng trừ tuyến trùng. Thí nghiệm bao gồm đối chứng, nấm *T. harzianum*, xạ khuẩn *(Streptomyces* sp.*)* mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Đếm tỉ lệ chết của tuyến trùng sau 24, 48, 72, 96, 120 và 144 giờ.

2.3.6 Chỉ tiêu theo dõi

Định lượng vi sinh vật

Đối với mẫu đất: Các đĩa thạch sau nuôi cấy trong tủ ấm ở 26˚C trong 48 giờ mang ra tiến hành đếm khuẩn lạc và tính số lượng tế bào trong 1ml mẫu ban đầu.

Đối với mẫu lên men: Mật độ tế bào vi sinh vật trong mẫu ban đầu tính từ số liệu của độ pha loãng theo công thức sau:

$$M_i \text{ (CFU/g)} = A_i \times D_i / V$$

Trong đó: A_i: số khuẩn lạc trung bình/ đĩa

D_i: độ pha loãng

V: dung tích huyền phù tế bào cho vào mỗi đĩa (ml)

Mật độ tế bào vi sinh vật tổng số trong 1ml dịch cấy:

$$N_1 \text{ (CFU/ml)} = \frac{\sum N}{V\,(n1+0{,}1\times n2)d}$$

Trong đó: $\sum N$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn

V: Thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa (ml)

n1: Số đĩa của độ pha loãng thứ nhất

n2: Số đĩa của độ pha loãng thứ hai

d: Hệ số pha loãng của độ pha loãng thứ nhất

Tổng lượng vi sinh vật trong dịch cấy sử dụng thử hiệu lực phòng trừ tuyến trùng:

N_{10} (CFU/10ml) = $N_1 \times 10$

Đánh giá hiệu lực của vi sinh vật bản địa trong phòng trừ tuyến trùng

Theo dõi tỉ lệ tuyến trùng nốt sưng sau 24, 48, 72, 96, 120 giờ xử lý; tính tỷ lệ chết của tuyến trùng nốt sưng sau 24, 48, 72, 96, 120 giờ xử lý bằng công thức:

Thay băng công thức tỉ lệ chết

$$\text{Tỉ lệ chết (\%)} = \left(1 - \frac{(T_a - C_b)}{T_b - C_a}\right) \times 100$$

Trong đó:

T_a: Mật độ tuyến trùng sau khi tiến hành nghiệm thức xử lý bằng vi sinh vật.

T_b: Mật độ tuyến trùng trước khi tiến hành nghiệm thức xử lý bằng vi sinh vật.

C_a: Mật độ tuyến trùng sau khi tiến hành nghiệm thức đối chứng.

C_b: Mật độ tuyến trùng trước khi tiến hành nghiệm thức đối chứng.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

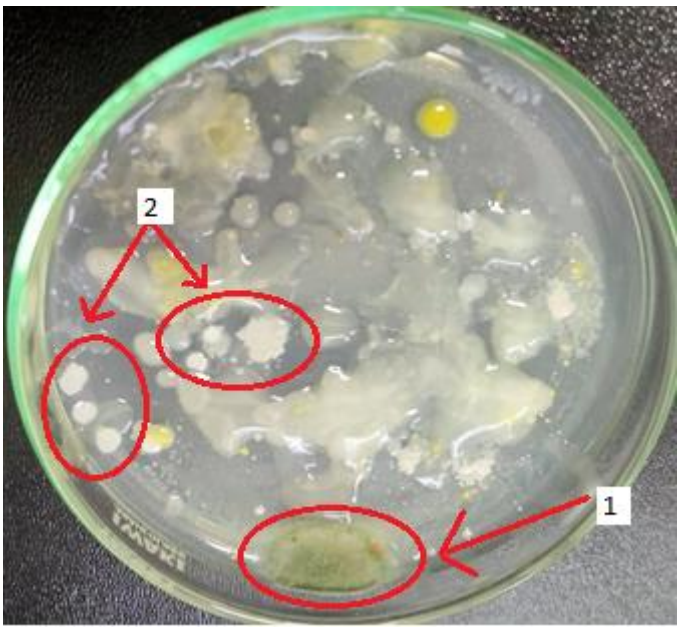
Đánh giá khả năng kiểm soát tuyến trùng của các chủng vi sinh vật bản địa thu được. Thu thập và xử lý số liệu bằng thống kê ANOVA bằng phần mềm MSTATC.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập chủng vi sinh vật bản địa có tiềm năng phòng trừ tuyến trùng tại Lâm Đồng.

3.1.1 Phân lập các chủng vi sinh vật trong đất

Sau 5 ngày nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường PDA, các đĩa petri sử dụng mẫu đất cà phê tại Lâm Đồng bắt đầu xuất hiện khuẩn lạc của các vi sinh vật:



Hình 3.1: Nấm và vi khuẩn trên môi trường Gause 1

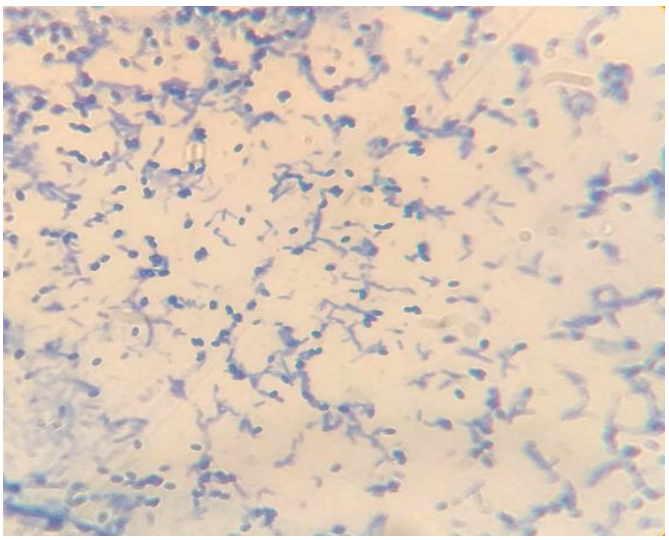
(1) Nấm (2) Xạ khuẩn

Trên đĩa thạch, tiến hành xác định đặc điểm khuẩn lạc của chủng nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn để nhận diện ban đầu, từ đó có phán đoán, thực hiện làm tiêu bản và quan sát mẫu chính xác hơn. Cụ thể, đặc điểm của khuẩn lạc được mô tả chi tiết ở bảng 3.1.

Bảng 3.1: Đặc điểm khuẩn lạc của nấm và xạ khuẩn từ mẫu đất.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	**Đặc điểm khuẩn lạc**	
	Nấm	Xạ khuẩn
48	Chưa xuất hiện	Khuẩn lạc bắt đầu hình thành với những chấm nhỏ li ti, màu trắng trên bề mặt môi trường.
96	Những tản nấm nhỏ màu trắng, vàng dạng sợi mịn bắt đầu xuất hiện. Đường kính 1 – 2cm.	Khuẩn lạc bắt đầu lan rộng, tạo những mảng lớn màu trắng sữa không theo hình dạng nhất định.
168	Những tản nấm màu trắng chuyển sang màu xanh lục, những tản nấm màu vàng chuyển sang màu xanh lục. Đường kính 4 – 5cm.	Khuẩn lạc lan rộng hơn trên môi trường thạch có xuất hiện các sợi xung quanh vùng khuẩn lạc ban đầu như sợi nấm, màu trắng sữa.

Sau khi tiến hành làm tiêu bản phòng ẩm từ các vi sinh vật trên được kết quả như sau:



Hình 3.2: Hệ sợi của chủng xạ khuẩn dưới kính hiển vi

Quan sát tiêu bản được thực hiện từ khuẩn lạc có đặc điểm của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. dưới kính hiển vi cho thấy đặc điểm của chủng vi sinh vật như sau: Hình thái có cấu trúc dạng sợi, bào tử hình trụ gắn liền có xu hướng phát triển thành chuỗi, bước đầu nhận thấy chủng vi khuẩn này có đặc điểm hình thái giống với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. đem cấy thuần để định danh.



Hình 3.3: Hệ sợi của nấm dưới kính hiển vi

Kết quả thực hiện tiêu bản từ khuẩn ty của khuẩn lạc nấm, quan sát hệ sợi có đặc điểm như hình 3.3. Đặc điểm của hệ sợi là có cấu trúc phân nhánh, khuẩn ty không màu và cuống sinh bào tử tạo với trục chính 1 góc 90˚, bước đầu nhận thấy rằng đây là nấm *Trichoderma* sp. đem cấy thuần để định danh.

3.1.2. Cấy thuần và định danh chủng vi sinh vật

Xạ khuẩn Streptomyces sp.

Sau khi phân lập và tuyển chọn được chủng nấm theo mô tả sơ bộ và đặc điểm hình thái giống mô tả về chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. nghi ngờ có khả năng kiểm

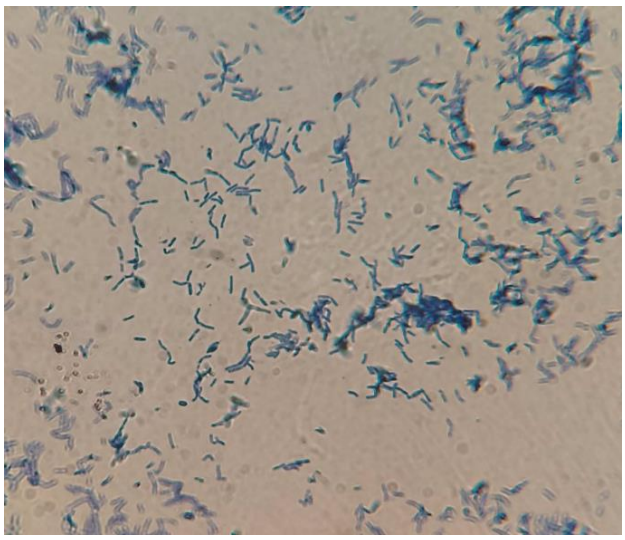
soát tuyến trùng. Tiếp tục cấy chuyền, nhân nuôi trên môi trường Gause - 1 để quan sát đặc điểm sinh học.

1. Khi nuôi cấy trên môi trường Gause - 1: Sau 3 ngày, xuất hiện hệ sợi khí sinh màu trắng. Sau 5 ngày hệ sợi cơ chất bắt đầu phát triển. Sau 7 ngày hệ sợi khí sinh có màu vàng trắng nhưng hệ sợi cơ chất chuyển sang màu vàng nâu.



Hình 3.4: Xạ khuẩn Streptomyces trên môi trường Gause 1

2. Khi quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100X, tế bào xạ khuẩn có dạng sợi như nấm, bào tử tạo chuỗi dài.



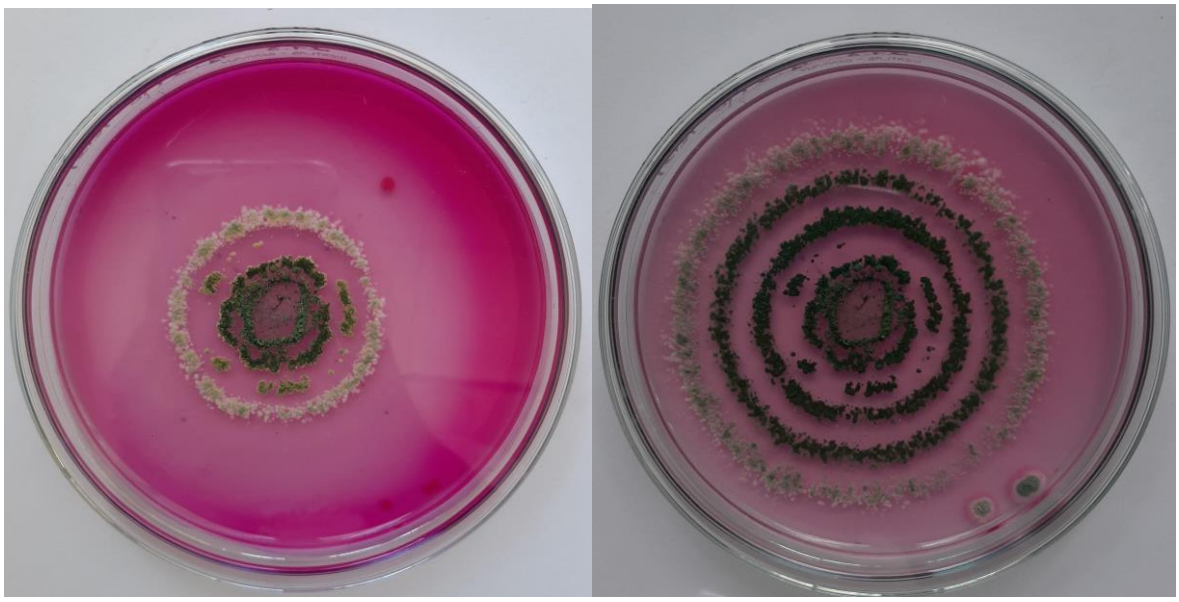
Hình 3.5: Sợi nấm và bào tử xạ khuẩn Streptomyces dưới kính hiển vi

So sánh đặc điểm sinh học, hình thái của hệ sợi và bào tử cho thấy đó là chủng *Streptomyces* sp. theo khóa phân loại của Waksman và Henrici (1943).

Nấm *T. harzianum*

Sau khi phân lập và tuyển chọn được chủng nấm theo mô tả sơ bộ và đặc điểm hình thái giống mô tả về chủng *T. harzianum* nghi ngờ có khả năng kiểm soát tuyến trùng. Tiếp tục cấy chuyền, nhân nuôi trên môi trường PDA để quan sát đặc điểm sinh học.

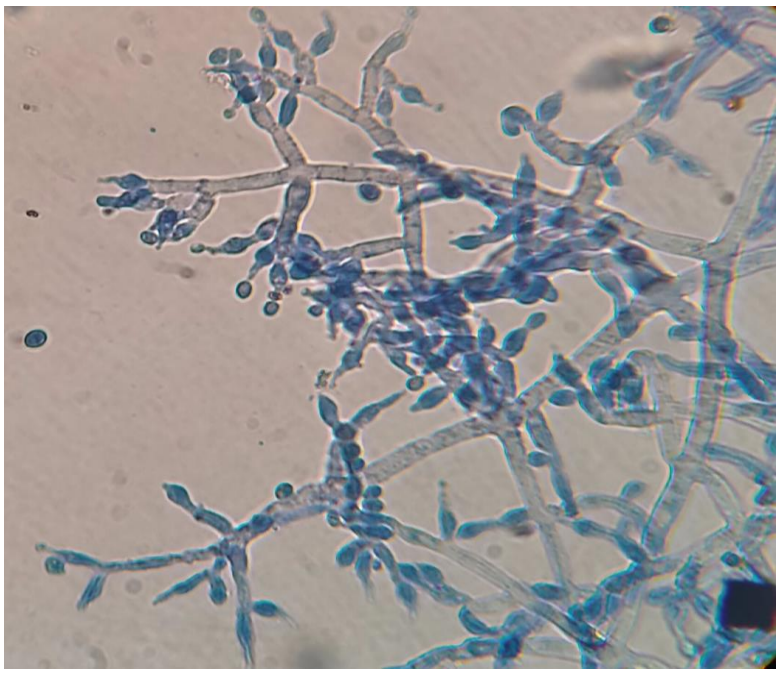
1. Nuôi cấy trên môi trường đặc hiệu (THSM): Trên môi trường đặc hiệu, *T. harzianum* sau 3 ngày phát triển các sợi nấm màu vàng, sau 5 ngày các sợi nấm phát triển tạo thành 2 -3 vòng tròn đồng tâm mỗi vòng tròn có sợi nấm với màu sắc từ xanh lục đến vàng theo thứ tự từ các vòng bên trong ra bên ngoài. Sau 7 ngày, số lượng vòng tròn đồng tâm nấm tạo thành tăng lên khoảng 5 - 7 vòng, màu sắc khuẩn lạc lần lượt là màu xanh đến màu vàng từ vòng trong ra đến các vòng bên ngoài.



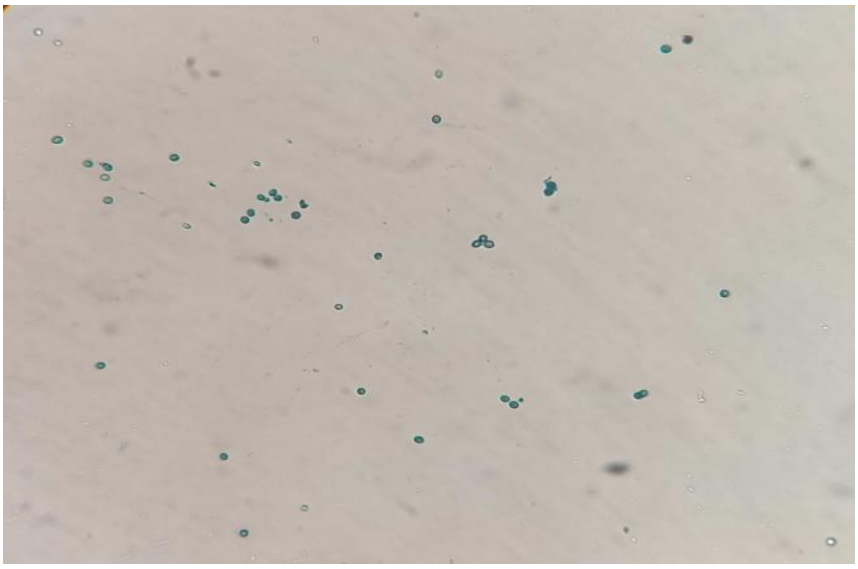
Hình 3.6: Nấm *T. harzianum* trên môi trường THSM

2. *T. harzianum* nuôi cấy trong môi trường PDA với điều kiện nhiệt độ 26 – 30˚C sau 5 ngày có khuẩn lạc tạo thành vòng tròn đồng tâm. Trong 3 ngày đầu sợi nấm mịn, màu trắng và thưa thớt. Sau đó các sợi nấm phát triển tạo khuẩn lạc trưởng thành màu xanh lục. Trong quá trình phát triển, môi trường có sự biến đổi màu sắc từ màu vàng đến màu vàng nâu phát triển theo quá trình phát triển của khuẩn lạc.

3. Quan sát dưới kính hiển vi quang học: khuẩn ty của nấm *T. harzianum* không màu, cuống sinh bào tử mọc thành cụm và phân nhánh ở gốc. Tế bào sinh bào tử dạng thể bình, mọc sát với cuống sinh bào tử một góc 90˚, đối xứng hai bên.



Hình 3.7: Sợi nấm, cuống sinh bào tử của nấm *T. harzianum*



Hình 3.8: Bào tử của nấm *T. harzianum*

So sánh đặc điểm sinh học, hình thái của hệ sợi cho thấy đó là chủng Trichoderma harzianum theo khóa phân loại của Rifai (1969).

3.2 Đặc điểm sinh học, sinh thái của *T. harzianum và Streptomyces* sp.

3.2.1 Đặc điểm sinh học của xạ khuẩn Streptomyces sp.

Nhân nuôi xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trên môi trường PDA quan sát đặc điểm hệ sợi, khuẩn lạc của nấm, cho thấy có sự phát triển của xạ khuẩn *Streptomyces* sp.. Thể hiện ở bảng sau:

Bảng 3.2: Sự phát triển của xạ khuẩn Streptomyces sp. trên môi trường Gause 1.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	**Màu sắc môi trường nuôi cấy**	**Đặc điểm phát triển của xạ khuẩn *Streptomyces* sp. trên môi trường Gause 1.**
24	Trắng trong	Chưa thấy sự sinh trưởng và phát triển của xạ khuẩn.
48	Trắng trong	Những mảng khuẩn lạc hình tròn, màu trắng phát triển rời rạc trên bề mặt môi trường.
72	Trắng đục	Các mảng khuẩn lạc phát triển lan rộng ra nối với nhau tạo thành chuỗi không liền mạch hoàn toàn, có dạng sợi nấm cơ chất màu trắng.
96	Trắng đục	Khuẩn lạc phát triển rộng và dày hơn, màu trắng tạo thành chuỗi liền mạch, hệ sợi cơ chất phát triển tỏa dần ra xung quanh chuỗi này.
120	Trắng trong	Chuỗi khuẩn lạc liền mạch nhau cả sợi khí sinh và sợi cơ chất đều chuyển từ màu trắng sang màu vàng nhạt, các sợi phát triển nhiều hơn.

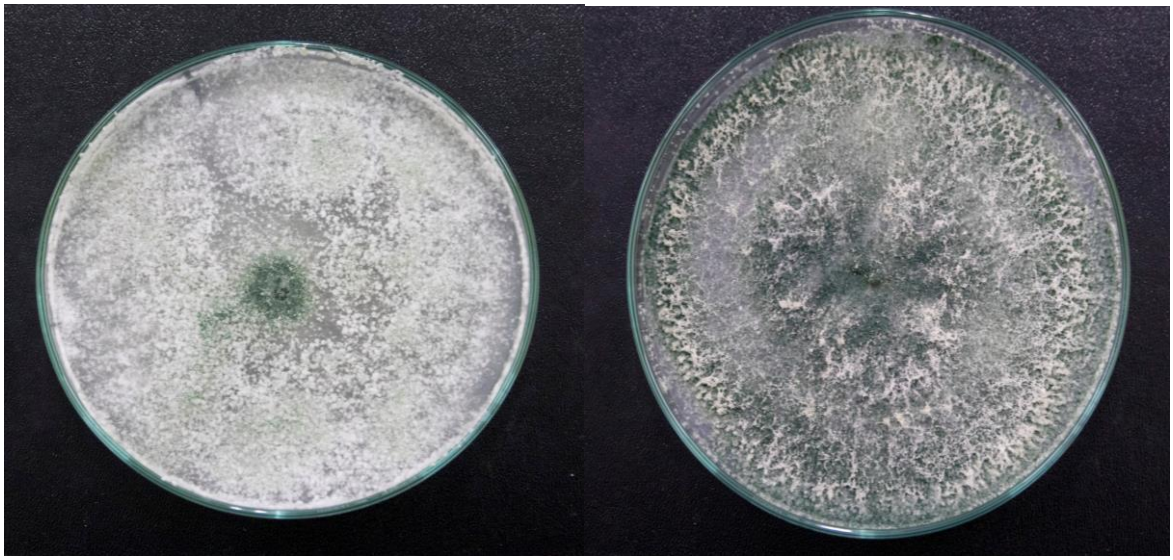
3.2.2 Đặc điểm sinh học của *T. harzianum*

Nhân nuôi *T. harzianum* trên môi trường PDA quan sát đặc điểm hệ sợi, khuẩn lạc của nấm, cho thấy có sự phát triển của *T. harzianum.* Thể hiện ở bảng sau:

Bảng 3.3: Sự phát triển của nấm T. harzianum trên môi trường PDA.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	**Màu sắc môi trường nuôi cấy**	**Đặc điểm phát triển của *T. harzianum* trên môi trường PDA**
24	Vàng nhạt	Có xuất hiện vài sợi nấm màu trắng quanh tản nấm cấy vào ban đầu, tuy nhiên không nhiều. Đường kính 0,5 – 1,3cm.
48	Vàng nhạt	Nhiều sợi nấm màu trắng phát triển quanh tản nấm ban đầu tạo thành vòng tròn đồng tâm. Đường kính 3,4 – 5cm.
72	Vàng đậm	Những sợi nấm màu trắng phát triển nhanh chóng, có xu hướng tiến đến thành đĩa petri với đường kính 7,2 – 8,5cm. Những sợi nấm gần với tâm của đĩa petri chuyển sang màu xanh lục tạo thành 1 vòng tròn với đường kính 1,5 – 2cm.
96	Vàng đậm	Các sợi nấm phát triển phủ kín bề mặt môi trường, vòng tròn có sợi nấm màu xanh phát triển với đường kính 3,5 – 4,2cm. Vòng trong lớn bên ngoài chứa những sợi nấm màu trắng có đường kính 12cm.

120	Vàng nâu	Các sợi nấm phát triển tạo thành các vòng tròn tính từ tâm ra thành đĩa. Vòng tròn đầu tiên có sợi nấm màu xanh lục với đường kính 5,5 - 6cm. Vòng tròn thứ hai có các sợi nấm màu trắng với đường kính từ 5,5 – 6cm đến 7,3 – 8cm. Vòng tròn thứ ba có các sợi nấm màu xanh với đường kính từ 7,3 – 8cm đến 12cm.



Hình 3.9: Nấm *T. harzianum* trên môi trường PDA

3.3 Mật độ vi sinh vật

Sau khi cấy thuần, xác định đặc điểm sinh học, tiến hành lên men trên môi trường Get chinson, xác định được mật độ nấm *T. harzianum* và xạ khuẩn *Streptomyces* sp. như sau:

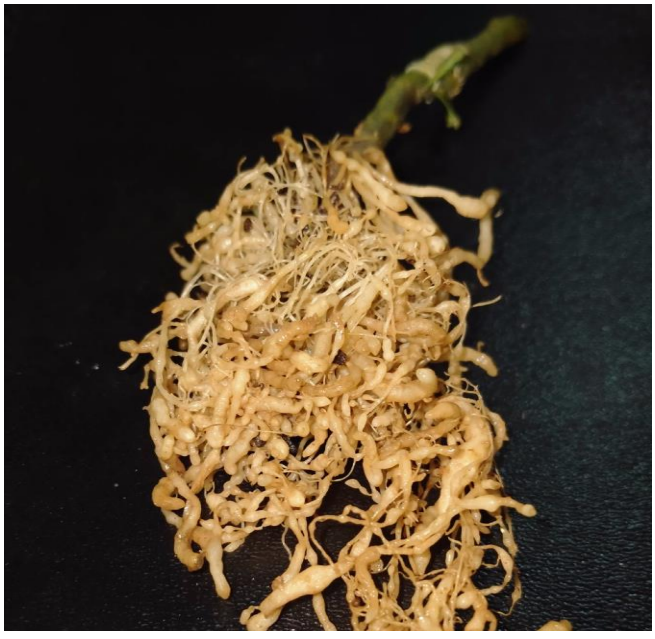
Bảng 3.4: Mật độ của hai chủng vi sinh vật bản địa.

Nguồn	***T. harzianum* (CFU/g)**	***Streptomyces* sp. (CFU/g)**
Mẫu đất	$1,8.10^5$	$1,5.10^5$
Sản phẩm lên men	$1,5.10^6$	$1,6.10^6$

Qua bảng 3.4 cho thấy mật độ của *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. trong mẫu đất ban đầu tương đối cao ($1,8.10^5$ CFU/g đối với *T. harzianum* và $1,6.10^6$ CFU/g đối với *Streptomyces* sp.), nói lên rằng tại đất cà phê Lâm Đồng có chứa 2 chủng vi sinh vật là *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. có thể sử dụng cho việc phòng trừ tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp.. Mật độ của *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. trong sản phẩm lên men đều cao hơn ($1,5.10^6$ CFU/g đối với *T. harzianum* và $1,6.10^6$ CFU/g đối với *Streptomyces* sp.) so với trong mẫu đất ban đầu thu thập được.

3.4. Đánh giá hiệu lực phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của các chủng vi sinh vật bản địa trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thu thập được các mẫu rễ cây bị nhiễm tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. tại Lâm Đồng.



Hình 3.10: Rễ cây cà chua bị tuyến trùng nốt sưng

Tách chiết ấu trùng nốt sưng tuổi 2 từ rễ cà chua bằng phương pháp Baermann cải biên. Sau 24 giờ thu được ấu trùng tuổi 2.



Hình 3.11: Tuyến trùng thu được từ các nốt sưng của mẫu rễ cây



Hình 3.12: Phần đầu của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp.tuyê

Tiến hành thử nghiệm hiệu lực đối kháng của 2 chủng vi sinh vật bản địa với tuyến trùng:



Hình 3.13: Tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. bị nấm *T. harzianum* tấn công

Qua thí nghiệm hiệu lực phòng trừ tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. của 2 chủng vi sinh vật phân lập được, kết quả được trình bày ở bảng sau:

Bảng 3.5: Tỷ lệ chết của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. sau khi xử lý bằng dịch huyền phù vi sinh vật.

Nghiệm thức	**Tỷ lệ chết của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp.**				
	24GSKXL	**48GSKXL**	**72GSKXL**	**96GSKXL**	**120GSKXL**
Đối chứng	0,00 b	1,517 b	2,907 c	2,907 c	2,907 b
T. harzianum	20,52 a	39,40 ab	98,61 a	98,61 a	100,0 a
Streptomyces sp.	14,29 ab	60,32 a	87,30 b	87,30 b	98,41 a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác nhau về ý nghĩa thống kê với $P \leq 0,05$ theo trắc nghiệm LSD. GSKXL: giờ sau khi xử lý.

Qua bảng 3.5 cho thấy tỷ lệ chết của tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. sau khi xử lý bằng dịch huyền phù vi sinh vật sau 24 giờ xử lý ở đối chứng không có tuyến trùng nào chết nhưng ở nghiệm thức sử dụng *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. đã có con chết với tỷ lệ lần lượt là 20,32% và 14,29%. Về mặt thống kê thì nghiệm thức sử dụng *Streptomyces* sp. chưa có sự khác biệt đáng kể. Vào thời điểm 48 giờ

sau khi xử lý nghiệm thức sử dụng *Streptomyces* sp. tỷ lệ chết của tuyến trùng tăng lên đáng kể từ 14,29% lên 60,32%, đạt tỷ lệ chết cao nhất vào thời điểm này. Nghiệm thức sử dụng *T. harzianum* tỷ lệ chết tăng tuy nhiên không đáng kể. Sau 72 giờ xử lý đã có sự khác biệt rõ rệt về mặt thống kê, ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ chết của tuyến trùng tăng lên 2,907%. Đồng thời, 2 nghiệm thức sử dụng vi sinh vật cũng tăng, đối với *T. harzianum* tỷ lệ chết đạt cao nhất (98,61%) vào thời điểm này, và tiếp theo là *Streptomyces* sp. với tỷ lệ chết của tuyến trùng thấp hơn (87,30%). Thời điểm 96 giờ sau khi xử lý tỷ lệ chết của tuyến trùng không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê so với thời điểm 72 giờ sau khi xử lý. Vào thời điểm 120 giờ sau khi xử lý, nghiệm thức đối chứng không tăng lên nhưng ở nghiệm thức sử dụng *T. harzianum* tỷ lệ chết của tuyến trùng đã đạt cao nhất (100%), nghiệm thức sử dụng *Streptomyces* sp. tăng từ 87,30% lên 98,41% và có sự khác biệt rõ rệt so với đối chứng. Ta thấy rằng hiệu lực phòng trừ tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. của *T. harzianum* đạt hiệu quả nhanh hơn so với *Streptomyces* sp. vì có khả năng gây chết 100% tuyến trùng vào thời điểm 120 giờ sau khi xử lý. Trong thí nghiệm này, *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. kiểm soát tuyến trùng bằng cơ chế tiết ra enzyme chitinase và protease phân hủy thành tế bào của tuyến trùng dẫn đến tuyến trùng bị tiêu diệt. Trong dung dịch huyền phù vi sinh vật, *T. harzianum* và *Streptomyces* sp. đã sinh trưởng đến giai đoạn ổn định và khi bắt gặp chúng chỉ cần thực hiện quá trình tiêu diệt tuyến trùng nên tác động nhanh hơn so với các loại chế phẩm phòng trừ tuyến trùng, vì trong chế phẩm vi sinh vật hiện diện dưới dạng bào tử nên chúng cần có quá trình sinh trưởng trước khi ổn định và thực hiện cơ chế kiểm soát tuyến trùng.

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Phân lập được hai chủng vi sinh vật từ đất trồng cà phê tại Lâm Đồng là *T. harzianum* với mật độ $1,8.10^5$ CFU/g và xạ khuẩn *Streptomyces* sp. với mật độ $1,5.10^5$ CFU/g.

Chủng *T. harzianum* có khả năng kiểm soát tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. nhanh hơn chủng *Streptomyces* sp. vào thời điểm 120 giờ sau khi xử lý với hiệu quả 100% cao hơn xạ khuẩn *Streptomyces* sp. chỉ đạt 98,41%.

4.2. Kiến nghị

Từ kết quả nghiên cứu trên, bước đầu có thể đưa ra khuyến cáo nên sử dụng *T. harzianum* với nồng độ $5,9.10^6$ CFU/10ml để đạt hiệu quả kiểm soát tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. nhanh và tiết kiệm chi phí.

Tiến hành thử nghiệm hiệu lực phòng trừ tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* sp. khi sử dụng kết hợp cả 2 chủng *T. harzianum* và xạ khuẩn *Streptomyces* sp. để đánh giá mức độ phòng trừ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu trong nước

1. Lê Gia Hy, 1994. *Nghiên cứu xạ khuẩn thuộc chi Streptomyces sinh chất kháng sinh chống nấm cây gây bệnh đạo ôn và thối rễ phân lập ở Việt Nam,* Luận án phó tiến sĩ khoa học Sinh học, Viện CSH, Trung tâm KHTN và CN Quốc Gia, Hà Nội.
2. Lê Lương Tề, 2005. *Giáo trình Bảo vệ thực vật*. Nhà xuất bản Hà Nội. 286pp.
3. Lê Xuân Phương, 2008. *Vi sinh vật học môi trường. Nhà xuất bản đại học quốc gia Hà Nội.*
4. Ngô Thị Thu Hà, 2013. *Luận văn thạc sĩ "Nghiên cứu phân lập nấm Purpureocillium lilacinum để phòng trừ tuyến trùng bướu rễ Meloidogyne sp.* Đại học Sư phạm Hồ Chí Minh.
5. Ngô Thị Xuyên, 2000. *Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng phòng chống tuyến trùng nốt sưng (Meloidogyne incognita Kofoid et White, 1919/Chitwood, 1949) trên một số cây trồng vùng Hà Nội và phụ cận*, Luận án Tiến sĩ, Đại học nông nghiệp I, 140 trang.
6. Nguyễn Lân Dũng, 2010. *Giáo trình vi sinh vật học.* Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam.
7. Nguyễn Ngọc Châu và Nguyễn Vũ Thanh, 2000. *Động vật chí Việt Nam- Tập 4- Tuyến trùng ký sinh thực vật*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
8. Nguyễn Ngọc Châu, 2003. *Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ.* Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
9. Nguyễn Thanh Nguyên, 2011. *Nghiên cứu một số nấm đối kháng tuyến trùng Pratylenchus coffeae gây hại trên cây cà phê vối ở Đăk Lăk.*
10. Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Trần Văn Huy, Nguyễn Thu Hà, Lê Văn Trịnh, Vũ Văn Hiền, Phạm Thị Minh Thắng và Phùng Quang Tùng,2015 . *Nghiên cứu sản xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học SH – BV1 phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh rễ hồ tiêu, cà phê ở Gia Lai và Đăk Nông,* Viện khoa học nông nghiệp Việt Nam.
11. Nguyễn Văn Đĩnh, Đỗ Tấn Dũng, Hà Quang Hùng, Phạm Văn Lâm, Phạm Bình Quyền và Ngô Thị Xuyên, 2007. *Giáo trình Biện pháp sinh học bảo vệ thực vật*, 116 -117pp.

12. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nghệ An, *2018. Tuyến trùng hại cây trồng và giải pháp xử lý.*

13. Trần Thị Minh Loan, 2006. *Đề xuất một số biện pháp tiêu diệt tuyến trùng hiệu quả trong đất trồng rau tại Lâm Đồng.*

14. Trịnh Thị Thu Thuỷ, 2010. *Tỷ lệ gây hại và ảnh hưởng của tuyến trùng hại rễ trên cây hồ tiêu tại Việt Nam.* Đại học K. U Leuven, Bỉ.

Tài liệu ngoài nước

15. Alford, D.V. 2012. Chapter 4-Miscellaneous Pests. *Pests of Ornamental Trees, Shrubs, and Flowers* (2): 434–443pp.

16. Bin Du, Yumei Xu, Hailong Dong, Yan Li & Jiang Ming Wang, 2020. *Phanerochaete chrysosporium strain B - 22, a nematophagous parasitizing Meloidogyne incognita.*

17. Carolee T. Bull, David M. Weller, and Linda S. Thomashow, 1991. *Relationship between root colonization and suppression of Gaeumannomyces graminis var. tritici by Pseudomonas fluorescens strain 2-79.*

18. Christain P. Kubicek & Gary E. Harman, 1998. *Trichoderma and gliocladium.*

19. David M. Weller, 1988. *Biology control of soilborne plant pathogens in the Rhizosphere with bacteria.*

20. G. Defago, D. Haas, 1990. *Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: Mode of actions and genetic analysis.*

21. G.Y. Yoon, Y.S. Lee, S.Y. Lee, R.D. Park, H.N Huyn, Y. Nam, & K.Y. Kim, 2012. *Effect on Meloidogyne sp. of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from Streptomyces cacaoi GY525*, Nematology, 14(2), 175 – 184pp.

22. Hadi Golzari, Naser Panjehkeh, Masoud Ahmadzadeh, Mohammad Salari & Ebrahim Sedaghati-khoravi, 2011. *Elucidating the Parasitic Capabilities of Trichoderma against Meloidogyne javanica on Tomato.*

23. Jaklitsch Walter M., Samuels Gary J., Dodd Sarah L., Lu, Bing-Sheng, Druzhinina Irina S, 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia*. Studies in Mycology. **56**: 135–177pp.

24. Jinkui Yang, Baoyu Tian, Lianming Liang & Ke-Qin Zhang, 2007. *Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi.*

25. JL. Parke, 1990. *Population dynamics of Pseudomonas cepacia in the pea spermosphere in relation to biocontrol of Pythium.*

26. Joanne Willey, Linda Sherwood & Christopher J. Woolverton, 2008. *Prescott, Harley and Klein's microbiology.* McGraw - hill education.

27. Kullnig, C., Szakacs, G., Kubicek, C.P., 2000. *Molecular identification of human pathogenic Trichoderma isolates as Trichoderma longibrachiatum and Trichoderma citrinoviride*. Med. Mycol. 37, 25 - 33pp.

28. Kurulkar Uday, Bhabesh Bhagawati & Pranjal Pratim Neog, 2019. *Biology control of Meloidogyne incognita by Trichoderma harzianum.*

29. M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge, 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, CABI Wallingford, UK, 871 pp.

30. M.R. Khan, K. Kounsar and A. Hamid, 2002. *Effect of certain rhizobacteria and antagonistic fungi on root-nodulation and root-knot nematode disease of green gram.*

31. Minkowski, N.A. & G.S. Abawi, 2003. *Root – knot nematodes, The plant health instructor*

32. MN. Schroth, JG. Hancock, 1982. *Disease – suppressive soil and root – colonizing bacteria.*

33. R. Mankau, Biocontrol, 1980. *Fungi as Nematode control Agents*. Journal of nematology, Volum 12, no.

34. R. Weindling, 1932. *Trichoderma lignorum as a parasite of other soil fungi,* Phytopathology, 22, 837-945pp

35. Roland N. Perry, Maurice Moens and James L. Starr, 2009. *Root-knot nematodes.*

36. Sahebani N., Hadavi N, 2008. *Biological control of the root-knot nematode Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum*. *Soil Biol Biochem.*

37. Sasser JN, Carter CC, 1985. Overview of the International *Meloidogyne Project* 1975–1984. In An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Edited by: Sasser JN, Carter CC. Raleigh: North Carolina State University Graphics; 19-24pp.

38. Shafiquzzaman Siddiquee, 2014. *Practical handbook of the biology and molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions.*

39. Sikora R.A, 1992. *Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant-parasitic nematodes.* Annual Review of Phytopathology, 30: 245-270pp.

40. Silvan, A. and I. Chet, 1989. *Degredation of fungal cell walls by lytic enzymes of Trichoderma harzianum. Journal of General Microbiology* 135: 675-682pp.

41. Tom Volk, 2006. *Fungal diseases that must be overcome to have a trditional Thankgiving dinner.*

42. Toyoda, H. Hashimoto, H. Utsumi, R. Kobayyashi, H. et el., 1988. *Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of Pseudomonas solanacearum and its application to biological control of Fusarium wilt of tomato.*

Tài liệu internet

43. http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21501203.2011.562559#

44. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Nematode_trapping_fungi#Introductionhttp://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/UsesOf_Fungi/primaryProduction/BiologicalControl/nematodes.shtml

45. https://vi.wikipedia.org/wiki/Vi_sinh_v%E1%BA%ADt_b%E1%BA%A3n_%C4%91%E1%BB%8Ba

46. http://www.biotech-agri.org/tin-tuc/Su-kien-nganh/HE-VI-SINH-VAT-TRONG-MOI-TRUONG-DAT-VA-NHUNG-VAI-TRO-CUA-CHUNG-TRONG-NONG-NGHIEP/129

47. https://nongnghiepthuanthien.vn/tuyen-trung-va-3-cach-phong-tru-tuyen-trung-ben-vung/

48. http://www.hcmbiotech.com.vn/vi/news/tin-khoa-hoc/tiem-nang-ung-dung-cua-nam-purpureocillium-lilacinum-trong-nong-nghiep-338.html
https://www.flickr.com/photos/scotnelson/39013404045/in/album-72157635415455383/

PHỤ LỤC

Title: ty le chet

Function: ANOVA-1
Data case no. 1 to 9

One way ANOVA grouped over variable 1 (nghiem thuc)
with values from 1 to 3.

Variable 2 (24h)

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	663.855	331.928	9.871	0.0127
Within	6	201.762	33.627		
Total	8	865.617			

Coefficient of Variation = 49.99%

V A R I A B L E No. 2

Var. 1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	0.000	0.000	0.00	3.35
2	3.00	61.550	20.517	8.84	3.35
3	3.00	42.860	14.287	4.77	3.35
Total	9.00	104.410	11.601	10.40	3.47
Within				5.80	

Bartlett's test

Chi-square = 27.622

Number of Degrees of Freedom = 2
Approximate significance = 0.000

WARNING: One or more factor levels have a variance of zero.
This will cause a large Chi-Square value.

RANGE

Error Mean Square = 33.63
Error Degrees of Freedom = 2
No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test
LSD value = 20.37 at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	0.0000	B	Mean 2 =	20.52	A
Mean 2 =	20.52	A	Mean 3 =	14.29	AB
Mean 3 =	14.29	AB	Mean 1 =	0.0000	B

Variable 3 (48h)

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	5330.207	2665.104	21.178	0.0019
Within	6	755.075	125.846		
Total	8	6085.282			

Coefficient of Variation = 33.24%

Var. V A R I A B L E No. 3

1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	4.550	1.517	2.63	6.48
2	3.00	118.210	39.403	16.50	6.48
3	3.00	180.950	60.317	9.91	6.48
Total	9.00	303.710	33.746	27.58	9.19
Within				11.22	

Bartlett's test

Chi-square = 3.892

Number of Degrees of Freedom = 2

Approximate significance = 0.143

RANGE

Error Mean Square = 125.8

Error Degrees of Freedom = 2

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 39.41 at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	1.517	B	Mean 3 =	60.32	A
Mean 2 =	39.40	AB	Mean 2 =	39.40	AB
Mean 3 =	60.32	A	Mean 1 =	1.517	B

Variable 4 (72h)

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.

Between	2	16409.279	8204.639	1246.070	0.0000
Within	6	39.506	6.584		
Total	8	16448.785			

Coefficient of Variation = 4.08%

Var. V A R I A B L E No. 4

1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	8.720	2.907	2.52	1.48
2	3.00	295.830	98.610	2.41	1.48
3	3.00	261.900	87.300	2.75	1.48
Total	9.00	566.450	62.939	45.34	15.11
Within				2.57	

Bartlett's test

Chi-square = 0.031

Number of Degrees of Freedom = 2

Approximate significance = 0.985

Variable 5 (96h)

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	16409.279	8204.639	1246.070	0.0000
Within	6	39.506	6.584		
Total	8	16448.785			

Coefficient of Variation = 4.08%

Var. 1	V A R I A B L E No. 5 Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	8.720	2.907	2.52	1.48
2	3.00	295.830	98.610	2.41	1.48
3	3.00	261.900	87.300	2.75	1.48
Total	9.00	566.450	62.939	45.34	15.11
Within				2.57	

Bartlett's test

Chi-square = 0.031

Number of Degrees of Freedom = 2

Approximate significance = 0.985

RANGE

Error Mean Square = 6.584

Error Degrees of Freedom = 2

No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test

LSD value = 9.014 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	2.907	C	Mean	2 =	98.61	A
Mean	2 =	98.61	A	Mean	3 =	87.30	B
Mean	3 =	87.30	B	Mean	1 =	2.907	C

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	18551.156	9275.578	1998.304	0.0000
Within	6	27.850	4.642		
Total	8	18579.006			

Coefficient of Variation = 3.21%

V A R I A B L E No. 6

Var. 1	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	8.720	2.907	2.52	1.24
2	3.00	300.000	100.000	0.00	1.24
3	3.00	295.240	98.413	2.75	1.24
Total	9.00	603.960	67.107	48.19	16.06
Within				2.15	

Bartlett's test

Chi-square = 23.804
Number of Degrees of Freedom = 2
Approximate significance = 0.000

WARNING: One or more factor levels have a variance of zero.
This will cause a large Chi-Square value.

RANGE

Error Mean Square = 4.642
Error Degrees of Freedom = 2
No. of observations to calculate a mean = 3

Least Significant Difference Test
LSD value = 7.569 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	2.907	B	Mean	2 =	100.0	A
Mean	2 =	100.0	A	Mean	3 =	98.41	A
Mean	3 =	98.41	A	Mean	1 =	2.907	B