

Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất chế phẩm *Trichoderma* phòng trừ bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi

Nguyễn Tiến Dũng^{1*}, Nguyễn Thị Thúy², Cao Thị Thu Dung², Quách Thị Hạnh¹, Nguyễn Thị Minh Trang¹, Nguyễn Thị Thu Hà¹, Phan Lệ Nga¹, Trần Phú Thắng¹, Trương Tuấn Oanh¹, Nguyễn Đức Thuận¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ, 70 Trần Hưng Đạo, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nông nghiệp và Tài nguyên, Trường Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, phường Trường Thi, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/8/2021; ngày chuyển phản biện 26/8/2021; ngày nhận phản biện 16/9/2021; ngày chấp nhận đăng 22/9/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối và sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ nấm *Trichoderma* bón cho cây có múi là cần thiết, giúp cải tạo đất và phòng trừ nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. gây bệnh vàng lá - thối rễ. Nghiên cứu sử dụng 2 chủng nấm *Trichoderma* đối kháng cao để nhân nuôi là *Trichoderma harzianum* 22.QH (T.haz.22.QH) và *Trichoderma asperellum* 11.TT (T.asp.11.TT). Môi trường lỏng với thành phần gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm *Trichoderma* đạt cao nhất ($4,35 \pm 0,48$ g/l) sau 1 ngày. Môi trường lên men rắn sử dụng cơ chất lúa nguyên hạt ninh nhừ và 10% dịch nấm *Trichoderma* là thích hợp cho nấm phát triển nhanh, mật độ bào tử đạt $8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất và thu sinh khối nấm sau 5-6 ngày nuôi cấy. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh sử dụng 100% phân chuồng hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng với 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* và thu sinh khối phân sau 60 ngày ủ.

Từ khóa: bệnh vàng lá - thối rễ, cây có múi, sinh khối, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trong sản xuất nông nghiệp, phân bón được xem là yếu tố quyết định đến năng suất và chất lượng nông sản. Tuy nhiên, việc sử dụng quá mức cần thiết các loại phân bón và thuốc trừ sâu hoá học đã gây ra nhiều hậu quả, ảnh hưởng đến con người và môi trường sống, làm đất canh tác nhanh bị bạc màu, giảm năng suất và chất lượng nông sản. Một trong những giải pháp để trả lại độ phì nhiêu cho đất, giảm chi phí phân hóa học đó là sử dụng phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma* được tạo ra từ các chủng vi sinh vật và nguyên liệu hữu cơ khác nhau vừa có tác dụng làm phân bón, cải tạo đất, kích thích cây trồng phát triển, đồng thời kiểm soát được nhiều bệnh hại cây trồng.

Hiện nay, bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi đã được xác định do nguyên nhân chính là nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., tuyến trùng hay ngập nước gây hại ngày càng phổ biến và nghiêm trọng trên cây có múi, việc sử dụng biện pháp hóa học hiệu quả không cao [1-3]. Trên thế giới, nghiên cứu ứng dụng nấm *Trichoderma* làm phân bón vi sinh đang là hướng được quan tâm. Nấm *Trichoderma* là một tác nhân quan trọng làm phân bón và kiểm soát nấm gây bệnh *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*... Ứng dụng công nghệ vi sinh đã lựa chọn các chủng nấm *Trichoderma* có hiệu lực cao và nhân nuôi sinh khối để sản xuất phân bón [4-6].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- 2 chủng nấm: T.haz.22.QH và T.asp.11.TT được tuyển chọn đối kháng cao với nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. gây bệnh

vàng lá - thối rễ cây có múi, thu thập tại huyện Thạch Thành, tỉnh Thanh Hóa và huyện Quỳnh Hợp, tỉnh Nghệ An.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại Viện Nghiên cứu và Phát triển vùng và Trường Đại học Vinh.

- Nguyên vật liệu: agar, glucose, peptone, đường, lúa, giá đậu, ri mật, chloramphenicol, streptomycin, cồn, phân chuồng, bã mía, than bùn...

- Dụng cụ: đĩa petri, bình thủy tinh, kính hiển vi, bộ dụng cụ nuôi cấy vi nấm...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ứng dụng công nghệ lên men bề mặt trên môi trường rắn, thu sinh khối và sản xuất chế phẩm nấm *Trichoderma* được tiến hành theo phương pháp của Phạm Thị Thùy (2004) [7], T. Pramod Kumar và M.G. Palakshappa (2009) [8], Z. Shahrim và cs (2008) [9], A. Singh (2007) [10].

Thí nghiệm 1: Xác định thành phần môi trường lỏng nhân sinh khối nấm *Trichoderma* (10 ml dịch nấm *Trichoderma* trong 1 l môi trường).

- Các công thức thí nghiệm gồm:

+ CT1.1: ri mật 140 g.

+ CT1.2: đường mía 30 g.

+ CT1.3: dịch chiết từ 150 g giá đậu.

+ CT1.4: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 140 g ri mật.

+ CT1.5: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía.

*Tác giả liên hệ: Email: dungnguyentien85@gmail.com

Research on technical production of *Trichoderma* preparations for control of yellow leaf - root rot on citrus trees

Tien Dung Nguyen^{1*}, Thi Thuy Nguyen²,
Thi Thu Dung Cao², Thi Hanh Quach¹,
Thi Minh Trang Nguyen¹, Thi Thu Ha Nguyen¹,
Le Nga Phan¹, Phu Thang Tran¹,
Tuan Oanh Truong¹, Duc Thuan Nguyen¹

¹Regional Research and Development Institute, Ministry of Science and Technology,
70 Tran Hung Dao Street, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²School of Agriculture and Natural Resources, Vinh University,
182 Le Duan Street, Truong Thi Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received 23 August 2021; revised 16 September 2021; accepted 22 September 2021

Abstract:

It is necessary to study conditions biomass multiplication and production of microbial organic fertilizers from *Trichoderma* for citrus trees, to help improve soil and prevent *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. causes yellow leaf - root rot. This study used two very high resistance strains of *Trichoderma* fungi for culture, namely T.haz.22.QH and T.asp.11.TT. Cultures of *Trichoderma* in liquid medium with the composition of extract from 150 g bean sprouts + 30 g sugar + 1 g urea + 1 g KH_2PO_4 + 0.5 g MgSO_4 achieved the highest biomass of 4.35 ± 0.48 g/l after 1 day. Solid fermentation medium using simmered whole-grain rice substrate and 10% fungal juice were suitable for fast growth and spores 8.82×10^9 CFU/g and obtained fungal biomass after 5-6 days. Producing micro-organic fertilizers using 100% manure or 50% bagasse + 50% manure with 6-8 kg of *Trichoderma* and obtained faecal biomass after 60 days of incubation.

Keywords: biomass, citrus, *Trichoderma*, yellow leaf - root rot.

Classification number: 4.6

+ CT1.6: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 .

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm: 2 chủng nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT cùng được nuôi trên môi trường PDA (200 g khoai tây, 20 g đường glucosơ, 20 g agar, 1000 ml nước cất) trong bình tam giác, trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%, 12 giờ sáng/12 giờ tối trong 2-3 ngày [9, 11].

+ Pha môi trường lỏng theo các công thức, hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút rồi lấy ra để nguội.

Cho 10 ml dịch nấm *Trichoderma* vào trong 1 l môi trường. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%.

- Chỉ tiêu theo dõi: khối lượng sinh khối nấm thu được (g/l) sau 1 ngày nuôi.

- *Thí nghiệm 2: Xác định thành phần cơ chất môi trường lên men rắn để sản xuất chế phẩm Trichoderma (mỗi công thức 10% dịch nấm Trichoderma).*

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT2.1: 10 g lúa nguyên hạt ninh nhừ.

+ CT2.2: 10 g lúa nghiền nhỏ + 10 ml nước.

+ CT2.3: 20 g cám gạo + 15 g trấu + 15 g cám vỏ lạc

+ 20 ml nước.

+ CT2.4: 20 g than bùn + 20 ml nước.

+ CT2.5: 20 g cám + 10 g trấu + 10 g cám ngô + 20 ml nước.

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm: 2 chủng nấm *Trichoderma* được nuôi trên môi trường gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 . Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%. Thu dịch nấm sau 2 ngày, nồng độ trung bình $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l.

+ Cho nguyên liệu môi trường vào mỗi túi bóng loại 0,5 kg có ống nhựa làm miệng. Đong lượng nước/cơ chất theo tỷ lệ 1/1 cho vào mỗi bịch, ngâm trong vòng 60 phút trước khi hấp khử trùng 2 lần liên tiếp ở 121°C trong 30 phút rồi lấy ra để nguội. Dùng bơm tiêm hút 10% dịch nấm và bơm vào môi trường rắn. Nuôi ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, theo dõi đến khi bào tử bao phủ kín túi.

- Chỉ tiêu đánh giá: thời gian phát triển nấm, nồng độ bào tử CFU/g cơ chất.

- *Thí nghiệm 3: Xác định tỷ lệ giữa dịch nấm Trichoderma và cơ chất lúa nguyên hạt ninh nhừ để sản xuất chế phẩm Trichoderma.*

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT3.1: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 10% khối lượng lúa ninh nhừ.

+ CT3.2: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 15% khối lượng lúa ninh nhừ.

+ CT3.3: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 20% khối lượng lúa ninh nhừ.

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm *Trichoderma* nồng độ $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l (tương tự thí nghiệm 2).

+ Cho 2,5 kg lúa vào mỗi túi bóng loại 5 kg có ống nhựa làm miệng. Đong lượng nước/lúa theo tỷ lệ 1/1 cho vào mỗi bịch, ngâm trong vòng 60 phút trước khi hấp khử trùng 2 lần liên tiếp ở 121°C trong 30 phút rồi lấy ra để nguội. Dùng bơm tiêm hút dịch nấm và bơm vào môi trường lúa chín nhừ. Nuôi ở 28±2°C, theo dõi đến khi bảo tử bao phủ kín túi.

+ Phương pháp thu sinh khối nấm: Khi sợi nấm bao phủ lên toàn bộ khối môi trường rắn đồng thời quá trình hình thành bào tử kết thúc, tiến hành thu sinh khối nấm. Sau đó sấy khô ở 40°C trong 1 ngày, nghiền mịn thu được chế phẩm *Trichoderma*.

- Chỉ tiêu theo dõi: Nồng độ bào tử nấm *Trichoderma* CFU/g cơ chất.

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu liều lượng chế phẩm *Trichoderma* thích hợp để xử lý chất mang hữu cơ.

Gồm 4 công thức thí nghiệm với lượng chế phẩm *Trichoderma* là 2, 4, 6 và 8 kg (mật độ bào tử nấm $7,6 \times 10^9$ CFU/g), xử lý cho 1 tấn phân chuồng (bổ sung đạm, lân, EM và ri mật).

- Phương pháp thực hiện: Phối trộn đều các thành phần nguyên liệu với lượng chế phẩm nấm với nhau theo các công thức. Ủ hiếu khí, độ ẩm đạt 50-60%. Đảo trộn 7-10 ngày/lần, nhiệt độ khối ủ tăng >60°C. Theo dõi các chỉ tiêu sau 60 ngày ủ.

- Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ bào tử CFU/g chất mang, hàm lượng C, N.

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu thành phần và tỷ lệ chất mang làm phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma*.

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT5.1: bã mía.

+ CT5.2: phân chuồng.

+ CT5.3: bã mía 80% + phân chuồng 20%.

+ CT5.4: bã mía 70% + phân chuồng 30%.

+ CT5.5: bã mía 60% + phân chuồng 40%.

+ CT5.6: bã mía 50% + phân chuồng 50%.

- Phương pháp thực hiện: Phối trộn đều các nguyên liệu theo tỷ lệ trên với 6 kg chế phẩm nấm *Trichoderma* (mật độ bào tử nấm $7,6 \times 10^9$ CFU/g) được 1 tấn chất mang (bổ sung đạm, lân, EM và ri mật). Phân chuồng và bã mía đã được xử lý. Ủ hiếu khí, độ ẩm đạt 50-60%. Đảo trộn 7-10 ngày/lần, nhiệt độ khối ủ tăng >60°C. Theo dõi các chỉ tiêu sau 60 ngày ủ.

- Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ bào tử CFU/g chất mang, hàm lượng C, N.

- Phương pháp xác định nồng độ bào tử bằng buồng đếm hồng cầu.

Số liệu được xử lý theo chương trình Excel và phần mềm thống kê sinh học Statistix 9.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định thành phần môi trường lỏng thích hợp nhân sinh khối nấm *Trichoderma*

Nhân nuôi nấm *Trichoderma* trên môi trường lỏng là bước cần thiết để có nguồn dịch nấm đủ cho nhân sinh khối trên môi trường rắn. Kết quả nghiên cứu sự phát triển của 2 chủng nấm trên 6 loại môi trường lỏng khác nhau cho thấy: môi trường lỏng có thành phần gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm *Trichoderma* đạt cao nhất ($4,35 \pm 0,48$ g/l) sau 1 ngày. Ngoài thành phần chính là giá đậu và đường thì việc bổ sung thêm urê, vi lượng KH_2PO_4 và MgSO_4 giúp nấm *Trichoderma* phát triển mạnh hơn (bảng 1).

Bảng 1. Sinh khối nấm *Trichoderma* trên môi trường lỏng sau 1 ngày nuôi cấy.

Công thức	Lượng sinh khối sau 1 ngày (g/l) (TB±SD)
Ri mật	1,92±0,34 ^d
Đường mía	3,78±0,45 ^c
DCGD	3,66±0,54 ^c
DCGD + ri mật	3,84±0,57 ^{bc}
DCGD + đường mía	4,03±0,51 ^b
DCGD + đường + N + P + Mg	4,35±0,48 ^a
LSD _{0,05}	0,22
CV%	5,70

Ghi chú: DCGD: dịch chiết giá đậu; các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2. Xác định thành phần cơ chất và tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn

Xác định thành phần cơ chất thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn: Trên 5 loại môi trường lên men rắn thì cả 2 chủng nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT đều thích hợp phát triển trên cơ chất là lúa nguyên hạt nhừ với thời gian sinh trưởng, phát triển ngắn nhất. Bào tử hình thành sau 2 ngày, bao phủ toàn túi chỉ sau 5 ngày nhân nuôi với mật độ bào tử đạt cao nhất là $8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất (sai khác với các công thức còn lại ở mức $p < 0,05$). Thời điểm thu sinh khối nấm *Trichoderma* thích hợp cũng là 5-6 ngày sau nuôi cấy.

Trong khi đó, 4 công thức môi trường rắn còn lại bào tử nấm cần 6,5-11 ngày sau nhân nuôi mới bao phủ toàn túi, mật độ bào tử đạt thấp ($1,87$ - $6,60 \times 10^9$ CFU/g cơ chất). Nấm phát triển kém nhất trên môi trường CT2.4 gồm 20 g than bùn + 20 ml nước (bảng 2 và 3).

Bảng 2. Sự phát triển của 2 chủng nấm *Trichoderma* trên một số cơ chất khác nhau ở các ngày sau khi nuôi cấy.

Công thức	Sự phát triển của nấm <i>Trichoderma</i> sau cấy (ngày)			
	Ngày sợi nấm mọc	Ngày hình thành bào tử	Ngày nấm mọc kín túi	Ngày bào tử bao phủ trong toàn túi
CT2.1	1,0	2,0	3,0	5,0
CT2.2	1,0	2,0	4,5	6,5
CT2.3	1,0	2,5	5,0	7,5
CT2.4	3,0	3,5	7,0	11,0
CT2.5	1,5	2,0	5,5	7,0

Bảng 3. Mật độ bào tử của 2 chủng nấm *Trichoderma* trên các loại môi trường rắn khác nhau sau khi nuôi cấy.

Công thức	Mật độ bào tử mỗi chủng ($\times 10^9$ CFU/g)				
	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
CT2.1	1,31 $\pm$ 0,3 ^a	3,14 $\pm$ 0,7 ^a	6,80 $\pm$ 1,1 ^a	8,82 $\pm$ 1,4 ^a	8,61 $\pm$ 1,3 ^a
CT2.2	0,86 $\pm$ 0,2 ^b	1,95 $\pm$ 0,5 ^b	3,13 $\pm$ 0,9 ^b	4,05 $\pm$ 0,6 ^c	4,50 $\pm$ 0,8 ^c
CT2.3	0,62 $\pm$ 0,1 ^b	2,27 $\pm$ 0,4 ^{ab}	4,50 $\pm$ 0,8 ^b	5,90 $\pm$ 1,0 ^{bc}	6,15 $\pm$ 1,0 ^b
CT2.4	0,14 $\pm$ 0,0 ^c	0,40 $\pm$ 0,1 ^c	0,82 $\pm$ 0,2 ^c	1,20 $\pm$ 0,4 ^d	1,87 $\pm$ 0,7 ^c
CT2.5	1,05 $\pm$ 0,2 ^{ab}	2,68 $\pm$ 0,5 ^{ab}	4,79 $\pm$ 1,0 ^b	6,20 $\pm$ 1,1 ^b	6,60 $\pm$ 1,1 ^b
LSD _{0,05}	0,34	0,84	1,64	1,81	1,58
CV%	5,10	5,60	7,10	6,70	8,10

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Xác định tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn: Dịch hỗn hợp của 2 chủng nấm *Trichoderma* cùng được nuôi trên môi trường lên men lỏng (nồng độ $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l), sau đó được khi tiêm vào môi trường rắn. Tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* được thí nghiệm ở 3 mức là 10, 15 và 20% khối lượng cơ chất trên môi trường rắn lúa nguyên nhữ.

Kết quả theo dõi được trình bày ở bảng 4 cho thấy, ở cả 3 mức tỷ lệ dịch nấm đều cho khả năng phát triển với mật độ bào tử và thời gian không có sự sai khác nhau. Mật độ bào tử đạt mức cao ($8,34-8,76 \times 10^9$ CFU/g). Như vậy, khi nhân sinh khối trên môi trường cơ chất lúa nguyên hạt nhữ, chỉ cần sử dụng 10% dịch bào tử hỗn hợp của 2 chủng nấm *Trichoderma* là đảm bảo sự phát triển của nấm (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng tỷ lệ dịch nấm của 2 chủng *Trichoderma* đến khả năng phát triển trên cơ chất lúa nguyên hạt nhữ.

Tỷ lệ dịch nấm/cơ chất (%)	Sự phát triển của nấm sau khi cấy (ngày)				Mật độ bào tử cao nhất (CFU/g)
	Ngày sợi nấm mọc	Ngày bắt đầu hình thành bào tử	Ngày sợi nấm mọc kín túi	Ngày bào tử bao phủ trong toàn túi	
10	1	2	4	5	$8,76 \times 10^9$
15	1	2	4	5	$8,34 \times 10^9$
20	1	2	4	5	$8,56 \times 10^9$
LSD _{0,05}					0,73
CV%					9,30

3.3. Xác định liều lượng chế phẩm *Trichoderma* thích hợp để xử lý chất mang

Xác định ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm *Trichoderma* đến nồng độ bào tử: Nấm sau khi được nhân sinh khối trên môi trường rắn là lúa nguyên hạt nhữ tạo ra chế phẩm *Trichoderma* và được sử dụng xử lý chất hữu cơ làm phân bón. Kết quả bảng 5 cho thấy, mật độ bào tử nấm trong khối ủ có xu hướng tăng dần theo liều lượng chế phẩm *Trichoderma* từ khi ủ đến 40 ngày sau đó giảm dần đến 60 ngày. Với liều lượng 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* xử lý cho 1 tấn chất mang hữu cơ thì cho mật độ bào tử nấm cao nhất sau 40 ngày ủ là $8,93-9,66 \times 10^6$ CFU/g.

Bảng 5. Nồng độ bào tử của khối ủ với các liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau.

Liều lượng chế phẩm <i>Trichoderma</i> (kg)	Mật độ bào tử của khối ủ theo thời gian (CFU/g)			
	0 ngày	20 ngày	40 ngày	60 ngày
2	$3,20 \times 10^3$	$4,15 \times 10^{4d}$	$5,40 \times 10^{4c}$	$4,45 \times 10^{3c}$
4	$6,40 \times 10^3$	$5,21 \times 10^{5c}$	$7,46 \times 10^b$	$6,90 \times 10^{4b}$
6	$9,60 \times 10^3$	$7,53 \times 10^{6b}$	$8,93 \times 10^{6a}$	$8,12 \times 10^{5a}$
8	$12,80 \times 10^3$	$8,62 \times 10^{6a}$	$9,66 \times 10^{6a}$	$8,79 \times 10^{5a}$
LSD _{0,05}		1,03	1,18	1,06
CV%		7,40	7,70	8,20

Xác định ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm *Trichoderma* đến hàm lượng chất dinh dưỡng: Các mức liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau đã ảnh hưởng đến khả năng phân hủy, hình thành chất dinh dưỡng trong quá trình ủ phân. Hàm lượng chất hữu cơ có xu hướng tăng dần, còn hàm lượng nitơ tổng số lại giảm dần theo thời gian ủ. Trong đó, hàm lượng chất hữu cơ đạt cao nhất ở công thức sử dụng 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* là 27,40-28,82%, hàm lượng nitơ tổng số là 1,32-1,34% sau 60 ngày ủ (bảng 6).

Bảng 6. Hàm lượng dinh dưỡng trong khối ủ với liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau.

Liều lượng chế phẩm <i>Trichoderma</i> (kg)	Hàm lượng chất dinh dưỡng sau khi ủ (%)							
	0 ngày		20 ngày		40 ngày		60 ngày	
	C%	N%	C%	N%	C%	N%	C%	N%
0 (đối chứng)	15,74	2,02	16,82 ^c	1,81 ^b	18,10 ^c	1,25 ^c	18,72 ^c	1,02 ^c
2	15,74	2,02	19,21 ^{bc}	1,90 ^b	21,80 ^b	1,51 ^b	21,65 ^b	1,17 ^b
4	15,74	2,02	20,10 ^b	1,96 ^{ab}	23,96 ^b	1,56 ^b	23,91 ^b	1,20 ^b
6	15,74	2,02	21,30 ^{ab}	2,01 ^a	25,02 ^a	1,65 ^a	27,40 ^a	1,32 ^{ab}
8	15,74	2,02	21,85 ^a	2,00 ^a	26,84 ^a	1,79 ^a	28,82 ^a	1,34 ^a
LSD _{0,05}			1,51	0,14	2,15	0,20	1,78	0,13
CV%			8,80	9,50	11,30	8,30	10,10	9,90

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Xác định thành phần và tỷ lệ chất mang làm phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma*

Xác định ảnh hưởng của thành phần và tỷ lệ chất mang đến mật độ bào tử nấm *Trichoderma*: Chất mang gồm phân chuồng và bã mía là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ủ. Kết quả bảng 7 cho thấy, thành phần, tỷ lệ chất mang khác nhau thì mức độ hình thành bào tử nấm *Trichoderma*

trong khối ủ cũng khác nhau. Công thức chất mang là 100% phân chuồng (CT5.2) hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng (CT5.6) cho mật độ bào tử đạt cao nhất là $7,5-8,4 \times 10^6$ CFU/g sau 40-50 ngày sau ủ.

Bảng 7. Mật độ bào tử nấm *Trichoderma* trong khối ủ với thành phần, tỷ lệ chất mang khác nhau.

Công thức	Mật độ bào tử các khối ủ theo thời gian (CFU/g)					
	10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày	50 ngày	60 ngày
CT5.1	$1,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
CT5.2	$6,6 \times 10^4$	$7,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$
CT5.3	$3,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
CT5.4	$2,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$
CT5.5	$5,5 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$
CT5.6	$7,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$

Xác định ảnh hưởng của thành phần và tỷ lệ chất mang đến hàm lượng chất dinh dưỡng: Thành phần, tỷ lệ chất mang là một trong những yếu tố quyết định đến hàm lượng các chất dinh dưỡng trong khối ủ. Hàm lượng chất hữu cơ có xu hướng tăng dần, còn hàm lượng nitơ tổng số lại giảm dần theo thời gian ủ. Trong đó, hàm lượng dinh dưỡng đạt cao nhất ở công thức chất mang là 100% phân chuồng (CT5.2) hoặc bã mía 50% + phân chuồng 50% (CT5.6) với hàm lượng chất hữu cơ là 26,5-27,1%, hàm lượng nitơ tổng số là 1,5% sau 60 ngày ủ (bảng 8).

Bảng 8. Hàm lượng dinh dưỡng trong khối ủ với thành phần và tỷ lệ chất mang khác nhau.

Công thức	Hàm lượng chất dinh dưỡng sau ngày ủ (%)								
	20 ngày			40 ngày			60 ngày		
	C%	N%	C/N	C%	N%	C/N	C%	N%	C/N
CT5.1	12,3 ^d	2,5 ^a	4,9	14,7 ^d	1,7 ^a	8,6	15,0 ^c	1,2 ^b	12,5
CT5.2	19,9 ^a	2,2 ^a	9,0	23,5 ^a	1,8 ^a	13,1	27,1 ^a	1,5 ^a	18,1
CT5.3	13,7 ^c	2,4 ^a	5,7	15,2 ^c	1,5 ^a	10,1	16,7 ^c	1,3 ^b	12,8
CT5.4	14,2 ^c	2,3 ^a	6,2	17,9 ^b	1,6 ^a	11,2	19,2 ^b	1,4 ^{ab}	13,7
CT5.5	16,1 ^b	2,3 ^a	7,0	19,5 ^b	1,8 ^a	10,8	21,1 ^b	1,4 ^{ab}	15,1
CT5.6	18,2 ^a	2,2 ^a	8,3	22,9 ^a	1,8 ^a	12,7	26,5 ^a	1,5 ^a	17,6
LSD _{0,05}	1,6	0,4		2,10	0,3		2,5	0,2	
CV%	7,8	5,5		8,1	6,7		8,5	7,1	

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Như vậy, thành phần, tỷ lệ chất mang ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ủ và chất lượng phân. Nguyên liệu sử dụng tốt để làm chất mang sản xuất phân hữu cơ vi sinh 100% phân chuồng hoặc phân chuồng với bã mía theo tỷ lệ 1/1.

4. Kết luận

- Môi trường lỏng gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT đạt cao nhất là $4,35 \pm 0,48$ g/l sau 1 ngày nuôi.

- Môi trường lên men rắn lúa nguyên hạt ninh nhừ với 10% dịch nấm của 2 chủng T.haz.22.QH và T.asp.11.TT là thích hợp cho thời gian phát triển ngắn, mật độ bào tử đạt

$8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất và thu sinh khối nấm sau 5-6 ngày nuôi cấy.

- Xử lý cho 1 tấn chất mang hữu cơ 100% phân chuồng hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng cần 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* cho mật độ bào tử, hàm lượng chất hữu cơ, hàm lượng nitơ tổng số đạt cao nhất và thu sinh khối phân sau 60 ngày ủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.V. Kim (1997), "Identifying the causative agent of yellow leaf fall disease on citrus trees in the Mekong Delta", *Collection of Scientific and Technological Works, Can Tho University*, pp.85-91 (in Vietnamese).
- [2] L.T.T. Hong, L.T.M. Nuong (2002), *Results of Research on the Cause of Yellow Leaf Root Rot Disease on Tangerines Lai Vung, Dong Thap*, Southern Horticultural Research Institute, pp.509-516 (in Vietnamese).
- [3] D. Minh, D.T.T. Nha (2003), "Antagonism ability of *Trichoderma* sp. domestic citrus root rot disease caused by *Fusarium solani* fungus in the Mekong Delta", *Proceedings of the Workshop on Plant Protection to Serve the Policy of Crop Restructuring in the Southern and Central Highlands Provinces*, pp.82-85 (in Vietnamese).
- [4] T.T. Thuan, N.T. Ly, N.V. Dung (2000), "Results of production and use of the antagonistic fungus *Trichoderma* to control plant diseases 1996-2000", *Collection of Research Works on Plant Protection 1996-2000*, pp.221-227 (in Vietnamese).
- [5] P. Sawangsri, A. Pengnoo, J. Suwanprasert, et al. (2007), "Effect of *Trichoderma harzianum* biomass and *Bradyrhizobium* sp. strain NC92 to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) caused by *Rhizoctonia solani* in the field", *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **29**(1), pp.75-88.
- [6] R. Rajendiran, D. Jegadeeshkumar, B.T. Sureshkumar, et al. (2010), "In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens", *Journal of Agricultural Technology*, **6**(1), pp.31-35.
- [7] P.T. Thuy (2004), *Biotechnology in Plant Protection*, VNU Publishing House, 355pp (in Vietnamese).
- [8] T.P. Kumar, M.G. Palakshappa (2009), "Evaluation of suitable substrates for on farm production of antagonist *Trichoderma harzianum*", *Karnataka J. Agric. Sci.*, **22**(1), pp.115-117.
- [9] Z. Shahrim, V. Sabaratnam, N.A.A. Rahman, et al. (2008), "Production of reducing sugars by *Trichoderma* sp. KUPM0001 during solid substrate fermentation of sago starch processing waste hampas", *Research Journal of Microbiology*, **3**(9), pp.569-579.
- [10] A. Singh, S. Srivastava, H.B. Singh (2007), "Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases", *Bioresource Technology*, **98**(2), pp.470-473, DOI: 10.1016/j.biortech.2006.01.002.
- [11] M.G. Prakash, K.V. Gopal, M. Anandaraj, et al. (1999), "Evaluation of substrates for mass multiplication of fungal biocontrol agents *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens*", *Journal of Spices and Aromatic Crops*, **8**(2), pp.207- 210.