

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN**

ĐỖ THỊ KIỀU AN

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN
NỘI SINH CHỌN LỌC ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN
CÂY CÀ PHÊ VỚI (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ NÔNG NGHIỆP

ĐẮK LẮK – NĂM 2019

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN**

ĐỖ THỊ KIỀU AN

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN
NỘI SINH CHỌN LỌC ĐẾN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN
CÂY CÀ PHÊ VỚI (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ NÔNG NGHIỆP

Chuyên ngành: Khoa học cây trồng

Mã số : 62.62.01.10

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. NGUYỄN ANH DŨNG

ĐẮK LẮK – NĂM 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng, đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và chưa từng được dùng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Tác giả luận án

Đỗ Thị Kiều An

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và thực hiện Luận án tôi luôn nhận được sự ủng hộ và giúp đỡ của các quý cơ quan, Thầy Cô, bạn bè, đồng nghiệp và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới Thầy giáo PGS. TS. Nguyễn Anh Dũng, người hướng dẫn khoa học đã tận tình giảng dạy, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và định hướng giúp tôi trưởng thành hơn trong công tác nghiên cứu và hoàn thiện Luận án.

Trong quá trình học tập và nghiên cứu tại trường, tôi đã nhận được sự hỗ trợ, động viên và giúp đỡ tận tình từ Ban Giám hiệu Trường Đại học Tây Nguyên; Lãnh đạo Khoa Nông Lâm Nghiệp, Bộ môn Khoa học Cây trồng và Bộ môn Bảo vệ thực vật - Trường Đại học Tây Nguyên. Ngoài ra, tôi còn nhận được sự hỗ trợ, hướng dẫn và giúp đỡ của tập thể quý Thầy, Cô giáo và cán bộ trong Khoa Nông Lâm Nghiệp, Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Phòng Đào tạo Sau đại học. Xin gửi đến tập thể quý Lãnh đạo và Thầy Cô lòng biết ơn sâu sắc.

Xin chân thành cảm ơn gia đình các anh Lê Văn Tâm và Trần Văn Ngọc đã tạo điều kiện để các thí nghiệm trên đồng ruộng được tiến hành một cách thuận lợi.

Gia đình yêu thương là những người đã luôn sát cánh động viên, chia sẻ khó khăn, buồn vui, là động lực giúp tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới các đồng nghiệp, bạn bè, anh em lớp NCS KHCT K1 và các em sinh viên thân yêu lớp KHCT K12, BVTV K12, KHCT K13, BVTV K13, BVTV K14 và BVTV K15 đã đồng hành và hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện Luận án.

Buôn Ma Thuột, ngày tháng năm 2019

Tác giả luận án

Đỗ Thị Kiều An

TÓM TẮT

Đề tài: “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)” đã được thực hiện tại thành phố Buôn Ma Thuột từ 12/2015 tới tháng 03/2019 với mục tiêu đánh giá được ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng. Trên cơ sở đó, xác định được hỗn hợp chủng và liều lượng áp dụng thích hợp nhằm giúp cà phê sinh trưởng, phát triển tốt, giảm lượng phân hóa học sử dụng.

Đề tài được thực hiện với 9 chủng vi khuẩn nội sinh: *Bacillus cereus* M15, *Bacillus subtilis* EK17, *Enterobacter cloace* EK19, Cu8, BH8, BMT7, *Bacillus pumilus* BMT4, BMT8 và *Bacillus* sp. BMT11 với các nội dung nghiên cứu cơ bản như sau:

- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cây con cà phê vối trong điều kiện nhà lưới;
- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây cà phê vối giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng;
- Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối giai đoạn kinh doanh trên đồng ruộng.

Kết quả nghiên cứu thu được như sau:

- Trong số 9 chủng vi khuẩn nội sinh thí nghiệm, các chủng *Bacillus cereus* M15, *B. subtilis* EK17, *B. pumilus* BMT4 có khả năng kích thích sinh trưởng cây con cà phê vối tốt nhất, làm hàm lượng diệp lục tố trong lá tăng 9,5 – 39,4%; hàm lượng N% tăng 10,3 – 20,9%, P% tăng 77,8 – 111,1%, chiều cao cây tăng 17,5 – 51,2%; đường kính gốc tăng 25,6 -27,8%; khối lượng cây tươi tăng 60,5 -117,5%; khối lượng rễ tươi tăng 218,5 – 235,2%; chiều dài rễ tăng đến 24,6% so với công thức đối chứng ĐC.

- Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có ảnh hưởng tốt đến khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá:

hàm lượng N tăng 9,1 – 27,7%, hàm lượng P tăng đến 18,2%. Khả năng sinh trưởng của cây cà phê với tái canh giai đoạn kiến thiết cơ bản tốt nhất khi xử lý các hỗn hợp này ở mức 20 – 30 ml huyền phù vi khuẩn/cây (mật độ 10^9 CFU/mL). Chiều cao cây tăng 11,9 – 19,9%; đường kính gốc tăng 20,2 – 33,0%; số cặp cành cơ bản tăng từ 3,4 – 18,4%.

- Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) đã ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng các sắc tố quang hợp, khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá, do đó thúc đẩy sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh, tăng số quả/chùm. Kết quả này đã làm tăng 14,8 – 20,9% năng suất cây cà phê.

- Hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi xử lý ở mức 20 – 30 ml/cây (mật độ 10^9 CFU/mL) có hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. gây hại rễ cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản lên đến hơn 80%.

- Đối với cà phê với giai đoạn kinh doanh, xử lý các hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) ở mức 30 – 40 ml (10^9 CFU/mL)/cây có hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. *Pratylenchus* sp. gây hại lên đến hơn 70%.

SUMMARY

The dissertation: "Study on the effects of some selected endophytic bacterial strains on growth and development of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)" was conducted in Buon Ma Thuot from December 2015 to March 2019. The aims were to evaluate the effects of some selected endophytic bacteria strains on growth, development of Robusta coffee in a greenhouse and in field conditions. Based on these results, further studies were conducted to determine the effective dose and compatible combination of the strains on the growth and yield of the coffee in the field.

The study was carried out with 9 endophytic bacteria strains: *Bacillus cereus* M15, *Bacillus subtilis* EK17, *Enterobacter cloace* EK19, *Bacillus* sp. Cu8, BH8, *B. cereus* BMT7, *Bacillus pumilus* BMT4, *Bacillus* sp. BMT8 and *Bacillus* sp. BMT11 with the following basic research contents:

- Evaluate the effects of selected endophytic bacteria strains on the growth of coffee seedlings in greenhouse conditions;
- Evaluate the effects of selected endophytic bacteria strains on the growth of Robusta coffee trees in vegetative stage;
- Evaluate the effects of selected endophytic bacteria strains on the growth and development of mature Robusta coffee.

The research results were obtained as follows:

- Among the 9 studied endophytic bacterial strains, *Bacillus cereus* M15, *B. subtilis* EK17, *B. pumilus* BMT4 stimulated the growth of Robusta coffee, the obtained results showed that the bacteria increased in the leaf chlorophyll content of 9.5 – 39.4%; N% content of 10.3 to 20.9%, P% content of 77.8 to 111.1%, plant height of 17.5 – 51.2%; stem diameter of 25.6 to 27.8%; seedling fresh weight of 60.5

-117.5%; seedling fresh root weight of 218.5 - 235.2%; root length up to 24.6% compared to the DC control.

- The B1 combination (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) and B2 combination (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) showed the best effect on N and P nutrient uptake thus enhancing the growth of young Robusta coffee trees when applied at the dosage of 20 - 30 ml of bacterial suspension (10^9 CFU/mL) per tree.

- The B1 combination (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) and B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) had positively affected on the mature coffee leaf chlorophyll content, N and P nutrient uptake, that lead to promoting the growth and development of mature coffee trees, increasing the number of fruits/bunches. These results increased the coffee productivity of 14.8 – 20.9%.

- Applying the B2 combination (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) and B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) with the dosage of 20 - 30 ml/plant for coffee seedlings or 30 - 40 ml/plant for mature coffee effectively reduced the density of *Meloidogyne* sp. and *Pratylenchus* sp. down to 80%.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
TÓM TẮT	iii
SUMMARY	v
MỤC LỤC.....	vii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	x
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	xi
DANH MỤC CÁC ĐỒ THỊ, HÌNH ẢNH.....	xiv
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN.....	5
1.1. Khái niệm vi khuẩn nội sinh thực vật	5
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu.....	5
1.1.2. Định nghĩa.....	5
1.1.3. Nguồn gốc vi khuẩn nội sinh thực vật	6
1.1.4. Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh thực vật	7
1.1.5. Ảnh hưởng của các hoạt động nông nghiệp đối với quần thể vi khuẩn nội sinh	11
1.1.6. Tính cây chủ với chủng vi khuẩn đặc thù và số lượng các tế bào vi khuẩn cần thiết cho việc xâm nhập vào thực vật	13
1.2. Vai trò vi khuẩn nội sinh thực vật.....	13
1.2.1. Khả năng cố định đạm sinh học của vi khuẩn nội sinh.....	15
1.2.2. Khả năng phân giải lân khó tan của vi khuẩn nội sinh	19
1.2.3. Khả năng tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) của vi khuẩn nội sinh ...	22
1.2.4. Khả năng đối kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật.....	23
1.3. Ứng dụng vi khuẩn nội sinh thực vật trong nông nghiệp.....	29
1.3.1. Phân vi sinh cố định đạm	29

1.3.2. Phân vi sinh hòa tan lẫn khó tan	32
1.3.3. Phân vi sinh kích thích, điều hoà sinh trưởng thực vật	34
1.3.4. Phân vi sinh đa chức năng.....	35
1.4. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn nội sinh cây cà phê.....	35
1.4.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước	35
1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	39
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu	42
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	42
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu:	42
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	43
2.2.1. Thời gian nghiên cứu	43
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	43
2.3. Nội dung nghiên cứu	44
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	44
2.4.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê với trong điều kiện nhà lưới	44
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng	47
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kinh doanh ngoài đồng ruộng....	49
2.4.4. Phương pháp lấy mẫu và theo dõi các chỉ tiêu.....	52
2.4.5. Phương pháp xử lý số liệu:	55
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	56
3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	56
3.1.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	56
3.1.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	59
3.1.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm	61

3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.....	71
3.2.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.....	71
3.2.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.....	73
3.2.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	76
3.2.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	79
3.2.5. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng kí sinh cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	94
3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng và phát triển của cà phê với giai đoạn kinh doanh.....	104
3.3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	104
3.3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá cây cà phê với giai đoạn kinh doanh.....	107
3.3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tuyến trùng kí sinh hại cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	109
3.3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài đoạn cành dự trữ và số đốt trên đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	121
3.3.5. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến một số chỉ tiêu cấu thành năng suất nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh.....	125
3.3.6. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ nhân cà phê đạt tiêu chuẩn xuất khẩu.....	131
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	134
1. Kết luận:	134
2. Kiến nghị.....	135
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	136

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu viết tắt	Nghĩa đầy đủ
B	: vi khuẩn (Bacteria)
B.	: <i>Bacillus</i>
C _{car}	: carotenoid
Chl _a	: diệp lục a
Chl _b	: diệp lục b
cs.	: cộng sự (dùng cho tài liệu tiếng Việt)
CT	: công thức
D	: liều lượng (Dose)
ĐC	: đối chứng
<i>et al.</i>	: và cộng sự (dùng cho tài liệu tiếng Anh)
KD	: kinh doanh
KTCB	: kiến thiết cơ bản
LLL	: lần lặp lại
N	: đạm
P	: lân
STT	: số thứ tự
SXL	: sau xử lý
T	: tháng
TB	: trung bình
TXL	: trước xử lý

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh thực vật	8
Bảng 1.2. Khả năng kiểm soát tác nhân gây bệnh thực vật của một số vi khuẩn nội sinh thực vật.....	24
Bảng 2.1. Công thức thí nghiệm vườn kiến thiết cơ bản ngoài đồng ruộng	48
Bảng 2.2. Công thức thí nghiệm vườn kinh doanh ngoài đồng ruộng.....	50
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng sắc tố quang hợp trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm	60
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều cao, đường kính gốc thân và khối lượng tươi của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm	63
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến bộ lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	65
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng bộ rễ của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm	67
Bảng 3.5. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản sau thí nghiệm	72
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất	74
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục và hàm lượng carotenoid (C_{car}) trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	77
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn đến chiều cao cây cà phê với (cm) giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất	80
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến đường kính gốc của cây cà phê với (mm) giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất.....	83
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến số cặp lá trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất.....	86
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến số cặp cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	88
Bảng 3.12. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	90
Bảng 3.13. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến số đốt trên cành cơ bản của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ hai	92
Bảng 3.14. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến số quả/chùm của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.....	93

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	95
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	97
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả phòng trừ tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản	100
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong lá cà phê với giai đoạn kinh doanh.....	105
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá cà phê với giai đoạn kinh doanh	108
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất (con/50 g đất) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	110
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	111
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ <i>Pratylenchus</i> sp. trong rễ (con/5g rễ) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	113
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp. trong rễ (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	114
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ <i>Meloidogyne</i> sp. trong đất (con/50 g đất) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	116
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> sp. trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	117
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ <i>Meloidogyne</i> sp. trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	119
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt <i>Meloidogyne</i> sp. trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	120
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	122
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số đốt trên đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	124
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số quả trên chùm của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh	126

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ tươi : nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh	127
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến năng suất nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh	129
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ nhân trên sàng 16 của cà phê với giai đoạn kinh doanh	132

DANH MỤC CÁC ĐỒ THỊ, HÌNH ẢNH

Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng đạm và lân trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm	56
Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn đến diễn biến đường kính gốc cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản ..	82
Hình 1.1. Tác dụng của vi khuẩn nội sinh thực vật và ứng dụng.....	14
Hình 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	64
Hình 3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sự phát triển bộ rễ cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.....	68
Hình 3.3. Vi khuẩn cư trú bên trong rễ cây cà phê	69
Hình 3.4. Khả năng tương hợp giữa các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc	70

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Phân bón và thuốc bảo vệ thực vật hóa học đang ngày càng bị nông dân lạm dụng nhằm mục đích tăng năng suất cây trồng. Hiện trạng này không những làm gia tăng chi phí sản xuất mà còn có nguy cơ gây ô nhiễm đất, nước, môi trường và nông sản. Nhằm giảm bớt lượng phân và thuốc hóa học sử dụng trên đồng ruộng nhưng vẫn đảm bảo khả năng sinh trưởng, phát triển của cây trồng, tiết kiệm chi phí sản xuất, hạn chế ô nhiễm môi trường và giảm thiểu những tác động xấu đến sức khỏe của người sản xuất cũng như người tiêu dùng, việc sử dụng các loại phân bón và chế phẩm sinh học có chứa các chủng vi sinh vật đa chức năng có khả năng hạn chế tác hại của các tác nhân gây hại cây trồng nhưng vẫn đảm bảo dinh dưỡng cho cây trồng sinh trưởng, phát triển tốt đang được rất nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu.

Một trong những nhóm vi sinh vật có lợi đang được quan tâm nghiên cứu nhiều hiện nay là vi khuẩn nội sinh thực vật. Đây là những vi khuẩn sống trong mô thực vật, không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ (Schulz, 2006 [177], Wang *et al.*, 2009 [211]); trái lại, chúng còn kích thích sinh trưởng của cây chủ một cách trực tiếp hoặc/và gián tiếp thông qua nhiều cơ chế khác nhau (Bent and Chanway, 1998) [48], Ryan *et al.*, 2008 [175]).

Cà phê là một trong những mặt hàng nông sản chiến lược, đóng góp hơn 3,5 tỷ USD cho ngân sách nhà nước (Nguyễn Thị Lại và Đỗ Thị Mỹ Hiền, 2019) [15]. Chủ trương của Nhà nước là hình thành các vùng trồng cà phê lớn, sản xuất bền vững, đạt các tiêu chuẩn của cà phê chứng chỉ quốc tế đáp ứng nhu cầu xuất khẩu và mang lại giá trị lợi nhuận cao (Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk, 2013) [28]. Tuy nhiên, sản xuất cà phê Việt Nam nói chung hiện đang phải đối mặt với nhiều thách thức, trong đó có vấn đề lạm dụng phân bón hóa học (Trương Hồng và cs., 2013) [14]. Điều này chẳng những làm gia tăng chi phí sản xuất mà còn đã và đang làm giảm khả năng chống chịu của cây cà phê dẫn đến bùng nổ dịch bệnh, ảnh hưởng không tốt đến

chất lượng cà phê Việt Nam trên thị trường thế giới và cũng là nguyên nhân có thể dẫn đến thoái hóa đất canh tác, ô nhiễm nguồn nước và môi trường sống. Ngoài ra, dư lượng hóa học còn làm giảm chất lượng hạt cà phê nhân, làm sản phẩm khó có thể đi vào các thị trường lớn đòi hỏi chất lượng cao. Do đó, việc nghiên cứu tìm ra các giải pháp thay thế một phần phân bón và thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong sản xuất cà phê hiện đang là vấn đề quan tâm của nhiều nhà khoa học.

Những kết quả nghiên cứu ban đầu trên thế giới và ở Việt Nam cho thấy một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê có hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp kích thích tố và đối kháng cao với một số tác nhân gây bệnh hại trên cây cà phê vối (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997 [108], Shiomi *et al.*, 2006 [182], Mekete *et al.*, 2009 [134], Nguyễn Ngọc Mỹ, 2012 [17], Trương Vĩnh Thới, 2012 [27], Oliveira *et al.*, 2013 [155]). Tuy nhiên, những nghiên cứu này mới chỉ dừng lại ở việc thu thập, phân lập và xác định một số hoạt tính sinh học của chúng trong điều kiện in vitro và trên cây con trong nhà lưới.

Xuất phát từ thực tế trên, đề tài “**Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*)**” đã được tiến hành.

2. Mục tiêu và phạm vi nghiên cứu của đề tài

a. Mục tiêu nghiên cứu

Đề tài được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển của cây cà phê vối trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng. Trên cơ sở đó, tuyển chọn các chủng có hiệu quả và xác định được hỗn hợp chủng và liều lượng áp dụng thích hợp nhằm hỗ trợ tăng trưởng và tăng năng suất cà phê.

b. Phạm vi nghiên cứu

- Kế thừa kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh trên cây cà phê chè và cà phê vối của Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại

học Tây Nguyên (Nguyễn Ngọc Mỹ, 2012 [17], Trương Vĩnh Thới, 2012 [27] và Ngô Văn Anh và cs., 2017[1]), đề tài tuyển chọn một số chủng có hoạt tính sinh học cao để đưa vào đánh giá hoạt tính trên cây cà phê trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng.

- Đề tài chỉ nghiên cứu vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê mà không nghiên cứu vi khuẩn nội sinh ở các bộ phận khác trong cây.

- Đề tài không nghiên cứu phát triển chế phẩm mà tập trung vào đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng, phát triển cây cà phê với bằng dịch huyền phù của một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê trong điều kiện nhà lưới và trên đồng ruộng trên nền đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

a. Ý nghĩa khoa học

- Kết quả nghiên cứu của đề tài làm sáng tỏ vai trò của một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê trong việc thúc đẩy sinh trưởng, phát triển cây cà phê với;

- Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu sâu hơn về vi khuẩn nội sinh cây cà phê và nghiên cứu phát triển các loại chế phẩm sinh học từ vi khuẩn nội sinh cây cà phê với.

b. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của đề tài là cơ sở cho việc lựa chọn các chủng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây cà phê có khả năng thúc đẩy sinh trưởng phát triển cây cà phê để nghiên cứu sản xuất phân sinh học có hiệu quả, ứng dụng trong canh tác cà phê với nhằm giảm lượng phân hoá học nhưng vẫn đảm bảo sinh trưởng, phát triển và năng suất cây cà phê, góp phần phát triển một nền nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

4. Những điểm mới của đề tài

- Đề tài đề cập đến vấn đề mới là ảnh hưởng của hỗn hợp các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng và phát triển của cây cà phê với các giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh trong điều kiện đồng ruộng.

- Đề tài đã đánh giá ảnh hưởng của hỗn hợp các chủng vi khuẩn nội sinh đến mật độ và hiệu quả phòng trừ hai loại tuyến trùng kí sinh chính gây hại rễ cây cà phê với trong điều kiện đồng ruộng và xác định được lượng và hỗn hợp huyền phù vi khuẩn thích hợp để hạn chế hơn 70% mật độ tuyến trùng kí sinh cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh

- Đề tài đã nghiên cứu ảnh hưởng của các hỗn hợp chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục, carotenoid, N và P trong lá, là những minh chứng rõ ràng cho sự ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây cà phê với các giai đoạn. Trên cơ sở này, đã xác định được lượng và hỗn hợp huyền phù vi khuẩn thích hợp áp dụng cho cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm vi khuẩn nội sinh thực vật

1.1.1. Lịch sử nghiên cứu

Nghiên cứu về vi khuẩn không gây bệnh cư trú bên trong mô thực vật đã bắt đầu từ năm 1926, mặc dù sự xuất hiện của chúng đã được ghi nhận từ năm 1870 trong công trình nghiên cứu của Pasteur *et al.* (Hallmann *et al.*, 1997) [88]. Kể từ năm 1940, đã có rất nhiều báo cáo về vi khuẩn nội sinh bản địa cư trú trong mô của nhiều loại thực vật khác nhau, kể cả hạt, noãn, củ, rễ, thân lá và quả (Hallmann *et al.*, 1997) [88]. Các công bố ban đầu coi vi khuẩn nội sinh là các vi khuẩn tạp nhiễm do khử trùng bề mặt chưa kỹ hoặc là các tác nhân gây bệnh tiềm ẩn (Smith, 1905) [189]. Tuy nhiên, các nghiên cứu sau này đã chứng minh rằng vi khuẩn nội sinh có thể cải thiện sinh trưởng thực vật, làm giảm các triệu chứng và tác nhân gây bệnh (Chen *et al.*, 1995 [62], Lodewyckx *et al.*, 2002 [126]).

Tiếp đó, các nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh chủ yếu tập trung vào các tác dụng có lợi và sinh thái của chúng (Ryan *et al.*, 2008) [175] để hiểu rõ hơn về phương thức tương tác của vi khuẩn nội sinh với kí chủ của chúng. Gần đây, các nhà khoa học lại tập trung vào việc sàng lọc các dòng vi khuẩn nội sinh và nghiên cứu hiệu quả của chúng đối với sinh trưởng, phát triển của thực vật và hạn chế ô nhiễm môi trường nhằm sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp (Senthilkumar *et al.*, 2011) [180].

1.1.2. Định nghĩa

Vi khuẩn nội sinh thực vật ("*Endophytic bacteria*") hiểu theo nghĩa đen là vi khuẩn cư trú bên trong cây ("*endon*" = bên trong; "*phyton*" = cây). Kể từ khi phát hiện ra các vi sinh vật nội sinh ở Đức vào năm 1904, các nhà nghiên cứu đã định nghĩa vi sinh vật nội sinh theo nhiều cách khác nhau, thường là tùy thuộc phương pháp vi sinh vật nội sinh được phân lập và đánh giá. Hallmann *et al.* (1997) [88] mô tả vi khuẩn nội sinh là những sinh vật có thể phân lập được từ các bộ phận đã khử

trùng bề mặt của cây hoặc được chiết xuất từ các nội mô thực vật và không gây thiệt hại cho cây chủ.

Kado (1992) [109] định nghĩa vi khuẩn nội sinh là những "vi khuẩn cư trú trong mô thực vật sống mà không làm tổn hại đáng kể hoặc đạt được lợi ích khác ngoài việc đảm bảo cư trú". Định nghĩa này được xem là quá hạn chế, vì nó loại trừ khả năng các vi khuẩn nội sinh có thể hình thành các mối quan hệ cộng sinh với kí chủ.

Bacon và White (2000) [39] đã đưa ra một định nghĩa về vi khuẩn nội sinh thực vật toàn diện hơn và được chấp nhận rộng rãi như sau: "*Vi khuẩn nội sinh thực vật là những vi khuẩn xâm chiếm các mô sống và cư trú ở bên trong thực vật mà không gây ra bất kỳ tác động tiêu cực tức thời rõ ràng nào*". Khái niệm này sẽ loại trừ các vi khuẩn gây bệnh cho thực vật.

1.1.3. Nguồn gốc vi khuẩn nội sinh thực vật

Vi khuẩn nội sinh thực vật hiện diện phổ biến trong hầu hết tất cả các loài thực vật, chúng sống tiềm ẩn hoặc tích cực xâm chiếm nội mô thực vật một cách cục bộ hoặc hệ thống (Hallmann *et al.*, 1997) [88]. Vi khuẩn nội sinh bắt nguồn từ các cộng đồng vi khuẩn biểu sinh vùng rễ và lá, cũng như từ hạt hoặc các vật liệu nhân giống vô tính. Nhiều nghiên cứu cho rằng vùng rễ là nguồn vi khuẩn nội sinh chính, từ đó chúng xâm chiếm vào bên trong mô tế bào thực vật (Verma *et al.*, 2001 [209], Bressan and Borges, 2004 [54]). Vì vậy, vi khuẩn nội sinh thường được phát hiện ở rễ với mật độ cao ngay từ những giai đoạn đầu của sự phát triển (McInroy and Kloepper, 1995) [132].

Rễ được xem là vị trí ưa thích nhất, từ đó vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cơ thể thực vật. Vi khuẩn nội sinh xâm chiếm tế bào nội mô từ các vị trí như bề mặt rễ, lông hút, chóp rễ và điểm phát sinh rễ bên (Verma *et al.*, 2001) [209]. Ngoài ra, vi khuẩn cũng có thể xâm nhập vào cây thông qua các khe hở tự nhiên như: khí khổng, thủy khổng (hydathode) và các lỗ xóp nhỏ trên mô thực vật. Hơn nữa, chúng có thể di chuyển một cách hệ thống bên trong cây, do đó, về mặt lý thuyết có thể dẫn đến tình trạng cân bằng mật độ vi khuẩn bên trong cây. Sự thật là vi khuẩn nội sinh thường

tập trung với mật độ thấp ở các bộ phận khí sinh có thể là một chỉ thị cho biết điều kiện môi trường ở các mô này ít thích hợp hơn cho sự phát triển của vi khuẩn nội sinh do sự biến động trong ngày lớn về nhiệt độ, hàm lượng nước, dinh dưỡng và tia UV. Ngược lại, hệ thống rễ đường như tạo ra một môi trường sống ổn định hơn nơi mà nhiệt độ và hàm lượng nước ổn định cho vi khuẩn cư trú (McInroy and Kloepper, 1995) [132].

Sau khi xâm nhập được vào bên trong cây chủ, vi khuẩn nội sinh sẽ cư trú ở các ổ nội sinh (endophytic niche). Các ổ nội sinh sẽ bảo vệ vi khuẩn nội sinh khỏi các tác động xấu từ môi trường, đồng thời giúp chúng xâm chiếm và thiết lập bên trong tế bào, mô thực vật. Những vi khuẩn nội sinh thường xâm chiếm khoảng gian bào và được phân lập từ tất cả các bộ phận của cây như rễ, thân, lá, quả và kể cả hạt (Oliveira *et al.*, 2013) [155].

1.1.4. Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh thực vật

Thành phần vi khuẩn nội sinh thực vật rất đa dạng, chúng được phân lập từ cả thực vật một lá mầm và hai lá mầm, từ các loài thân gỗ (sồi, lê, keo ...), thân bụi (cà phê ...), thân leo (hồ tiêu ...) đến các thực vật thân thảo (lúa, củ cải đường, ngô, nha đam và cỏ chăn nuôi ...). Rất nhiều tác giả đã tổng hợp sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh thực vật (Hallmann *et al.*, 1997 [88], Lodewyckx *et al.*, 2002 [126], Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006 [174], Ryan *et al.*, 2008 [175]). Gần đây nhất, Miliute *et al.* (2015) [140] đã tóm tắt các chủng vi khuẩn nội sinh phân bố rộng và phổ biến nhất trong nhiều loại cây trồng nông nghiệp. Tuy nhiên, danh sách này vẫn chưa được thống kê đầy đủ vì các chủng vi khuẩn và loài cây trồng mà chúng nội sinh rất đa dạng. Theo Strobel *et al.* (2004) [196], mỗi loài thực vật đều có một hay nhiều loài vi khuẩn nội sinh cư trú.

Bảng 1.1 tổng hợp các loại thực vật khác nhau có thể có thành phần vi khuẩn nội sinh tương tự nhau và một loài vi khuẩn có thể nội sinh nhiều loài thực vật khác nhau. Theo tổng kết của nhiều tác giả, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* và *Agrobacterium* là các chi vi khuẩn nội sinh phổ biến nhất, được phân lập được từ nội

mô các cây khỏe của hơn 129 loài thực vật, đại diện cho hơn 54 chi (Hallmann *et al.*, 1997 [88], Miliute *et al.*, 2015 [140]).

Bảng 1.1. Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh thực vật

Vi khuẩn nội sinh	Thực vật	Nguồn dẫn
α - Proteobacteria		
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Lúa	Engelhard <i>et al.</i> 2000*
<i>Azospirillum brasilense</i>	Chuối	Weber <i>et al.</i> 1999*
<i>Azospirillum amazonense</i>	Chuối, dứa	Weber <i>et al.</i> 1999*
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Lúa	Chantreuil <i>et al.</i> 2000*
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Mía, Cà phê, Lúa Dứa, Khoai lang	Cavalcante & Döbereiner 1988* Jiménez-Salgado <i>et al.</i> 1997* Muthukumarasamy <i>et al.</i> (2002) [149] (Tapia-Hernández <i>et al.</i> , 2000) [198]
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Cây có múi	Araujo <i>et al.</i> 2002*
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Scots pine, Cây có múi	Araujo <i>et al.</i> 2002*; Pirttilä <i>et al.</i> 2004*
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Lúa	Yanni <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter</i>	Cà rốt, lúa	Surette <i>et al.</i> (2003)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Khoai lang	Reiter <i>et al.</i> 2003*
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Lúa	Engelhard <i>et al.</i> 2000*
β - Proteobacteria		
<i>Azoarcus</i> sp.	Cỏ Kallar, Lúa	Engelhard <i>et al.</i> 2000*; Reinhold-Hurek <i>et al.</i> (1993) [169]
<i>Burkholderia pickettii</i>	Ngô	(Martinez-Ochoa, 2000) [130]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Đậu lupin Cây có múi	Araujo <i>et al.</i> 2001*; Barac <i>et al.</i> 2004*
<i>Burkholderia</i> sp.	Chuối, dứa, Lúa	Weber <i>et al.</i> 1999*; Engelhard <i>et al.</i> 2000*
<i>Chromobacterium violaceum</i> ^a	Lúa	Phillips <i>et al.</i> 2000*
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Mía, lúa, chuối, ngô, sorghum	Olivares <i>et al.</i> 1996*; Weber <i>et al.</i> 1999*
<i>Herbaspirillum rubrisulbalbicans</i>	Mía	Olivares <i>et al.</i> 1996*
γ-Proteobacteria		

<i>Citrobacter</i> sp.	Chuối	Martínez <i>et al.</i> 2003*
<i>Enterobacter</i> spp.	Ngô	McInroy and Kloepper (1995) [133]
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]
<i>Enterobacter cloacae</i> ^a	Cây có múi, Ngô, Cà phê vối	Araujo <i>et al.</i> 2002*; Hinton <i>et al.</i> 1995*; Trương Vĩnh Thới (2012) [27]
<i>Enterobacter agglomerans</i> ^a	Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Cà phê	Miguel <i>et al.</i> (2013) [138]
<i>Enterobacter asburiae</i>	Khoai lang	Asis & Adachi 2003*
<i>Erwinia</i> sp.	Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]
<i>Escherichia coli</i> ^b	Xà lách Cà phê chè	Ingham <i>et al.</i> 2005* Miguel <i>et al.</i> (2013) [138]
<i>Klebsiella</i> sp.	Lúa mì, Khoai lang, Ngô	Engelhard <i>et al.</i> 2000*; Iniguez <i>et al.</i> 2004*; Reiter <i>et al.</i> 2003*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]
<i>Klebsiella variicola</i> ^b	Chuối, lúa, ngô, mía	Rosenblueth <i>et al.</i> 2004*
<i>Klebsiella terrigena</i>	Cà rốt	Surette <i>et al.</i> (2003)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Đậu nành Cà phê chè	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119, Miguel <i>et al.</i> (2013) [138]]
<i>Pantoea</i> sp.	Lúa, Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]; Verma <i>et al.</i> 2004
<i>Pantoea vagans</i>	Cà phê chè	Miguel <i>et al.</i> (2013) [138]
<i>Pantoea agglomerans</i>	Cây có múi, Khoai lang	Araujo <i>et al.</i> 2001, 2002*; Asis & Adachi 2003*
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Marigold Cà rốt	Sturz & Kimpinski 2004*; Surette <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas putida</i>	Cà rốt	Surette <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cà rốt	Surette <i>et al.</i> (2003)
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Đậu nành	(Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> , 2004) [119]
<i>Pseudomonas syringae</i>	Cà phê chè	Mekete <i>et al.</i> (2009) [134]
<i>Pseudomonas synxantha</i>	Scots pine	Prittila <i>et al.</i> 2004*

<i>Salmonella enterica</i> ^b	Alfalfa, Cà rốt, cải củ, Cà chua	Cooley <i>et al.</i> 2003*; Guo <i>et al.</i> 2002*; Islam <i>et al.</i> 2004*
<i>Serratia sp.</i>	Lúa	S&hiya <i>et al.</i> 2005*
<i>Serratia marcescens</i>	Lúa	Gyaneshwar <i>et al.</i> 2001*
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Ammophila arenaria, Elymus mollis</i>	Dalton <i>et al.</i> 2004 *
Firmicutes		
<i>Bacillus pumilus</i>	Cà phê chè	(Mekete <i>et al.</i> , 2009) [134, Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17]]
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>	Cà phê chè	(Mekete <i>et al.</i> , 2009) [134, Miguel <i>et al.</i> , 2013) [138]
<i>B. brevis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. mycoides</i>	Cà phê chè	Mekete <i>et al.</i> (2009) [134]
<i>Bacillus spp.</i>	Cây có múi	Araujo <i>et al.</i> 2001, 2002*
<i>Bacillus megaterium</i>	Ngô Cà rốt, Cây có múi	Araujo <i>et al.</i> 2001; McInroy & Kloepper 1995; Surette <i>et al.</i> 2003
<i>Clostridium</i>	<i>Miscanthus sinensis</i>	Miyamoto <i>et al.</i> 2004*
<i>Paenibacillus odorifer</i>	Khoai lang	Reiter <i>et al.</i> 2003*
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cà rốt	Surette <i>et al.</i> 2003*
Bacteroidetes		
<i>Sphingobacterium sp.</i>	Lúa	Phillips <i>et al.</i> 2000*

Ghi chú: (*): dẫn theo Rosenblueth and Martínez-Romero (2006) [174]

Sự đa dạng của vi khuẩn nội sinh giảm khi môi trường bị ô nhiễm, đất đai bị khai thác quá mức và lạm dụng phân hóa học (Mekete *et al.*, 2009) [134]. Ngoài ra, mật độ vi khuẩn nội sinh còn bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, lượng mưa, kỹ thuật canh tác và các chất cải tạo đất (Hallmann *et al.*, 1999 [90], Berg and Hallmann, 2006 [49]. Thành phần vi khuẩn nội sinh ở nơi có điều kiện khí hậu ôn đới đa dạng hơn so với ở vùng nhiệt đới.

Sự hiện diện của các loài nội sinh khác nhau phụ thuộc chủ yếu vào kiểu gen của vi khuẩn cũng như của thực vật cùng với các yếu tố hữu sinh và vô sinh khác.

Trong khi một loài cây chủ bao gồm vài loài thuộc vài chi vi khuẩn nội sinh khác nhau. Loại mô thực vật hay thời điểm mà vi khuẩn nội sinh được phân lập khác nhau cũng mang lại kết quả khác nhau về mật độ vi khuẩn nội sinh (Mekete *et al.*, 2009 [134], Miguel *et al.*, 2013 [138]). Nhiều nghiên cứu về quần thể vi khuẩn nội sinh cho thấy rằng mặc dù vi khuẩn nội sinh xâm chiếm toàn bộ cây, nhưng rễ thường là nơi tập trung nhiều loài nhất. Các loài vi khuẩn nội sinh chủ yếu thuộc nhóm α -, β - và γ -Proteobacteria và có liên quan chặt chẽ với các loài biểu sinh (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) [119].

Phần lớn các chủng vi khuẩn nội sinh có thể nuôi cấy được thuộc nhóm *Proteobacteria*, trong khi các chủng *Firmicutes*, *Actinobacteria* và *Bacteroides* nuôi cấy ít phổ biến hơn (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) [169] .

Mật độ vi khuẩn nội sinh trong cây biến động tùy thuộc loài thực vật, bộ phận cây, giai đoạn sinh trưởng và điều kiện môi trường. Nhìn chung, mật độ vi khuẩn nội sinh thường cao nhất ở mô rễ và thường dao động ở khoảng 10^3 - 10^6 CFU/g rễ tươi (McInroy and Kloepper, 1995) [133]. Mật độ này được cho là thấp hơn so với mật độ vi khuẩn kí sinh gây hại thực vật (dao động ở khoảng 10^8 - 10^{10} CFU/g rễ tươi (Hallmann, 2001) [89]. Mật độ vi khuẩn nội sinh bên trong các bộ phận khí sinh khoảng 10^4 CFU/g thân tươi và khoảng 10^3 CFU/g lá tươi (Quadt-Hallmann and Kloepper, 1996 [166], Hallmann *et al.*, 1997 [88]). Ở các bộ phận như hoa, quả và hạt có mật độ vi khuẩn nội sinh thường thấp nhất.

1.1.5. Ảnh hưởng của các hoạt động nông nghiệp đối với quần thể vi khuẩn nội sinh

Các biện pháp làm đất làm thay đổi đáng kể các đặc tính lý, hóa và sinh học của đất (García-Orenes *et al.*, 2013) [79]. Các hoạt động làm đất có thể làm giảm sự đa dạng của vi sinh vật đất do phá hủy cơ học, đất bị nén chặt, giảm thể tích mao quản, làm mất nước và làm gián đoạn việc tiếp cận nguồn thức ăn của vi sinh vật. Ngoài ra, sử dụng thuốc hóa học quá mức để trừ dịch hại cũng có thể gây ra những thay đổi đáng kể về chức năng và cấu trúc quần thể vi khuẩn trong đất (Pampulha and Oliveira, 2006) [158]. Thuốc trừ dịch hại có thể ức chế trực tiếp đến sự tăng trưởng

và chuyển hóa của vi sinh vật, cũng như sự đa dạng của vi sinh vật có thể thay đổi do sự thay đổi tổng thể trong cấu trúc hệ sinh thái nông nghiệp. Bên cạnh đó, các biện pháp kỹ thuật canh tác làm thay đổi số lượng, chất lượng cũng như sự phân bố theo không gian của tàn dư thực vật trong đất, thông qua sự thay đổi các chất dinh dưỡng và các yếu tố đầu vào (Miliute *et al.*, 2015) [140]. Tương tự như vậy, việc sử dụng phân khoáng hoặc phân hữu cơ cũng được ghi nhận có ảnh hưởng khác nhau đến thành phần và sinh khối vi sinh vật (Zhong *et al.*, 2010) [222]. Sự đa dạng vi sinh vật và hoạt động trao đổi chất tăng lên đáng kể trong đất có sử dụng phân hữu cơ. Tuy nhiên, việc bón phân chuồng vào đất có khả năng thay đổi thành phần của quần thể vi sinh vật nội sinh và gây hại môi trường (Soupir *et al.*, 2006) [192].

Đa số vi khuẩn nội sinh thực vật là nội sinh không bắt buộc và ở một giai đoạn nào đó trong vòng đời, chúng có thể tồn tại bên ngoài cây ký chủ (Hardoim *et al.*, 2008) [93]. Những chủng vi khuẩn nội sinh này thường bắt nguồn từ đất, xâm nhiễm vào rễ của cây chủ và xâm chiếm gian bào. Vì vậy, có thể giả định rằng cộng đồng vi sinh vật nội sinh là đại diện cho một tập con của quần thể vi sinh vật rộng hơn của vùng rễ và nó sẽ phản ánh sự khác biệt gây ra bởi các kỹ thuật canh tác đặc trưng cho cộng đồng vi sinh vật đất. Tuy nhiên, nghiên cứu về tác động của các kỹ thuật canh tác đối với biến động quần thể vi sinh vật đất chỉ giới hạn trong một số nghiên cứu. Các vi khuẩn nội sinh *Acetobacter diazotrophicus* có khả năng cố định đạm đã được chứng minh là giảm đáng kể mật độ bên trong cây mía khi được bón phân với hàm lượng đạm cao (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999) [75]. Phân tích thành phần vi khuẩn nội sinh rễ cây ngô ở vườn được xử lý bằng thuốc diệt cỏ và các loại phân bón khác nhau cho thấy sự khác nhau về thành phần và mật độ vi khuẩn nội sinh rễ cây ngô ở vườn sử dụng phân vô cơ khác với vườn trồng bằng phân hữu cơ (Seghers *et al.*, 2004) [179]. Ở những vườn có sử dụng phân hữu cơ, mật độ vi khuẩn nội sinh thường cao hơn so với ở vườn sử dụng phân vô cơ (Seghers *et al.*, 2004) [179]. Trong khi đó, ảnh hưởng của việc xử lý thuốc diệt cỏ đến thành phần vi khuẩn nội sinh không đáng kể. Các nghiên cứu này không cho thấy liệu sự thay đổi quần thể vi khuẩn nội sinh có phải là hậu quả của sự thay đổi quần thể vi khuẩn tổng số trong đất khi xử lý phân

bón hoặc các kỹ thuật canh tác có ảnh hưởng trực tiếp đến cộng đồng nội sinh rễ. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác chứng minh rằng việc xử lý chitin vào đất dẫn đến sự thay đổi các quần thể vi khuẩn trong rễ, vùng rễ và đất trồng bông vải (Hallmann *et al.*, 1999) [90].

1.1.6. Tính cây chủ với chủng vi khuẩn đặc thù và số lượng các tế bào vi khuẩn cần thiết cho việc xâm nhập vào thực vật

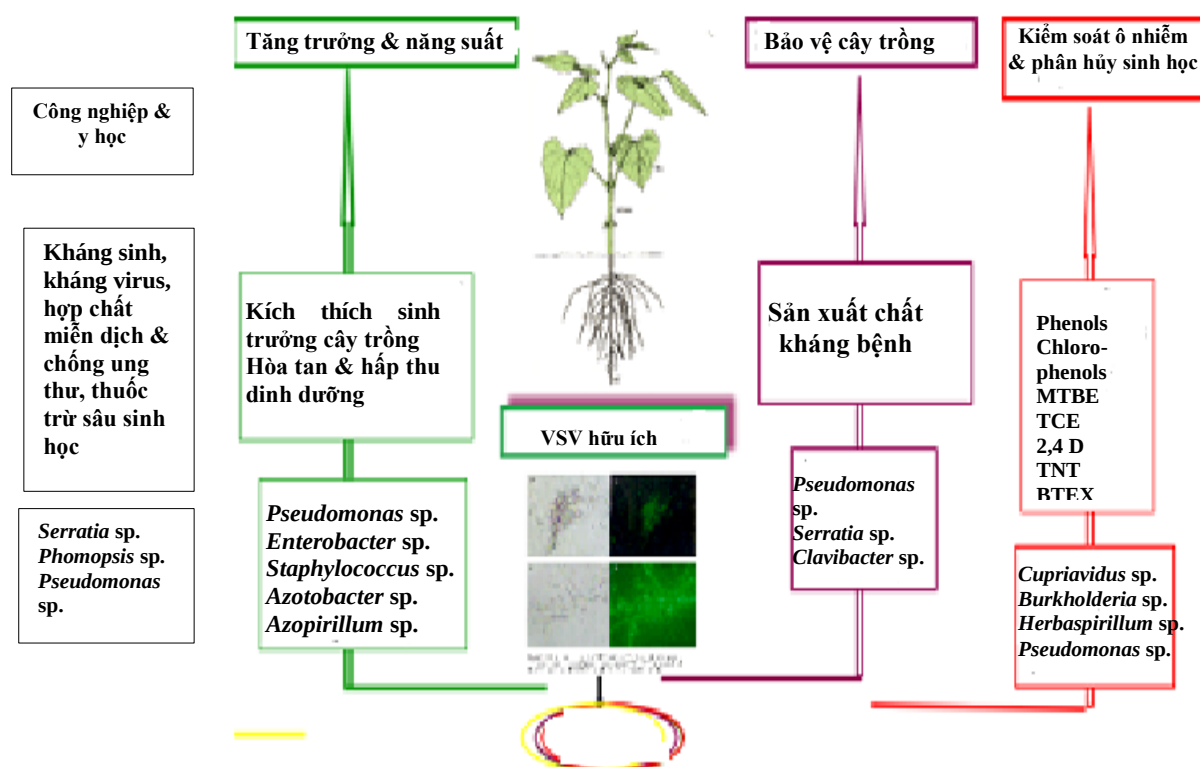
Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ loài thực vật này có thể được chủng thành công vào bên trong loại thực vật khác mà vẫn phát huy các đặc tính thúc đẩy sinh trưởng thực vật của chúng. Chẳng hạn như chủng *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R được phân lập từ nội mô cây thông *Pinus contorta* nhưng vẫn có thể xâm nhập thành công vào bên trong cây ngô, có định đạm sinh học và thúc đẩy sinh trưởng của cây (Puri *et al.*, 2015) [164]. Quá trình xâm nhiễm nội mô tối ưu đạt được khi lượng tế bào chủng nhiễm ban đầu là 10^3 - 10^4 CFU/cây.

Mật độ vi khuẩn nội sinh trong rễ thay đổi tùy theo từng loài cây chủ. Với thực vật hai lá mầm, mật độ tối đa là 10^5 CFU/g rễ, trong khi thực vật một lá mầm có mật độ cao hơn đáng kể, 10^7 - 10^8 CFU/g rễ (Dong *et al.*, 2003) [68]. Tuy nhiên, nguyên nhân của hiện tượng này vẫn chưa được làm sáng tỏ.

Việc nghiên cứu chủng nhiễm vi khuẩn nội sinh vào thực vật đã đưa đến một số kết luận sau: (i) chỉ cần một vài tế bào cũng đủ để vi khuẩn nội sinh xâm nhập được vào bên trong cây; (ii) chủng có khả năng xâm nhiễm tốt có thể xâm chiếm nội mô của nhiều loài thực vật khác nhau và; (iii) các chủng liên quan gần có thể khác biệt rất lớn về khả năng xâm nhập vào bên trong mô thực vật (Dong *et al.*, 2003) [68].

1.2. Vai trò vi khuẩn nội sinh thực vật

Vai trò của vi khuẩn nội sinh thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước. Tác dụng và ứng dụng của vi khuẩn nội sinh thực vật được trình bày tóm tắt trong hình 1.1.



Hình 1.1. Tác dụng của vi khuẩn nội sinh thực vật và ứng dụng

(Ryan *et al.*, 2008) [175]

Cơ chế của những tác động có lợi của vi khuẩn nội sinh đối với cây chủ tương tự như của các vi khuẩn vùng rễ có khả năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Compant *et al.*, 2010) [57]. Điều này là do hầu hết các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ nội mô các loài thực vật khỏe mạnh và có thể được xem như nội sinh không bắt buộc và có khả năng sống bên ngoài mô thực vật như những vi khuẩn vùng rễ (Di Fiori và Del Gallo, 1995, dẫn theo Lodewyckx *et al.*, 2002 [126]). Ngoài ra, nhiều chủng vi khuẩn nội sinh cây ngô ngọt và cây bông vải được ghi nhận là những chủng vi khuẩn vùng rễ phổ biến (McInroy and Kloepper, 1994) [131]. Vi khuẩn nội sinh thực vật thúc đẩy sinh trưởng của cây chủ một cách trực tiếp thông qua tăng cường tổng hợp kích thích tố sinh trưởng thực vật auxin (IAA), tăng hàm lượng các chất khoáng, giúp cố định đạm sinh học, phân giải lân khó tan, (Jasim *et al.*, 2013 [105], Nguyễn Thị Huỳnh Như và cs., 2013 [20], Milca *et al.*, 2014 [139]) hoặc gián tiếp thông qua tăng

khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh, giảm sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây (Ryan *et al.*, 2008) [175]. Ngoài ra, chúng còn có thể giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006 [174], Ryan *et al.*, 2008 [175]. Trong một số trường hợp chúng có thể đẩy mạnh tốc độ nảy mầm của hạt, thúc đẩy sự hình thành cây con trong điều kiện bất lợi (Chanway, 1997) [60]. Ngoài ra, vi khuẩn nội sinh còn có thể ngăn chặn mầm bệnh phát triển bằng cách tổng hợp các chất nội sinh trung gian, qua đó tiếp tục tổng hợp các chất chuyển hóa và các hợp chất hữu cơ mới. Vi khuẩn nội sinh cũng có thể có một số tác dụng có lợi khác như sản sinh *siderophore*, giúp phần nào thỏa mãn nhu cầu về sắt của cây chủ, giúp cây phòng chống lây nhiễm các mầm bệnh (Murugappan *et al.*, 2013) [148]. Như vậy, có thể thấy rằng tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn nội sinh trong sản xuất nông nghiệp bền vững là rất lớn.

1.2.1. Khả năng cố định đạm sinh học của vi khuẩn nội sinh

Nitơ là yếu tố dinh dưỡng hạn chế nhất cho sự phát triển của thực vật mặc dù trong khí quyển, chúng chiếm tới 78% thể tích không khí (Gupta *et al.*, 2012) [85]. Tuy nhiên, chúng tồn tại dưới dạng khí N_2 , thực vật không có khả năng đồng hóa trực tiếp được. Các vi sinh vật cố định đạm có khả năng hút đạm (N_2) trong không khí và biến đổi đạm từ dạng cây trồng không hấp thụ được (N_2) thành dạng đạm mà cây trồng hấp thụ được nhờ sự xúc tác của enzyme nitrogenase.

Quan hệ cộng sinh này có vai trò hết sức quan trọng trong sự ổn định chu trình dinh dưỡng nitơ, bổ sung nguồn đạm cho đất và dinh dưỡng cây trồng, ổn định năng suất mùa vụ, phát triển bền vững sinh thái (Nguyễn Hữu Hiệp, 2007) [12]. Hàng năm trên toàn thế giới, các vi khuẩn cố định đạm đã cố định được khoảng 160 – 170 triệu tấn ni tơ khí quyển và chuyển hóa thành nguồn phân đạm dưới các dạng khác nhau (Cao Ngọc Điệp, 2010) [7]. Như vậy, cây trồng có thể sử dụng nguồn đạm vô tận trong không khí nhờ có sự giúp đỡ của các vi sinh vật cố định đạm.

Trong số các thực vật không phải họ đậu, một số loài đã được phân lập và mô tả như là những loài cố định đạm nội sinh, bao gồm *Gluconacetobacter* (tên cũ:

Acetobacter) (Boddey *et al.*, 2003) [52], *Azoarcus* spp. (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) [170], *Serratia* spp. (Gyaneshwar *et al.*, 2002) [86], *Burkholderia* spp. và *Herbaspirillum* spp. (Baldani *et al.*, 2000) [42]. Các vi khuẩn cố định đạm cung cấp nitơ cố định sinh học cho cây chủ, tuy nhiên, lượng đạm mà chúng cung cấp rất biến động. Chẳng hạn như, hàm lượng N mà vi khuẩn nội sinh cây lúa cố định được đáp ứng 0-36 % nhu cầu N của cây (Malarvizhi and Ladha, 1999) [128] trong khi vi khuẩn nội sinh cây mía giúp đáp ứng 0 – 71,7% nhu cầu N của cây (Boddey *et al.*, 2003) [52]. Sự biến động về lượng đạm cố định được cho là phụ thuộc vào giống, giai đoạn sinh trưởng của cây, chủng vi khuẩn, phương pháp chủng nhiễm vi khuẩn và điều kiện môi trường (Boddey *et al.*, 2003 [52], Soad *et al.*, 2005 [191]).

Kết quả nghiên cứu cho thấy có nhiều vi khuẩn nội sinh giữ vai trò quan trọng trong sản xuất lúa, mía, lúa mì và giúp giảm lượng phân đạm cần bón trong quá trình canh tác. Chẳng hạn như, việc bổ sung *Rhizobium* cho cây lúa đã tiết kiệm được 96 kg N/ha, đáp ứng 2/3 lượng phân bón cần thiết cho lúa (Yanni *et al.*, 1997) [215], bón bổ sung *Burkholderia vietnamiensis* vào cây lúa đã giúp tiết kiệm được 25 - 30 kg phân đạm/ha (Tran *et al.*, 2000) [205].

Herbaspirillum được chứng minh là vi khuẩn nội sinh cố định đạm trong nhiều loài cây trồng như: mía, lúa, lúa mì, lúa mạch và các loại ngũ cốc (Baldani *et al.*, 2000) [42]. Khi được chủng vào cây lúa, một số dòng *H. seropedicae* làm tăng 100% khối lượng tươi cây lúa (Baldani *et al.*, 2000) [42]. Ngoài ra, *H. seropedicae* Z67 làm tăng hàm lượng N của giống lúa chịu phèn 29 - 61% (ở rễ) và 37 - 85% (ở thân). Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy khi chủng *H. seropedicae* vào hạt ngô rồi trồng trong nhà kính, sản lượng ngô tăng 49 - 82% so với công thức bón phân đạm.

Lượng đạm sinh học tổng hợp bởi các chủng *Herbaspirillum seropedicae* đáp ứng 31 – 54% nhu cầu đạm của cây lúa. Các chủng *Burkholderia* spp. chỉ cố định được khoảng 19% đạm tổng số của cây (Baldani *et al.*, 2000) [42].

Xét về hiệu quả cố định và cung cấp nitơ trực tiếp cho cây chủ, các vi khuẩn nội sinh được coi là tốt hơn các vi khuẩn vùng rễ do áp suất oxy ở bên trong mô thực vật thấp hơn so với ở trong đất. Khi vi khuẩn cố định đạm thiết lập quan hệ nội sinh với thực vật, hàm lượng nitơ thực vật tăng có thể là do sự cố định đạm sinh học hoặc tăng khả năng hấp thụ nitơ từ đất (Jha *et al.*, 2013) [106]. Một nghiên cứu quy mô thực hiện ở Braxin cho thấy 60 - 80% lượng nitơ tích lũy trong các loại giống lúa khác nhau là kết quả của quá trình cố định đạm sinh học (Boddey, 1995) [51]. Năng suất tổng thể của việc áp dụng kết hợp các vi khuẩn cố định đạm (*Rhizobium trifolii* và *Burkholderia* MG43) và giảm lượng phân bón tương đương với năng suất thu được từ công thức bón đầy đủ phân hoá học (Bhattacharyya and Jha, 2012) [50]. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* là vi khuẩn cố định đạm chính nội sinh trong cây lúa, với khả năng cố định đạm sinh học lên tới 150 Kg N/ha/năm (Bhattacharyya and Jha, 2012) [50]. Tuy nhiên, khả năng bổ sung đạm sinh học cho cây chủ có thể khác nhau tùy từng chủng vi khuẩn và loài cây chủ. Phân tích protein của giống lúa SP70-1143 được chủng vi khuẩn nội sinh *G. diazotrophicus* cho thấy sự biểu hiện gia tăng của ammonia lyase chứng tỏ sự trao đổi chất tăng lên do vi khuẩn giúp tăng khả năng hấp thụ nitơ (Lery *et al.*, 2011) [122].

Một số vi khuẩn nội sinh cố định đạm đã được phân lập từ cây lúa và có thể cung cấp N cố định được cho cây chủ (Gyaneshwar *et al.*, 2002) [86]. Nhiều chủng vi khuẩn nội sinh có phổ ký chủ rộng. Ví dụ: *H. seropedicae* đã được tìm thấy trong một loạt các loại cây trồng như cây ngô, lúa miến, lúa và các loài họ hòa thảo khác (Baldani *et al.*, 1986) [41]. Điều này cho thấy vi khuẩn nội sinh phân lập từ một loài cây có thể nội sinh được trong nhiều loài cây khác, thậm chí nhóm cây này không cùng chi, họ và bộ. Như vậy, các loài nội sinh cũng cho thấy tính kí chủ không chuyên tính giữa các loài thực vật. Chẳng hạn như, *Burkholderia* sp. phân lập từ hành tây nhưng cũng có thể nội sinh trong mô cây nho (Compant *et al.*, 2005) [58]

Khả năng cố định đạm của một vi khuẩn nội sinh bên trong cây kí chủ đã được chứng minh bằng nhiều phương pháp khác nhau: thí nghiệm giảm axetylen, thí nghiệm pha loãng đồng vị ^{15}N . Những thí nghiệm trên đã kết luận rằng hàm lượng

đạm bên trong cây kí chủ tăng 30-45 mg N/cây (cây con 6 tuần tuổi) ở cây lúa và 170kg N/ha/năm trong mía là kết quả của quá trình cố định đạm sinh học (Iniguez *et al.*, 2004) [101]

Nhiều nghiên cứu gần đây đã tập trung vào vi khuẩn nội sinh cố định đạm nhằm cung cấp đạm cố định sinh học trực tiếp cho cây. Một loạt các vi khuẩn nội sinh cố định đạm đã được tìm thấy xâm chiếm nội mô của rễ lúa, ngô và cỏ (Hinton and Bacon, 1995 [98], Paulina Estrada-De Los *et al.*, 2001 [159], Verma *et al.*, 2001 [209], Elbeltagy and Ando, 2008 [71] và được cho là có khả năng cung cấp trực tiếp nitơ cho nhu cầu của mía (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999 [75], Chauhan *et al.*, 2013 [61]), lúa (Baldani *et al.*, 2000) [42] và lúa mì (Kennedy *et al.*, 1997) [111].

Trong điều kiện *in vitro*, hầu hết các chủng vi khuẩn nội sinh cây mía (*Gluconacetobacter* spp. và *Azospirillum* spp.) đều cố định đạm mạnh nhất vào ngày thứ 4 và giảm mạnh ở ngày thứ 6. Lượng NH_4^+ mà vi khuẩn *Gluconacetobacter* spp. tổng hợp được có thể lên đến 10,7 $\mu\text{g/ml}$ trong khi lượng đạm cao nhất mà *Azospirillum* spp. có thể tổng hợp được là 8,09 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả nghiên cứu của Văn Thị Phương Như (2015) [21] cho biết lượng đạm sinh học cố định được bởi các dòng vi khuẩn nội sinh có thể thay thế được 25 – 75% lượng phân đạm hóa học bón cho cây mía. Dòng *Bacillus megaterium*, *Bacillus megaterium* TANA5, *Pseudomonas putida* TAL1, *Bacillus megaterium* THL105 có khả năng cố định 30kg N/ha. Dòng *Bacillus subtilis* TAL4 và dòng *Burkholderia vietnamiensis* THL103 có khả năng cố định đạm sinh học lên đến 60kg N/ha (thay thế 50% lượng phân đạm hóa học). Dòng *Azospirillum amazonense* có khả năng cố định 90 kg N/ha, đáp ứng 50% đến 75% nhu cầu đạm của cây mía. Bổ sung *Azospirillum* lên cây lúa đã thay thế được 40 kg N/ha (Smith *et al.*, 1978) [190], bổ sung *Burkholderia vietnamiensis* đã giúp giảm lượng đạm bón cho lúa là 25 - 30 kg N/ha (Tran *et al.*, 2000) [205]. Hai dòng vi khuẩn *Azospirillum amazonense* SHL70 và *Burkholderia kururiensis* PHL87 có khả năng thay thế khoảng 50 - 75% lượng đạm

hóa học đối với cây lúa trồng trong điều kiện nhà lưới (Văn Thị Phương Như, 2015) [21].

Sturz *et al.* (2000) [195] cho biết một số giống mía của Brazil nhận được hơn 50% nhu cầu đạm cho sự sinh trưởng phát triển của chúng từ sinh vật cố định đạm sinh học ($> 150\text{kg N/ha/năm}$). Việc phát hiện ra các vi khuẩn cố định N_2 nội sinh trong rễ, thân và lá mía được cho là nguyên nhân của hiện tượng này (Kennedy *et al.*, 1997) [111]. Chủng *Azospirillum* vào cây lúa đóng góp đến 66% tổng lượng đạm trong cây (Malik *et al.*, 1997) [129].

Vi khuẩn nội sinh cố định đạm được nghiên cứu nhiều nhất gồm các chủng thuộc chi: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum* và *Klebsiella* (Bacon and White, 2000) [39] trong khi các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm tốt nhất được cho là *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., và *Azoarcus* sp. (Sturz *et al.*, 2000) [195].

Các chủng vi khuẩn cố định đạm *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azotobacter vinelandii*, *Paenibacillus polymyxa*, *Herbaspirillum seropedicae* và *Acetobacter diazotrophicus* nội sinh cả vùng rễ và nội mô cây mía (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999) [75].

1.2.2. Khả năng phân giải lân khó tan của vi khuẩn nội sinh

Lân (P) là chất dinh dưỡng đa lượng ảnh hưởng đến sinh trưởng của thực vật lớn thứ hai sau nitơ. P có trong thành phần cấu tạo của ATP, hợp chất cao năng của sinh vật, có trong cấu tạo của axit nucleic, các dẫn xuất phosphat trong trao đổi chất. Chính vì vậy, P có vai trò sinh lý quan trọng trong quang hợp, trao đổi chất, phân chia tế bào. Thể hiện vai trò đối với thực vật, P ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của rễ, độ chắc của thân và gốc, sự hình thành hoa và hạt, sự sinh trưởng và phát triển của cây, khả năng cố định đạm của các loại đậu, chất lượng và sức đề kháng của cây với các tác nhân gây bệnh (Khan *et al.*, 2009) [120]. Tuy nhiên, cây trồng chỉ có thể sử dụng được lân từ đất dưới dạng hòa tan trong dung dịch đất. Thế nhưng, trong đất lân tồn tại dưới hai dạng là lân hữu cơ và lân vô cơ. Lân hữu cơ tồn tại trong xác bã động,

thực vật và trong vi sinh vật, thường là các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipid, acid nucleic và các hợp chất hữu cơ khác. Lân vô cơ trong đất thường ở trong các dạng khoáng như apatit, phosphat sắt, phosphat nhôm và các dạng này khó tan khiến cây trồng không hút được. Ngay cả trong đất giàu P, hầu hết đều ở dạng không hòa tan, và chỉ có một tỷ lệ nhỏ ($\sim 0,1\%$) khả dụng cho cây trồng (Taurian *et al.*, 2012) [199]. Chính vì vậy, để đạt được năng suất cây trồng, người ta thường dùng các dạng phân lân dễ tan để bón cho cây. Tuy nhiên, hiệu quả của phân bón P trên toàn thế giới chỉ đạt khoảng 10 -25% (Sherword, 1998) [181] do một tỷ lệ lớn phân lân có thể hòa tan khi bón vào đất dễ dàng bị cố định thành các dạng không hòa tan như calcium monohydrogen dihydrat phosphat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), calcium monohydrogen phosphat (CaHPO_4) hay calcium orthophosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) và trở nên kém hữu dụng cho cây trồng (Dey, 1988) [67]. Ngoài ra, việc bón quá nhiều lân sẽ gây ra ô nhiễm môi trường đất (Chen *et al.*, 2006) [64].

Phân giải lân là một trong những đặc tính phổ biến của vi khuẩn nội sinh, do đó, chúng được sử dụng để giải quyết vấn đề trên (Rodríguez and Fraga, 1999) [173], Nguyễn Văn Được và Cao Ngọc Diệp, 2004 [10], Khan *et al.*, 2009 [120]). Chẳng hạn như, phần lớn các quần thể vi khuẩn nội sinh cây lúa mì, gạo, ngô, lạc, cây họ đậu, và hướng dương có thể hòa tan phosphate khoáng trong các thí nghiệm in vitro, và một số lượng lớn các vi khuẩn kích thích tăng trưởng cây trồng có khả năng hòa tan phosphat đã được ghi nhận, bao gồm các chủng thuộc giống *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* và *Azotobacter* (Singh *et al.*, 2016) [188].

Vi khuẩn tăng cường khả năng cung cấp lân cho thực vật theo nhiều cơ chế khác nhau: Kích thích sự phát triển của bộ rễ bằng cách tiết ra các hormone kích thích phát triển bộ rễ như IAA, ACC deaminase (Hayat *et al.*, 2010) [96]. Thay đổi các ion trong dung dịch đất, làm tăng khả năng chuyển hóa lân khó tan tạo ra các orthophosphate trong dung dịch đất hoặc tác động trực tiếp hay gián tiếp đến sự chuyển hóa lân vô cơ (Seeling and Zasoski, 1993) [178]. Quá trình trao đổi chất của vi khuẩn đã tác động trực tiếp đến quá trình hòa tan và khoáng hóa lân từ các dạng

lân hữu cơ và lân vô cơ (Richardson *et al.*, 2009) [172]. Quá trình này tạo ra các ion hữu cơ như gluconate, oxalate, malate, lactate, citrate hoặc tạo ra các enzyme thủy phân như phosphatase, cellulases cần thiết cho quá trình thủy phân lân hữu cơ.

Các cơ chế hòa tan phosphate hữu cơ liên quan đến các enzyme, cụ thể là C-P lyase và các phosphatase không đặc thù và phytase. Tuy nhiên, hầu hết các loại vi khuẩn hòa tan phosphat thông qua sản xuất axit hữu cơ như gluconat, ketogluconat, axetat, lactat, oxalat, tartarat, succinat, citrat và glycolat (Khan *et al.*, 2009) [120]. Loại axit hữu cơ sản sinh để hòa tan P có thể phụ thuộc vào nguồn cơ chất carbon được sử dụng. Khả năng hòa tan P cao nhất được ghi nhận trong môi trường sử dụng đường glucose, sucrose hoặc galactose làm nguồn carbon duy nhất (Khan *et al.*, 2009) [120].

Jasim *et al.* (2013) [105] đã phân lập vi khuẩn nội sinh từ thân cây hồ tiêu và ghi nhận các chủng PnB 1 (*Bacillus* sp.1), PnB 8 (*Klebsiella pneumoniae*) và PnB 9 (*Enterobacter* sp.) có khả năng sử dụng lân khó tan tốt nhất trong điều kiện *in vitro*. *Bacillus firmus* cũng từng được ghi nhận làm tăng khả năng hấp thu lân của lúa và lúa mì (Datta *et al.*, 1982) [65]. *Klebsiella* sp. cũng được ghi nhận có khả năng phân giải lân và tổng hợp IAA ở một nghiên cứu khác của Chaiharn and Lumyong (2009) [59] trên lúa ở Thái Lan.

Vi khuẩn hòa tan lân khó tan khi bổ sung vào thực vật làm tăng khả năng hấp thu lân của cây (Chen *et al.*, 2006) [63]. Matsuoka *et al.* (2013) đã phân lập được các dòng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp., *Pseudomonas* từ rễ *Carex kobobugi* có khả năng hòa tan lân vô cơ và tạo ra siderophore.

Khi bón vi khuẩn *Pseudomonas* spp. với chất mang là than bùn (phân sinh học) đã làm tăng chữ đường trong mía cây ở vụ 1 và tăng năng suất mía cây cũng như lượng đường trong cả 2 vụ (Cao Ngọc Diệp và Bùi Thị Kiều Oanh, 2006) [8]. Các tác giả này cho biết thêm bón phân sinh học cho cây mía đường đã tiết kiệm được 184 kg N (400 kg urê), 192 kg P₂O₅ (1200 kg phân supe lân) nhưng vẫn đảm bảo năng suất và lượng đường thu được cao hơn so với bón phân hóa học, mang lại 37.968.000 đồng/ha đến 56.596.000 đồng/ha lợi nhuận cho người trồng.

Bacillus cereus, *B. megaterium* và *Lysinibacillus fusiformis* phân lập từ cây sâm (*Panax ginseng*) thể hiện hoạt tính phân giải lân trong điều kiện in vitro (Vendan *et al.*, 2010) [208].

B. pumilus phân lập từ mô đã khử trùng bề mặt của cây hương nhu tía *Ocimum sanctum* có hoạt tính phân giải lân khó tan (37,3 µg/ml) và tổng hợp IAA (36,7 µg/ml) khá cao, đạt cực đại sau 60h chủng nhiễm vi khuẩn (Murugappan *et al.*, 2013) [148].

Một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cỏ chăn nuôi có khả năng hòa tan lân khó tan cao trong điều kiện invitro như *Klebsiella pneumonia G4* (211,1 mg P₂O₅/l) và *Micrococcus sp.* (277,75 mg P₂O₅/l) (Nguyễn Thị Thu Hà và cs., 2009) [11]. Hai dòng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TAL1 và *Bacillus subtilis* TAL4 có khả năng hòa tan lân khó tan thành dễ tan để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng và phát triển cho cây lúa và đã tiết kiệm được 50% lượng phân lân vô cơ (tương đương 40 kg P₂O₅/ha) nhưng vẫn đảm bảo về năng suất, cải thiện chất lượng gạo. Kết quả bổ sung kết hợp 2 dòng vi khuẩn *Azospirillum amazonense* SHL70 và *Bacillus subtilis* TAL4 lên cây lúa cho hiệu quả cố định đạm và hòa tan lân khó tan cao hơn khi bổ sung riêng rẽ từng dòng cho cây lúa (Văn Thị Phương Như, 2015) [21].

1.2.3. Khả năng tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) của vi khuẩn nội sinh

Indole-3-acetic acid (IAA) là một dạng auxin, là chất điều hòa sinh trưởng của thực vật. IAA chi phối sự phân chia tế bào, sự giãn dài tế bào, phân hóa sinh mô, phát triển trái và hạt, chi phối giai đoạn đầu sự phát triển của cây trồng. IAA kích thích đồng thời sự giãn dài trục lá mầm, ngăn cản sự sinh trưởng của rễ chính, kích thích sự khởi đầu của rễ bên và sự thành lập lông rễ (Theologies and Ray, 1982) [202]. Rất nhiều vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacteria*, *Azospirillum* và *Gluconacetobacter* là những vi khuẩn cố định đạm nhưng nhờ vào khả năng sinh tổng hợp IAA của chúng nên cũng được xem là vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật, góp phần làm tăng năng suất cây trồng (Kloepper *et al.*, 1989) [113].

Hầu hết các chủng có khả năng cố định đạm đều thể hiện khả năng tổng hợp IAA. Tuy nhiên, hàm lượng IAA sinh tổng hợp được phụ thuộc vào loài kí chủ, dòng vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy như pH, nồng độ oxy và giai đoạn phát triển. Văn Thị Phương Như (2015) [21] đã phân lập được 457 dòng vi khuẩn nội sinh cây lúa vừa có khả năng tổng hợp NH_4^+ và hòa tan lân khó tan vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA, trong đó, nhiều dòng có khả năng tổng hợp IAA khá cao, lên đến 38,75 $\mu\text{g/ml}$ sau 4 ngày nuôi cấy. Một số chủng vi khuẩn nội sinh cây cỏ chăn nuôi cũng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao trong điều kiện invitro như *Klebsiella pneumonia* G4 (37,85 mg IAA/l) và *Micrococcus* sp. (39,64 mg IAA/l) (Nguyễn Thị Thu Hà và cs., 2009) [11]. Ngược lại, hàm lượng IAA mà các chủng vi khuẩn nội sinh cây mía (*Azospirillum* spp. và *Gluconacetobacter* sp.) tổng hợp được trong điều kiện *in vitro* thấp hơn, chỉ đạt 17,75 $\mu\text{g/ml}$ và 3,41 $\mu\text{g/ml}$ (Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công, 2011) [19]. Thậm chí vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* nội sinh cây chuối chỉ tổng hợp được 3,16 μg IAA/ml (Nguyễn Thị Huỳnh Như và cs., 2013) [20].

1.2.4. Khả năng đối kháng các vi sinh vật gây bệnh thực vật

Vi khuẩn nội sinh xâm chiếm cùng ổ sinh thái với các tác nhân gây bệnh làm cho chúng trở thành các ứng viên tiềm năng trong việc kiểm soát dịch bệnh (Ryan *et al.*, 2008) [175]. Thật vậy, rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn nội sinh có khả năng kiểm soát các tác nhân gây bệnh (Berg and Hallmann, 2006 [49], Melnick *et al.*, 2008 [135], Ryan *et al.*, 2008) [175], Hallmann *et al.*, 2009) [92]), côn trùng (Kloepper *et al.*, 2004 [116], Zhang *et al.*, 2011 [220]) và tuyến trùng (Mekete *et al.*, 2009 [134], Siddiqui and Singh, 2010 [185], Senthilkumar *et al.*, 2011 [180]).

Phần lớn các vi khuẩn nội sinh đối kháng có hiệu quả với các tác nhân gây bệnh đều là vi khuẩn Gram âm và thuộc nhóm *Pseudomonas* huỳnh quang (Whipps, 2001) [212]. *Pseudomonas* huỳnh quang thường thấy nội sinh ở rễ, làm cho chúng là những ứng viên lý tưởng trong việc kiểm soát sinh học các tác nhân gây bệnh. Các chủng đối kháng thường được ghi nhận là *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas tolaasii* và *Pseudomonas veronii*. Khả năng kiểm soát tỷ lệ bệnh có thể lên tới 80% trong điều

Bảng 1.2. Khả năng kiểm soát tác nhân gây bệnh thực vật của một số vi khuẩn nội sinh thực vật

Loại cây trồng (tác nhân gây bệnh)	Vi khuẩn nội sinh kiểm soát sinh học	Loại thử nghiệm	Phương pháp áp dụng	Hiệu quả	Tài liệu tham khảo
Bông vải, đậu (<i>Rhizoctonia solani</i>)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i>	Nhà kính	Chủng huyền phù vi khuẩn vào rễ	Giảm tỷ lệ bệnh 50%	Pleban <i>et al.</i> (1995) [162]
Đậu (<i>Sclerotium rolfsii</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i>	Nhà kính	Chủng huyền phù vi khuẩn vào rễ	Giảm tỷ lệ bệnh 70-80%	Pleban <i>et al.</i> (1995) [162]
Bông vải (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>)	<i>Aureobacterium saperdae</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Phyllobacterium rubiacearum</i> <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Burkholderia solanacearum</i>	Thí nghiệm trong chậu	Tiêm bằng kim tiêm	Giảm tỷ lệ bệnh và giúp tăng trưởng thực vật	Chen <i>et al.</i> (1995) [62]
Cà chua (<i>Verticillium dahliae</i>)	<i>Pseudomonas</i>	Thiết bị trồng cây	Chủng vi khuẩn vào cây con	Giảm tỷ lệ bệnh, giúp tăng trưởng thực vật	Sharma and Nowak (1998)*
Lúa (<i>Achlya klebsiana</i> , <i>Pythium spinosum</i>)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas tolaasii</i> <i>Pseudomonas veronii</i> <i>Sphingomonas trueperi</i>	Thí nghiệm trong chậu	Ngâm hạt trong huyền phù vi khuẩn 1h (mật độ 10^8 CFU/mL)	Giảm tỷ lệ bệnh 50- 73%; thúc đẩy tăng trưởng thực vật (chiều cao cây và khối lượng cây khô)	Adhikari <i>et al.</i> (2001) [30]

Đậu (<i>Rhizoctonia solani</i>)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Rifl::tc4 (with <i>chiA</i> gene)	Thiết bị trồng cây	Tưới vào đất 10^7 CFU/mL Chủng vào giống	Giảm tỷ lệ bệnh 48%	Downing & Thomson (2000) *
Khoai tây (<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>M. incognita</i>)	<i>Streptomyces</i> <i>turgidiscabies</i> <i>Kitasatosporia</i> <i>cystargenia</i> <i>Streptomyces</i> <i>galilaeus</i> <i>Streptomyces</i> <i>griseus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>graminis</i>	Thiết bị trồng cây	Xử lý giống	Giảm sự phát triển của nấm, tỷ lệ nhiễm tuyến trùng vào cây, thúc đẩy tăng trưởng cây 78%	Krechel <i>et al.</i> (2002)*
Ớt (<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> , <i>Phytophthora</i> <i>capsid</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Nhà kính	Xử lý hạt Tưới vào rễ	Giảm 55% tỷ lệ bệnh do <i>R. solani</i> và 55% do <i>P.</i> <i>capsid</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2003)*
Cà tím, khoai tây (<i>Verticillium</i> <i>dahliae</i>)	<i>Bacillus</i> spp, <i>Paenibacillus alvei</i> <i>Bacillus</i> <i>amiloliquefaciens</i>	Nhà kính Ruộng	Nhúng rễ Tưới chế phẩm vào đất (10^7 CFU/mL)	Giảm tỷ lệ bệnh 40- 70%; tăng năng suất 25%	Tjamos <i>et al.</i> (2004)*
Khoai tây (<i>Rhizoctonia solani</i>)	<i>Serratia plymuthica</i> <i>Pseudomonas reactans</i>	Nhà kính Đồng ruộng	Tưới vào đất Xử lý giống (10^8 CFU/mL)	Giảm tỷ lệ bệnh 76%	Faltin <i>et al.</i> (2004) [73]
Cà chua (<i>Meloidogyne</i> <i>incognita</i>)	<i>B. pumilus</i> , <i>B. mycoides</i> ,	Nhà kính	Nhúng rễ cây con vào huyền phù vi khuẩn trước khi trồng + tưới 5ml huyền phù vi khuẩn vào gốc sau trồng 5 ngày	- Giảm 30 - 35% số bọ trùng tuyến trùng - Giảm 23 – 33% số u sung trên rễ do tuyến trùng	Mekete <i>et al.</i> (2009) [134]
Cà phê (<i>Hemileia</i> <i>vastatrix</i> Berk et Br.)			Phun lên lá		Silva <i>et al.</i> (2012) [187]

Ghi chú: *: dẫn theo Berg and Hallmann (2006) [49]

kiện nhà kính (Pleban *et al.*, 1997) [161]. Các loài Gram âm khác có hoạt tính kiểm soát sinh học chống lại các tác nhân gây bệnh là *Phyllobacterium rubiacearum*, *Burkholderia solanacearum* (Chen *et al.*, 1995) [62], *Sphingomonas trueperi* (Adhikari *et al.*, 2001) [30] và *Serratia plymuthica* (Faltin *et al.*, 2004) [73].

Các vi khuẩn nội sinh gram dương có khả năng đối kháng thường gặp trong chi *Bacillus* (Berg and Hallmann, 2006) [49]. *Bacillus* spp. xuất hiện chủ yếu trong đất/vùng rễ nhưng cũng được ghi nhận sống nội sinh trong một số loài thực vật (Hallmann and Berg, 2006) [91]. Như được tóm tắt trong Bảng 1.1, các vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Bacillus* và chi *Pseudomonas* đã được chứng minh là có khả năng kiểm soát đáng kể các loại bệnh do nấm gây ra.

Vi khuẩn nội sinh có thể làm giảm hoặc ngăn cản ảnh hưởng bất lợi của một số tác nhân gây bệnh đối với cây trồng. Các ảnh hưởng có lợi của vi khuẩn nội sinh hoạt động theo cơ chế giống như đối với vi khuẩn vùng rễ. Các cơ chế này đã được nhiều tác giả mô tả khá chi tiết (Compant *et al.*, 2010) [57]. Tuy nhiên, để phát huy tác dụng, vi khuẩn nội sinh cần phải hiện diện bên trong cây trước các tác nhân gây bệnh (Silva *et al.*, 2012) [187].

Hiệu quả của các vi khuẩn nội sinh trong kiểm soát sinh học phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm: kí chủ đặc thù, biến động quần thể và kiểu xâm chiếm kí chủ, khả năng di chuyển trong mô ký chủ, và khả năng tạo ra sức đề kháng hệ thống (Backman *et al.*, 1997) [38]. Ví dụ, chủng *Pseudomonas* sp. PsJN, nội sinh hành tây, ức chế nấm gây bệnh *Botrytis cinerea* Pers. và thúc đẩy tăng trưởng nho, được chứng minh là có thể nội sinh ở nhiều kí chủ khác nhau (Ait Barka *et al.*, 2002) [33]. Khả năng xâm chiếm nhiều kí chủ cũng đã được ghi nhận ở nhiều loài nội sinh khác. Ví dụ: *Pseudomonas putida* 89B-27 và *Serratia marcescens* 90-166 làm giảm bệnh do *Cucumber mosaic virus* gây ra trên cà chua và dưa chuột (Raupach, 1996) [168].

Bailey *et al.* (2006) [40] cho biết nấm nội sinh cây ca cao là *Trichoderma* spp. đã kích thích cây chống lại các tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, chế phẩm chứa bào tử nấm thường nhạy cảm với môi trường và có tuổi thọ ngắn hơn so với các chủng vi khuẩn có khả năng hình thành nội bào tử vì các nội bào tử có khả năng chịu nhiệt và

khô hạn (Driks, 2004) [69]. Ngoài khả năng tồn tại dài của các nội bào tử, vi khuẩn sinh nội bào tử thường có thể được sử dụng kết hợp với một số nông dược (Jacobsen *et al.*, 2004) [102]. Do vậy, các vi khuẩn kiểm soát sinh học có khả năng hình thành nội bào tử là những chủng rất có tiềm năng trong việc thương mại hóa sản phẩm.

Kết hợp bón phân hữu cơ ủ từ xác bã cây dừa với các dòng vi khuẩn nội sinh *Burkholderia tropica*, *Burkholderia tropicalis* và *Pseudomonas stutzeri* cùng với 150 kg N/ha đã làm tăng các yếu tố cấu thành năng suất, năng suất và chất lượng quả. Hàm lượng đường trong quả và cả hàm lượng dưỡng chất trong đất ở nghiệm thức này tương đương với nghiệm thức bón 300 kg N/ha. Phân hữu cơ vi sinh không những tạo thành một lớp thực bì vừa hạn chế bốc thoát nước, giữ ẩm vào mùa khô vừa hạn chế độc tính của đất phèn mà còn là loại phân bón tốt cho cây dừa, giảm được 50% lượng phân đạm hóa học và cải thiện năng suất và chất lượng quả (Trần Thanh Phong, 2012) [22].

Một số vi khuẩn nội sinh có khả năng kiểm soát sinh học, vì chúng tạo ra các hợp chất kháng vi sinh vật giúp cho cây trồng hạn chế dịch bệnh. Các chất kháng sinh là sản phẩm tự nhiên được xác định là những phân tử hữu cơ có khối lượng phân tử thấp. Nhóm kháng sinh này có khả năng ức chế vi sinh vật ngay cả ở nồng độ rất thấp (Demain, 1981). Các chất kháng sinh của vi khuẩn nội sinh có khả năng tiêu diệt các yếu tố gây bệnh như vi khuẩn, nấm, virus và động vật nguyên sinh. Các nhóm kháng sinh này không chỉ có hiệu quả kháng bệnh cho cây trồng mà còn có hiệu quả đối với người và động vật.

Ecomycin là sản phẩm kháng sinh được tạo ra từ vi khuẩn nội sinh *Pseudomonas viridiflava* của một số giống cỏ. Ecomycin là nhóm lipopeptide mới, trong thành phần cấu tạo có các amino acid phổ biến như alanine, serine, threonine và glycine và các amino acid đặc biệt. Ecomycin có khả năng ức chế mạnh nấm gây bệnh như *Cryptococcus neoformans* và *C. albicans*.

Nhóm chất chống nấm khác là pseudomycin, sản phẩm của *Pseudomonas* nội sinh ở thực vật (Ballio *et al.*, 1994) [43]. Pseudomycin thuộc nhóm lipopeptid, chứa

hiều amino acid không thay thế như L-chlorothreonine, L-hydroxy aspartic acid, D và L-diaminobutyric acid. Pseudomycine có hoạt tính kháng nấm gây bệnh ở người *C. albicans*, *C. neoformans* và các loại nấm gây bệnh thực vật bao gồm *Ceratocystis ulmi* và *Mycosphaerella fijiensis*. Pseudomycin có hiệu quả trong việc kháng nấm *Ascomycetes* và được sử dụng trong nông nghiệp.

Vi khuẩn nội sinh có khả năng làm yếu đi hay ngăn cản tác hại của vi sinh vật gây hại, tăng cường tính kháng bệnh đối với cây trồng. Nhiều thí nghiệm đã chứng minh vai trò của vi khuẩn nội sinh trong việc ngăn chặn sự tác hại của nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* trên bông vải (Chen *et al.*, 1995) [62].

Theo Mukhopadhyay *et al.* (1996) [146], một số chủng vi khuẩn nội sinh trong hạt lúa có khả năng kháng nấm rất mạnh như nấm *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumanomyces* và cả tuyến trùng *Meloidogyne graminicola*. Vi khuẩn *Bacillus megaterium* có khả năng kháng *Meloidogyne graminicola*. *Burkholderia* sp. và *B. glumae* và giúp cho cây lúa kháng lại *R. solani*. Dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* EDR4 nội sinh trong rễ lúa mì đã tạo ra một loại protein E2 có tính kháng nấm *F. graminearum*, *Macrophoma kuwatsukai*, *R. cerealis*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Botrytis cinerea* và *G. graminis* (Liu *et al.*, 2010) [125]. Vi khuẩn *Bacillus licheniformis* và *Bacillus pumilus* nội sinh trong rễ cây *Platycodon grandiflorum* có khả năng kháng nấm *Phytophthora capsici*, *F. oxysporum*, *R. solani* và *Pythium ultimum* rất mạnh (Asraful *et al.*, 2010) [36].

Vi khuẩn nội sinh thực vật còn giúp cho cây giảm bớt tác động của các tác nhân vô sinh gây bất lợi như hạn và nhiễm mặn (Flinn and Mei, 2010) [74]. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* giúp cây *Bassia indica* tăng khả năng chịu mặn đồng thời giúp cây sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện bình thường cũng nhưng trong điều kiện nhiễm mặn (Hashem *et al.*, 2015) [94].

Tác dụng của vi khuẩn nội sinh không chỉ làm tăng năng suất và chất lượng sản phẩm nông nghiệp mà còn góp phần quan trọng trong việc bảo vệ môi trường. Với khả năng cố định đạm sinh học và hòa tan lân khó tan, chúng đã giúp làm giảm

một lượng đáng kể phân bón hóa học cần sử dụng. Vì vậy, chúng có tác dụng bảo vệ nguồn đất mặt, bảo vệ nguồn chất hữu cơ trong đất, làm giảm sự ô nhiễm môi trường đất và nước. Ngoài ra, vi khuẩn nội sinh còn có khả năng phân hủy sinh học, chúng có thể chuyển hóa các chất độc hại trong môi trường như thuốc trừ sâu và thuốc diệt cỏ. *Burkholderia cepacia* G4 có khả năng tồn tại và chuyển hoá toluen trong môi trường (Barac *et al.*, 2004) [44]. Siciliano *et al.* (2001) [183] cũng nhận thấy rằng một số cây trồng có khả năng phát triển tốt trong đất nhiễm hóa chất độc. Trên những cánh đồng nhiễm hợp chất vòng thơm chứa N, người ta đã phân lập được vi sinh vật nội sinh thực vật tại đây có khả năng phân hủy hợp chất vòng thơm chứa N. Kết quả nghiên cứu của Germaine *et al.* (2006) [81] khẳng định vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng phân hủy thuốc diệt cỏ 2,4-D sau khi chúng được chủng vào cây đậu Hà Lan *Pisum sativum*. Sự phát hiện những dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy sinh học giúp chúng ta có thể sử dụng trực tiếp chúng như các chế phẩm sinh học phân hủy độc chất hay chuyển gen có khả năng phân hủy độc chất vào các vi khuẩn khác để xử lý môi trường.

Như vậy, có thể nói vai trò của các vi khuẩn nội sinh thực vật rất đa dạng, là lĩnh vực đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp cũng như bảo vệ môi trường.

1.3. Ứng dụng vi khuẩn nội sinh thực vật trong nông nghiệp

1.3.1. Phân vi sinh cố định đạm

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã phát hiện nhiều nhóm vi khuẩn có khả năng cố định đạm giúp tăng năng suất cây trồng đáng kể. Các nhóm vi khuẩn này được ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp ở nhiều nước trên thế giới: Mỹ, Ấn Độ, Thái Lan và Ai Cập, ... đã đạt được kết quả khá cao. Vi khuẩn cố định đạm bổ sung lên thực vật là nguồn cung cấp đạm hữu hiệu có thể thay thế đạm dạng urea dùng cho trồng lúa và các loại ngũ cốc khác, có thể thay thế được 2/3 lượng đạm hóa học nhưng vẫn đảm bảo năng suất lúa ổn định (Yanni *et al.*, 1997) [215].

Vi khuẩn *Azospirillum* có thể sống tự do, cộng sinh trong rễ và phát triển mạnh trong vùng rễ lúa. Nhóm vi khuẩn này có khả năng cố định đạm và tiết các chất điều hòa sinh trưởng như IAA làm tăng chiều dài, thể tích và số lượng rễ, nhờ đó giúp cây tăng khả năng hấp thu nước và chất khoáng. *Azospirillum* làm tăng năng suất cây ngô từ 20 - 30% (Zaady *et al.*, 1994) [219], tăng năng suất lúa mì 10 - 40% (Reynders and Vlassak, 1982) [171], tăng năng suất lúa 32 - 81% (Bashan and de-Bashan, 2010) [45] so với đối chứng. Vai trò quan trọng của *Azospirillum* đối với nông nghiệp đã được kiểm chứng trong thí nghiệm nhà lưới và ngoài đồng. Các dòng vi khuẩn *Azospirillum* có khả năng cố định đạm được dùng để sản xuất phân bón vi sinh cho cây lúa. Chúng vi khuẩn được sử dụng để xử lý hạt giống và mạ non trên đồng ruộng. Ngoài khả năng cố định đạm, chủng vi khuẩn này còn giúp cây chống chịu được hạn. Khi bổ sung *A. brasilense* vào cây lúa mì, chiều dài rễ, bề mặt rễ và các chất khoáng trong cây được tăng lên với tổng lượng N cố định được từ N₂ không khí chiếm tới 58,9% (Kapulnik *et al.*, 1983) [110].

Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nội sinh giữ vai trò quan trọng trong sản xuất lúa gạo, mía và lúa mì. Vi khuẩn nội sinh có vai trò cố định N nhờ đó làm giảm lượng phân đạm cần thiết trong trồng trọt. Cụ thể như bổ sung *Rhizobium* vào cây lúa đã tiết kiệm được 2/3 lượng đạm cần bón cho lúa, tương đương 96 kg N/ha (Yanni *et al.*, 1997) [215], bổ sung *Burkholderia* MG43 cho cây mía đã tiết kiệm được hơn 50% lượng phân bón N cần thiết (140 kg N/ha). Kết quả cho thấy 14 ngày sau khi xử lý *Burkholderia vietnamiensis*, khả năng đâm chồi của lúa tăng 33%, số lượng rễ tăng 57%, diện tích lá tăng 30% và năng suất lúa tăng từ 13 - 22%, tiết kiệm được 25 - 30 kg N/ha đối với lúa trồng ngoài đồng ruộng (Tran *et al.*, 2000) [205]. Vi khuẩn *Herbaspirillum* có thể nội sinh trong nhiều loài cây như: mía, lúa, lúa mì, lúa mạch và các loại ngũ cốc. Baldani *et al.* (2000) [42] đã thí nghiệm 80 dòng khác nhau của *H. seropedicae* được phân lập từ cây lúa, ngô, lúa miến và bổ sung cho cây lúa. Kết quả cho thấy 12% các dòng vi khuẩn làm tăng 100% khối lượng tươi cây lúa. Các thí nghiệm cho thấy trong nhà kính *Herbaspirillum* tăng năng suất lúa 5% (Mirza *et al.*, 2000) [141]. Ngoài ra, chủng *H. seropedicae* Z67 làm tăng hàm lượng

N ở rễ của giống lúa chịu phèn 29 - 61% và ở thân 37 - 85%. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy khi bổ sung *H. seropedicae* cho hạt ngô trồng trong nhà kính, sản lượng tăng 49 - 82% so với bón phân đạm hóa học. Tương tự như vậy, vi khuẩn nội sinh *Burkholderia* sp. đã làm tăng sản lượng lúa 0,5 - 0,8 tấn/ha, tăng sinh khối 22 mg/cây (Baldani *et al.*, 2000) [42]. Thí nghiệm khác trên khoai tây và cỏ ba lá cho thấy vi khuẩn nội sinh đã giúp cây trồng sinh trưởng tốt hơn, làm tăng chiều cao cây (63%), khối lượng thân tươi (66%), và khối lượng rễ tươi (55%) (Sturz *et al.*, 1998) [193].

Việc bổ sung kết hợp nhiều dòng vi khuẩn nội sinh giúp làm tăng sự phát triển thực vật tốt hơn so với việc bổ sung riêng rẽ từng loài vi khuẩn. Xử lý hỗn hợp *H. seropedicae* LMG6513, *Azospirillum lipoferum* 4B LMG4348, *Gluconacetobacter* LMG7603 và *B. vietnamiensis* LMG10929 với mật 10^8 CFU/ml vào cây lúa 5 ngày tuổi đã giúp làm tăng năng suất 14,4% trong khi việc bổ sung riêng lẻ từng dòng chỉ tăng tối đa 6,2% (Govindarajan *et al.*, 2008) [84].

Một vi khuẩn nội sinh cố định đạm khác đang được quan tâm là *Azoarcus*. Vi khuẩn cố định đạm sống nội sinh trong rễ cỏ lông công *Leptochloa fusca*, góp phần cho cỏ đạt năng suất khoảng 20-40 tấn/ha/năm mà không cần bón thêm phân N trên chân đất kiềm, mặn và nghèo dinh dưỡng (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) [169].

Những nghiên cứu bước đầu cho thấy khi bổ sung vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp., lúa cao sản đã cho năng suất cao và tiết kiệm được 70 kg N/ha (Cao Ngọc Điệp, 2005) [6].

Sử dụng phân vi sinh chứa các dòng vi khuẩn *Burkholderia tropicalis*, *B. tropica* và *Pseudomonas stutzeri* kết hợp 150 kg N, 60 kg P_2O_5 và 200 kg K_2O /ha bón cho cây dừa làm tăng kích thước, khối lượng và năng suất dừa tương đương bón 300 kg N/ha (Trần Thanh Phong, 2012) [22].

Hiện nay, ở Việt Nam đã sử dụng các vi sinh vật cố định đạm để sản xuất nhiều loại phân vi sinh khác nhau dưới các thương phẩm: Nitragin, Rhidafo, Azotobacterin, Azogin, Dasvila, ... và đã thử nghiệm trên phạm vi cả nước. Các thử nghiệm sử dụng

phân vi sinh cố định nitơ Azogin ở 15 tỉnh miền Bắc, Trung và miền Nam trên diện tích hàng chục ngàn hecta cho thấy, trong cùng điều kiện sản xuất, ruộng lúa được bón phân Azogin đều tốt hơn so với đối chứng, biểu hiện qua bộ lá phát triển tốt hơn, tỷ lệ nhánh hữu hiệu và số bông/khóm nhiều hơn đối chứng. Năng suất hạt tăng 4 - 25%, đặc biệt nhiều nơi bón Azogin và giảm 20% phân hóa học vẫn cho năng suất lúa cao hơn so với đối chứng. Đối với rau (xà lách, rau diếp, khoai tây, ...), bón phân Azogin cũng làm tăng sản lượng thu hoạch 20 - 30%. Việc bón phân Azogin còn làm tăng khả năng chống chịu của cây và giảm lượng nitrat tồn dư trong rau (Nguyễn Minh Hưng, 2007, dẫn theo (Văn Thị Phương Như, 2015) [21]. Tuy nhiên đây chủ yếu là các chủng cố định N tự do, không phải là các chủng vi khuẩn cố định N nội sinh trong cây trồng.

1.3.2. Phân vi sinh hòa tan lân khó tan

Nhiều loài vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan đã được sử dụng trong sản xuất phân sinh học ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp như: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* và *Erwinia* (Goldstein, 1986) [83]. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi bổ sung vi khuẩn hòa tan lân cho cây trồng đã làm tăng hiệu quả hấp thu P đối với cây đồng thời kích thích sự phát triển của cây.

Bổ sung các dòng vi khuẩn phân giải lân khó tan *Rhizobium*, *Pseudomonas striata* và *Bacillus polymyxa* lên cây đậu xanh trồng trong điều kiện ngoài đồng ruộng đã làm tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng, tăng sự hình thành nốt sần cố định N, tăng hoạt động của enzyme nitrogenase và sinh khối khô của cây. Ngoài ra, dòng *Pseudomonas putida* cũng làm tăng khả năng hấp thu P và kích thích sự phát triển của cây cải dầu (Lifshitz *et al.*, 1987) [124]. Với cây lúa mì, sử dụng các dòng vi khuẩn hòa tan lân kết hợp chỉ với 30 - 40% phân P hóa học thì sản lượng tăng lên đáng kể so với chỉ sử dụng phân P hóa học. Kết quả cho thấy khi bổ sung kết hợp *Bradyrhizobium japonicum* và vi khuẩn hòa tan lân *Pseudomonas* spp. sản lượng lúa mì tăng lên 20% so với đối chứng. Xử lý hạt lúa với *Azospirillum lipoferum* 34H đã

làm tăng hàm lượng P, chiều dài rễ và khối lượng tươi khô của cây lúa (Murty and Ladha, 1988) [147].

Theo kết quả nghiên cứu của Sundara *et al.* (2002) [197] dòng vi khuẩn hòa tan lân *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* được áp dụng trong canh tác mía đã làm tăng lượng P hữu dụng cung cấp cho cây, thúc đẩy khả năng đâm chồi, mật độ, khối lượng thân và tăng 12,6% năng suất. Ngoài ra, khi kết hợp bón bổ sung vi khuẩn với phân hóa học, vi khuẩn hòa tan lân đã giúp tiết kiệm được khoảng 25% lượng phân bón so với nghiệm thức đối chứng. Ở một nghiên cứu khác, việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus* sp. vào hạt ngô đã giúp cho cây tăng chiều cao 16%, chiều dài rễ 11%, khối lượng rễ khô 29% và khối lượng thân khô 42%, làm cho năng suất tăng hơn 30% so với không bổ sung vi khuẩn (Muhammad *et al.*, 2013) [145].

Nhiều nghiên cứu cũng chứng minh rằng, việc bổ sung kết hợp các dòng vi khuẩn *Pseudomonas striata*, *Bacillus polymyxa* và *Azospirillum brasilense* đã làm tăng năng suất ngũ cốc một cách đáng kể so với bổ sung riêng từng dòng vi khuẩn do làm cân bằng chất dinh dưỡng của cây và tăng cường khả năng hấp thụ N và P (Belimov *et al.*, 1995) [47]. Chủng *Agrobacterium radiobacter* 10 thúc đẩy khả năng tích lũy phân lân và *Arthrobacter mysorens* 7 làm gia tăng hàm lượng lân tổng số trong cây. Việc kết hợp bổ sung các chủng này đạt hiệu quả nhất khi kết hợp với việc giảm lượng phân đạm cung cấp cho cây. Nhiều bằng chứng cho thấy hiệu quả hòa tan lân khó tan của vi khuẩn trong việc tăng cường sự phát triển thực vật.

Trong nước cũng có nhiều nghiên cứu và ứng dụng vi khuẩn hòa tan lân khó tan. Khi tưới dịch lên men vi khuẩn hòa tan lân khó tan *Pseudomonas* spp. cho cây đậu nành, năng suất và chất lượng hạt đậu đã tăng một cách đáng kể đồng thời tăng hơn một triệu đồng lợi nhuận/ha do *Pseudomonas* spp. đã giúp cây hấp thu nhiều dưỡng chất trong đất hơn so với đối chứng (Cao Ngọc Diệp, 2005) [6]. Sử dụng vi khuẩn cố định đạm *Bradyrhizobium japonicum* và vi khuẩn hòa tan lân PSB *Pseudomonas* spp. đã làm tăng số nốt rễ, khối lượng khô nốt rễ, sản lượng, khả năng hấp thu chất dinh dưỡng trong sản xuất đậu nành và đồng thời giảm lượng phân lân

vô cơ, giảm chi phí sản xuất đậu từ 785.000 – 1.000.000 đồng/ha (Tran Thi Ngoc Son *et al.*, 2006) [204]. Bổ sung kết hợp vi khuẩn hòa tan lân khó tan *Burkholderia sp.* PS-01 với bùn ép đã làm tăng năng suất (38 - 69%), hàm lượng P tổng số trong rễ (1,3 – 3,3 lần) và trong thân (32 -136%) của đậu xanh so với bổ sung riêng rẽ *Burkholderia sp.* PS-01 hoặc bùn ép (Niazi *et al.*, 2015) [150].

Bổ sung kết hợp huyền phù vi khuẩn của *Bradyrhizobia* (*Bradyrhizobium japonicum*) và vi khuẩn hòa tan lân (*Pseudomonas spp.*) vào hạt đậu nành trước khi trồng kết hợp với bón 20 kg N/ha đã làm gia tăng số lượng nốt rễ, khối lượng tươi và khô của nốt rễ, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất hạt so với bón phân hóa học. Không những vậy, phân bón sinh học này còn giúp tiết kiệm được 40 – 60 kg N/ha và 60 kg P₂O₅ kg/ha. Hiệu quả kinh tế khi bón phân vi sinh chứa các chủng này cao hơn so với bón phân hóa học 43,98% (Tran Thi Ngoc Son *et al.*, 2007) [203].

1.3.3. Phân vi sinh kích thích, điều hoà sinh trưởng thực vật

Các kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn sống ở vùng rễ hoặc nội sinh cây lúa như: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* và *Paenibacillus* ngoài khả năng cố định đạm, hòa tan lân còn có khả năng tiết ra các chất điều hòa sinh trưởng kích thích sự phát triển thực vật: IAA, cytokinin, gibberellin, ... được ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp (Glick, 2012) [82]. Malik *et al.* (1997) [129] cho biết việc chủng các vi khuẩn *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Bacillus* và *Pseudomonas* vào cây lúa nước đã giúp cây gia tăng khả năng sinh tổng hợp IAA, giúp rễ lúa phát triển nhiều hơn để hấp thu nhiều nước và chất dinh dưỡng, do đó cây phát triển tốt hơn với đối chứng. Araújo *et al.* (2005) [35] cho thấy hai dòng *B. subtilis* có khả năng tạo IAA có tác dụng kích thích sự phát triển cây đậu nành, ngoài ra còn có tác dụng kháng nấm gây bệnh cho cây. Vi khuẩn *Pseudomonas* là vi khuẩn sống trong vùng đất quanh rễ và nội sinh, nhóm này có khả năng hòa tan lân khó tan thành lân dễ tan và tổng hợp IAA (Glick, 2012) [82]. Tưới vi khuẩn *Pseudomonas* cho Đậu nành đã giúp rễ đậu phát triển nhiều do vi khuẩn này tổng hợp IAA cung cấp và kích thích hình thành rễ mới

và lân khó tan được vi khuẩn hòa tan nhiều tạo nguồn dưỡng chất quan trọng cho cây Đậu nành phát triển. Sự phối hợp giữa lân hòa tan và nitơ sinh học sẽ giúp cây Đậu nành phát triển tốt, tích lũy nhiều sinh chất và thể hiện sự gia tăng thành phần năng suất và năng suất đậu đặc biệt là hàm lượng protein trong hạt Đậu nành tăng cao rõ rệt.

1.3.4. Phân vi sinh đa chức năng

Nhiều dòng vi sinh vật cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp nhiều chất điều hòa sinh trưởng (phytohormones), gia tăng sự hấp thu nhiều dưỡng chất hơn, để phát huy tác dụng của tất cả các nhóm vi sinh vật có ích đã tổng hợp một dạng phân bón sinh học đa chủng, đa chức năng cho cây trồng (Chabot *et al.*, 2011) [224]. Loại phân bón này đã phát huy tác dụng trên cây ngô lai, đậu nành (Molla *et al.*, 2001) [144], lúa mạch (Belimov *et al.*, 1995) [47], cải ăn lá (Antoun *et al.*, 1998) [34].

Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh phân vi sinh đa chủng, đa chức năng có tác dụng tiết kiệm phân hóa học, giảm thiểu thuốc hóa học bảo vệ thực vật và góp phần tích cực cho việc xây dựng nền nông nghiệp bền vững. Khi xử lý hỗn hợp 3 dòng vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* hòa tan lân, tổng hợp IAA, vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* cố định đạm và *Bacillus subtilis* hòa tan kali đồng thời bổ sung 25 kg N/ha, 15 kg K₂O/ha cho năng suất lúa tương đương bón 100 kg N/ha + 60 kg P₂O₅/ha + 30 kg K₂O/ha. Cây lúa trong thử nghiệm ít bị đổ ngã, tiết kiệm chi phí sản xuất 2.283.875 đồng/ha (Cao Ngọc Diệp and Phan Văn Tùng, 2010) [9]. Tổ hợp 4 chủng vi sinh vật trên có khả năng làm tăng nhanh thời gian bật búp chè ở giai đoạn bầu ươm từ 10 - 14 ngày và làm giảm tỷ lệ bầu chết 50,6 % so với đối chứng.

1.4. Tình hình nghiên cứu vi khuẩn nội sinh cây cà phê

1.4.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Mặc dù vi khuẩn nội sinh thực vật đã được nghiên cứu từ rất lâu nhưng gần đây, chúng mới được chú ý trên cây cà phê và đã thu được những kết quả ban đầu rất khả quan. Vi khuẩn nội sinh được tìm thấy ở hầu hết các bộ phận của cây cà phê ở khắp nơi trên thế giới với thành phần rất đa dạng: 87 dòng nội sinh cây cà phê chè ở

Colombia, Hawaii và Mexico (Vega *et al.*, 2005) [207], 200 dòng vi khuẩn nội sinh rễ cà phê vối tại Ethiopia (Mekete *et al.*, 2009) [134], 18 dòng vi khuẩn nội sinh quả tại Brazil (Miguel *et al.*, 2013) [138], 217 dòng vi khuẩn nội sinh lá, cành và rễ cà phê chè và cà phê vối ở Pedreira, Mococa, Pindorama và Brazil (Silva *et al.*, 2012) [187]. Các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ cây cà phê chủ yếu thuộc các chi: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas* và *Bacillus*, trong đó chủ yếu là các vi khuẩn Gram (-) (Mekete *et al.*, 2009) [134].

Tính đa dạng của vi khuẩn nội sinh cây cà phê tùy thuộc vào chế độ canh tác của vườn cà phê. Những vườn cà phê thâm canh cao, sử dụng nhiều phân hoá học và thuốc bảo vệ thực vật hoá học thì tính đa dạng của nhóm vi khuẩn nội sinh giảm. Ngoài ra, các yếu tố vô sinh như: nhiệt độ, lượng mưa, hàm lượng hữu cơ trong đất, kỹ thuật canh tác và cải tạo đất cũng ảnh hưởng đến thành phần và mật độ vi khuẩn nội sinh (Hallmann *et al.*, 1997 [88], Garbeva *et al.*, 2004 [78], Berg and Hallmann, 2006 [49], Mekete *et al.*, 2009 [134]. Tính đa dạng của vi khuẩn nội sinh trong quả còn tùy thuộc vào các giai đoạn phát triển khác nhau của quả, đạt cao nhất vào giai đoạn quả xanh và thấp nhất vào giai đoạn quả chín (Miguel *et al.*, 2013) [138]. Trong mùa mưa, mật độ vi khuẩn nội sinh cao hơn, đạt $5,2 \times 10^3$ - $2,07 \times 10^6$ CFU/g rễ tươi) với thành phần đa dạng lên đến 201 dòng; trong khi đó ở mùa khô, mật độ chỉ đạt $2,7 \times 10^3$ - $1,23 \times 10^4$ CFU/g rễ tươi và chỉ có 114 dòng (Mekete *et al.*, 2009) [134].

Tính đa dạng của vi khuẩn nội sinh còn phụ thuộc vào hình thức canh tác, với chỉ số đa dạng Shannon (H) giảm dần theo các hình thức canh tác cà phê như sau: canh tác tự nhiên, bán tự nhiên, canh tác bán thâm canh và thâm canh cao. Sự khác biệt này chủ yếu là do những khác nhau về các kỹ thuật canh tác. Nhìn chung, với hình thức canh tác đồn điền lớn, cây cà phê được thâm canh, tăng cường sử dụng phân và thuốc hóa học, máy móc cơ giới, do đó ảnh hưởng tiêu cực đến tính đa dạng của nhóm vi khuẩn nội sinh (Mekete *et al.*, 2009) [134].

Một số chủng vi khuẩn nội sinh đã thể hiện khả năng thúc đẩy sinh trưởng cây cà phê như *Acinetobacter calcoaceticus* 161G, 163G, 160G, 150G và *Salmonella*

enteric 109G. Chúng thể hiện khả năng thúc đẩy sinh trưởng cây cà phê tốt nhất (*Escherichia fergusonii* 85G) có hoạt tính phân giải phosphat, tổng hợp siderophores và IAA trong điều kiện *in vitro*. Những đặc tính này hứa hẹn tiềm năng của chủng *Escherichia fergusonii* 85G trong việc thúc đẩy sinh trưởng phát triển của cây cà phê vì sự hiện diện của các siderophores (đại thực bào chứa sắt) làm gia tăng hàm lượng sắt dễ tiêu để rễ hấp thu còn IAA ảnh hưởng trực tiếp đến các bộ phận trên không của cây (Silva *et al.*, 2012) [187].

Phần lớn các loài vi khuẩn nội sinh quả cà phê phân lập và tái thiết lập được quần thể bên trong cây cà phê với đều thuộc chi *Bacillus*, bao gồm: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. cereus* và *B. thuringiensis*. Đáng chú ý là *B. thuringiensis*, loài vi khuẩn được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, cũng được ghi nhận nội sinh quả cà phê (Miguel *et al.*, 2013) [138].

Khi nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê, Mekete *et al.* (2009) [134] cho biết 33% số chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được từ rễ cây cà phê có hoạt tính đối kháng với tuyến trùng nốt sùng *M. incognita*, trong đó, đáng chú ý là các loài *Bacillus pumilus* và *B. mycoides* có khả năng làm giảm 39% khả năng sinh sản của tuyến trùng và giảm 33% số bướu rễ gây ra bởi tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (Mekete *et al.*, 2009) [134]. Những kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy một số loài vi khuẩn nội sinh cây cà phê (*Bacillus lentimorbus* và *Bacillus cereus*) có tiềm năng trong việc ức chế khả năng nảy mầm và phát triển của bào tử hạ nấm *Hemileia vastatrix* gây bệnh gỉ sắt cà phê (Shiomi *et al.*, 2006 [182], Silva *et al.*, 2012) [187]).

Thời điểm chủng vi khuẩn nội sinh cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả ức chế các tác nhân gây bệnh. Chủng các vi khuẩn nội sinh *Brevibacillus choshinensis* 64R và 137G vào cây cà phê ở thời điểm 72h hoặc 24h trước khi chủng nấm *H. vastatrix* gây bệnh gỉ sắt đã làm giảm chỉ số bệnh gỉ sắt lần lượt là 100% và 97% nhưng nếu chủng đồng thời cả vi khuẩn nội sinh và tác nhân gây bệnh, chỉ số bệnh không giảm (Shiomi *et al.*, 2006 [182], Silva *et al.*, 2012 [187]). Việc chủng các vi khuẩn nội sinh trước khi chủng các tác nhân gây bệnh sẽ đảm bảo khả năng xâm

chiếm tế bào biểu mô và nội mô của các chủng thích hợp kích thích tính kháng hệ thống cảm ứng ISR nhờ làm nhạy cảm các mô, tăng cường cạnh tranh không gian và dinh dưỡng trên bề mặt lá. Vi khuẩn nội sinh tiêu diệt các tác nhân gây bệnh thông qua quá trình phân huỷ hoặc ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm nhờ các chất kháng sinh do vi khuẩn sản sinh.

Trong điều kiện *in vitro*, ở 24°C, các chủng *B. megaterium*, *A. radiobacter* và *C. davisae* cho hiệu quả diệt tuyến trùng tuổi 2 *Meloidogyne incognita* trên 90%. Các chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê như: *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Paenibacillus pabuli*, *Cellulomonas fimi* và *Pseudomonas coronafaciens* khi được chủng vào cây cà chua đã làm giảm hơn 54% số lượng u sưng trên rễ gây ra bởi tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Tuy nhiên, các chủng này lại không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh trưởng của cây, ngoại trừ *P. coronafaciens* có khả năng làm tăng khối lượng thân tươi 51%.

Hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne incognita* của các chủng vi khuẩn nội sinh trong cây cà phê dao động từ 38 - 98%. Trong đó, các chủng *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus pumilus*, *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *Chryseobacterium balustinum*, *Cedecea davisae*, *Cytophaga johnsonae*, *Lactobacillus paracasei*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas syringae* và *Stenotrophomonas maltophilia*, *M. halobius* cho hiệu quả diệt tuyến trùng > 80% trong điều kiện *in vitro* (Mekete *et al.*, 2009) [134]. Trong số các chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê phân lập được, chủng *Bacillus* spp. được coi là tác nhân sinh học tiềm năng để kiểm soát tuyến trùng nốt sưng *Meloidogyne* spp. vì chúng sản sinh nội bào tử có khả năng chịu được điều kiện nóng và khô (Kloepper *et al.*, 2004) [116]. Chủng *Bacillus pumilus* và *B. mycoides* hiệu quả nhất trong việc làm giảm số lượng khối trứng và u sưng do tuyến trùng *M. incognita* gây ra trên cây cà chua trồng trong nhà lưới (33 và 39%, một cách tương ứng) (Mekete *et al.*, 2009) [134]. *Bacillus cereus* làm giảm đến hơn 50% số lượng khối trứng và u sưng gây ra bởi *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* (Mahdy *et al.*, 2000, dẫn theo Mekete *et al.*, 2009).

Cơ chế đối kháng tuyến trùng của vi khuẩn nội sinh *B. pumilus* và *B. mycoides* được cho là tương tự như đối với các vi khuẩn vùng rễ và nội sinh khác, bao gồm: giảm khả năng xâm nhập, sản sinh chất kháng sinh trực tiếp hoặc kháng hệ thống cảm ứng ISR (Sikora *et al.*, 2007) [186]. Trong một tổng hợp gần đây, Kloepper and Ryu (2006) [115] đánh giá *B. pumilus* là một trong những vi khuẩn nội sinh quan trọng nhất gây ra kháng hệ thống cảm ứng đối với nhiều loại bệnh khác nhau. Vi khuẩn nội sinh kích kháng hệ thống cảm ứng để kiểm soát hiệu quả một số tuyến trùng kí sinh thực vật như *G. pallida* and *M. incognita* (Mekete *et al.*, 2009) [134]. Trong một nghiên cứu khác, *B. cereus* được ghi nhận là có hiệu quả trong việc kiểm soát bệnh gỉ sắt cà phê (Vega *et al.*, 2005) [207] .

Tuy nhiên, các tác giả chưa ghi nhận được bất kì sự liên hệ nào giữa các chủng vi khuẩn nội sinh cây cà phê có khả năng thúc đẩy sinh trưởng với các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng đối kháng các tác nhân gây bệnh (Silva *et al.*, 2012) [187]. Do đó, việc phối trộn các chủng có đặc tính tốt để sử dụng là cần thiết nhằm vừa giúp cây sinh trưởng, phát triển tốt vừa không chế tác hại của bệnh.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên trong những năm qua đã tiến hành nghiên cứu và phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh trên cả cà phê chè và cà phê vối. Trên cà phê chè ở Lâm Đồng, Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17] đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ và tuyển chọn được chủng *B. cereus* M15 là chủng có hoạt tính cố định N và phân giải P cao nhất. Hàm lượng N và P trong lá cây con cà phê chè khi được xử lý với chủng này tăng 52% và 33,3% so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu bước đầu khi chủng nhiễm chủng vi khuẩn này vào hạt cà phê rồi trồng trong nhà lưới cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê chè giai đoạn vườn ươm như: chiều cao cây, đường kính gốc, chiều dài lá và diện tích lá cũng đều tăng so với đối chứng.

Trong rễ cây cà phê vối tại Đắk Lắk, 37 chủng vi khuẩn nội sinh cũng đã được phân lập, trong các đó chủng *B. subtilis* EK17 và *Enterobacter cloace* EK19 được

tuyển chọn có khả năng cố định đạm và phân giải lân cao nhất. Kết quả thử nghiệm bước đầu của các chủng này trên cây con cà phê với TR4 cho thấy hàm lượng đạm và lân trong lá cà phê đều cao hơn gấp 1,5 lần so với đối chứng. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê con như: chiều cao cây, đường kính gốc, chiều dài lá và diện tích lá cũng đều tăng so với đối chứng (Trương Vĩnh Thới, 2012) [27]. Ngô Văn Anh và cs. (2017) [1] đã phân lập được 41 dòng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây cà phê với. Trong điều kiện invitro, các dòng *Bacillus* sp. BMT11 (1,574 µg/ml), *B. pumilus* BMT4 (1,493 µg/ml), *Bacillus* sp. BMT8 (1,474 µg/ml), BH8 (1,434 µg/ml), *Bacillus cereus* BMT7 (1,399 µgm/l) và *Bacillus* sp. Cu8 (1,372 µg/ml) có hoạt tính cố định đạm cao nhất. Các dòng có hoạt tính phân giải lân cao nhất là *Bacillus* sp. BMT11 (12,25 µg/ml), *Bacillus* sp. Cu8 (11,46 µg/ml) và Cu2 (11,25 µg/ml). Ngoài ra, các chủng này còn có khả năng sinh tổng hợp IAA khá cao: *Bacillus* sp. BMT11 (9,048 µg/ml), BH8 (8,876 µg/ml), *Bacillus* sp. Cu8 (8,153 µg/ml), *B. pumilus* BMT4 (5,624 µg/ml).

Tóm lại, vi khuẩn nội sinh đóng vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật do chúng có những đặc tính tốt như có khả năng cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan giúp cho cây trồng hấp thụ tốt chất dinh dưỡng, sinh tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng, tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh và giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm môi trường. Do đó, việc nghiên cứu chúng để sản xuất phân vi sinh ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững là vấn đề đang được quan tâm hiện nay. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc bổ sung kết hợp nhiều chủng vi sinh vật vào cây trồng đem lại hiệu quả đối với sự sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng tốt hơn so với bổ sung riêng lẻ từng chủng. Do vậy, cần chú trọng tới vấn đề nghiên cứu khả năng phối trộn các chủng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Cà phê là một trong những loại cây trồng chủ lực tại Đắk Lắk. Các nghiên cứu bước đầu trên thế giới và trong nước đã chỉ ra rằng thành phần vi khuẩn nội sinh cây cà phê rất phong phú với nhiều hoạt tính tốt như cố định đạm, phân giải lân, đối kháng một số tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ được tiến hành ở

điều kiện trong phòng thí nghiệm và nhà lưới. Trong khi đó, thành phần và hoạt tính của vi khuẩn lại chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố môi trường và biện pháp kỹ thuật canh tác. Do đó, rất cần tiến hành các nghiên cứu ở điều kiện đồng ruộng để đánh giá hiệu quả của chúng trong sản xuất cà phê bền vững. Ngoài ra, cũng chưa có nghiên cứu nào trên cây cà phê về tương tác của các chủng vi khuẩn nội sinh và hoạt tính khi tổ hợp các chủng tương hợp với nhau.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, 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

- Cây cà phê với giống thực sinh, cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*) giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh trồng trên đất nâu đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

- Các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê: *Bacillus cereus* M15, *Bacillus pumilus* BMT4, *B. subtilis* EK17, *Enterobacter cloace* EK19, *Bacillus* sp. CƯ8, BH8, *Bacillus cereus* BMT7, *Bacillus* sp. BMT8 và *Bacillus* sp. BMT11 đã được định danh và lưu giữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên. Các chủng này đều là các chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê được tuyển chọn từ bộ sưu tập hơn 100 chủng nội sinh phân lập có hoạt tính cố định N, phân giải P khó tan và sinh tổng hợp IAA. Một số đặc điểm hình thái và hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn này được trình bày ở Phụ lục 1 (Trang P1).

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu:

2.1.2.1. Các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn

a. Môi trường pepton

- Meat extract: 7g
- Soya pepton: 7g
- NaCl : 5g
- Agar : 15g

Thêm nước cất vừa đủ 1 lít

b. Môi trường nhân nuôi sinh khối vi khuẩn M1:

- Beef extract : 6g
- Sacharose : 3g
- Yeast extract powder: 2g

- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$: 0,3g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2g
- NaCl : 3g

Thêm nước cất vừa đủ 1L. Điều chỉnh pH = 7.

2.1.2.2. Hóa chất và vật tư khác

- Hóa chất khử trùng hạt cà phê: $KMnO_4$ 5%, cồn 70°, NaOCl 5%, Tween 80.
- Vật liệu đóng bầu: hạt cà phê vối lai TRS1, đất đỏ bazan, xơ dừa, túi nylon (17 x 25 cm)
- Phân bón: Urê Phú Mỹ (46% N), SA Phú Mỹ (21% N + 24% S), Kali Phú Mỹ (61% K_2O), Lân nung chảy Văn Điển (15 – 17% P_2O_5 , 28 – 34% CaO; 15 – 18% MgO, 24 – 30% SiO_2 , B, Mn, Zn, Cu, Co ...),

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Thời gian nghiên cứu

Đề tài thực hiện từ tháng 12/2015 tới tháng 03/2019.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Các thí nghiệm trong phòng được thực hiện tại Bộ môn Bảo vệ thực vật và Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên.
- Các thí nghiệm trong nhà lưới được thực hiện tại Trại thực nghiệm Nông Lâm Nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên.
- Thí nghiệm đồng ruộng giai đoạn kiến thiết cơ bản được thực hiện trên vườn cà phê tái canh năm thứ nhất trên đất nâu đỏ bazan tại xã Hòa Thuận, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.
- Thí nghiệm đồng ruộng giai đoạn kinh doanh được thực hiện trên vườn cây cà phê vối 19 năm tuổi trên nền đất nâu đỏ bazan tại xã Hòa Xuân, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

2.3. Nội dung nghiên cứu

- Nội dung 1: Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cây con cà phê vối trong điều kiện nhà lưới.
- Nội dung 2: Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây cà phê vối giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng.
- Nội dung 3: Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối giai đoạn kinh doanh trên đồng ruộng.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê vối trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến khả năng sinh trưởng của cây con cà phê vối trong điều kiện nhà lưới.

* Thời gian và địa điểm thí nghiệm: thí được tiến hành trong nhà lưới tại Trại thực nghiệm Nông Lâm Nghiệp, trường Đại học Tây Nguyên trong thời gian từ tháng 12/2015 đến tháng 6/2016.

* Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn được nhân nuôi cấy trên môi trường M1 ở điều kiện nhiệt độ phòng với tốc độ lắc 150 rpm trong thời gian nuôi cấy 48^h. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn sau đó được ly tâm ở 4000 v/phút trong 20 phút để tách vi khuẩn ra khỏi môi trường nuôi cấy. Sau ly tâm, thu phần dịch nổi bên trên và lọc qua 2 lớp giấy lọc Whatman số 1 (Mekete *et al.*, 2009) [134]. Điều chỉnh để mật độ vi khuẩn đạt 10⁹ CFU/mL. Kết quả thu được được coi là dịch huyền phù vi khuẩn tiêu chuẩn và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 4°C để sử dụng.

* Chuẩn bị bầu để ươm hạt cà phê:

Dùng túi nylon có kích thước 17 x 25 cm, đục 8 lỗ đường kính 0,5 cm cách đáy bầu khoảng 2 - 4cm để dễ thoát nước. Đất dùng để vào bầu là lớp đất mặt từ 0 – 20 cm, tơi xốp và nhiều mùn. Dùng lớp đất mặt (đã được xử lý tiệt trùng) trộn lẫn với 25% xơ dừa sạch để tạo thành hỗn hợp đóng bầu.

* Chuẩn bị hạt cà phê vối

Hạt cà phê vối lai giống TRS1 được khử trùng bằng KMnO₄ 5% trong 1 giờ, lắc qua cón 70o trong 1 phút, đưa vào tủ vô trùng để xử lý NaOCl 5% trong 40 phút và thêm 3 giọt Tween 80 rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Cho hạt vào đĩa petri có bông đã được khử trùng, với một ít nước cất vô trùng và ủ cho tới khi hạt nảy mầm, rửa sạch hạt bằng nước cất. Sau đó, cho hạt cà phê đã nảy mầm vào ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn (mật độ 10⁹ CFU/mL) đã chuẩn bị trong 30 phút, rồi gieo 1 hạt vào từng bầu đất đã khử trùng. Chăm sóc cho đến khi cây con được 2 cặp lá thật, tưới 10 ml (mật độ 10⁹ CFU/mL) huyền phù vi khuẩn thí nghiệm vào từng bầu đất. Hai công thức đối chứng được sử dụng trong thí nghiệm là đối chứng ĐC0 (hạt không được ngâm huyền phù vi khuẩn cũng như môi trường dinh dưỡng nhân nuôi sinh khối vi khuẩn M1) và đối chứng ĐC (hạt được ngâm trong môi trường M1). Chăm sóc cho đến khi cây con được 2 cặp lá thật, tưới huyền phù vi khuẩn thí nghiệm vào từng bầu đất (10ml/bầu). Mỗi chủng vi khuẩn là 1 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 30 cây. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 11 công thức, được lặp lại 3 lần.

Các nghiệm thức bao gồm:

- CT1: *Bacillus cereus* M15
- CT2: *Bacillus subtilis* EK17
- CT3: *Enterobacter cloace* EK19
- CT4: *Bacillus* sp. CƯ8
- CT5: chủng vi khuẩn BH8
- CT6: *Bacillus cereus* BMT7
- CT7: *Bacillus pumilus* BMT4
- CT8: *Bacillus* sp. BMT8
- CT9: *Bacillus* sp. BMT11
- CT10: đối chứng ĐC (môi trường M1)
- CT11: đối chứng ĐC0 (nước lã)

*** Các chỉ tiêu theo dõi:** các chỉ tiêu sau được theo dõi sau khi chủng nhiễm vi khuẩn nội sinh vào cây con 2 và 4 tháng. Mỗi công thức, chọn 5 cây ngẫu nhiên để đo đếm các chỉ tiêu sau:

- Chiều cao cây (cm): đo từ mặt bầu cà phê đến đỉnh sinh trưởng của cây
- Đường kính gốc thân (mm): Dùng thước kẹp Palmer để đo đường kính gốc cây ở vị trí cách mặt bầu 3 cm. Đường kính gốc thân được tính bằng trung bình cộng của 2 lần đo ở 2 vị trí vuông góc.
- Số cặp lá (cặp lá/cây): đếm toàn bộ số cặp lá trên cây
- Chiều dài lá (cm): đo từ gốc lá đến chóp lá.
- Chiều rộng lá (cm): đo tại vị trí rộng nhất của lá.
- Diện tích lá ($\text{cm}^2/\text{lá}$) : $S = Kab$ ($K = 0,66$; a: chiều dài lá; b: chiều rộng lá) (Phan Văn Tân và Nguyễn Văn Thái, 2000) [25].
- Chiều dài rễ (cm): đo bằng thước có khắc vạch, chính xác đến mm.
- Khối lượng rễ tươi (g/bộ rễ): cân toàn bộ khối lượng bộ rễ của các cây đã chọn để theo dõi các chỉ tiêu trên.
- Khối lượng cây tươi (g/cây): cân toàn bộ khối lượng các bộ phận trên mặt đất của các cây đã chọn theo dõi các chỉ tiêu trên
- Hàm lượng đạm và lân trong lá (% chất khô trong lá).
- Hàm lượng diệp lục chlorophyll a (Chl_a), chlorophyll b (Chl_b) và carotenoid (C_{car}) trong lá (mg/g lá tươi).

Thí nghiệm 2: Đánh giá khả năng tương hợp của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc trong điều kiện *in vitro*

Dựa vào kết quả thu được từ thí nghiệm 1, tuyển chọn 3 chủng có ảnh hưởng tốt nhất đến sinh trưởng cây con cà phê với để đánh giá khả năng tương hợp của chúng phục vụ cho các thí nghiệm ngoài đồng ruộng. Các chủng vi khuẩn được chọn để thực hiện thí nghiệm này gồm: *B. subtilis* EK17, *B. pumilus* BMT 4 và *B. cereus* M15.

Thử khả năng tương thích giữa các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc bằng phương pháp cấy vạch vuông góc trên môi trường pepton. Cấy thẳng vạch vi khuẩn thứ nhất, sau đó cấy chủng vi khuẩn thứ hai vuông góc với vạch thứ nhất. Các đĩa vi

khuẩn được nuôi giữ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong vòng 72 giờ. Nếu tại điểm giao nhau của 2 vạch, vi khuẩn thứ nhất không mọc thì vi khuẩn thứ hai có khả năng ức chế vi khuẩn thứ nhất (kết quả dương tính). Nếu tại điểm giao nhau của 2 vạch, vi khuẩn thứ hai mọc trên đường vạch của vi khuẩn thứ nhất thì vi khuẩn thứ hai có khả năng xâm lấn vi khuẩn thứ nhất. Kết quả âm tính khi vi khuẩn thứ nhất vẫn phát triển bình thường tại điểm giao nhau của 2 vạch (Fukui *et al.*, 1994) [76]. Chỉ thực hiện phối trộn các chủng cho kết quả âm tính (tương thích và không đối kháng với nhau).

2.4.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản trên đồng ruộng.

a. Thời gian: từ tháng 9/2017 đến tháng 3/2019.

b. Địa điểm: xã Hòa Thuận, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

c. Đối tượng nghiên cứu:

- Ba chủng vi khuẩn có ảnh hưởng tốt nhất đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm được chọn lọc từ kết quả nghiên cứu của thí nghiệm 1 gồm: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4.

- Cây cà phê với thực sinh, trồng cuối tháng 7 năm 2017, có 5 – 6 cặp lá thật, tái canh trên nền đất đỏ bazan. Sau vụ thu hoạch năm 2016, vườn cây cà phê già cỗi bị nhổ bỏ bằng máy móc, thu gom và đưa toàn bộ thân, cành, rễ ra khỏi vườn. Đất sau đó được phơi trong 4 tháng, rồi rải vôi bột (1 tấn/ha). Phân hữu cơ ủ từ vỏ cà phê + phân bò + *Trichoderma* được bón với lượng 15 kg/hố khoảng 1 tháng trước khi trồng lại. Phân lân nung chảy Văn Điển được bón lót vào hố trước khi trồng với lượng 500g/hố.

d. Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 2 yếu tố với 4 tổ hợp các chủng vi khuẩn và 3 mức liều lượng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tổng thí nghiệm gồm 36 ô cơ sở. Mỗi ô cơ sở gồm 9 cây. Giữa các ô cơ sở được cách ly bởi 1 hàng cà phê. Các công thức thí nghiệm như sau:

Bảng 2.1. Công thức thí nghiệm vườn kiến thiết cơ bản ngoài đồng ruộng

Hỗn hợp vi khuẩn Liều lượng	B0 (Đối chứng)	B1 (<i>B. cereus</i> + <i>B. subtilis</i>)	B2 (<i>B. subtilis</i> + <i>B. pumilus</i>)	B3 (<i>B. cereus</i> + <i>B. pumilus</i>)
D1 (10ml/cây)	D1B0 (CT1)	D1B1 (CT4)	D1B2 (CT7)	D1B3 (CT10)
D2 (20ml/cây)	D2B0 (CT2)	D2B1 (CT5)	D2B2 (CT8)	D2B3 (CT11)
D3 (30ml/cây)	D3B0 (CT3)	D3B1 (CT6)	D3B2 (CT9)	D3B3 (CT12)

Ghi chú: D: các mức liều lượng hỗn hợp vi khuẩn; B: hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Các công thức thí nghiệm được bố trí như sau:

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm vườn kiến thiết cơ bản

LLL	Công thức thí nghiệm											
I	CT1	CT4	CT7	CT10	CT3	CT5	CT9	CT12	CT2	CT6	CT8	CT11
II	CT5	CT2	CT11	CT8	CT6	CT12	CT1	CT7	CT10	CT9	CT4	CT3
III	CT7	CT12	CT4	CT2	CT9	CT3	CT10	CT6	CT8	CT1	CT11	CT5

Các cây cà phê trong thí nghiệm được chăm sóc dựa theo Quy trình tái canh cây cà phê vối (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016) [4] với chế độ phân bón hóa học như sau:

- Các công thức đối chứng B0 (CT1, CT2 và CT3): bón phân hóa học theo quy trình tái canh cây cà phê vối.

- Các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn nội sinh (CT4 đến CT12)

+ Năm thứ nhất: giảm 25% phân N so với quy trình (111 kg urê + 550 kg lân nung chảy + 70 kg kali clorua).

+ Năm thứ hai: giảm 25% phân N và 25% P so với quy trình (150 kg ure + 75 kg SA + 412,5 kg lân nung chảy + 150 kg kali clorua).

e. Phương pháp xử lý: Hỗn hợp huyền phù vi khuẩn (10^9 CFU/mL) được xử lý 6 lần như sau: lần 1: tháng 9/2017, lần 2: tháng 11/2017, lần 3: tháng 3/2018, lần 4: tháng 5/2018, lần 5: tháng 9/2018, lần 6: tháng 11/2018. Hỗn hợp huyền phù vi

khuẩn được pha trong 2 - 5 lít nước/cây tùy vào tháng tuổi của cây. Tưới vào đất ở vị trí gốc và xung quanh tán cây cà phê. Trước khi xử lý, cây cà phê được tưới nước đủ ẩm. Vật liệu che phủ gốc được cào ra trước khi xử lý huyền phù vi khuẩn và lấp lại xong khi xử lý xong. Phân bón hóa học được chia thành 4 lần bón theo Quy trình tái canh cây cà phê vối.

f. Các chỉ tiêu theo dõi:

- Hàm lượng N và P trong lá (%)
- Hàm lượng diệp lục tố (Chl_a , Chl_b và C_{car} trong lá (mg/g lá tươi)
- Chiều cao cây (cm)
- Đường kính gốc (mm)
- Số cặp cành cơ bản (cặp cành/cây)
- Số cặp lá (cặp lá/cây)
- Chiều dài cành cơ bản (cm/cành)
- Số đốt/cành cơ bản (đốt/cành)
- Số quả trên chùm (quả/chùm)
- Thành phần và mật độ tuyến trùng trong đất (con/50g đất)

Thời gian theo dõi: Định kì theo dõi 2 tháng/lần (trước khi bón phân và xử lý thuốc hoá học, nếu có).

2.4.3. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cà phê với giai đoạn kinh doanh ngoài đồng ruộng

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển của cà phê với giai đoạn kinh doanh trên đồng ruộng

a. Thời gian: Tháng 7/2016 – Tháng 11/2018

b. Địa điểm: xã Hòa Xuân, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

c. Đối tượng nghiên cứu:

- Cây cà phê với giai đoạn kinh doanh 19 tuổi trồng trên nền đất đỏ bazan. Sầu riêng được trồng xen trong vườn cà phê với khoảng cách 12 x 12 m. Phân hữu cơ hoai mục ủ từ vỏ cà phê + phân bò + *Trichoderma* được bón 2 năm/lần với lượng 15

kg/cây/đợt. Năng suất trung bình của vườn cây trước khi tiến hành thí nghiệm dao động trong khoảng 2,7 – 3,0 tấn nhân/ha.

- Ba chủng vi khuẩn có ảnh hưởng tốt nhất đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm được chọn lọc từ kết quả nghiên cứu của thí nghiệm 1 gồm: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4.

d. Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên 2 yếu tố với 4 tổ hợp các chủng vi khuẩn và 3 mức liều lượng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tổng thí nghiệm gồm 36 ô cơ sở. Mỗi ô cơ sở gồm 9 cây. Giữa các ô cơ sở được cách ly bởi 1 hàng cà phê. Các công thức thí nghiệm như sau:

Bảng 2.2. Công thức thí nghiệm vườn kinh doanh ngoài đồng ruộng

Hỗn hợp vi khuẩn Liều lượng	B0 (Đối chứng)	B1 (<i>B. cereus</i> M15 + <i>B. subtilis</i> EK17)	B2 (<i>B. subtilis</i> EK17+ <i>B. pumilus</i> BMT4)	B3 (<i>B. cereus</i> M15 + <i>B. pumilus</i> BMT4)
D1 (20ml/cây)	D1B0 (CT1)	D1B1 (CT4)	D1B2 (CT7)	D1B3 (CT10)
D2 (30ml/cây)	D2B0 (CT2)	D2B1 (CT5)	D2B2 (CT8)	D2B3 (CT11)
D3 (40ml/cây)	D3B0 (CT3)	D3B1 (CT6)	D3B2 (CT9)	D3B3 (CT12)

Ghi chú: D: các mức liều lượng hỗn hợp vi khuẩn; B: hỗn hợp các chủng vi khuẩn.

Các công thức thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD) như sau:

Các cây cà phê trong thí nghiệm được chăm sóc dựa theo Quy trình tái canh cây cà phê với (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016) [4], với chế độ phân bón hóa học như sau:

- Các công thức đối chứng B0 (CT1, CT2 và CT3): 100% phân bón theo quy trình (400 kg ure + 250 kg SA + 550 kg lân nung chảy + 350 kg Kali clorua)

- Các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn nội sinh (CT4 đến CT12): giảm 25% lượng phân N và P theo quy trình (300 kg ure + 188 kg SA + 412 kg lân nung chảy + 350 kg kali clorua).

Sơ đồ 2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm vườn kinh doanh

LLL	CÔNG THỨC THÍ NGHIỆM											
I	CT8	CT11	CT1	CT5	CT12	CT4	CT2	CT7	CT9	CT10	CT3	CT6
II	CT4	CT9	CT5	CT2	CT8	CT11	CT6	CT1	CT12	CT7	CT10	CT3
III	CT1	CT6	CT7	CT12	CT4	CT2	CT9	CT3	CT8	CT5	CT11	CT10

e. Phương pháp xử lý:

- Hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nghiên cứu (10^9 CFU/mL) được xử lý 5 lần/năm (giữa mùa khô; cuối mùa khô; đầu mùa mưa; giữa mùa mưa; cuối mùa mưa). Lần xử lý đầu tiên bắt đầu từ tháng 7/2016. Hỗn hợp huyền phù vi khuẩn được khuấy đều trong nước sạch và tưới 5 lít nước/cây. Tưới vào đất ở vị trí gốc và xung quanh tán cây cà phê. Trước khi xử lý, cây cà phê được tưới nước đủ ẩm. Vật liệu che phủ gốc được cào ra trước khi xử lý huyền phù vi khuẩn và lấp lại xong khi xử lý xong.

- Phân bón được bón theo qui trình tái canh cà phê của (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016) [4]

f. Các chỉ tiêu theo dõi:

- Hàm lượng N và P trong lá (% chất khô trong lá)
- Hàm lượng diệp lục tố trong lá: Chl_a , Chl_b và C_{car} (mg/g lá tươi)
- Chiều dài đoạn cành dự trữ (cm)
- Số đốt trên đoạn cành dự trữ (đốt/cành)
- Số quả trên chùm (quả/chùm)
- Tỷ lệ quả tươi : nhân
- Năng suất cà phê nhân (tấn/ha)
- Tỷ lệ hạt cà phê nhân xuất khẩu (%)
- Mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. trong đất (con/50g) và trong rễ (con/5 g rễ).

Thời gian theo dõi: Định kì theo dõi 2 tháng/lần (trước khi bón phân và xử lý thuốc hoá học, nếu có).

2.4.4. Phương pháp lấy mẫu và theo dõi các chỉ tiêu

2.4.4.1. Phương pháp lấy mẫu

- Mẫu đất: lấy theo hình chiếu tán lá (cách gốc từ 1,2 - 1,4 m), lấy từ mặt đất xuống độ sâu 30 cm bằng khoan chuyên dụng, mỗi cây lấy 1 mũi khoan, sau đó trộn đều làm mẫu đại diện cho ô.

- Mẫu rễ: rễ tơ được lấy theo hình chiếu tán, lấy đến độ sâu 30 cm. Mỗi cây lấy ở 4 vị trí theo 4 hướng. Mỗi công thức lấy mẫu ở 5 cây, trộn đều thành 1 mẫu. Mẫu được giữ ẩm ở nơi mát và ly trích tuyến trùng ngay trong ngày.

- Mẫu lá: lấy ở cặp lá thứ 3 từ ngọn trở vào trên cành sinh trưởng bình thường, ở giữa tán, lấy bốn hướng đối diện và trên 5 cây (8 lá/cây) cách đều, sau đó trộn đều làm mẫu đại diện cho ô. Mẫu lá được rửa sạch, bảo quản ở nơi thoáng mát và xử lý để phân tích hàm lượng diệp lục tổng hợp ngay trong ngày.

2.4.4.2. Phương pháp theo dõi các chỉ tiêu:

Mỗi công thức thí nghiệm, đánh dấu cố định 3 cây để theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng sau:

- Chiều cao cây (cm): dùng thước dây đo từ mặt đất đến đỉnh sinh trưởng của cây. Theo dõi chỉ tiêu này đến thời điểm 6 tháng sau xử lý (6T SXL).

- Đường kính gốc (mm): dùng thước kẹp Palmer để đo đường kính gốc cây ở vị trí cách mặt đất 5 cm. Đường kính gốc thân được tính bằng trung bình cộng của 2 lần đo ở 2 vị trí vuông góc.

- Số cặp cành: đếm toàn bộ số cặp cành mọc trên thân chính.

- Số cặp lá: đếm toàn bộ số cặp lá mọc trên thân chính. Theo dõi chỉ tiêu này đến thời điểm 6 tháng sau xử lý (6T SXL).

- Chiều dài cành cơ bản (cm): mỗi cây, đánh dấu và theo dõi cố định 4 cành phân bố theo 4 hướng. Mỗi cành, đo chiều dài từ vị trí phân cành đến đầu mút của cành.

- Số đốt trên cành cơ bản (đốt/cành): trên mỗi cành cơ bản theo dõi chỉ tiêu chiều dài cành, đếm toàn bộ số đốt.

- Số quả trên chùm: mỗi cây, đánh dấu và theo dõi cố định 4 chùm quả trên 4 cành phân bố theo 4 hướng. Trên mỗi chùm quả, đếm toàn bộ số quả trên từng chùm.

- Chiều dài đoạn cành dự trữ (cm): chiều dài đoạn cành dự trữ được đo từ vị trí chùm quả cuối cùng đến đầu mút cành và được tính bằng trung bình cộng của 4 lần đo ở 4 cành phân bố theo 4 hướng khác nhau.

- Số đốt trên đoạn cành dự trữ (đốt/cành): đếm toàn bộ số đốt trên các đoạn cành dự trữ theo dõi chiều dài.

- Năng suất quả tươi (tấn/ha): thu hoạch cà phê theo từng công thức, cân toàn bộ khối lượng và tính năng suất quả tươi quy đổi trên 1 ha (tấn quả tươi/ha).

- Tỷ lệ quả tươi: nhân: cà phê tươi sau khi thu hoạch được phơi hoặc sấy đến khi hạt cà phê nhân đạt ẩm độ 13%, sát tách vỏ, cân và tính tỷ lệ quả tươi: nhân.

$$\text{- Năng suất nhân (tấn/ha)} = \frac{\text{Năng suất quả tươi}}{\text{Tỷ lệ tươi:nhân}}$$

- Tỷ lệ hạt cà phê nhân trên sàng 16 (%): nhân cà phê được rây qua sàng 16 có đường kính lỗ rây 6,3 mm. Cân và tính tỷ lệ nhân cà phê trên sàng 16 so với tổng khối lượng nhân cà phê đem rây.

- Mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. trong đất (con/50g đất): tuyến trùng trong đất được lọc bằng phương pháp lọc Berman có cải tiến. Mẫu đất mang về phòng thí nghiệm, trộn đều theo từng mẫu rồi cân 50 g đất cho vào rây có đường kính 10 cm, bên trong rây đặt một mảnh vải lọc không cho đất và tàn dư thực vật rơi xuống đĩa. Đặt rây vào đĩa và đổ nước từ từ ở mép ngoài của rây, giữ mực nước xâm xấp lượng đất trong rây. Để ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tuyến trùng sẽ di chuyển qua màng lọc và rơi xuống đĩa. Khi đã đủ thời gian, bỏ rây ra khỏi đĩa, dùng bình tia xịt xung quanh và đáy đĩa để đảm bảo tuyến trùng không bị sót lại ở những vị trí này. Dịch lọc tuyến trùng bên trong đĩa được chuyển sang cốc đong thủy tinh dung tích 100 ml. Dùng kính kính soi nổi để xác định mật độ tuyến trùng trong dịch lọc.

- Mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. trong rễ (con/100g rễ): tuyến trùng trong rễ được ly trích bằng phương pháp lọc qua rây. Rễ sau khi thu thập được rửa sạch dưới vòi nước mạnh, để ráo nước rồi cắt thành từng đoạn dài 0,5 - 1cm. Trộn đều mẫu rồi cân 5g rễ cho vào máy xay sinh tố chứa 100 ml nước, xay ba lần, mỗi lần 10 giây, sau mỗi lần xay nghỉ 10 giây. Hỗn hợp sau đó được chuyển sang rây lọc đường kính 10 cm và ngâm ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian 48 giờ. ở điều kiện phòng và làm tương tự như phần còn lại của ly trích tuyến trùng trong đất. Tuyến trùng sẽ di chuyển qua màng lọc và rớt xuống đĩa. Khi đã đủ thời gian, bỏ rây ra khỏi đĩa, dùng bình tia xịt xung quanh và đáy đĩa để đảm bảo tuyến trùng không bị sót lại ở những vị trí này. Dịch lọc tuyến trùng bên trong đĩa được chuyển sang cốc đong thủy tinh dung tích 100 ml. Dùng kính kính soi nổi để xác định mật độ tuyến trùng trong dịch lọc.

Hiệu quả của thuốc đối với mỗi loài tuyến trùng trong rễ và trong đất tại các thời điểm điều tra được hiệu chỉnh theo công thức Henderson - Tilton:

$$H\% = 1 - \frac{(Ta \times Cb)}{(Tb \times Ca)} \times 100$$

Trong đó:

- + Ta: Mật độ tuyến trùng sau xử lý ở công thức xử lý vi khuẩn.
- + Tb: Mật độ tuyến trùng trước xử lý ở công thức xử lý vi khuẩn.
- + Ca: Mật độ tuyến trùng sau xử lý ở công thức đối chứng.
- + Cb: Mật độ tuyến trùng trước xử lý ở công thức đối chứng.

- Hàm lượng đạm tổng số trong lá (% chất khô trong lá): được xác định theo tiêu chuẩn 10TCN 451: 2001 (Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn, 2001) [3].

- Hàm lượng lân tổng số trong lá (% chất khô trong lá): được xác định bằng phương pháp quang phổ trên thiết bị UV Vis Jasco, Nhật Bản theo tiêu chuẩn 10TCN 453: 2001 (Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn, 2001) [2].

- Hàm lượng diệp lục chlorophyll a (Chl_a), chlorophyll b (Chl_b) và carotenoid (C_{car}) được xác định bằng phương pháp quang phổ trên thiết bị UV Vis Jasco, Nhật Bản (Yoshida *et al.*, 1976) [217].

$$\text{- Mức tăng so với trước xử lý (\%)} = \frac{SXL - TXL}{TXL} \times 100$$

Trong đó:

+ SXL: giá trị trung bình sau xử lý

+ TXL: giá trị trung bình trước xử lý

$$\text{- Mức tăng so với đối chứng (\%)} = \frac{TN - ĐC}{ĐC} \times 100$$

Trong đó:

+ TN: giá trị trung bình ở công thức xử lý vi khuẩn

+ ĐC: giá trị trung bình ở công thức đối chứng

2.4.5. Phương pháp xử lý số liệu:

Các số liệu thu được trong các thí nghiệm được tổng hợp và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) 1 hoặc 2 nhân tố, dùng phép kiểm định Duncan hoặc LSD test ở mức $P < 0,05$ và $P < 0,01$ để so sánh sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm sử dụng phần mềm thống kê SAS 9.2.

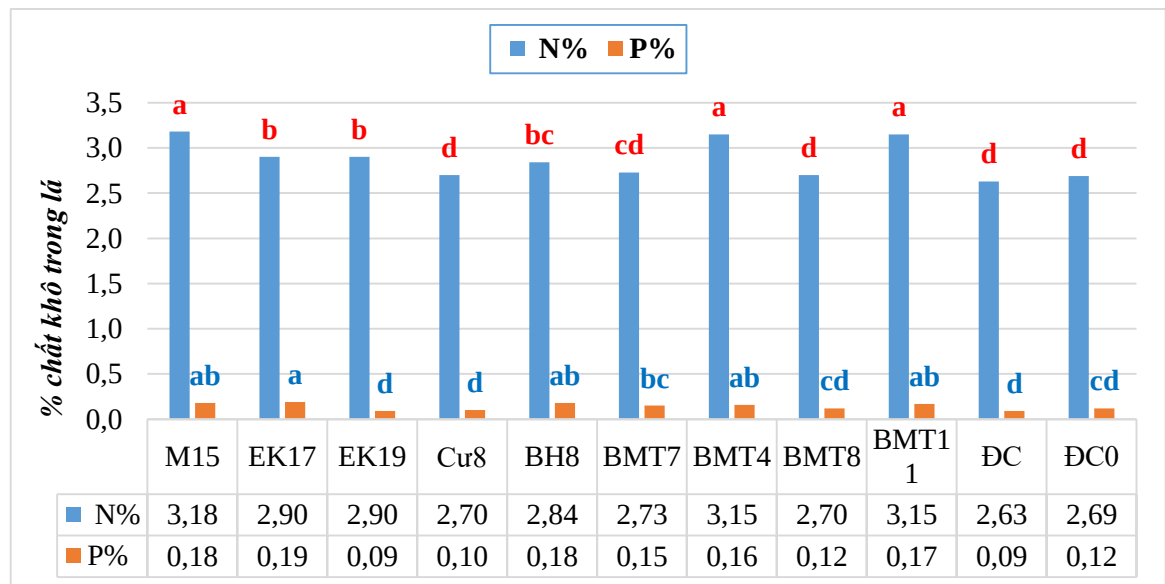
Các số liệu % được chuyển đổi sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

3.1.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Đạm (N) và lân (P) là hai dinh dưỡng đa lượng rất quan trọng, ảnh hưởng quyết định đến quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26]. Các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn sử dụng trong thí nghiệm đều là các chủng có hoạt tính cố định N và phân giải P khó tan mạnh trong in vitro. Để đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến khả năng hấp thu dinh dưỡng N và P của cây. Sau thời gian xử lý chủng 4 tháng, lá cây cà phê được thu thập và phân tích hàm lượng đạm (N%) và lân (P%) tích lũy trong lá. Kết quả được trình bày trong Biểu đồ 3.1.



Biểu đồ 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng đạm và lân trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau trên các cột cùng màu thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Range Test ở mức $p < 0,01$.

Kết quả trình bày trong Biểu đồ 3.1. cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về hàm lượng đạm và lân tích lũy trong lá giữa hai công thức đối chứng là ĐC (môi trường M1 dùng để nhân nuôi các chủng vi khuẩn nội sinh thí nghiệm) và ĐC0 (nước lã). Điều này có nghĩa, hàm lượng dinh dưỡng có trong môi trường dùng để nhân nuôi các chủng vi khuẩn nội sinh không ảnh hưởng đến hàm lượng N% và P% tích lũy trong lá cây cà phê.

Kết quả ở Biểu đồ 3.1 còn cho thấy với cùng chế độ chăm sóc, việc chủng nhiễm các chủng vi khuẩn nội sinh khác nhau đã ảnh hưởng khác nhau đến hàm lượng đạm và lân tích lũy trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm. Sau 4 tháng chủng nhiễm vi khuẩn nội sinh vào cây con, hàm lượng N% và P% trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm ở tất cả các công thức có chủng vi khuẩn nội sinh đều cao hơn so với ở hai công thức đối chứng ĐC và ĐC0. Hàm lượng N% ở tất cả các công thức xử lý các chủng vi khuẩn nội sinh dao động trong khoảng 2,70 – 3,18% trong khi ở 2 công thức đối chứng ĐC và ĐC0 chỉ đạt 2,63 và 2,69%. Theo thang dinh dưỡng được xây dựng bởi Đoàn Triệu Nhạn (1982) [18] (2,7 – 3,0%), hàm lượng N% trong lá ở tất cả các công thức xử lý vi khuẩn đều nằm trong, thậm chí vượt ngưỡng tối ưu đối với sinh trưởng của cây cà phê với. Tuy nhiên, theo thang dinh dưỡng xây dựng cho cây cà phê với giai đoạn kinh doanh của Nguyễn Văn Sanh (2009) [24], chỉ các công thức xử lý các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. pumilus* BMT4 và *Bacillus* sp. BMT11 mới có hàm lượng N% trong lá nằm trong ngưỡng tối ưu (3,0 – 3,2%). Hàm lượng N% trong lá ở các công thức này cao hơn so với ở công thức đối chứng ĐC lần lượt là: 20,9%, 19,8% và 19,8%. Sự khác biệt về hàm lượng N% trong lá giữa các công thức rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

Trong thí nghiệm này, khả năng tích lũy đạm trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm ở công thức có chủng vi khuẩn *B. cereus* M15 đạt 3,18% và cao hơn so với công thức đối chứng ĐC0 (nước lã) 18,2%. Tuy nhiên, giá trị này thấp hơn so với kết quả thí nghiệm của Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17] trên cây cà phê chè giai đoạn vườn ươm. Nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17] cho thấy *B. cereus* M15 là chủng có khả năng cố định đạm rất tốt, với hàm lượng N% tích lũy trong lá

cây cà phê chè lên đến 4,27% và gấp rưỡi so với công thức đối chứng. Hai chủng *B. pumilus* BMT4 và *Bacillus* sp. BMT11 cũng được đánh giá là những chủng có hoạt tính cố định đạm khá cao trong điều kiện *in vitro*, lần lượt đạt 1,493g/ml và 1,574 mg/ml (Ngô Văn Anh và cs., 2017) [1] (Phụ lục 1, trang P1).

Kết quả ở biểu đồ 3.1 cũng cho thấy trong khi hàm lượng lân tích lũy trong lá ở các công thức đối chứng chỉ dao động trong khoảng 0,09 - 0,12%, hàm lượng P% trong lá ở một số công thức xử lý vi khuẩn có thể đạt tới 0,19%. Hàm lượng P% trong lá cao nhất ở các công thức chủng các vi khuẩn *B. subtilis* EK17, *B. cereus* M15, BH8, *Bacillus* sp. BMT11 và *B. pumilus* BMT4, đạt 0,16 – 0,19%, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ở mức $p < 0,01$. Các công thức xử lý các chủng vi khuẩn nội sinh này có hàm lượng P% trong lá cao hơn so với ở công thức đối chứng ĐC0 lần lượt là 50,0%, 58,3%, 50,0%, 33,3% và 41,7%. Kết quả này cho thấy, hàm lượng P% trong lá ở phần lớn các công thức xử lý vi khuẩn (trừ *Enterobacter cloacae* EK19, *Bacillus* sp. Cu8, *B. cereus* BMT7, *Bacillus* sp. BMT8) đều vượt quá ngưỡng tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh (Nguyễn Tri Chiêm, 1993 [5], Trương Hồng và cs., 2000 [13], Nguyễn Văn Sanh, 2009 [24]). Điều này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Trương Vĩnh Thới (2012) [27] và Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17].

Dinh dưỡng P có vai trò rất quan trọng trong cấu tạo năng lượng ATP, axit nucleic, liên quan đến phân chia tế bào và quang hợp của cây. Vì vậy, gia tăng hấp thu P nhờ khả năng phân giải P khó tan của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc sẽ ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng và phát triển của cây cà phê. Đặc biệt đối với cây trồng trên đất nâu đỏ bazan giàu P tổng số nhưng nghèo P dễ tiêu, hoạt tính phân giải P khó tan cung cấp cho cây của các chủng vi khuẩn nội sinh rất có ý nghĩa.

Kết quả trên cho thấy, việc chủng các vi khuẩn nội sinh vào cây cà phê với giai đoạn vườn ươm đã có tác động tích cực, làm gia tăng khả năng tích lũy N và P trong lá cây cà phê với. Kết quả này cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến khả năng tăng cường

dinh dưỡng tích lũy trong lá ở một số cây trồng khác. Kết quả nghiên cứu của Turner và Backman (1991) [201] cho biết chủng vi khuẩn *B. subtilis* đã làm tăng hàm lượng N% tích lũy trong lá cây lạc 12,4% so với đối chứng không xử lý. Trong một nghiên cứu khác, Mohamed và Gomaa (2012) [143] kết luận, cây cải củ *Raphanus sativus* có hàm lượng N% và P% trong lá tăng lần lượt 17% và 15% sau khi được chủng bằng vi khuẩn *B. subtilis*. Khi được chủng vào cây lúa, chủng vi khuẩn nội sinh *H. seropedicae* Z67 đã làm tăng hàm lượng N% trong rễ 29 - 61% và trong thân 37 - 85% (Baldani *et al.*, 2000) [42]. Chủng vi khuẩn nội sinh *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R đã làm tăng hàm lượng N% từ 5,42 – 31,8% khi được chủng vào cây ngô (Puri *et al.*, 2015 [164], Puri *et al.*, 2016 [163]). Khi được chủng vào cây cải dầu (canola) và cây cà chua, *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R đã làm tăng hàm lượng N% lên đến 18 – 48% và 22,5 – 33,3%, một cách tương ứng (Padda *et al.*, 2016) [157].

Như vậy, với cùng chế độ chăm sóc, việc chủng nhiễm các chủng vi khuẩn nội sinh trong thí nghiệm đã làm gia tăng khả năng hấp thu và tích lũy N và P trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm.

3.1.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Ở thực vật, quá trình quang hợp xảy ra chủ yếu ở các tế bào lá trong các cơ quan tử gọi là lục lạp chứa các sắc tố quang hợp, bao gồm: diệp lục a (*Chl_a*), diệp lục b (*Chl_b*) và carotenoid (*C_{car}*). Những sắc tố này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp và tích lũy sinh khối cho cây (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26]. Hàm lượng sắc tố quang hợp càng cao, cường độ quang hợp càng mạnh. Ngoài ra, đạm là một trong hai thành tố quan trọng nhất trong cấu tạo hóa học của các phân tử diệp lục và protein (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26], do đó, hàm lượng đạm cũng ảnh hưởng đến sự hình thành lục lạp và tích lũy diệp lục tố trong lá.

Kết quả phân tích hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm cho thấy hầu hết các chủng vi khuẩn nội sinh đã ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng các sắc tố quang hợp, làm tăng hàm lượng diệp lục a (*Chl_a*, diệp

lục b (Chl_b) và carotenoid (C_{car}) trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm so với 2 công thức đối chứng ĐC và ĐC0 (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng sắc tố quang hợp trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Công thức	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng các sắc tố trong lá (mg/g lá tươi)		
		Chl_a	Chl_b	C_{car}
CT1	<i>B. cereus</i> M15	1,142 ^a	0,683 ^a	0,529 ^{bc}
CT2	<i>B. subtilis</i> EK17	1,097 ^{ab}	0,594 ^b	0,542 ^b
CT3	<i>Enterobacter cloacae</i> EK19	0,957 ^{bcd}	0,536 ^{cd}	0,457 ^{ef}
CT4	<i>Bacillus</i> sp. CƯ8	0,811 ^{ef}	0,505 ^{def}	0,446 ^f
CT5	BH8	1,037 ^{abc}	0,519 ^{de}	0,510 ^{bcd}
CT6	<i>B. cereus</i> BMT7	1,045 ^{abc}	0,536 ^{cd}	0,495 ^{cd}
CT7	<i>B. pumilus</i> BMT4	0,995 ^{bcd}	0,573 ^{bc}	0,546 ^b
CT8	<i>Bacillus</i> sp. BMT8	0,931 ^{cde}	0,485 ^{ef}	0,498 ^{cd}
CT9	<i>Bacillus</i> sp. BMT11	1,092 ^{ab}	0,592 ^b	0,584 ^a
CT10	ĐC	0,875 ^{def}	0,490 ^{def}	0,483 ^{de}
CT11	ĐC0	0,791 ^f	0,464 ^f	0,402 ^g
p		**	**	**
CV%		7,59	4,71	4,07

Ghi chú: Chla: diệp lục a; Chlb: diệp lục b; Car: Carotenoids; **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$; Các chữ cái giống nhau trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

Hàm lượng diệp lục Chl_a ở các công thức có chủng vi khuẩn dao động từ 0,811 – 1,142 mg/g, hàm lượng Chl_b là 0,485 – 0,683 mg/g, hàm lượng carotenoid (C_{car}) là 0,446 – 0,529 mg/l. So với công thức đối chứng ĐC, hàm lượng diệp lục Chl_a và Chl_b tăng nhiều nhất ở công thức chủng vi khuẩn *B. cereus* M15 (tăng 30,5% và

39,4%, một cách tương ứng) trong khi hàm lượng carotenoid lại tăng nhiều nhất ở công thức chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. BMT11 (tăng 20,9%). Hàm lượng C_{car} cao nhất theo thứ tự là công thức chủng *Bacillus* sp. BMT11 (0,584 mg/g), *B. pumilus* BMT4 (0,546 mg/g), *B. subtilis* EK17 (0,542 mg/g) và *B. cereus* M15 (0,529 mg/g). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả trước đây về khả năng làm tăng hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá của các chủng vi khuẩn nội sinh thực vật cũng như của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. (Chauhan *et al.*, 2013) [61, Zhao *et al.*, 2015) [221]. Chẳng hạn như, hàm lượng các diệp lục tố Chl_a , Chl_b và C_{car} trong lá đã tăng lần lượt theo thứ tự là 35%, 31% và 39% sau khi chủng nhiễm vi khuẩn *B. subtilis* vào cây con *Bassia indica* (Turner and Backman, 1991) [201]. Trong một nghiên cứu khác trên cây lúa mì, vi khuẩn *B. cereus* đã làm tăng hàm lượng diệp lục tổng số từ 22,3 – 27,1% (Hassan *et al.*, 2018) [95].

Hàm lượng diệp lục trong lá càng cao chứng tỏ khả năng quang hợp của cây càng mạnh dẫn tới tăng hiệu suất quang hợp, tích lũy chất khô, sinh khối và sinh trưởng, phát triển của cây trồng. Bởi vì, quang hợp quyết định đến 90 – 95% năng suất cây trồng (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26].

Bảng 3.1 cũng cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai công thức đối chứng ĐC và ĐC0. Điều này có nghĩa hàm lượng dinh dưỡng có trong môi trường dùng để nuôi cấy các chủng vi khuẩn nội sinh dùng trong thí nghiệm không ảnh hưởng đến hàm lượng Chl_a và Chl_b tích lũy trong lá cà phê với giai đoạn vườn ươm.

3.1.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Hàm lượng đạm và lân tích lũy trong lá cà phê tăng (Biểu đồ 3.1) là tiền đề thuận lợi cho quá trình quang hợp, trao đổi chất và phân chia tế bào của cây. Đạm là một trong những thành tố quan trọng nhất trong thành phần cấu tạo hóa học của diệp lục tố, enzyme và cấu trúc tế bào. Sự gia tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm đã thúc đẩy quá trình quang hợp và hấp thu dinh dưỡng

của cây. Lân là thành phần cấu tạo của axit nuceic, năng lượng ATP, các dẫn suất phosphate trong trao đổi chất. Do đó, lân ảnh hưởng trực tiếp đến quang hợp, hô hấp và phân chia tế bào của cây trồng. Sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính cố định N, phân giải P khó tan đã làm tăng hấp thu N và P trong lá (Biểu đồ 3.1), dẫn đến những ảnh hưởng tích cực đối với các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm ươm (Bảng 3.2, 3.3 và 3.4).

Bảng 3.2 cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai công thức đối chứng ĐC và ĐC0 về chỉ tiêu chiều cao cây và đường kính gốc. Kết quả này có nghĩa hàm lượng dinh dưỡng có trong môi trường M1 dùng để nhân nuôi các chủng vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh trưởng này.

Chiều cao cây là một trong những chỉ tiêu quan trọng phản ánh khả năng sinh trưởng của cây trồng. Sự thay đổi chiều cao cây giữa các công thức theo thời gian được trình bày trong bảng 3.2.

Trong giai đoạn đầu (2 tháng sau xử lý), mặc dù cây sinh trưởng rất chậm (chiều cao cây mới chỉ dao động trong khoảng 5,31 - 7,70 cm) nhưng sự khác biệt về chiều cao cây giữa các công thức đã rất có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$. Đáng chú ý, chiều cao cây ở các công thức có chủng vi khuẩn *B. cereus* M15 và *B. cereus* BMT7 cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với các công thức khác và cao hơn so với ở công thức đối chứng ĐC lần lượt là: 45,0% và 38,2%.

Sau 4 tháng thí nghiệm, chiều cao cây ở tất cả các công thức có xử lý chủng đã tăng gấp khoảng 3 – 4 lần so với ở thời điểm sau xử lý 2 tháng. Ngoại trừ công thức CT4 (xử lý vi khuẩn *Bacillus* sp. Cu8), chiều cao cây ở tất cả các công thức xử lý vi khuẩn đều cao hơn và khác biệt rất có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$ so với ở công thức đối chứng ĐC.

Trong số các công thức xử lý vi khuẩn, công thức CT1 (*B. cereus* M15) vẫn tiếp tục là công thức có chiều cao lớn nhất, đạt 31,18 cm và cao hơn 51,2% so với ở công thức đối chứng ĐC. Đáng chú ý, cây cà phê ở công thức xử lý *Bacillus* sp. BMT11 (CT9) đã vươn lên, vượt công thức xử lý *B. cereus* BMT7 (CT6) để trở thành

công thức có chiều cao cây tương đương với ở công thức *B. cereus* M15, đạt 29,69 cm và cao hơn 44,0% so với ở công thức đối chứng ĐC. Tiếp đến, chiều cao cây ở các công thức xử lý *B. subtilis* EK17, *B. cereus* BMT7, *B. pumilus* BMT4 và *E. cloacae* EK19 lần lượt cao hơn so với ở công thức đối chứng ĐC 36,9%, 19,5%, 17,5% và 17,4%.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều cao, đường kính gốc thân và khối lượng tươi của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Công thức	Chủng vi khuẩn nội sinh	Chiều cao cây (cm)		Đường kính gốc (mm)		Khối lượng cây (g/cây)	
		2 tháng SXL	4 tháng SXL	2 tháng SXL	4 tháng SXL	2 tháng SXL	4 tháng SXL
CT1	M15	7,70 ^a	31,18 ^a	2,49 ^a	5,61 ^{ab}	2,60 ^a	11,50 ^a
CT2	EK17	5,63 ^e	28,22 ^b	2,07 ^{bc}	5,55 ^{ab}	1,78 ^b	11,22 ^a
CT3	EK19	6,63 ^{cd}	24,20 ^c	2,27 ^{ab}	5,39 ^{abc}	1,43 ^c	7,97 ^d
CT4	Cu8	6,53 ^d	21,97 ^{de}	2,04 ^{bc}	4,67 ^{efg}	1,35 ^c	6,78 ^e
CT5	BH8	6,45 ^d	23,27 ^{cd}	2,26 ^{ab}	5,15 ^{bcd}	1,88 ^b	8,93 ^b
CT6	BMT7	7,34 ^{ab}	24,64 ^c	2,50 ^a	4,79 ^{def}	1,89 ^b	8,29 ^{cd}
CT7	BMT4	7,18 ^b	24,22 ^c	2,23 ^{abc}	5,65 ^a	1,78 ^b	8,49 ^{bcd}
CT8	BMT8	7,03 ^{bc}	23,19 ^{cd}	2,20 ^{bc}	4,98 ^{cde}	1,70 ^b	6,78 ^e
CT9	BMT11	6,29 ^d	29,69 ^{ab}	2,28 ^{ab}	5,41 ^{abc}	1,18 ^{cd}	8,71 ^{bc}
CT10	ĐC	5,31 ^e	20,62 ^e	2,14 ^{bc}	4,42 ^{fg}	1,04 ^d	5,29 ^f
CT11	ĐC0	5,63 ^e	17,89 ^f	1,97 ^c	4,28 ^g	1,03 ^d	4,78 ^g
p		**	**	*	**	**	**
CV%		4,21	3,63	6,48	4,85	9,53	3,65

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; *: khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$; Các chỉ số chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

Không chỉ giúp cây phát triển chiều cao, các chủng vi khuẩn nội sinh còn làm tăng đường kính gốc thân của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm (bảng 3.2), là tiền đề giúp cây cứng cáp, phát triển khỏe mạnh. Sau 2 tháng chủng vi khuẩn, sự khác biệt về đường kính gốc thân giữa các công thức chủng vi khuẩn và công thức đối chứng rất ít, đường kính gốc của các công thức có chủng vi khuẩn dao động trong khoảng 2,04 – 2,50 mm trong khi ở 2 công thức đối chứng ĐC và ĐC0 lần lượt là 2,14 và 1,97 mm. Sau đó, sự cách biệt này đã tăng đáng kể ở thời điểm sau 4 tháng xử lý. Đường kính gốc thân ở các công thức chủng vi khuẩn *B. pumilus* BMT4, *B. cereus* M15, *B. substilis* EK17, *Bacillus* sp. BMT11 và *E. cloacae* EK19 tương đương nhau, dao động trong khoảng 5,39- 5,65 mm, lần lượt cao gấp 27,8%, 26,9%, 25,6%, 22,4% và 21,9% so với ở công thức đối chứng ĐC (4,42 mm).



Hình 3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Sự phát triển về chiều cao và đường kính gốc thân đã góp phần làm tăng khối lượng cây tươi. Sau 4 tháng chủng vi khuẩn nội sinh vào cây con, khối lượng cây tươi đã tăng rất đáng kể (4 – 7 lần) so với ở thời điểm 2 tháng sau chủng. Sau 4 tháng, khối lượng cây tươi ở các công thức chủng vi khuẩn *B. cereus* M15 (11,50 g) và *B. substilis* EK17 (11,22 g) cao vượt trội so với các công thức còn lại và cao hơn 117,5% so với ở công thức đối chứng ĐC. Tiếp đến là các công thức có chủng vi khuẩn BH8,

Bacillus sp. BMT11 và *B. pumilus* BMT4. Khối lượng cây tươi ở các công thức này lần lượt đạt 8,93 g, 8,71 g và 8,29 g.

Lá là cơ quan làm nhiệm vụ quang hợp chủ yếu ở thực vật (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26]. Do vậy, tăng số lá và diện tích lá là một trong những biện pháp thúc đẩy quá trình quang hợp tổng hợp chất hữu cơ, giúp cây sinh trưởng và phát triển tốt. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu: số cặp lá, chiều dài lá, chiều rộng lá và diện tích lá cho thấy các chủng vi khuẩn đã ảnh hưởng rất đáng kể đến quá trình quang hợp của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến bộ lá cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Công thức	Vi khuẩn	Số cặp lá (cặp)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Diện tích lá (cm ² /lá)
CT1	M15	7,11 ^a	17,85 ^a	6,53 ^{ab}	76,94 ^a
CT2	EK17	6,83 ^{ab}	16,34 ^{abcd}	6,84 ^a	73,92 ^a
CT3	EK19	6,89 ^a	15,57 ^{bcdef}	6,02 ^{cd}	61,85 ^b
CT4	Cur8	6,17 ^{cd}	14,70 ^{ef}	5,70 ^{def}	55,36 ^{bc}
CT5	BH8	6,50 ^{abc}	15,36 ^{cdef}	5,90 ^{de}	59,79 ^b
CT6	BMT7	6,22 ^{bcd}	14,89 ^{def}	5,57 ^{ef}	54,71 ^{bc}
CT7	BMT4	7,17 ^a	16,78 ^{abc}	6,37 ^{bc}	70,45 ^a
CT8	BMT8	6,17 ^{cd}	15,88 ^{bcde}	5,49 ^f	57,52 ^{bc}
CT9	BMT11	7,00 ^a	17,13 ^{ab}	6,33 ^{bc}	71,64 ^a
CT10	ĐC	6,05 ^{dc}	14,10 ^f	5,33 ^{fg}	49,60 ^{cd}
CT11	ĐC0	5,72 ^d	12,51 ^g	5,10 ^g	42,14 ^d
P		**	**	**	**
CV%		5,42	5,47	3,62	7,26

Ghi chú: **Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; * :khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$; Các chỉ số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

Sau 4 tháng chủng vi khuẩn, cây cà phê ở các công thức xử lý vi khuẩn *B. pumilus* BMT4, *B. cereus* M15, *Bacillus* sp. BMT11 có khoảng 7 cặp lá và nhiều hơn

so với ở đối chứng ĐC 18,4%, 17,5% và 15,6% số cặp lá. Chiều dài lá và chiều rộng lá ở các công thức chủng vi khuẩn cũng tăng đáng kể. Chiều dài và chiều rộng lá ở một số công thức (*B. cereus* M15, *Bacillus* sp. BMT11 và *B. subtilis* B. *subtilis* EK17) đã tăng trên 20% so với công thức đối chứng ĐC. Kết quả này dẫn đến diện tích lá ở các công thức có chủng vi khuẩn đã tăng 10,3 - 55,1% so với ở công thức đối chứng ĐC. Diện tích lá cao nhất theo thứ tự là ở các công thức có chủng vi khuẩn *B. cereus* M15 (76,9 cm²/lá), *B. subtilis* EK17 (73,9 cm²/lá), *Bacillus* sp. BMT11 (71,6 cm²/lá) và *B. pumilus* BMT4 (70,5 cm²/lá) trong khi ở công thức đối chứng ĐC chỉ là 49,6 cm²/lá và ở công thức ĐC0 là 42,1 cm²/lá. Sự khác biệt về số cặp lá và diện tích lá giữa hai công thức đối chứng ĐC và ĐC0 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa hàm lượng dinh dưỡng có trong môi trường dùng để nhân sinh khối các chủng vi khuẩn thí nghiệm không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu này.

Không chỉ giúp các chỉ tiêu sinh trưởng của các bộ phận trên mặt đất gia tăng, các chủng vi khuẩn nội sinh còn thúc đẩy bộ rễ phát triển rất tốt, làm tăng đáng kể chiều dài và khối lượng tươi của rễ cây cà phê với giai đoạn vườn ươm. Bộ rễ ở các công thức chủng các vi khuẩn *E. cloacae* EK19, *B. cereus* M15 dài nhất, lần lượt theo thứ tự là 37,17 cm và 35,49 cm và gấp khoảng 1,3 lần so với ở công thức đối chứng ĐC. Thế nhưng, khối lượng rễ tươi lại cao nhất ở các công thức có chủng các vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4, đạt 5,06 g/cây, 4,81 g/cây và 4,78 g/cây, một cách tương ứng. Kết quả này là do bộ rễ ở các công thức này phát triển không chỉ theo chiều dọc mà còn theo chiều rộng trong khi các chủng *E. cloacae* EK19, BH8, *B. cereus* BMT7, *Bacillus* sp. BMT8 lại chỉ giúp bộ rễ phát triển theo chiều sâu (hình 3.2). Sự phát triển của bộ rễ đặc biệt quan trọng giúp cho cây tăng cường khả năng hấp thu nước và chất dinh dưỡng cung cấp cho quá trình sống và phát triển của chúng. Chính vì vậy, các chỉ tiêu sinh trưởng của các bộ phận trên mặt đất của cây con cà phê ở các công thức chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 cũng vượt trội hơn hẳn so với ở các công thức khác.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng bộ rễ của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Công thức	Vi khuẩn	Chiều dài rễ (cm)		Khối lượng rễ (g/cây)	
		2 tháng	4 tháng	2 tháng	4 tháng
CT1	M15	14,47 ^a	35,49 ^b	0,42 ^a	5,06 ^a
CT2	EK17	12,54 ^{bcd}	27,13 ^e	0,28 ^{bc}	4,81 ^{ab}
CT3	EK19	13,03 ^{abcd}	37,17 ^a	0,28 ^{bc}	2,76 ^{de}
CT4	Cr8	12,89 ^{bcd}	28,79 ^d	0,20 ^{cde}	2,61 ^e
CT5	BH8	13,20 ^{abcd}	23,59 ^f	0,41 ^a	4,14 ^c
CT6	BMT7	13,81 ^{ab}	28,04 ^{de}	0,30 ^b	3,33 ^d
CT7	BMT4	13,73 ^{abc}	27,17 ^e	0,31 ^b	4,78 ^{ab}
CT8	BMT8	11,88 ^d	31,69 ^c	0,25 ^{bc}	1,86 ^f
CT9	BMT11	12,22 ^{dc}	31,58 ^c	0,23 ^{bcd}	4,34 ^{bc}
CT10	ĐC	8,94 ^e	28,48 ^{de}	0,11 ^e	1,51 ^f
CT11	ĐC0	8,62 ^e	21,96 ^g	0,15 ^{de}	1,38 ^f
p		*	**	**	**
CV%		6,47	2,90	19,09	10,52

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; *: khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$; Các chỉ số chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Rang Test.

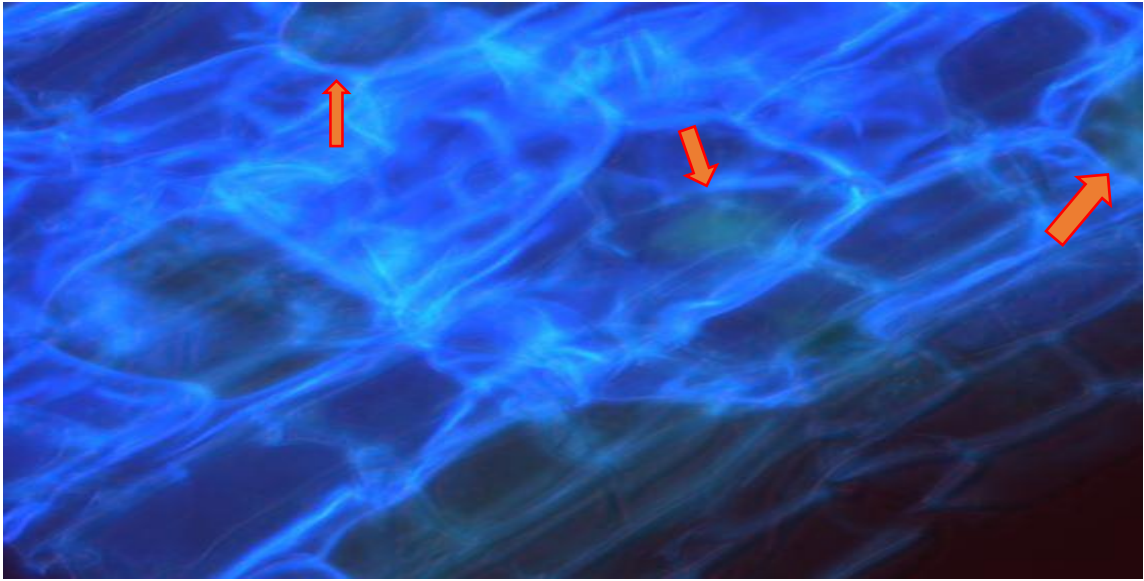
B. cereus và *B. subtilis* cũng đã được ghi nhận là những chủng có khả năng thúc đẩy sinh trưởng của cây ớt (Zhou *et al.*, 2014) [223], cây lạc (Turner and Backman, 1991) [201], cà chua, mướp tây và rau bó xôi (Adesemoye *et al.*, 2008) [29]. Các kết quả nghiên cứu của những tác giả này cũng cho thấy, tùy từng loại cây trồng khác nhau mà mức độ ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn đến các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cũng khác nhau. Adesemoye *et al.* (2008) [29] đã nghiên cứu ảnh

hưởng của vi khuẩn *B. subtilis* đến sinh trưởng của cà chua, mướp tây và rau bó xôi và cho biết khối lượng cây khô ở các công thức xử lý vi khuẩn *B. subtilis* đã tăng lần lượt theo thứ tự là 31%, 36% và 83% trong khi chiều cao cây tăng 28%, 43% và 27%, một cách tương ứng. *B. subtilis* và *B. cereus* làm tăng khối lượng cây tiêu từ 7,4 – 29,6% tùy vào phương pháp chủng vi khuẩn cũng như lượng huyền phù vi khuẩn xử lý (Zhou *et al.*, 2014) [223]. Kết quả nghiên cứu của Jha and Subramanian (2013) [107] cũng cho biết vi khuẩn *B. pumilus* cũng có ảnh hưởng đáng kể đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây lúa như đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm 7%, tăng khối lượng cây khô 20% và tăng chiều cao cây 12% so với đối chứng. Trên cây cà chua, *B. pumilus* làm tăng khối lượng cây tươi từ 8 - 31%, tăng chiều cao cây từ 11 - 46%, tăng khối lượng rễ tươi từ 8 - 65% và tăng chiều dài rễ lên đến 59% (Ramezani *et al.*, 2014) [167].



Hình 3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sự phát triển bộ rễ cây cà phê với giai đoạn vườn ươm

Kết quả trên có được có thể là do các chủng vi khuẩn nội sinh đã xâm chiếm bộ rễ cây cà phê (hình 3.3) và phát huy khả năng cố định đạm, phân giải lân khó tan và sinh tổng hợp kích thích tố thực vật. Khả năng xâm chiếm bộ rễ thực vật của các chủng vi khuẩn nội sinh *Bacillus* đã được ghi nhận trên nhiều loại cây trồng khác nhau như mía (Sturz *et al.*, 1997) [194], cacao (Melnick *et al.*, 2008) [135], ớt (Hianna *et al.*, 2013) [97], ngô và bông vải (McInroy and Kloepper, 1995) [133].



Hình 3.3. Vi khuẩn cư trú bên trong rễ cây cà phê
(mũi tên chỉ ổ vi khuẩn nội sinh phát huỳnh quang)

Các chủng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính phân giải P khó tan nhờ các enzyme phân giải như phytase, các axit hữu cơ dễ hoà tan P khó tan làm tăng khả năng hấp thu P của cây cà phê từ 30 - 50% (Biểu đồ 3.1). Ngoài ra, các chủng này đều có hoạt tính sinh tổng hợp IAA để kích thích bộ rễ phát triển (Phụ lục 1, trang P1), (Ngô Văn Anh và cs., 2017) [1]. Do đó, xử lý các chủng vi khuẩn nội sinh ngoài vai trò tăng cường sinh lý quang hợp, năng lượng, trao đổi chất và sinh trưởng của cây còn có tác dụng kích thích phát triển bộ rễ và tăng khả năng chịu hạn cho cây. Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy chiều dài rễ và khối lượng rễ/cây ở các công thức có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Tóm lại, tất cả các chủng vi khuẩn nội sinh nghiên cứu đã ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn vườn ươm, làm tăng hàm lượng dinh dưỡng N% và P% tích lũy trong lá, tăng hàm lượng diệp lục tố và các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây, đường kính gốc, số cặp lá, diện tích lá, chiều dài rễ và khối lượng rễ. Trong số 9 chủng vi khuẩn nội sinh nghiên cứu, 3 chủng làm tăng khả năng tích lũy đạm và lân trong lá cao nhất là *Bacillus cereus* M15, *Bacillus subtilis* EK17 và *Bacillus pumilus* BMT4. Trong lá, hàm lượng N% tăng 10,3 – 20,9%, hàm lượng P% tăng 77,8 – 111,1% và hàm lượng diệp lục tố tăng 13,8 – 39,4% so với công thức

đối chứng ĐC. Do đó, sinh trưởng của cây con cà phê vối ở những công thức chủng các vi khuẩn này cũng tốt hơn: chiều cao cây tăng 17,5 – 51,2%; đường kính gốc tăng 25,6 – 26,9%, khối lượng thân tươi tăng 60,5 - 117,5%, chiều dài rễ tăng đến 24,6%, và khối lượng rễ tươi tăng đến 235,1% so với đối chứng ĐC. Đây là những chủng vi khuẩn nội sinh tiềm năng trong việc nghiên cứu sản xuất phân sinh học ứng dụng trong canh tác cà phê bền vững. Do đó, những chủng vi khuẩn này được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo ở điều kiện động ruộng trên cây cà phê giai đoạn kiến thiết cơ bản và giai đoạn kinh doanh.

Trong thực tiễn, mỗi chủng vi khuẩn nội sinh đều có tiềm năng đặc trưng: cố định nitơ, phân giải photphat khó tan, tổng hợp chất kích thích sinh trưởng và/hoặc đối kháng tác nhân gây bệnh. Để tăng hiệu quả thúc đẩy sinh trưởng thực vật của các chủng vi khuẩn này, phối trộn các chủng có tiềm năng là điều cần thiết và được nhiều nhà khoa học áp dụng (Mohamed and Gomaa, 2012 [143], Jha and Subramanian, 2013 [107], Zhou *et al.*, 2014 [223]). Tuy nhiên, Agbenin *et al.* (2004) [31] cho rằng các tác nhân sinh học cũng có tác dụng ức chế sự phát triển lẫn nhau do cạnh tranh về dinh dưỡng và môi trường sống hoặc trong quá trình phát triển của chúng hình thành các hoạt chất không có lợi cho sự phát triển của chủng sinh vật đang cùng chung sống. Do đó, việc đánh giá khả năng tương thích giữa các chủng được chọn lọc bao gồm: *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 đã được thực hiện bằng phương pháp cấy vạch vuông góc.



Hình 3.4. Khả năng tương hợp giữa các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc

Kết quả đánh giá khả năng tương thích của từng cặp vi khuẩn chọn lọc cho thấy, các chủng vi khuẩn được thử nghiệm vẫn phát triển bình thường tại các điểm giao nhau của 2 vạch vi khuẩn vuông góc (Hình 3.4). Do đó, có thể phối trộn các chủng vi khuẩn đã chọn lọc được ở trên để thử nghiệm trên vườn cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản và kinh doanh ngoài đồng ruộng.

3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng cây con cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

3.2.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Các chủng vi khuẩn nội sinh thông thường cũng là các chủng vi khuẩn vùng rễ. Khả năng cố định N tự do, phân giải P khó tan, phân giải hữu cơ sẽ ảnh hưởng đến khả năng hấp thu dinh dưỡng của đất và ảnh hưởng trực tiếp, hoặc gián tiếp đến độ phì của đất canh tác. Sau 18 tháng xử lý các tổ hợp chủng vi khuẩn nội sinh vào đất trồng cà phê kiến thiết cơ bản, mẫu đất đã được thu thập và phân tích. Kết quả trình bày trong bảng 3.5 cho thấy tính chất hoá học đất rất biến động giữa các công thức. Hàm lượng hữu cơ ở các công thức xử lý bằng hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) đều tăng từ 2,4 – 19,0% so với ở các công thức đối chứng tương ứng. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Hassan *et al.* (2018) [95] trên đất trồng hạt lúa mỳ được chủng bằng vi khuẩn *B. cereus*. Trái lại, hàm lượng hữu cơ trong đất lại giảm ở tất cả các công thức được xử lý bằng hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi so sánh với các công thức đối chứng tương ứng. Đáng lưu ý, hàm lượng hữu cơ tăng nhiều nhất ở công thức CT6 (30 ml/cây tổ hợp *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), tăng 19% so với ở công thức đối chứng tương ứng (CT3). Kết quả này cao hơn tỷ lệ tăng hàm lượng hữu cơ 10% ở đất trồng cây lúa mỳ đã được chủng nhiễm chỉ vi khuẩn *B. cereus* (Hassan *et al.*, 2018) [95].

Bảng 3.5. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản sau thí nghiệm

Công thức	Tổ hợp	pH _{KCl}	HC (%)	N dễ tiêu (ppm)	P ₂ O ₅ dễ tiêu (mg/100g)
CT 1	B0D1	3,72	5,13	39,19	16,33
CT2	B0D2	3,75	4,98	40,31	21,57
CT3	B0D3	3,86	5,01	47,25	20,78
CT 4	B1D1	3,77	5,64	39,20	18,72
CT 5	B1D2	3,63	5,13	39,20	23,43
CT 6	B1D3	3,97	5,96	72,80	22,89
CT 7	B2D1	3,85	5,47	55,99	15,94
CT 8	B2D2	3,73	5,30	56,01	17,99
CT 9	B2D3	3,71	5,13	67,21	24,21
CT 10	B3D1	3,90	4,80	33,60	12,90
CT 11	B3D2	3,77	4,96	60,67	27,28
CT 12	B3D3	3,92	4,71	50,40	28,58

Ở các công thức được xử lý bằng hỗn hợp các chủng vi khuẩn, hàm lượng đạm dễ tiêu trong đất đều tăng so với ở các công thức đối chứng tương ứng (trừ CT10: 10 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4). So với ở các công thức đối chứng tương ứng, hàm lượng đạm dễ tiêu trong đất tăng từ 0,03 – 55,6%. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Hassan *et al.* (2018) [95] khi *B. cereus* làm tăng hàm lượng đạm dễ tiêu trong đất từ 27 – 34%.

Các chủng vi khuẩn nội sinh *B. cereus* M15, *B. pumilus* BMT4 và *B. subtilis* EK17 trong nghiên cứu này đã được chứng minh có khả năng cố định đạm và phân giải lân trong điều kiện in vitro hoặc/và nhà lưới (Trương Vĩnh Thới, 2012) [27], (Nguyễn Ngọc Mỹ, 2012) [17], (Ngô Văn Anh và cs., 2017) [1]. Vì vậy, hàm lượng

mùn, N và P_2O_5 dễ tiêu tăng ở các công thức xử lý những hỗn hợp chủng vi khuẩn này (như kết quả trình bày trong Bảng 3.5) là hoàn toàn hợp lý.

Khác với hàm lượng đạm dễ tiêu, hàm lượng lân dễ tiêu trong đất lại rất biến động giữa các công thức xử lý các hỗn hợp khác nhau cũng như ở các mức huyền phù vi khuẩn xử lý khác nhau. Hàm lượng lân dễ tiêu trong đất ở tất cả các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) đều tăng so với ở các công thức đối chứng tương ứng, tăng từ 8,6% (CT5) đến 14,6% (CT4). Trong khi đó, ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4), hàm lượng lân dễ tiêu lại chỉ tăng ở công thức xử lý huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây.

3.2.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Đạm và lân là hai trong số những yếu tố rất cần thiết quyết định quá trình sinh trưởng của thực vật. Phân tích hàm lượng đạm (N%) và lân (P%) tích lũy trong lá của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản, kết quả được trình bày trong bảng 3.6 cho thấy: Hàm lượng N% trong lá ở tất cả các công thức, kể cả các công thức đối chứng khá cao, dao động trong khoảng 3,04 – 3,64% chất khô trong lá. Chiều theo ngưỡng dinh dưỡng tối ưu dành cho cây cà phê với trên thế giới của Willson (1985) [213] cũng như tại Tây Nguyên của Nguyễn Văn Sanh (2009) [24], các công thức đối chứng có hàm lượng N% trong lá nằm trong ngưỡng phù hợp. Ngược lại, hàm lượng N% trong lá ở phần lớn các công thức xử lý vi khuẩn (trừ CT8 và CT10) đều vượt quá ngưỡng thích hợp. Theo thang dinh dưỡng của Đoàn Triệu Nhạn (1982) [18] xây dựng cho cây cà phê với tại Tây Nguyên, hàm lượng N% tích lũy trong lá ở tất cả các công thức đều vượt quá ngưỡng thích hợp (2,70 - 3,00%). Tuy nhiên, cả 3 thang dinh dưỡng trên đều xây dựng cho cây cà phê giai đoạn kinh doanh chứ chưa có tài liệu nào đề cập đến ngưỡng N% trong lá thích hợp cho cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản. Mặt khác, cây trong thí nghiệm đang ở thời kì kiến thiết cơ bản, thời kì cây phát triển

mạnh về thân lá nên hàm lượng N% trong lá cao là điều cần thiết để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng của cây.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất

Công thức	Tổ hợp	N (%)	P (%)
Trước xử lý (TXL)		2,98	0,11
CT 1	B0D1	3,04	0,10
CT2	B0D2	3,04	0,11
CT3	B0D3	3,11	0,11
CT 4	B1D1	3,58	0,14
CT 5	B1D2	3,50	0,14
CT 6	B1D3	3,64	0,12
CT 7	B2D1	3,35	0,11
CT 8	B2D2	3,16	0,10
CT 9	B2D3	3,53	0,13
CT 10	B3D1	3,16	0,10
CT 11	B3D2	3,39	0,11
CT 12	B3D3	3,39	0,13

So với trước thí nghiệm, hàm lượng N% tích lũy trong lá cây cà phê đã gia tăng ở tất cả các công thức, kể cả các công thức đối chứng. Tuy nhiên, trong khi hàm lượng N% tích lũy trong lá ở các công thức đối chứng so với trước xử lý chỉ tăng từ 2,0 – 4,4%, mức độ tăng ở các công thức xử lý vi khuẩn nội sinh dao động từ 6 – 22%. Đáng chú ý, hàm lượng N% trong lá đạt cao nhất ở các tổ hợp công thức B1D3 (CT6: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), B1D1 (CT4: 10 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và

B1D2 (CT5: 20 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), lần lượt tăng 22,1%, 20,1%, 18,5% và 17,4% so với trước xử lý.

Khác với hàm lượng N% tích lũy trong lá, hàm lượng P% sau xử lý rất biến động so với trước xử lý. Ở tất cả các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), hàm lượng P% đều cao hơn so với trước xử lý từ 9,1 – 27,3%, đạt 0,12 – 0,14% và đều nằm trong ngưỡng thích hợp cho cây cà phê vối tại Tây Nguyên theo thang dinh dưỡng của Nguyễn Văn Sanh (2009) [24]. Ở các công thức xử lý hai hỗn hợp còn lại là B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4), hàm lượng P% trong lá chỉ tăng ở hai công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn với mức 30 ml/cây. Hàm lượng P% trong lá ở 2 công thức này (CT9 và CT12) đều đạt 0,13% và nằm trong ngưỡng thích hợp cho cây cà phê theo thang dinh dưỡng của nhiều tác giả như: Đoàn Triệu Nhạn (1982) [18], Nguyễn Tri Chiêm (1993) [5] và Nguyễn Văn Sanh (2009) [24].

Kết quả trình bày trong bảng 3.6 cũng cho thấy, hàm lượng P% trong lá cao nhất ở các tổ hợp công thức B1D1 (CT4: 10 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B1D2 (CT5: 20 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) đều đạt 0,14% và cao hơn 27,3% so với trước xử lý. So với các công thức đối chứng tương ứng ở cùng thời điểm, hàm lượng P% ở các công thức này lần lượt cao hơn 27,3% và 40,0%. Như vậy, có thể thấy việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh ở mức thích hợp đã làm tăng hàm lượng P% tích lũy trong lá.

Kết quả trên cho thấy mặc dù đã giảm 25% lượng phân N và P so với quy trình, việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh *Bacillus* ở các mức thích hợp đã ảnh hưởng tích cực, làm gia tăng khả năng tích lũy N và P trong lá cây cà phê vối so với đối chứng. Kết quả này cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây về ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* đến khả năng tăng cường dinh dưỡng tích lũy trong lá ở một số cây trồng khác. Kuan *et al.* (2016) [118] cho biết khả năng cố định N₂ của chủng *B. pumilus* S1r1 sau khi chủng vào cây ngô có thể lên tới 262 mg N₂/cây, đáp ứng 30,5% nhu cầu đạm của cây. Trong một nghiên cứu khác, chủng

vi khuẩn *B. subtilis* đã làm tăng hàm lượng N tích lũy trong lá cây lạc 12,4% so với đối chứng không xử lý (Turner and Backman, 1991) [201]. Hàm lượng N và P trong thân đậu đũa tăng 20,7 – 29,7% và 13,6 – 45,6% tùy từng loại đất (Ha *et al.*, 2008) [87]. Nếu chỉ xử lý cây lúa bằng huyền phù vi khuẩn *B. pumilus*, hàm lượng N và P trong lá lúa chỉ tăng 6,8% và 2,9% nhưng nếu xử lý kết hợp *B. pumilus* và *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, hàm lượng N và P trong lá tăng 20,7% và 16,3%, một cách tương ứng (Jha and Subramanian, 2013) [107].

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy khả năng hấp thu và tích lũy N và P trong thân lá cây trồng khi được xử lý hỗn hợp nhiều chủng vi khuẩn cao hơn so với khi xử lý riêng lẻ từng vi khuẩn.

3.2.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Sắc tố quang hợp là hợp chất duy nhất trong tự nhiên nhận năng lượng ánh sáng mặt trời để chuyển thành năng lượng hóa học trong các hợp chất hữu cơ. Hàm lượng các sắc tố quang hợp luôn biến động phụ thuộc rất nhiều vào chế độ dinh dưỡng, cường độ và chất lượng ánh sáng, tuổi lá ... (Nguyễn Văn Minh, 2014) [16]. Kết quả phân tích hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản của các công thức xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh được trình bày ở bảng 3.7.

Kết quả cho thấy hàm lượng diệp lục Chl_a và Chl_b ở tất cả các công thức có xử lý vi khuẩn nội sinh đều cao hơn so với ở các công thức đối chứng. Hàm lượng diệp lục Chl_a ở các công thức đối chứng đều thấp hơn 0,8 mg/g lá tươi trong khi ở các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn dao động trong khoảng 0,831 – 1,015 mg/g lá tươi (Bảng 3.7). Ở cùng mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý, hàm lượng diệp lục Chl_a và Chl_b lần lượt tăng từ 10,7 – 33,2% và 3,5 – 28,8% so với ở các công thức đối chứng tương ứng. Đáng chú ý, hàm lượng diệp lục Chl_a tăng nhiều nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) cao hơn 28,6 – 33,2% so với ở các công thức đối chứng. Trong khi đó, hàm lượng Chl_b

lại tăng nhiều nhất ở các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4), cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng từ 20,6 – 28,8%. Hàm lượng diệp lục trong lá càng cao chứng tỏ khả năng quang hợp của cây càng mạnh, từ đó cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn bởi quang hợp quyết định đến 90 – 95% năng suất cây trồng (Hoàng Minh Tấn và cs., 2006) [26].

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục và hàm lượng carotenoid (C_{car}) trong lá cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Công thức	Chl_a (mg/g lá tươi)	Chl_b (mg/g lá tươi)	C_{car} (mg/g lá tươi)
CT1	0,751	0,470	0,400
CT2	0,763	0,485	0,409
CT3	0,783	0,462	0,463
CT4	1,000	0,554	0,536
CT5	1,002	0,573	0,533
CT6	1,007	0,595	0,469
CT7	0,909	0,583	0,531
CT8	0,857	0,502	0,478
CT9	1,015	0,508	0,465
CT10	0,831	0,589	0,470
CT11	0,949	0,586	0,524
CT12	0,968	0,557	0,540

Một trong những chức năng quan trọng của carotenoid là bảo vệ diệp lục, hạn chế những tác động bất lợi của bức xạ sóng ngắn cường độ mạnh của ánh sáng mặt trời. Hàm lượng carotenoid trong lá tăng góp phần làm cho quá trình tổng hợp chất diễn ra tốt hơn từ đó góp phần thúc đẩy sự sinh trưởng của cây. Tương tự như hàm lượng diệp lục Chl_a và Chl_b , hàm lượng C_{car} ở tất cả các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn đều cao hơn so với ở các công thức đối chứng, dao động trong khoảng 0,465 – 0,540 mg/g lá tươi. Đáng chú ý, hàm lượng C_{car} trong lá cao nhất theo thứ tự là

CT12, CT4 và CT5, cao hơn 16,6%, 34,0% và 30,3% so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Khả năng làm tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá của các chủng vi khuẩn *Bacillus* trong nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trước đây. Chẳng hạn như, hàm lượng các diệp lục tố *Chl_a*, *Chl_b* và *C_{car}* trong lá đã tăng lần lượt theo thứ tự là 35%, 31% và 39% sau khi chủng vi khuẩn *B. subtilis* vào cây con *Bassia indica* (Hashem *et al.*, 2015) [94]. Hàm lượng chlorophyll tổng số khi được xử lý bằng huyền phù vi khuẩn *B. cereus* đã tăng 22,3 – 27,1% trong lá cây lúa mì (Hassan *et al.*, 2018) [95], tăng 14,6% trong cây súp lơ xanh (Yildirim *et al.*, 2011) [216]. Hàm lượng chlorophyll tổng số trong lá cây dưa leo khi được xử lý bằng vi khuẩn *B. pumilus* và *B. subtilis* đã tăng 33 và 36% đối với *Chl_a* và tăng 40 – 50% đối với *Chl_b* (Mohamed and Gomaa, 2012) [143]. Hàm lượng chlorophyll tổng số trong lá cây ớt tăng từ 5,0 – 17,3% tùy vào lượng hỗn hợp vi khuẩn *B. cereus* và *B. subtilis* khi xử lý hạt (Zhou *et al.*, 2014) [223].

Sự gia tăng hàm lượng diệp lục thường do hai nguyên nhân chủ yếu đó là chế độ dinh dưỡng tốt hơn hoặc cường độ ánh sáng yếu hơn buộc lá phải tăng cơ quan tiếp nhận ánh sáng hoặc do cả hai. Cường độ ánh sáng ở các công thức thí nghiệm được coi là đồng nhất vì mẫu lá cà phê được thu thập trong cùng một thời điểm tại cùng một vườn và cùng loại lá. Với cùng chế độ phân bón như nhau giữa các công thức trong toàn khu vực thí nghiệm, việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh đã ảnh hưởng đến hàm lượng carotenoid trong lá. Do vậy, có thể các vi khuẩn nội sinh đã giúp cây cà phê tăng tốc độ quang hợp hay do chúng làm tăng hàm lượng N trong lá dẫn đến cây tăng cường sản sinh các chất tăng trưởng thực vật, làm tăng khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng vốn là thành phần chính cấu thành diệp lục.

3.2.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

3.2.4.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều cao của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Hàm lượng đạm tổng số trong lá tăng là tiền đề thuận lợi cho quá trình quang hợp vì đạm là một trong những thành tố quan trọng nhất trong thành phần cấu tạo hóa học của diệp lục tố. Sự gia tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá cây cà phê với đã thúc đẩy quá trình quang hợp và hấp thu dinh dưỡng của cây. Điều này đã ảnh hưởng tích cực đến các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê với.

Một trong những chỉ tiêu sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản được quan tâm theo dõi trong thí nghiệm này là chiều cao cây. Kết quả theo dõi diễn biến chiều cao cây theo thời gian xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn được trình bày trong bảng 3.8.

Bảng 3.8 cho thấy, từ thời điểm 2 tháng sau xử lý, chiều cao cây ở tất cả các công thức có xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn đều cao hơn so với ở các công thức đối chứng. Chiều cao cây trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) cao hơn có ý nghĩa so với ở trung bình các công thức đối chứng cũng như các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4). Ở thời điểm 6 tháng sau xử lý, chiều cao cây trung bình ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn đều cao hơn có ý nghĩa so với ở các công thức đối chứng, trong đó, chiều cao cây ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17 + *B. pumilus* BMT4) cao nhất và không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Tuy nhiên, lượng huyền phù vi khuẩn xử lý khác nhau không ảnh hưởng có ý nghĩa đến chiều cao cây ở các thời điểm 2 tháng và 4 tháng sau xử lý. Chỉ đến thời điểm 6 tháng sau xử lý, lượng huyền phù vi khuẩn xử lý mới ảnh hưởng có ý nghĩa đến chiều cao cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản. Tại thời điểm này, xử lý hỗn

hợp vi khuẩn ở mức 30ml/cây đã làm cho cây cà phê có chiều cao lớn hơn so với ở các công thức chỉ xử lý 10 ml/cây và 20 ml/cây.

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn đến chiều cao cây cà phê với (cm) giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Chiều cao cây cà phê (cm)				
		Hỗn hợp vi khuẩn B				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (10)	30,44	35,22	30,44	33,78	32,47
	D2 (20)	31,33	33,56	34,33	33,33	33,14
	D3 (30)	33,22	33,67	30,56	31,44	32,22
	Trung bình (B)	31,67	34,15	31,78	32,85	
	Các trung bình không khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$; $CV = 7,68$					
2T SXL	D1 (10)	46,11 ^{bc}	57,33 ^a	54,78 ^{ab}	49,67 ^{abc}	51,97
	D2 (20)	42,49 ^{bc}	58,89 ^a	54,22 ^{ab}	50,44 ^{abc}	51,51
	D3 (30)	44,97 ^c	57,89 ^a	54,78 ^{ab}	51,78 ^{abc}	52,35
	Trung bình (B)	44,52 ^C	58,04 ^A	54,59 ^{AB}	50,63 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,01$; tương tác D*B: $p > 0,05$; $CV = 9,96$					
4T SXL	D1 (10)	60,88 ^{bcd}	71,33 ^{abc}	72,78 ^{abc}	72,56 ^{abc}	69,39
	D2 (20)	55,98 ^d	74,56 ^{ab}	71,67 ^{abc}	74,22 ^{ab}	69,11
	D3 (30)	58,04 ^{bcd}	75,33 ^{ab}	77,11 ^a	75,44 ^{ab}	71,48
	Trung bình (B)	58,30 ^B	73,74 ^A	73,85 ^A	74,07 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; $CV = 11,12$					
6T SXL	D1 (10)	80,89 ^f	92,56 ^{cd}	90,56 ^{cd}	88,94 ^{de}	88,24 ^B
	D2 (20)	83,33 ^f	93,22 ^{bcd}	95,56 ^{abc}	90,28 ^{cd}	90,60 ^B
	D3 (30)	84,12 ^{ef}	98,33 ^{ab}	100,88 ^a	91,72 ^{cd}	93,76 ^A
	Trung bình (B)	82,78 ^C	94,70 ^A	95,66 ^A	90,32 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,01$; tương tác D*B: $p > 0,05$; $CV = 13,31$					

Kết quả xử lý thống kê cũng cho thấy, tương tác giữa các hỗn hợp vi khuẩn và lượng huyền phù vi khuẩn xử lý khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, số liệu trình bày ở Bảng 3.8 cũng ghi nhận chiều cao cây ở các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B1D3 (CT6: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) cao nhất và cao hơn so với các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là 20%, 17% và 15%.

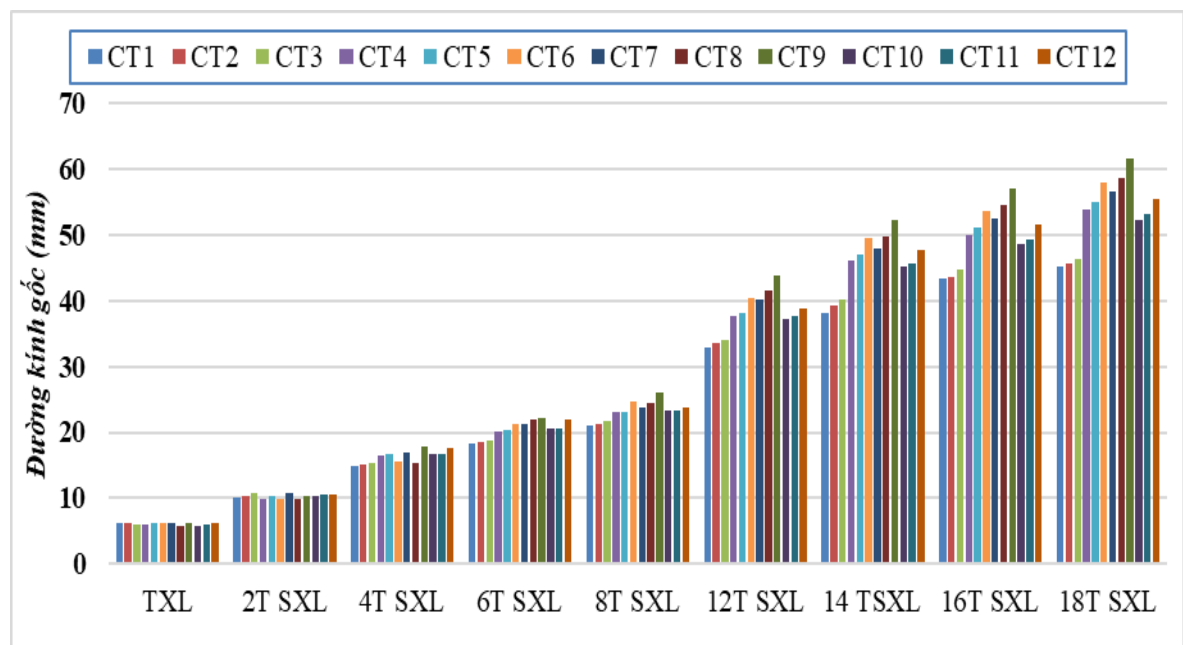
Sau thời điểm 6 tháng SXL, chủ vườn đã tiến hành ngắt ngọn, hãm chiều cao để giúp cây cà phê phát triển cành thứ cấp, do đó, chỉ tiêu này không được tiếp tục theo dõi.

Khả năng làm tăng chiều cao cây cà phê với của các hỗn hợp chủng vi khuẩn *Bacillus* trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Hassan *et al.* (2018) [95] trên cây lúa mỳ. Chiều cao cây lúa mỳ khi được xử lý bằng vi khuẩn *B. cereus* đã cao hơn so với đối chứng 33,7 – 41,0% (Hassan *et al.*, 2018) [95]. Chiều cao cây cà chua tăng từ 24,0 - 27,3% tùy vào phương pháp chủng vi khuẩn *B. subtilis* (Fakhreldin, 2017) [72]. Trong một nghiên cứu khác trên cây ớt, chiều cao cây ở các công thức được xử lý bằng hỗn hợp vi khuẩn *B. cereus* + *B. subtilis* đã tăng 9 – 31% so với đối chứng, với lượng vi khuẩn xử lý càng cao, chiều cao cây càng lớn (Zhou *et al.*, 2014) [223]. Chiều cao cây dưa leo ở các công thức xử lý bằng vi khuẩn *B. pumilus* tuy thấp hơn nhưng không khác biệt so với ở công thức xử lý bằng vi khuẩn *B. subtilis* và cao hơn so với đối chứng 32 – 36% (Mohamed *et al.*, 2016) [142]. Chiều cao cây lúa tăng 12% khi được xử lý bằng chủng vi khuẩn *B. pumilus* nhưng khi được xử lý bằng hỗn hợp *B. pumilus* + *P. pseudoalcaligenes*, chiều cao cây tăng đến 26% so với đối chứng (Jha and Subramanian, 2013) [107]. Tương tự, chiều cao cây đậu tương khi được xử lý bằng hỗn hợp vi khuẩn *B. subtilis* và *Bradyrhizobium japonicum* cao hơn 11,3% và 17,8% so với khi xử lý riêng lẻ từng chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *B. japonicum*, một cách tương ứng (Petkar *et al.*, 2018) [160]. Kết quả nghiên cứu của Petkar *et al.* (2018) [160] cũng cho biết chiều cao cây đậu tương khi được xử lý bằng hỗn hợp hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *B. japonicum* kết hợp bón 75% lượng phân hóa học theo khuyến cáo cao hơn so với đối chứng bón 100% lượng phân hóa

học theo khuyến cáo. Trong khi đó, chiều cao cây ở các công thức xử lý riêng lẻ từng chủng vi khuẩn lại thấp hơn so với đối chứng (Petkar *et al.*, 2018) [160].

3.2.4.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến đường kính gốc của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Kết quả theo dõi sự phát triển của đường kính gốc cây cà phê được trình bày ở bảng 3.9 và biểu đồ 3.2. Kết quả này cho thấy ở thời điểm trước xử lý, đường kính gốc ở tất cả các công thức thí nghiệm tương đối đồng đều và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Ở thời điểm 2 tháng và 4 tháng sau xử lý, đường kính gốc ở một số công thức xử lý vi khuẩn thậm chí còn thấp hơn so với ở một số công thức đối chứng. Tuy nhiên, từ thời điểm 6 tháng sau xử lý, đường kính gốc ở tất cả các công thức xử lý vi khuẩn đều cao hơn so với ở các công thức đối chứng. Kết quả xử lý thống kê cho thấy tại thời điểm này, đường kính gốc trung bình ở những công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức đối chứng cũng như các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4).



Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn đến diễn biến đường kính gốc cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến đường kính gốc của cây cà phê vối (mm) giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn B (ml/cây)	Đường kính gốc cây cà phê (mm)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (10)	6,16	6,09	6,10	5,69	6,0
	D2 (20)	6,29	6,20	5,83	5,97	6,1
	D3 (30)	5,94	6,19	6,10	6,18	6,1
	Trung bình (B)	6,1	6,2	6,0	5,9	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p > 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,82					
6T SXL	D1 (10)	18,21 ^d	20,11 ^c	21,22 ^{abc}	20,60 ^c	20,0^B
	D2 (20)	18,60 ^d	20,34 ^c	21,98 ^a	20,69 ^{bc}	20,4^B
	D3 (30)	18,84 ^d	21,33 ^{abc}	22,20 ^a	21,89 ^{ab}	21,1^A
	Trung bình (B)	18,6^C	20,6^B	21,8^A	21,1^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,25					
12T SXL	D1 (10)	32,87 ^e	37,70 ^{cde}	40,11 ^{ab}	37,19 ^{bcde}	37,0^B
	D2 (20)	33,51 ^e	38,23 ^{bcd}	41,46 ^{ab}	37,58 ^{bcde}	37,7^B
	D3 (30)	34,04 ^{de}	40,37 ^{ab}	43,83 ^a	38,93 ^{bc}	39,3^A
	Trung bình (B)	33,5^C	38,8^B	41,8^A	37,9^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,28					
18T SXL	D1 (10)	45,1f ^e	53,83 ^{cd}	56,53 ^{bc}	52,23 ^d	52,0^B
	D2 (20)	45,77 ^e	55,03 ^{bcd}	58,63 ^{ab}	53,20 ^{cd}	53,2^B
	D3 (30)	46,43 ^e	58,07 ^{ab}	61,73 ^a	55,47 ^{bcd}	55,4^A
	Trung bình (B)	45,8^C	55,6^B	59,0^A	53,6^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,9					

Xét về lượng huyền phù vi khuẩn xử lý, đường kính cây ở các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây lớn hơn có ý nghĩa so với ở các công thức xử lý ở các mức thấp hơn là 20 ml/cây và 10 ml/cây. Tuy nhiên có thể thấy tỷ lệ

tăng đường kính gốc giữa các mức huyền phù vi khuẩn xử lý không đáng kể, chỉ tăng 6% khi tăng gấp đôi lượng hỗn hợp vi khuẩn xử lý (21,1 mm so với 20,0 mm).

Tuy tương tác giữa các hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê, đường kính cây ở các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B3D3 (CT12: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4), B1D3 (CT6: 30ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2D1 (CT7: 10 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) lớn nhất, lớn hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là 17,8%, 18,2%, 16,2%, 13,2% và 16,5%. Xu hướng này vẫn tiếp tục tiếp diễn cho đến hết thời điểm 18T SXL.

Tương tự như các thời điểm 6T SXL và 12T SXL, tại thời điểm 18T SXL, tương tác giữa hỗn hợp vi khuẩn và mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, số liệu trình bày trong bảng 3.9 cũng cho thấy đường kính gốc trung bình ở các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B1D3 (CT6: 30ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) lớn nhất và cao hơn 33,0%, 28,1% và 25,0% so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Biểu đồ 3.2 cho thấy kể từ thời điểm 4T SXL, tổ hợp công thức B2D3 (CT9) luôn có đường kính gốc cao nhất. Tuy nhiên, về mặt thống kê, đường kính gốc ở công thức này không khác biệt so với ở tổ hợp B2D2 trong khi lượng hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý tăng 1/3 lần (Bảng 3.9). Do vậy, để đảm bảo hiệu quả kinh tế, có thể áp dụng hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) ở mức 20 ml/cây.

Vai trò làm tăng đường kính gốc thân của các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cũng được khẳng định trong nghiên cứu của Zhou *et al.* (2014) [223]. Xử lý kết hợp hỗn hợp 2 vi khuẩn *B. cereus* + *B. subtilis* đã làm tăng đường kính thân cây ớt từ 0 - 15,3% tùy vào lượng vi khuẩn xử lý cũng như phương pháp xử lý.

3.2.4.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số cặp lá của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Lá là bộ phận quang hợp cũng như tổng hợp, chuyển hoá các chất thành năng lượng cho chu trình sống của cây. Số cặp lá trên cây là chỉ tiêu theo dõi không kém phần quan trọng để đánh giá khả năng ảnh hưởng của vi khuẩn đến sự sinh trưởng của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản ngoài đồng ruộng. Kết quả được biểu thị trong Bảng 3.10.

Bảng 3.10 cho thấy, ở đợt điều tra 2 tháng sau xử lý, số cặp lá/cây hầu như ít thay đổi so với trước xử lý và cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức. Số cặp lá/cây bắt đầu tăng mạnh từ đợt điều tra 4 tháng sau xử lý và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức ở mức $p < 0,05$. Trung bình số cặp lá/cây lớn nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) rồi đến các công thức xử lý hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) và B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17). Tại thời điểm này, tỷ lệ tăng số cặp lá/cây so với trước xử lý ở các công thức đối chứng chỉ dao động từ 53 – 56%, trong khi ở các công thức xử lý vi khuẩn (CT4 – CT12), tỷ lệ này dao động từ 58 - 85%. Sang đến thời điểm 6 tháng sau xử lý, các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) vẫn tiếp tục là các công thức có trung bình số cặp lá/cây cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4).

Các mức huyền phù xử lý khác nhau cũng đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến trung bình số cặp lá/cây, trong đó, các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn ở mức 20 ml/cây và 30 ml/cây có trung bình số cặp lá/cây cao nhất và không khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê.

Tương tự như đối với các chỉ tiêu chiều cao cây và đường kính gốc, tương tác giữa các hỗn hợp vi khuẩn và lượng huyền phù vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến chỉ tiêu số cặp lá/cây. Tuy nhiên, bảng 3.10 cho thấy cây cà phê trong các tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B2D2 (CT8:

20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3D3 (CT12: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) có trung bình số cặp lá/cây cao nhất, cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là 20%, 19% và 14%.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến số cặp lá trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ nhất

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số cặp lá/cây				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (10)	6,6	6,9	6,3	6,9	6,7
	D2 (20)	6,4	6,6	6,6	6,8	6,6
	D3 (30)	6,7	6,8	6,7	6,8	6,7
	Trung bình (B)	6,6	6,7	6,5	6,8	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p > 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 7,65</i>					
2T SXL	D1 (10)	7,0	7,9	8,0	8,1	7,8
	D2 (20)	7,1	7,7	8,3	8,0	7,8
	D3 (30)	7,3	8,1	8,4	8,1	8,0
	Trung bình (B)	7,1	7,9	8,3	8,1	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p > 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 16,47</i>					
4T SXL	D1 (10)	10,0 ^d	10,9 ^{bcd}	11,4 ^{abc}	11,1 ^{bcd}	10,9^B
	D2 (20)	10,0 ^{cd}	11,1 ^{bcd}	12,1 ^a	11,1 ^{bcd}	11,2^{AB}
	D3 (30)	10,3 ^{cd}	11,4 ^{abc}	12,2 ^a	11,8 ^{ab}	11,5^A
	Trung bình (B)	10,5^C	11,1^B	11,9^A	11,3^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 14,32</i>					
6T SXL	D1 (10)	12,6 ^d	13,9 ^c	14,4 ^{bc}	14,0 ^c	13,7^B
	D2 (20)	12,8 ^d	14,0 ^c	15,2 ^{ab}	14,3 ^{bc}	14,1^{AB}
	D3 (30)	13,0 ^d	14,6 ^{bc}	15,6 ^a	14,8 ^{abc}	14,5^A
	Trung bình (B)	12,8^C	14,1^B	15,1^A	14,4^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,38</i>					

Ở sau thời điểm 6T SXL, cây cà phê được hãm ngọn nên chỉ tiêu số cặp lá/cây không tiếp tục được theo dõi.

Như vậy, các công thức xử lý vi khuẩn khác nhau đã ảnh hưởng đến sự phát triển số cặp lá /cây cà phê giai đoạn kiến thiết cơ bản trong thời gian theo dõi.

3.2.4.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số cặp cành cơ bản của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Trong thời kì kiến thiết cơ bản, cành cơ bản (cành cấp 1) mọc từ thân cây cà phê là loại cành rất quan trọng, quyết định đến bộ khung tán của cây và năng suất cà phê sau này. Kết quả theo dõi diễn biến số cặp cành cơ bản được trình bày ở bảng 3.11.

Kết quả cho thấy trung bình số cặp cành cơ bản ở các công thức xử lý hỗn hợp các huyền phù vi khuẩn đều cao hơn có ý nghĩa so với ở công thức đối chứng ở mức $p < 0,05$ trong suốt thời gian theo dõi chỉ tiêu này. Tại tất cả các thời điểm theo dõi, trung bình số cặp cành cơ bản giữa các công thức xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn khác nhau B1, B2 và B3 chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê mặc dù số cặp cành cơ bản trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 luôn lớn hơn so với ở B1 và B3. Tuy nhiên, các mức huyền phù khuẩn khác nhau đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến trung bình số cặp cành cơ bản của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản, với số cặp cành cơ bản tỷ lệ thuận với mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, trung bình số cặp cành cơ bản ở các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn ở mức 20 ml/cây không khác biệt có ý nghĩa so với ở mức 30 ml/cây.

Tuy tương tác giữa các hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn không khác biệt có ý nghĩa, tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* B. *subtilis* EK17 + *B. pumilus* BMT4) luôn là công thức có trung bình số cặp cành cơ bản cao nhất. Tại thời điểm 18 tháng sau xử lý, số cặp cành cơ bản ở công thức này cao hơn 18,4% so với ở công thức đối chứng tương ứng. Đây là kết quả của sự gia tăng hấp thu N, P và hàm lượng diệp lục trong lá cây cà phê khi xử lý tổ hợp các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn. Sự gia tăng hàm lượng N, P và diệp lục sẽ làm gia tăng quá trình quang

hợp, phân chia tế bào và kết quả làm tăng sinh trưởng của cây. Gia tăng số cặp cành cơ bản là cơ sở để cây cà phê phát triển bộ khung tán vững chắc và là tiền đề để đạt năng suất cao sau này.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến số cặp cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn B (ml/cây)	Số cặp cành cơ bản (cặp cành/cây)				
		Hỗn hợp vi khuẩn				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
6T SXL	D1 (10)	4,3 ^d	5,3 ^{bcd}	5,3 ^{bcd}	5,4 ^{bcd}	5,11 ^B
	D2 (20)	4,8 ^{cd}	5,3 ^{bcd}	6,2 ^{ab}	6,1 ^{ab}	5,61 ^{AB}
	D3 (30)	4,6 ^{cd}	5,8 ^{abc}	6,8 ^a	6,4 ^{ab}	5,89 ^A
	Trung bình (B)	4,56 ^B	5,48 ^A	6,11 ^A	6,00 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 12,0%					
12T SXL	D1 (10)	9,1 ^d	10,9 ^b	10,6 ^{bc}	10,7 ^{bc}	10,31 ^B
	D2 (20)	9,7 ^{cd}	10,6 ^{bc}	11,4 ^{ab}	11,7 ^{ab}	10,83 ^A
	D3 (30)	9,6 ^{cd}	11,3 ^{ab}	12,3 ^a	11,6 ^{ab}	11,19 ^A
	Trung bình (B)	9,45 ^B	10,93 ^A	11,44 ^A	11,30 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 15,5%					
18T SXL	D1 (10)	13,6 ^e	15,3 ^{abcd}	14,9 ^{bcde}	15,0 ^{bcde}	14,70 ^B
	D2 (20)	14,7 ^{cde}	15,2 ^{abcd}	15,9 ^{abc}	16,0 ^{ab}	15,44 ^{AB}
	D3 (30)	14,1 ^{de}	15,8 ^{abc}	16,7 ^a	15,3 ^{abcd}	15,47 ^A
	Trung bình (B)	14,11 ^B	15,44 ^A	15,81 ^A	15,44 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 15,6%					

Khả năng gia tăng số cặp cành cơ bản của các hỗn hợp chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu của Petkar *et al.* (2018) [160] khi xử lý hỗn hợp hai chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *B. japonicum* kết hợp bón 75% lượng phân N và P theo khuyến cáo. Số cành cơ bản của đậu tương khi được xử lý bằng hỗn hợp hai chủng vi khuẩn này cao hơn 7,1% so với đối chứng bón 100% lượng phân

hóa học theo khuyến cáo và lần lượt cao hơn 21,0% và 43,2% so với khi xử lý riêng lẻ từng chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *B. japonicum*.

3.2.4.5. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài cành cơ bản và số đốt trên cành của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Cà phê là cây công nghiệp dài ngày, khả năng cho năng suất cao và ổn định phụ thuộc rất lớn vào bộ khung tán, đặc biệt là cành cấp 1 (cành cơ bản). Theo dõi chỉ tiêu chiều dài cành cơ bản từ thời điểm 10T SXL đến hết 18T SXL, kết quả được trình bày trong Bảng 3.12.

Ngay từ thời điểm theo dõi 10T SXL, chiều dài cành cơ bản trung bình ở các công thức có xử lý vi khuẩn nội sinh đã cao hơn có ý nghĩa so với ở các công thức đối chứng. Tương tự như các chỉ tiêu: chiều cao, đường kính gốc, số cặp lá/cây, chỉ tiêu chiều dài cành cơ bản trung bình cũng lớn nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4). Ở các thời điểm 10, 12 và 14 tháng sau xử lý, trung bình chiều dài cành cơ bản ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) tuy cao hơn nhưng luôn không khác biệt so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* *B. subtilis* EK17).

Tương tự như các chỉ tiêu theo dõi khác, tương tác giữa các hỗn hợp vi khuẩn và mức huyền phù vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến chỉ tiêu chiều dài cành cơ bản. Tuy nhiên, tại thời điểm 18 tháng sau xử lý, chiều dài cành cơ bản ở 2 tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B2D2 (20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) lớn nhất, khác biệt có ý nghĩa với phần lớn các công thức còn lại và cao hơn 21,3% và 17,7% so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Chiều dài cành cơ bản phụ thuộc vào nhiều yếu tố, một trong những yếu tố tác động mạnh nhất là chế độ dinh dưỡng. Như vậy, mặc dù lượng phân N và P đã giảm 25% so với quy trình, việc bổ sung thêm hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh vào gốc cây cà phê đã có có ảnh hưởng tích cực làm tăng chiều dài cành cơ bản so với ở các công thức đối chứng. Nhìn chung, hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17)

và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có ảnh hưởng tốt hơn đến chiều dài cành cơ bản so với hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4).

Bảng 3.12. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài cành cơ bản trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Chiều dài cành cơ bản (cm)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
10T SXL	D1 (10)	63,5 ^d	68,9 ^{abcd}	69,0 ^{abcd}	66,0 ^{bcd}	66,8
	D2 (20)	64,0 ^d	69,8 ^{abc}	70,2 ^{ab}	67,1 ^{abcd}	67,8
	D3 (30)	64,5 ^{cd}	72,4 ^a	72,5 ^a	68,8 ^{abcd}	69,5
	Trung bình (B)	64,0^C	70,4^A	70,5^A	67,3^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,2%					
12T SXL	D1 (10)	78,2 ^c	86,1 ^{ab}	86,3 ^{ab}	82,7 ^{bc}	83,3
	D2 (20)	78,8 ^c	87,3 ^{ab}	87,8 ^{ab}	84,0 ^{abc}	84,5
	D3 (30)	79,4 ^c	90,4 ^a	90,6 ^a	86,1 ^{ab}	86,6
	Trung bình (B)	78,8^C	87,9^A	88,3^A	84,3^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 14,2%					
14T SXL	D1 (10)	91,5 ^d	101,9 ^{abc}	104,4 ^{abc}	97,9 ^{cd}	98,9
	D2 (20)	92,2 ^d	103,3 ^{abc}	106,1 ^{ab}	99,2 ^{bcd}	100,2
	D3 (30)	92,9 ^d	106,9 ^{ab}	109,4 ^a	101,6 ^{abc}	102,7
	Trung bình (B)	92,2^C	104,0^A	106,6^A	99,6^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 14,0%					
18T SXL	D1 (10)	99,7 ^d	109,6 ^c	115,4 ^{bc}	108,8 ^c	108,4^B
	D2 (20)	100,5 ^d	110,9 ^c	118,2 ^{ab}	110,2 ^c	109,9^{AB}
	D3 (30)	101,3 ^d	115,4 ^{bc}	122,8 ^a	112,8 ^{bc}	113,1^A
	Trung bình (B)	100,5^C	112,0^B	118,8^A	110,6^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,5%					

Tương tự như đối với chỉ tiêu chiều dài cành cơ bản, số đốt trên cành cơ bản trung bình ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh cũng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ ngay từ thời điểm theo dõi đầu tiên lúc 10T SXL. Số đốt trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) cũng luôn cao nhất trong suốt thời gian theo dõi nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17).

Lượng hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý đã có ảnh hưởng có ý nghĩa đến số đốt trên cành cơ bản của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản. Nhìn chung, số đốt/cành tỷ lệ thuận với lượng hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa mức 20 ml/cây và 30 ml/cây (Bảng 3.13).

Tuy tương tác giữa hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê, tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn là công thức có trung bình số đốt/cành lớn nhất. Từ thời điểm theo dõi 14T SXL, số đốt/cành ở công thức này đã cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với tất cả các công thức còn lại.

Đến thời điểm 18T SXL, số đốt/cành ở tổ hợp B2D3 đã cao hơn 31,5% so với ở công thức đối chứng tương ứng (B0D3: CT3). Các tổ hợp B1D2 (CT5: 20 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), B1D3 (CT6: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), B2D1 (CT7: 10 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B1D1 (CT4: 10 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B3D3 (CT12: 30 ml (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) tiếp đến là các công thức có trung bình số đốt/cành lớn nhất và cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là: 25,1%, 23,4%, 25,8%, 23,3% và 16,7%.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến số đốt trên cành cơ bản của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản năm thứ hai

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số đốt/cành				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
10T SXL	D1 (10)	9,5 ^f	11,1 ^{abcd}	11,1 ^{abcd}	10,2 ^{def}	10,5^B
	D2 (20)	9,5 ^f	11,5 ^{ab}	11,2 ^{abc}	10,4 ^{cde}	10,7^{AB}
	D3 (30)	9,9 ^{ef}	11,8 ^a	11,6 ^{ab}	10,8 ^{bcd}	11,0^A
	Trung bình (B)	9,7^C	11,4^A	11,3^A	10,5^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,2%</i>					
12T SXL	D1 (10)	11,3 ^e	13,4 ^{bc}	13,6 ^{abc}	12,5 ^d	12,7^B
	D2 (20)	11,5 ^e	13,7 ^{abc}	13,7 ^{abc}	12,7 ^d	12,9^{AB}
	D3 (30)	11,6 ^e	14,0 ^{ab}	14,1 ^a	13,1 ^{cd}	13,2^A
	Trung bình (B)	11,4^C	13,7^A	13,8^A	12,8^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 12,83%</i>					
14T SXL	D1 (10)	12,9 ^e	15,7 ^b	16,0 ^b	14,5 ^d	14,8^B
	D2 (20)	13,1 ^e	15,7 ^b	16,1 ^b	14,8 ^{cd}	14,9^B
	D3 (30)	13,3 ^e	16,0 ^b	17,1 ^a	15,4 ^{bc}	15,4^A
	Trung bình (B)	13,1^C	15,8^A	16,4^A	14,9^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,11%</i>					
18T SXL	D1 (10)	14,1 ^e	17,4 ^b	17,7 ^b	16,0 ^d	16,3^B
	D2 (20)	14,4 ^e	18,0 ^b	17,9 ^b	16,3 ^{cd}	16,6^B
	D3 (30)	14,6 ^e	18,0 ^b	19,2 ^a	17,0 ^{bc}	17,2^A
	Trung bình (B)	14,3^C	17,8^A	18,2^A	16,4^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,72%</i>					

Số quả/chùm là một trong những chỉ tiêu ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất thu hoạch của cây cà phê. Kết quả theo dõi chỉ tiêu này ở thời điểm 18T SXL được trình bày trong bảng 3.14. Kết quả cho thấy việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi

khuẩn nội sinh đã có tác động tích cực, làm tăng số quả/chùm so với ở các công thức đối chứng không xử lý. Trong số các hỗn hợp vi khuẩn, hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có số quả/chùm trung bình lớn nhất, tiếp đến hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) rồi B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17). Tuy nhiên, số quả/chùm trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) không khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4). Các mức huyền phù khuẩn khác nhau không ảnh hưởng có ý nghĩa đến số quả/chùm.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng vi khuẩn nội sinh đến số quả/chùm của cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số quả/chùm				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (ĐC)	B1	B2	B3	
18T SXL	D1 (10)	25,4 ^d	29,4 ^{bc}	31,7 ^{ab}	30,6 ^b	29,3
	D2 (20)	25,6 ^{cd}	29,6 ^{bc}	32,4 ^{ab}	31,3 ^{ab}	29,7
	D3 (30)	26,2 ^{cd}	30,2 ^b	35,1 ^a	32,7 ^{ab}	31,1
	Trung bình (B)	25,7 ^C	29,7 ^B	33,1 ^A	31,6 ^{AB}	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 17,16%					

Tương tự như các chỉ tiêu theo dõi khác, tương tác giữa hỗn hợp và mức huyền phù khuẩn vi khuẩn xử lý ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến số quả/chùm. Tuy nhiên, bảng 3.14 cũng cho thấy các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* + *B. pumilus*), B3D3 (CT12: 30 ml *B. cereus* + *B. pumilus*), B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* + *B. pumilus*), B2D1 (CT7: 10 ml *B. subtilis* + *B. pumilus*) và B3D2 (CT11: 20 ml *B. cereus* + *B. pumilus*) là các công thức có số quả/chùm trung bình lớn nhất, tương đương nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa so với các công thức đối chứng ở mức $p < 0,05$. Số quả/chùm trung bình ở các công thức này cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là: 34,3%, 25,1%, 26,4%, 24,9% và 22,3%. Khả năng gia tăng số lượng quả của các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này tương

đồng với kết quả nghiên cứu của Zhou *et al.* (2014) [223] về ảnh hưởng của hỗn hợp vi khuẩn *B. cereus* + *B. subtilis* đến số lượng quả ớt. Số quả ớt trung bình tăng từ 3,5% đến 22,6% tùy mức vi khuẩn và phương pháp xử lý.

3.2.5. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng kí sinh cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

3.2.5.1. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong vườn cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Tuyến trùng là một trong những tác nhân chính gây hại cây cà phê, làm cho cây cà phê bị vàng lá và thối rễ, giảm tỷ lệ thành công khi tái canh. Chính vì vậy, mật độ 2 loại tuyến trùng chính gây hại cây cà phê là *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* sp. cũng đã được theo dõi và ghi nhận ở các bảng 3.15 và 3.17.

Kết quả trình bày trong bảng 3.15 cho thấy trước xử lý, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở tất cả các công thức tương đối đồng đều nhau, dao động trong khoảng 42,4 – 61,1 con/50 g đất và khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sau xử lý, ngay từ thời điểm theo dõi sau xử lý 2 tháng trở đi, mật độ *Pratylenchus* sp. ở tất cả các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn đều thấp hơn so với ở các công thức đối chứng và có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Trong khi mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. tăng dần theo thời gian ở tất cả các công thức đối chứng và đạt đỉnh ở thời điểm 12 tháng sau xử lý, chúng lại giảm dần ở các công thức có xử lý vi khuẩn. Đáng chú ý, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) luôn thấp nhất và khác biệt so với ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17). Tuy nhiên, sự khác biệt về mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. giữa các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) không có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm theo dõi sau xử lý.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Mật độ tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp. (con/50g đất)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (B)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (10)	52,5	60,2	42,4	46,8	50,47
	D2 (20)	57,6	48,7	49,2	49,9	51,34
	D3 (30)	54,5	48,0	48,0	61,1	52,90
	Trung bình (D)	54,9	52,3	46,5	52,6	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 22,06%</i>					
2T SXL	D1 (10)	80,1 ^a	63,6 ^{ab}	37,5 ^c	39,3 ^c	55,11
	D2 (20)	81,6 ^a	52,0 ^{bc}	40,0 ^c	42,0 ^c	53,91
	D3 (30)	72,9 ^a	53,1 ^c	39,4 ^c	48,5 ^{bc}	53,45
	Trung bình (D)	78,2^A	56,2^B	38,9^C	43,3^C	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 20,62%</i>					
6T SXL	D1 (10)	105,7 ^a	49,3 ^b	23,6 ^{cd}	26,7 ^{cd}	51,3
	D2 (20)	113,2 ^a	39,7 ^{bc}	25,9 ^{cd}	24,1 ^{cd}	50,7
	D3 (30)	114,9 ^a	33,5 ^{cd}	20,8 ^d	28,3 ^{cd}	49,4
	Trung bình (D)	111,3^A	40,8^B	23,4^C	26,4^C	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 17,22%</i>					
12T SXL	D1 (10)	143,1 ^b	52,6 ^c	30,1 ^c	30,7 ^c	64,1
	D2 (20)	183,0 ^a	47,9 ^c	33,2 ^c	29,9 ^c	73,5
	D3 (30)	156,7 ^{ab}	38,6 ^c	20,9 ^c	25,1 ^c	60,3
	Trung bình (D)	160,9^A	46,4^B	28,1^C	28,6^C	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 26,12%</i>					
18T SXL	D1 (10)	97,3 ^a	38,0 ^b	19,0 ^c	19,0 ^c	43,3
	D2 (20)	96,7 ^a	23,3 ^{bc}	15,0 ^c	16,7 ^c	37,9
	D3 (30)	99,3 ^a	25,3 ^{bc}	14,7 ^c	22,0 ^c	40,3
	Trung bình (D)	97,8^A	28,9^B	16,2^C	19,2^C	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 21,73%</i>					

Ở thời điểm 18 tháng sau xử lý, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở tất cả các công thức, kể cả đối chứng đều giảm so với ở thời điểm 12 tháng sau xử lý. Tuy nhiên, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở các công thức đối chứng vẫn cao hơn

so với ở các công thức xử lý khoảng 2,5 – 6,5 lần. Lúc này, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở các công thức xử lý vi khuẩn giảm xuống còn thấp nhất, chỉ dao động trong khoảng 14,7 – 38,0 con/50 g đất.

Ở tất cả các thời điểm theo dõi, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trung bình ở các mức xử lý vi khuẩn khác nhau đều không khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, tương tác giữa hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý cũng không có ý nghĩa thống kê. Bảng 3.15 cũng cho thấy tuy mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn thấp nhất trong số tất cả các công thức nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở các công thức có xử lý các hỗn hợp vi khuẩn khác.

Bên cạnh việc theo dõi mật độ tuyến trùng, hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cũng được tính toán và trình bày trong bảng 3.16. Bảng 3.16 cho thấy các chủng vi khuẩn nội sinh đã phát huy hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ngay từ thời điểm 2 tháng sau xử lý. Tuy nhiên, hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. tại thời điểm này chưa cao, chỉ dao động ở mức 18,1 – 45,2%. Hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. tiếp tục tăng dần ở các đợt theo dõi 4T SXL và 6T SXL và đạt trên 80% ở một số công thức từ thời điểm 10T SXL. Từ thời điểm này, hiệu quả diệt tuyến trùng của các công thức xử lý vi khuẩn duy trì khá ổn định theo thời gian theo dõi. Bảng 3.16 còn cho thấy, hiệu quả diệt tuyến trùng trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) luôn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) ở tất cả các thời điểm theo dõi.

Xét lượng huyền phù vi khuẩn xử lý, số liệu trình bày trong bảng 3.16 cho thấy, các mức huyền phù vi khuẩn xử lý đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp., với mức vi khuẩn xử lý càng nhiều, hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. càng cao. Đến thời điểm 18 tháng sau xử lý, xử lý hỗn hợp

huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây cho hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở mức 20 ml/cây.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Pratylenchus</i> sp.				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình D
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (10)	0 ^d	32,2 ^{ab}	40,0 ^a	45,2 ^a	29,33
	D2 (20)	0 ^d	26,0 ^{bc}	41,6 ^a	40,4 ^a	26,99
	D3 (30)	0 ^d	18,1 ^c	39,6 ^a	41,0 ^a	24,68
	Trung bình (D)	0 ^C	25,4 ^B	40,4 ^A	42,2 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 15,34					
4T SXL	D1 (10)	0 ^c	49,8 ^b	65,8 ^a	69,0 ^a	46,2
	D2 (20)	0 ^c	48,5 ^b	66,8 ^a	71,2 ^a	46,6
	D3 (30)	0 ^c	53,1 ^b	69,9 ^a	71,9 ^a	48,7
	Trung bình (D)	0 ^C	50,5 ^B	67,5 ^A	70,7 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 8,58					
6T SXL	D1 (10)	0 ^e	59,2 ^d	73,5 ^{ab}	72,7 ^b	51,4 ^B
	D2 (20)	0 ^e	59,0 ^d	72,2 ^b	75,6 ^{ab}	51,7 ^B
	D3 (30)	0 ^e	66,4 ^c	79,0 ^a	78,3 ^a	55,9 ^A
	Trung bình (D)	0 ^C	61,5 ^B	74,9 ^A	75,5 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,72					
12T SXL	D1 (10)	0 ^g	68,0 ^f	74,9 ^{de}	76,5 ^{cd}	54,9 ^C
	D2 (20)	0 ^g	69,4 ^f	79,1 ^{bc}	81,3 ^{ab}	57,4 ^B
	D3 (30)	0 ^g	72,6 ^e	85,4 ^a	85,6 ^a	60,9 ^A
	Trung bình (D)	0 ^C	70,0 ^B	79,8 ^A	81,1 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 12,25					
18T SXL	D1 (10)	0 ^e	66,9 ^d	77,3 ^b	78,6 ^b	55,7 ^B
	D2 (20)	0 ^e	71,7 ^c	81,2 ^{ab}	80,0 ^{ab}	58,2 ^A
	D3 (30)	0 ^e	71,2 ^c	83,6 ^a	80,1 ^{ab}	58,7 ^A
	Trung bình (D)	0 ^C	69,9 ^B	80,7 ^A	79,6 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 13,27					

Ghi chú: giá trị trung bình theo sau bởi (các) kí tự giống nhau thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

Tương tác giữa hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý chỉ có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ từ thời điểm 6 tháng sau xử lý. Đáng chú ý, các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3D3 (CT12: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) luôn đạt hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cao nhất và đều duy trì ở mức trên 80% từ thời điểm 10T SXL. Đến thời điểm 18T SXL, các tổ hợp B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3D2 (CT11: 20 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) cho hiệu quả làm giảm tuyến trùng tương đương các tổ hợp B2D3 và B3D3, đều có hiệu quả làm giảm tuyến trùng đạt trên 80%.

Hiệu quả làm giảm mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. của các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này tương đương với hiệu quả của thuốc hóa học imicyafos diệt tuyến trùng *Pratylenchus penetrans* gây hại cây cải củ (Wada *et al.*, 2011) [210]. Asyiah *et al.* (2015) [37] cũng đã kết luận vi khuẩn *B. subtilis* có hiệu quả tương đương như thuốc hóa học carbofuran đối với tuyến trùng *Pratylenchus coffeae* gây hại cây cà phê chè giai đoạn vườn ươm. Loài vi khuẩn này có khả năng làm giảm đến 71,3% số lượng tuyến trùng *Pratylenchus coffeae*, do đó, làm giảm 87% số lượng vết thương do tuyến trùng gây ra trên rễ cây cà phê chè (Asyiah *et al.*, 2015) [37]. Hiệu quả này cũng tương đương với hiệu quả của chế phẩm sinh học SH-BV1 (cũng bao gồm cả vi khuẩn *B. subtilis*) đối với tuyến trùng gây hại cây cà phê vối tại Đắk Nông (Nguyễn Thị Chúc Quỳnh và cs., 2016) [23].

3.2.5.2. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong vườn cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Số liệu mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất được trình bày ở bảng 3.17 cho thấy trước xử lý, mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất dao động trong khoảng 31,1 – 45,3 con/50 g đất và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức, đảm bảo độ đồng đều khi tiến hành thí nghiệm. Sau xử lý 2 tháng, giữa các công thức thí nghiệm đã có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp.. Tương tự như đối với mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp., mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất cũng luôn thấp nhất ở tất cả các thời

điểm theo dõi sau xử lý ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4). Mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trung bình ở các công thức xử lý 2 hỗn hợp vi khuẩn này khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) cũng như các công thức đối chứng. Điều này đã dẫn đến trung bình hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) luôn cao hơn so với ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) (Bảng 3.18).

Bảng 3.17 và 3.18 còn cho thấy, các mức xử lý vi khuẩn khác nhau không gây ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất. Kết quả này khác với kết quả nghiên cứu của Mahmoud *et al.* (2017) [127] về hiệu quả của *B. pumilus* đối với tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cây củ cải đường. Xử lý củ cải đường với lượng 30 ml huyền phù/chậu, *B. pumilus* đã làm giảm 95% số lượng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. tuổi 2 (J2), 78% số u sưng, 87% số khối trứng nhưng ở mức 10 ml/chậu, số liệu tương ứng chỉ là: 81%, 69% và 8%.

Tương tác giữa các hỗn hợp vi khuẩn và các mức huyền phù vi khuẩn xử lý, cũng không có ý nghĩa thống kê đối với mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp.. Tuy nhiên, có thể thấy, mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. ở các tổ hợp công thức B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3D3 (CT12: 30 ml (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) luôn thấp nhất và chỉ bằng khoảng 13 – 15% so với ở các công thức đối chứng tương ứng tại thời điểm 18 tháng sau xử lý (Bảng 3.17). Điều này cũng đã dẫn đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. ở các công thức này cao nhất, đạt trên 80% (Bảng 3.18).

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả phòng trừ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> sp. (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (10)	0 ^d	24,2 ^c	48,9 ^{ab}	47,1 ^{ab}	30,0
	D2 (20)	0 ^d	26,7 ^{bc}	50,6 ^a	44,2 ^{abc}	30,4
	D3 (30)	0 ^d	28,1 ^{abc}	45,8 ^{abc}	49,4 ^{ab}	30,8
	Trung bình (B)	0^C	26,34^B	48,43^A	46,93^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 25,0%					
4T SXL	D1 (10)	0 ^b	46,9 ^a	59,9 ^a	62,2 ^a	56,4
	D2 (20)	0 ^b	56,5 ^a	71,7	50,7 ^a	59,6
	D3 (30)	0 ^b	54,8 ^a	71,6 ^a	73,5 ^a	66,6
	Trung bình (B)	0^B	52,8^A	67,7^A	62,1^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 27,58%					
6T SXL	D1 (10)	0 ^c	53,9 ^{ab}	72,3 ^{ab}	70,2 ^{ab}	49,1
	D2 (20)	0 ^c	50,9 ^b	64,3 ^{ab}	60,7 ^{ab}	44,0
	D3 (30)	0 ^c	54,6 ^{ab}	62,6 ^{ab}	74,4 ^a	47,9
	Trung bình (B)	0^C	53,1^B	66,4^A	68,4^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 18,12%					
12T SXL	D1 (10)	0 ^e	63,1 ^d	73,8 ^{abc}	68,1 ^c	51,3
	D2 (20)	0 ^e	61,0 ^d	74,0 ^{bc}	72,9 ^c	52,0
	D3 (30)	0 ^e	63,8 ^d	78,7 ^{ab}	80,7 ^a	55,8
	Trung bình (B)	0^C	62,6^B	75,5^A	73,9^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 13,98%					
18T SXL	D1 (10)	0 ^f	67,2 ^d	78,9 ^{ab}	74,6 ^c	55,2
	D2 (20)	0 ^f	67,4 ^d	81,7 ^a	78,5 ^b	56,9
	D3 (30)	0 ^f	61,8 ^e	80,3 ^{ab}	80,1 ^{ab}	55,6
	Trung bình (B)	0^D	65,5^C	80,3^A	77,7^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p < 0,05$; CV% = 12,73%					

Ghi chú: giá trị trung bình theo sau bởi (các) kí tự giống nhau thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

Tóm lại, xét tổng thể hiệu quả diệt cả 2 loại tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. trong đất, các tổ hợp B2D3 (CT9: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B2D2 (CT8: 20 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3D3 (CT12: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) có hiệu quả diệt tuyến trùng tốt nhất, tương đương nhau và khác biệt có ý nghĩa so với các công thức khác. Nếu tính đến lượng hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh sử dụng, công thức CT8 tỏ ra kinh tế hơn so với CT9 và CT12 vì lượng hỗn hợp sử dụng chỉ bằng 2/3 so với ở công thức CT9 và CT12.

Những kết quả trình bày ở trên cho thấy, các chủng vi khuẩn nội sinh *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 trong nghiên cứu này cũng có khả năng tiêu diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. kí sinh cây cà phê. Khả năng đối kháng tuyến trùng *Meloidogyne* sp. của các chủng vi khuẩn *Bacillus* cũng đã được khẳng định trong nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước. Đã có nhiều công trình nghiên cứu về ảnh hưởng riêng lẻ của từng chủng vi khuẩn *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus* đến mật độ và hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* spp. nhưng chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của các hỗn hợp các chủng vi khuẩn này đến tuyến trùng *Meloidogyne* spp.. Những kết quả nghiên cứu về từng chủng vi khuẩn riêng lẻ đều cho thấy chúng có tác dụng làm giảm mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp..

Chủng vi khuẩn *B. pumilus* đã làm giảm tỷ lệ nở của trứng tuyến trùng *Meloidogyne javanica* xuống chỉ còn 17 – 19% và tăng tỷ lệ chết của ấu trùng lên đến 99,3% (Ramezani *et al.*, 2014) [167]. Kết quả nghiên cứu của Mahmoud *et al.* (2017) [127] cũng cho thấy vai trò của vi khuẩn *B. pumilus* trong việc hạn chế mật độ tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây hại cây củ cải đường. Số lượng khối trứng và u sưng do tuyến trùng *Meloidogyne incognita* đã giảm đến 74% và 73% khi xử lý cây củ cải củ bằng *B. pumilus*. Đối với tuyến trùng *M. incognita* gây hại cây củ cải đường, xử lý *B. subtilis* đã làm giảm 71% số lượng u sưng do tuyến trùng, giảm 65% số lượng khối trứng (Mahmoud *et al.*, 2017) [127]. Ngoài ra, *B. subtilis* còn làm giảm đáng kể số lượng u sưng, giảm khả năng sinh sản cũng như mật độ tuyến trùng *M. incognita* gây hại cây đậu xanh (Khan *et al.*, 2007) [121]. Siddiqui *et al.* (2001) [184] cũng cho

biết *B. subtilis* phân lập từ vùng rễ của *Helianthus annuus* có khả năng diệt tuyến trùng *M. javanica* gây hại cây đậu xanh. Kết quả nghiên cứu của Burkett-Cadena *et al.* (2008) [56] cho thấy chủng *B. subtilis* GB03 và *B. velezensis* GB99 (BioYield, Gustafson LLC, Plano TX, USA) gây giảm đáng kể lượng trứng và tuyến trùng *M. incognita* J2 trong đất trồng cà chua.

Trong điều kiện *in vitro*, dịch lọc *B. cereus* cũng đã làm tỷ lệ chết của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. tăng lên đến 92,8%, làm tỷ lệ trứng nở giảm 86,1% (Xiao *et al.*, 2012) [214]. Ở điều kiện đồng ruộng, *B. cereus* đã làm giảm 65% số lượng u sưng do tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây ra trên rễ cà chua (Xiao *et al.*, 2012) [214]. Trong một nghiên cứu khác, huyền phù vi khuẩn *B. cereus* gây chết 90,96% tuyến trùng *M. incognita* trong điều kiện *in vitro* (Gao *et al.*, 2016) [77]. Với thí nghiệm trong chậu, xử lý dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. cereus* đã mang lại hiệu quả diệt tuyến trùng *M. incognita* lên đến 81,36% (Gao *et al.*, 2016) [77].

Cơ chế của tác dụng này cũng đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu và thảo luận. Ongena and Jacques (2008) [156] cho rằng các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* không những có thể ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh mà còn có khả năng xâm chiếm bộ rễ cây trồng và kích thích khả năng miễn dịch của cây. Đây là những loài có khả năng sản sinh một lượng lớn các phân tử có hoạt tính sinh học ức chế sự tăng trưởng của các tác nhân gây bệnh thực vật (Krebs *et al.*, 1998) [117]. Ngoài ra, enzyme protease, chitinase phân hủy chitin sản sinh bởi các chủng vi khuẩn *Bacillus* cũng đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng mật độ tuyến trùng trong đất (Lian *et al.*, 2007) [123]. *B. pumilus* là một trong những loài được biết đến nhiều nhất trong sản xuất protease và lipase công nghiệp (Ahmadian *et al.*, 2007) [32]. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan có thể khống chế tuyến trùng bằng hai cách: (i) hàm lượng lân dễ tan trong đất cao giúp cây trồng sinh trưởng khỏe mạnh, do đó, giúp tăng khả năng chống lại sự tấn công của tuyến trùng (Kirkpatrick *et al.*, 1964) [112] và (ii): sản sinh một số độc tố có thể hạn chế khả năng xâm nhiễm của tuyến trùng gây hại (Brannen, 1995) [53]. Chẳng hạn như, *B. subtilis* được coi là một trong những vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan và cung cấp

lân dễ tan rất tốt cho bộ rễ cây trồng phát triển (Gaur, 1990) [80] và sản sinh độc tố bulbiformin ức chế sự phát triển của tuyến trùng *M. incognita* gây hại cây đậu xanh (Khan *et al.*, 2007) [121]. Các chất chuyển hóa có khả năng ức chế tuyến trùng gây hại như: uracil, 9H-purine và dihydrouracil đã được chiết xuất từ các chủng vi khuẩn *B. cereus* và *B. subtilis* (Oliveira *et al.*, 2014) [154]. Trong số đó, dihydrouracil có liều lượng gây chết 50% tuyến trùng LC50 còn thấp hơn cả thuốc diệt tuyến trùng carbofuran (204 µg/mL so với 260 µg/mL).

Ngoài ra, các chủng vi khuẩn *Bacillus* còn có khả năng hình thành nội bào tử và có khả năng chịu nhiệt, giúp chúng có thể dễ dàng được phát triển thành các sản phẩm sinh học và thương mại hóa (Krebs *et al.*, 1998) [117].

Kloepper *et al.* (2004) [116] cho biết các chủng vi khuẩn *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* và *B. subtilis* làm giảm tỷ lệ bệnh và mức độ bệnh của nhiều loại bệnh hại thông qua tính kháng lưu dẫn cảm ứng. Tính kháng lưu dẫn cảm ứng của vi khuẩn *B. firmus* GB-126 đối với tuyến trùng kí sinh thực vật *Rotylenchulus reniformis* trong điều kiện nhà lưới cũng được khẳng định trong nghiên cứu của Schrimsher *et al.* (2014) [176].

Nghiên cứu cơ chế đối kháng của các chủng vi khuẩn *Bacillus* đối với 3 loài tuyến trùng kí sinh thực vật (*Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* và *Ditylenchus dipsaci*), Mendoza *et al.* (2008) [136] kết luận tuyến trùng bị bất hoạt và chết sau khi tiếp xúc với huyền phù vi khuẩn *B. firmus* là do trong quá trình lên men nhân sinh khối, *B. firmus* đã sản sinh ra các chất chuyển hóa thứ cấp. Becker *et al.* (1988) [46] cũng khẳng định, các chất chuyển hóa thứ cấp sản sinh bởi các vi khuẩn liên quan đến khả năng kiểm soát tuyến trùng *M. incognita*. Qiuhong *et al.* (2006) [165] chứng minh rằng các enzyme protease, collagenase và chitinase sản sinh bởi vi khuẩn *Bacillus* B16 là nguyên nhân gây chết tuyến trùng.

Nghiên cứu của Nguyen *et al.* (accepted) [152], Nguyen *et al.* (accepted) [153] và Trinh *et al.* (accepted) [206] cũng cho thấy các chủng vi khuẩn nội sinh và vùng rễ cây hồ tiêu ngoài khả năng cố định N, phân giải P khó tan để kích thích sinh trưởng,

các chủng này còn tổng hợp nhiều hợp chất kháng tuyến trùng cũng như nấm *Phytophthora* sp. và *Fusarium* sp. gây bệnh.

3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến sinh trưởng và phát triển của cà phê với giai đoạn kinh doanh

3.3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng dinh dưỡng tích lũy trong lá cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kết quả phân tích hàm lượng dinh dưỡng của N và P trong lá cà phê giai đoạn kinh doanh trình bày trong bảng 3.19 cho thấy tại thời điểm trước xử lý, hàm lượng N% trong lá ở các công thức thí nghiệm rất biến động, dao động trong khoảng 2,88 – 3,37%. Theo thang dinh dưỡng xây dựng cho cây cà phê với năng suất 3 – 4 tấn/ha tại Đắk Lắk của Nguyễn Văn Sanh (2009) [24], hàm lượng N trong lá của hầu hết các công thức đều nằm trong ngưỡng tối ưu (3,05 – 3,28%), một số công thức nằm trong ngưỡng trung bình (CT4 và CT7) và một số khác nằm trong ngưỡng thừa (CT9 và CT12). Sau xử lý 1 năm, hàm lượng N trong lá ở phần lớn các công thức (trừ công thức CT1 và CT9) đều tăng. Ở thời điểm 2 năm sau xử lý, hàm lượng N trong lá ở tất cả các công thức đều tăng so với trước xử lý. Tuy nhiên, trong khi hàm lượng N trong lá tăng mạnh so với trước xử lý ở các công thức xử lý vi khuẩn (tăng đến 23,4% - CT7) thì chỉ tiêu này lại chỉ tăng rất ít ở các công thức đối chứng (tăng nhiều nhất chỉ là 4,4%).

Đáng chú ý, tại thời điểm 2 năm sau xử lý, hàm lượng N trong lá lại tăng nhiều nhất so với trước xử lý ở 2 công thức CT4 và CT7 (tăng trên 20%). Đây là 2 công thức có hàm lượng N trong lá trước xử lý nằm trong ngưỡng trung bình theo thang dinh dưỡng do Nguyễn Văn Sanh (2009) [24] xây dựng nhưng sang đến thời điểm 2 năm sau xử lý, chúng lại nằm trong ngưỡng thừa dinh dưỡng N (> 3,28%). Như vậy, có thể thấy các chủng vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này đã phát huy tác dụng, giúp cây cà phê tăng cường hấp thu dinh dưỡng N nên mặc dù lượng N bón đã giảm 25% so với quy trình nhưng hàm lượng N tích lũy trong lá ở các công thức vẫn tăng từ 5,6 – 23,4% so với trước xử lý và vượt ngưỡng tối ưu dành cho cây cà phê vối. Do

đó, trong điều kiện thực tế, nếu được xử lý hỗn hợp vi khuẩn nội sinh như trong điều kiện thí nghiệm này, cần điều chỉnh giảm hơn nữa lượng N bón cho cây cà phê để hạn chế việc lãng phí phân bón, đồng thời giảm tác động xấu của phân hóa học đến tính chất đất và nguồn nước ngầm.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng một số chất dinh dưỡng trong lá cà phê với giai đoạn kinh doanh

Công thức	Tổ hợp	Hàm lượng N (%)			Hàm lượng P (%)		
		TXL	1 năm SXL	2 năm SXL	TXL	1 năm SXL	2 năm SXL
CT1	B0D1	3,26	3,25	3,37	0,11	0,11	0,12
CT2	B0D2	3,16	3,17	3,30	0,12	0,12	0,11
CT3	B0D3	3,20	3,21	3,34	0,12	0,12	0,12
CT4	B1D1	2,88	3,26	3,54	0,11	0,12	0,13
CT5	B1D2	3,12	3,40	3,65	0,12	0,13	0,15
CT6	B1D3	3,28	3,42	3,54	0,12	0,12	0,13
CT7	B2D1	2,90	3,42	3,58	0,12	0,12	0,15
CT8	B2D2	3,12	3,64	3,63	0,11	0,13	0,12
CT9	B2D3	3,37	3,35	3,61	0,12	0,13	0,13
CT10	B3D1	3,04	3,28	3,63	0,12	0,12	0,13
CT11	B3D2	3,15	3,25	3,64	0,11	0,12	0,14
CT12	B3D3	3,37	3,44	3,56	0,12	0,12	0,14

Khác với hàm lượng N%, hàm lượng P% trong lá cà phê của các công thức ở thời điểm trước xử lý đều nằm trong ngưỡng trung bình theo thang dinh dưỡng do Nguyễn Văn Sanh (2009) [24] xây dựng cho cây cà phê với giai đoạn kinh doanh (0,08 – 0,12%). Sau 1 năm xử lý vi khuẩn nội sinh, hàm lượng P% trong lá ở tất cả

các công thức đối chứng đều không thay đổi nhưng tăng ở một số công thức xử lý vi khuẩn nội sinh (CT4, CT5, CT8, CT9 và CT11). Đến thời điểm 2 năm sau xử lý, hàm lượng P% trong lá ở các công thức xử lý vi khuẩn đều tăng so với trước xử lý. Đáng chú ý, hàm lượng P tăng nhiều nhất ở các công thức CT11, CT7 và CT5, lần lượt tăng 27,3%, 25,0% và 25,0% so với trước xử lý và đều nằm trong ngưỡng dinh dưỡng tối ưu theo thang dinh dưỡng do Nguyễn Văn Sanh (2009) [24] xây dựng cho cây cà phê với giai đoạn kinh doanh (0,13 – 0,15%). Trong khi đó, hàm lượng P% ở các công thức đối chứng lại thay đổi không theo xu hướng nào, giảm ở CT2, không biến động ở CT3 và tăng nhẹ ở CT1 và đều nằm ở ngưỡng trung bình trong thang dinh dưỡng.

Đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của hỗn hợp nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* đến hàm lượng các chất dinh dưỡng cũng như sinh trưởng, phát triển của một số loại cây trồng nhưng chỉ có một nghiên cứu về ảnh hưởng hỗn hợp của 2 chủng vi khuẩn *B. cereus* + *B. subtilis* (Zhou *et al.*, 2014) [223] giống như trong nghiên cứu này. Do đó, việc so sánh kết quả có thể được thực hiện với các chủng vi khuẩn khi được xử lý riêng lẻ hoặc khi một trong các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này kết hợp với các chủng vi khuẩn khác. Sự gia tăng hàm lượng N% và P% trong lá sau khi chủng nhiễm các hỗn hợp vi khuẩn cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jha and Subramanian (2013) [107] khi chủng nhiễm hỗn hợp vi khuẩn *B. pumilus* và *P. pseudoalcaligenes* vào cây lúa. Sau chủng nhiễm, hàm lượng N% trong lá lúa tăng đến 26,7% trong khi hàm lượng P% tăng 16,3%. Hàm lượng N trong cây súp lơ xanh (*Brassica oleracea* L., var. *italic*) khi được xử lý bằng phân chuồng và vi khuẩn *B. cereus* tương đương với ở công thức bón 100% phân hóa học và cao hơn 30% so với ở công thức chỉ bón bằng phân chuồng (Yildirim *et al.*, 2011) [216]. Trong khi đó, hàm lượng P lại chỉ bằng khoảng 70% so với ở công thức bón hoàn toàn bằng phân hỗn hợp nhưng cao hơn khoảng 28% so với công thức bón hoàn toàn bằng phân chuồng (Yildirim *et al.*, 2011) [216]. Trong một nghiên cứu khác cũng tiến hành trên cây súp lơ xanh nhưng áp dụng sản phẩm có chứa vi khuẩn *B. subtilis*, hàm lượng N% trong cây tăng từ 4,8 – 39,5% trong khi hàm lượng P tăng 1,5 – 101,5% so với

đối chứng, với tỷ lệ tăng hàm lượng N và P tỷ lệ thuận với lượng vi khuẩn áp dụng (El-Nemr *et al.*, 2011) [70].

Các kết quả nghiên cứu trên đều khẳng định vai trò tăng khả năng hấp thu N và P của các chủng vi khuẩn *B. cereus*, *B. pumilus* và *B. subtilis* được sử dụng trong nghiên cứu này. Hàm lượng các chất dinh dưỡng trong cây tăng sau khi được xử lý bằng vi khuẩn được cho là bởi vi khuẩn đã giúp cây tăng cường sản sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật, kích thích sự phát triển của rễ và dẫn đến sự hấp thụ nước và chất dinh dưỡng tốt hơn từ đất (Kloepper *et al.*, 1991) [114]. Kết quả này cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu *invitro* của Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17], Trương Vĩnh Thới (2012) [27] và Ngô Văn Anh và cs. (2017) [1] về khả năng cố định đạm, phân giải lân của các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4. Kết quả này cũng thống nhất với kết quả nghiên cứu trong nhà lưới và cà phê giai đoạn kiến thiết cơ bản ngoài đồng ruộng.

3.3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Đạm là một trong hai thành tố quan trọng nhất trong cấu tạo hóa học của các phân tử diệp lục và protein, do đó, hàm lượng đạm cũng ảnh hưởng đến sự hình thành lục lạp và tích lũy diệp lục tố trong lá, bao gồm: diệp lục a (*Chl_a*) và diệp lục b (*Chl_b*). So với thời điểm năm 2016, hàm lượng diệp lục *Chl_a*, *Chl_b* và carotenoid *C_{car}* đều có xu hướng tăng ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn trong khi lại giảm nhẹ ở các công thức đối chứng tại thời điểm phân tích trong năm 2018 (bảng 3.20).

Tại thời điểm phân tích năm 2018, hàm lượng *Chl_a* cao nhất lần lượt theo thứ tự là: CT9, CT12 rồi đến CT11. Đây cũng là các công thức có tỷ lệ tăng hàm lượng *Chl_a* cao nhất so với ở các công thức đối chứng tương ứng, lần lượt đạt: 31,2%, 27,9% và 26,1%. Tuy nhiên, so với trước xử lý, hàm lượng *Chl_a* lại tăng nhiều nhất ở các công thức CT12 (39,3%), CT8 (30,5%), CT10 (25,1%), CT11 (23,2%) và CT9 (21,6%). Hàm lượng *Chl_b* cao nhất ở công thức CT9 rồi đến CT11 và CT7, lần lượt cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng là 31,1%, 4,6% và 12,9%. Hàm

lượng C_{car} cao nhất lần lượt theo thứ tự ở các công thức CT5, CT6 và CT8, cao hơn so với các công thức đối chứng tương ứng là: 9%; 6,7% và 6,2%. Tuy nhiên, so với trước xử lý, hàm lượng C_{car} lại tăng nhiều nhất ở công thức CT9, tăng 7,6%.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hàm lượng diệp lục tố trong lá cà phê với giai đoạn kinh doanh

Công thức	Tổ hợp	Hàm lượng Chl_a (mg/g)		Hàm lượng Chl_b (mg/g)		Hàm lượng C_{car} (mg/g)	
		2016	2018	2016	2018	2016	2018
CT1	B0D1	1,054	0,958	0,652	0,596	0,742	0,702
CT2	B0D2	1,058	0,981	0,641	0,647	0,737	0,714
CT3	B0D3	1,033	0,990	0,674	0,594	0,743	0,717
CT4	B1D1	0,997	1,074	0,692	0,632	0,709	0,731
CT5	B1D2	1,061	1,079	0,615	0,665	0,753	0,778
CT6	B1D3	0,974	1,130	0,651	0,648	0,746	0,765
CT7	B2D1	1,010	1,163	0,618	0,673	0,711	0,739
CT8	B2D2	0,909	1,186	0,593	0,615	0,740	0,758
CT9	B2D3	1,068	1,299	0,628	0,779	0,700	0,753
CT10	B3D1	0,948	1,186	0,667	0,659	0,653	0,696
CT11	B3D2	1,004	1,237	0,696	0,677	0,743	0,741
CT12	B3D3	0,909	1,266	0,652	0,632	0,734	0,733

Khả năng làm tăng hàm lượng các sắc tố quang hợp của các hỗn hợp chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này tương đồng với kết quả của nhiều nghiên cứu trước đây được thực hiện trên các đối tượng cây trồng khác như: dưa leo (Mohamed *et al.*, 2016) [142], *Bassia indica* (Hashem *et al.*, 2015) [94], lúa mỳ (Hassan *et al.*, 2018) [95], súp lơ xanh (Yildirim *et al.*, 2011) [216], ớt (Zhou *et al.*, 2014) [223]. Hàm lượng các sắc tố quang hợp trong lá cây cà phê với giai đoạn kinh doanh ở các công thức xử lý

hỗn hợp các vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này gần như tương đồng với hàm lượng các sắc tố quang hợp trong nghiên cứu bón hoàn toàn bằng phân hóa học (Nguyễn Văn Minh, 2014) [16] hay trong nghiên cứu có bón bổ sung chất hữu cơ sinh học chitosan oligomer (Nguyen *et al.*, 2010) [151]. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yildirim *et al.* (2011) [216] khi xử lý vi khuẩn *B. cereus* cho cây súp lơ xanh. Hàm lượng diệp lục tố khi xử lý *B. cereus* kết hợp với phân chuồng tương đương với ở công thức bón hoàn toàn bằng phân hóa học và cao hơn 14,6% so với ở công thức bón hoàn toàn bằng phân chuồng.

3.3.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tuyến trùng kí sinh hại cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

3.3.3.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tuyến trùng kí sinh *Pratylenchus* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kinh doanh

Diễn biến mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất cũng như trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh được theo dõi và ghi nhận trong các bảng 3.21 và 3.23. Bảng 3.21 và 3.23 cho thấy, trước xử lý, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. dao động trong khoảng 59,7 – 97,6 con/50g đất và 189,8 – 274,6 con/5 g rễ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các công thức về mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở thời điểm này. Điều này đảm bảo tính đồng nhất giữa các công thức trước khi tiến hành thí nghiệm. Sau xử lý, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất cũng như trong rễ ở tất cả các công thức đối chứng đều tăng trong khi lại giảm dần ở các công thức có xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh. Kết quả này đã dẫn đến sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) về mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất cũng như trong rễ giữa các công thức đối chứng và các công thức có xử lý huyền phù vi khuẩn nội sinh. Bảng 3.21 và 3.23 cũng cho thấy, trung bình mật độ *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn thấp nhất trong suốt quá trình điều tra sau xử lý. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trung bình các công thức.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ *Pratylenchus* sp. trong đất (con/50 g đất) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Mật độ <i>Pratylenchus</i> sp. (con/50 g đất)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (20)	87,5	74,3	70,1	97,6	82,4
	D2 (30)	65,9	66,8	77,1	62,9	68,2
	D3 (40)	71,6	73,8	59,7	78,3	70,9
	Trung bình (B)	75,0	71,7	69,0	79,6	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 22,8</i>					
4T SXL	D1 (20)	124,2 ^a	57,8 ^{de}	48,4 ^e	72,7 ^{cd}	75,8^A
	D2 (30)	102,8 ^{ab}	41,2 ^e	42,1 ^e	42,9 ^e	57,2^B
	D3 (40)	91,5 ^{bc}	40,9 ^e	35,5 ^e	39,8 ^e	51,9^B
	Trung bình (B)	106,2^A	46,6^B	42,0^B	51,8^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 20,5</i>					
8T SXL	D1 (20)	112,2 ^a	55,6 ^b	32,0 ^b	47,3 ^b	61,8
	D2 (30)	109,1 ^a	52,3 ^b	35,7 ^b	37,8 ^b	58,7
	D3 (40)	102,3 ^a	51,8 ^b	30,6 ^b	33,6 ^b	54,6
	Trung bình (B)	107,9^A	53,2^B	32,8^B	39,6^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 22,2</i>					
12T SXL	D1 (20)	124,9 ^a	35,5 ^b	36,5 ^b	46,2 ^b	60,8
	D2 (30)	118,7 ^a	40,9 ^b	35,8 ^b	37,4 ^b	58,2
	D3 (40)	118,9 ^a	42,8 ^b	27,1 ^b	37,9 ^b	56,7
	Trung bình (B)	120,9^A	39,8^B	33,2^B	40,5^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 17,0</i>					
24T SXL	D1 (20)	165,3 ^a	48,2 ^b	45,8 ^b	54,0 ^b	78,3
	D2 (30)	159,1 ^a	56,3 ^b	47,4 ^b	50,8 ^b	78,4
	D3 (40)	174,0 ^a	55,8 ^b	35,5 ^b	52,3 ^b	79,4
	Trung bình (B)	166,1^A	53,4^B	42,9^B	52,4^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 18,7</i>					

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt <i>Pratylenchus</i> sp. trong đất (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (20)	0 ^b	21,8	23,6	17,7	15,8
	D2 (30)	0 ^b	24,9	28,0	23,8	19,2
	D3 (40)	0 ^b	18,3	18,9	23,7	15,2
	Trung bình (B)	0	21,7	23,5	21,7	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 14,82</i>					
4T SXL	D1 (20)	0 ^e	46,2 ^d	51,7 ^{cd}	46,5 ^d	36,1 ^B
	D2 (30)	0 ^e	60,3 ^{ab}	64,5 ^a	56,5 ^{bc}	45,3 ^A
	D3 (40)	0 ^e	55,7 ^{bc}	52,3 ^{bcd}	59,6 ^{abc}	41,9 ^A
	Trung bình (B)	0^e	54,1^A	56,2^A	54,2^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 7,1</i>					
8T SXL	D1 (20)	0 ^e	42,8 ^d	64,8 ^{ab}	61,5 ^b	42,3 ^B
	D2 (30)	0 ^e	52,8 ^c	71,1 ^a	64,6 ^{ab}	47,1 ^A
	D3 (40)	0 ^e	49,7 ^{cd}	62,9 ^{ab}	69,0 ^{ab}	45,4 ^{AB}
	Trung bình (B)	0^C	48,4^B	66,2^A	65,0^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 7,0</i>					
12T SXL	D1 (20)	0 ^c	64,9 ^b	64,0 ^b	66,1 ^{ab}	48,7
	D2 (30)	0 ^c	66,4 ^{ab}	74,2 ^a	69,1 ^{ab}	52,4
	D3 (40)	0 ^c	64,8 ^b	72,1 ^{ab}	70,5 ^{ab}	51,9
	Trung bình (B)	0^C	65,4^B	70,1^A	68,6^{AB}	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 6,6</i>					
24T SXL	D1 (20)	0 ^b	62,2 ^a	65,5 ^a	69,1 ^a	49,2
	D2 (30)	0 ^b	65,2 ^a	74,0 ^a	67,9 ^a	51,8
	D3 (40)	0 ^b	67,9 ^a	74,5 ^a	71,7 ^a	53,5
	Trung bình (B)	0^C	65,1^B	71,3^A	69,6^{AB}	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 9,3</i>					

Ghi chú: Giá trị hiệu quả trung bình được chuyển đổi sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

Từ thời điểm 8T SXL, mật độ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. ở các công thức xử lý vi khuẩn biến động rất ít, chỉ dao động trong khoảng 27,1 – 56,3 con/50g đất và 73,0 – 151,9 con/5 g rễ trong khi vẫn liên tục tăng ở các công thức đối chứng. Điều này chứng tỏ các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh đã có tác dụng không chế sự phát triển của quần thể tuyến trùng *Pratylenchus* sp.. Thật vậy, kết quả tính toán hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ của các công thức xử lý vi khuẩn trình bày trong các bảng 3.22 và 3.24 đã chứng minh nhận định này. Đáng chú ý, trong số 3 hỗn hợp vi khuẩn nội sinh, hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn có trung bình hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với trung bình của các công thức xử lý hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) trong suốt quá trình thí nghiệm. Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) có hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trung bình luôn thấp nhất nhưng cũng đạt trên 65% (đối với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất) và khoảng 70% (đối với tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong rễ) từ thời điểm 12T SXL.

Lượng huyền phù vi khuẩn xử lý chỉ ảnh hưởng đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất ở thời điểm 4T và 8T SXL, với hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất cao nhất khi xử lý với lượng 30 ml/cây và 40 ml/cây. Tuy nhiên, sang đến các thời điểm theo dõi tiếp theo, lượng vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất. Đặc biệt, lượng huyền phù vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong rễ (Bảng 3.23 và 3.24).

Kết quả xử lý thống kê cũng cho thấy tương tác giữa hỗn hợp và lượng vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ. Tuy nhiên, các tổ hợp công thức B2D2 (30 ml *B. subtilis* + *B. pumilus*) và B2D3 (40 ml *B. subtilis* + *B. pumilus*) luôn có hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong đất và trong rễ cao nhất, đều đạt trên 70% kể từ thời điểm 12T SXL.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ *Pratylenchus* sp. trong rễ (con/5g rễ) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Mật độ <i>Pratylenchus</i> sp. (con/5g rễ)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (B)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (20)	197,1	272,6	244,6	214,0	232,1
	D2 (30)	274,6	245,4	226,6	229,4	244,0
	D3 (40)	222,2	205,3	273,6	189,8	222,7
	Trung bình (B)	231,3	241,1	248,3	211,1	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 21,0</i>					
4T SXL	D1 (20)	321,6 ^{bc}	232,1 ^{cd}	184,9 ^d	224,2 ^{cd}	240,7
	D2 (30)	430,3 ^a	166,4 ^d	160,7 ^d	197,8 ^d	238,8
	D3 (40)	344,5 ^{ab}	154,2 ^d	201,6 ^d	172,0 ^d	218,1
	Trung bình (B)	365,5 ^A	184,2 ^B	182,4 ^B	198,0 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 24,9</i>					
8T SXL	D1 (20)	311,5 ^b	142,6 ^c	120,6 ^c	131,6 ^c	176,6
	D2 (30)	434,5 ^a	104,8 ^c	97,4 ^c	131,8 ^c	192,1
	D3 (40)	346,7 ^a	81,9 ^c	109,9 ^c	100,3 ^c	159,7
	Trung bình (B)	364,2 ^A	109,8 ^B	109,3 ^B	121,2 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05 ; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 22,1</i>					
12T SXL	D1 (20)	313,9 ^b	138,9 ^c	96,9 ^{cd}	110,5 ^{cd}	168,4
	D2 (30)	419,5 ^a	115,8 ^{cd}	73,0 ^d	101,2 ^{cd}	184,5
	D3 (40)	369,8 ^a	102,7 ^{cd}	108,0 ^{cd}	85,6 ^d	160,9
	Trung bình (B)	367,7 ^A	119,1 ^B	92,6 ^B	99,1 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05 ; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 19,2</i>					
24T SXL	D1 (20)	349,0 ^b	151,9 ^c	101,9 ^c	122,5 ^c	181,3
	D2 (30)	449,6 ^a	123,8 ^c	98,0 ^c	108,8 ^c	195,1
	D3 (40)	427,8 ^a	125,5 ^c	125,2 ^c	95,9 ^c	193,6
	Trung bình (B)	408,8 ^A	133,7 ^B	108,4 ^B	109,0 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 18,3</i>					

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. trong rễ (%) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt <i>Pratylenchus</i> sp. trong rễ (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (20)	0 ^c	27,6 ^{ab}	29,1 ^{ab}	29,7 ^{ab}	21,6
	D2 (30)	0 ^c	31,4 ^a	30,5 ^a	30,5 ^a	23,1
	D3 (40)	0 ^c	28,5 ^{ab}	24,7 ^b	27,6 ^{ab}	20,2
	Trung bình (B)	0 ^B	29,2 ^A	28,1 ^A	29,3 ^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,82					
4T SXL	D1 (20)	0 ^e	50,3 ^b	55,3 ^{ab}	39,3 ^d	36,3
	D2 (30)	0 ^e	56,7 ^a	54,3 ^{ab}	44,7 ^c	38,9
	D3 (40)	0 ^e	52,3 ^{ab}	54,0 ^{ab}	41,7 ^{cd}	37,0
	Trung bình (B)	0 ^C	53,1 ^A	54,6 ^A	41,9 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 4,8					
8T SXL	D1 (20)	0 ^d	69,5 ^{abc}	71,6 ^{ab}	64,2 ^c	51,3
	D2 (30)	0 ^d	73,3 ^a	73,4 ^a	64,2 ^c	52,7
	D3 (40)	0 ^d	74,9 ^a	74,6 ^a	66,6 ^{bc}	54,0
	Trung bình (B)	0 ^C	72,6 ^A	73,2 ^A	65,0 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 4,8					
12T SXL	D1 (20)	0 ^d	69,4 ^c	76,7 ^{ab}	70,0 ^c	52,3
	D2 (30)	0 ^d	69,2 ^c	78,9 ^a	71,5 ^c	53,0
	D3 (40)	0 ^d	70,8 ^c	78,0 ^{ab}	73,6 ^{bc}	54,5
	Trung bình (B)	0 ^C	69,8 ^B	77,9 ^A	71,7 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,28					
24T SXL	D1 (20)	0 ^c	69,9 ^b	78,7 ^a	70,7 ^b	54,8
	D2 (30)	0 ^c	69,4 ^b	73,7 ^{ab}	71,7 ^b	53,7
	D3 (40)	0 ^c	68,9 ^b	78,1 ^a	74,4 ^{ab}	55,4
	Trung bình (B)	0 ^C	69,4 ^B	76,8 ^A	72,3 ^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,72					

Ghi chú: Giá trị hiệu quả trung bình được chuyển đổi sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê.

Kết quả này cũng tương đương với kết quả nghiên cứu trên cây cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản, với hiệu quả diệt tuyến trùng *Pratylenchus* sp. cũng đạt cao nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* + *B. pumilus*).

3.3.3.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tuyến trùng kí sinh *Meloidogyne* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kết quả theo dõi ảnh hưởng của các công thí nghiệm đến mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất và trong rễ cây cà phê với được trình bày trong các bảng 3.25 và 3.27.

Bảng 3.25 cho thấy, trước xử lý mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất dao động trong khoảng 12,6 – 16,8 con/50 g đất và không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các công thức thí nghiệm, đảm bảo độ đồng đều trước khi tiến hành thí nghiệm.

Bảng 3.25 cho thấy, sau xử lý, mật độ *Meloidogyne* sp. ở tất cả các công thức đối chứng đều tăng dần theo thời gian theo dõi. Đến thời điểm điều tra cuối cùng (24T SXL), mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất đã tăng 3,8– 4,2 lần so với ở thời điểm TXL. Ngược lại, mật độ *Meloidogyne* sp. trong đất ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn lại biến động hơi thất thường theo thời gian. Tuy nhiên, đến thời điểm 24T SXL, mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. ở hầu hết các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn đều chỉ tăng rất nhẹ, tăng 1,16 – 1,69 lần so với ở thời điểm TXL. Bảng 3.25 cũng cho thấy luôn có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) về mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất giữa trung bình của các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn với trung bình của các công thức đối chứng. Kết quả này chứng tỏ, các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh đã phần nào không chế được quần thể tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất. Tuy nhiên, mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất ở tất cả các công thức xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn khác nhau đều không khác biệt nhau có ý nghĩa ($p < 0,05$), dao động từ 15,1 – 24,8 con/50 g đất.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ *Meloidogyne* sp. trong đất (con/50 g đất) trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Mật độ <i>Meloidogyne</i> sp. trong đất (con/50 g đất)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (20)	15,7	14,7	16,3	15,4	15,5
	D2 (30)	16,8	15,4	16,5	15,8	16,1
	D3 (40)	12,9	14,2	14,7	12,6	13,6
	Trung bình (B)	15,1	14,8	15,8	14,6	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 30,8</i>					
4T SXL	D1 (20)	26,5 ^a	12,3 ^b	8,0	13,9 ^{bb}	15,2
	D2 (30)	29,4 ^a	10,2	8,8 ^b	11,2 ^b	14,9
	D3 (40)	23,4 ^a	11,1 ^{bb}	8,2 ^b	9,0 ^b	12,9
	Trung bình (B)	26,4 ^A	11,2 ^B	8,3 ^B	11,4 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV% = 30,2</i>					
8T SXL	D1 (20)	37,4 ^a	19,4 ^b	13,6 ^b	16,9 ^b	21,8
	D2 (30)	39,9 ^a	17,4 ^b	12,5 ^b	15,6 ^b	21,4
	D3 (40)	34,9 ^a	18,2 ^b	13,0 ^b	13,6 ^b	19,9
	Trung bình (B)	37,4 ^A	18,3 ^B	13,1 ^{BC}	15,3 ^C	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV% = 22,3</i>					
12T SXL	D1 (20)	44,8 ^a	18,2 ^b	14,7 ^b	17,4 ^b	23,8
	D2 (30)	46,5 ^a	17,3 ^b	14,1 ^b	14,5 ^b	23,1
	D3 (40)	40,5 ^a	17,1 ^b	13,1 ^b	13,8 ^b	21,1
	Trung bình (B)	43,9 ^A	17,5 ^B	14,0 ^B	15,2 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV% = 18,5</i>					
24T SXL	D1 (20)	59,0 ^a	24,8 ^b	19,2 ^b	20,5 ^b	30,9
	D2 (30)	63,6 ^a	20,9 ^b	16,2 ^b	18,4 ^b	29,8
	D3 (40)	53,8 ^a	20,2 ^b	17,2 ^b	15,1 ^b	26,6
	Trung bình (B)	58,8 ^A	22,0 ^B	17,5 ^B	18,0 ^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV% = 21,6</i>					

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất trồng cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> sp. (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (20)	0 ^c	14,7 ^a	30,9 ^a	26,4 ^{ab}	18,0
	D2 (30)	0 ^c	19,2 ^b	22,5 ^b	21,1 ^b	15,7
	D3 (40)	0 ^c	19,6 ^b	21,7 ^b	21,6 ^b	15,7
	Trung bình (B)	0^C	17,9^B	25,0^A	23,1^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 13,0</i>					
4T SXL	D1 (20)	0 ^c	53,7 ^{ab}	72,5 ^a	49,7 ^b	44,0
	D2 (30)	0 ^c	61,9 ^{ab}	68,6 ^{ab}	56,2 ^{ab}	46,7
	D3 (40)	0 ^c	58,0 ^{ab}	69,7 ^a	60,2 ^{ab}	47,0
	Trung bình (B)	0^C	57,8^B	70,3^A	55,4^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 15,4</i>					
8T SXL	D1 (20)	0 ^a	45,0 ^b	63,3 ^b	57,4 ^b	41,4
	D2 (30)	0 ^a	48,5 ^b	65,1 ^b	59,0 ^b	43,2
	D3 (40)	0 ^a	51,3 ^b	67,9 ^b	60,3 ^b	44,9
	Trung bình (B)	0^C	48,3^B	65,5^A	58,9^{AB}	
	<i>D: $p > 0,05$; B: $p > 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 15,4</i>					
12T SXL	D1 (20)	0 ^a	60,0 ^b	67,4 ^b	62,7 ^b	47,5
	D2 (30)	0 ^a	59,2 ^b	68,1 ^b	66,0 ^b	48,3
	D3 (40)	0 ^a	61,3 ^b	71,7 ^b	64,3 ^b	49,3
	Trung bình (B)	0^B	60,2^A	69,0^A	64,3^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,28</i>					
24T SXL	D1 (20)	0 ^a	57,5 ^b	66,9 ^b	67,8 ^b	48,1
	D2 (30)	0 ^a	64,1 ^b	73,6 ^b	68,5 ^b	51,6
	D3 (40)	0 ^a	65,6 ^b	73,1 ^b	70,5 ^b	52,3
	Trung bình (B)	0^B	62,4^A	71,2^A	68,9^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV = 13,72</i>					

Kết quả tính hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất trình bày trong bảng 3.26 cho thấy trung bình các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn có hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. cao

nhất. Hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 luôn khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp B1 cho đến thời điểm 8T SXL. Từ thời điểm 8T SXL, tuy trung bình hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) vẫn luôn cao nhất, rồi đến hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) và B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Lượng vi khuẩn xử lý cũng không có ảnh hưởng có ý nghĩa đến mật độ cũng như hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất. Tương tự, tương tác giữa hỗn hợp vi khuẩn và lượng vi khuẩn xử lý cũng ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đến các chỉ tiêu này trong suốt quá trình theo dõi thí nghiệm.

Bảng 3.26 cho thấy, hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất tăng vọt ở thời điểm 4T SXL so với 2T SXL, tăng từ 1,8 – 3,7 lần, với hiệu quả dao động trong khoảng 49,7 – 72,5%. Sau thời điểm này, hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất chỉ tăng rất nhẹ và đều không vượt quá 74%. So với ở vườn cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản, hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất ở vườn cà phê với kinh doanh thấp hơn một chút.

Tương tự như mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất, ở các thời điểm điều tra sau xử lý, mật độ *Meloidogyne* sp. trong rễ ở các công thức đối chứng cũng tăng dần theo thời gian điều tra (tăng 2,2 – 3,4 lần), trong khi lại giảm dần ở các công thức có xử lý vi khuẩn. Mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ ở các công thức xử lý vi khuẩn chỉ dao động trong khoảng 15,2 – 36,6 con/5 g rễ kể từ thời điểm 4T SXL. Ở tất cả các thời điểm điều tra sau xử lý, giữa các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn và các công thức đối chứng luôn có sự khác biệt có ý nghĩa về trung bình mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các hỗn hợp vi khuẩn khác nhau (bảng 3.27).

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến mật độ *Meloidogyne* sp. trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Mật độ <i>Meloidogyne</i> sp. trong rễ (con/5 g rễ)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
TXL	D1 (20)	27,0	39,3	39,0	37,0	35,6
	D2 (30)	40,3	37,0	39,7	38,0	38,8
	D3 (40)	31,0	34,0	35,3	25,7	31,5
	Trung bình (B)	32,8	36,8	38,0	33,6	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p > 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 32,5</i>					
4T SXL	D1 (20)	56,3 ^a	32,1 ^{bc}	27,5 ^c	32,7 ^{bc}	37,2
	D2 (30)	63,0 ^a	30,3 ^c	26,3 ^c	30,0 ^c	37,4
	D3 (40)	54,0 ^{ab}	27,3 ^c	27,3 ^c	20,0 ^c	32,2
	Trung bình (B)	57,8^A	29,9^B	27,0^B	27,6^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 34,8</i>					
8T SXL	D1 (20)	64,9 ^a	32,0 ^b	33,6 ^b	25,4 ^b	39,0
	D2 (30)	67,5 ^a	25,7 ^b	18,0 ^b	19,2 ^b	32,6
	D3 (40)	71,2 ^a	28,9 ^b	22,6 ^b	18,8 ^b	35,4
	Trung bình (B)	67,9^A	28,9^B	24,8^B	21,1^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV% = 24,2</i>					
12T SXL	D1 (20)	80,5 ^a	32,4 ^b	34,7 ^b	30,5 ^{bc}	44,5
	D2 (30)	72,8 ^a	25,6 ^{bc}	15,2 ^c	21,7 ^{bc}	33,9
	D3 (40)	73,1 ^a	27,3 ^{bc}	21,6 ^{bc}	15,2 ^c	34,3
	Trung bình (B)	75,5^A	28,5^B	23,9^B	22,5^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV = 21,6</i>					
24T SXL	D1 (20)	91,7 ^a	36,6 ^b	34,5 ^b	34,6 ^b	49,3
	D2 (30)	86,6 ^a	27,4 ^{bc}	17,5 ^c	24,0 ^{bc}	38,9
	D3 (40)	87,8 ^a	32,2 ^b	23,1 ^{bc}	17,8 ^c	40,2
	Trung bình (B)	88,7^A	32,1^B	25,0^B	25,5^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p < 0,05; CV = 17,5</i>					

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến hiệu quả diệt *Meloidogyne* sp. trong rễ cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Thời gian	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Hiệu quả diệt <i>Meloidogyne</i> sp. trong rễ (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2T SXL	D1 (20)	0	22,7	25,3	25,1	18,3
	D2 (30)	0	19,6	24,7	19,1	15,9
	D3 (40)	0	22,7	9,1	34,7	16,6
	Trung bình (B)	0^B	21,7^A	19,7^A	26,3^A	
	<i>D: p > 0,05 ; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 14,82</i>					
4T SXL	D1 (20)	0 ^d	66,4 ^{ab}	68,1 ^a	62,0 ^{abc}	49,1^A
	D2 (30)	0 ^d	52,1 ^{bc}	60,1 ^{abc}	47,6 ^c	40,0^B
	D3 (40)	0 ^d	53,3 ^{bc}	55,7 ^{abc}	52,8 ^{bc}	40,5^B
	Trung bình (B)	0^B	57,3^A	61,3^A	54,1^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p < 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 12,1</i>					
8T SXL	D1 (20)	0 ^c	64,9 ^{ab}	65,9 ^{ab}	72,3 ^{ab}	50,8
	D2 (30)	0 ^c	58,1 ^b	73,2 ^{ab}	68,7 ^{ab}	50,0
	D3 (40)	0 ^c	63,4 ^{ab}	74,1 ^a	64,3 ^{ab}	50,4
	Trung bình (B)	0^C	62,1^B	71,1^A	68,4^{AB}	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 11,6</i>					
12T SXL	D1 (20)	0 ^c	70,7 ^{ab}	70,6 ^{ab}	71,9 ^{ab}	53,3
	D2 (30)	0 ^c	60,9 ^b	77,5 ^a	68,8 ^{ab}	51,8
	D3 (40)	0 ^c	65,7 ^{ab}	76,0 ^a	74,6 ^{ab}	54,1
	Trung bình (B)	0^C	65,8^B	74,7^A	71,8^{AB}	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 10,7</i>					
24T SXL	D1 (20)	0 ^b	70,6 ^a	73,7 ^a	72,2 ^a	54,1
	D2 (30)	0 ^b	65,0 ^a	78,3 ^a	71,1 ^a	53,6
	D3 (40)	0 ^b	66,3 ^a	78,1 ^a	75,7 ^a	55,0
	Trung bình (B)	0^C	67,3^B	76,7^A	73,0^{AB}	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV = 10,7</i>					

Kết quả tính hiệu quả tiêu diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ được trình bày trong bảng 3.28. Kết quả cho thấy, ngay sau 2 tháng xử lý, các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh xử lý đã phát huy tác dụng làm giảm bớt mật số tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ. Tuy nhiên, hiệu quả ở thời điểm này rất thấp, chỉ dao động trong khoảng 9,1 – 34,7%. Tương tự như đối với hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong đất, hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ cũng tăng vọt ở thời điểm 4T SXL. Hiệu quả sau đó cũng chỉ duy trì dao động quanh mức 70% và không có công thức xử lý nào có hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. đạt mức 80%.

Bảng 3.28 cũng cho thấy, hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn có hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ cao nhất, tuy không khác biệt có ý nghĩa so với trung bình hỗn hợp B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) nhưng khác biệt có ý nghĩa so với trung bình hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17). Tuy nhiên, xét theo từng công thức riêng lẻ thì hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ ở tất cả các công thức có xử lý vi khuẩn đều không khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này có nghĩa tất cả các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn với các mức khác nhau đều có hiệu quả tương đương nhau đối với tuyến trùng *Meloidogyne* sp. trong rễ.

3.3.4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài đoạn cành dự trữ và số đốt trên đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kết quả theo dõi chỉ tiêu chiều dài đoạn cành dự trữ ở các công thức thí nghiệm theo thời gian được trình bày ở bảng 3.29 cho thấy chỉ tiêu này luôn biến động qua các năm. Trong năm đầu tiên tiến hành thí nghiệm (năm 2016), chiều dài đoạn cành dự trữ trung bình ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn đã cao hơn có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ so với ở các công thức đối chứng. Tuy nhiên, tại thời điểm này, không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các hỗn hợp cũng như giữa các mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn khác nhau. Một điểm đáng lưu ý là ở tất cả các thời điểm theo dõi, trung bình chiều dài đoạn cành dự trữ luôn cao nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn

B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), cao hơn so với trung bình ở các công thức đối chứng từ 15,6% (năm 2016) đến 24,8% (năm 2018).

Các mức huyền phù vi khuẩn xử lý cũng đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến chỉ tiêu chiều dài đoạn cành dự trữ ở năm thứ 3 sau xử lý (năm 2018), với chiều dài đoạn cành dự trữ tỷ lệ thuận với mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, mức độ tăng chiều dài cành không đáng kể giữa các mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn khác nhau. Kết quả còn cho thấy chiều dài đoạn cành dự trữ khi xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây không khác biệt có ý nghĩa so với khi xử lý ở mức 40 ml/cây.

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến chiều dài đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Chiều dài đoạn cành dự trữ (cm)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	36,6 ^d	39,9 ^{abcd}	42,2 ^{ab}	41,9 ^{ab}	40,2
	D2 (30)	37,0 ^{cd}	41,8 ^{ab}	44,1 ^a	43,2 ^a	41,5
	D3 (40)	37,8 ^{bcd}	40,1 ^{abcd}	42,5 ^{ab}	41,3 ^{abc}	40,4
	Trung bình (B)	37,1^B	40,6^A	42,9^A	42,2^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 6,0</i>					
2017	D1 (20)	36,9 ^b	42,3 ^{ab}	43,8 ^{ab}	41,1 ^{ab}	41,0
	D2 (30)	37,2 ^b	44,7 ^a	46,6 ^a	42,4 ^{ab}	42,7
	D3 (40)	37,3 ^b	46,9 ^a	46,2 ^a	42,4 ^{ab}	43,2
	Trung bình (B)	37,1^B	44,6^A	45,5^A	42,0^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 8,8</i>					
2018	D1 (20)	35,1 ^d	43,1 ^{bc}	43,6 ^{bc}	41,3 ^{bc}	40,8 ^B
	D2 (30)	37,8 ^{cd}	44,5 ^{ab}	46,1 ^{ab}	43,1 ^{abc}	42,9 ^{AB}
	D3 (40)	38,4 ^{cd}	45,5 ^{ab}	48,7 ^a	43,6 ^{abc}	44,1 ^A
	Trung bình (B)	37,1^C	44,4^{AB}	46,1^A	42,7^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 7,2</i>					

Bảng 3.29 cũng cho thấy tuy tương tác giữa các hỗn hợp và các mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê, tại thời điểm 3 năm sau xử lý (năm 2018), chiều dài đoạn cành dự trữ ở tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với ở tất cả các công thức đối chứng và các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn với mức 20 ml/cây. Tại thời điểm này, chiều dài đoạn cành dự trữ ở tổ hợp B2D3 (CT9) cao hơn 26,8% so với ở tổ hợp công thức đối chứng tương ứng (CT3). Tiếp đến là các tổ hợp công thức B2D2 (CT8: 30 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B1D3 (CT6: 40 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), với chiều dài đoạn cành dự trữ cao hơn 22,0% và 18,5% so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Như vậy, có thể nói các hỗn hợp vi khuẩn áp dụng trong thí nghiệm đã ảnh hưởng tích cực, làm tăng chiều dài đoạn cành dự trữ trên cây cà phê với giai đoạn kinh doanh. Khả năng hạn chế mật độ tuyến trùng kí sinh gây hại cũng như khả năng tăng cường hấp thu N và P, tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá cũng như sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 từ đó giúp cây tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng có thể là nguyên nhân của hiện tượng này. Đoạn cành dự trữ dài và khỏe mạnh là cơ sở để cây cà phê cho năng suất cao ở năm sau do cây cà phê vối có đặc điểm là hoa chỉ phát triển một lần trên các cành tơ được hình thành từ năm trước. Sự sinh trưởng của đoạn cành dự trữ phụ thuộc rất lớn vào chế độ chăm sóc, đặc biệt là lượng phân bón cho cây năm trước để tạo và nuôi một lượng cành dự trữ nhất định.

Kết quả trình bày trong bảng 3.30 cũng cho thấy các hỗn hợp vi khuẩn nội sinh cũng đã ảnh hưởng đến số đốt trên đoạn cành dự trữ của cà phê với giai đoạn kinh doanh từ năm thứ 2 sau khi xử lý. Điều này thể hiện ở số đốt trên đoạn cành dự trữ của các công thức xử lý vi khuẩn luôn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ so với ở các công thức đối chứng kể từ năm 2017. Số đốt trên đoạn cành dự trữ trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp các huyền phù vi khuẩn nội sinh cao hơn so với ở các công thức đối chứng từ 9,0% (hỗn hợp B3: *B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4, năm 2017) đến 22,3% (hỗn hợp B1: *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17, năm

2018). Một điểm đáng lưu ý khác là số đốt trên đoạn cành dự trữ trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) luôn cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với ở trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4).

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số đốt trên đoạn cành dự trữ của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số đốt trên đoạn cành dự trữ (đốt/cành)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	8,1	7,5	8	8,6	8,1
	D2 (30)	8,1	8,3	8,3	8,6	8,3
	D3 (40)	7,4	8,7	7,5	7,8	7,9
	Trung bình (B)	7,9	8,2	7,9	8,3	
	<i>Các trung bình không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p > 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 7,03</i>					
2017	D1 (20)	7,8 ^d	8,8 ^{abc}	8,5 ^{abcd}	8,7 ^{abcd}	8,5
	D2 (30)	7,8 ^d	9,2 ^{ab}	9,2 ^{ab}	8,5 ^{abcd}	8,7
	D3 (40)	8,0 ^{cd}	9,5 ^a	9,3 ^{ab}	8,5 ^{bcd}	8,8
	Trung bình (B)	7,9^C	9,2^A	9,0^{AB}	8,6^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 15,9</i>					
2018	D1 (20)	7,7 ^d	8,6 ^c	8,7 ^c	8,9 ^{ab}	8,5^B
	D2 (30)	7,7 ^d	9,8 ^a	9,5 ^{ab}	8,9 ^{ab}	9,0^A
	D3 (40)	7,6 ^d	9,7 ^{ab}	9,8 ^a	8,8 ^{bc}	9,0^A
	Trung bình (B)	7,7^C	9,4^A	9,3^{AB}	8,9^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 15,15</i>					

Mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn chỉ có ảnh hưởng đến chỉ tiêu số đốt trên đoạn cành dự trữ ở thời điểm năm 2018 với số đốt trên đoạn cành dự trữ tỷ lệ thuận với mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa mức 30 ml/cây và mức 40 ml/cây. Cũng giống như đối với các chỉ tiêu theo dõi khác, tương tác giữa các hỗn hợp và các mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý không ảnh hưởng có ý nghĩa đến số đốt trên đoạn cành dự trữ ở tất cả

các thời điểm theo dõi. Tuy nhiên, có thể dễ dàng nhận thấy, các tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4), B1D2 (CT5: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17), B1D3 (CT6: 40 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2D2 (CT8: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có số đốt trên đoạn cành dự trữ cao nhất, lần lượt cao hơn 28,6%, 27,7%, 26,5% và 23% so với ở các công thức đối chứng tương ứng. Số đốt trên đoạn cành dự trữ càng cao, khả năng cây cho quả càng nhiều. Điều này đặc biệt có ý nghĩa đối với năng suất vườn cây cà phê với giai đoạn kinh doanh.

3.3.5. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến một số chỉ tiêu cấu thành năng suất nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh

3.3.5.1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số quả/chùm của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kết quả theo dõi số quả cà phê trên chùm quả cho thấy hỗn hợp các chủng vi khuẩn nội sinh xử lý đã ảnh hưởng đến chỉ tiêu này, thể hiện ở số quả/chùm trung bình ở các công thức xử lý vi khuẩn đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ so với các công thức đối chứng ở cả 3 năm theo dõi (bảng 3.31). Tuy nhiên, không có sự sai khác có ý nghĩa giữa các hỗn hợp cũng như các mức huyền phù vi khuẩn xử lý. Điều này có nghĩa, các hỗn hợp vi khuẩn xử lý có ảnh hưởng tương đương nhau đến số quả/chùm.

Tuy tương tác giữa các hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý không có ý nghĩa thống kê và số quả/chùm giữa các công thức xử lý vi khuẩn cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa, tỷ lệ tăng số quả trên chùm so với năm xử lý đầu tiên (năm 2016) cao nhất ở các công thức xử lý hỗn hợp B1 rồi đến B2 nhưng hầu như không tăng ở các công thức xử lý hỗn hợp B3. Tỷ lệ tăng số quả/chùm cao nhất so với năm 2016 lần lượt theo thứ tự ở các tổ hợp công thức B1D2 (CT5: 20,2%), B1D1 (CT4: 17,6%), B1D3 (CT6: 15,7%) và B2D3 (CT9: 11,7%). Trong năm 2018, số quả/chùm trung bình cao nhất lần lượt theo thứ tự là ở các tổ hợp công thức B3D3 (CT12), B2D3 (CT9), B3D2 (CT11), B1D3 (CT6). Số quả/chùm trung bình ở các công thức

này lần lượt cao hơn 28,3%, 26,7%, 30,7% và 24,8% so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến số quả trên chùm của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Số quả trên chùm (quả/chùm)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	15,30 ^c	18,05 ^{abc}	19,85 ^{abc}	19,49 ^{abc}	18,17
	D2 (30)	16,68 ^{bc}	17,64 ^{abc}	21,73 ^{ab}	22,39 ^a	19,61
	D3 (40)	16,26 ^{bc}	19,05 ^{abc}	20,04 ^{abc}	22,83 ^a	19,55
	Trung bình (B)	16,08^C	18,25^B	20,54^A	21,57^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV =</i>					
2017	D1 (20)	16,90 ^c	20,53 ^b	20,56 ^b	20,25 ^b	19,56
	D2 (30)	17,69 ^c	20,96 ^{ab}	21,83 ^{ab}	22,76 ^{ab}	20,81
	D3 (40)	17,34 ^c	21,17 ^{ab}	21,66 ^{ab}	23,54 ^a	20,93
	Trung bình (B)	17,31^B	20,89^A	21,35^A	22,18^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 17,0</i>					
2018	D1 (20)	16,84 ^b	21,23 ^a	21,62 ^a	20,62 ^a	20,08
	D2 (30)	17,10 ^b	21,20 ^a	21,89 ^a	22,35 ^a	20,64
	D3 (40)	17,67 ^b	22,05 ^a	22,39 ^a	22,67 ^a	21,19
	Trung bình (B)	17,20^B	21,49^A	21,97^A	21,88^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; D*B: $p > 0,05$; CV = 18,1</i>					

Tăng số quả/chùm là tiền đề để tăng năng suất thu hoạch được. Khả năng làm tăng số quả/chùm của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh của các vi khuẩn trong nghiên cứu này cũng tương tự như vai trò của hỗn hợp vi khuẩn *B. cereus* và *B. subtilis* đối với số lượng quả ớt trong nghiên cứu của Zhou *et al.* (2014) [223]. Số lượng quả ớt trong nghiên cứu này đã tăng từ 3,5 – 22,6% so với đối chứng. Khi được xử lý bằng hỗn hợp vi khuẩn *Bradyrhizobium japonicum* 526 và *Bacillus* sp. Q10, số lượng quả đậu tương/cây đã tăng 36,4% so với khi xử lý chỉ vi khuẩn *Bradyrhizobium japonicum* (Ilić *et al.*, 2017) [100]. Số lượng hạt lúa mỳ/gié trong nghiên cứu của

Hassan *et al.* (2018) [95] cũng đã tăng 35,0 – 47,2% khi được xử lý bằng huyền phù vi khuẩn *B. cereus*.

3.3.5.2. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ tươi : nhân trong vườn cà phê với giai đoạn kinh doanh

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ tươi : nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Tỷ lệ tươi : nhân				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	5,10 ^a	4,86 ^{abc}	4,87 ^{abc}	4,83 ^{abc}	4,91
	D2 (30)	5,17 ^a	4,93 ^{abc}	4,67 ^{bc}	4,60 ^c	4,84
	D3 (40)	5,03 ^{ab}	4,82 ^{abc}	4,86 ^{abc}	4,79 ^{abc}	4,87
	Trung bình (B)	5,10^A	4,87^B	4,80^B	4,74^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 14,4</i>					
2017	D1 (20)	5,03 ^a	4,70 ^{cd}	4,79 ^{bc}	4,75 ^{cd}	4,82
	D2 (30)	5,02 ^a	4,56 ^{de}	4,73 ^{cd}	4,80 ^{bc}	4,78
	D3 (40)	4,97 ^{ab}	4,84 ^{abc}	4,48 ^e	4,73 ^{cd}	4,76
	Trung bình (B)	5,01^A	4,70^B	4,67^B	4,76^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 12,3</i>					
2018	D1 (20)	5,02 ^a	4,64 ^{cde}	4,78 ^{bc}	4,74 ^{cd}	4,79
	D2 (30)	5,02 ^a	4,54 ^{de}	4,75 ^{bcd}	4,85 ^{abc}	4,79
	D3 (40)	4,95 ^{ab}	4,73 ^{cde}	4,51 ^e	4,71 ^{cde}	4,73
	Trung bình (B)	5,00^A	4,64^C	4,68^{BC}	4,77^B	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: p > 0,05; B: p < 0,05; tương tác D*B: p > 0,05; CV% = 12,4</i>					

Tỷ lệ tươi/nhân là một trong những chỉ tiêu quan trọng quyết định đến năng suất cà phê nhân. Với cùng một loại giống và tuổi cây cà phê, tỷ lệ này thường được quyết định bởi chế độ dinh dưỡng. Tỷ lệ tươi/nhân càng thấp, năng suất cà phê nhân càng cao và ngược lại.

Số liệu trình bày trong bảng 3.32 cho thấy các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý đã có ảnh hưởng đến tỷ lệ tươi/nhân của các công thức thí nghiệm ngay trong năm đầu tiên xử lý hỗn hợp các huyền phù vi khuẩn (năm 2016). Với cùng chế độ phân bón như nhau, tỷ lệ tươi/nhân ở các công thức xử lý huyền phù vi khuẩn nội sinh đã giảm một cách có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với ở các công thức đối chứng. Kết quả năm 2018, tỷ lệ tươi/nhân trung bình ở các công thức đối chứng đều trên 4,95 trong khi ở các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh, tỷ lệ này cao nhất chỉ ở mức 4,85 (B3D2: CT11) và thấp nhất là 4,51 (B2D3: CT9). Tương tự như đối với các chỉ tiêu theo dõi khác, mặc dù có sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh so với các công thức đối chứng, sự khác biệt giữa các công thức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn là không có ý nghĩa về mặt thống kê. Sự thay đổi lượng huyền phù vi khuẩn xử lý cũng không đem lại sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$. Do đó, tương tác giữa các hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý cũng không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, bảng 3.32 cũng cho thấy, các tổ hợp công thức B2D3 (CT9: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B1D2 (CT5: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) có tỷ lệ tươi: nhân thấp nhất, lần lượt đạt 4,51 và 4,54 và khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức đối chứng tương ứng.

3.3.5.3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến năng suất cà phê nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh

Kết quả trình bày trong bảng 3.33 cho thấy các vi khuẩn nội sinh đã ảnh hưởng tích cực đến năng suất cà phê nhân, với năng suất cà phê nhân trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) luôn cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với hỗn hợp vi khuẩn B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) trong suốt 3 năm theo dõi. Năng suất trung bình ở các công thức xử lý hỗn hợp vi khuẩn B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) cao hơn từ 12,0% (năm 2016) đến 21,1% (năm 2017) so với ở các công thức đối chứng B0 (không xử lý vi khuẩn). Các mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn khác nhau chưa ảnh hưởng có ý nghĩa đến năng suất nhân cà phê với. Tương tự, tương tác giữa các

hỗn hợp và mức huyền phù vi khuẩn xử lý cũng không ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến chỉ tiêu này. Mặc dù không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức xử lý vi khuẩn, các tổ hợp B2D3 (CT9: 40 ml *B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B1D2 (CT5: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) luôn có năng suất cao nhất trong 2 năm 2017 và 2018, cao hơn so với ở các công thức đối chứng tương ứng lần lượt là 23,7%, 24,0% (năm 2017) và 20,9%, 19,6% (năm 2018).

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến năng suất nhân cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Năng suất cà phê nhân (tấn nhân/ha)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	2,78 ^c	3,07 ^{ab}	3,13 ^a	3,02 ^{abc}	3,00
	D2 (30)	2,79 ^c	3,17 ^a	3,20 ^a	3,19 ^a	3,09
	D3 (40)	2,83 ^{bc}	3,10 ^{ab}	3,08 ^{ab}	3,09 ^{ab}	3,03
	Trung bình (B)	2,80^B	3,11^A	3,14^A	3,10^A	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,9					
2017	D1 (20)	2,70 ^e	3,20 ^{bcd}	3,25 ^{abc}	3,04 ^d	3,05
	D2 (30)	2,71 ^e	3,36 ^{ab}	3,23 ^{abc}	3,10 ^{cd}	3,10
	D3 (40)	2,74 ^e	3,21 ^{bcd}	3,39 ^a	3,14 ^d	3,12
	Trung bình (B)	2,71^C	3,26^A	3,29^A	3,09^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p < 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 13,0					
2018	D1 (20)	2,76 ^b	3,21 ^a	3,25 ^a	3,10 ^a	3,08
	D2 (30)	2,70 ^b	3,23 ^a	3,25 ^a	3,15 ^a	3,08
	D3 (40)	2,77 ^b	3,18 ^a	3,35 ^a	3,12 ^a	3,10
	Trung bình (B)	2,74^C	3,21^{AB}	3,28^A	3,12^B	
	Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 14,1					

Kết quả này cho thấy, việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này đã tiết kiệm được ít nhất 25% lượng phân đạm và 25% lượng phân lân hóa học bón cho cây cà phê với giai đoạn kinh doanh.

Kết quả trên cũng tương đồng với nhiều kết quả nghiên cứu trước đây về vai trò của các chủng vi khuẩn *Bacillus* trong việc gia tăng năng suất thu hoạch một số loại cây trồng. Các vi khuẩn này có thể gia tăng năng suất khi được sử dụng riêng lẻ cũng như khi kết hợp với một số vi khuẩn khác. Chủng nhiễm *B. cereus* vào hạt ngô, đậu gà và lúa mỳ đã làm tăng năng suất thu hoạch của các loại cây này lần lượt là 43,8%, 38,1% và 38,6% (Tilak and Reddy, 2006) [200]. *B. subtilis* cũng được ghi nhận đã làm tăng năng suất yến mạch 33% và cà rốt 48% (Merriman *et al.*, 1974) [137]. Năng suất ớt đã tăng từ 1,7% đến 23,9% tùy vào mức xử lý hỗn hợp vi khuẩn *B. cereus* và *B. subtilis*, với mức tăng năng suất tỷ lệ thuận với lượng vi khuẩn áp dụng (Zhou *et al.*, 2014) [223]. Năng suất ớt thậm chí tăng đến 58,2% nếu kết hợp cả hai phương pháp xử lý huyền phù vi khuẩn là xử lý hạt giống và tưới vào đất (Zhou *et al.*, 2014) [223]. Năng suất cây đậu phụng tăng 6 - 16% (Jaks *et al.*, 1985) [103], 3,5 - 37% (Turner and Backman, 1991) [201]. Xử lý kết hợp nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* (*Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. erythropolis*, *B. pumilus* và *P. rubiacearum*) trên nền 50% phân bón hóa học theo khuyến cáo cho cây xà lách, năng suất thu hoạch tăng 25% và như vậy đã tiết kiệm được ít nhất 50% lượng phân hóa học (Young *et al.*, 2003) [218].

Năng suất thu hoạch tăng được cho là bởi các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng trực tiếp hay gián tiếp (Broadbent *et al.*, 1977) [55]. Cơ chế của hiện tượng này là do các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sản sinh một số kích thích tố thực vật, cố định đạm sinh học, phân giải lân khó tan, kích kháng hệ thống, tiết ra một số kháng sinh giúp cây gia tăng khả năng đối kháng với các tác nhân gây hại, từ đó, giúp cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn, dẫn đến tăng năng suất thu hoạch.

Văn Thị Phương Như (2015) [21] cho biết xử lý vi khuẩn nội sinh *Bacillus subtilis* TAL4 đã tiết kiệm được 50% lượng phân lân vô cơ (tương đương 40 kg P₂O₅/ha) nhưng vẫn đảm bảo về năng suất và cải thiện chất lượng gạo do chủng vi khuẩn này có khả năng hòa tan lân khó tan thành dễ tan để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng và phát triển cho cây lúa. Tác giả này cũng kết luận việc bổ sung kết hợp 2

dòng vi khuẩn *Azospirillum amazonense* SHL70 và *Bacillus subtilis* TAL4 lên cây lúa cho hiệu quả cố định đạm và hòa tan lân khó tan cao hơn khi bổ sung riêng rẽ từng dòng cho cây lúa.

Các kết quả nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Mỹ (2012) [17], Trương Vĩnh Thới (2012) [27] và Ngô Văn Anh và cs.(2017) [1] trong điều kiện in vitro cho thấy các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 sử dụng trong nghiên cứu này đều có khả năng cố định đạm sinh học và phân giải lân khó tan. Ngoài ra, các kết quả trình bày trong các biểu đồ 3.1, bảng 3.6 và bảng 3.19 ở trên cũng cho thấy các chủng vi khuẩn này khi sử dụng riêng lẻ hay hỗn hợp với nhau đều giúp cây cà phê với ở các giai đoạn sinh trưởng tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng N và P, tăng hàm lượng diệp lục tố. Thêm vào đó, mật độ tuyến trùng kí sinh hại rễ cà phê ở các công thức có xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn cũng giảm đáng kể, với hiệu quả diệt các tuyến trùng kí sinh dao động trong khoảng 70 – 80%. Do đó, sinh trưởng của cây được tăng cường, dẫn đến năng suất thu hoạch vẫn tăng trong khi giảm một phần lượng phân bón hóa học bón cho cây.

3.3.6. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến đến tỷ lệ nhân cà phê đạt tiêu chuẩn xuất khẩu

Kích cỡ nhân hạt cà phê trên sàng là một trong những chỉ tiêu rất quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng cà phê, góp phần nâng cao giá trị cà phê xuất khẩu, do đó, ảnh hưởng đến giá bán của sản phẩm. Kết quả theo dõi tỷ lệ hạt cà phê nhân trên sàng 16 (hạng 1) cho thấy, việc xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn ở các mức khác nhau đã ảnh hưởng có ý nghĩa đến chỉ tiêu này (Bảng 3.34).

Bảng 3.34 cho thấy ngay từ năm đầu tiên xử lý các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn nội sinh, tỷ lệ nhân trên sàng 16 trung bình ở các công thức xử lý các hỗn hợp vi khuẩn đã cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với trung bình các công thức đối chứng. Tỷ lệ nhân trên sàng 16 trung bình ở các công thức xử lý các hỗn hợp B1, B2 và B3 đã lần lượt cao hơn 38,3%, 36,4% và 34,1% so với ở trung bình các công thức đối

chúng. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa trung bình các hỗn hợp vi khuẩn không có ý nghĩa thống kê trong suốt 3 năm thu hoạch.

Bảng 3.33. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh đến tỷ lệ nhân trên sàng 16 của cà phê với giai đoạn kinh doanh

Năm	Lượng huyền phù vi khuẩn D (ml/cây)	Tỷ lệ nhân trên sàng 16 (%)				
		Hỗn hợp vi khuẩn (B)				Trung bình (D)
		B0 (Đ/C)	B1	B2	B3	
2016	D1 (20)	26,0 ^d	32,5 ^{abc}	33,0 ^{ab}	31,7 ^{bcd}	30,8 ^B
	D2 (30)	25,9 ^d	37,6 ^{ab}	37,5 ^{ab}	39,1 ^a	35,0 ^A
	D3 (40)	26,4 ^{cd}	38,3 ^{ab}	36,2 ^{ab}	34,1 ^{ab}	33,8 ^A
	Trung bình (B)	26,1^B	36,1^A	35,6^A	35,0^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 10,01</i>					
2017	D1 (20)	24,9 ^c	36,4 ^{ab}	33,3 ^b	35,4 ^{ab}	32,5 ^B
	D2 (30)	25,0 ^c	39,2 ^a	36,4 ^{ab}	38,5 ^a	34,8 ^A
	D3 (40)	27,3 ^c	38,0 ^a	37,1 ^{ab}	38,3 ^a	35,2 ^A
	Trung bình (B)	25,7^B	37,8^A	35,6^A	37,4^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 6,9</i>					
2018	D1 (20)	24,7 ^c	37,7 ^{ab}	34,1 ^b	36,3 ^{ab}	33,2 ^B
	D2 (30)	25,0 ^c	39,5 ^a	36,7 ^{ab}	39,1 ^a	35,0 ^A
	D3 (40)	27,2 ^c	39,0 ^a	37,2 ^{ab}	38,9 ^a	35,6 ^A
	Trung bình (B)	25,6^B	38,7^A	36,0^A	38,1^A	
	<i>Các trung bình có cùng kí tự không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất với D: $p > 0,05$; B: $p < 0,05$; tương tác D*B: $p > 0,05$; CV% = 6,19</i>					

Các mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý cũng đã có ảnh hưởng khác biệt đến tỷ lệ nhân trên sàng 16, với tỷ lệ nhân trên sàng 16 tỷ lệ thuận với mức hỗn hợp huyền phù vi khuẩn xử lý. Tuy nhiên, xử lý hỗn hợp huyền phù vi khuẩn ở mức 30 ml/cây cho hiệu quả tương đương khi xử lý ở mức 40 ml/cây. Tuy tương tác giữa các hỗn hợp và mức xử lý không có ý nghĩa thống kê, tổ hợp các công thức B1D2 (CT5: 30 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B1D3 (CT6: 40 ml *B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) luôn có tỷ lệ nhân trên sàng 16 cao nhất, dao động trong khoảng 38 -

39,5% ở vụ thu hoạch thứ 2 (năm 2017) và thứ 3 (năm 2018). Tỷ lệ này tương đương với ở công thức bón phân hóa học với lượng 312 kg N + 95 kg P₂O₅% + 288 kg K₂O trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Minh (2014) [16].

B. subtilis, *B. pumilus* và *B. cereus* những vi khuẩn Gram dương rất phổ biến, không độc và không gây hại cho người, động vật và môi trường (Huang *et al.*, 2011 [99], Janarthine *et al.*, 2010 [104], de-Bashan *et al.*, 2010 [66]). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *B. subtilis*, *B. pumilus* và *B. cereus* có quan hệ mật thiết với thực vật, có khả năng kích thích sinh trưởng phát triển cây trồng nhờ sản sinh các kích thích tố thực vật, gia tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng và bảo vệ cây khỏi một số tác nhân gây hại (Oliveira *et al.*, 2014 [154], Ramezani *et al.*, 2014 [167], Ha *et al.*, 2008 [87], Murugappan *et al.*, 2013 [148]). Ngoài ra, chúng là những vi khuẩn có khả năng hình thành bào tử nên dễ nhân sinh khối, dễ dàng được sản xuất dưới dạng bột, bột thấm nước trong khi vẫn giữ duy trì được khả năng sống vì chúng có thể sống tiềm sinh trong thời gian dài khi gặp điều kiện ngoại cảnh bất lợi (Turner and Backman, 1991) [201]. *B. subtilis* đã được sản xuất thương mại bởi Gustafson, Inc. (Dallas, TX) lần đầu vào năm 1983 và kể từ đó đã được sử dụng rộng rãi cho lạc, bông vải và các loại đậu thông thường khác (Turner and Backman, 1991) [201].

Kết quả của nghiên cứu này khẳng định thêm rằng *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 còn có khả năng hạn chế mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. cũng như thúc đẩy sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với trồng trên đất đỏ bazan tại Buôn Ma Thuột.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận:

1. Trong số 9 chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây cà phê thí nghiệm, các chủng *Bacillus cereus* M15, *B. subtilis* EK17, *B. pumilus* BMT4 có khả năng kích thích sinh trưởng cây con cà phê với hiệu quả nhất trong điều kiện vườn ươm: tăng hàm lượng diệp lục tố trong lá từ 13,8 - 39,4%; hàm lượng N% trong lá tăng 10,3 - 20,9%; P% trong lá tăng 77,8 - 111,1%; chiều cao cây tăng từ 17,5 – 51,2%; đường kính gốc tăng 25,6 - 27,8%; khối lượng cây tươi tăng 60,5 - 117,4%; khối lượng rễ tươi tăng 218,5 - 235,1%; chiều dài rễ tăng đến 24,6% so với công thức đối chứng ĐC.

2. Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá cà phê: hàm lượng N tăng 9,1 – 27,7%, hàm lượng P tăng đến 18,2%. Khả năng sinh trưởng của cây cà phê với tái canh giai đoạn kiến thiết cơ bản tốt nhất khi xử lý các hỗn hợp này ở mức 20 – 30 ml huyền phù vi khuẩn/cây (4 đợt/năm). Chiều cao cây tăng 11,9 – 19,9%; đường kính gốc tăng 20,2 – 33,0%; số cặp cành cơ bản tăng 3,4 – 18,4%.

3. Hỗn hợp B1 (*B. cereus* M15 + *B. subtilis* EK17) và B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) đã ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng các sắc tố quang hợp, khả năng hấp thu dinh dưỡng N, P trong lá; thúc đẩy sinh trưởng, phát triển của cây cà phê với giai đoạn kinh doanh. Kết quả đã làm tăng 14,8 – 20,9% năng suất cây cà phê so với đối chứng bón phân hóa học 100% theo qui trình).

4. Hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi xử lý ở mức 20 – 30 ml/cây có khả năng hạn chế đến hơn 80% mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kiến thiết cơ bản.

5. Hỗn hợp B2 (*B. subtilis* EK17+ *B. pumilus* BMT4) và B3 (*B. cereus* M15 + *B. pumilus* BMT4) khi xử lý ở mức 30 – 40 ml/cây có khả năng hạn chế đến khoảng

70% mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* sp. và *Pratylenchus* sp. trong vườn cà phê với giai đoạn kinh doanh.

2. Kiến nghị

1. Các chủng vi khuẩn *B. cereus* M15, *B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT4 rất có tiềm năng để ứng dụng trong sản xuất cà phê bền vững, giảm lượng phân bón cũng như thuốc bảo vệ thực vật. Do đó, cần nghiên cứu các điều kiện thích hợp để phát triển chế phẩm sinh học làm vật liệu để khảo nghiệm trên cây cà phê.

2. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế thúc đẩy sinh trưởng, phát triển cây cà phê và hạn chế tuyến trùng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

3. Nghiên cứu thử nghiệm ảnh hưởng của các hỗn hợp huyền phù vi khuẩn đến khả năng thúc đẩy sinh trưởng, phát triển và hạn chế các tác nhân gây hại khác trên một số cây trồng quan trọng của vùng Tây Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

A. Tài liệu tiếng Việt

1. Ngô Văn Anh, Nguyễn Anh Dũng và Trần Trung Dũng (2017), "Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây cà phê (*Coffea canephora* Pierre var. *robusta*) có hoạt tính cố định đạm và sinh tổng hợp Indole Acetic Acid (IAA) tại Đắk Lắk", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Tây Nguyên*. 23: 59-64.
2. Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn (2001), Tiêu chuẩn ngành 10TCN 453-2001: Phân tích cây trồng - Phương pháp phân tích Photpho tổng số.
3. Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn (2001), Tiêu chuẩn ngành 10TCN 451-2001: Phân tích cây trồng - Phương pháp phân tích Nitơ tổng số.
4. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2016), Quy trình Tái canh cây cà phê vối.
5. Nguyễn Tri Chiêm (1993), *Chẩn đoán nhu cầu dinh dưỡng khoáng cho cây cà phê để có cơ sở bón phân hợp lý*, Kết quả 10 năm nghiên cứu khoa học 1983-1994, Viện nghiên cứu Cà phê, 298-312.
6. Cao Ngọc Diệp (2005), "Hiệu quả của chủng vi khuẩn nốt rễ (*Sinorhizobium fredii*) và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. trên đậu nành", *Tạp chí Khoa học Cần Thơ*, Số 3: 40-48
7. Cao Ngọc Diệp (2010), *Vi khuẩn nội sinh thực vật*, NXB Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
8. Cao Ngọc Diệp và Bùi Thị Kiều Oanh (2006), "Hiệu quả vi khuẩn *Pseudomonas* spp. trên năng suất và trữ lượng đường trong cây mía đường (*Saccharum officinarum* L. giống VDNL-7) trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An", *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, Số 6: 69-76
9. Cao Ngọc Diệp và Phan Văn Tùng (2010), "Hiệu quả của vi khuẩn có ích trên cây lúa cao sản trồng trên đất phù sa huyện Bình Tân, Tỉnh Vĩnh Long", *Tạp chí Khoa học Đất*, Số 34: 79-83.
10. Nguyễn Văn Đước và Cao Ngọc Diệp (2004), "Hiệu quả của phân lân sinh học trên đậu nành và bắp lai trồng trên đất phù sa huyện Tân Hiệp, tỉnh Kiên Giang", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, Số 1: 105-111.
11. Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp (2009), "Phân lập và đặc tính các dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. Số 7(2): 241-250.
12. Nguyễn Hữu Hiệp (2007), *Cố định đạm sinh học*, Viện nghiên cứu và phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
13. Trương Hồng, Đào Hữu Hiền, Nguyễn Quốc Tín và cs. (2000), "Hàm lượng dinh dưỡng trong đất và lá cà phê các vườn năng suất cao ở Đắk Lắk", *Tạp chí Khoa học đất*, Số 13/2000.

14. Trương Hồng, Đinh Thị Nhã Trúc và Nguyễn Xuân Hòa (2013), “Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật tổng hợp tiết kiệm chi phí đầu vào đối với cà phê ở Tây Nguyên”, *Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ nhất*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội: 914-922.
15. Nguyễn Thị Lại và Đỗ Thị Mỹ Hiền (2019), "Thách thức trong xuất khẩu cà phê tại Việt Nam hiện nay", *Tạp chí Công thương*, Số 9: 85-89.
16. Nguyễn Văn Minh (2014), *Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật bón phân cho cà phê vối (Coffea canephora Pierre) giai đoạn kinh doanh trên đất bazan tại Đắk Lắk*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.
17. Nguyễn Ngọc Mỹ (2012), *Nghiên cứu, phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ cây cà phê chè (Coffea arabica) ở Tây Nguyên*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Đại học Tây Nguyên.
18. Đoàn Triệu Nhạn (1982), "Nghiên cứu áp dụng phương pháp chẩn đoán lá đề xác định nhu cầu dinh dưỡng khoáng của cây cà phê ở Tây Nguyên", *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp*, Số 3: 110-114.
19. Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), "Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, Số 18a: 161-167
20. Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Nguyễn Minh Đồi, Trần Nguyễn Nhật Khoa và Thái Trần Phương Minh (2013), "Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. Số 27 (Phần B): 24-31
21. Văn Thị Phương Như (2015), *Phân lập và khảo sát các đặc tính của vi khuẩn nội sinh trong cây lúa trồng trên đất ở tỉnh Phú Yên*, Luận án Tiến sĩ Vi sinh vật, Trường Đại học Cần Thơ.
22. Trần Thanh Phong (2012), *Đánh giá khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh đến năng suất và chất lượng của trái khóm trồng tại huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.
23. Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Trần Văn Huy, Nguyễn Thu Hà, Lê Văn Trịnh, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Minh Thắng và Phùng Quang Tùng (2016), “Nghiên cứu sản xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học SH-BV1 phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê ở Gia Lai và Đắk Nông”, *Hội thảo quốc gia về Khoa học cây trồng lần 2*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Cần Thơ: 960-965.
24. Nguyễn Văn Sanh (2009), *Nghiên cứu xây dựng thang dinh dưỡng khoáng trên lá và bước đầu thử nghiệm bón phân theo chẩn đoán dinh dưỡng cho cà phê vối kinh doanh tại Dak Lak*, Luận án Tiến sĩ nông nghiệp, Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội, Hà Nội.

25. Phan Văn Tân và Nguyễn Văn Thái (2000), *Tìm hệ số K bằng thực nghiệm để tính diện tích lá cà phê vối*, Kết quả nghiên cứu khoa học, Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội, Quyền IV: 47-48.
26. Hoàng Minh Tân, Nguyễn Quang Thạch và Vũ Quang Sáng (2006), *Giáo trình Sinh lý thực vật*, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
27. Trương Vĩnh Thới (2012), *Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ cây cà phê vối (Coffea canephora Pierre var. robusta) ở Đắk Lắk*, Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk.
28. Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk (2013), *Báo cáo Đề án tiếp tục phát triển cà phê bền vững tỉnh Đắk Lắk đến năm 2020, tầm nhìn 2030*, Đắk Lắk.

B. Tài liệu tiếng Anh

29. Adesemoye, A. O., Obini, M. and Ugoji, E. O. (2008), "Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 39(3): 423-426.
30. Adhikari, Tika B., Joseph, C. M., Yang, Guoping, Phillips, Donald A. and Nelson, Louise M. (2001), "Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 47(10): 916-924.
31. Agbenin, N. O., Emechebe, A. M. and Marley, P. S. (2004), "Evaluation of neem seed powder for *Fusarium* wilt and *Meloidogyne* control on tomato", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, Vol. 37(4): 319-326.
32. Ahmadian, G., Degraasi, G., Venturi, V., Zeigler, D. R., Soudi, M. and Zanguinejad, P. (2007), "*Bacillus pumilus* SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 103: 1081-1089.
33. Ait Barka, Essaid, Gognies, Sabine, Nowak, Jerzy, Audran, Jean-Claude and Belarbi, Abdel (2002), "Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth", *Biological Control*, Vol. 24(2): 135-142.
34. Antoun, Hani, Beauchamp, Chantal J., Goussard, Nadia, Chabot, Rock and Lalande, Roger (1998), "Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.)", *Plant and Soil*, Vol. 204(1): 57-67.
35. Araújo, Fabio Fernando, Henning, Ademir Assis and Hungria, Mariangela (2005), "Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 21(8): 1639-1645.
36. Asraful, S.M., Math, R.K. and Kim, J.M. (2010), "Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities", *Curr Microbiol.*, Vol. 61(4): 346-356.
37. Asyiah, Iis Nur, Wiryadiputra, Soekadar, Irfan, Fauzi and Soekadar, Wiryadiputra (2015), "Population of *Pratylenchus coffeae* (Z.) and growth of

- Arabica coffee seedling inoculated by *Pseudomonas diminuta* L. and *Bacillus subtilis* (C.)", *Pelita Perkebunan*, Vol. 31(1): 30-40.
38. Backman, P.A., Wilson, M. and Murphy, J.F. (1997), "Bacteria for biological control of plant diseases", in Rechcigl, Nancy A. and Rechcigl, Jack E., Editors, *Environmentally safe approaches to crop disease control*, CRC Press, Boca Raton.
 39. Bacon, Charles W. and White, James F. (2000), *Microbial endophytes*, Marcel Dekker, New York.
 40. Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, Ik-Young and Holmes, K. A. (2006), "Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species", *Planta*, Vol. 224(6): 1449-1464.
 41. Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L. and Döbereiner, J. (1986), "Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 36(1): 86-93.
 42. Baldani, V.L.D., Baldani, I.J. and Döbereiner, J. (2000), "Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.", *Biol Fert Soils*, Vol. 30: 485-491.
 43. Ballio, A. , Bossaa, F. , Di Giorgio, D. , Ferrantib, P. , Paci, M. , Puccib, P. , A. Scalonia, Segred, A. and Strobel, G.A. (1994), "Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins", *FEBS Letters*, Vol. 355: 96-100.
 44. Barac, Tanja, Taghavi, Safiyh, Borremans, Brigitte, Provoost, Ann, Oeyen, Licy, Colpaert, Jan V., Vangronsveld, Jaco and van der Lelie, Daniel (2004), "Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants", *Nature Biotechnology*, Vol. 22(5): 583-588.
 45. Bashan, Yoav and de-Bashan, Luz (2010), "How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment", *Advances in Agronomy*, Vol. 108: 77-136.
 46. Becker, J.O., Zavaleta-Mejia, E., Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G. and Van Gundy, S.D. (1988), "Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation", *Phytopathology*, Vol. 78(11): 1466-1469.
 47. Belimov, A.A., Kojemiakov, P. A. and Chuvarliyeva, V. C. (1995), "Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria", *Plant Soil*, Vol. 173: 29-37.
 48. Bent, E. and Chanway, CP. (1998), "The growth-promoting effects of abacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria", *Can. J. Microbiol.*, Vol. 44: 980-988.
 49. Berg, Gabriele and Hallmann, Johannes (2006), "Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes", in Schulz, Barbara J. E. , Boyle, Christine J.

- C., and Sieber, Thomas N., Editors, *Microbial root endophytes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 53-69.
50. Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K. (2012), "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 28(4): 1327-1350.
 51. Boddey, Robert M. (1995), "Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production", *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 14(3): 263-279.
 52. Boddey, Robert M., Urquiaga, Segundo, Alves, Bruno J.R. and Reis, Veronica (2003), "Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications", *Plant and Soil*, Vol. 252(1): 139-149.
 53. Brannen, R (1995), "Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonists of various crops", *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Vol. 65: 203.
 54. Bressan, Wellington and Borges, Marcela T. (2004), "Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize", *Biocontrol*, Vol. 49(3): 315-322.
 55. Broadbent, P., Baker, K.F., Franks, N. and Holla, J. (1977), "Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seed ling in steamed and in non-treated soil", *Phytopathology*, Vol. 67: 1027-34.
 56. Burkett-Cadena, Marleny, Kokalis-Burelle, Nancy, Lawrence, Kathy S., van Santen, Edzard and Kloepper, Joseph W. (2008), "Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria", *Biological Control*, Vol. 47(1): 55-59.
 57. Compant, Stéphane, Clément, Christophe and Sessitsch, Angela (2010), "Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 42(5): 669-678.
 58. Compant, Stéphane, Reiter, Birgit, Sessitsch, Angela, Nowak, Jerzy, Clément, Christophe and Barka, Essaïd Ait (2005), "Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71(4): 1685-1693.
 59. Chaiarn, Mathurot and Lumyong, Saisamorn (2009), "Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25(2): 305-314.
 60. Chanway, CP. (1997), "Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation", *Forest Sci.*, Vol. 43: 99-112.
 61. Chauhan, Hemlata, Bagyaraj, D. J. and Sharma, Anita (2013), "Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potetial in promoting growth of the host under field conditions", *Experimental Agriculture*, Vol. 49(1): 43-52.

62. Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguezkabana, R. and Kloepper, J. W. (1995), "Biological control of fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria", *Biological Control*, Vol. 5(1): 83-91.
63. Chen, W.M., James, E.K. , Coenye, T. , Chou, J.H. , Barrios, E. , S.M.D. Faria, Elliott, G.N. , Sheu, S.Y. , Sprent, J.I. and Vandamme, P. (2006), "*Burkholderia mimosarum* sp. Now., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. From Taiwan and South America", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol. 56: 1847-1851.
64. Chen, Y.P., Rekha, P.D. , Arun, A.B. , Shen, F.T. , Lai, W.A. and Young, C.C. (2006), "Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities", *Appl. Soil Ecol.*, Vol. 34: 33-41.
65. Datta, N, Banik, SA and Gupta, NK (1982), "Studies on the efficiency of phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland (India)", *Plant Soil*, Vol. 69: 365-374.
66. de-Bashan, Luz E., Hernandez, Juan-Pablo, Bashan, Yoav and Maier, Raina (2010), "*Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings", *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 69(3): 343-352.
67. Dey, B. K. (1988), "Phosphate solubilizing organisms in improving fertility status of soil.", in Sen, S. P. and Palit, P. , Editors, *Biofertilizers: potentialities and problems*, Plant Physiology Forum, Naya Prokash, Calcutta: 237 - 248.
68. Dong, Yuemei, Iniguez, A. Leonardo and Triplett, Eric W. (2003), "Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342", *Plant and Soil*, Vol. 257(1): 49-59.
69. Driks, Adam (2004), "The bacillus spore coat", *Phytopathology*, Vol. 94(11): 1249.
70. El-Nemr, M.A., Zaki, M.F., Tantawy, A.S. and Abdel-Mawgoud, A.M.R. (2011), "Enhancement of growth and production of broccoli crop using bio-nutritional foliar compound", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 5(12): 2578-2583.
71. Elbeltagy, Adel and Ando, Yasuo (2008), "Expression of nitrogenase gene (NIFH) in roots and stems of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(12): 1950-1957.
72. Fakhreldin, Musa Eltom Eltayeb (2017), "The effects of *Bacillus subtilis* bacteria on *Meloidogyne javanica* (nematode) infection and tomato plant growth", *European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences*, Vol. 5(2): 45-51.
73. Faltin, Franziska, Lottmann, Jana, Grosch, Rita and Berg, Gabriele (2004), "Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of

- Rhizoctonia solani* Kuhn", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 50(10): 811-820.
74. Flinn, Barry and Mei, Chuansheng (2010), "The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement", *Recent Patents on Biotechnology*, Vol. 4(1): 81-95.
 75. Fuentes-Ramírez, Luis E., Caballero-Mellado, Jesús, Sepúlveda, Jorge and Martínez-Romero, Esperanza (1999), "Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization", *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 29(2): 117-128.
 76. Fukui, R., Schroth, M.N., Hendson, M. and Hancock, J.G. (1994), "Interaction between strains of *Pseudomonads* in sugar beet spermospheres and the relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil", *Phytopathology*, Vol. 84: 1322–1330.
 77. Gao, Huijuan, Qi, Gaofu, Yin, Rong, Zhang, Hongchun, Li, Chenggang and Zhao, Xiuyun (2016), "*Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine", *Scientific Reports*, Vol. 6: 1-11.
 78. Garbeva, P., van Veen, J. A. and van Elsas, J. D. (2004), "Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness", *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 42 (1): 243-270.
 79. García-Orenes, Fuensanta, Morugán-Coronado, Alicia, Zornoza, Raul and Scow, Kate (2013), "Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem", *PLOS ONE*, Vol. 8(11): e80522.
 80. Gaur, A C (1990), *Phosphate Solubilising microorganisms as biofertilizers*, Omega Scientific Publishers, New Delhi, 176.
 81. Germaine, Kieran J., Liu, Xuemei, Cabellos, Guiomar Garcia, Hogan, Jill P., Ryan, David and Dowling, David N. (2006), "Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", *FEMS Microbiology Ecology*. 57(2): 302-310.
 82. Glick, Bernard R. (2012), "Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications", *Scientifica*, Vol. 2012: 1-16.
 83. Goldstein, A. H. (1986), "Bacterial solubilization", *Am. J. Altern. Agri.*, Vol. 1: 51-57.
 84. Govindarajan, Munusamy, Balandreau, Jacques, Kwon, Soon-Wo, Weon, Hang-Yeon and Lakshminarasimhan, Cunthipuram (2008), "Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice", *Microbial Ecology*, Vol. 55(1): 21-37.
 85. Gupta, Garima, Panwar, Jitendra, Akhtar, Mohd Sayeed and Jha, PrabhatN (2012), "Endophytic nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer", in Lichtfouse, Eric (Editor), *Sustainable Agriculture Reviews*, Springer Netherlands: 183-221.

86. Gyaneshwar, Prasad, James, Euan K., Reddy, Pallavolu M. and Ladha, Jagdish K. (2002), "Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties", *New Phytologist*, Vol. 154(1): 131-145.
87. Ha, Minh Thanh, Huang, Yuh Ming and Huang, Jenn Wen (2008), "Influence of organic amendment and *Bacillus subtilis* on mineral nutrient uptake of asparagus bean in two field soils", *Plant Pathology Bulletin*, Vol. 17: 289-296.
88. Hallmann, Quadt-Hallmann, A. , Mahafee, W. F. and Kloepper, J. W. (1997), "Bacterial endophytes in agricultural crops ", *Can. J. Microbiol.*, Vol. 43: 895-914.
89. Hallmann, J. (2001), "Plant interactions with endophytic bacteria", in Jeger, M.J. and Spence, N.J., Editors, *Biotic interactions in plant-pathogen associations*, CABI Publishing, Wallingford, UK: 87-119.
90. Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J. W. (1999), "Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 31(4): 551-560.
91. Hallmann, Johannes and Berg, Gabriele (2006), "Spectrum and population dynamics of bacterial root endophyte", in Schulz, Barbara J. E. , Boyle, Christine J. C., and Sieber, Thomas N., Editors, *Microbial root endophytes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 15-32.
92. Hallmann, Johannes, Davies, Keith G. and Sikora, Richard (2009), "Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists", in Perry, R., Moens, Maurice, and Starr, J. L., Editors, *Root-knot nematodes*, CABI Publishing, GB.
93. Hardoim, Pablo R., van Overbeek, Leo S. and Elsas, Jan Dirk van (2008), "Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth", *Trends in Microbiology*, Vol. 16(10): 463-471.
94. Hashem, A, Abd Allah, Elsayed, Alqarawi, A.A, Al-Huqail, A. A., Alshalawi, S.R.M, Wirth, Stephan and Egamberdieva, Difuza (2015), "Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (Indian bassia) grown under salt stress", *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 47(5): 1735-1741.
95. Hassan, Tamoor, Asghari, Bano, Irum, Naz and Manzoor, Hussain (2018), "*Bacillus cereus*: A competent plant growth promoting bacterium of saline sodic field", *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 50(3): 1029-1037.
96. Hayat, R., Ali, S. , U. Amara, Khalid, R. and Ahmed, I . (2010), "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion a review", *Ann. Microbiol.*, Vol. 60: 579-598.
97. Hianna, Leite Almeida Câmara, Silva, Anderson Barbosa, Gomes, Fábio Pinto, Gramacho, Karina Peres, Faria, José Cláudio, de Souza, Jorge Teodoro and Loguercio, Leandro Lopes (2013), "*Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically

- colonize seedlings and promote growth", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97(6): 2639-2651.
98. Hinton, D. M. and Bacon, C. W. (1995), "*Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn", *Mycopathologia*, Vol. 129(2): 117-125.
 99. Huang, B., Lv, C., Zhuang, P., Zhang, H. and Fan, L. (2011), "Endophytic colonisation of *Bacillus subtilis* in the roots of *Robinia pseudoacacia* L", *Plant Biology*, Vol. 13(6): 925-931.
 100. Ilić, Renata M. , Pivić, Radmila N. , Dinić, Zoran S. , Latković, Dragana S., Vlajić, Slobodan A. and Jošić, Dragana Lj. (2017), "The enhancement of soybean growth and yield in a field trial through introduction of mixtures of *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus* sp. and *Pseudomonas chlororaphis*", *Not. Sci. Biol.*, Vol. 9(2): 274-279.
 101. Iniguez, A., Dong, Yuemei and Triplett, Eric (2004), "Nitrogen Fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol. 17(10): 1078-1085.
 102. Jacobsen, B. J., Zidack, N. K. and Larson, B. J. (2004), "The role of bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases", *Phytopathology*, Vol. 94(11): 1272.
 103. Jaks, A. J., Smith, D. H., Davis, R. E. and Dolton, B. D. (1985), "Effects of *B. subtilis* on seedling emergence and pod yield on Spanish market type cultivars and 'Florunner'", *Proc. Am. Peanut Res. Educ. Soc.*, Vol. 17: 45.
 104. Janarthine, Sona, Palanisami, Eganathan and Thangavel, Balasubramanian (2010), "Plant growth promoting of endophytic *Bacillus cereus* isolated from the pneumatophores of *Avicennia marina*", *International Journal of Current Research*, Vol. 5: 9-13.
 105. Jasim, B., John Jimtha, C., Jyothis, Mathew and Radhakrishnan, E. K. (2013), "Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*", *Plant Growth Regulation*, Vol. 71(1): 1-11.
 106. Jha, Prabhat N., Gupta, Garima, Jha, Pameela and Mehrotra, Rajesh (2013), "Association of rhizospheric endophytic bacteria with plants a potential gateway to sustainable agriculture", *Greener Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 3(2): 73-84.
 107. Jha, Y. and Subramanian, R.B. (2013), "Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline conditions", *Chilean Journal of Agricultural Research*, Vol. 73(3): 213-219.
 108. Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martinez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. (1997), "*Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63(9): 3676-3683.
 109. Kado, C. I. (1992), "Plant pathogenic bacteria", *The prokaryotes*, ed. Balows, A., et al., Springer-Verlag, New York, 660 - 662.

110. Kapulnik, Y., Sarig, S. , Nur, I. and Okon, Y. (1983), "Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field grown wheat", *Can. J. Microbiol.*, Vol. 29: 895-899.
111. Kennedy, Ivan R., Pereg-Gerk, Lily L., Wood, Craig, Deaker, Rosalind, Gilchrist, Kate and Katupitiya, Sunietha (1997), "Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat", *Plant and Soil*, Vol. 194(1/2): 65-79.
112. Kirkpatrick, J D, Mai, W F, Parker, K G and Fisher, E G E. (1964), "Effect of phosphorus and potassium nutrition of sour cherry on the soil population of fire plant parasitic nematodes", *Phytopathology*(54): 706-712.
113. Kloepper, J.W., Lifshitz, R. and Zablutowicz, M.R. (1989), "Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity", *Trends Biotechnology*, Vol. 7: 39-43.
114. Kloepper, J.W., Zablutowiz, R.M., Ippig, E.M. and Lifshitz, R. (1991), "Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers", in Keister, D.L. and Cregan, P.B., Kluwer (Editors), *The rhizosphere and plant growth*, Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 315 - 326.
115. Kloepper, Joseph W. and Ryu, Choong-Min (2006), "Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance", in Schulz, B., Boyle, C., and Sieber, T. (Editors), *Soil biology, microbial root endophytes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 33-52.
116. Kloepper, Joseph W., Ryu, Choong-Min and Zhang, Shouan (2004), "Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.", *Phytopathology*, Vol. 94(11): 1259-1266.
117. Krebs, Birgit, Höding, Birgit, Kübart, Sabine, Workie, Melkamu, Junge, Helmut, Schmiedeknecht, G., Grosch, Rita, Bochow, Helmut and Hevesi, Mária (1998), "Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and Characterization of *Bacillus subtilis* strains", *Journal of Plant Diseases and Protection*, Vol. 105(2): 181-197.
118. Kuan, KB., Othman, R., Abdul Rahim, K and Shamsuddin, ZH. (2016), "Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions", *PLoS ONE*, Vol. 11(3): e0152478.
119. Kuklinsky-Sobral, Júlia, Araújo, Welington Luiz, Mendes, Rodrigo, Geraldi, Isaias Olívio, Pizzirani-Kleiner, Aline Aparecida and Azevedo, João Lúcio (2004), "Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion", *Environmental Microbiology*, Vol. 6(12): 1244-1251.
120. Khan, A. , Jilani, G. , Akhtar, M. S. , Naqvi, S. M. S. and Rasheed, M. (2009), "Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production", *J. Agric. Biol. Sci.*, Vol. 1(1): 48-58.

121. Khan, M. R., Khan, S. M., Mohiddin, F. A. and Askary, T. H. (2007), "Effect of certain phosphate-solubilizing bacteria on root-knot nematode disease of mungbean", *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Springer Netherlands, Dordrecht: 341-346.
122. Lery, Letícia M. S., Von Krüger, Wanda M. A., Bisch, Paulo M., Hemerly, Adriana S. and Nogueira, Eduardo M. (2011), "Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol. 24(5): 562-576.
123. Lian, L.H., Tian, B.Y., Xiong, R., Zhu, M.Z., Xu, J. and Zhang, K.Q. (2007), "Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations", *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 45(3): 262-269.
124. Lifshitz, R., Kloepper, W. J. , Kozlowski, M. , Simonson, C. , Carlson, J. , Tipping, M. E. and Zalesca, I. (1987), "Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions.", *Can. J. Microbiol.*, Vol. 33: 390-395.
125. Liu, Qin, Qiu, Yang and Beta, Trust (2010), "Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 58(16): 9235-9241.
126. Lodewyckx, Cindy, Taghavi, Safieh, Porteous, Fiona, Moore, Edward R. B., Mezgeay, Max, der Lelie, Daniel van and Vangronsveld, Jaco (2002), "Endophytic bacteria and their potential applications", *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 21(6): 583-606.
127. Mahmoud, Mohamed Ahmed Youssef, Hassan, Abd-El-Khair and Wafaa, Mohamed Abd El-Hameed El-Nagdi (2017), "Management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting sugar beet as affected by certain bacterial and fungal suspensions", *CIGR Journal*, Special issue: 293-301.
128. Malarvizhi, P. and Ladha, J. K. (1999), "Influence of available nitrogen and rice genotype on associative dinitrogen fixation", *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 63(1): 93-99.
129. Malik, K. A., Bilal, Rakhshanda, Mehnaz, Samina, Rasul, G., Mirza, M. S. and Ali, S. (1997), "Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice", *Plant and Soil*, Vol. 194(1/2): 37-44.
130. Martinez-Ochoa, Natalia (2000), *Biological control of the root -knot nematode with rhizobacteria and organic amendments*, ProQuest Dissertations Publishing.
131. McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. (1994), "Novel bacterial taxa inhabiting internal tissue of sweet corn and cotton", in Ryder, M.H., Stephens, P.M., and Bowen, G.D (Editors), *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*, CSIRO, Melbourne, Australia.

132. McInroy, John A. and Kloepper, Joseph W. (1995), "Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 41(10): 895-901.
133. McInroy, John A. and Kloepper, Joseph W. (1995), "Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn", *Plant and Soil*, Vol. 173(2): 337-342.
134. Mekete, Tesfamariam, Hallmann, Johannes, Kiewnick, Sebastian and Sikora, Richard (2009), "Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*", *Nematology*, Vol. 11(1): 117-117.
135. Melnick, Rachel L., Zidack, Nina K., Bailey, Bryan A., Maximova, Siela N., Guiltinan, Mark and Backman, Paul A. (2008), "Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao", *Biological Control*, Vol. 46(1): 46-56.
136. Mendoza, Alexander R. , Kiewnick, Sebastian and Sikora, Richard A. (2008), "In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*", *Biocontrol Sci. Technol.*, Vol. 18: 377-389.
137. Merriman, P.R., Price, R.D. , Kollmorgen, J.F. , Piggott, T. and Ridge, E. H. (1974), "Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots", *Ausl. J. Agric. Res.*, Vol. 25: 219-226.
138. Miguel, Paulo Sérgio Balbino, Delvaux, Julio Cesar , de Oliveira, Marcelo Nagem Valério , Monteiro, Larissa Cassemiro Pacheco , Freitas, Fernanda de Souza, Costa, Maurício Dutra , Tótola, Marcos Rogério , de Moraes, Célia Alencar and Borges, Arnaldo Chaer (2013), "Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora* ", *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7(7): 586-594.
139. Milca, Rachel Costa Ribeiro Lins, Jssica, Martins Fontes, Nataliane, Marques Vasconcelos, Danilo, Mamede Silva Santos, Ozias, Elias Ferreira, Joo, Lcio de Azevedo, Janete, Magali Arajo and Glucia, Manoella Souza Lima (2014), "Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from cashew leaves", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 13(33): 3360-3365.
140. Miliute, Inga, Buzaitė, Odeta, Baniulis, Danas and Stanys, Vidmantas (2015), "Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review", *Zemdirbyste-Agriculture*, Vol. 102(4): 465-478.
141. Mirza, M.S., Rasul, G. , S. Mehnaz, Ladha, K.J. and Malik, A.K. (2000), "Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. ", in Ladha, JK and Reddy, PM (Editors), *The quest for nitrogen fixation in rice*, International Rice Research Institute, Los Baños: 191-204.

142. Mohamed, Ahme, Hamza, Amany and Derbalah, Aly (2016), "Recent approaches for controlling downy mildew of cucumber under greenhouse conditions", *Plant Protect. Sci.*, Vol. 52(1): 1-9.
143. Mohamed, H. I. and Gomaa, E. Z. (2012), "Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress", *Photosynthetica*, Vol. 50(2): 263-272.
144. Molla, AH., Shamsuddin, ZH., Halimi, MS, Morziah, M. and Puteh, AB. (2001), "Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems", *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 33: 457-46.
145. Muhammad, I.H., Hafiz, A.N. , Muhammad, A.J. and Muhammad, A. (2013), "Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize", *Soil Environ.*, Vol. 32(1): 71-78.
146. Mukhopadhyay, Kunal, Nancy, K. Garrison , Dorothy , M. Hinton, Charles, W. Bacon, Gurdev, S Khush, Harry, D. Peck and Neeraj, Datta (1996), "Identification and characterization of bacterial endophytes of rice", *Mycopathologia*, Vol. 134(3): 151-159.
147. Murty, M. G. and Ladha, J. K. (1988), "Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions", *Plant and Soil*, Vol. 108(2): 281-285.
148. Murugappan, R. M., Begum, S. Benazir and Roobia, R. Raja (2013), "Symbiotic influence of endophytic *Bacillus pumilus* on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant *Ocimum sanctum*", *Symbiosis*, Vol. 60(2): 91-99.
149. Muthukumarasamy, R.I., Revathi, G. and Loganathan, P. (2002), "Effect of inorganic N on the population in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus*", *Plant and Soil*, Vol. 234: 91-102.
150. Niazi, M. T. , Kashif, H. Saif-ur-Rehman, Asghar, H. N. , Saleem, M. , Khan, M. Y. and A., ZahirZ. (2015), "Phosphate solubilizing bacteria in combination with pressmud improve growth and yield of mash bean", *The Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol. 25(4): 1049-1054.
151. Nguyen, Anh Dzung, Vo, Thi Phuong Khanh and Tran, Trung Dzung (2010), "Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 84(2011): 751-755.
152. Nguyen, Anh Dzung, Wang, San Lang, Trinh, Thi Huyen Trang, Tran, Thi Ngoc, Nguyen, Van Bon, Doan, Thang Chien, Huynh, Que V and Vo, Thi Phuong Khanh (accepted), "Plant growth promotion and fungal antagonism of endophytic bacteria for the sustainable production of black pepper (*Piper nigrum* L.)", *Research on chemical intermediates*.
153. Nguyen, Van Bon, Wang, San Lang, Nguyen, Thi Hanh, Nguyen, Thi Huyen, Trinh, Thi Huyen Trang, Nong, Thi Thiep, Nguyen, To Uyen, Nguyen, Van

- Nam and Nguyen, Anh Dzung (accepted), "Reclamation of rhizobacteria newly isolated from black pepper plant roots as potential biocontrol agents of root-knot nematodes", *Research on chemical intermediates*.
154. Oliveira, Denilson F. , Júnior, Helvécio M. Dos Santos , Nunes, Alexandro, S., Campos, Vicente P. , Pinho, Renata S. C. De and Gajo, Giovanna C. (2014), "Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Vol. 86(2): 525-538.
 155. Oliveira, Marcelo N. V., Santos, Thiago M. A., Vale, Helson M. M., Delvaux, Júlio C., Cordero, Alexander P., Ferreira, Alessandra B., Miguel, Paulo S. B., Tótola, Marcos R., Costa, Maurício D., Moraes, Célia A. and Borges, Arnaldo C. (2013), "Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from Southeastern Brazil", *Canadian journal of microbiology*, Vol. 59(4): 221-230.
 156. Ongena, M. and Jacques, P. (2008), "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol", *Trends Microbiol*, Vol. 16(3): 115-25.
 157. Padda, KP, Puri, A and Chanway, CP. (2016), "Effect of GFP tagging of *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R on its ability to promote growth of canola and tomato seedlings", *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 52(3): 377-387.
 158. Pampulha, M. E. and Oliveira, A. (2006), "Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms", *Current Microbiology*, Vol. 53(3): 238-243.
 159. Paulina Estrada-De Los, Santos, Bustillos-Cristales, Rocío and Caballero-Mellado, Jesús (2001), "*Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67(6): 2790-2798.
 160. Petkar, V.V., Deshmukh, T.T. and Jadhav, A.N. (2018), "Effect of dual inoculation of *Bacillus subtilis* and *Bradyrhizobium japonicum* on growth parameters of soybean (*Glycine max* L.)", *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, Vol. 7(10): 563-567.
 161. Pleban, S., Chernin, L. and Chet, I. (1997), "Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*", *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 25(4): 284-288.
 162. Pleban, Shlomo, Ingel, Fanya and Chet, Ilan (1995), "Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp.", *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 101(6): 665-672.
 163. Puri, A, Padda, K.P. and Chanway, C.P. (2016), "Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-term trial", *Symbiosis*, Vol. 69(2): 123-129.

164. Puri, A, Padma, KP and Chanway, CP. (2015), "Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth?", *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 89: 210-216.
165. QiuHong, Niu, Huang, Xiaowei, Zhang, Lin, Li, Yunxia, Le, Cuo, Yang, Jinkui and Zhang, Keqin (2006), "A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes", *Archives of Microbiology*, Vol. 185: 439-48.
166. Quadt-Hallmann, A. and Kloepper, J. W. (1996), "Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 42(11): 1144-1154.
167. Ramezani, Moghadda Maryam , Mahdikhani, Moghaddam Esmat, Baghaee, Ravari Sareh and Rouhani, Hamid (2014), "The first report of *Bacillus pumilus* influence against *Meloidogyne javanica* in Iran", *Journal of Crop Protection*, Vol. 3(1): 105-112.
168. Raupach, Georg S. (1996), "Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)", *Plant Disease*, Vol. 80(8): 891.
169. Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M. , Hoste, B., Vancanneyt, M., Kresters, K. and De-Ley, J. (1993), "*Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azococcus communis* sp. nov.", *Init. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 43: 574-584.
170. Reinhold-Hurek, Barbara and Hurek, Thomas (1998), "Interactions of Gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function", *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 17(1): 29-54.
171. Reynders, L. and Vlassak, K. (1982), "Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping", *Plant and Soil*, Vol. 1982(66): 217-223.
172. Richardson, A. E., Barea, M. J. , Mcill, M. A. and Prigent, C. C. (2009), "Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms", *Plant Soil*, Vol. 321: 305-339.
173. Rodríguez, Hilda and Fraga, Reynaldo (1999), "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion", *Biotechnol. Adv.*, Vol. 17(4): 319-339.
174. Rosenblueth, Mónica and Martínez-Romero, Esperanza (2006), "Bacterial endophytes and their interactions with hosts", *Molecular plant-microbe interactions*, Vol. 19(8): 827-837.
175. Ryan, Robert P., Germaine, Kieran, Franks, Ashley, Ryan, David J. and Dowling, David N. (2008), "Bacterial endophytes: recent developments and applications", *FEMS microbiology letters*, Vol. 278(1): 1-9.

176. Schrimsher, Drew W., Lawrence, Kathy S., Sikkens, Roelof B. and Weaver, David B. (2014), "Nematicides enhance growth and yield of *Rotylenchulus reniformis* resistant cotton genotypes", *Journal of Nematology*, Vol. 46(4): 365-375.
177. Schulz, Barbara (2006), "What are Endophytes?", in Schulz, Barbara J.E., Boyle, Christine J.C., and Sieber, Thomas N., Editors, *Microbial Root Endophytes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 1-13.
178. Seeling, B. and Zasoski, J.R. (1993), "Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland topsoil", *Plant Soil*, Vol. 148: 277-284.
179. Seghers, Dave, Wittebolle, Lieven, Top, Eva M., Verstraete, Willy and Siciliano, Steven D. (2004), "Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community", *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1475.
180. Senthilkumar, M., Anandham, R., Madhaiyan, M., Venkateswaran, V. and Sa, Tongmin (2011), "Endophytic bacteria: Perspectives and applications in agricultural crop production", in Maheshwari, D.K. (Editor), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 61-96.
181. Sherword, K. F. (1998), "Fertilizer use and environment", *Proc. Symp. Plant Nutrition Management for Sustainable Agricultural Growth*, N., Ahmed and HamidA., NFDC, Islamabad, 57-76.
182. Shiomi, Humberto Franco, Silva, Harllen Sandro Alves, Melo, Itamar Soares de, Nunes, Flávia Vieira and Bettiol, Wagner (2006), "Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust", *Scientia Agrícola*, Vol. 63(1).
183. Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K. and Greer, C. W. (2001), "Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination", *Applied and environmental microbiology*, Vol. 67(6): 2469-2475.
184. Siddiqui, A. I., Ehetshamul Haque, S. and Shahid Shaukat, S. (2001), "Use of rhizobacteria in the control of root rot–root knot disease complex of mungbean", *Journal of Phytopathology*, Vol. 149(6): 337-346.
185. Siddiqui, Zaki and Singh, Priyanka (2010), "Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, Vol. 43(6): 552.
186. Sikora, R. A., Schäfer, K. and Dababat, A. A. (2007), "Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant-parasitic nematodes", *Australasian Plant Pathology*, Vol. 36(2): 124-134.
187. Silva, Harllen S. A., Tozzi, João P. L., Terrasan, César R. F. and Bettiol, Wagner (2012), "Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant

- growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust", *Biological Control*, Vol. 63(1): 62.
188. Singh, Dhananjaya Pratap, Singh, Harikesh Bahadur and Prabha, Ratna (2016), *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Vol. 1: Research Perspectives*, Springer India: New Delhi, New Delhi.
 189. Smith, E. F. (1905), *Bacteria in relation to plant diseases*, Washington, D.C.
 190. Smith, R. L., Schank, S. C., Bouton, J. H. and Quesenberry, K. H. (1978), "Yield increases of tropical grasses after inoculation with *Spirillum lipoferum*", *Ecological Bulletins*, Vol. 26: 380-385.
 191. Soad, A. Algam, Xie, Guan-Lin and Jef, Coosemans (2005), "Delivery methods for introducing endophytic *Bacillus* into tomato and their effect on growth promotion and suppression of tomato wilt", *Plant Pathology Journal*, Vol. 4(1): 69-74.
 192. Soupir, M. L., Mostaghimi, S., Yagow, E. R., Hagedorn, C. and Vaughan, D. H. (2006), "Transport of fecal bacteria from poultry litter and cattle manures applied to pastureland", *Water, Air and Soil Pollution*, Vol. 169(1): 125-136.
 193. Sturz, A. V., Christie, B. R. and Matheson, B. G. (1998), "Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 44(2): 162-167.
 194. Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G. and Nowak, J. (1997), "Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth", *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 25(1): 13-19.
 195. Sturz, A. V., Christie, B. R. and Nowak, J. (2000), "Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production", *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 19(1): 1-30.
 196. Strobel, Gary, Daisy, Bryn, Castillo, Uvidelio and Harper, James (2004), "Natural products from endophytic microorganisms", *Journal of natural products*, Vol. 67(2): 257-268.
 197. Sundara, B., Natarajan, V. and Hari, K. (2002), "Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the change in soil available phosphorus and sugarcane and sugaryield", *Field Crop Res*, Vol. 77: 43-49.
 198. Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J. and Fuentes-Ramírez, L. E. (2000), "Natural endophytic occurrence of acetobacter diazotrophicus in pineapple plants", *Microbial ecology*, Vol. 39(1): 49-55.
 199. Taurian, Tania, Ibáñez, Fernando, Angelini, Jorge, Tonelli, María Laura and Fabra, Adriana (2012), "Endophytic bacteria and their role in legumes growth promotion", in Maheshwari, D.K. (Editor), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg: 141-168.
 200. Tilak, K. V. B. R. and Reddy, B. Srinivasa (2006), "*Bacillus cereus* and *B. circulans* – novel inoculants for crops", *Current Science*, Vol. 90(5): 642-644.

201. Turner, T. J. and Backman, P. A. (1991), "Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*", *The American Phytopathological Society*, Vol. 75: 347-353.
202. Theologies, A. and Ray, M. P. (1982), "Early auxin-regulated polyadenylated messenger-RNA sequences in pea stem tissue", *Biological Sciences*, Vol. 79: 418-421.
203. Tran Thi Ngoc Son, Cao Ngoc Diep, Truong Thi Minh Giang and Tran Thi Anh Thu (2007), "Effect of co-inoculants (Bradyrhizobia and phosphate solubilizing bacteria) liquid on soybean under rice based cropping system in the Mekong Delta", *Omonrice*, Vol. 15: 135-143.
204. Tran Thi Ngoc Son, Cao Ngoc Diep and Truong Thi Minh Giang (2006), "Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing bacteria application on soybean in rotational system in the Mekong delta", *Omonrice*, Vol. 14: 48-57.
205. Tran, Van V., Berge, O., Ngo, K. S., Balandreau, J. and Heulin, T. (2000), "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam", *Plant and Soil*, Vol. 218(1): 273-284.
206. Trinh, Thi Huyen Trang, Wang, San Lang, Nguyen, Van Bon, Tran, Minh Dinh, Doan, Chien Thang, Vo, Thi Phuong Khanh, Huynh, Que V and Nguyen, Anh Dzung (accepted), "A potent antifungal rhizobacteria *Bacillus velezensis* RB.DS29 isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.)", *Research on chemical intermediates*.
207. Vega, Fernando E., Pava-Ripoll, Monica, Posada, Francisco and Buyer, Jeffrey S. (2005), "Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L", *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 45(5): 371.
208. Vendan, Regupathy Thamizh, Yu, Young Joon, Lee, Sun Hee and Rhee, Young Ha (2010), "Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion", *The Journal of Microbiology*, Vol. 48(5): 559-565.
209. Verma, Subhash C., Ladha, Jagdish K. and Tripathi, Anil K. (2001), "Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice", *Journal of Biotechnology*, Vol. 91(2): 127-141.
210. Wada, Satoko, Toyota, Koki and Takada, Atsushi (2011), "Effects of the nematicide imicyafos on soil nematode community structure and damage to radish caused by *Pratylenchus penetrans*", *Journal of nematology*, Vol. 43(1): 1-6.
211. Wang, Wen, K., Zhao, X. , Wang, H. , Li, A. and Hong, H. (2009), "The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect", *Crop Protection*, Vol. 28: 634-639.
212. Whipps, John M. (2001), "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52(suppl_1): 487-511.

213. Willson, K. C. (1985), "Mineral nutrition and fertiliser needs", in Clifford, M. N. and Willson, K. C. (Editors), *Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage*, Springer US, Boston, MA: 135-156.
214. Xiao, Tong-Jian, Tan, Shi-Yong, Shen, Qi-Rong and Ran, Wei (2012), "*Bacillus cereus* X5 suppresses root-knot nematode of tomato by colonizing in roots and soil", *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(10): 2321-2327.
215. Yanni, Youssef G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K. and Dazzo, Frank B. (1997), "Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth", *Plant and Soil*, Vol. 194(1): 99-114.
216. Yildirim, Ertan, Karlidag, Huseyin, Turan, Metin, Dursun, Atilla and Goktepe, Fahrettin (2011), "Growth, nutrient uptake, and yield promotion of broccoli by plant growth promoting rhizobacteria with manure", *HortScience*, Vol. 46(6): 932-936.
217. Yoshida, S., Forno, D. A. , Cock, J. H. and Gomez, K. A. (1976), *Laboratory manual for physiological studies of rice*, IRRI, Las Bano.
218. Young, C.C., Lai, W.A. , Shen, F.T. , Hung, M.H. , Hung, W.S. and Arun, A.B. (2003), Exploring the microbial potentially to augment soil fertility in Taiwan, *Proc. of the 6th ESAFS International Conference: Soil management technology on low productivity and degraded soils*, Taipei: 25-27.
219. Zaady, E., Okon, Y. and Perevolotsky, A. (1994), "Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasiliense*", *J. Range Manage*, Vol. 47: 12-15.
220. Zhang, XianFang, Li, Jingjing, Qi, Gaofu, Wen, Kai, Lu, Jinzhong and Zhao, Xiuyun (2011), "Insecticidal effect of recombinant endophytic bacterium containing *Pinellia ternata* agglutinin against white backed planthopper, *Sogatella furcifera*", *Crop Protection*, Vol. 30(11): 1478-1484.
221. Zhao, Longfei, Xu, Yajun, Lai, Xin-He, Shan, Changjuan, Deng, Zhenshan and Ji, Yuliang (2015), "Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 46(4): 977-989.
222. Zhong, Wenhui, Gu, Ting, Wang, Wei, Zhang, Bin, Lin, Xiangui, Huang, Qianru and Shen, Weishou (2010), "The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity", *An International Journal on Plant-Soil Relationships*, Vol. 326(1): 523-523.
223. Zhou, Dong-Mei, Wang, Kui-Ping, Liu, Hong-Xia, Gu, Chun and Guo, Jian-Hua (2014), "Field evaluation of different application methods of the mixture of *Bacillus cereus* strain AR156 and *Bacillus subtilis* strain SM21 on pepper

growth and disease resistance", *Biocontrol Science and Technology*, Vol. 24(12): 1451-1468.

C. Tài liệu tiếng Pháp

224. Chabot, Rock, Antoun, Hani and Cescas, P. Michel (2011), "Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique", *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 39(10): 941-947.