ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN XUÂN HIẾU

NGHIÊN CỨU ĐỐI KHÁNG SINH HỌC NẤM *Aspergillus* sp. GÂY BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC ĐEN TRÊN CÂY LẠC (*Arachis hypogaea*) Ở TỈNH QUẢNG TRỊ VÀ THÀNH PHỐ HUẾ

Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

Công trình được hoàn thành tại: **Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế**

Người hướng dẫn khoa học: **PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Thủy**

Phản biện 1:
PGS.TS. Phạm Bích Ngọc
Viện Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam

Phản biện 2:
PGS.TS. Nguyễn Vũ Phong
Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

Phản biện 3:
PGS.TS. Trịnh Thị Sen
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế, họp tại cơ quan Đại học Huế, vào hồi 8 giờ 00 ngày 26 tháng 8 năm 2026

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam.
2. Trung tâm học liệu Đại học Huế.
3. Thư viện Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Lạc (*Arachis hypogaea*) là cây trồng cạn quan trọng ở miền Trung Việt Nam, giúp cải tạo đất cát và nâng cao thu nhập. Tuy nhiên, năng suất lạc chịu áp lực lớn từ bệnh hại, đặc biệt là bệnh héo rũ gốc mốc đen do nấm *Aspergillus niger*, làm cây héo rũ, chết hàng loạt, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng; một số chủng *A. niger* còn sản sinh độc tố Ochratoxin A, tiềm ẩn nguy cơ mất an toàn thực phẩm. Hiện nay, phòng trừ bệnh chủ yếu dựa vào thuốc hóa học, gây ô nhiễm môi trường và kháng thuốc. Vì vậy, **"Nghiên cứu đối kháng sinh học nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc (*Arachis hypogaea*) ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế"** nhằm xây dựng giải pháp sinh học an toàn, hiệu quả, phục vụ sản xuất lạc bền vững.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Tuyển chọn và nghiên cứu các vi sinh vật bản địa có khả năng đối kháng với nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc, tập trung vào β-1,3-glucanase liên quan đến hoạt tính đối kháng, làm cơ sở cho phòng trừ sinh học bệnh tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Nội dung 1: Phân lập, xác định tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

- Nội dung 2: Phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật bản địa có khả năng đối kháng với nấm *Aspergillus* sp., biểu hiện hoạt tính enzyme ngoại bào và đáp ứng các chỉ tiêu an toàn sinh học được khảo sát

- Nội dung 3: Xác định được ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt độ và khả năng sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của chủng vi sinh vật được tuyển chọn; đánh giá tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với nấm *Aspergillus* sp. trong điều kiện *in vitro*.

- Nội dung 4: Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của chủng vi sinh vật được tuyển chọn trong điều kiện nhà lưới và thử nghiệm đồng ruộng.

4. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Các chủng nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

- Các chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng và sinh enzyme ngoại bào (chitinase, β -1,3-glucanase, cellulase) phân lập từ đất trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

- Giống lạc L14 của địa phương.

5. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

5.1. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 12/2021 đến tháng 6/2025.

5.2. Địa điểm nghiên cứu

Khảo sát, điều tra, thu mẫu bệnh và đất để phân lập vi sinh vật đối kháng, thử nghiệm đánh giá khả năng phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trên đồng ruộng được thực hiện tại các vùng trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế. Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật, nghiên cứu đặc điểm enzyme, thử nghiệm *in vitro*, thử nghiệm ở nhà lưới được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế. Chụp ảnh SEM tại Phòng thí nghiệm Khoa học vật liệu, Khoa Lý – Hóa, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng.

6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

6.1. Tuyển chọn được 03 chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa gồm *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 có khả năng đối kháng với nấm *A. niger* và sinh enzyme ngoại bào (chitinase, β-1,3-glucanase, cellulase).

6.2. Xác định được ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến hoạt độ β-1,3-glucanase và các yếu tố môi trường nuôi cấy liên quan đến khả năng sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* bản địa tuyển chọn; đồng thời cung cấp bằng chứng về vai trò quan trọng của phân đoạn enzyme ngoại bào chứa β-1,3-glucanase tham gia vào hoạt tính đối kháng đối với *A. niger* trong điều kiện *in vitro*.

6.3. Đánh giá được hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137, phối trộn tỉ lệ 1:1:1 theo thể tích, nồng độ 10^8 CFU/mL) ở quy mô nhà lưới và thử nghiệm đồng ruộng đa điểm tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế; ghi nhận khả năng duy trì tỉ lệ cây chết do bệnh ở mức thấp (1,16–3,57 %) và làm tăng năng suất thực thu của lạc từ 24,90–30,86 % so với đối chứng không xử lý.

7. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

7.1. Ý nghĩa khoa học

- Luận án bổ sung các dữ liệu khoa học có hệ thống về đặc điểm sinh học, tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc và nguồn vi sinh vật bản địa có khả năng đối kháng nấm bệnh tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

- Kết quả tuyển chọn và nghiên cứu ba chủng *Bacillus* bản địa cung cấp dữ liệu về khả năng đối kháng, hoạt tính các enzyme ngoại bào chitinase, β-1,3-glucanase và cellulase; đồng thời làm rõ một số đặc tính của β-1,3-glucanase và các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme này. Các kết quả về tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với sinh trưởng và hình thái sợi nấm cung cấp thêm bằng chứng về sự tham gia của enzyme ngoại bào trong hoạt tính đối kháng *A. niger*.

- Kết quả đánh giá hiệu quả của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* trong điều kiện *in vitro*, nhà lưới và đồng ruộng góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc phối hợp các chủng *Bacillus* trong kiểm soát sinh học bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc.

7.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Luận án cung cấp 03 chủng vi khuẩn bản địa gồm *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 có khả năng đối kháng *A. niger* và đáp ứng các chỉ tiêu an toàn sinh học được khảo sát.

- Hỗn hợp dịch nuôi 03 chủng vi khuẩn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) đã được đánh giá trong điều kiện nhà lưới và tại các địa điểm trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế, cho thấy tiềm năng sử dụng trong phòng trừ sinh học bệnh héo rũ gốc mốc đen và nâng cao năng suất lạc.

- Kết quả nghiên cứu là cơ sở thực tiễn cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện quy trình sử dụng và phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng *Bacillus* bản địa tuyển chọn phục vụ phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc.

Chương 1
TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

Lạc là cây trồng kinh tế quan trọng ở duyên hải miền Trung Việt Nam nhưng đang bị hạn chế năng suất do bệnh héo rũ gốc mốc đen, chủ yếu do nấm *Aspergillus* sp.– loài nấm đất khó phòng trừ vì tồn tại lâu

dài và xâm nhiễm qua rễ. Các biện pháp hóa học hiện nay tiềm ẩn rủi ro môi trường và kháng thuốc, do đó kiểm soát sinh học được xem là hướng tiếp cận bền vững. Trong đó, các vi sinh vật đối kháng như *Bacillus*, *Trichoderma* có khả năng ức chế nấm bệnh thông qua enzyme ngoại bào, đặc biệt là β-1,3-glucanase phân giải thành tế bào nấm. Tuy nhiên, các nghiên cứu gắn với điều kiện sinh thái địa phương tại Quảng Trị và Huế còn hạn chế, vì vậy việc tuyển chọn vi sinh vật đối kháng bản địa và làm rõ mối liên hệ của enzyme β-1,3-glucanase trong đối kháng sinh học là cần thiết và có ý nghĩa khoa học, thực tiễn.

Chương 2
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Thu thập, phân lập, kiểm chứng khả năng gây bệnh theo quy tắc Koch và định danh nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen;

- Phân lập, sàng lọc và định danh các chủng vi sinh vật bản địa có khả năng đối kháng nấm *Aspergillus* sp. và sinh enzyme ngoại bào.

- Đánh giá hoạt tính đối kháng *in vitro*, xác định MIC, MFC, khả năng ức chế sinh trưởng và tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đến hình thái sợi nấm;

- Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ và khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase

- Khảo sát một số chỉ tiêu an toàn sinh học, khả năng sinh IAA và tính tương thích giữa các chủng *Bacillus*;

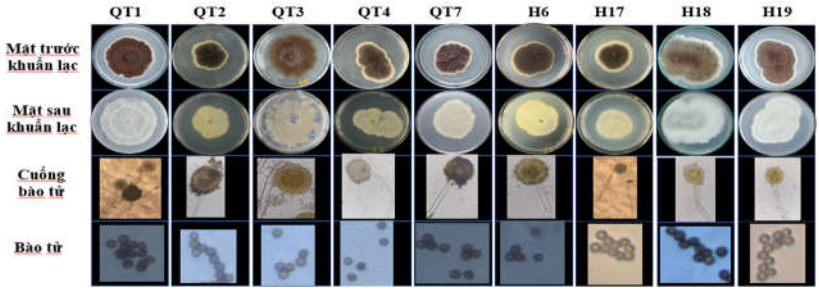
- Thử nghiệm hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp ba chủng *Bacillus* trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng;

- Xử lý số liệu: Số liệu (≥3 lần lặp) được xử lý bằng SPSS 26.0 và Excel 2016, trình bày M ± SD; phân tích ANOVA, Duncan, Fisher's LSD, Bonferroni, Levene và hồi quy tuyến tính (R^2)…, với $p < 0,05$.

Chương 3
NỘI DUNG, KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và xác định tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc

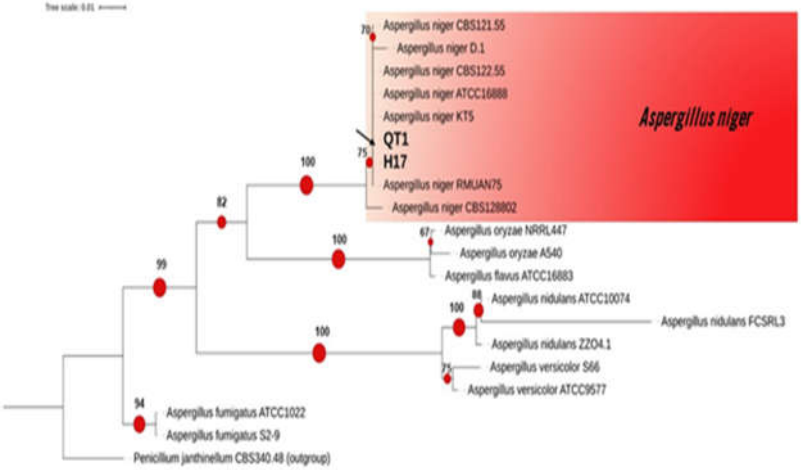
Phân lập và nhận diện chủng nấm bệnh: Đã tuyển chọn 9 chủng nấm đặc trưng từ các vùng trồng lạc nhiễm bệnh tại Quảng Trị và Huế để nghiên cứu đặc điểm hình thái, định danh và xác định tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc (Hình 3.2).



Hình 3.2. *Đặc điểm hình thái các chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên môi trường PDA*

Kiểm chứng theo quy tắc Koch và tuyển chọn chủng nấm có khả năng gây bệnh cao: Cả 9 chủng nấm đều gây bệnh (100%), xuất hiện triệu chứng sau 3–6 ngày nhiễm; tỉ lệ cây chết từ 85,7–100%, trong đó QT1 và H17 gây chết cao nhất với sai khác có ý nghĩa thống kê.

Định danh chủng nấm bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử: Hai chủng QT1 và H17 được giám định kết hợp bằng hình thái và trình tự ITS1–ITS4, cho kết quả có sự tương đồng 100% với *Aspergillus niger*, qua đó xác định thuộc loài *A. niger* trong phạm vi nghiên cứu (Hình 3.5).



Hình 3.5. *Cây phát sinh loài chủng nấm A. niger QT1 và A. niger H17*

3.2. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật bản địa đối kháng nấm *A. niger*

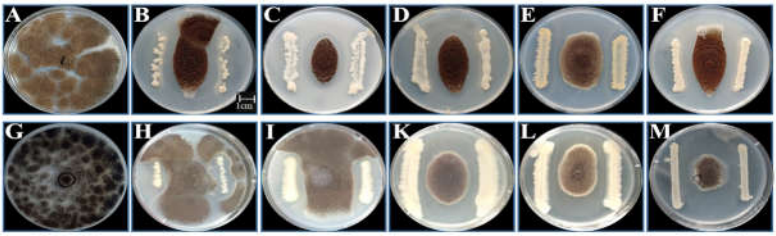
3.2.1. Phân lập, sàng lọc sơ bộ các chủng vi sinh vật đối kháng nấm *A. niger*

Từ 12 mẫu đất các vùng trồng lạc nhiễm bệnh héo rũ gốc mốc đen tại Quảng Trị và Huế, phân lập được 144 chủng VSV đối kháng với *A. niger* QT1 và H17; trong đó chọn 16 chủng tiềm năng để đánh giá đối kháng *in vitro* (Bảng 3.5; Hình 3.6).

Bảng 3.5. *Tỉ lệ ức chế của các chủng vi sinh vật đối kháng với nấm bệnh A. niger QT1 và A. niger H17 sau 6 ngày nuôi cấy*

STT	Chủng vi sinh vật đống kháng	Tỉ lệ ức chế (%)	
		***A. niger* QT1**	***A. niger* H17**
1	H1	45,20 ± 0,46 ^{gh}	45,21 ± 0,35 ^{d}
2	**K1**	**61,60 ± 0,05** ^{b}	**45,50 ± 0,35** ^{d}
3	K2	49,86 ± 0,13 ^{ef}	41,15 ± 0,18 ^{e}
4	**B8**	**55,38 ± 0,18** ^{d}	**45,61 ± 0,08** ^{d}
5	45K	41,05 ± 0,19 ^{i}	46,44 ± 0,20 ^{dc}
6	46K	45,10 ± 0,03 ^{h}	45,54 ± 0,08 ^{d}
7	**101**	**58,60 ± 0,18** ^{c}	**54,56** ± 0,12 ^{b}
8	**112**	**52,10 ± 0,04** ^{e}	**52,28** ± 0,07 ^{b}
9	118	46,90 ± 0,06 ^{gh}	42,63 ± 0,12 ^{e}
10	**137**	**57,14 ± 0,13** ^{cd}	**57,63** ± 0,15 ^{a}
11	VL1	37,04 ± 3,40 ^{k}	35,82 ± 3,36 ^{f}
12	Đak3	46,67 ± 2,23 ^{gh}	40,83 ± 2,28 ^{e}
13	**HL6**	**77,41 ± 1,28** ^{a}	**48,30 ± 1,22** ^{c}
14	PhĐ3	47,78 ± 2,94 ^{fg}	27,64 ± 2,61 ^{g}
15	TPH4	50,37 ± 2,31 ^{e}	26,91 ± 2,18 ^{g}
16	PhV1	61,48 ± 0,64 ^{b}	23,28 ± 2,31 ^{h}

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD (Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn).



Hình 3.6. *Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn với nấm bệnh trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy, (Đối kháng với QT1 từ A-F tương ứng là B8, K1, 101, 112 và 137; đối kháng với H17 từ G-M, tương ứng là B8, K1, 101, 112 và 137).*

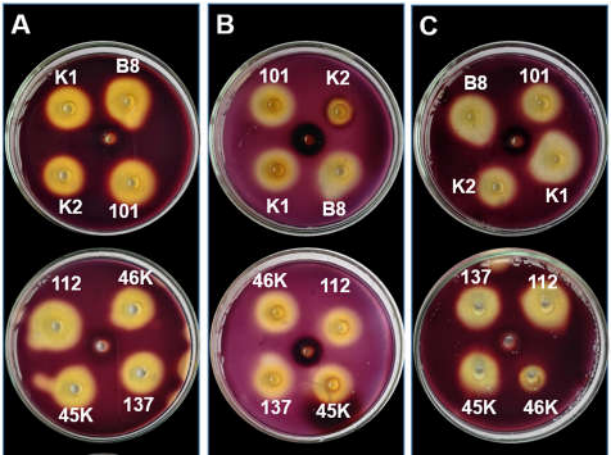
3.2.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật đối kháng và sinh enzyme ngoại bào

Tiếp tục sàng lọc hoạt tính enzyme các chủng đối kháng mạnh qua đường kính vùng thủy phân trên thạch đĩa, thu được 11 chủng, kết quả trình bày Bảng 3.6 và Hình 3.9.

Bảng 3.6. *Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi sinh vật đối kháng (mm)*

TT	Chủng vi sinh vật	Đường kính vùng thủy phân (mm)		
		1,3- β -glucanase	Chitinase	Cellulase
1	H1	18,50 ± 0,20 ^{d}	20,47 ± 0,15 ^{c}	17,70 ± 0,62 ^{d}
2	K1	24,97 ± 0,15 ^{ab}	25,83 ± 0,15 ^{a}	25,47 ± 0,06 ^{a}
3	K2	22,77 ± 0,25 ^{bc}	23,30 ± 0,20 ^{b}	24,03 ± 0,15 ^{ab}
4	B8	26,17 ± 0,42 ^{a}	26,10 ± 0,10 ^{a}	25,77 ± 0,25 ^{a}
5	45K	20,07 ± 0,31 ^{cd}	19,37 ± 0,15 ^{cd}	18,73 ± 0,21 ^{cd}
6	46K	22,23 ± 0,38 ^{bc}	22,93 ± 0,21 ^{bc}	22,97 ± 0,15 ^{b}
7	101	23,20 ± 0,36 ^{b}	22,53 ± 0,06 ^{bc}	21,23 ± 0,31 ^{bc}
8	112	23,93 ± 0,31 ^{b}	22,87 ± 0,23 ^{bc}	21,90 ± 0,79 ^{bc}
9	118	21,03 ± 0,15 ^{c}	18,17 ± 0,15 ^{d}	20,10 ± 0,10 ^{c}
10	137	21,03 ± 0,15 ^{c}	20,47 ± 0,06 ^{c}	20,67 ± 0,31 ^{c}
11	HL6	18,30 ± 0,18 ^{d}	18,45 ± 0,15 ^{d}	17,68 ± 0,20 ^{d}

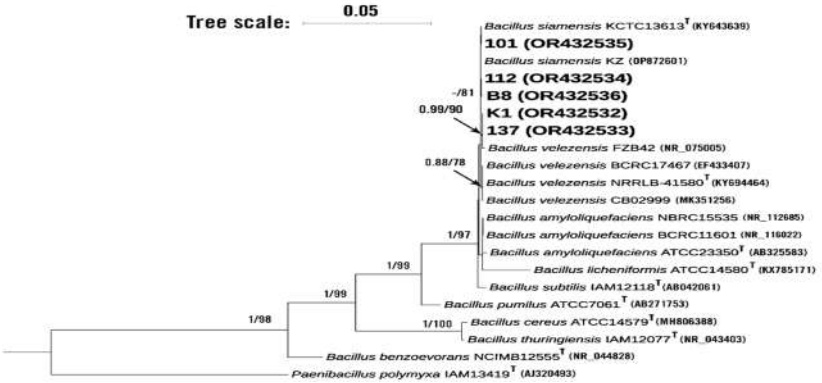
Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD.



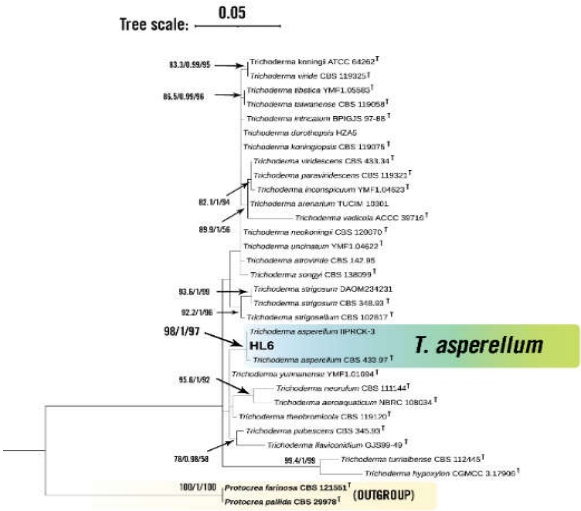
***Hình 3.9**. Hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase (A), chitinase (B) và cellulase (C) của một số chủng vi sinh vật phân lập*

3.2.3. Định danh các chủng vi sinh vật sau sàng lọc đối kháng và hoạt tính enzyme ngoại bào

06 mẫu VSV phân lập đối kháng mạnh, hoạt tính enzyme ngoại bào cao trong nghiên cứu được định danh hình thái kết hợp phân tử, kết quả 5 mẫu vi khuẩn phân lập đều thuộc chi *Bacillus* và đặt tên lần lượt là *B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* K1 và *B. velezensis* 137 (Hình 3.11); chủng nấm HL6 được xác định là *T. asperellum* (Hình 3.13.)



***Hình 3.11.** Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của các chủng phân lập B8, K1, 101, 112, 137*



Hình 3.13. *Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm HL6.*

3.2.4. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đối kháng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc

Xử lý hạt lạc L14 bằng 6 chủng VSV tuyển chọn, kết quả tỉ lệ nảy mầm cao (98,33–99,67%), tương đương đối chứng và không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3.2.5. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của các chủng vi sinh vật đối kháng riêng rẽ trong điều kiện nhà lưới

Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen do chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 ở nhà lưới, ghi nhận các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* thể hiện mức đối kháng tương đối ổn định hơn so với các chủng *Trichoderma* HL6, *B. siamensis* B8 và *B. velezensis* K1 trong cùng điều kiện thử nghiệm. Tổng hợp các kết quả trên, lựa chọn ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 cho các nghiên cứu tiếp.

3.2.6. Khả năng tương thích giữa các chủng *Bacillus* được tuyển chọn

Kết quả cấy vạch chéo trên môi trường thạch LB trong 48 giờ cho thấy cả ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều phát triển bình thường, tại vị trí tiếp xúc giữa các chủng không xuất hiện vùng ức chế sinh trưởng (Hình 3.14).



Hình 3.14. *Khả năng tương thích của ba chủng B. siamensis 101, B. siamensis 112 và B. velezensis 137 trên môi trường LBA sau 48 giờ nuôi cấy.*

3.2.7. Khả năng đối kháng *A. niger* của các chủng *Bacillus* và vai trò phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase trong điều kiện *in vitro*

3.2.7.1. Khả năng đối kháng và ức chế A. niger trên môi trường đặc

Bảng 3.12. *Khả năng ức chế nấm bệnh A. niger của dịch nuôi cấy thô đã loại bỏ tế bào*

Chủng vi khuẩn	Đường kính ức chế sinh trưởng các chủng nấm bệnh (mm)	
	***A.niger* QT1**	***A.niger* H17**
B. siamensis 101	26,6± 0,54 [c]	21,1± 0,44 [c]
B. siamensis 112	25,4±0,46 [c]	20,3±0,46 [c]
B. velezensis 137	28,3±0,61 [b]	23,5±0,53 [b]
Hỗn hợp	**30,8±0,58 [a]**	**26,8±0,66 [a]**
Đối chứng	0,0±0,00 [d]	0,0±0,00 [d]

3.2.7.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)

Phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đơn lẻ của *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều có MIC = MFC = 0,4 U/mL đối với *A. niger* QT1 và H17; khi phối hợp phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* trên theo tỉ lệ 1:1:1, hiệu quả diệt nấm tăng rõ rệt với MIC/MFC lần lượt là 0,1/0,2 U/mL (QT1) và 0,2/0,4 U/mL (H17), với tỉ lệ MFC/MIC = 2 (Bảng 3.13).

Bảng 3.13. *Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)*

Nguồn enzyme	Kiểm soát nấm bệnh *A. niger* QT1			Kiểm soát nấm bệnh *A. niger H17*		
	MIC	MFC	MFC/MIC	MIC	MFC	MFC/MIC
B. siamensis 101	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
B. siamensis 112	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
B. velezensis 137	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
Hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus*	**0,1**	**0,2**	**2**	**0,2**	**0,4**	**2**

MFC là giá trị hoạt độ ở vi giếng được cấy trải lên môi trường PDA không quan sát thấy sự phát triển của nấm sau 48 giờ.

3.2.7.3. Khả năng làm giảm sinh khối A.niger trong môi trường lỏng

Khả năng ức chế sinh khối nấm bệnh của các chủng vi khuẩn riêng lẽ và hỗn hợp được thể hiện ở Bảng 3.14, 3.15 và Hình 3.18, 3.19.

Bảng 3.14. *Ảnh hưởng của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đến sinh khối (khô) của A. niger QT1*

Nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào	Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (U/mL)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
B. siamensis 101	**39,19±1,22**	36,33±1,15 ^{dA}	23,22± 2,17 ^{cB}	18,13±1,05 ^{bC}	13,50±0,68 ^{aC}
B. siamensis 112	**39,19±1,22**	36,00±1,01 ^{dA}	22,80±1,79 ^{cB}	17,27±0,82 ^{bC}	12,62±1,37 ^{aBC}
B. velezensis 137	**39,19±1,22**	35,72±1,80 ^{dA}	21,14±0,38 ^{cB}	13,79±0,60 ^{bB}	10,59±0,44 ^{aB}
Hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus*	**39,19±1,22**	**35,29±1,23** ^{dA}	**16,68±1,55** ^{cA}	**10,46±0,42** ^{bA}	**6,43±0,71** ^{aA}

Kết quả ANOVA hai yếu tố

Nguồn biến thiên	df	F	p
Nguồn enzyme (Yếu tố 1)	3; 32	52,632	< 0,001
Hoạt độ enzyme (Yếu tố 2)	3; 32	1007,792	< 0,001
Tương tác (nguồn enzyme x hoạt độ enzyme)	9; 32	4,383	0,001

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (M ± SD; n = 3). Trong cùng một hàng, các giá trị mang chữ

cái thường khác nhau (a–d) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mức hoạt độ enzyme; trong cùng một cột, các giá trị mang chữ cái hoa khác nhau (A–C) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nguồn enzyme (p < 0,05; so sánh từng cặp có điều chỉnh Bonferroni). Phân tích ANOVA hai yếu tố được thực hiện trên 16 tổ hợp nguồn enzyme × hoạt độ enzyme, không bao gồm đối chứng chung 0 U/mL. Kiểm định Levene không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phương sai giữa các nhóm (p = 0,201).

Bảng 3.15. *Ảnh hưởng của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đến sinh khối khô của A. niger H17*

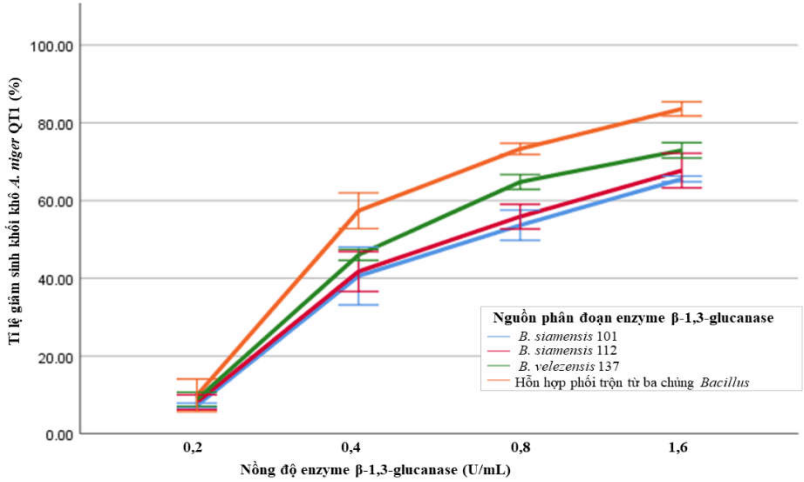
Nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào	**Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (U/mL)**				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
B. siamensis 101	**31,93±2,00**	30,60±1,62 ^{cA}	22,54±1,25 ^{bB}	16,34±1,10 ^{aB}	13,94±0,77 ^{aB}
B. siamensis 112	**31,93±2,00**	30,14±2,03 ^{cA}	21,34±2,19 ^{bB}	15,19±1,23 ^{aB}	12,88±0,98 ^{aB}
B. velezensis 137	**31,93±2,00**	29,85±1,26 ^{cA}	19,44±3,19 ^{bB}	13,23±1,03 ^{aBA}	10,63±1,57 ^{aBA}
Hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus*	**31,93±2,00**	**29,68±2,28** ^{cA}	**15,40±1,93** ^{bA}	**10,30±1,10** ^{aA}	**7,53±1,00** ^{aA}

Kết quả ANOVA hai yếu tố

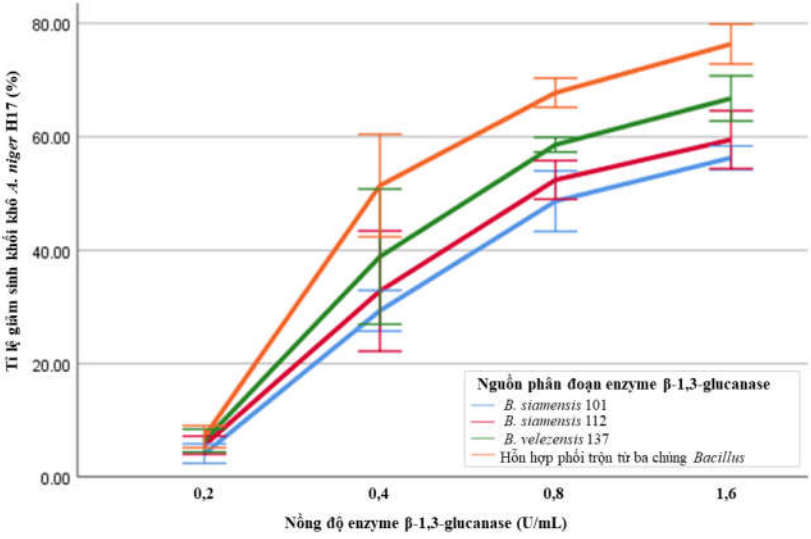
Nguồn biến thiên	df	F	p
Nguồn enzyme (Yếu tố 1)	3; 32	22,075	< 0,001
Hoạt độ enzyme (Yếu tố 2)	3; 32	307,487	< 0,001
Tương tác (nguồn enzyme x hoạt độ enzyme)	9; 32	1,784	0,110

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (M ± SD; n = 3). Trong cùng một hàng, các giá trị mang chữ cái thường khác nhau (a–c) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mức hoạt độ enzyme; trong cùng một cột, các giá trị mang chữ cái hoa không có ký tự chung (A–B) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nguồn enzyme (p < 0,05; so sánh từng cặp có điều chỉnh Bonferroni). Phân tích ANOVA hai yếu tố được thực hiện

trên 16 tổ hợp nguồn enzyme × hoạt độ enzyme, không bao gồm đối chứng chung 0 U/mL. Kiểm định Levene không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phương sai giữa các nhóm (p = 0,262).



Hình 3.18. *Tỉ lệ % giảm sinh khối khô của A. niger QT1 dưới tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase*



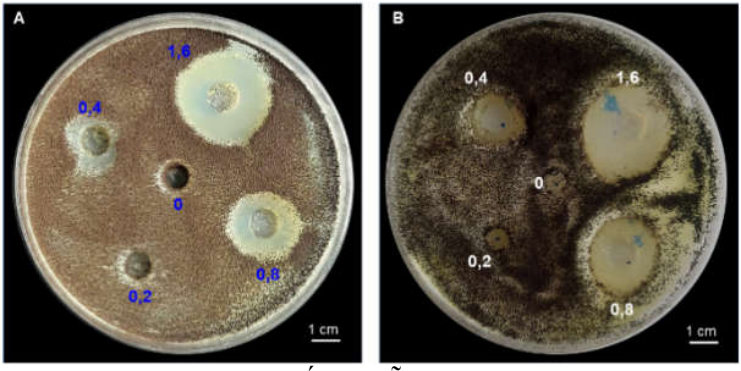
Hình 3.19. *Tỉ lệ % giảm sinh khối khô của A. niger H17 dưới tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase*

3.2.7.4 Mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế A. niger

Bảng 3.16*. Khả năng ức chế A. niger của hỗn hợp phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase ở các mức hoạt độ khác nhau trên đĩa thạch*

Nồng độ (U/mL)	Đường kính ức chế sinh trưởng các chủng nấm bệnh (mm)	
	***A.niger* QT1**	***A.niger* H17**
0 (Đối chứng)	0,0± 0,00	0,0± 0,00
0,2	ND	ND
0,4	23,5±0,49 [c]	20,7±0,43 [c]
0,8	26,4±0,17 [b]	25,2±0,17 [b]
1,6	33,3±0,19 [a]	30,3±0,31 [a]

ND (Not determined): không xác định. Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD.



Hình 3.20. *Khả năng ức chế của hỗn hợp phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ ba chủng Bacillus đối với chủng nấm A. niger QT1 (**A**) và A. niger H17 (**B**)*

Bảng 3.17. *Các thông số hồi quy tuyến tính giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính đối kháng nấm A. niger*

Chủng nấm bệnh	Phương trình hồi quy (y = ax + b)	Hệ số xác định (R^2)	Mức ý nghĩa (p)
A. niger QT1	y = 18,609x + 6,843	0,634	0,002
A. niger H17	y = 17,191x + 6,157	0,641	0,002

Kết quả ở Bảng 3.16, 3.17 và Hình 3.20 cung cấp thêm bằng chứng thực nghiệm về sự liên quan của β-1,3-glucanase tham gia vào hoạt tính đối kháng *A. niger*.

3.2.7.5. Tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đến hình thái sợi nấm A. niger

Quan sát ảnh SEM, mẫu đối chứng có hình thái sợi nấm bình thường, trong khi xử lý bằng enzyme β-1,3-glucanase gây biến dạng và nứt vỡ, tạo các lỗ thủng trên thành tế bào sợi nấm.

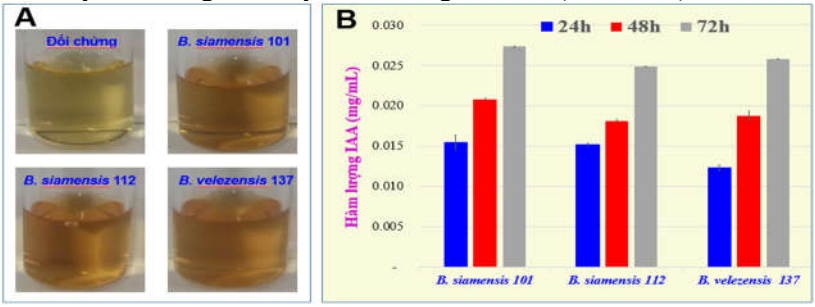
3.2.8. Một số đặc tính liên quan đến an toàn sinh học và khả năng trợ sinh của các chủng *Bacillus* được tuyển chọn

Hoạt tính tan máu trên môi trường thạch máu: Kết quả, cả 3 chủng vi khuẩn *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều không để lại biểu hiện hoạt tính làm tan máu trên đĩa thạch trong điều kiện thử nghiệm.

Độ nhạy cảm với kháng sinh: Cả 3 chủng vi khuẩn *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều mẫn cảm với 6 loại kháng sinh Tetracyline (30µg), Chloramphenicol (30 µg), Trimethoprim (25µg), Levofloxacin (Lv-5µg), Gentamicin (Ge-10 µg) và Streptomycin (Sm-10 µg).

Độc tính cấp tính đối với giun đất: Ba chủng vi khuẩn *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137, sử dụng đơn lẻ hoặc phối hợp (10^7–10^9 CFU/g đất khô), chưa ghi nhận tác động gây độc cấp tính đối với giun đất *Eisenia fetida* sau 14 ngày phơi nhiễm. Tỉ lệ chết (5,00–7,50%) và giảm sinh khối (10,29–10,99%) không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p > 0,05$), phù hợp với tiêu chí đánh giá theo TCVN 5961:1995 và ISO 11268-1:2012.

Khả năng sinh IAA: Ba chủng vi khuẩn *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều có khả năng sản xuất IAA, với hàm lượng tăng theo thời gian nuôi cấy và đạt cao nhất sau 72 giờ, dao động từ 0,025–0,027 mg/mL, không khác biệt đáng kể giữa các chủng, cho thấy tiềm năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Hình 3.24).

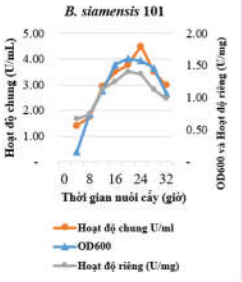


Hình 3.24. *Định tính khả năng sinh Indole-3-acetic acid (IAA) của ba chủng Bacillus được tuyển chọn (**A**), xác định hàm lượng IAA (**B**)*

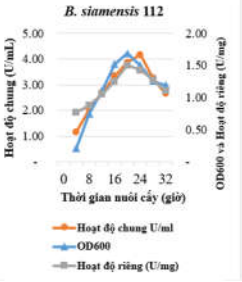
3.3. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HOẠT ĐỘ VÀ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME β-1,3-GLUCANASE CỦA CÁC CHỦNG *BACILLUS* ĐƯỢC TUYỂN CHỌN

3.3.1. Sự biến đổi hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase theo thời gian nuôi cấy

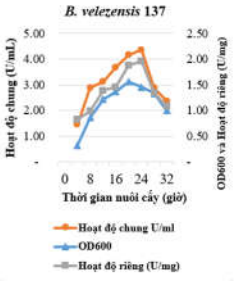
Thời điểm thích hợp thu enzyme là 20–24 giờ cho cả ba chủng vi khuẩn*: B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, và *B. velezensis* 137 (Hình 3.25, 3.26 và 3.27).



Hình 3.25. *Hoạt độ β-1,3-glucanase của B. siamensis 101 theo thời gian nuôi cấy*



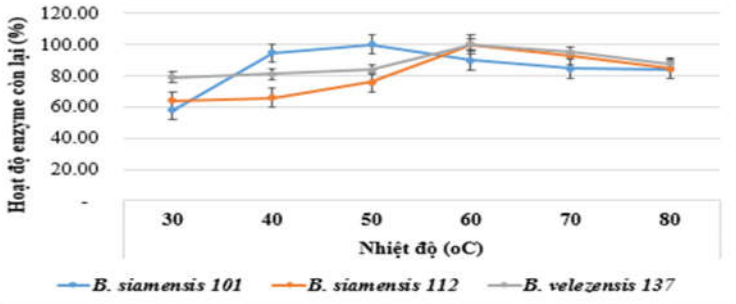
Hình 3.26. *Hoạt độ β-1,3-glucanase của B. siamensis 112 theo thời gian nuôi cấy*



Hình 3.27. *Hoạt độ β-1,3-glucanase của B. velezensis 137 theo thời gian nuôi cấy*

3.3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

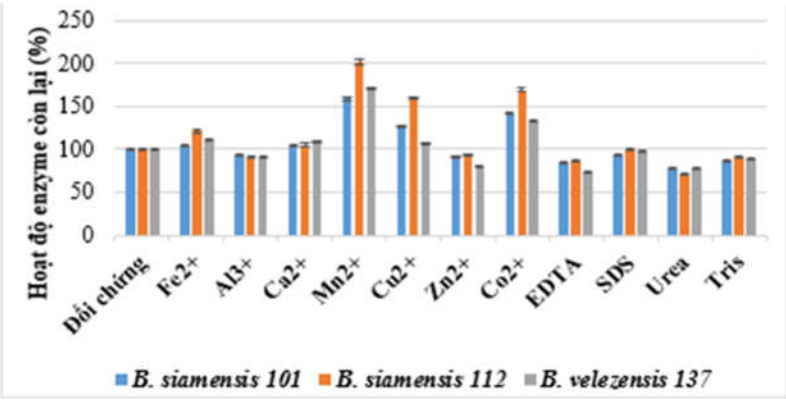
Ảnh hưởng của nhiệt độ: Hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* đạt cực đại trong khoảng 50–60°C; *B. siamensis* 101 cực đại ở 50°C, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 cực đại ở 60°C (Hình 3.28).



Hình 3.28. *Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng Bacillus được tuyển chọn*

Ảnh hưởng của pH: Enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* đều cho hoạt độ tối ưu tại pH 5,0 và giảm mạnh ở pH quá axit hoặc quá kiềm.

Ảnh hưởng của ion kim loại và các chất hóa học: Mn^{2+} và Co^{2+} làm tăng hoạt độ β-1,3-glucanase của ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 lên 132–202% so với đối chứng; trong khi EDTA, Urea và Tris làm giảm đáng kể hoạt độ enzyme (70–91%) (Hình 3.30).



Hình 3.30. *Ảnh hưởng ion kim loại và các chất hóa học đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng Bacillus được tuyển chọn*

3.3.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase

Ảnh hưởng của nguồn cacbon: bột ngô và curdlan làm nguồn carbon cho kết quả sinh tổng hợp β-1,3-glucanase trong 24 giờ nuôi cấy tương đương nhau và cao hơn đại mạch, lúa mì.

Ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy: Môi trường LB được xác định là phù hợp nhất để nuôi cấy các chủng *Bacillus* trong số bốn môi trường khảo sát (LB, MPB, NB và NBY).

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung: Cao nấm men là nguồn nitơ phù hợp nhất trong số các nguồn khảo sát (Cao nấm men, tryptone và peptone).

Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống: Tỉ lệ cấy giống 7% cho kết quả tối ưu trong điều kiện khảo sát (Bảng 3.23).

Bảng 3.23. *Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

Tỉ lệ cấy giống (%)	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)
1	0,93±0,44^c	1,51±0,21^b	1,70±0,20^c	2,40±0,41^b	1,88±0,51^c	1,81±0,34^b
5	3,89±0,23^b	**7,20±0,61^a**	**3,92±0,21^a**	**8,40±0,31^a**	3,90±0,11^b	**7,33±0,54^a**
7	**4,98±0,11^a**	**7,71±0,43^a**	**4,32±0,20^a**	**8,50±0,22^a**	**4,39±0,41^a**	**8,80±0,41^a**
10	**3,92±0,12^a**	**7,42±0,41^a**	3,72±0,24^b	**8,11±0,63^a**	3,80±0,40^b	**8,32±0,32^a**

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p < 0,05 (Duncan's test). M ± SD. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô ; 1 % (w/v) cao nấm men, 30 ^{o}C, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: Trong phạm vi khảo sát, thời gian 24 giờ nuôi cấy là điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus* (Bảng 3.24).

Bảng 3.24. *Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và tích lũy enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

Thời gian (giờ)	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)
0	0,19±0,10^c	**0,00002±0,3^a**	2,60±0,13^b	**0,00002±0,51^a**	0,58±0,33 ^{c}	**0,000015±0,50^a**
24	**5,15±0,40^a**	**7,52±0,51^a**	**4,40±0,21^a**	**8,94 ±0,90** ^{a}	**4,41±0,51^a**	**8,44±0,53**^{a}
36	3,66±0,52^b	**6,34±0,53^a**	3,92±0,24^b	**7,72 ±0,91^a**	**3,90±0,14^a**	**7,34±0,81^a**
48	1,63±0,53^c	**3,62±1,14^a**	1,96±0,41^c	**4,22 ±0,54^a**	2,08±0,93^b	**3,82 ±1,14^a**

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p < 0,05 (Ducan's test). M ± SD. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô; 1 % (w/v) cao nấm men, tỉ lệ cấy giống 7 %, 30 ^{o}C, pH 7,0, 150 rpm.

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: Trong phạm vi khảo sát, nhiệt độ 30°C là điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus* (Bảng 3.25).

Bảng 3.25. *Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

t°C	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)
25	3,01±0,62^b	0,33±0,12^b	**3,06±0,63^a**	0,40±0,34^b	3,17^b±0,73	0,50±0,21^b
30	**5,24±0,44^a**	**7,42±0,23^a**	**4,49±0,11^a**	**9,11±0,52^a**	**4,52±0,54^a**	**8,24±0,41^a**
35	3,9±0,42^b	**7,02±0,60^a**	**3,66±0,32^a**	**8,82±0,43^a**	**3,52±0,52^a**	**8,52±0,54^a**
37	2,91±0,60^b	**7,04±0,51^a**	**2,79±0,44^a**	**8,14±0,31^a**	2,59±0,40^b	**7,91±0,72^a**

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy: trong phạm vi khảo sát, pH 7,0 là điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus* (Bảng 3.26).

Bảng 3.26. *Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

pH	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối (x10^9 CFU/mL)
5,0	3,01±0,91^c	0,16±0,3^c	2,80±0,50^b	0,52±0,4^b	2,85±0,41^c	0,23±0,62^c
6,0	3,51±0,32^c	0,31±0,62^c	3,62±0,44^b	**0,71±0,41^a**	3,64±0,10^b	0,50±0,31^c
6,5	4,21±0,50^b	**7,12±0,74^a**	3,67±0,32^b	**8,40±0,82^a**	3,74±0,34^b	8,11±0,50^{ab}
7,0	**5,43±0,34^a**	**7,63±0,82^a**	**4,53±0,10^a**	**8,84±0,53^a**	**4,52 ± 0,51^a**	**8,51±0,62^a**
7,5	4,17±0,11^b	4,51±0,50^b	3,50±0,42^b	**6,40±0,33^a**	3,04±0,62^b	7,01±0,22^{ab}
8,0	2,86±0,21^c	2,30±0,44^b	3,21±0,50^b	3,82±0,60^b	2,24±0,63^c	5,23±0,44^b

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Ducan's test). M ± SD. Điều kiện nuôi cấy: 1% (w/v) bột ngô; 1% (w/v) cao nấm men; tỉ lệ cấy giống 7%; 30 °C; 150 rpm; thời gian 24 giờ.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc: Trong phạm vi khảo sát, tốc độ lắc 150 rpm, là điều kiện thích hợp nhất cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus*.

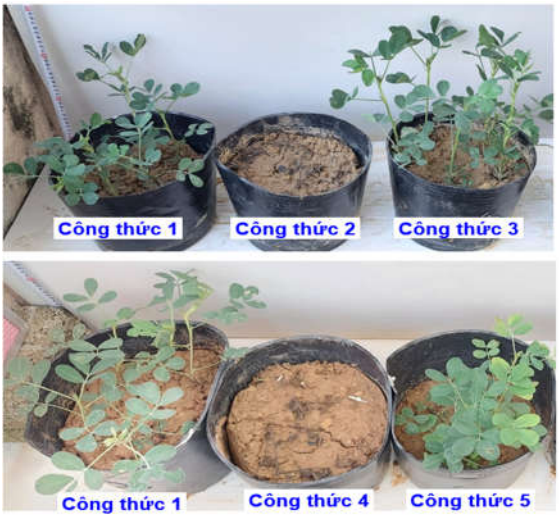
Các thông số môi trường cho nuôi cấy thu enzyme β-1,3-glucanase: LB lỏng; nguồn N bổ sung là nấm men; tỉ lệ cấy giống: 7%; thời gian nuôi cấy: 24 giờ; nhiệt độ nuôi cấy: 30-35° C; pH môi trường nuôi cấy là 7,0; tốc độ lắc: 150rpm.

3.4. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng

3.4.1. Hiệu quả phòng trừ bệnh trong điều kiện nhà lưới

Ở nghiệm thức đối chứng âm (CT1) duy trì tỉ lệ cây lạc bị chết là 0,00% trong suốt 45 ngày thí nghiệm. Sau nhiễm nấm bệnh chủng *A. niger* QT1 ở nồng độ 10^6 bào tử/mL, nghiệm thức đối chứng bệnh (CT2) ghi nhận tỉ lệ cây chết với biểu hiện bệnh héo rũ gốc mốc đen điển hình là 26,67 % ở 5 ngày sau nhiễm nấm bệnh, tăng lên 60,00 % ở 7 ngày sau nhiễm và 100 % ở 14 ngày sau nhiễm. Trong khi đó, nghiệm thức (CT3) xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) giai đoạn hạt và cây con với nồng độ 10^8 CFU/mL không xuất hiện bệnh héo rũ gốc mốc đen và duy trì tỉ lệ chết 0% trong suốt 45 ngày sau nhiễm nấm bệnh.

Tương tự, sau nhiễm nấm bệnh chủng *A. niger* H17 ở nồng độ 10^6 bào tử/mL, nghiệm thức đối chứng bệnh CT4, tỉ lệ cây biểu hiện bệnh héo rũ gốc mốc đen điển hình chết ghi nhận là 26,67 % ở 5 ngày sau nhiễm nấm bệnh, tăng lên 60,00 % ở 14 ngày sau nhiễm và chết 100 % ở 21 ngày sau nhiễm. Ở nghiệm thức CT5 xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy của ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) giai đoạn hạt và cây con với nồng độ 10^8 CFU/mL cho hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen đạt 73,33% trong suốt 45 ngày sau nhiễm nấm bệnh (Hình 3.31). Các nghiệm thức xử lý có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$).



Hình 3.31. *Hiệu lực phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus (B. siamensis 101, B. siamensis 112 và B. velezensis 137) trong điều kiện nhà lưới: CT 1: Không nhiễm nấm, xử lý nước vô trùng (đối chứng âm); CT 2: Nhiễm A. niger QT1, xử lý nước vô trùng (đối chứng bệnh); CT 3: Nhiễm A. niger QT1, xử lý hỗn hợp dịch nuôi 3 vi khuẩn; CT 4: Nhiễm A. niger H17, xử lý nước vô trùng (đối chứng bệnh); CT5: Nhiễm A. niger H17, xử lý hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus.*

3.4.2. Hiệu quả thử nghiệm trên đồng ruộng

Ảnh hưởng chiều cao thân chính: Tại cả bốn vùng thử nghiệm (Phú Vang, Hương Trà, Nam Hải Lăng và Triệu Phong), nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* làm tăng chiều cao thân chính cây lạc L14 so với đối chứng âm.

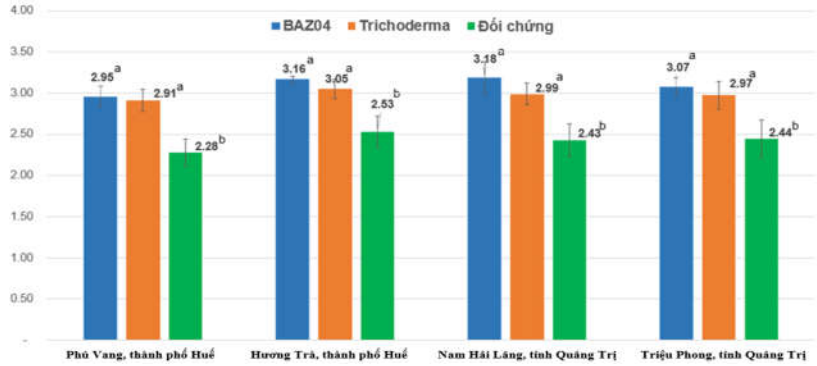
Ảnh hưởng của hỗn hợp *Bacillus* đến bệnh héo rũ gốc mốc đen: cả bốn địa điểm thử nghiệm (Phú Vang, Hương Trà, Nam Hải Lăng và Triệu Phong), tỉ lệ cây lạc chết do bệnh héo rũ gốc mốc đen ở nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* (CT1) đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng âm (CT3) ở mức $LSD_{0,05}$ (Bảng 3.32).

Bảng 3.32. *Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến tỉ lệ cây chết do bệnh héo rũ gốc mốc đen trên lạc giống L14 tại các địa điểm nghiên cứu (%)*

Công thức	Phú Vang, thành phố Huế	Hương Trà, thành phố Huế	Nam Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị	Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị
Hỗn hợp dịch nuôi 3 chủng *Bacillus* (CT1)	**3,57 ±0,33 b**	**1,16 ± 0,06 b**	**1,38 ± 0,11 b**	**2,11 ± 0,20 b**
Trichoderma (CT2)	4,08 ± 0,31b	1,75 ± 0,11b	1,78 ± 0,14 b	2,21 ± 0,28 b
Đối chứng âm (CT3)	**10,71±1,05a**	**6,57 ± 0,62 a**	**4,13 ± 0,35 a**	**8,16 ± 0,69 a**
LSD 0.05	*2,61*	*3,05*	*1,07*	*2,13*

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với p < 0,05

Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến năng suất lạc: Tại cả bốn địa điểm thử nghiệm trên giống lạc L14, nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* (CT1) cho năng suất thực thu đạt 2,95–3,18 tấn/ha, cao hơn đối chứng âm (2,28–2,53 tấn/ha), tương ứng mức tăng 0,63–0,75 tấn/ha (24,9–30,86%) (Hình 3.32).



Hình 3.32. *Năng suất lạc trên các địa điểm thử nghiệm ở Hương Trà, Phú Vang, Triệu Phong và Nam Hải Lăng. Các chữ cái khác nhau trên cùng một khu vực chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p < 0,05 (Duncan's test). M ± SD..*

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Dựa trên các kết quả nghiên cứu đạt được, luận án đưa ra các kết luận như sau:

1. Đã phân lập được 60 mẫu nấm từ cây lạc bị bệnh héo rũ gốc mốc đen tại Quảng Trị và thành phố Huế. Kiểm tra theo quy tắc Koch và đánh giá độc tính trên 09 chủng tuyển chọn cho thấy tỉ lệ cây chết đạt 85,7–100%. Trên cơ sở kết hợp đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS-rDNA, hai chủng đại diện có khả năng gây bệnh cao nhất gây chết 100% (QT1 và H17) được định danh sơ bộ là *Aspergillus niger*, được ký hiệu là *A. niger* QT1 và *A. niger* H17.

2. Tuyển chọn được 03 chủng vi khuẩn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112; *B. velezensis* 137) bản địa đối kháng ổn định với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và *A. niger* H17. Ba chủng *Bacillus* được lựa chọn có biểu hiện enzyme ngoại bào chitinase, β-1,3-glucanase, cellulase; sinh IAA và đáp ứng các tiêu chí an toàn sinh học được khảo sát như không gây tan máu, không độc với giun đất (10^9 CFU/g đất khô), mẫn cảm với 06 loại kháng sinh (tetracyline, chloramphenicol, trimethoprim, levofloxacin, gentamicin và streptomycin) và không ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm hạt lạc.

3. Trong khảo sát đơn yếu tố, phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ 03 chủng vi khuẩn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) đạt hoạt tính cao nhất ở pH 5,0, nhiệt độ phản ứng 50 – 60 °C, tăng hoạt tính bởi Mn^{2+}, Co^{2+}, bị ức chế mạnh bởi EDTA và urea. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho ba chủng *Bacillus* thu dịch enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase là: LB lỏng (bổ sung 1% bột ngô, 1% cao nấm men), pH 7,0, nhiệt độ nuôi cấy 30 – 35 °C, tốc độ lắc150 rpm, tỉ lệ cấy giống 7% và thời gian nuôi 24 giờ. Phối trộn phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase tỉ lệ 1:1:1 theo thể tích làm giảm MIC (0,1 - 0,2 U/mL), MFC (0,2 - 0,4 U/mL) và gây biến dạng, nứt vỡ thành tế bào *A. niger* QT1 và H17 qua quan sát SEM.

4. Hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy 3 chủng vi khuẩn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112; *B. velezensis* 137) tỉ lệ 1 : 1 : 1 theo thể tích ở mật độ tế bào 10^8 CFU/mL ức chế *A. niger* QT1 và H17 hiệu quả hơn chủng đơn lẻ trong điều kiện *in vitro* đồng thời giúp duy trì tỉ lệ cây lạc chết do bệnh héo rũ gốc mốc đen ở mức thấp (1,16 - 3,57%) và làm tăng năng suất thực thu dao động từ 24,90% đến 30,86% tại bốn địa điểm thử nghiệm đồng ruộng so với đối chứng âm.

Kiến nghị

Tiếp tục đánh giá hiệu lực phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp dịch nuôi cấy ba chủng vi khuẩn: *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 qua nhiều vụ trong điều kiện canh tác khác nhau và nghiên cứu ảnh hưởng lên vi sinh vật có ích trong đất; đồng thời nghiên cứu dạng chế phẩm, mật độ tế bào sống, độ ổn định, thời gian và điều kiện bảo quản, hiệu lực sau lưu kho làm cơ sở cho việc đánh giá khả năng ứng dụng trong phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc tại miền Trung./.

DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

[1]. Nguyen Xuan Hieu, Nguyen Thi Minh Nga, Nguyen Duc Huy, Nguyen Quang Co, Cao Thi Thuyet, Pham Thi Thuy Hoai, Nguyen Thi Thu Thuy (**2023**). **Identification and characterization of *Aspergillus niger* causing collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*)**. *Biodiversitas*, *24*(5). 2556-2562. **Scopus Q3.**

https://doi.org/10.13057/biodiv/d240507

[2]. Nguyen Thi Minh Nga, **Nguyen Xuan Hieu**, Nguyen Tien Long, Nguyen Duc Huy and Nguyen Thi Thu Thuy (**2024**). **Isolation and characterization of antagonistic bacterial strains for biocontrol of collar rot (*Aspergillus niger*) in groundnut (*Arachis hypogaea* L.).** *Chiang Mai J Sci 2024* 51(2): e2024022. **SCIE Q3**

https://doi.org/10.12982/CMJS.2024.022

[3]. Nguyen Xuan Hieu, Nguyen Duc Huy, Nguyen Tien Long, Cao Thi Thuyet, Pham Thi Thuy Hoai and Nguyen Thi Thu Thuy (**2024**). **Controlling soil-borne fungus *Aspergillus niger* in groundnut by optimizing the function of isolated *Bacillus* bacteria**. *Malaysian Applied Biology*, 53(2), 134-144. **Scopus Q4.**

https://doi.org/10.55230/mabjournal.v53i2.3012

[4]. Nguyễn Xuân Hiếu, Nguyễn Đức Huy, Tôn Đức Hồng, Nguyễn Tiến Long, Thái Thị Huyền, Nguyễn Thị Thu Thủy (**2024**). **Đánh giá khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma asperellum* HL6 đối với nấm *Aspergillus niger* Van Tieghem gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc**. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 133(3C), 41-55.

https://doi.org/10.26459/hueunijard.v133i3C.7496