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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Huế, 2026

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC
Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

Người hướng dẫn khoa học
PGS. TS. NGUYỄN THỊ THU THỦY

Huế, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng luận án này là công trình nghiên cứu độc lập của bản thân tôi và một số kết quả cộng tác với các cộng sự khác. Các kết quả nghiên cứu, số liệu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được sử dụng để bảo vệ cho bất kỳ học vị nào trước đây. Một phần số liệu đã được công bố trên các tạp chí, báo cáo chuyên ngành với sự đồng ý và chấp thuận của các đồng tác giả. Phần còn lại chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi cũng cam kết đã ghi rõ nguồn gốc tất cả các thông tin, số liệu và tài liệu tham khảo sử dụng trong luận án. Mọi sự hỗ trợ, giúp đỡ trong quá trình thực hiện luận án đều đã được trân trọng ghi nhận và cảm ơn đầy đủ.

Nếu có bất kỳ vi phạm nào liên quan đến tính trung thực và bản quyền của luận án, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm theo quy định của đơn vị đào tạo.

Huế, ngày 26 tháng 10 năm 2026

TÁC GIẢ LUẬN ÁN



Nguyễn Xuân Hiếu

LỜI CẢM ƠN

*Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và tri ân chân thành tới **PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Thủy** và **TS. Nguyễn Đức Huy** – những người thầy, người cô đã tận tâm hướng dẫn, dìu dắt và luôn đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án. Sự tận tụy, kiên nhẫn, những góp ý khoa học sâu sắc cùng sự động viên kịp thời của quý thầy cô không chỉ giúp tôi hoàn thiện luận án, mà còn tiếp thêm cho tôi niềm tin và bản lĩnh trên con đường nghiên cứu khoa học.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học**, cùng các phòng chức năng của Viện và **Đại học Huế** đã tạo điều kiện thuận lợi và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu tại Viện.*

*Xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các anh chị, đồng nghiệp tại **phòng thí nghiệm Công nghệ Gene** và **phòng thí nghiệm Enzyme – Protein**, các thành viên đề tài **CT-2022.09.DHH.04**, cùng các học viên cao học, sinh viên đã đồng hành, sẻ chia và hỗ trợ tôi bằng tinh thần hợp tác chân thành và trách nhiệm.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Quỹ Đổi mới Sáng tạo Vingroup (VINIF)** và **Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINBIGDATA)** vì sự hỗ trợ quý báu, không chỉ về tài chính mà còn là nguồn động viên to lớn để tôi kiên trì theo đuổi mục tiêu nghiên cứu. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới bà con nông dân địa phương đã nhiệt tình hợp tác, tạo điều kiện cho khảo sát và thực nghiệm, đồng thời chia sẻ những kinh nghiệm thực tiễn quý giá.*

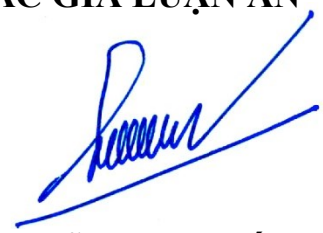
*Tôi xin trân trọng cảm ơn **Ban Giám đốc Sở giáo dục và Đào tạo Quảng Trị, Phòng Giáo dục phổ thông, Phòng Tổ chức cán bộ, Chi bộ, Ban Giám hiệu và tập thể Trường THCS&THPT Cửa Việt** đã tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành Chương trình đào tạo tiến sĩ.*

*Cuối cùng, tôi xin dành lòng biết ơn sâu sắc nhất tới **cha mẹ**, **đại gia đình**, đặc biệt là **người vợ – Lê Thị Hồng Cẩn**, đã lặng lẽ hy sinh, chăm lo hậu phương và luôn là chỗ dựa tinh thần vững chắc để tôi có thể toàn tâm hoàn thành luận án này.*

Trân trọng và biết ơn.

Huế, ngày 26 tháng 10 năm 2026

TÁC GIẢ LUẬN ÁN



Nguyễn Xuân Hiếu

KÝ HIỆU VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải thích
BAZ04	Ký hiệu hỗn hợp dịch nuôi cấy của ba chủng vi khuẩn đối kháng *Bacillus siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137
BCA	Biological Control Agent (tác nhân kiểm soát sinh học)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (công cụ tìm kiếm tương đồng trình tự cục bộ)
BNNPTNT	Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn
bp	Base pair (cặp base)
BVTV	Bảo vệ thực vật
CNSH	Công nghệ sinh học
CS	Cộng sự
CT	Công thức
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CWDEs	Cell Wall-Degrading Enzymes (các enzyme phân giải thành tế bào)
DNA	Deoxyribonucleic acid (axit deoxyribonucleic)
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid (axit 3,5-dinitrosalicylic)
ĐC	Đối chứng
HRGMĐ	Héo rũ gốc mốc đen
IAA	Indole-3-acetic acid (axit indole-3-acetic)
ITS	Internal Transcribed Spacer (vùng đệm phiên mã nội bộ)
LB	Luria–Bertani (môi trường nuôi cấy LB)
M ± SD	Mean ± Standard Deviation (trung bình ± độ lệch chuẩn)
MFC	Minimum Fungicidal Concentration (nồng độ diệt nấm tối thiểu)
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (nồng độ ức chế tối thiểu)
NSLT	Năng suất lý thuyết
NSNNB	Ngày sau nhiễm nấm bệnh
NSTT	Năng suất thực thu
OD	Optical Density (mật độ quang)

Chữ viết tắt	Giải thích
PCR	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymerase)
PDA	Potato Dextrose Agar (môi trường thạch khoai tây dextrose)
PDB	Potato Dextrose Broth (môi trường dịch thể khoai tây dextrose)
PTP	Poisson Tree Processes (phương pháp phân định loài dựa trên cây phát sinh chủng loại)
QCVN	Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia Việt Nam
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (kỹ thuật phân tích đa hình DNA khuếch đại ngẫu nhiên)
RCBD	Randomized Complete Block Design (thiết kế khối hoàn toàn ngẫu nhiên)
RNA	Ribonucleic acid (axit ribonucleic)
SSR	Simple Sequence Repeat (trình tự lặp lại đơn giản)
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
TLB	Tỉ lệ bệnh
UV–Vis	Ultraviolet–Visible spectroscopy (quang phổ tử ngoại–khả kiến)
VSV	Vi sinh vật

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN ..... **i**
LỜI CẢM ƠN ..... **ii**
KÝ HIỆU VIẾT TẮT ..... **iii**
MỤC LỤC ..... **v**
DANH MỤC CÁC BẢNG ..... **x**
DANH MỤC CÁC HÌNH ..... **xiii**
MỞ ĐẦU **1**
1. Tính cấp thiết của đề tài 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 2
2.1. Mục tiêu chung 2
2.2. Mục tiêu cụ thể 2
3. Nội dung nghiên cứu 3
4. Đối tượng nghiên cứu 3
5. Phạm vi nghiên cứu 3
5.1. Thời gian nghiên cứu 3
5.2. Địa điểm nghiên cứu 3
6. Những đóng góp mới của luận án 3
7. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của luận án 4
7.1. Ý nghĩa khoa học 4
7.2. Ý nghĩa thực tiễn 4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU **5**
1.1. Cơ sở lý luận 5
1.1.1. Tổng quan về cây lạc 5
1.1.2. Nấm gây bệnh thực vật *Aspergillus niger* 5
1.1.2.1. Đặc điểm hình thái của *A. niger* 5
1.1.2.2. Cấu trúc thành tế bào nấm *A. niger* 8
1.1.2.3. Đặc điểm sinh học và cơ chế sinh sản của *A. Niger* 9
1.1.3. Bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc 10
1.1.3.1. Triệu chứng bệnh và tác hại của bệnh 10
1.1.3.2. Cơ chế xâm nhiễm, gây hại 11
1.1.3.3. Chu kỳ bệnh của nấm *A. niger* 11
1.1.4. Đối kháng sinh học trong kiểm soát nấm bệnh hại cây trồng 11
1.1.4.1. Khái niệm về đối kháng sinh học 11
1.1.4.2. Cơ chế đối kháng sinh học 12
1.1.4.3. Các nhóm vi sinh vật đối kháng tiềm năng 13
1.1.5. Hệ enzyme ngoại bào phân giải thành tế bào nấm 13
1.1.5.1. Cấu trúc và cơ chế thủy phân của enzyme β-1,3-glucanase 13

1.1.5.2. Các enzyme hỗ trợ phân giải thành tế bào nấm.....14
1.1.5.3. Sự phối hợp của các enzyme ngoại bào trong quá trình phân giải thành tế bào nấm.....15
1.1.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của vi sinh vật.....16
1.1.6.1. Yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase.....16
1.1.6.2. Yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của vi sinh vật.....16
1.2. Cơ sở thực tiễn.....17
1.2.1. Tình hình sản xuất lạc trên thế giới, Việt Nam và vùng nghiên cứu.....17
1.2.1.1. Trên thế giới.....17
1.2.1.2. Ở Việt Nam.....18
1.2.1.3. Ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.....19
1.2.2. Đặc điểm sinh thái vùng nghiên cứu.....19
1.2.3. Thực trạng bệnh héo rũ gốc mốc đen trên thế giới, Việt Nam và vùng nghiên cứu.....20
1.2.3.1. Trên thế giới.....20
1.2.3.2. Ở Việt Nam.....20
1.2.3.3. Ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.....20
1.2.4. Các biện pháp phòng trừ hiện nay và những hạn chế.....21
1.2.5. Sử dụng các chế phẩm sinh học thương mại và sự cần thiết của chủng bản địa.....22
1.3. Tình hình nghiên cứu đối kháng sinh học nấm *A. niger*.....23
1.3.1. Các nghiên cứu trên thế giới.....23
1.3.2. Các nghiên cứu tại Việt Nam.....23
1.3.3. Các nghiên cứu tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.....24
1.4. Các chiến lược kiểm soát nấm *Aspergillus* bằng vi khuẩn *Bacillus* và xu hướng nghiên cứu hiện đại.....24
1.4.1. Các chiến lược kiểm soát nấm *Aspergillus* bằng vi khuẩn *Bacillus*.....24
1.4.4. Ứng dụng công nghệ OMICS trong nghiên cứu cơ chế đối kháng của vi khuẩn *Bacillus*.....25
1.5. Tóm tắt tổng quan và định hướng nghiên cứu của luận án.....25
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....27
2.1. Vật liệu.....27
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....27
2.2.1. Phương pháp phân lập và xác định tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc.....27
2.2.1.1. Thu thập, phân lập và giám định sơ bộ nấm *Aspergillus* sp.....27
2.2.1.2. Kiểm chứng theo quy tắc Koch và tuyển chọn chủng nấm có khả năng gây bệnh cao.....28
2.2.1.3. Định danh bằng sinh học phân tử.....29

2.2.2. Phương pháp tuyển chọn chủng vi sinh vật bản địa đối kháng nấm *A. niger*.....30
2.2.2.1. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng vi sinh vật đối kháng nấm *A. niger* ...30
2.2.2.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật đối kháng và sinh enzyme ngoại bào 31
2.2.2.3. Định danh các chủng vi sinh vật sau sàng lọc đối kháng và hoạt tính enzyme ngoại bào 31
2.2.2.4. Sàng lọc các chủng vi sinh vật đối kháng dựa trên ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc 33
2.2.2.5. Sàng lọc các chủng vi sinh vật đối kháng dựa trên hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trong điều kiện nhà lưới 34
2.2.2.6. Đánh giá khả năng tương thích giữa các chủng *Bacillus* được tuyển chọn...35
2.2.3. Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng *A. niger* của các chủng *Bacillus* và vai trò của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase trong điều kiện *in vitro* 35
2.2.3.1. Đánh giá khả năng đối kháng và ức chế *A. niger* trên môi trường đặc ...35
2.2.3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC).....36
2.2.3.3. Đánh giá khả năng làm giảm sinh khối *A. niger* trong môi trường lỏng.37
2.2.3.4. Phân tích mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế *A. niger*.....38
2.2.3.5. Đánh giá tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đến hình thái sợi nấm *A. niger* 38
2.2.4. Phương pháp khảo sát một số đặc tính liên quan đến an toàn sinh học và khả năng trợ sinh các chủng *Bacillus* được tuyển chọn.....39
2.2.4.1. Khảo sát hoạt tính tan máu trên môi trường thạch máu 39
2.2.4.2. Khảo sát độ nhạy cảm với kháng sinh.....39
2.2.4.3. Khảo sát độc tính cấp tính đối với giun đất.....39
2.2.4.4. Khảo sát khả năng sinh IAA.....40
2.2.5. Phương pháp xác định hoạt độ, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme và khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase 40
2.2.5.1. Xác định hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và sự biến đổi hoạt độ theo thời gian nuôi cấy.....40
2.2.5.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase41
2.2.5.3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase.....42
2.2.6. Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp ba chủng *Bacillus* trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng 43
2.2.6.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh trong điều kiện nhà lưới.....43
2.2.6.2. Đánh giá hiệu quả thử nghiệm trên đồng ruộng.....44
2.3. Xử lý số liệu 46

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....47
3.1. Phân lập và xác định tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc.....47
3.1.1. Phân lập và nhận diện chủng nấm bệnh dựa trên đặc điểm hình thái.....47
3.1.2. Kiểm chứng theo quy tắc Koch và tuyển chọn chủng nấm có khả năng gây bệnh cao.....51
3.1.3. Định danh chủng nấm bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử.....53
3.2. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật bản địa đối kháng nấm *A. niger*.....55
3.2.1. Phân lập, sàng lọc sơ bộ các chủng vi sinh vật đối kháng nấm *A. niger*.....55
3.2.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật đối kháng và sinh enzyme ngoại bào.....61
3.2.3. Định danh các chủng vi sinh vật sau sàng lọc đối kháng và hoạt tính enzyme ngoại bào.....64
3.2.3.1. Định danh các chủng vi khuẩn.....64
3.2.3.2. Định danh chủng nấm.....70
3.2.4. Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đối kháng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc..73
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.....74
3.2.6. Khả năng tương thích giữa các chủng *Bacillus* được tuyển chọn.....77
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*.....77
3.2.7.1. Khả năng đối kháng và ức chế *A. niger* trên môi trường đặc.....78
3.2.7.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)..80
3.2.7.3. Khả năng làm giảm sinh khối *A.niger* trong môi trường lỏng.....82
3.2.7.4 Mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế *A. niger*.....89
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*.....90
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.....93
3.2.8.1. Hoạt tính tan máu trên môi trường thạch máu.....93
3.2.8.2. Độ nhạy cảm với kháng sinh.....93
3.2.8.3. Độc tính cấp tính đối với giun đất.....95
3.2.8.4. Khả năng sinh IAA.....97
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.....98
3.3.1. Sự biến đổi hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase theo thời gian nuôi cấy.....98
3.3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase.100
3.3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase.....100
3.3.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase.....101

3.3.2.3. Ảnh hưởng của ion kim loại và các chất hóa học đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase 102
3.3.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase 103
3.3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon 103
3.3.3.2. Ảnh hưởng của loại môi trường nuôi cấy 104
3.3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung 105
3.3.3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống 106
3.3.3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy 107
3.3.3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy 108
3.3.3.7. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy 108
3.3.3.8. Ảnh hưởng của tốc độ lắc 109
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 113
3.4.1. Hiệu quả phòng trừ bệnh trong điều kiện nhà lưới 113
3.4.2. Hiệu quả thử nghiệm trên đồng ruộng 116
3.4.2.1. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển cây lạc 116
3.4.2.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* 120
3.4.2.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến năng suất lạc 121
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ 127
TÀI LIỆU THAM KHẢO 128
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân bố β-1,3-glucanase trong các họ glycoside hydrolase 13
Bảng 1.2. Diện tích, năng suất và sản lượng lạc trên thế giới 18
Bảng 1.3. Diện tích, năng suất và sản lượng lạc ở Việt Nam 18
Bảng 2.1. Thông tin thu mẫu các chủng vi sinh vật lựa chọn nghiên cứu chuyên sâu .27
Bảng 2.2. Các nghiệm thức sàng lọc đối kháng *A. niger* ở nhà lưới 34
Bảng 2.3. Khả năng ức chế *A.niger* bằng phương pháp nuôi cấy kép trên môi trường đặc.... 36
Bảng 2.4. Nghiệm thức đánh giá hiệu lực ức chế nấm ở điều kiện nhà lưới 44
Bảng 2.5. Các nghiệm thức và liều lượng xử lý trong thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trên đồng ruộng.....45
Bảng 3.1. Đặc điểm các chủng nấm phân lập điển hình gây bệnh héo rũ gốc mốc đen tại các vùng khảo sát ở Quảng Trị và thành phố Huế 48
Bảng 3.2. Kết quả lây nhiễm nhân tạo các chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên giống lạc L14 trong điều kiện nhà lưới 51
Bảng 3.3. Khả năng kháng nấm *A. niger* của các chủng vi khuẩn phân lập.....55
Bảng 3.4. Khả năng đối kháng nấm *A. niger* của các chủng nấm phân lập.....57
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.....58
Bảng 3.6. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi sinh vật đối kháng 61
Bảng 3.7. Đặc tính hóa sinh của 5 chủng vi khuẩn đối kháng được phân lập sử dụng bộ kit API 50 CHB 66
Bảng 3.8. Chỉ số tương đồng vùng 16S rRNA giữa các chủng lựa chọn và chủng tham chiếu.....68
Bảng 3.9. Tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc L14, khi được xử lý bằng dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật đối kháng B8, K1, 101, 112, 137 và HL6.....74
Bảng 3.10. Sàng lọc khả năng phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của các chủng vi sinh vật đối kháng trong điều kiện nhà lưới.....76
Bảng 3.11. Khả năng đối kháng *A.niger* của các chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp ...78
Bảng 3.12. Khả năng ức chế nấm bệnh *A. niger* của dịch nuôi cấy thô đã loại bỏ tế bào .79
Bảng 3.13. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) 81

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 83
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.....84
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 nhaun trên đĩa thạch.....89
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* 90
Bảng 3.18. Tính mẫn cảm với kháng sinh của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 94
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của các chủng *Bacillus* tuyển chọn đến tỉ lệ chết và biến động khối lượng của giun đất (*Eisenia fetida*) sau 14 ngày thử nghiệm.....96
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase 104
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng *Bacillus* 104
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng *Bacillus*.....105
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* 106
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng *Bacillus*.....107
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*.....108
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* 109
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng *Bacillus*.....110
Bảng 3.28. Mật độ tế bào, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và khả năng đối kháng nấm *A. niger c*ủa ba chủng *Bacillus* trước và sau khi lựa chọn điều kiện nuôi cấy.....111
Bảng 3.29. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng *Bacillus* trong nhà lưới.....114

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến chiều cao thân chính ở các giai đoạn phát triển của giống lạc L14 trên đồng ruộng 117
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến tổng số cành ở các giai đoạn phát triển của giống L14 trên đồng ruộng 119
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 (%) 120
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến các yếu tố cấu thành năng suất lạc giống L14 trong điều kiện đồng ruộng 123

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Đặc điểm sinh học của cây lạc (A, B, C) và một số dạng hình thái vỏ quả (D), màu sắc vỏ hạt lạc (E) 5
Hình 1.2. Đặc điểm khuẩn lạc nấm *A. niger* nuôi cấy trên các môi trường 6
Hình 1.3. Đặc điểm khuẩn lạc các chủng *Aspergillus* sp. từ *Dioscorea rotundata*.....6
Hình 1.4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng *A. niger* từ môi trường thạch SDA.....7
Hình 1.5. Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc *A. niger* (A) trên môi trường PDA.....7
Hình 1.6. Sự biến dạng của cuống bào tử, đầu bào tử *A. niger* trên SDA bị ô nhiễm....8
Hình 1.7. Sơ đồ cấu trúc thành tế bào nấm sợi (*Aspergillus spp*.) và các thành phần đích của enzyme thủy phân thành tế bào nấm.....9
Hình 1.8. Cấu trúc ba chiều của β-1,3-glucanase 14
Hình 1.9. Minh họa quá trình phân giải thành tế bào nấm bởi các enzyme thủy phân của *Bacillus* sp.....15
Hình 1.10. Sơ đồ nội dung nghiên cứu của luận án.....26
Hình 2.1. Đồ thị đường chuẩn IAA 40
Hình 3.1. Địa điểm thu thập mẫu bệnh và mẫu đất phân lập vi sinh vật đối kháng.....47
Hình 3.2. Đặc điểm hình thái các chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên môi trường PDA 49
Hình 3.3. Đặc điểm hình thái vi thể của các chủng *A. niger* QT1 và H17 trên môi trường PDA 50
Hình 3.4. Lây nhiễm các chủng nấm gây héo rũ gốc mốc đen lên cây lạc L14 khỏe theo quy tắc Koch.....52
Hình 3.5. Cây phát sinh loài chủng nấm *A. niger* QT1 và *A. niger* H17.....54
Hình 3.6. Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn với nấm bệnh trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy 56
Hình 3.7. Khả năng đối kháng với *A. niger* QT1 của các chủng vi sinh vật trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy.....59
Hình 3.8. Khả năng đối kháng với *A. niger* H17 của các chủng vi sinh vật trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy.....60
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 62
Hình 3.10. Hình thái khuẩn lạc trên môi trường LBA (a, b) và tế bào nhuộm Gram (c) các chủng vi khuẩn đối kháng B8, K1, 101, 112, 137 quan sát dưới kính hiển vi quang học (X 100).....65
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 và các chủng tham chiếu, *Paenibacillus polymyxa* được sử dụng làm nhóm ngoài 69
Hình 3.12. Đặc điểm hình thái chủng nấm HL6 trên môi trường PDA.....71
Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm HL6.....72

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. 77
Hình 3.15. Khả năng đối kháng *A.niger* QT1 của các chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp... 78
Hình 3.16. Khả năng đối kháng *A. niger* H17 của các chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp .. 79
Hình 3.17. Thử nghiệm resazurin để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).....80
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.....85
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.....86
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**) 89
Hình 3.21. Ảnh SEM về ảnh hưởng của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ ba chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp đến thành tế bào sợi nấm chủng *A. niger* QT1 91
Hình 3.22. Ảnh SEM về ảnh hưởng của enzyme β-1,3-glucanase từ ba chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp đến thành tế bào sợi nấm chủng *A. niger* H17.....92
Hình 3.23. Độ nhạy cảm với kháng sinh của *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 sau 24 giờ nuôi cấy ở 30 ºC.....94
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**) 97
Hình 3.25. Hoạt độ β-1,3-glucanase của *B. siamensis* 101 theo thời gian nuôi cấy.....98
Hình 3.26. Hoạt độ β-1,3-glucanase của *B. siamensis* 112 theo thời gian nuôi cấy.....99
Hình 3.27. Hoạt độ β-1,3-glucanase của *B. velezensis* 137 theo thời gian nuôi cấy 99
Hình 3.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* được tuyển chọn 100
Hình 3.29. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase 101
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 102
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 113
Hình 3.32. Năng suất lạc trên các địa điểm thử nghiệm ở Hương Trà, Phú Vang, Triệu Phong và Nam Hải Lăng 124

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Lạc (*Arachis hypogaea*) là cây công nghiệp ngắn ngày quan trọng, giúp nông dân nâng cao thu nhập, ổn định sinh kế. Tại Việt Nam, đặc biệt là khu vực miền Trung như tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế, lạc là cây trồng quan trọng và được xác định là sản phẩm có lợi thế cạnh tranh của địa phương. Tuy nhiên, sản xuất lạc tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế đang đối mặt với nhiều thách thức lớn từ các tác nhân sinh học, đặc biệt là nấm bệnh trong đất. Trong đó, nấm *Aspergillus* sp. (điển hình là *Aspergillus niger*) gây bệnh héo rũ gốc mốc đen (collar rot/crown rot) là một trong những dịch gây hại nặng (Thủy et al, 2024; Awoke et al., 2025; Bongomin et al., 2026). Nấm gây hại suốt cả quá trình phát triển của lạc, trước khi mọc mầm *A. niger* gây thối hạt và sau khi mọc mầm gây héo rũ, làm thối đen vùng cổ rễ, khiến cây chết hàng loạt (Gajera et al., 2011). Tỉ lệ cây chết do nấm này có thể dao động từ 28% đến 50%, gây tổn thất nghiêm trọng đến năng suất từ 20% đến 50%, thậm chí gây thất thu nếu không phòng trừ kịp thời (Hảo, 2004; Gajera et al., 2011; Hà & Hòa, 2012). Đáng lo ngại hơn, một số chủng *A. niger* còn sinh độc tố ochratoxin A, gây rủi ro mất an toàn thực phẩm nghiêm trọng, giảm giá trị thương phẩm và có thể ảnh hưởng đến sức khỏe con người (El-Dawy et al., 2024; Bongomin et al., 2026). Tại Quảng Trị và thành phố Huế, thời tiết diễn biến phức tạp, nắng nóng cực đoan xen kẽ mưa lũ ngập úng là điều kiện thuận lợi để các nấm bệnh trong đất bùng phát (Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Quảng Trị, 2025; Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật thành phố Huế, 2025).

Hiện nay, biện pháp phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen chủ yếu dựa vào thuốc bảo vệ thực vật hóa học (Awoke et al., 2025; Yuan et al., 2026). Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc hóa học gây ô nhiễm môi trường sinh thái, ảnh hưởng sức khỏe và gia tăng nguy cơ kháng thuốc (Nath & Patel, 2022; Yuan et al., 2026). Trong bối cảnh đó, định hướng giai đoạn 2023 đến 2025 tại tỉnh Quảng Trị, thành phố Huế ưu tiên và khuyến khích phương án sử dụng chế phẩm sinh học trong bảo vệ thực vật. Giải pháp sử dụng đối kháng sinh học thông qua các tác nhân như *Trichoderma* spp. và *Bacillus* spp. đang nổi lên như một hướng đi triển vọng. Các vi sinh vật đối kháng không chỉ ức chế trực tiếp nấm bệnh thông qua cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng, tiết enzyme, kháng sinh và ký sinh nấm, mà còn giúp kích thích sự sinh trưởng, tăng khả năng chịu hạn và cải thiện sức khỏe hệ rễ cây lạc (Kampa et al., 2025; Moreira et al., 2025). Trong sử dụng chế phẩm sinh học, hiệu quả thực tế thay đổi tùy theo điều kiện sinh thái và đặc điểm chủng vi sinh vật đối kháng (Gangaraj et al., 2023; Moreira et al., 2025). Do đó, các chế phẩm sinh học được phát triển từ những chủng vi sinh vật không có nguồn gốc tại địa phương có thể chưa phát huy hiệu quả tối ưu khi áp dụng ở vùng sinh thái khác. Đối với khu vực Quảng Trị và thành phố Huế có điều kiện khí hậu khắc nghiệt, nền nhiệt cao, gió Lào, mưa lớn theo mùa, nhiều vùng đất cát pha ven biển, thì việc tuyển chọn các chủng vi

sinh vật bản địa có khả năng thích nghi tốt với điều kiện sinh thái địa phương được xem là hướng tiếp cận có cơ sở khoa học nhằm nâng cao hiệu quả phòng trừ sinh học bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc.

Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã ghi nhận tiềm năng của vi sinh vật đối kháng và các enzyme ngoại bào có khả năng phân giải thành tế bào nấm trong kiểm soát *A. niger*. Trong đó, vi khuẩn *Collimonas fungivorans* Ter331 được nghiên cứu về khả năng tác động đến sự phát triển của nấm *A. niger*. Chủng vi khuẩn *Collimonas fungivorans* Ter331 ức chế sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử *A. niger* N402 (Mosquera et al., 2021). Chủng *Pseudomonas* sp. HP-1 có khả năng kiểm soát sinh học đối với *A. niger* và cả với *A. flavus* (Kader et al., 2025). Chủng *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập tại Hưng Yên, Việt Nam đã thể hiện khả năng kiểm soát nấm *A. niger* gây thối hỏng nông sản (Bình et al., 2024). Tuy nhiên, theo hiểu biết của tác giả và trong phạm vi tài liệu được tổng hợp, các nghiên cứu tại vùng miền Trung trước đây chủ yếu tập trung vào bệnh héo rũ gốc mốc trắng do *Sclerotium rolfsii*, trong khi bệnh héo rũ gốc mốc đen do *A. niger* hại lạc vẫn chưa được đánh giá một cách toàn diện. Có khoảng trống khoa học về một nghiên cứu liên hoàn từ việc phân lập xác định tác nhân gây bệnh, tuyển chọn các chủng vi sinh vật đối kháng có nguồn gốc bản địa Quảng Trị và thành phố Huế, đến việc cung cấp các bằng chứng cho thấy hệ enzyme ngoại bào có hoạt tính β -1,3-glucanase liên quan đến cơ chế đối kháng nấm bệnh trong điều kiện *in vitro*, cũng như đánh giá hiệu quả phòng trừ thực tế từ nhà lưới đến thử nghiệm đồng ruộng.

Xuất phát từ khoảng trống thực tiễn và lý luận nêu trên, việc thực hiện đề tài **"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"** là hết sức cấp thiết. Nghiên cứu nhằm cung cấp dữ liệu vi sinh vật bản địa có hệ thống, cung cấp bằng chứng về cơ chế enzymatic đối kháng và tạo cơ sở khoa học cho việc phát triển các chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen, giảm phụ thuộc thuốc hóa học, góp phần sản xuất lạc an toàn, bền vững thân thiện với môi trường tại địa phương.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu chung

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.

2.2. Mục tiêu cụ thể

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

- Mục tiêu 2: Phân lập, tuyển chọn được các 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.

- Mục tiêu 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 các chủng vi sinh vật tuyển chọn; đánh giá được 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*.

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

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; thời gian thử nghiệm trên đồng ruộng từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2023.

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

Nghiên cứu của luận án có các đóng góp mới như sau:

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.

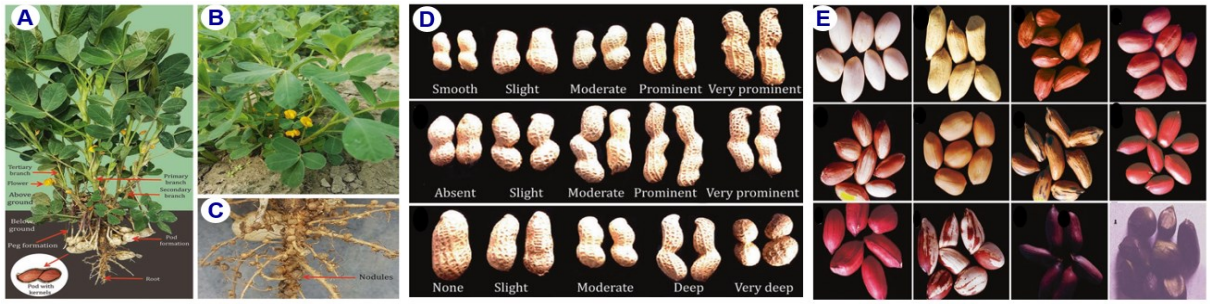
- Kết quả nghiên cứu là cơ sở thực tiễn cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện quy trình sử dụng và phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng *Bacillus* bản địa tuyển chọn phục vụ phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen hại lạc.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. CƠ SỞ LÝ LUẬN

1.1.1. Tổng quan về cây lạc

Cây lạc (*Arachis hypogaea*), còn gọi là cây đậu phộng, là cây trồng quan trọng trong cơ cấu nông nghiệp thế giới, được trồng phổ biến ở nhiều nước nhiệt đới và bán khô hạn (Hình 1.1). Về mặt phân loại theo Linnaeus 1753, *A. hypogaea* thuộc giới Plantae, ngành Tracheophyta, phân ngành Spermatophytina, lớp Magnoliophyta, bộ Fabales, họ Fabaceae, phân họ Faboideae, tông Aeschynomeneae, chi *Arachis*, loài *Arachis hypogaea.* Rễ của cây lạc có khả năng cố định nitơ sinh học nhờ sự cộng sinh của vi sinh vật (VSV) như vi khuẩn ở nốt sần (Đạo et al., 2021). Quả của cây lạc được hình thành trong đất, do sau khi thụ tinh, cuống hoa kéo dài thành tia quả và đâm sâu vào đất để hình thành quả non. Quá trình sinh trưởng, phát triển này dẫn đến nhiều kẽ hở để các mầm bệnh trong đất xâm nhập gây hại cho cây lạc (Korangi Alleluya et al, 2023).



Hình 1.1. *Đặc điểm sinh học của cây lạc (A, B, C) và một số dạng hình thái vỏ quả (D), màu sắc vỏ hạt lạc (E) (Al-Khayri et al., 2019).*

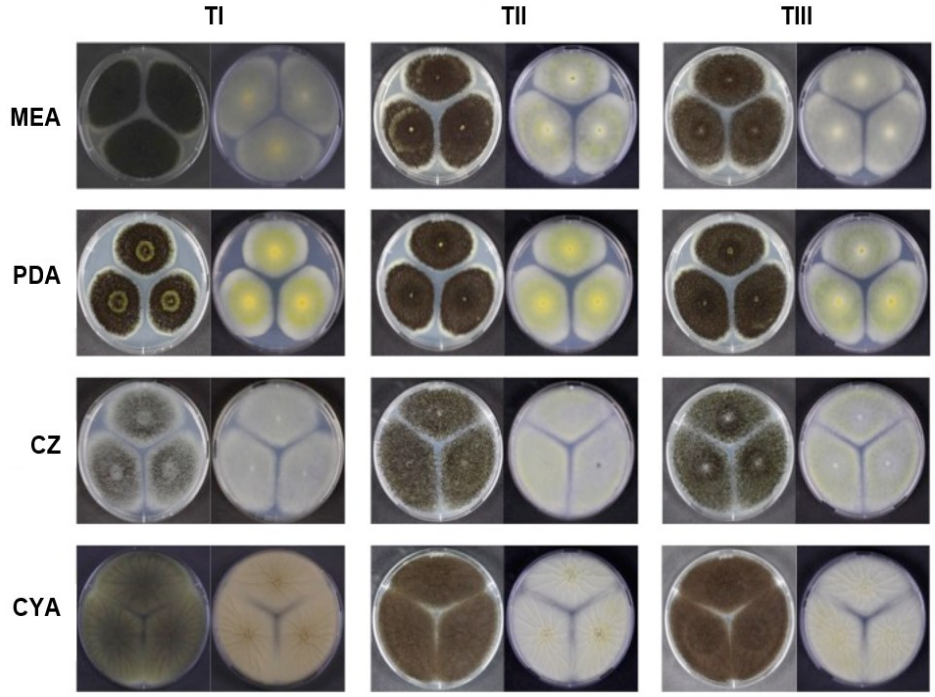
Cây lạc là cây trồng quan trọng trong cơ cấu nông nghiệp của nhiều nước và vùng lãnh thổ, cây lạc không chỉ có giá trị cung cấp dinh dưỡng thông qua hạt mà còn góp phần cải tạo đất nhờ đặc tính sinh học của cây họ Đậu. Cây lạc chủ yếu được trồng lấy hạt chiết xuất dầu (44-56%). Dầu lạc có hương vị, điểm bốc hơi cao và chứa axit béo không bão hòa đơn, làm cho nó lành mạnh hơn và kháng ôi. Hạt lạc chứa protein chất lượng cao (22-30%) và các khoáng chất như phốt pho, canxi, magiê và kali. Hạt có thể được chế biến thành các sản phẩm bánh kẹo, bơ lạc, hoặc tiêu thụ trực tiếp dưới dạng luộc hoặc rang. Lạc cũng là nguồn cung cấp vitamin E, K, B, chất xơ, thiamine, niacin và được sử dụng trong y học dân gian để điều trị nhiều bệnh (Al-Khayri et al., 2019). Nhờ các vi khuẩn *Rhizobium* cộng sinh trong nốt sần rễ, giúp cây lạc có khả năng tự cố định đạm sinh học, giúp giảm thiểu sử dụng đạm hóa học, góp phần cải tạo cấu trúc đất, cây lạc cùng với cây họ đậu được xem là nhóm cây quan trọng đối với nông nghiệp bền vững và thích ứng với biến đổi khí hậu (Goyal et al., 2021).

1.1.2. Nấm gây bệnh thực vật *Aspergillus niger*

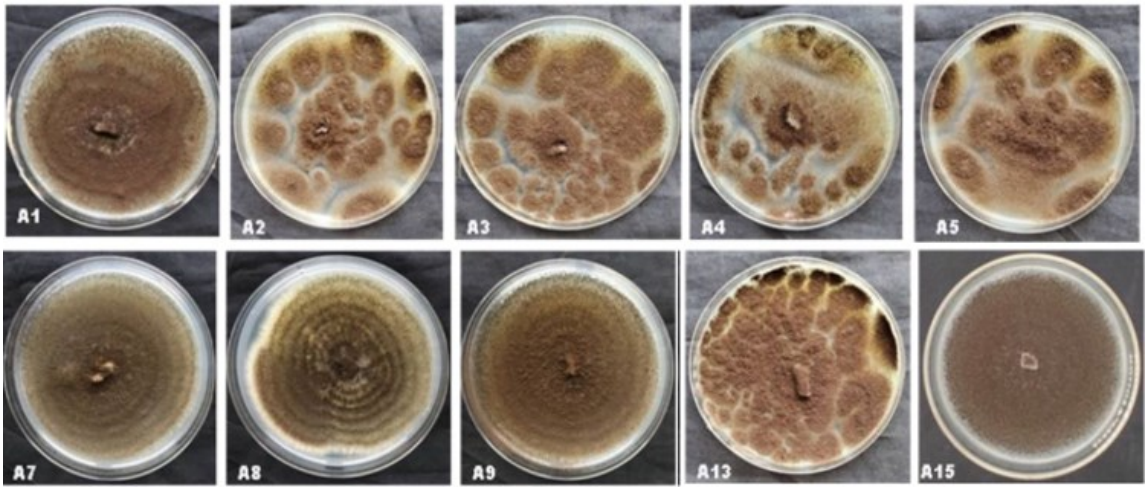
1.1.2.1. Đặc điểm hình thái của A. niger

Aspergillus niger là một loài nấm sợi thuộc giới Fungi, ngành Ascomycota, phân ngành Pezizomycotina, lớp Eurotiomycetes, bộ Eurotiales, họ Trichocomaceae. Loài *A. niger* có phổ phân bố sinh thái rộng, hiện diện phổ biến trong đất, nước, không khí, trên mô thực vật và trong nhiều loại thực phẩm cũng như thức ăn chăn nuôi (Yu et al., 2021).

Trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), *A. niger* có tốc độ phát triển rất nhanh, màu sắc tương đối đa dạng (Hình 1.2 và 1.3) (Rodriguez et al., 2019; Dania et al., 2021).

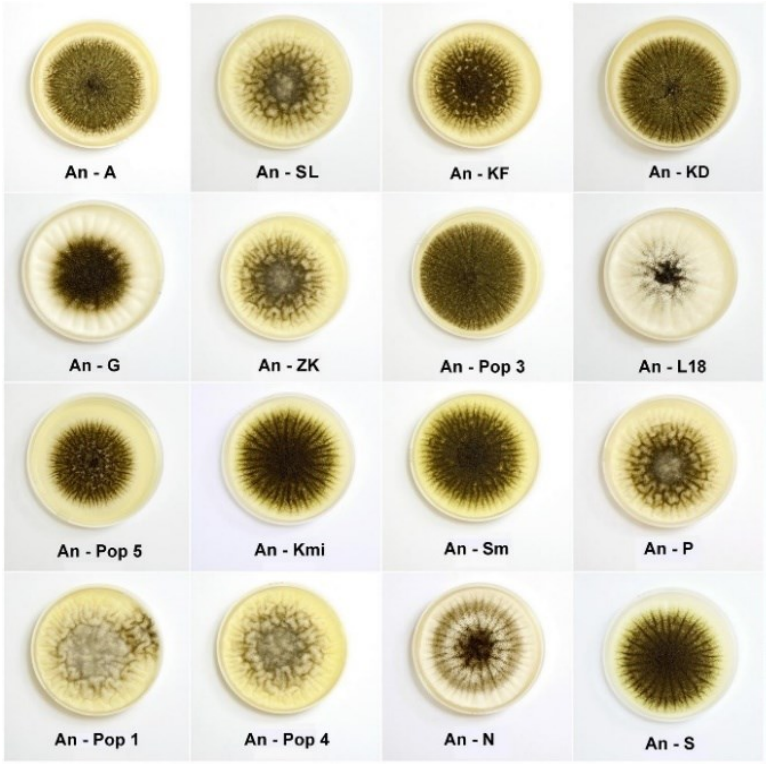


Hình 1.2. *Đặc điểm khuẩn lạc nấm A. niger nuôi cấy trên các môi trường: thạch chiết xuất mạch nha (MEA), thạch khoai tây dextrose (PDA), thạch Czapek (CZ) và thạch Czapek với cao nấm men (CYA) (Rodriguez et al., 2019).*



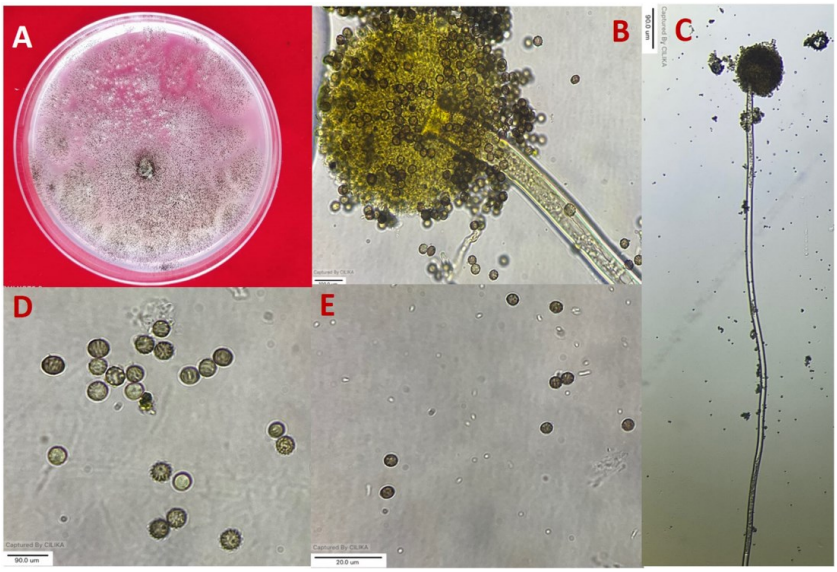
Hình 1.3. *Đặc điểm khuẩn lạc các chủng Aspergillus sp. từ Dioscorea rotundata (Dania et al., 2021).*

Khuẩn lạc của *A. niger* thường có màu đen hoặc màu nâu, đôi khi ngả màu vàng nhẹ. Ở một số chủng của *A. niger* giai đoạn đầu có màu trắng hoặc trắng vàng; khi bào tử phát triển và trưởng thành, khuẩn lạc chuyển dần sang màu đen do sự tích lũy melanin trong thành bào tử phân sinh (conidia), tạo nên đặc điểm hình thái đặc trưng của loài (Kumar et al., 2020). Rìa khuẩn lạc có thể có màu trắng vàng, mặt dưới thường có màu trắng hoặc vàng nhạt. Các nghiên cứu cũng ghi nhận rằng các chủng *A. niger* có thể thể hiện sự đa dạng về màu sắc sợi nấm, tốc độ phát triển và hình dạng rìa khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường PDA, SDA (Hình 1.4) (Šimonovičová et al., 2021).

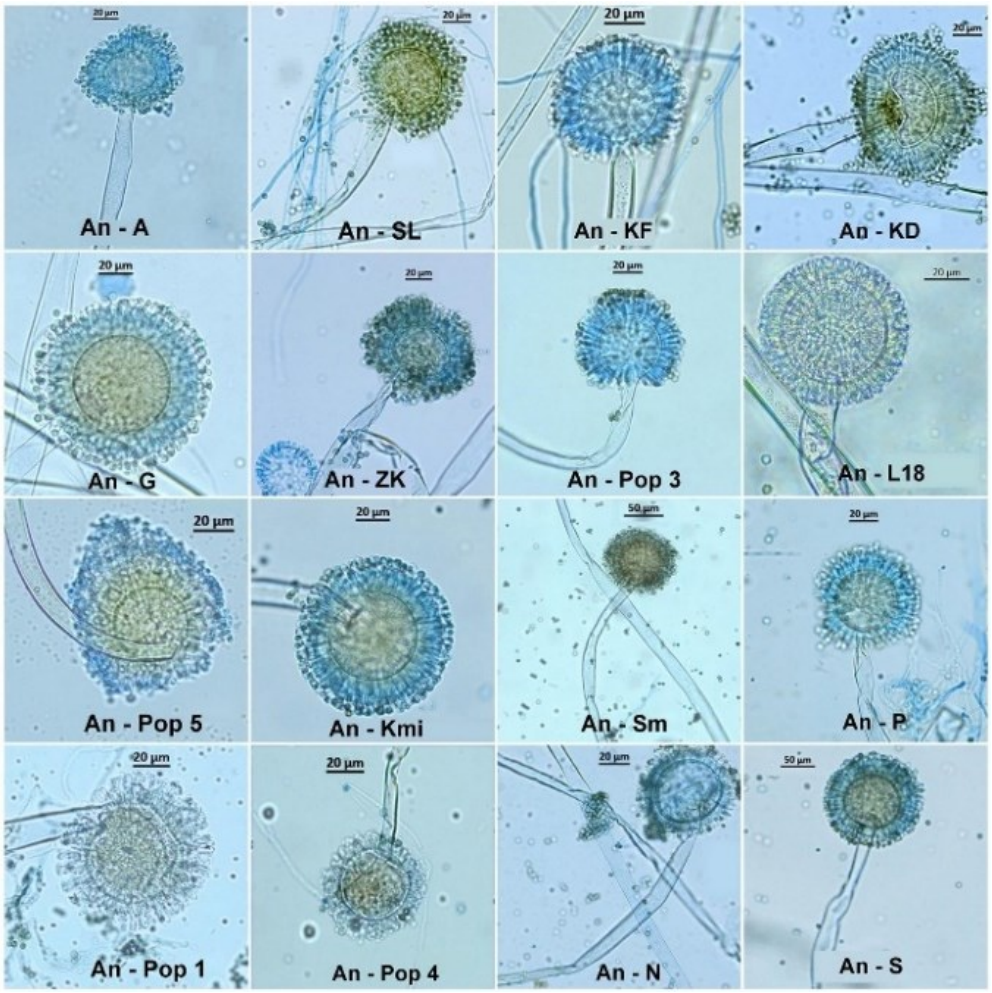


Hình 1.4. *Đặc điểm hình thái khuẩn lạc các chủng A. niger từ môi trường thạch SDA (Šimonovičová et al., 2021).*

Bào tử của *A. niger* có màu đen hoặc nâu sẫm, đường kính khoảng 2,5-5 µm. Dưới kính hiển vi, bề mặt bào tử ban đầu nhẵn nhưng dần trở nên sần sùi hoặc có gai khi trưởng thành. Cành bào tử phân sinh (conidiophore) mọc thẳng đứng, vách nhẵn, màu sắc đậm khi về phía đỉnh (Andge et al., 2017). Đầu bào tử dạng hình cầu đặc trưng, các thể bình (phialide) bao phủ toàn bộ bề mặt bóng đỉnh (vesicle). Bào tử được tạo thành theo chuỗi hướng gốc (basipetally) (Akhtar et al., 2014). Cành bào tử phân sinh (conidiophore) có đỉnh phình to tạo thành bóng đỉnh (vesicle). Các đặc điểm màu sắc và đặc điểm hình thái bào tử có giá trị quan trọng trong định danh loài (Gangaraj et al., 2023) (Hình 1.5 và 1.6).



Hình 1.5. *Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc A. niger (A) trên môi trường PDA; (B, C) Cành bào tử phân sinh (conidiophore) và bóng đỉnh (vesicle); (D, E) Bào tử (Conidia) (Gangaraj et al., 2023).*



Hình 1.6. *Sự biến dạng của cuống bào tử, đầu bào tử A. niger trên SDA bị ô nhiễm (Šimonovičová et al., 2021).*

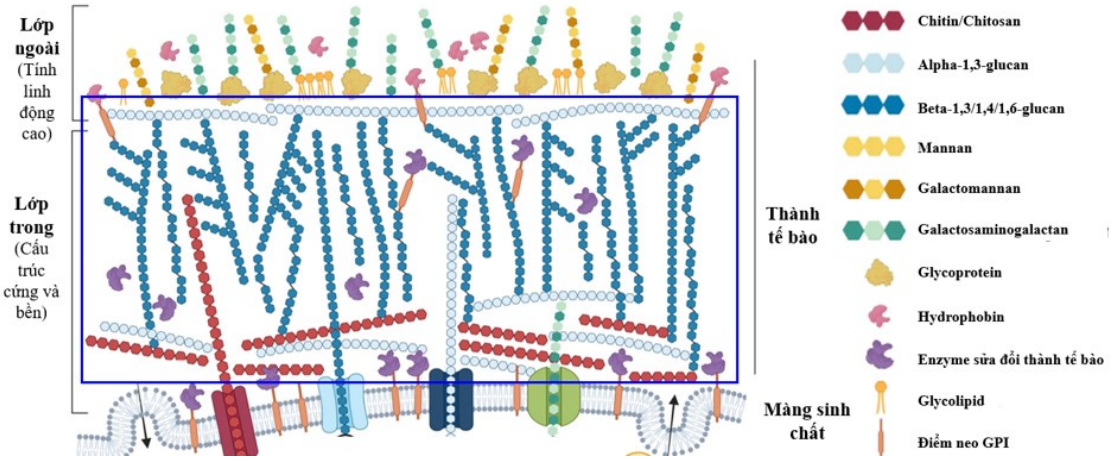
A. niger được phân biệt với các loài *Aspergillus* khác dựa trên đặc điểm cuống, màu sắc bào tử và kích thước cấu trúc sinh sản (Villalba-Villalba et al., 2018). Tuy nhiên, sự tương đồng về mặt hình thái giữa các loài *Aspergillus* gây khó khăn trong việc phân loại. Phương pháp sinh học phân tử, với việc sử dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự các vùng ITS, calmodulin, β-tubulin và RPB2 đã được áp dụng để định danh chính xác loài *A. niger* (Varga et al., 2011; Samson et al., 2014; Susca et al., 2016)

1.1.2.2. Cấu trúc thành tế bào nấm A. niger

Thành tế bào có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc bảo vệ nấm khỏi bị phá hủy bởi áp suất thẩm thấu. Thành phần hóa học của thành tế bào nấm có cấu trúc phức tạp và có tính đặc thù cao, khác biệt với thành tế bào của vi khuẩn và của thực vật. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, thành tế bào nấm chứa thành phần chính gồm glucan, chitin và mannoprotein. Trong các thành phần đó, mannoprotein nằm ở ngoài, tiếp theo là β-1,3-glucan và β-1,6-glucan, các sợi chitin nằm gần màng sinh chất. Với cấu trúc này, glucan và chitin tạo nên lớp bảo vệ cho tế bào nấm (Ost et al., 2025). Trong số các loại polysaccharide của thành tế bào nấm, glucan phong phú nhất và có cấu trúc đa dạng. Ở phần lớn các loại nấm, chitin chỉ chiếm một tỉ lệ thấp trong tổng khối lượng thành tế bào, trong khi đó lại có nhiều là β-glucan (Fesel & Zuccaro, 2016).

Thành tế bào *A. niger* được cấu tạo từ các lớp polymer phức tạp, trong đó β -1,3-glucan đóng vai trò là thành phần định hình khung xương chính (Hình 1.7). Beta-1,3-

glucan trong thành tế bào nấm là một chuỗi polymer glucose được liên kết với nhau bằng các liên kết β-1,3-glycosidic và các liên kết ngang với các mạch β-1,6-glucan và chitin tạo nên khung cấu trúc cơ học vững chắc. Sự toàn vẹn của β-1,3-glucan là yếu tố quyết định sự sống còn và khả năng gây bệnh cho tế bào nấm (Ost et al., 2025).



Hình 1.7. *Sơ đồ cấu trúc thành tế bào nấm sợi (Aspergillus spp.) và các thành phần đích của enzyme thủy phân thành tế bào nấm (Ost et al., 2025).*

Trong thành tế bào nấm, 1,3-glucan hiện diện chủ yếu ở dạng β-glucan, chiếm khoảng 65% đến 90% tổng hàm lượng β-glucan (Bowman & Free, 2006). Do đó, khi enzyme β-1,3-glucanase thủy phân liên kết β-1,3-glucan, sẽ làm suy giảm tính toàn vẹn của thành tế bào nấm. Vì vậy, các enzyme phân giải β-1,3-glucan và chitin có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học nấm bệnh trong nông nghiệp (Gangaraj et al., 2023).

1.1.2.3. Đặc điểm sinh học và cơ chế sinh sản của A. Niger

A. niger được ghi nhận là loài vi nấm phổ biến toàn cầu, có khả năng thích nghi cực kỳ linh hoạt với nhiều loại cơ chất và điều kiện môi trường khắc nghiệt. Sợi nấm phát triển theo cơ chế kéo dài đỉnh và phân nhánh dưới đỉnh, tạo thành mạng lưới sợi nấm xen kẽ dày đặc. Loại nấm này tạo ra áp lực bệnh hại lớn trong các hệ sinh thái nông nghiệp khắc nghiệt. Khả năng này bắt nguồn từ dải giới hạn sinh trưởng cực rộng: nhiệt độ từ 6 °C đến 47 °C (tối ưu 35 °C – 37 °C), hoạt độ nước tối thiểu (aw) tối thiểu ≥0,77 và khả năng chịu đựng pH dao động mạnh từ 1,5 đến 9,8 (Dijksterhuis & Wösten, 2013; George & Ramteke, 2019; Šimonovičová et al., 2021).

Sự linh hoạt trong trao đổi chất thông qua việc bài tiết đa dạng các enzyme thủy phân ngoại bào (lipase, catalase, pectinase và protease) giúp *A. niger* dễ dàng phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp để xâm nhiễm ký chủ (Nji et al., 2023). Đặc biệt, dưới tác động của stress môi trường như khô hạn, độ mặn cao hoặc ô nhiễm kim loại nặng, bào tử *A. niger* thiết lập cơ chế bảo vệ bằng cách tích lũy các hợp chất tương thích (mannitol, trehalose) và chuyển sang trạng thái ngủ nghỉ bền vững để duy trì sức sống lâu dài trước khi tái nảy mầm (van Leeuwen et al., 2013; Šimonovičová et al., 2021).

A. niger sinh sản chủ yếu bằng hình thức vô tính bằng bào tử (conidia) được hình thành trên cành bào tử. Cơ chế sinh sản vô tính của *A. niger* (conidiogenesis) diễn ra thông qua việc hình thành các cành bào tử phân sinh, bắt đầu từ tế bào chân (foot-cell) phát triển thành cuống đài dài từ 100 đến 3000 µm (Teertstra et al., 2017). Đầu cuống đài trương nở tạo thành thể bóng đỉnh có đường kính 50 – 80 *µm*, mang các lớp tế bào trung gian (metulae) và các thể bình theo cấu trúc lưỡng dãy (biseriate), từ đó sinh ra

các chuỗi bào tử đính hướng gốc với số lượng có thể vượt quá 10.000 bào tử trên mỗi đầu đài (Dijksterhuis & Wösten, 2013; Teertstra et al., 2017). Vách bào tử có cấu trúc đa lớp phức tạp, bao gồm lớp hydrophobin (RodA/Hyp1) ngoài cùng tạo tính kỵ nước giúp phát tán qua không khí và bám dính vào mô thực vật, cùng lớp melanin bên dưới giúp bảo vệ nấm khỏi tia UV và các tác nhân oxy hóa từ hệ miễn dịch ký chủ (Baltussen et al., 2020; Nji et al., 2023).

1.1.3. Bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc

1.1.3.1. Triệu chứng bệnh và tác hại của bệnh

Bệnh héo rũ gốc mốc đen (HRGMĐ) do *A. niger* trên cây lạc có các triệu chứng đặc trưng ở từng giai đoạn phát triển của cây, từ trước khi nảy mầm đến khi cây trưởng thành. Trước khi nảy mầm, hạt giống nhiễm nấm dễ bị thối mềm hoặc bao phủ bởi lớp bào tử đen, khiến hạt không nảy mầm hoặc cây con chết ngay sau khi nảy mầm (Gajera et al., 2011). Sau khi nảy mầm, cây con nhiễm bệnh thường xuất hiện các vết đốm tròn màu nâu nhạt trên lá mầm, lan đến cổ rễ và thân dưới, làm cho mô mềm, thối rữa và dẫn đến cây con gãy đổ. Trên cây trưởng thành, triệu chứng bao gồm héo úa lá dưới, thân cây sần sùi, dễ gãy, cành bào tử phân sinh cùng bào tử đen xuất hiện dày đặc ở cổ rễ và thân, tạo thành lớp mốc đen (Bajaya et al., 2022b). *A. niger* gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự phát triển của cây lạc, có thể gây chết đột ngột, đặc biệt trong điều kiện đất ẩm và khi cây bước vào giai đoạn phân cành (Hà & Hòa, 2012).

A. niger có khả năng gây bệnh cho nhiều loại cây trồng như lạc, ngô, hành tây, tỏi, xoài, cam, nho do khả năng phổ biến và hiện diện rộng rãi trong môi trường (Kumawat et al., 2025). Bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng và an toàn nông sản trên toàn cầu (Zakaria, 2024). Bệnh HRGMĐ làm gây tổn thương vùng cổ, gây vàng lá, làm chết cây hoặc không hình thành được quả (Andge et al., 2017). Nếu nhiễm bệnh trong khoảng 50 ngày sau gieo sẽ gây thiệt hại nghiêm trọng và có thể gây chết tới 40% số cây, tổn thất về tỉ lệ chết của cây do bệnh dao động từ 28 - 50% (Ghewande et al., 2002). Ngoài ra, *A. niger* gây bệnh trên củ hành có thể làm thối từ 55–80% sản phẩm trong điều kiện bảo quản nóng ẩm, dẫn đến thiệt hại nghiêm trọng cho chuỗi cung ứng nông nghiệp (El-Dawy et al., 2024). Trên cây tỏi, *A. niger* là nguyên nhân chính gây bệnh mốc đen hậu thu hoạch, chiếm tới 30–40% tổn thất trong quá trình lưu trữ, ảnh hưởng trực tiếp đến giá trị xuất khẩu (Kumawat et al., 2025). Ngoài thiệt hại về sản lượng, *A. niger* còn tạo ra các độc tố thứ cấp như aflatoxin và ochratoxin – những hợp chất độc hại có khả năng gây ung thư và độc tính gan thận ở người và động vật, khiến sản phẩm nông nghiệp bị hạ cấp hoặc cấm xuất khẩu (Nji et al., 2023). *A. niger* còn làm giảm tỉ lệ nảy mầm, ức chế sinh trưởng rễ – thân và gây chết cây non, dẫn đến giảm năng suất ở các cây trồng như ngô và hành (Collinge et al., 2022). Một số chủng *A. niger* tổng hợp độc tố nấm mốc ochratoxin A và mức độ sản xuất của nó phụ thuộc vào các yếu tố loại giá thể, môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy. Một số chủng *A. niger* lây truyền qua thực phẩm có thể sản xuất độc tố nấm mốc fumonisin, cụ thể là fumonisin B1 và B2. (Šimonovičová et al., 2021). Nhìn chung, sự phổ biến và độc tính cao của *A.niger* khiến chúng trở thành mối đe dọa nghiêm trọng đối với kinh tế nông nghiệp và an toàn thực phẩm toàn cầu.

1.1.3.2. Cơ chế xâm nhiễm, gây hại

Bệnh HRGMĐ chủ yếu lây qua đất. Nguồn gây bệnh chính là bào tử và sợi nấm hiện diện trên hạt và mảnh vụn hữu cơ trong đất (Nji et al., 2023). Nấm *A. niger* có khả năng gây bệnh từ giai đoạn trước khi cây lạc nảy mầm, lây lan qua các bào tử bám vào hạt giống nhiễm bệnh. Trong đất, bào tử xâm nhập qua các vết nứt trên vỏ hạt và phát triển mạnh, gây thối hạt. Khi hạt bắt đầu nảy mầm, bào tử nhanh chóng xâm nhập vào mô non của rễ và thân cây non, hình thành các tổn thương màu nâu nhạt ở vùng phần thân non giữa lá mầm và rễ (hypocotyl), làm cho mô cây dễ thối rữa, gây gãy đổ và chết cây con (Zakaria, 2024). Sau khi nảy mầm, nấm tiếp tục xâm nhiễm qua các vết thương cơ học hoặc các mô suy yếu ở vùng cổ rễ. Nấm sản sinh ra enzyme và độc tố phá hủy cấu trúc tế bào, gây thối rữa các mô trong cây và gián đoạn dẫn truyền nước và dinh dưỡng, dẫn đến héo úa các nhánh dưới và chết dần (Zakaria, 2024). Trong điều kiện thuận lợi, như độ ẩm cao, nấm phát triển mạnh mẽ, các cuống bào tử trần và bào tử đen xuất hiện dày đặc trên bề mặt cổ rễ và thân dưới, dễ dàng lây lan sang các cây khác qua gió, nước hoặc tiếp xúc với đất nhiễm bào tử (Rani et al., 2017).

1.1.3.3. Chu kỳ bệnh của nấm A. niger

Chu kỳ bệnh của *A. niger* gồm nhiều giai đoạn, từ tồn tại trong đất, tàn dư thực vật; phát tán qua gió, mưa, hạt giống; xâm nhập vào ký chủ qua vết thương; phát triển trong mô cây; gây thối rữa, sinh bào tử; phát tán và lưu tồn lại trong đất, trên hạt giống.

A. niger tồn tại chủ yếu ở trong đất, ngoài ra nấm còn có trên tàn dư xác thực vật hoặc trên bề mặt hạt giống. Nhờ khả năng thích ứng cao, tuổi thọ dài, khả năng sống sót cao trong điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ cao, hạn hán kéo dài, bào tử trở thành nguồn bệnh chính cho vụ sau (Nji et al., 2023). Ở giai đoạn phát tán, bào tử rất nhẹ, dễ dàng phát tán trong không khí, qua mưa, gió, bụi hoặc dụng cụ canh tác nông nghiệp. Bào tử *A. niger* sau khi bám dính lên mô cây khỏe mạnh, khi gặp điều kiện thuận lợi, đặc biệt trong môi trường độ ẩm cao, bào tử nảy mầm. *A. niger* dựa vào các vết thương hở trên cây được tạo ra do các tổn thương cơ học, côn trùng cắn hoặc các stress của môi trường đối với ký chủ để xâm nhập vào mô, tế bào (Zakaria, 2024). Trong mô ký chủ, *A. niger* sử dụng các enzyme thủy phân để phân giải gây hoại tử mô, xâm chiếm mô ký chủ. Sợi nấm và bào tử phát triển mạnh, theo cấp số nhân, làm mềm mô, tạo thành các đốm đen hoặc khối bào tử đen trên bề mặt của gốc thân, rễ, củ, quả, hạt tạo ra các tổn thương nghiêm trọng, kéo dài (Zakaria, 2024). *A. niger* phát triển mạnh ở điều kiện độ ẩm 90–100% và nhiệt độ trên 30°C (El-Dawy et al., 2024). Khi ký chủ bị phân giải hoàn toàn, hoặc bị chết, *A. niger* chuyển sang giai đoạn tồn lưu và lan truyền dưới dạng thể bào tử. Các bào tử này phát tán trở lại môi trường không khí, đất, nước hoặc tồn tại ngay trên hạt giống của vụ sau, khép kín vòng đời bệnh (Zakaria, 2024).

1.1.4. Đối kháng sinh học trong kiểm soát nấm bệnh hại cây trồng

1.1.4.1. Khái niệm về đối kháng sinh học

Đối kháng sinh học hay kiểm soát sinh học (BCA-Biological Control Agent) thường được định nghĩa là sử dụng các sinh vật như virus, vi khuẩn, vi nấm, động vật và kể cả các sản phẩm sinh học của chúng để ức chế, làm giảm số lượng mầm bệnh, làm giảm tác hại của tác nhân gây hại (sâu bệnh, nấm, vi khuẩn, virus gây bệnh cây, cỏ dại...) đối với cây trồng (Stenberg et al., 2021). Khái niệm về đối kháng sinh học được phát triển qua nhiều gian đoạn và được nhấn mạnh tùy vào trường hợp sử dụng, "biological control" bao gồm cả việc áp dụng trực tiếp sinh vật đối kháng và các biện pháp sinh thái/phân tử dựa trên hiểu biết về cơ chế tương tác giữa ký chủ, tác nhân gây hại và đối kháng (Collinge et al., 2022).

1.1.4.2. Cơ chế đối kháng sinh học

Có nhiều cơ chế trong đối kháng sinh học kiểm soát bệnh ở thực vật. Sau đây là một số cơ chế đối kháng sinh học chính:

Cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống

Cạnh tranh về chất dinh dưỡng (cacbohydrat, nitơ và oxy,…) và không gian sống được xem là cơ chế hoạt động tiềm năng trong các hệ thống đối kháng sinh học. Một số VSV như nấm men và vi khuẩn tạo thành các nang polysaccharide ngoại bào giúp bám dính vào bề mặt quả (Spadaro & Gullino, 2004). Nhiều BCA khác nhau hạn chế lượng chất dinh dưỡng có sẵn và làm giảm tỉ lệ nảy mầm của bào tử mầm bệnh, sau đó làm giảm sự phát triển của ống mầm, nhiễm trùng gây hoại tử và sau đó ngăn ngừa sự phát triển của mầm bệnh (Roca-Couso et al., 2021).

Cơ chế cạnh tranh sắt và sản xuất siderophore

Sắt là nguyên tố vi lượng cần thiết cho quá trình sinh trưởng và trao đổi chất của VSV. Việc hạn chế nguồn sắt sẵn có trong đất có thể làm suy giảm hoạt động sinh lý và khả năng phát triển của các VSV gây bệnh. Trong điều kiện *in vitro*, *P. aeruginosa* được ghi nhận có khả năng sinh siderophore cùng các chất chuyển hóa có hoạt tính đối kháng với *F. oxysporum* và *A. niger* (Sulochana et al., 2014).

Cơ chế kháng sinh

Cơ chế kháng sinh trong đối kháng VSV liên quan đến việc các VSV có lợi sản sinh các hợp chất khuếch tán có khối lượng phân tử thấp hoặc các chất kháng sinh, qua đó ức chế sự sinh trưởng và phát triển của mầm bệnh. Chẳng hạn như *Agrobacterium radiobacter* K84 sản sinh agrocin 84, có khả năng ức chế *A. tumefaciens* và đã được ứng dụng trong các chế phẩm VSV kiểm soát sinh học (Fravel, 2005) hay *A. radiobacter* có thể làm giảm sự phát triển của nấm gây bệnh thực vật từ 65–74% và cản trở sự nảy mầm của bào tử từ 30–75% (Win et al., 2021).

Cơ chế phân giải thành tế bào bằng enzyme

Các VSV đối kháng có khả năng sản xuất chitinase, cellulase, protease và β-1,3-glucanase, tạo điều kiện cho sự phân giải các thành phần thành tế bào nấm gây bệnh thực vật. Khi thành tế bào của nấm bệnh bị các enzyme phân giải, có thể dẫn đến sự phân giải tế bào và rò rỉ chất dinh dưỡng từ tế bào chất (Mishra et al., 2020). Chi *Bacillus* chủ yếu được biết đến với khả năng sản xuất và tiết ra nhiều loại enzyme thủy phân mạnh, được sử dụng trong kiểm soát sinh học và các ứng dụng công nghiệp (Su et al., 2020). Các hiệu ứng hiệp đồng giữa endochitinase từ *T. harzianum* và gliotoxin, cũng như giữa các enzyme thủy phân và peptaibol trong việc ức chế bào tử của *Botrytis cinerea* (Howell, 2003).

Cơ chế ký sinh (mycoparasitism)

Một số tác nhân kiểm soát sinh học có khả năng nhận diện và bao bọc tác nhân gây bệnh để sử dụng tác nhân gây bệnh như một nguồn cung cấp chất dinh dưỡng. *Trichoderma* bám vào tác nhân gây bệnh thông qua tương tác giữa carbohydrat thành tế bào liên kết với lectin của tác nhân gây bệnh. Sau khi *Trichoderma* bám dính, nó cuộn quanh tác nhân gây bệnh và hình thành cấu trúc áp bào (appresoria). Tiếp theo, nấm tiết các enzyme phân giải thành tế bào (Cell Wall Degrading Enzymes - CWDEs) và peptaibol giúp xâm nhập vào tác nhân gây bệnh, phá vỡ thành tế bào và đồng hóa thành phần nội bào của tác nhân gây bệnh (Howell, 2003).

1.1.4.3. Các nhóm vi sinh vật đối kháng tiềm năng

***Trichoderma* spp.**

Các loài thuộc chi *Trichoderma* được ứng dụng rộng rãi trong kiểm soát sinh học nhờ khả năng đối kháng với nhiều nấm gây bệnh thực vật. Trong đó, *T. viride* và *T. harzianum* đã được ghi nhận có khả năng ức chế *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* và *Sclerotium rolfsii* trên nhiều loại cây trồng. Hoạt tính đối kháng của *Trichoderma* liên quan đến nhiều cơ chế, bao gồm ký sinh nấm và tiết các enzyme ngoại bào như chitinase và β-1,3-glucanase. Các enzyme này tham gia phân giải những thành phần cấu trúc của thành tế bào nấm bệnh, góp phần hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của chúng (Sharma et al., 2023).

***Pseudomonas* spp.**

Pseudomonas fluorescens có khả năng đối kháng với *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* và một số nấm gây bệnh khác thông qua cơ chế cạnh tranh nguồn sắt, qua đó hạn chế sự sinh trưởng của chúng. Bên cạnh đó, các loài thuộc chi *Pseudomonas* còn có khả năng tạo ra những chất chuyển hóa như hydro xyanua, axit salicylic và enzyme β-1,3-glucanase, góp phần tăng cường hoạt tính đối kháng và bảo vệ cây trồng trước sự xâm nhiễm của tác nhân gây bệnh (Kruijt et al., 2009; Kader et al., 2025).

***Bacillus* spp.**

Các loài thuộc chi *Bacillus*, trong đó *B. subtilis* được nghiên cứu khá phổ biến, cho ứng dụng trong kiểm soát sinh học nhờ khả năng hình thành bào tử và duy trì sức sống trong điều kiện nhiệt độ cao hoặc khô hạn. Đã có nhiều công bố cho thấy *B. subtilis* có khả năng đối kháng với một số tác nhân gây bệnh có nguồn gốc từ đất như *R. solani* và *Macrophomina phaseolina*. Các nghiên cứu chỉ ra rằng khả năng kiểm soát mầm bệnh của *B. subtilis* liên quan đến nhiều cơ chế, gồm sản sinh các hợp chất kháng khuẩn, hỗ trợ cây hấp thu dinh dưỡng, điều hòa cân bằng hormone, kích hoạt tính kháng toàn thân và góp phần thúc đẩy sinh trưởng của cây (Blake et al., 2021). Bên cạnh hoạt động thủy phân thành tế bào nấm của các enzyme ngoại bào, một số nghiên cứu cho thấy các chất chuyển hóa do *B. velezensis* tạo ra còn có thể làm thay đổi biểu hiện các gene liên quan đến sinh trưởng, chuyển hóa và đáp ứng stress của nấm (Wu et al., 2022).

1.1.5. Hệ enzyme ngoại bào phân giải thành tế bào nấm

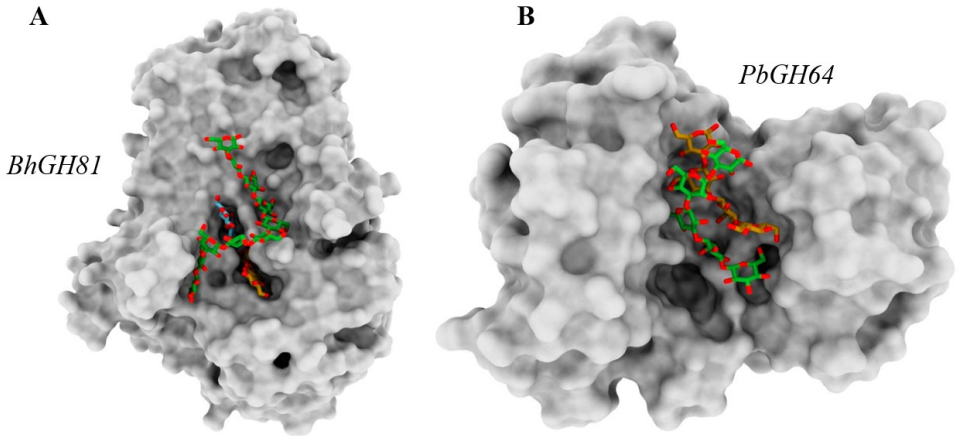
1.1.5.1. Cấu trúc và cơ chế thủy phân của enzyme β-1,3-glucanase

β-1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) thuộc nhóm enzyme glycoside hydrolase (GH), có chức năng xúc tác phản ứng thủy phân các liên kết β-1,3-glycosidic trong cấu trúc β-glucan, góp phần phân giải polysaccharide này (Caseiro et al., 2022). Dựa trên trình tự axit amin, cấu trúc 3D và cơ chế hoạt động, β-1,3-glucanase chủ yếu thuộc các họ GH5, GH16, GH17, GH55 và GH81, thể hiện sự đa dạng về đặc điểm và vai trò sinh học của enzyme này (Bảng 1.1) (Caseiro et al., 2022).

Bảng 1.1. *Phân bố β-1,3-glucanase trong các họ glycoside hydrolase (Caseiro et al., 2022)*

Lớp β-1,3-glucanase	Nhóm	Họ GH													
		3	5	8	9	16	17	51	55	64	81	128	152	157	158
EC 3.2.1.39	Vi khuẩn cổ					1									
	Vi khuẩn		1			27	3		1	5	3	3		1	3
	Nấm					2	1		2		10	1	1		
	Thực vật						28				1				
	Động vật					14									

β-1,3-glucanase có khối lượng phân tử từ 12–230 kDa và đa dạng về cấu trúc, với khoảng 32 cấu trúc 3D đã được xác định bằng thực nghiệm (Hình 1.8). Trong tự nhiên, β-1,3-glucanase có sự phân bố rộng rãi từ vi khuẩn, nấm, thực vật bậc cao cho đến động vật không xương sống. Ở vi khuẩn đối kháng, enzyme này được sử dụng chủ yếu để thủy phân thành tế bào nấm và chuyển hóa polysaccharide thành nguồn năng lượng (Caseiro et al., 2022).



Hình 1.8. *Cấu trúc ba chiều của β-1,3-glucanase: Bh GH81 (A) và Pb GH64 (B) (Caseiro et al., 2022).*

Một bằng chứng trực tiếp chứng minh vai trò quan trọng trong phân giải thành tế bào nấm được thực hiện bởi enzyme α-1,3-glucanase (Agl-EK14) thuộc họ glycoside hydrolase GH87 được phân lập từ vi khuẩn *Flavobacterium* sp. EK14 mã hóa enzyme có cấu trúc đa miền gồm peptide tín hiệu, miền xúc tác, các miền giống immunoglobulin, miền lectin và CTD. Enzyme này có khả năng thủy phân α-1,3-glucan trong thành tế bào nấm, giải phóng glucose và các oligosaccharide. Khi xử lý *A. oryzae*, enzyme làm mất cấu trúc glucan thành tế bào (Takahashi et al., 2023). Chủng *B. siamensis* QN2MO-1 chứa 4 gen quy định chitinase và 8 gen quy định β-1,3-glucanase liên quan đến phá hủy cấu trúc bào tử, tạo ra biến dạng bào tử và sợi nấm bị suy yếu, ức chế sinh trưởng nấm *Fusarium* gây bệnh héo rũ ở cà chua (M. Zhang et al., 2024). Chủng *B. velezensis* GX0002980 thể hiện hoạt tính amylase, cellulase, protease và pectinase có khả năng đối kháng mạnh với *Colletotrichum gloesporioides*, tác nhân gây bệnh thán thư xoài. Quan sát SEM cho thấy sợi nấm của *C. gloeosporioides* bị ảnh hưởng sau khi xử lý bằng chủng GX0002980 so với đối chứng (Wang et al., 2025). Như vậy, có nhiều bằng chứng trong phá hủy hàng rào bảo vệ tế bào nấm bệnh, hoạt động của enzyme thủy phân đóng vai trò trung tâm, trực tiếp phá vỡ cấu trúc bảo vệ cơ học của nấm bệnh, qua đó ức chế sinh trưởng, phòng trừ sinh học nấm bệnh.

1.1.5.2. Các enzyme hỗ trợ phân giải thành tế bào nấm

Các enzyme có hoạt tính kháng nấm góp phần kiểm soát tác nhân gây bệnh thực vật thông qua khả năng phân giải các thành phần cấu trúc của thành tế bào nấm, từ đó làm suy giảm khả năng sinh trưởng và phát triển của chúng. Sự phối hợp giữa các enzyme có thể tạo ra tác dụng hiệp đồng, qua đó nâng cao hiệu quả ức chế nấm bệnh.

Chitinase: Là enzyme xúc tác quá trình thủy phân chitin, một thành phần cấu trúc của thành tế bào nhiều loài nấm. Chitinase do các vi sinh vật đối kháng như *Trichoderma* spp. tiết ra có thể làm suy giảm tính toàn vẹn của thành tế bào nấm bệnh,

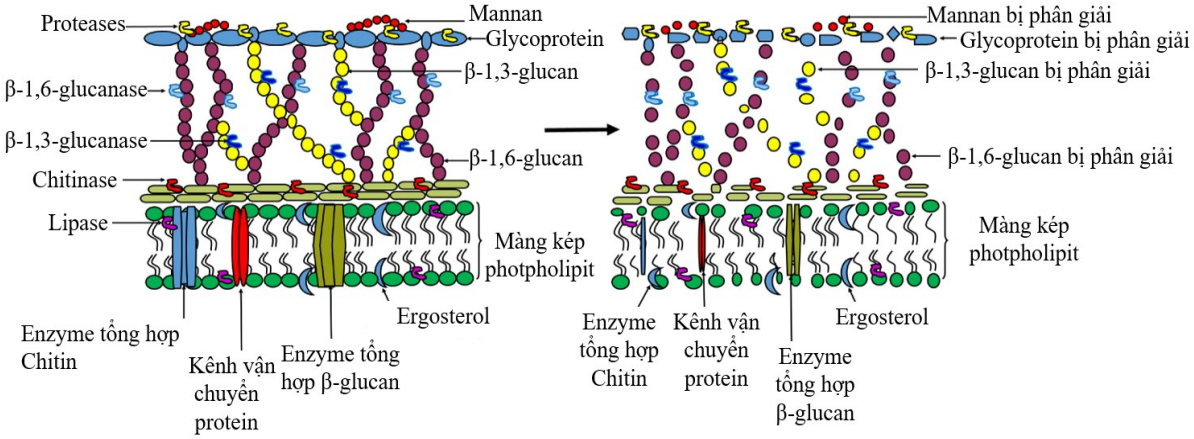
qua đó góp phần ức chế sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Nghiên cứu của De Marco et al. (2003) cho biết các dòng *T. harzianum* có khả năng sản xuất chitinase cao đã làm giảm tỉ lệ bệnh chổi rễ trên cây ca cao. Enzyme này hoạt động tấn công trực tiếp vào cấu trúc bảo vệ của nấm, làm suy yếu nấm bệnh.

Cellulase: Có nhiệm vụ phân giải cellulose, một polysaccharide quan trọng trong thành tế bào thực vật. Mặc dù cellulose không phải là thành phần chính của thành tế bào nấm, nhưng việc phân giải cellulose giúp các tác nhân kiểm soát sinh học tiếp cận và tiêu diệt các mầm bệnh có liên quan đến thành phần này. Cellulase cũng đóng vai trò trong việc phá hủy cấu trúc bảo vệ của các mô thực vật bị bệnh do nấm tấn công, tạo điều kiện thuận lợi cho các enzyme khác như chitinase và β-1,3-glucanase hoạt động mạnh hơn. *Trichoderma* spp. nổi tiếng với khả năng sản xuất cellulase, giúp phân giải và ức chế các mầm bệnh như *Pythium ultimum* trên cây con (Howell, 2003).

Protease: Phân giải protein thành chuỗi peptide và axit amin, làm yếu cấu trúc cơ học của thành tế bào, góp phần làm hư hại và phá hủy tế bào nấm bệnh. Do các sợi nhỏ của β-glucanase và chitin được được nối với nhau bằng các phân tử protein. Nhiều nhà nghiên cứu đã chứng minh được khả năng diệt nấm và diệt tuyến trùng của protease do VSV đối kháng sản xuất. Chẳng hạn, chủng *B. velezensis* TSA32-1 có hoạt tính protease và cellulase, đồng thời thể hiện khả năng đối kháng với các tác nhân gây bệnh thực vật như *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum* và *Pythium ultimum* (Saberi Riseh et al., 2024).

1.1.5.3. Sự phối hợp của các enzyme ngoại bào trong quá trình phân giải thành tế bào nấm

Phối hợp giữa các enzyme phân giải thành tế bào nấm (Hình 1.9). Nhiều chủng BCA được báo cáo về khả năng tiết ra đồng thời nhiều enzyme ngoại bào để phá hủy thành tế bào nấm bệnh. Cụ thể, dịch chiết ngoại bào của chủng *B. siamensis* 3BS12-4 có hoạt tính của các enzyme protease (4,48 ± 0,09 U/mg protein), β-1,3-glucanase (15,35 ± 0,02 U/mg protein) và chitinase (1,21 ± 0,005 U/mg protein) đã tác động đến bào tử và phá hủy tế bào nấm *A. flavus*. Khi quan sát SEM cho thấy sợi nấm và bào tử nấm *A. flavus* bị tổn thương và mất khả năng nảy mầm. Tổn thương này dẫn đến biến dạng và phá vỡ tế bào chất bên trong, gây ra rò rỉ các thành phần tế bào (Aphaiso et al., 2024). Dịch nuôi cấy được loại bỏ tế bào của chủng *B. siamensis* YB-1631 chứa hoạt tính các enzyme β-glucanase, amylase, cellulase và protease và chitosanase đã được báo cáo tham gia vào việc gây ra sợi nấm bị đứt, sưng tấy, phân giải thành tế bào nấm *Fusarium pseudograminearum* gây bệnh thối gốc ở lúa mì (Q. Dong et al., 2023).



Hình 1.9. *Minh họa quá trình phân giải thành tế bào nấm bởi các enzyme thủy phân của Bacillus sp. (Ajuna et al., 2023).*

1.1.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của vi sinh vật

1.1.6.1. Yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Nhiệt độ phản ứng: Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ β-1,3-glucanase. Khi nhiệt độ vượt ngưỡng tối ưu, hoạt độ enzyme có thể suy giảm do biến đổi cấu trúc không gian hoặc biến tính. Nhiệt độ hoạt động tối ưu khác nhau tùy nguồn gốc enzyme, chẳng hạn β-1,3-glucanase từ *Aspergillus fumigatus* được ghi nhận trong khoảng 24–40 °C, trong khi enzyme từ vi khuẩn cổ *Pyrococcus furiosus* có thể đạt tối ưu ở 100–105 °C (Caseiro et al., 2022). β-glucanase của chủng *B. subtilis* W3.15 hoạt động tối ưu ở pH 7,0 và nhiệt độ từ 60-80 °C và có khả năng ức chế cao đối với sự phát triển của sợi nấm *F. oxysporum* và làm giảm đáng kể sinh khối nấm (Putri et al., 2021).

Độ pH môi trường: Ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme thông qua ảnh hưởng đến trung tâm phản ứng của enzyme. Giá trị pH tối ưu và độ bền pH của enzyme β-1,3-glucanase thay đổi tùy loài, pH tối ưu thường dao động trong khoảng từ 5,0 đến 6,5. β-1,3-glucanase từ nấm có thể hoạt động ở các giá trị pH thấp hơn (4,0–6,0) (El-Shora et al., 2021). Glucanase của chủng *Bacillus* spp. PX.07 phân lập từ dạ cỏ của bò ở Việt Nam có pH hoạt động tốt từ 3-6, nhiệt độ tối ưu là 60 ºC (Anh et al., 2017).

Ion kim loại và các chất hóa học: Endo-β-1,3-glucanase PeBgl1 tái tổ hợp từ gen của *Penicillium expansum* có hoạt tính enzyme bị giảm hoạt tính đáng kể khi có mặt của ion kim loại Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+} và Zn^{2+} hoặc các chất SDS và TritonX-100 (Wang. et al., 2023). Trong khi đó, Co^{2+}, Mn^{2+} và Fe^{3+} làm tăng hoạt độ β-1,3-glucanase của *Paenibacillus polymyxa* AT4 (Quang et al., 2024).

1.1.6.2. Yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của vi sinh vật

Nhiệt độ môi trường: Ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của VSV. Nhiệt độ quá thấp hoặc quá cao đều làm giảm sinh trưởng và tích lũy enzyme; mức nhiệt tối ưu thay đổi tùy loài và điều kiện nuôi cấy. Chẳng hạn, *B. siamensis* N-1 đạt hoạt độ β-1,3-glucanase cao nhất ở 30 °C (You et al., 2021).

pH môi trường: Ảnh hưởng đến sinh trưởng VSV và sinh tổng hợp β-1,3-glucanase. pH tác động trực tiếp đến tính thấm màng, khả năng hấp thu dinh dưỡng và cấu hình ion hóa của các nhóm chức trong enzyme, từ đó quyết định mức độ ổn định và hoạt tính xúc tác (Plakys et al., 2022).

Thành phần môi trường nuôi cấy

Nguồn cacbon: Cung cấp năng lượng, vừa là nguồn nguyên liệu để tạo khung chất hữu cơ, đồng thời là yếu tố định hướng cho biểu hiện enzyme của VSV. Theo Quang et al (2024), hoạt độ enzyme β-1,3- glucanase đạt cao nhất đối với chủng *P. polymyxa* AT4 khi sử dụng nguồn cacbon là đại mạch, chủng *B. tequilensis* ML6 cần nguồn cacbon là yến mạch. Elshami et al. (2025), sử dụng các nguồn cacbon chứa β-glucan phức hợp (1%) của *Streptomyces albogriseolus* S13-1, bao gồm bột lúa mạch, bột yến mạch, bột ngô và bột mì, kết quả hoạt tính enzyme cao nhất với bột yến mạch và bột ngô, tiếp theo là bột lúa mạch, sau đó là bột mì.

Nguồn nitơ: Tham gia vào quá trình tổng hợp các đại phân tử hữu cơ quan trọng như protein, axit nucleic và các hợp chất sinh học khác của tế bào VSV. Axit amin là những phân tử hợp thành phân tử enzyme, axit amin có ảnh hưởng tốt đến quá trình sinh tổng hợp enzyme. Các nguồn nitơ khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng

khác nhau đến sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh tổng hợp β-glucanase. Elshami et al. (2025) cho thấy có sự khác biệt không đáng kể về sản lượng β-glucanase từ môi trường chứa tryptone, chiết xuất mạch nha, urê và amoni sulfat so với cao nấm men, trong khi việc sử dụng chiết xuất thịt bò dẫn đến sự gia tăng đáng kể hoạt tính.

Nguồn cơ chất: Ảnh hưởng đến sinh tổng hợp β-1,3-glucanase; trong đó, cấu trúc và độ hòa tan của glucan có vai trò đáng kể. Các loại β-1,3-glucan mạch thẳng và dễ hòa tan như laminarin thường kích thích sản xuất enzyme mạnh mẽ nhất, trong khi các cấu trúc phức tạp hơn như curdlan (cấu trúc xoắn) hoặc glucan nấm men (có phân nhánh β-1,6) thường cho hoạt độ enzyme thấp hơn do khó tiếp cận. Theo Ueki et al. (2020), khả năng sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của *Clostridium* TW1, TW10 và TB10 phụ thuộc vào nguồn glucan, trong đó laminarin và curdlan có khả năng cảm ứng mạnh, nhưng hiệu quả khác nhau giữa các chủng.

Nguồn khoáng dinh dưỡng: Ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp enzyme, đặc biệt một số kim loại vi lượng đóng vai trò là nguyên tố khoáng thiết yếu tham gia cấu trúc hoặc hoạt hóa các enzyme. Các nguyên tố khoáng này thường có vai trò là các cofactor, ổn định cấu hình không gian, tham gia trung hòa điện tích trong vị trí hoạt động hoặc hỗ trợ gắn cơ chất.

Thời gian nuôi cấy: Ảnh hưởng đến sinh trưởng và tích lũy β-1,3-glucanase ngoại bào của VSV. Hoạt độ enzyme thường đạt mức cao ở cuối pha logarit hoặc đầu pha ổn định và có thể giảm khi kéo dài thời gian nuôi. Các nghiên cứu đã ghi nhận thời điểm đạt hoạt độ β-1,3-glucanase cao nhất khác nhau giữa các chủng: 12 và 15 giờ đối với *Bacillus* sp. 41 và *Bacillus* sp. 4 (Huyền et al., 2024), 24 giờ ở *P. polymyxa* M6 (A et al., 2024) và 72 giờ ở *B. siamensis* N-1 (You et al., 2021).

Tỉ lệ cấy giống: Ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng của VSV và quá trình tổng hợp enzyme ngoại bào như β-1,3-glucanase. Khi tỉ lệ cấy giống quá thấp, quần thể VSV tăng trưởng chậm, kéo dài thời gian đạt pha lũy thừa, dẫn đến năng suất enzyme thấp. Ngược lại, nếu tỉ lệ quá cao, môi trường nhanh chóng bị cạn kiệt dinh dưỡng và oxy, đồng thời tăng tích lũy các chất ức chế, dẫn đến giảm hoạt lực enzyme thu được. Theo Dewi et al. (2016), với chủng *B. subtilis* SAHA 32.6 tỉ lệ cấy giống 3,28 % cho β-1,3-glucanase hoạt tính enzyme cao nhất. Trong khi đó, Majeed et al. (2024) xác định tỉ lệ giống cấy 1% là tối ưu cho quá trình sản xuất protease của *Bacillus subtilis* BSP; khi tăng tỉ lệ giống cấy vượt mức này, khả năng sản xuất enzyme có xu hướng giảm trong các điều kiện nuôi cấy khảo sát.

Tốc độ lắc: Giúp cung cấp lượng oxygen cho tế bào sử dụng đồng thời giúp phân bố đều mật độ tế bào trong môi trường nuôi cấy. Theo Baumann et al. (2010), tốc độ lắc trong quá trình nuôi cấy nấm men ảnh hưởng đến khả năng cung cấp oxygen hòa tan, qua đó tác động đến sự sinh trưởng và tiết enzyme ngoại bào. Việc tăng tốc độ lắc có thể cải thiện khả năng chuyển oxygen vào môi trường, tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động trao đổi chất và sinh tổng hợp enzyme.

1.2. CƠ SỞ THỰC TIỄN

1.2.1. Tình hình sản xuất lạc trên thế giới, Việt Nam và vùng nghiên cứu

1.2.1.1. Trên thế giới

Lạc được trồng khắp các vùng ôn đới ấm và nhiệt đới trên thế giới. Nhiều nước ở châu Á, châu Phi, Châu Mỹ lạc được canh tác với mục đích thương mại (Al-Khayri et al., 2019). Khu vực châu Á dẫn đầu thế giới về diện tích và sản lượng lạc, tiếp theo là châu Phi, Bắc Mỹ và Nam Mỹ (Bảng 1.2). Hiện nay, sản xuất lạc có nhiều cơ hội phát triển

như nhu cầu nội địa cao, cộng đồng nông dân khởi nghiệp, tiếp cận thị trường toàn cầu, các phòng thí nghiệm được trang bị tốt. Các giống lạc chịu hạn có thể tăng cường năng suất và giảm thiểu tác động tiêu cực của biến đổi khí hậu (Zhen et al., 2024).

***Bảng 1.2**. Diện tích, năng suất và sản lượng lạc trên thế giới*

TT	Khu vực	Diện tích (triệu ha)		Năng suất (tấn/ha)		Sản lượng (triệu tấn)	
		2021	**2022**	**2021**	**2022**	**2021**	**2022**
1	Thế giới	32,65	30,54	1,67	1,78	54,49	54,24
2	Ấn Độ	6,01	5,70	1,70	1,78	0,24	0,13
3	Trung Quốc	4,82	4,46	3,81	4,12	8,36	8,38
4	Nigeria	3,70	3,40	1,14	1,26	4,23	4,28
5	Sudan	3,94	3,00	0,60	0,83	2,36	2,50
6	Senegal	1,21	1,23	1,38	1,23	1,68	1,50
7	Chad	0,75	0,76	1,06	1,09	0,80	0,83
8	Mỹ	0,62	0,56	4,63	4,50	2,89	2,53
9	Argentina	0,40	0,41	3,15	3,31	1,27	1,35
10	Indonesia	0,36	0,19	1,94	2,01	0,70	0,38
11	**Việt Nam**	**0,17**	**0,16**	**2,60**	**2,58**	**0,43**	**0,41**

(Nguồn: FAOSTAT, 2024)

1.2.1.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, cây lạc được trồng từ lâu đời và sử dụng rộng rãi trong đời sống xã hội. Năm 2022, năng suất lạc của Việt Nam cao gấp 1,5 lần năng suất lạc trung bình của thế giới và vượt trội so với năng suất lạc của nhiều nước như Ấn Độ, Myanmar, Indonesia, Nigeria, Sudan,… (Bảng 1.3). Nhìn chung, diện tích trồng lạc của Việt Nam giảm nhẹ trong giai đoạn 2019 – 2022, nguyên nhân có thể do chuyển đổi cơ cấu cây trồng, ảnh hưởng của biến đổi khí hậu, thiếu nước, nắng nóng kéo dài và đặc biệt là tình hình bệnh hại. Tuy nhiên, nhờ áp dụng giống mới và kỹ thuật canh tác tiên tiến, năng suất lạc đã tăng lên, giúp sản lượng chỉ giảm nhẹ và cơ bản duy trì ổn định, đáp ứng đủ nhu cầu trong nước và xuất khẩu. Do đó, cần tiếp tục cải tiến kỹ thuật canh tác và nâng cao hiệu quả phòng trừ bệnh hại để đảm bảo năng suất và sản lượng trong tương lai.

***Bảng 1.3.** Diện tích, năng suất và sản lượng lạc ở Việt Nam*

TT	Khu vực	Diện tích (nghìn ha)		Năng suất (tấn/ha)		Sản lượng (nghìn tấn)	
		2021	**2022**	**2021**	**2022**	**2021**	**2022**
1.	**Cả nước**	165,23	159,36	2,6	2,58	430,37	408,08
2.	Bắc Trung Bộ và Duyên hải miền Trung	75,6	73,83	2,63	2,51	199	185,52
3.	Nghệ An	12,21	11,79	2,75	2,71	33,55	31,94
4.	Bình Thuận	5,75	6,19	1,84	1,92	10,58	11,89
5.	Quảng Bình	4,15	3,93	2,44	2,38	10,12	9,34
6.	**Quảng Trị**	**3,29**	**3,14**	**2,36**	**1,78**	**7,76**	**5,59**
7.	**Thành phố Huế**	**2,52**	**2,38**	**2,27**	**1,6**	**5,71**	**3,81**
8.	Ninh Thuận	0,77	0,8	1,44	1,34	1,11	1,07
9.	Phú Yên	0,46	0,48	2,4	2,53	1,1	1,22
10.	Lâm Đồng	0,86	0,88	1,26	1,27	1,08	1,11
11.	Kon Tum	0,14	0,14	1,87	1,88	0,27	0,27

(Nguồn: Tổng Cục Thống kê Việt Nam, 2024)

1.2.1.3. Ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế

Sản xuất lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế chiếm vị trí đáng chú ý trong ngành nông nghiệp của Việt Nam. Theo Tổng cục thống kê (2024), tỉnh Quảng Trị có tổng diện tích trồng lạc đứng thứ 18 (3,14 nghìn ha), thứ 47 về năng suất (1,78 tấn/ha) và thứ 23 về sản lượng (5,59 tấn); thành phố Huế đứng thứ 25 về diện tích (2,38 nghìn ha), thứ 51 về năng suất (1,6 tấn/ha) và thứ 28 về sản lượng lạc (3,81 tấn) so với cả nước. Tuy nhiên, năng suất lạc của tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế đều thấp hơn năng suất trung bình của cả nước. Sự chênh lệch lớn giữa quy mô diện tích và năng suất cho thấy yêu cầu cấp thiết về các giải pháp kỹ thuật và quản lý dịch bệnh nhằm cải thiện năng suất bình quân và ổn định sản lượng lạc tại khu vực này.

1.2.2. Đặc điểm sinh thái vùng nghiên cứu

Quảng Trị và Thừa Thiên Huế thuộc khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa, có sự phân hóa rõ rệt giữa mùa khô nóng và mùa mưa, đồng thời chịu tác động của các hiện tượng thời tiết cực đoan (Thang et al., 2023; Trang et al., 2026). Vào mùa hè, gió phơn Tây Nam vượt dãy Trường Sơn góp phần gây ra các đợt nắng nóng (Kusaka et al., 2024). Phân tích ảnh vệ tinh giai đoạn 2014–2024 tại Quảng Trị cho thấy mức độ hạn hán biến động theo không gian và thời gian, trong đó khu vực ven biển thường được phân loại ở mức hạn hán cực đoan (Trang et al., 2026). Trong mùa mưa, sự tương tác giữa không khí lạnh, nhiễu động nhiệt đới và địa hình có thể gây mưa lớn, lũ lụt (Vân & Tăng, 2003; Thang et al., 2023). Điển hình, lượng mưa tại Huế vượt 1.800 mm trong hai ngày tháng 11/1999 và lượng mưa tích lũy tháng 10/2020 đạt 3.245 mm tại Hướng Linh, Quảng Trị (Thang et al., 2023). Các dự báo theo kịch bản RCP4.5 và RCP8.5 giai đoạn 2020–2035 cho thấy nguy cơ hạn hán và điều kiện mưa ẩm cực đoan tại Thừa Thiên Huế có thể gia tăng, với mức độ khác nhau giữa các kịch bản (Son et al., 2024).

Do đặc tính cát chiếm tỉ lệ 68,24−85,28 %, đất thoát nước quá nhanh, không giữ được ẩm và dinh dưỡng (Tung et al., 2024). Trên các loại đất cát tại Phú Vang và Nam Hải Lăng, nhiệt độ bề mặt đất có thể vượt quá giới hạn chịu đựng của đa số vi sinh vật có ích. Thổ dưỡng ở các vùng này còn đặc trưng bởi độ chua cao (pH đo trong dung dịch KCl ≈ 4,41−4,75), nghèo dinh dưỡng và khả năng giữ nước kém, tạo ra áp lực sinh thái rất lớn lên sinh trưởng của cây nông nghiệp (Tung et al., 2024). Đối với cây lạc trồng ở miền trung, ở giai đoạn ra hoa rộ và hình thành quả, nếu cây lạc gặp hạn hán kéo dài 10 ngày, tỉ lệ lá héo rũ có thể lên tới 80−100 % (Long et al., 2023).

Trong điều kiện khắc nghiệt nêu trên, *A. niger* thể hiện sự tương thích sinh thái vượt trội. Với dải nhiệt độ sinh trưởng rộng (6−47 °C), loài nấm này không chỉ tồn tại mà còn phát triển mạnh trong các đợt nắng nóng đỉnh điểm (Dijksterhuis & Wösten, 2013; Li et al., 2023). Khả năng chịu hạn và nhiệt của *A. niger* được củng cố bởi cơ chế tích lũy các hợp chất bảo vệ tương thích như mannitol và trehalose, giúp bảo vệ cấu trúc protein và duy trì áp suất thẩm thấu (Li et al., 2023). Sự kết hợp giữa đặc điểm đất cát chua và khả năng chịu stress nhiệt giúp *A. niger* chiếm ưu thế tuyệt đối, trở thành tác nhân nguy hại gây bệnh HRGMĐ trên cây lạc và các cây trồng cạn tại địa phương.

Điều kiện sinh thái khắc nghiệt ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế không chỉ gây áp lực lên sinh trưởng cây trồng, sự gia tăng của nấm bệnh, mà còn giảm hiệu lực của các giải pháp sinh học. Các chủng VSV ngoại lai ở các chế phẩm sinh học được

phân lập từ các vùng có điều kiện nhiệt độ ổn định hoặc ưa mát, nên dễ dàng đối mặt với hiện tượng "stress nhiệt" và "stress ẩm" khi đưa vào canh tác tại hai địa phương này (Tung et al., 2024). Việc nhiệt độ đất duy trì cao hơn ngưỡng tối ưu khiến tỉ lệ sống sót thấp và khả năng thiết lập quần thể tại vùng rễ bị suy giảm nghiêm trọng. Điều này dẫn đến hiệu lực đối kháng của các chế phẩm ngoại lai thường không ổn định, thường thất bại trên đồng ruộng khi gặp các hiện tượng thời tiết cực đoan. Do đó, rất cần thiết phải tuyển chọn các chủng VSV "bản địa" để phục vụ cho canh tác tại địa phương (Cương et al., 2019).

1.2.3. Thực trạng bệnh héo rũ gốc mốc đen trên thế giới, Việt Nam và vùng nghiên cứu

1.2.3.1. Trên thế giới

Bệnh HRGMĐ do *A. niger* là một trong những bệnh nấm nguy hiểm và phổ biến nhất ảnh hưởng đến cây lạc trên toàn thế giới. Chúng làm chết cây con, giảm sự sinh trưởng, phát triển, gây thiệt hại về năng suất, chất lượng hạt lạc và thậm chí tiết độc tố trên sản phẩm gây bệnh nguy hiểm cho con người và vật nuôi (Pal et al., 2014). Thiệt hại về năng suất lạc trên thế giới do do nấm, vi khuẩn và virus ước tính đến 80 % (Biswal et al., 2024). Bệnh này có phạm vi phân bố rất rộng và tác động mạnh mẽ đến các vùng trồng lạc lớn như Ấn Độ, Trung Quốc và nhiều nước châu Phi. Ở Ấn Độ, bệnh đặc biệt nghiêm trọng tại các vùng đất cát, nơi tỉ lệ cây chết có thể lên tới 40 % - 50 %, gây thiệt hại lớn về năng suất và tạo áp lực kinh tế nặng nề cho nông dân (Ghewande et al., 2002). Tương tự, tại Trung Quốc, bệnh này làm giảm năng suất và chất lượng lạc, ảnh hưởng nghiêm trọng đến xuất khẩu và thị trường nội địa (Rohtas et al., 2016). Ở châu Phi, bệnh hại khiến năng suất lạc giảm từ 28 % đến 50 %, đe dọa an ninh lương thực và làm suy yếu nền kinh tế của các cộng đồng phụ thuộc vào trồng lạc (Mohammed & Chala, 2014). Tổn thất năng suất hàng năm trên toàn thế giới do bệnh HRGMĐ gây ra là hơn 10 % và phổ biến hơn ở các loại đất có độ ẩm thấp và nhiệt độ cao, khoảng 30 ºC (Kumari & Singh, 2016; Zakaria, 2024).

1.2.3.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, khí hậu nhiệt đới ẩm, việc mở rộng diện tích, thâm canh lạc đã tạo điều kiện thuận lợi cho nhiều loại bệnh lạc phát triển. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong số các tác nhân gây bệnh trên lạc, bệnh nấm là phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng nhất, đặc biệt là các loài nấm có nguồn gốc từ đất và lây qua hạt giống. Ở miền trung Việt Nam, một số kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh HRGMĐ và héo rũ gốc mốc trắng, bệnh héo rũ tái xanh thường xuyên gây hại trên đồng ruộng với tỉ lệ từ 3 – 11 % (Cương et al., 2018). Tại thành phố Huế, bệnh HRGMĐ cũng là một vấn đề lớn. *A. niger* thường tấn công cây lạc từ giai đoạn non và kéo dài đến sau thu hoạch, với tỉ lệ mẫu lạc nhiễm bệnh có thể lên đến 66 % và tỉ lệ hạt bị nhiễm bệnh dao động từ 1-30 % (Hà & Hòa, 2012).

1.2.3.3. Ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế

Ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế, nghiên cứu gần đây cho thấy bệnh HRGMĐ phát triển nhiều ở giai đoạn cây con đến giai đoạn hình thành quả. Các triệu chứng bệnh thay đổi tuỳ theo giống lạc bị nhiễm bệnh. Bệnh phát sinh ở hạt giống và cổ rễ suốt thời kỳ mới nảy mầm. Nấm mốc màu đen phát triển dọc theo các gân mô thịt của quả. Ở cây lạc, nấm gây thối rữa phần chóp hay cổ, điển hình là rễ uốn cong và biến

dạng ở phần bên trên của cây. Thời điểm vụ Đông Xuân 2021- 2022, tất cả các hộ dân và cán bộ nông nghiệp ở vùng nghiên cứu đều cho biết, bệnh HRGMĐ xuất hiện và gây hại mạnh trên cây lạc. Trong đó, tại Quảng Trị, 5 % người được phỏng vấn trả lời bệnh nhiễm nhẹ trên cây lạc, 25 % người trả lời bệnh gây hại ở mức trung bình, 70 % người trả lời bệnh gây hại ở mức nặng. Tại thành phố Huế, có 60 % người được phỏng vấn cho biết bệnh HRGMĐ gây hại nặng trên cây lạc, 30 % cho biết bệnh gây hại ở mức trung bình và 10 % cho biết bệnh gây hại nhẹ (Thủy, et al., 2024)

Tổng hợp các dữ liệu trên cho thấy, trong khi bệnh héo rũ gốc mốc đen phân hóa theo vùng sinh thái, bệnh HRGMĐ thể hiện xâm nhiễm đồng nhất, cường độ gây hại vượt trội trên toàn khu vực. Đây là cơ sở thực tiễn quan trọng khẳng định tính cấp thiết của việc nghiên cứu các giải pháp đối kháng sinh học nhằm kiểm soát tác nhân *A. niger*, góp phần bảo vệ năng suất và phát triển nông nghiệp bền vững tại các tỉnh miền Trung.

1.2.4. Các biện pháp phòng trừ hiện nay và những hạn chế

Trên thế giới, việc phòng trừ các bệnh do nấm gây ra trên cây lạc được thực hiện thông qua sự phối hợp nhiều giải pháp, như sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, áp dụng các biện pháp kỹ thuật nông nghiệp, luân canh cây trồng, điều tiết độ ẩm đất bằng chế độ tưới tiêu phù hợp, bón vôi để cải thiện tính chất đất và lựa chọn các giống lạc có khả năng kháng bệnh. Trong khi đó, tại Việt Nam, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học vẫn là biện pháp chủ yếu trong kiểm soát các bệnh do nấm gây ra trên cây lạc. Các biện pháp khác như luân canh, sử dụng giống kháng thuốc, phơi đất cũng được sử dụng nhưng hiệu quả không ổn định. Xu hướng sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ nấm cũng đang được chú ý sử dụng.

Sử dụng thuốc hóa học diệt nấm: Nhiều nghiên cứu ghi nhận thuốc hóa học được sử dụng để kiểm soát nấm bệnh. Lora và Begum (2022) báo cáo rằng mancozeb 75 % WP có hiệu quả cao nhất với tỉ lệ ức chế 86,73 %, tiếp theo là carbendazim 50 % WP. Nath & Patel (2022) cũng xác nhận pyraclostrobin + epoxiconazole, tebuconazole 2 % DS và các tổ hợp khác như carbendazim + mancozeb và azoxystrobin + mancozeb cho thấy khả năng mạnh mẽ trong phòng trừ nấm *A. niger* đạt tỉ lệ ức chế 100 %.

Sử dụng biện pháp sinh học: Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tiềm năng ứng dụng vi sinh vật đối kháng trong phòng trừ nấm *A. niger* gây bệnh trên cây lạc. Trong đó, các loài thuộc chi *Trichoderma*, bao gồm *T. viride, T. harzianum, T. hamatum* và *T. virens*, được đánh giá có khả năng hạn chế sự phát triển của nấm gây bệnh (Nath & Patel, 2022). Hoạt động đối kháng của các vi sinh vật này được thực hiện thông qua nhiều cơ chế, chủ yếu là ký sinh trực tiếp trên sợi nấm, tổng hợp các chất có hoạt tính kháng nấm và cạnh tranh nguồn dinh dưỡng với tác nhân gây bệnh. Bên cạnh đó, một số vi khuẩn như *P. fluorescens* và *B. subtilis* cũng có khả năng ức chế *A. niger* thông qua việc tạo ra các hợp chất kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên cùng những chất chuyển hóa dạng bay hơi và không bay hơi, góp phần kìm hãm quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm.

Sử dụng giống kháng bệnh: Divya Rani et al. (2018) đã sàng lọc 40 dòng lạc lai trong điều kiện nhà kính để kiểm tra khả năng kháng bệnh HRGMĐ. Kết quả, trong số 40 dòng, có 10 dòng kháng với tỉ lệ mắc bệnh dưới 15 %.

Biện pháp quản lý bệnh tổng hợp: Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng biện pháp tổng hợp, bao gồm sử dụng thuốc diệt nấm, tác nhân sinh học và các kỹ thuật canh tác,

giúp kiểm soát hiệu quả bệnh HRGMĐ do nấm *A. niger* gây ra trên cây lạc. Gajera et al (2011) báo cáo các biện pháp như luân canh cây trồng và tránh gieo hạt sâu để giảm nguy cơ nhiễm bệnh do *A. niger* gây ra. Xử lý hạt và đất bằng carboxin và *T. harzianum* giúp tăng khả năng nảy mầm, hoặc kết hợp *T. viride* với captan cho tỉ lệ bệnh thấp (Lora & Begum, 2022)

1.2.5. Sử dụng các chế phẩm sinh học thương mại và sự cần thiết của chủng bản địa

Vi sinh vật ngoại lai khi được đưa vào môi trường mới thường phải đối mặt với hiện tượng "Allochthonous stress" – tình trạng sốc sinh thái do sự khác biệt quá lớn về các yếu tố phi sinh học (Z.Wang et al., 2024). Tại khu vực miền Trung Việt Nam, đặc điểm khí hậu cực đoan với nền nhiệt độ bề mặt đất cao và áp lực hạn hán kéo dài (Trang et al., 2026) gây ra những tác động tiêu cực trực tiếp đến sự sống sót của VSV (Bigatton et al., 2025). Khi tiếp xúc với nhiệt độ cao và độ ẩm thấp, các VSV không có nguồn gốc bản địa dễ bị mất nước tế bào, dẫn đến biến tính protein và giới hạn hiệu suất của hệ enzyme đối kháng (Etesami et al., 2026). Nghiên cứu về *T. asperellum* đã chỉ ra rằng tốc độ tăng trưởng và khả năng tiết enzyme thủy phân (chitinase, glucanase) phụ thuộc chặt chẽ vào nhiệt độ và hoạt độ nước (*aw*); sự sụt giảm *aw* xuống dưới 0,910 làm ngừng trệ hoàn toàn sự phát triển của nhiều chủng ngoại lai (Begoude et al., 2007). Ngoài ra, bên cạnh yếu tố khí hậu, tính chất đất cát nghèo dinh dưỡng, hữu cơ thấp và độ pH chua tại khu vực nghiên cứu (Tung et al., 2024) là những rào cản sinh học đáng kể. Các chế phẩm thương mại thường được tối ưu hóa cho các loại đất có độ phì nhiêu cao và pH trung tính (Mendes et al., 2019). Trong điều kiện đất chua (pH ≈ 3,0−5,0), hoạt động của nhiều vi khuẩn có lợi bị ức chế mạnh mẽ, dẫn đến sự thất bại trong việc thiết lập quần thể (Cournault et al., 2025; Etesami et al., 2023). Sự "bất tương thích" này khiến VSV ngoại lai không thể cạnh tranh được với quần thể bản địa vốn đã thích nghi, dẫn đến tình trạng mật độ quần thể sụt giảm nhanh chóng sau khi bón (Z. Wang et al., 2024).

Ngược lại với các chủng ngoại lai, VSV bản địa mang những "vũ khí" sinh tồn đặc biệt, được hình thành qua quá trình chọn lọc tự nhiên để tồn tại trong những điều kiện khắc nghiệt nhất (Igiehon et al., 2024). Các tác nhân đối kháng bản địa đã phát triển khả năng duy trì hệ enzyme ổn định dưới áp lực thẩm thấu và nhiệt độ cao. Các chủng này thường sở hữu khả năng hình thành bào tử bền vững (ở *Bacillus*) hoặc sản sinh màng sinh học (biofilm) và các hợp chất exopolysaccharides (EPS) dồi dào để duy trì độ ẩm quanh tế bào (Etesami et al., 2026).

Trong điều kiện đất nghèo dinh dưỡng tại miền Trung, các chủng bản địa đã qua chọn lọc có khả năng duy trì hệ enzyme thủy phân mạnh mẽ để khai thác các nguồn hữu cơ hạn chế và đối kháng hiệu quả với mầm bệnh (Begoude et al., 2007). Ngoài ra, chủng bản địa có khả năng thiết lập mật độ và bám dính vùng rễ vượt trội so với chủng ngoại lai. Chủng *Pseudomonas* bản địa R4D2 cho thấy mật độ quần thể duy trì ổn định hơn và khả năng kiểm soát đa tác nhân gây bệnh (như *S. rolfsii*, *A. niger*, *R. solanacearum*) hiệu quả hơn đáng kể so với các chủng đối kháng nhập khẩu từ Hà Lan Điều này minh chứng rằng sự tương thích về kiểu gen và môi trường là yếu tố quyết định đến thành công của việc kiểm soát sinh học (Camerini et al., 2018; Francioli et al., 2025). Hơn nữa, việc sử dụng VSV bản địa không chỉ có ý nghĩa về mặt hiệu quả

bảo vệ thực vật mà còn góp phần quan trọng vào việc tái lập cân bằng sinh thái đất vốn đã bị tổn thương do lạm dụng hóa chất trong thời gian dài. Các chủng bản địa đóng vai trò là những "trung tâm" điều tiết trong mạng lưới tương tác VSV, giúp khôi phục độ phì nhiêu và cấu trúc đất thông qua các cơ chế phân giải lân, cố định đạm và cải thiện khả năng giữ nước của đất (Igiehon et al., 2024).

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ĐỐI KHÁNG SINH HỌC NẤM *A. NIGER*

1.3.1. Các nghiên cứu trên thế giới

Vineela et al. (2020) đánh giá hiệu quả *in vitro* của ba tác nhân sinh học như *T. viride, T. harzianum* và *T. hamatum* đối với *A. niger* nhiễm bệnh lạc và báo cáo tỉ lệ ức chế sinh trưởng sợi nấm cao nhất đáng kể với *T. hamatum* (75,20 %), tiếp theo là *T. harzianum* (74,70 %) và *T. viride* (71,90 %). Nath & Patel (2022) đánh giá hiệu quả *in vitro* của bốn tác nhân sinh học như *T. viride*, *T. harzianum*, *P. fluorescens* và *B. subtilis* đối với *A. niger* gây bệnh HRGMĐ cây lạc và báo cáo rằng *T. viride* đạt tỉ lệ ức chế sinh trưởng sợi nấm cao nhất (63,72 %), tiếp theo là *T. harzianum* (61,95 %), *P. fluorescens* (43,51 %) và *B. subtilis* (24,96 %). Dhumal et al. (2022) đã đánh giá khả năng quả ức chế *A. niger* gây thối lưu trữ của hành trong điều kiện *in vitro* thu được kết quả khả quan. Kết quả về tỉ lệ ức chế thử nghiệm lần lượt là *T. harzianum* (81,11 %), *T. virens* (78,22 %), *T. hamatum* (72,66 %), *T. viride* (64,88 %), *T. asperellum* (61,88 %), *B. subtilis* (57,77 %), *P. fluorescens* (55,55 %) và *Penicillium* spp. (40,77 %).

Nhìn chung, các nghiên cứu trên thế giới về kiểm soát sinh học bệnh HRGMĐ trên cây lạc đã ghi nhận tiềm năng ứng dụng của nhiều VSV đối kháng, tiêu biểu là các loài thuộc chi *Trichoderma, P. fluorescens* và *B. subtilis*. Các nghiên cứu chủ yếu đánh giá hiệu quả đối kháng trong điều kiện *in vitro* và khảo nghiệm ngoài đồng ruộng. Kết quả cho thấy nhiều tác nhân sinh học có khả năng hạn chế đáng kể sự sinh trưởng của nấm *A. niger*, trong đó nổi bật là *T. viride, T. harzianum* và một số loài thuộc chi *Pseudomonas*. Các cơ chế ức chế bao gồm ký sinh sợi nấm, sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp và cạnh tranh dinh dưỡng. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu chỉ báo cáo thực hiện trong phòng thí nghiệm và ít báo cáo kết quả áp dụng ở điều kiện đồng ruộng. Việc tập trung chủ yếu vào *Trichoderma* spp. và *Pseudomonas* spp. cho thấy sự hạn chế trong việc khai thác các loài VSV khác có tiềm năng. Ngoài ra, còn thiếu nghiên cứu về tác động lâu dài của các tác nhân sinh học lên hệ sinh thái và môi trường đất. Tính ổn định khi sử dụng các tác nhân này trong thực tế và các yếu tố ảnh hưởng vẫn chưa được làm rõ.

1.3.2. Các nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu bước đầu đã đề cập đến khả năng ứng dụng các tác nhân sinh học trong phòng trừ bệnh HRGMĐ do *Aspergillus* sp. gây ra trên cây lạc. Theo Cương et al., (2019), các chủng vi khuẩn thuộc hai chi *Pseudomonas* và *Bacillus* thể hiện hiệu quả kiểm soát bệnh héo rũ gốc mốc trắng, nhưng khả năng hạn chế bệnh do *A. niger* gây ra còn thấp. Bên cạnh đó, Hà và Hòa (2012) ghi nhận hoạt tính đối kháng của *Trichoderma* đối với các loài nấm gây bệnh héo rũ trên cây lạc. Ngoài các VSV đối kháng, Cương et al. (2018) cũng ghi nhận khả năng ức chế nấm gây bệnh của vật liệu nano bạc trong điều kiện thí nghiệm. Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng của vật liệu này trong điều kiện sản xuất thực tế vẫn cần được tiếp tục đánh giá. Tại thành phố Huế, các biện pháp như luân canh cây trồng, bón vôi và làm luống cao đã giúp giảm tỉ lệ cây lạc bị nhiễm bệnh, nhưng cần được điều chỉnh linh hoạt theo điều kiện từng vùng (Cương, 2015).

1.3.3. Các nghiên cứu tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế

Tại khu vực tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế, đang tồn tại những khoảng trống nghiên cứu lớn liên quan đến đối kháng sinh học nấm *A. niger* gây bệnh HRGMĐ trên cây lạc. Hà và Hòa (2012) ghi nhận chủng *Trichoderma* ĐR16 ức chế 100% hạch nấm *S. rolfsii* trên cây lạc. Cương et al. (2019) khẳng định hiệu quả của hai chủng bản địa *Bacillus* sp. S18F11 và S20D12 trong việc tăng số lượng nốt sần và nâng cao 26,8 % năng suất thực thu. Ngoài ra, việc phối hợp *Trichoderma* sp. PC6 và *P. putida* 214D trên nền hữu cơ Bokashi đã giúp giảm đáng kể tỉ lệ chết cây do *A. niger* và kiểm soát bệnh héo rũ tổng hợp trên đất xám bạc màu tại Hương Trà (Tý et al., 2017). Tuy nhiên, phần lớn các công trình hiện có tại miền Trung chủ yếu tập trung vào nấm *S. rolfsii* gây bệnh mốc trắng (Hà & Hòa, 2012) hoặc vi khuẩn *R. solanacearum* (Vũ, 2022). Đối với *A. niger*, các tài liệu đa số chỉ dừng lại ở việc đánh giá hiệu quả phòng trừ tổng quát qua tỉ lệ chết cây hoặc năng suất thực thu (Tý et al., 2017), mà chưa đi sâu vào phân tích cơ chế đối kháng chuyên biệt. Thiếu vắng các dữ liệu thực nghiệm làm rõ cơ chế đối kháng của VSV bản địa liên quan đến enzyme glucanase phân giải thành tế bào nấm. Đồng thời, thiếu hụt các thông số thích hợp về điều kiện nuôi cấy để các chủng đối kháng sinh tổng hợp enzyme cao nhất, ổn định và nâng cao hiệu lực kiểm soát sinh học ngoài thực địa.

1.4. CÁC CHIẾN LƯỢC KIỂM SOÁT NẤM *ASPERGILLUS* BẰNG VI KHUẨN *BACILLUS* VÀ XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU HIỆN ĐẠI

1.4.1. Các chiến lược kiểm soát nấm *Aspergillus* bằng vi khuẩn *Bacillus*

Sử dụng tế bào sống và cạnh tranh sinh thái: Tế bào *Bacillus* sống cạnh tranh vị trí bám dính, dinh dưỡng và hình thành màng sinh học (biofilm) rễ (Zhang et al., 2023; Ali, 2026). Dạng tế bào sống *B. velezensis* CNPMS-22 ức chế 59,05% sự phát triển sợi nấm *A. niger in vitro* (Figueiredo et al., 2025). Ưu điểm của hướng này là khả năng duy trì quần thể bền vững, nhưng hạn chế lớn nằm ở hiệu quả không ổn định trước biến động môi trường và sự cạnh tranh từ vi sinh vật bản địa (Ali, 2026; Dėlkus et al., 2026).

Sử dụng chất chuyển hóa và enzyme ngoại bào: Vi khuẩn *Bacillus* tiết các hợp chất lipopeptide (iturin, fengycin, surfactin) và enzyme thủy phân (chitinase, β-1,3-glucanase) gây tổn thương màng và thành tế bào nấm (Zhang et al., 2023; Figueiredo et al., 2025; Ali, 2026). Ưu điểm của hướng này là tác động nhanh, cơ chế phân tử rõ ràng; tuy nhiên, hạn chế nằm ở chi phí tinh chế cao và nguy cơ dễ bị phân hủy ngoài tự nhiên (Ali, 2026; Dėlkus et al., 2026). Thử nghiệm trên *A. flavus* cho thấy dịch chiết thô *B. velezensis* 802 gây mất điện thế màng ti thể và kích hoạt con đường apoptosis (L. Zhang et al., 2026).

Phối hợp đa chủng/cơ chế (SynCom): Tổ hợp vi khuẩn (SynCom) phối hợp đồng thời việc tiết lipopeptide, enzyme và biofilm giúp tăng phổ kháng và độ bền sinh thái (Zhang et al., 2023; Ali, 2026). Sự phối hợp tự nhiên giữa iturin và fengycin thể hiện tính hiệp đồng tăng độc tính kháng nấm (Gharsallah et al., 2025; Jiang et al., 2025). Hạn chế chính là sự phức tạp trong việc duy trì tính tương thích và ổn định quần thể (Ali, 2026).

1.4.2. Ứng dụng công nghệ omics trong nghiên cứu cơ chế đối kháng của vi khuẩn *Bacillus*

Sự phát triển của các công nghệ omics cho phép nghiên cứu cơ chế đối kháng ở nhiều cấp độ phân tử. Genomics phát hiện các cụm gene sinh tổng hợp (BGCs) lipopeptide và enzyme (Keshmirshekan et al., 2024; Dėlkus et al., 2026); metabolomics định danh chính xác các chất chuyển hóa (Jiang et al., 2025; L. Zhang et al., 2026); transcriptomics và proteomics làm rõ biến đổi biểu hiện gene và protein ở cả chủng đối kháng lẫn nấm hại (Z. Wang et al., 2024; Jiang et al., 2025).

S. Wang et al. (2024) sử dụng proteomics Label-free phát hiện 310 protein biểu hiện sai khác ở *A. niger* do iturin A, chỉ ra sự rối loạn chu trình TCA và đường phân; Jiang et al. (2025) tích hợp genomics (xác định 13 BGCs ở *B. velezensis* TCS001), metabolomics và transcriptomics chứng minh iturin A4 tác động lên màng tế bào nấm; L. Zhang et al. (2026) kết hợp genomics và metabolomics xác định 13 BGCs cùng chất kháng nấm isobutyric acid ở *B. velezensis* 802 đối kháng *A. flavus*.

Tích hợp omics với các phương pháp sinh hóa và hình thái giúp làm rõ cơ chế đối kháng của *Bacillus* đối với *Aspergillus*, song cần thêm bằng chứng thực nghiệm để xác nhận quan hệ nhân quả (Jiang et al., 2025; Dėlkus et al., 2026).

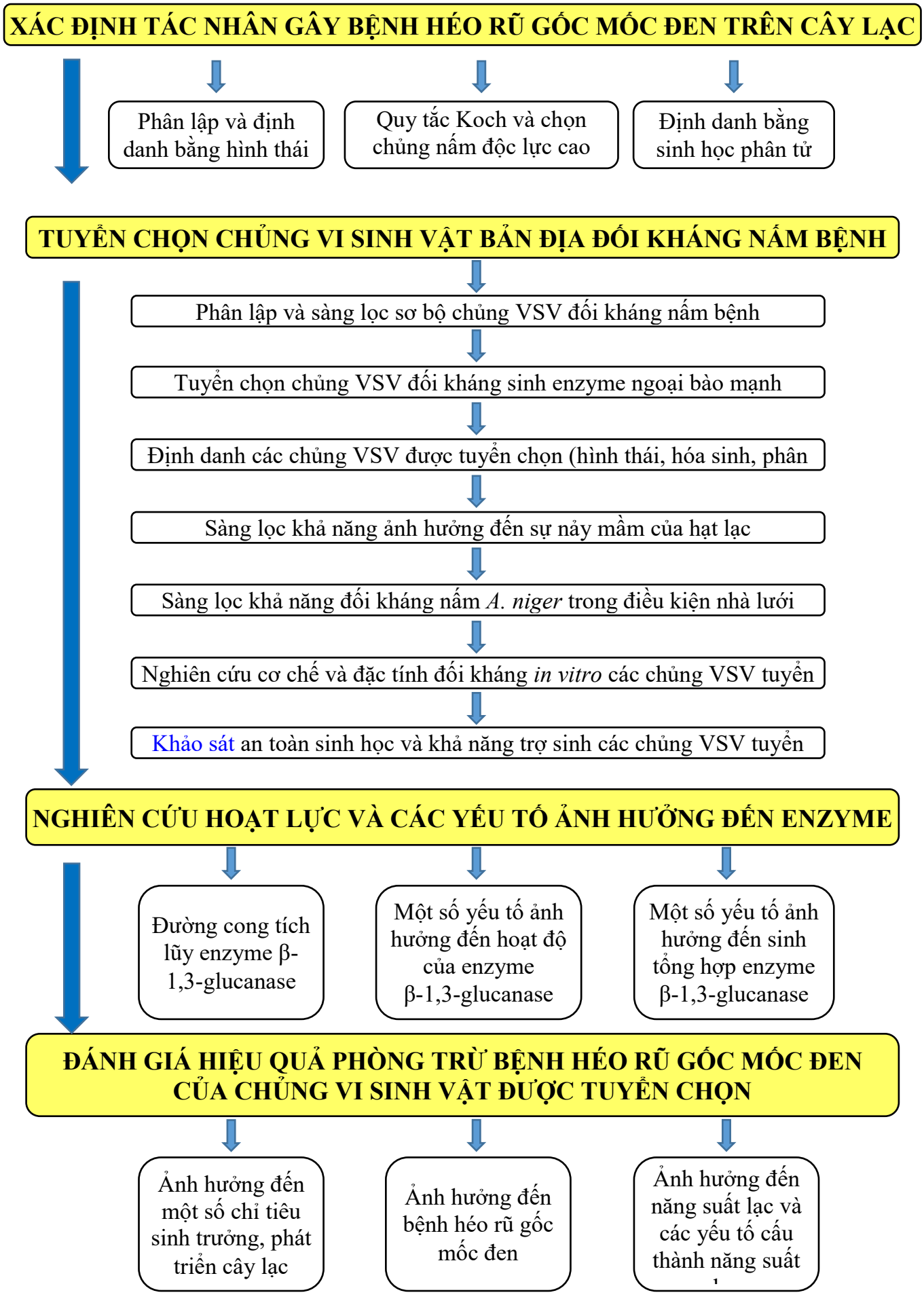
1.5. TÓM TẮT TỔNG QUAN VÀ ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU CỦA LUẬN ÁN

Nấm *A. niger* là tác nhân gây bệnh HRGMĐ nguy hiểm, làm giảm năng suất lạc từ 20–50 % tại khu vực miền Trung. Thành tế bào *A. niger* chứa chitin và β-glucan, trong đó β-1,3-glucan góp phần duy trì tính toàn vẹn cấu trúc. Vì vậy, VSV sinh enzyme ngoại bào, đặc biệt β-1,3-glucanase, là hướng tiềm năng trong kiểm soát nấm bệnh. Tuy nhiên, các chế phẩm vi sinh có nguồn gốc ngoài khu vực nghiên cứu có thể cho hiệu quả không ổn định trong điều kiện địa phương do khả năng thích nghi với đặc điểm đất cát nghèo dinh dưỡng và điều kiện khí hậu khắc nghiệt (nhiệt độ cao, gió Lào) đặc thù tại Quảng Trị và thành phố Huế.

Từ thực tiễn và khoảng trống nghiên cứu nêu trên, luận án xác định các định hướng nghiên cứu trọng tâm sau:

- 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.
- Phân lập, tuyển chọn chủng VSV 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.
- 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 VSV 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*.
- Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của chủng VSV được tuyển chọn trong điều kiện nhà lưới và thử nghiệm đồng ruộng.

Dựa trên mục tiêu và khoảng trống nghiên cứu đã phân tích, luận án thiết lập lộ trình gồm 4 nội dung nghiên cứu trọng tâm, được khái quát logic qua Hình 1.10.



Hình 1.10. *Sơ đồ nội dung nghiên cứu của luận án*

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU

- Các chủng nấm gây bệnh HRGMĐ trên cây lạc được phân lập từ cây lạc bị bệnh HRGMĐ điển hình, thu thập trực tiếp tại các vùng trồng lạc trọng điểm thuộc tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế (Bảng 2.1).

- Các chủng VSV đối kháng được phân lập từ đất vùng trồng lạc trọng điểm của tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế có tiềm năng sinh enzyme ngoại bào đối kháng với nấm bệnh (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. *Thông tin thu mẫu các chủng vi sinh vật lựa chọn nghiên cứu chuyên sâu*

Chủng vi sinh vật	Nhóm chủng	Địa điểm thu mẫu	Giống lạc	Giai đoạn sinh trưởng	Nguồn mẫu
A. niger QT1	Nấm bệnh	Nam Cửa Việt, tỉnh Quảng Trị	L 14	Cây con	Gốc thân rễ cây lạc bị bệnh HRGMĐ
A. niger H17	Nấm bệnh	Đan Điền, thành phố Huế	L 16	Ra hoa	Gốc thân rễ cây lạc bị bệnh HRGMĐ
B. siamensis B8	Vi sinh vật đối kháng	Phú Vang, thành phố Huế	L14	Cây con	Đất vùng rễ cây lạc
B. velezensis K1	Vi sinh vật đối kháng	Hương Trà, thành phố Huế	TK10	Hình thành quả	Đất vùng rễ cây lạc
B. siamensis 101	Vi sinh vật đối kháng	Phong Thái, thành phố Huế	Ran	Ra hoa	Đất vùng rễ cây lạc
B. siamensis 112	Vi sinh vật đối kháng	Ba Lòng, tỉnh Quảng Trị	L14	Hình thành quả	Đất vùng rễ cây lạc
B. velezensis 137	Vi sinh vật đối kháng	Nam Cửa Việt, tỉnh Quảng Trị	L16	Cây con	Đất vùng rễ cây lạc
T. asperellum HL6	Vi sinh vật đối kháng	Mỹ Thủy, tỉnh Quảng Trị	Sen Lai	Ra hoa	Đất vùng rễ cây lạc

- Giống lạc sử dụng trong nghiên cứu thử nghiệm là giống L14 được người dân sử dụng trồng hằng năm ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế. Đây là giống lạc có khả năng thích nghi cao với đất cát pha và khí hậu khô nóng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp phân lập và xác định tác nhân nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc

2.2.1.1. Thu thập, phân lập và giám định sơ bộ nấm Aspergillus sp.

Các mẫu cây bị bệnh HRGMĐ với các triệu chứng điển hình thu thập tại các ruộng lạc ở tỉnh Quảng Trị, thành phố Huế được cho vào túi nilon và đưa về phòng thí nghiệm để phân lập ngay. Mẫu được khử trùng bề mặt bằng cách rửa với ethanol 70% trong 1 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Tiếp theo, mẫu được đặt trong tủ cấy vô trùng và làm khô trên giấy thấm vô trùng. Các mẫu mô có kích thước khoảng 3 mm được thu

từ vùng gốc thân và rễ của cây lạc biểu hiện triệu chứng bệnh, sau đó chuyển lên đĩa Petri chứa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) bổ sung streptomycin sulfate với nồng độ 50 µg/mL. Các đĩa nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 25 ± 2 °C trong 7 ngày để theo dõi sự hình thành và phát triển của hệ sợi nấm trên môi trường. Những khuẩn lạc nấm phát triển từ mẫu bệnh được phân lập và làm thuần bằng cách cấy chuyển liên tiếp phần sợi nấm sang môi trường PDA mới, kết hợp kỹ thuật phân lập đơn bào tử. Sau khi thu được các chủng nấm thuần khiết, mẫu được chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường PDA thạch nghiêng và lưu giữ ở 4 °C nhằm phục vụ các thí nghiệm tiếp theo. Các chủng nấm phân lập được xác định đặc điểm hình thái đặc trưng của *A. niger* dựa trên việc so sánh các đặc điểm hình thái khuẩn ty, cành bào tử, bào tử phân sinh, bóng đỉnh và thể bình của chúng với các mô tả có sẵn trong tài liệu khoa học (Samson et al. 2014; Kumari & Singh, 2016: Rodriguez et al., 2019; Kumar et al., 2020; Thuận et al., 2022; Bajaya et al., 2022b; Zakaria, 2024).

2.2.1.2. Kiểm chứng theo quy tắc Koch và tuyển chọn chủng nấm có khả năng gây bệnh cao

Chín chủng nấm phân lập từ cây lạc bị bệnh HRGMĐ từ tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế được kiểm tra theo quy tắc Koch và chọn chủng có độc lực cao (Kumar et al., 2020; Bhunjun et al., 2021). Thí nghiệm được thực hiện trên giống lạc L14, giai đoạn 14 ngày tuổi trong nhà lưới của Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế. Hạt lạc được gieo trong chậu nhựa (35×30×30 cm) chứa 5 kg đất cát pha đã tiệt trùng, mỗi chậu có 3 cây. Bố trí thí nghiệm theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD) với 5 lần lặp lại cho mỗi chủng nấm.

Chuẩn bị dung dịch bào tử nấm *A. niger*:

Từng chủng nấm A. niger được nuôi riêng biệt trên môi trường PDA trong đĩa Petri ở nhiệt độ 25 ± 2 °C trong 7 ngày. Sau thời gian nuôi cấy, bổ sung nước cất vô trùng vào mỗi đĩa và sử dụng que trang vô trùng thao tác nhẹ trên bề mặt khuẩn lạc nhằm thu nhận bào tử. Dịch huyền phù thu được được cho đi qua hai lớp vải màn vô trùng để loại bỏ các thành phần sợi nấm và mảnh thạch còn lẫn trong mẫu. Mật độ bào tử được xác định bằng buồng đếm Neubauer dưới kính hiển vi quang học, sau đó điều chỉnh về nồng độ 10^5 bào tử/mL để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Lây nhiễm: Huyền phù bào tử nấm bệnh được phun vào vùng đất xung quanh rễ với thể tích 20 mL/chậu. Sau khi nhiễm nấm bệnh, các chậu được giữ trong nhà lưới. Các chậu được đặt cách nhau 50 cm để tránh lây nhiễm chéo. Lô đối chứng được phun 20 mL nước cất vô trùng.

Theo dõi triệu chứng và đánh giá: Quan sát các triệu chứng điển hình của bệnh HRGMĐ, đặc biệt sự xuất hiện của khối bào tử màu đen bao phủ vùng gốc thân rễ (Bajaya et al., 2022b; Junjadia et al., 2025). Đánh giá tỉ lệ bệnh DI (Disease Incidence) và chỉ số bệnh DS (Disease Severity) sau 14 và 21 ngày sau khi gây nhiễm dựa trên phương pháp của (Divya Rani et al., 2018; Cuong et al., 2018; Junjadia et al., 2025).

$$\text{DI (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \text{ x } 100$$

$$\text{DS (\%)} = \frac{[(1 \text{ x số cây ở cấp } 1)+(2 \text{ x số cây ở cấp } 2)+(3 \text{ x số cây ở cấp } 3)+(4 \text{ x số cây ở cấp } 4)] \text{ x} 100}{4 \text{ x tổng số cây}}$$

Mức độ nghiêm trọng của bệnh gây ra cho cây, được chấm điểm theo thang 0 đến 4, trong đó: (0) Không có triệu chứng bệnh; (1) Có triệu chứng bệnh nhưng không thấy sợi nấm mọc ra bên ngoài; (2) Có triệu chứng bệnh và thấy sợi nấm mọc ra bên ngoài; (3) Cây bị héo một phần và (4) Cây bị héo hoàn toàn và chết.

Tái phân lập: Tiến hành tái phân lập nấm từ các mô của cây lạc xuất hiện triệu chứng bệnh héo rũ gốc mốc đen trong lây nhiễm nhân tạo. Chủng nấm tái phân lập được nuôi cấy thuần khiết và so sánh, đối chiếu với chủng nấm ban đầu. Dựa trên các đặc điểm hình thái khuẩn lạc (màu sắc, cấu trúc, tốc độ sinh trưởng) và đặc điểm hình thái hiển vi (cấu trúc tơ nấm, hình thái và kích thước bào tử) để xác nhận tính đồng nhất giữa chủng nấm tái phân lập và chủng nấm ban đầu được sử dụng để lây nhiễm (Andge et al., 2017; Junjadia et al., 2025).

2.2.1.3. Định danh bằng sinh học phân tử

Các chủng nấm thuần được nuôi cấy trên môi trường PDA, ủ ở 25 ± 2 ºC trong 7 ngày và được sử dụng làm nguồn giống cấy. Sợi nấm phát triển trên môi trường PDA được cấy chuyển sang môi trường PDB (Potato Dextrose Broth), sau đó nuôi lắc ở tốc độ 125 rpm trong 3 ngày. Sinh khối nấm của từng chủng được thu nhận để tách chiết DNA tổng số.

DNA tổng số của nấm được tách chiết bằng bộ kit TopPURE Genomic DNA extraction KIT (Công ty TNHH Giải pháp Sinh học ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng ITS (Internal Transcribed Spacer) của nấm được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) và ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′). Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 60 µL, gồm: 30 µL dung dịch 2× Go Taq® Green Master Mix (M7502, Promega, USA), 5 µL mồi ITS1 (10 µM), 5 µL mồi ITS4 (10 µM), 2,5 µL DNA khuôn và 17,5 µL nước cất vô trùng hai lần. Chu kỳ PCR gồm: giai đoạn biến tính ban đầu ở 95 °C trong 10 phút, sau đó là 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm biến tính ở 94 °C trong 1 phút, gắn mồi ở 53 °C trong 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72 °C trong 1 phút; cuối cùng là giai đoạn kéo dài hoàn tất ở 72 °C trong 10 phút. Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1 % (w/v) trong đệm TAE, nhuộm bằng SafeView™ Classic Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials Inc., Canada). Các sản phẩm PCR sau đó được gửi đến Công ty FirstBASE (Malaysia) để giải trình tự.

Trình tự DNA thu được được xử lý và lắp ráp bằng phần mềm DNA Baser V.4. Việc tìm kiếm các trình tự tương đồng được thực hiện thông qua cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Các trình tự có độ tương đồng cao bao gồm *A. niger* CBS121.55 (MH857404), *A. niger* CBS122.55 (MH857405), *A. niger* D.1 (GU183162), *A. niger* ATCC16888 (NR111348), *A. niger* RMUAN75 (MT541882), *A. niger* CBS128802 (MH865152), *A. niger* KT5 (LC105682) và các trình tự liên quan khác như *A. oryzae* NRRL447 (NR135395), *A. oryzae* A540 (KX462996), *A. flavus* ATCC16883 (MW513940), *A. nidulans* ATCC10074 (KC146354), *A. nidulans* FCSRL3 (ON383939), *A. versicolor* S66 (KU318417), *A. versicolor* ATCC9577 (AY373880), *A. fumigatus* ATCC1022 (NR121481), *A. fumigatus* S2-9 (JX537971) được sử dụng làm

trình tự tham chiếu để xây dựng cây phát sinh loài của hai chủng nấm bằng phần mềm MEGA (phiên bản 7.0). *Penicillium janthinellum* CBS 340.48 (GU981585) được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup control). Độ tin cậy của các nhánh trong cây phát sinh được đánh giá bằng 1000 lần lặp bootstrap (White et al., 1990; Schoch et al., 2012).

2.2.2. Phương pháp tuyển chọn chủng vi sinh vật bản địa đối kháng nấm *A. niger*

2.2.2.1. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng vi sinh vật đối kháng nấm A. niger

Các mẫu đất được thu thập từ vùng rễ cây lạc của các vùng trồng lạc trọng điểm tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế. Tại mỗi điểm lấy mẫu, đất được lấy ở độ sâu từ 5-25 cm trong khu vực rộng 25 cm^2. Đất được cho vào túi nilon sạch, đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập VSV đối kháng. Các mẫu đất được huyền phù trong nước cất vô trùng theo tỉ lệ 10g đất với 90 mL nước. Pha loãng nối tiếp và lấy 100 µL ở mỗi nồng độ pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-8} cấy trải trên đĩa thạch môi trường khác nhau theo đối tượng mục tiêu (Hà & Hòa, 2012; Anith et al., 2021; Bình et al., 2024; Chang et al., 2025).

- Phân lập, sàng lọc vi khuẩn đối kháng có tiềm năng về enzyme 1,3-β-glucanase:

+ Sử dụng dãy nồng độ pha loãng từ 10^{-5} đến 10^{-8}, mẫu được cấy trải trên đĩa thạch chứa môi trường có thành phần gồm: nấm men bánh mì (5 g), $FeSO_4$. $7H_2O$ (0,5 g), $MgSO_4.7H_2O$ (0,5 g), KCl (0,5 g), $NaNO_3$ (3 g), K_2HPO_4 (1 g), agar (20 g), nước cất vừa đủ 1 lít. Các đĩa thạch được ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30 °C trong 48 giờ. Những vi khuẩn xung quanh có vòng phân giải trong suốt là những chủng có tiềm năng sinh 1,3-β-glucanase được cấy chuyền nhiều lần để làm thuần trên môi trường trên LB (Luria-Bertani). Các mẫu vi khuẩn được bảo quản ở 4 ºC (Wu et al., 2018).

+ Sàng lọc hoạt tính đối kháng với nấm *A. niger*: một khối thạch đường kính 4 mm chứa sợi nấm *A. niger* (chủng QT1, H17) 3 ngày tuổi được đặt vào vị trí trung tâm của đĩa Petri chứa môi trường PDA. Tiếp đó, vi khuẩn được cấy theo một đường thẳng cách mép khối nấm khoảng 2 cm. Sau 5 ngày nuôi ủ ở nhiệt độ 30 °C, đường kính khuẩn lạc nấm *A. niger* được đo và so sánh với giá trị trung bình của mẫu đối chứng không cấy vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập. Hiệu suất đối kháng (GIR - Growth inhibition rate) được được tính so với đối chứng theo công thức: GIR (%) = $\frac{C-T}{C}$ x 100. Trong đó, C là bán kính khuẩn lạc *A. niger* ở mẫu đối chứng (mm) và T là bán kính khuẩn lạc *A. niger* ở công thức xử lý (mm) (Kruijt et al., 2009; Torres et al., 2016; Raymaekers et al., 2020; Anith et al., 2021).

- Phân lập và sàng lọc nấm đối kháng:

+ Sử dụng dãy nồng độ pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-5}, mẫu được cấy trải trên môi trường PDA có bổ sung propamocarb. Các đĩa được nuôi ở 28 ± 2 °C trong 96 giờ chọn các khuẩn lạc nấm khác nhau, có hình thái đặc trưng của *Trichoderma* để làm thuần bằng phương pháp cấy sợi nấm và cấy đơn bào tử.

+ Khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* được đánh giá bằng phương pháp cấy đối xứng qua tâm. Trên mỗi đĩa Petri chứa môi trường PDA, một khối thạch

đường kính 4 mm chứa *A. niger* 3 ngày tuổi và một khối thạch đường kính 4 mm chứa *Trichoderma* 3 ngày tuổi được cấy đối xứng nhau qua tâm đĩa và cách nhau 3 cm. Nuôi ủ ở 28 ± 2 °C. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập. Hiệu suất đối kháng H (%) được tính theo công thức H (%) = $\frac{D-d}{D}$ x 100. Trong đó, D và d lần lượt là đường kính khuẩn lạc *A. niger* ở đối chứng và nghiệm thức (mm) (Anith et al., 2021).

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

Các chủng VSV đối kháng được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 30 °C, 180 rpm trong 24 giờ để sàng lọc khả năng sinh enzyme ngoại bào. Hỗn hợp dịch nuôi cấy nổi phía trên được thu bằng cách ly tâm ở 10000 rpm trong 10 phút ở 4 ºC. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào như sau:

- Hoạt tính enzyme chitinase được đánh giá trên môi trường thạch chứa 0,1 % keo chitin. Sau khi cho 50 µL dịch nuôi cấy vào các giếng thạch (5 mm) và ủ ở 30 °C trong 48 giờ, đĩa được nhuộm bằng dung dịch Lugol, quan sát và đo vòng phân giải chitin (Loc et al., 2011; You et al., 2021).

- Hoạt tính cellulase được đánh giá trên môi trường thạch chứa 0,1 % CMC (carboxymethyl cellulose). Sau khi cho 50 µL dịch nuôi cấy vào các giếng thạch (5 mm) và ủ ở 30 °C trong 48 giờ, đĩa được nhuộm bằng Congo đỏ 1% và rửa lại với NaCl 1M; quan sát và đo vòng phân giải CMC (Quảng et al., 2014; Anh et al., 2017; You et al., 2021).

- Hoạt tính β -1,3-glucanase được đánh giá trên môi trường thạch chứa 0,1 % curdlan. Sau khi cho 50 µL dịch nuôi cấy vào các giếng thạch (5 mm) và ủ ở 30 °C trong 48 giờ, đĩa được nhuộm bằng dung dịch Lugol 0,1 %; quan sát và đo vòng phân giải curdlan (Wu et al., 2018; Tram et al., 2023).

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

Định danh các chủng vi khuẩn:

Các chủng vi khuẩn đáp ứng các tiêu chuẩn kết hợp về đối kháng và hoạt tính enzyme được định danh bằng cách kết hợp các biện pháp hình thái, sinh hóa và phân tử.

- *Quan sát đặc điểm hình thái:* Quan sát hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram và quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi quang học Olympus BX51.

- *Đặc tính hoá sinh:* Khả năng đồng hoá/lên men các nguồn carbohydrate của các chủng vi khuẩn được xác định bằng bộ kit API 50CHB (bioMérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch LB trong 18–24 giờ, sau đó chọn một khuẩn lạc đơn, điển hình để tạo huyền phù vi khuẩn trong 1 mL môi trường API CHB. Độ đục của huyền phù được điều chỉnh đạt chuẩn 2 McFarland. Tiếp theo, huyền phù được phân phối vào các giếng của dải thử API 50CHB, mỗi giếng chứa một loại cơ chất. Dải thử được đặt trong khay ủ và ủ ở 37 °C trong 24 – 48 giờ. Sau thời gian ủ, sự thay đổi màu sắc trong từng giếng được quan sát. Kết quả được biểu thị dưới dạng phản ứng dương tính (+), âm tính (−) hoặc không xác định (ND).

- *Phân tích sinh học phân tử và phát sinh loài:* Các chủng phân lập được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng qua đêm và các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 10000 rpm trong 10 phút ở 4 ºC. DNA được chiết xuất bằng ToPURE Genomic DNA

extraction KIT (ABT, Vietnam) theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Trình tự 16S rRNA được khuếch đại bằng cách sử dụng các mồi: 5'-AGATTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492_Reverse: 5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3'(Weisburg et al., 1991). Phản ứng PCR bao gồm 30 µL của 2X Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA), 2,5 µL DNA đã chiết xuất, 5 µL mỗi mồi 10 µM và 17,5 µL nước cất khử trùng hai lần. Chu kỳ PCR được thực hiện với bước làm nóng trước 10 phút ở 95 ºC, sau đó là 30 chu kỳ gồm 1 phút ở 94 ºC , ủ ở 53 ºC trong 30 giây và kéo dài ở 72 ºC trong 1 phút và bước kéo dài cuối cùng ở 72 ºC trong 10 phút. Các sản phẩm khuếch đại PCR được đánh giá trên gel agarose TAE 1 % (w/v) được nhuộm bằng SafeView™ Classic Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials, Canada). Các sản phẩm PCR khuếch đại được gửi đến dịch vụ giải trình tự thương mại (Firstbase, Malaysia) để giải trình tự. Các trình tự DNA thu được từ cả hai mạch được lắp ráp bằng BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Các trình tự 16S rRNA tham chiếu được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI). Sự sắp xếp trình tự được thực hiện thủ công với các trình tự tham chiếu liên quan bằng phần mềm ClustalW2 (http:// www. ebi. ac. uk/Tools/ phylogenecy/ clust alw2- phylo geny/) bằng cách sử dụng các tham số mặc định (Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2021). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Maximum likelihood method bằng IQ-TREE v. 2.1.3 (Minh et al., 2020). ModelFinder được sử dụng để xác định mô hình phù hợp nhất (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Các cây kết quả được vẽ bằng Interactive Tree of Life (iTOL) v.6 (Letunic & Bork, 2019).

Định danh các chủng nấm

Các chủng nấm đáp ứng các tiêu chuẩn kết hợp về đối kháng và hoạt tính enzyme được định danh bằng cách kết hợp các biện pháp hình thái và phân tử.

- *Định danh bằng hình thái:* Các chủng nấm được nhận dạng sơ bộ dựa trên các đặc trưng hình thái của nấm như màu sắc, sự phát triển sợi nấm và kết cấu khuẩn lạc, sự phân nhánh của bào tử, kích thước và hình dạng bào tử (Alwadai et al., 2022).

- *Định danh bằng sinh học phân tử và phân tích phát sinh loài:* Nuôi cấy chủng nấm đối kháng được tuyển chọn trong môi trường PDA. Sợi nấm ở giai đoạn phát triển mạnh được chuyển sang môi trường PDB, nuôi lắc ở 28 ± 2 ºC với tốc độ 180 rpm trong 2 ngày để sản xuất sinh khối. DNA được tách chiết bằng kit TopPURE Genomic DNA Extraction Kit; TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT) (Công ty TNHH Giải pháp Y Sinh ABT, Việt Nam). Vùng Internal transcribed spacer (ITS) của nấm được khuếch đại với cặp primer ITS1 (5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3′) và ITS4 (5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) (White et al., 1990; Manter & Vivanco, 2007). Quá trình khuếch đại phản ứng chuỗi polymerase (PCR) được thực hiện trong máy gia nhiệt SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) với tổng thể tích phản ứng là 50 µL chứa 25 µL Go Taq Green 2X Master Mix (Promega, USA), 5 µL (50 ng) mẫu DNA, 5 µL mỗi mồi (10 pmol) và 15 µL H_2O. Chu trình khuếch đại như sau: 95 °C trong 10 phút; 30 chu kỳ ở 95 ºC trong 50 giây, 53 ºC trong 50 giây và 72 ºC trong 1 phút; 72 ºC trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,0%, nhuộm SafeView™ và ghi nhận bằng hệ thống Ultra Slim LED Illuminator. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự tại First BASE (Malaysia). Trình tự thu được được xử lý bằng BioEdit v.7 (Hall, 1999) và đối chiếu với dữ liệu GenBank bằng BLASTn.

Phân tích phát sinh loài: Cây phát sinh loài được xây dựng bằng 31 trình tự tham chiếu vùng ITS được thu thập và tải xuống từ NCBI của các loài thuộc chi *Trichoderma* cùng với trình tự ITS của chủng HL6. Hai chủng *Protocrea farinosa* CBS 121551 (chủng TYPE, NR_119700) và *Protocrea pallida* CBS 29978 (chủng TYPE, NR_111329) được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup). Các trình tự này được căn chỉnh bằng ClustalW (Thompson et al., 1994). Sau đó, cây phát sinh loài được dựng bằng phần mềm trực tuyến IQ-TREE v. 2.1.3 bằng phương pháp Maximum Likelihood với 1000 lần ultrafast bootstrap (Trifinopoulos et al., 2016; Minh et al., 2020). ModelFinder được sử dụng để xác định mô hình thuật toán tối ưu cho phân tích phát sinh loài (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Kết quả được hiển thị bằng phần mềm Interactive Tree of Life (iTOL) v. 5 và chỉnh sửa thủ công bằng Adobe Illustrator CC 2021 (Adobe Systems, CA, USA) (Letunic & Bork, 2021).

2.2.2.4. Sàng lọc các chủng vi sinh vật đối kháng dựa trên ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc

Chuẩn bị vi khuẩn đối kháng: Các chủng *Bacillus* (*B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* K1 và *B. velezensis* 137) được nuôi cấy độc lập trong môi trường LB lỏng, tỉ lệ cấy giống 10 %, pH 7,0, nhiệt độ 30 ^{o}C, tốc độ lắc 180 rpm, thời gian nuôi cấy 24 giờ (Li et al., 2016). Dịch nuôi của từng chủng vi khuẩn đơn lẻ được chuẩn hóa về nồng độ dựa vào thang chuẩn 0,5 McFarland và xác nhận lại bằng cấy trải trước khi thử nghiệm.

Chuẩn bị nấm đối kháng: Chủng *Trichoderma asperellum* HL6 được nuôi cấy trên môi trường PDA ở nhiệt độ 28 ± 2 °C trong thời gian 5 ngày. Sau khi nuôi cấy, bào tử nấm được thu nhận bằng nước cất vô trùng. Huyền phù thu được được lọc qua hai lớp vải màn vô trùng nhằm loại bỏ sợi nấm và các mảnh thạch còn sót lại. Số lượng bào tử trong huyền phù được xác định bằng buồng đếm Neubauer kết hợp quan sát dưới kính hiển vi quang học. Trên cơ sở kết quả định lượng, huyền phù bào tử được chuẩn hóa về mật độ 10^8 bào tử/mL để phục vụ các thí nghiệm tiếp theo.

- Xử lý hạt giống với vi khuẩn đối kháng: Ngâm 100 hạt lạc giống L14, kích thước đồng đều trong 500 mL nước cất vô trùng có bổ sung 30 mL dung dịch nuôi cấy mỗi chủng vi khuẩn (*B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* K1 và *B. velezensis* 137), nồng độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/mL. Thời gian ngâm hạt trong 1 giờ, các chủng vi khuẩn được xử lý độc lập với nhau. Ở nghiệm thức đối chứng, hạt lạc được ngâm nước cất vô trùng (Ayyandurai et al., 2021; Kampa et al., 2025).

- Xử lý hạt giống với nấm đối kháng: Ngâm 100 hạt lạc giống L 14 kích thước đồng đều vào trong 500 mL nước cất có bổ sung 30 mL dung dịch huyền phù bào tử HL6 (nồng độ 10^8 bào tử/mL). Thời gian ngâm trong 3 giờ. Ở nghiệm thức đối chứng, hạt lạc được ngâm trong nước cất vô trùng (Ayyandurai et al., 2021; Kampa et al., 2025).

- Hạt lạc ở nghiệm thức và đối chứng sau đó được vớt ra, để ráo nước và ủ riêng trong các khay ở điều kiện nhiệt độ phòng. Theo dõi sự nảy mầm của hạt sau 48 giờ. Thí nghiệm lặp lại 3 lần độc lập. Tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ nảy mầm (\%)} = \frac{Số\ hạt\ nảy\ mầm}{Tổng\ số\ hạt} \text{ x 100 (Kampa et al., 2025)}$$

2.2.2.5. Sàng lọc các chủng vi sinh vật đối kháng dựa trên hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trong điều kiện nhà lưới

Chuẩn bị VSV đối kháng: Dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn (*B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* K1 và *B. velezensis* 137) và dịch bào tử nấm *T. asperellum* HL6 tương tự như đã mô tả ở mục 2.2.2.4.

Chuẩn bị nấm bệnh: Dịch bào tử *A. niger* QT1 và H17 được chuẩn bị như mục 2.2.1.2 nhưng nồng độ bào tử được chuẩn hóa để đạt 10^6 bào tử/mL.

Bố trí thí nghiệm: Quy trình thử nghiệm như sau:

- *Xử lý hạt giống:* 15g hạt lạc giống L14 được ngâm trong 2 mL dịch nuôi cấy các chủng *Bacillus* ở nồng độ 10^8 CFU/mL trong 1 giờ và trong dịch huyền phù bào tử nấm *T. asperellum* HL6 nồng độ 10^8 bào tử/mL trong 3 giờ. Sau đó gieo hạt lạc đã xử lý vào các chậu thí nghiệm.

- *Xử lý bổ sung ở giai đoạn cây con:* Sau 14 ngày gieo hạt (cây con giai đoạn 2–4 lá), tiến hành các bước xử lý tiếp theo trên hệ thống 5 cây/chậu. Tưới trực tiếp vào vùng gốc cây của mỗi chậu 20 mL dịch nuôi cấy của mỗi chủng VSV đối kháng (10^8 CFU/mL đối với vi khuẩn, 10^8 bào tử/mL đối với *T. asperellum* HL6) tương ứng với các công thức.

- *Lây nhiễm nấm bệnh:* Sau 24 giờ kể từ khi xử lý VSV đối kháng, tiến hành lây nhiễm nhân tạo nấm bệnh bằng cách tưới 20 mL dịch huyền phù bào tử nấm bệnh (*A. niger* QT1 hoặc *A. niger* H17) mật độ 10^6 bào tử/mL vào sát gốc cây lạc cho các nghiệm thức tương ứng (nồng độ cao hơn khi kiểm tra ở quy tắc Koch nhằm tăng áp lực gây bệnh lên cây lạc).

- Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên RCBD với 15 công thức. Mỗi nghiệm thức được thực hiện trên 1 chậu nhựa (kích thước 35 × 30 × 30 cm) chứa 5 kg đất cát pha đã được khử trùng. Các khối được bố trí cách biệt nhau để tránh sự phát tán bào tử nấm bệnh, được đặt trong môi trường đồng nhất và được chăm sóc với chế độ như nhau. Mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại độc lập. Nội dung nghiệm thức được trình bày ở Bảng 2.2.

Bảng 2.2. *Các nghiệm thức sàng lọc đối kháng A. niger ở nhà lưới*

Nghiệm thức	Xử lý vi sinh vật đối kháng	Nấm bệnh
CT1 (Đối chứng âm)	Nước cất vô trùng	Không nhiễm nấm bệnh
CT2	*B. siamensis* B8	*A. niger* QT1
CT3	*B. siamensis* B8	*A. niger* H17
CT4	*B. velezensis* K1	*A. niger* QT1
CT5	*B. velezensis* K1	*A. niger* H17
CT6	*B. siamensis* 101	*A. niger* QT1
CT7	*B. siamensis* 101	*A. niger* H17
CT8	*B. siamensis* 112	*A. niger* QT1
CT9	*B. siamensis* 112	*A. niger* H17
CT10	*B. velezensis* 137	*A. niger* QT1
CT11	*B. velezensis* 137	*A. niger* H17
CT12	*T. asperellum* HL6	*A. niger* QT1
CT13	*T. asperellum* HL6	*A. niger* H17
CT14 (Đối chứng bệnh)	Nước vô trùng	*A. niger* QT1
CT15 (Đối chứng bệnh)	Nước vô trùng	*A. niger* H17

Chỉ tiêu theo dõi: Theo dõi tỉ lệ cây chết do nhiễm bệnh (%) tại các thời điểm 7, 14, 21, 28 và 45 ngày sau nhiễm nấm bệnh (Cương et al., 2018; Vũ, 2022; Jia et al., 2023; Tiên et al., 2025; Figueiredo et al., 2025).

2.2.2.6. Đánh giá khả năng tương thích giữa các chủng Bacillus được tuyển chọn

Đánh giá khả năng tương thích (không ức chế lẫn nhau) giữa 3 chủng *Bacillus* được tuyển chọn (*B. siamensis* 101*, B. siamensis* 112 *và B. velezensis* 137*)* được thực hiện theo phương pháp cấy vạch chéo (cross-streaking) dựa trên nguyên lý của Pierson và Weller (1994). Các chủng được xác định là tương thích khi không hình thành vùng vô khuẩn tại các vị trí tiếp giáp giữa các đường cấy sau 48 giờ nuôi ở 30 °C (Yaadesh et al., 2023; Kampa et al., 2025).

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

2.2.3.1. Đánh giá khả năng đối kháng và ức chế A. niger trên môi trường đặc

***Chuẩn bị dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng*:** Các chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. velezensis* 137 và *B. siamensis* 112) được nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường LB lỏng có bổ sung chất cảm ứng là curdlan 1% (ở nồng độ cuối) ở 30 ^{o}C trong 24 giờ với tốc độ lắc 180 rpm. Nồng độ huyền phù tế bào của mỗi chủng được điều chỉnh với nước cất vô trùng đạt chuẩn 0,5 McFarland tương đương khoảng 10^8 CFU/mL và xác nhận lại bằng đo OD_{600} trước khi thử nghiệm đối kháng (Zhou et al., 2017; Thi et al., 2024).

Đánh giá khả năng đối kháng A. niger bằng phương pháp nuôi cấy kép: Dịch nuôi cấy của từng chủng *Bacillus* được chuẩn bị theo quy trình mô tả ở phần trên và sử dụng để khảo sát khả năng đối kháng riêng lẻ. Đối với nghiệm thức phối hợp, dịch nuôi cấy của ba chủng được trộn đồng đều theo tỉ lệ thể tích 1:1:1. Trên đĩa thạch PDA, sử dụng dụng cụ vô trùng tạo giếng có đường kính 5 mm để tiến hành thí nghiệm. Sau đó, 50 µL huyền phù vi khuẩn nồng độ 10^8 (CFU/mL) được thêm vào giếng. Một mảnh thạch chứa sợi nấm *A. niger* QT1, *A. niger* H17 ba ngày tuổi được thả vào phía đối diện của giếng chứa huyền phù vi khuẩn. Với nghiệm thức đối chứng không cấy dịch vi khuẩn. Tất cả các đĩa được ủ ở 30 °C cho đến khi sợi nấm trong đĩa đối chứng lan tới mép đĩa. Sự tăng trưởng của sợi nấm chủng *A. niger* QT1 *và A. niger* H17 trong các đĩa có chứa dịch vi khuẩn được đo và so sánh với mức tăng trưởng của *A. niger* của chủng tương ứng ở đĩa đối chứng. Tỉ lệ ức chế sinh trưởng của nấm được xác định bằng công thức: I (%) = $\frac{D-d}{D}$ x 100. Trong đó, D là đường kính trung bình khuẩn lạc *A. niger* ở mẫu đối chứng (mm) và d là đường kính trung bình khuẩn lạc *A. niger* ở công thức xử lý (mm). Đo hai đường kính vuông góc rồi lấy trung bình, D và d được đo riêng trên từng đĩa. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp (n = 3), mỗi lần lặp là một đĩa Petri độc lập (Landa et al., 1997; Gajera & Vakharia, 2012; Anith et al., 2021). Các nghiệm thức được bố trí như Bảng 2.3.

Bảng 2.3. *Khả năng ức chế A.niger bằng phương pháp nuôi cấy kép trên môi trường đặc*

Công thức	Dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng	Nấm bệnh
CT1 (Đối chứng với QT1)	Nước cất vô trùng	*A. niger* QT1
CT2 (Đối chứng với H17)	Nước cất vô trùng	*A. niger* H17
CT3	*B. siamensis* 101	*A. niger* QT1
CT4	*B. siamensis* 101	*A. niger* H17
CT5	*B. siamensis* 112	*A. niger* QT1
CT6	*B. siamensis* 112	*A. niger* H17
CT7	*B. velezensis* 137	*A. niger* QT1
CT8	*B. velezensis* 137	*A. niger* H17
CT9	Hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng *Bacillus*	*A. niger* QT1
CT10	Hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng *Bacillus*	*A. niger* H17

Đánh giá khả năng ức chế A. niger của dịch nuôi cấy thô đã loại tế bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch: Dịch nuôi của từng chủng *Bacillus* đơn lẻ đã chuẩn bị như đã mô tả ở trên được ly tâm lạnh (10000 vòng/phút, 15 phút, 4 °C) để thu dịch nổi của mỗi chủng. Mẫu hỗn hợp dịch nuôi cấy thô của ba chủng *Bacilllus* đã loại tế bào được trộn theo thể tích với tỉ lệ 1 : 1 : 1. Hai trăm µL huyền phù bào tử nấm *A. niger* nồng độ10^6 bào tử/mL được cấy trải trên các đĩa môi trường PDA. Trên bề mặt môi trường PDA, bố trí 5 giếng thạch có đường kính 5 mm bằng dụng cụ đã vô trùng. Mỗi giếng thử nghiệm được bổ sung 50 µL dịch nuôi cấy không chứa tế bào, thu từ từng chủng *Bacillus* hoặc từ mẫu phối hợp. Giếng ở vị trí trung tâm được bổ sung nước cất vô trùng để làm đối chứng âm. Sau đó, các đĩa Petri được đặt vào tủ lạnh nhiệt độ 4 ^oC trong 4 giờ. Các đĩa sau đó được lấy ra, nuôi ở tủ ấm trong 48 giờ ở 30 ^oC. Khả năng ức chế nấm được xác định bằng đường kính vùng nấm không phát triển được quanh giếng, thí nghiệm lặp lại ba lần (Kuzin et al., 2019; Gorai et al., 2021).

2.2.3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)

Các chỉ số MIC và MFC của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với *A. niger* được xác định bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng, tham khảo nguyên tắc của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng xét nghiệm (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) với một số hiệu chỉnh kỹ thuật (Heo et al. 2022).

Chuẩn bị phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase: Các chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101*, B. siamensis* 112 *và B. velezensis* 137*)* được nuôi cấy độc lập trên môi trường LB có bổ sung 1% curdlan, tỉ lệ cấy giống 10%, pH 7,0; nhiệt độ nuôi 30 ^oC, tốc độ lắc 180 rpm, thời gian nuôi cấy 24 giờ. Dịch nuôi của từng chủng đơn lẻ sau đó được ly tâm lạnh (10000 vòng/phút, 15 phút, 4 °C) để thu dịch nổi chứa enzyme thô. Protein trong dịch nổi được kết tủa bằng muối $(NH_4)_2SO_4$ trong 12 giờ ở 4 °C. Khối kết tủa thu được sau ly tâm (12000 vòng/phút, 20 phút) được hòa tan và thẩm tách qua màng

lọc cellulose acetate trong dung dịch đệm Citrate-Phosphate 50 mM (pH 6,0) để loại muối. Phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của mỗi chủng vi khuẩn được xác định hoạt độ β-1,3-glucanase bằng phương pháp so màu và chuẩn hóa nồng độ trước theo mục 2.2.5.1 khi thực hiện xử lý mẫu (Loc et al., 2020; Wu et al., 2018; Kuzin et al., 2019; El-Shora et al., 2021; Tram et al., 2023; Elshami et al., 2025).

Bố trí thí nghiệm: Dãy nồng độ enzyme β -1,3-glucanase từ 0,0125 đến 0,4 U/mL được chuẩn bị trong môi trường lỏng với thể tích tổng 200 µL mỗi giếng. Sau đó, mỗi giếng được gây nhiễm bằng 20 µL huyền phù bào tử nấm đạt mật độ cuối 10^5 bào tử/mL. Đối chứng bao gồm đối chứng âm (DMSO 1%) và đối chứng sinh trưởng (chỉ có môi trường và bào tử nấm). Đĩa thí nghiệm được nuôi ủ lắc (150 rpm) ở 37 °C trong 18 - 72 giờ.

Xác định MIC*:* Bổ sung chỉ thị Resazurin (nồng độ cuối 44 µM) vào các giếng và ủ tối trong 48 giờ. MIC được ghi nhận tại nồng độ enzyme thấp nhất mà dịch nuôi cấy không chuyển màu (vẫn giữ màu xanh của Resazurin), đồng thời không quan sát thấy sự phát triển của nấm bằng mắt thường (Chakansin et al., 2022; Heo et al. 2022; Serrano et al., 2023).

Xác định MFC*:* Hút 30 µL dịch từ các giếng tương ứng với nồng độ MIC, 2 x MIC và 4 x MIC để trải trên môi trường PDA. MFC là nồng độ thấp nhất không làm xuất hiện khuẩn lạc sau 48 giờ nuôi cấy (Chakansin et al., 2022; Heo et al. 2022; Serrano et al., 2023).

Bản chất tác động của enzyme được phân loại dựa trên tỉ lệ MFC/MIC. Enzyme được coi là có hoạt tính diệt nấm nếu tỉ lệ này < 4 và có hoạt tính ức chế nếu tỉ lệ ≥ 4 (Chakansin et al., 2022; Serrano et al., 2023). Toàn bộ thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần độc lập để đảm bảo tính khách quan và chính xác của dữ liệu.

2.2.3.3. Đánh giá khả năng làm giảm sinh khối A. niger trong môi trường lỏng

Sử dụng các bình tam giác chứa 50 mL môi trường PDB vô trùng. Dung dịch phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 đã chuẩn bị ở mục 2.2.3.1 được chuẩn hóa để tạo dãy nồng độ 0,2 : 0,4 : 0,8 : 1,6 (U/mL) cho mẫu riêng lẻ và mẫu hỗn hợp trước khi thử nghiệm. Ở mỗi nghiệm thức cấy 1 mL huyền phù bào tử mỗi chủng nấm *A. niger* QT1, *A. niger* H17 ở nồng độ 10^6 CFU/bào tử. Nghiệm thức đối chứng, dung dịch phân đoạn enzyme ngoại bào được thay thế bằng nước cất vô trùng với thể tích tương đương (Chu et al., 2015).

Các bình tam giác được nuôi cấy lắc 150 rpm ở 28 ± 2 °C trong 3 ngày. Sinh khối nấm được lọc qua giấy lọc đã biết khối lượng (W_1), sấy ở 80 °C đến khối lượng không đổi và cân (W_2). Sinh khối khô được xác định theo công thức: $W=W_2-W_1$. Hiệu suất ức chế sinh khối nấm bệnh được xác định thông qua tỉ lệ giảm sinh khối (H%) theo công thức: $H\ (\%)= \frac{W_C - W_T}{W_C}$ x 100; trong đó, W_C và W_T lần lượt là sinh khối khô ở đối chứng và nghiệm thức.

Số liệu được phân tích phương sai hai yếu tố (Two-way ANOVA), để đánh giá ảnh hưởng của 2 yếu tố (factors) gồm nguồn từ các chủng VSV đối kháng riêng lẽ, phối trộn (yếu tố 1), hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (yếu tố 2) và sự tương tác giữa chúng đến sinh khối nấm bệnh (Gao et al., 2023).

2.2.3.4. Phân tích mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế A. niger

Mối tương quan giữa hoạt độ β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế *A. niger* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (mục 2.2.3.1). Các phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase sau khi hiệu chỉnh hoạt độ được phối trộn theo tỉ lệ thể tích 1:1:1 và khảo sát ở dãy hoạt độ 0,2; 0,4; 0,8 và 1,6 U/mL. Khả năng ức chế được xác định bằng đường kính vùng nấm không phát triển quanh giếng. Thí nghiệm lặp lại ba lần. Phân tích hồi quy tuyến tính giữa hoạt độ β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17.

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

Chuẩn bị phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase: Thực hiện theo phương pháp trình bày ở mục 2.2.3.2. Dịch phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase được xác định hoạt độ bằng phương pháp DNS và chuẩn hóa hoạt độ về mức 4,0 U/mL trước khi thực hiện xử lý mẫu.

Chuẩn bị sinh khối nấm: Các chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 được nuôi cấy lắc trong môi trường PDB ở 25 ± 2 ºC trong 7 ngày. Thu nhận sinh khối tươi bằng cách lọc qua giấy lọc vô trùng.

Xử lý mẫu: 0,1 g sợi nấm tươi của mỗi chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 được xử lý riêng lẻ với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase hoạt độ 4,0 U/mL, ủ nhiệt ở 37 °C trong 6 giờ. Mẫu được xử lý theo 5 nghiệm thức sau:

CT 1: xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ *B. siamensis* 101;

CT 2: xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ *B. siamensis* 112;

CT 3: xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ *B. velezensis* 137;

CT 4: xử lý với hỗn hợp phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 theo tỉ lệ thể tích 1 : 1 : 1.

CT 5 (đối chứng): xử lý với hỗn hợp phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 theo tỉ lệ thể tích 1 : 1 : 1 bị bất hoạt bằng đun sôi ở 100 ºC trong 10 phút, để nguội về nhiệt độ phòng, không phát hiện hoạt tính β-1,3-glucanase trước khi xử lý sợi nấm (Xue et al., 2015).

Phân tích hình thái bề mặt sợi nấm bằng hiển vi điện tử quét (SEM): Sau thời gian xử lý enzyme, các mẫu sợi nấm được thu hồi và tiến hành làm khô bằng thiết bị quay chân không nhằm loại bỏ nước nhưng vẫn duy trì nguyên vẹn cấu trúc bề mặt. Mẫu được xử lý kỹ thuật để cố định, làm khô điểm tới hạn và phủ vàng trước khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Quan sát và chụp ảnh SEM nhằm phân tích các tổn thương vật lý và sự biến dạng của thành tế bào (Gajera & Vakharia, 2012; L. Zhou et al., 2022; J. Zhou et al., 2022; Pan et al., 2023; Gao et al., 2023; Ost et al., 2025). Quá trình chụp ảnh SEM được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Khoa học vật liệu, Khoa Lý - Hoá, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.

2.2.4. Phương pháp khảo sát một số đặc tính liên quan đến an toàn sinh học và khả năng trợ sinh các chủng *Bacillus* được tuyển chọn

2.2.4.1. Khảo sát hoạt tính tan máu trên môi trường thạch máu

Ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) được nuôi cấy trong môi trường thạch máu, nuôi ở 30 °C trong 48 giờ để đánh giá hoạt tính tan máu. Kết quả là dương tính nếu hình thành vòng tan máu (hemolytic zone) xung quanh khuẩn lạc (Bamba et al., 2024).

2.2.4.2. Khảo sát độ nhạy cảm với kháng sinh

Tính mẫn cảm kháng sinh của 3 chủng *Bacillus* nghiên cứu được xác định theo phương pháp được đề xuất bởi Bauer et al. (1966) đã được chuẩn hóa bởi Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2005). Tổng cộng có 6 loại kháng sinh tetracyline (Te - 30 µg), chloramphenicol (Cl - 30 µg), trimethoprim (Tr - 25 µg), levofloxacin (Lv-5 µg), gentamicin (Ge-10 µg) và streptomycin (Sm-10 µg).

Các chủng *Bacillus* được hoạt hóa trên môi trường NA ở 30 °C trong 24 giờ. Sinh khối vi khuẩn được huyền phù trong dung dịch NaCl sinh lý vô trùng 0,85 % và điều chỉnh mật độ tương đương chuẩn McFarland 0,5 và xác nhận lại bằng OD_{600}. Dịch huyền phù vi khuẩn được trải đều trên bề mặt môi trường thạch Mueller–Hinton (HiMedia) bằng tăm bông vô trùng. Sau khi bề mặt thạch khô, các đĩa kháng sinh được đặt lên bề mặt môi trường. Đường kính vòng vô khuẩn được đo bằng mm sau 24 giờ nuôi ở 30 °C. Sau đó, dựa vào bảng giải thích tính mẫn cảm với kháng sinh để xác định mức độ mẫn cảm với kháng sinh của các chủng *Bacillus* nghiên cứu (Bauer et al., 1966).

2.2.4.3. Khảo sát độc tính cấp tính đối với giun đất

Độc tính của ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) đối với giun đất được đánh giá bằng phương pháp tham khảo TCVN 5961:1995 (ISO 11268-1:1993), có điều chỉnh phù hợp với mục tiêu nghiên cứu và đối chiếu với các nguyên tắc của ISO 11268-1:2012. Thí nghiệm sử dụng trực tiếp dịch nuôi cấy để đánh giá tác động tổng hợp của các chủng *Bacillus* và các chất chuyển hóa ngoại bào của chúng. Quy trình thực hiện như sau:

Chuẩn bị dịch nuôi cấy vi khuẩn: Ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) được nuôi cấy độc lập trong môi trường LB. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 1% curdlan, tỉ lệ cấy giống 10%, pH 7,0. Quá trình nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ nuôi 30 °C, tốc độ lắc 180 rpm, thời gian nuôi cấy 24 giờ. Để đánh giá đồng thời tác động của tế bào và các chất chuyển hóa ngoại bào, dịch nuôi cấy toàn phần được ly tâm (6000 rpm, 10 phút, 4 °C), sau đó thu hồi sinh khối và tái huyền phù trong chính dịch nuôi cấy để điều chỉnh mật độ tế bào đạt nồng độ 10^{10} (CFU/mL). Từ dịch huyền phù này, tiến hành pha loãng bằng nước cất vô trùng và kiểm tra để thu được các mức mật độ 10^8, 10^9 và 10^{10} CFU/mL. Mật độ vi khuẩn được xác định thông qua đo OD_{600} và xác nhận lại bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

Bố trí thí nghiệm: Các lô thí nghiệm được bố trí theo sơ đồ khối RCBD với 4 nghiệm thức bao gồm, chủng đơn lẻ *B. siamensis* 101 (CT 1), *B. siamensis* 112 (CT 2), *B. velezensis* 137 (CT 3) và hỗn hợp 3 chủng *Bacillus* tỉ lệ thể tích 1:1:1 (CT4). Mật độ tế bào sống trong các dịch xử lý được kiểm tra trước khi bổ sung vào đất. Mỗi chậu chứa 500 g đất nhân tạo (tính theo khối lượng khô), được bổ sung 50 mL dịch huyền phù vi khuẩn với mật độ tương ứng, nhằm thiết lập các mức xử lý mục tiêu là 10^7, 10^8 và 10^9 CFU/g đất khô, tính theo lượng

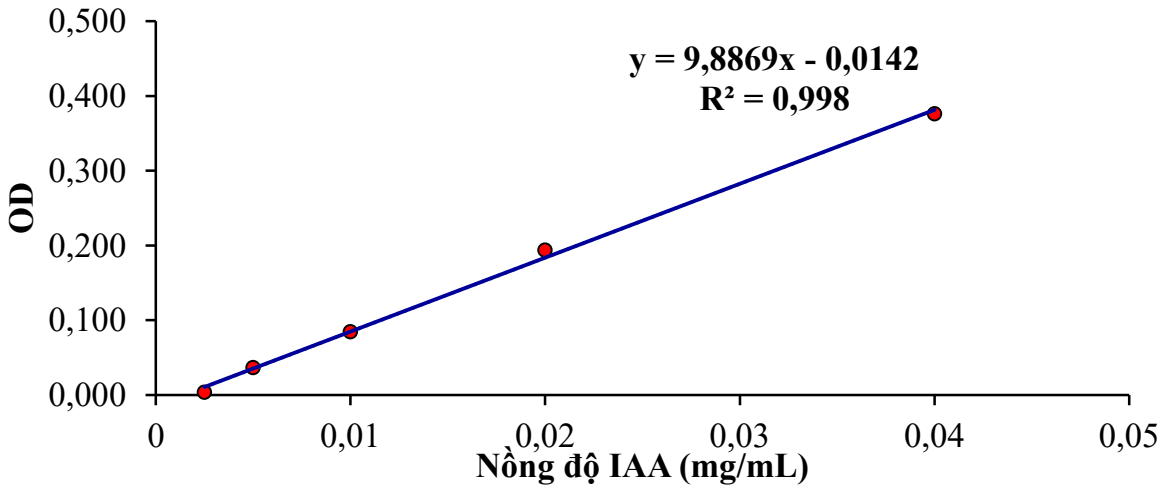
tế bào sống bổ sung. Sau xử lý, đất được trộn đều và bổ sung nước cất vô trùng để điều chỉnh độ ẩm đạt 60% khả năng giữ nước tối đa (WHC). Nghiệm thức đối chứng được bổ sung 50 mL nước cất vô trùng không chứa vi khuẩn và điều chỉnh độ ẩm tương tự các nghiệm thức xử lý. Mười con giun đất (*Eisenia fetida*) trưởng thành (300–600 mg) được làm sạch bằng nước uống vô trùng và ổn định trong đất 24 giờ trước khi xử lý nuôi vào trong các chậu nhựa chứa 500 g đất nhân tạo. Điều kiện nuôi cấy được duy trì ở 20 ± 2 °C, chiếu sáng 12 giờ sáng/tối theo chu kỳ. Thời gian thử nghiệm là 14 ngày. Số giun chết tích lũy được ghi nhận vào ngày thứ 7 và ngày thứ 14 để xác định tỉ lệ chết (%). Tổng khối lượng giun được xác định trước khi bắt đầu thí nghiệm và tổng khối lượng giun còn sống được xác định sau 14 ngày để tính tỉ lệ hao hụt tổng sinh khối (%). Thí nghiệm được lặp lại 4 lần (n=4).

2.2.4.4. Khảo sát khả năng sinh IAA

Ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) được cấy chuyền từ ống giống vào mỗi bình tam giác chứa 50 mL chứa môi trường LB (môi trường cấp 1) đã được tiệt trùng. Mẫu được lắc ở 150 rpm trong 24 giờ để đạt mật độ tế bào khoảng 10^8 CFU/mL.

Một mL dịch mỗi chủng vi khuẩn được chuyển sang bình chứa 50 mL môi trường cấp 2 (g/L: sucrose 5 g; peptone 10 g; L-tryptophan 1 g; NaCl 5 g; pH 7,0), tiếp tục lắc trong điều kiện tương tự để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh IAA.

Sau khi nuôi, dịch vi khuẩn được ly tâm ở 6000 rpm trong 10 phút, thu phần dịch nổi để định lượng IAA. Lấy 2 mL dịch nổi cho phản ứng với 4 mL thuốc thử Salkowski, ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó đo mật độ quang (Optical Density - OD) ở bước sóng 530 nm. Hàm lượng IAA (mg/L) được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa nồng độ IAA và giá trị OD_{530} (Hình 2.1).



Hình 2.1. *Đồ thị đường chuẩn IAA*

2.2.5. Phương pháp xác định hoạt độ, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme và khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase

2.2.5.1. Xác định hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và sự biến đổi hoạt độ theo thời gian nuôi cấy

Vi khuẩn được nuôi trên môi trường cơ bản có thành phần gồm: 0,65 g/L K_2HPO_4, 2,5 g/L KH_2PO_4, 0,5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 g/L NaCl, 0,12 g/L $MgSO_4.7H_2O$ và 1,5 g/L cao nấm men (YE) (Dewi et al., 2016). Dịch giống mật độ $0,5 \times 10^8$ CFU/mL (1% v/v) được cấy vào 100 mL môi trường cơ bản có bổ sung 1% curdlan làm chất cảm ứng, nuôi cấy trong tủ lắc. Dịch huyền phù vi khuẩn được thu sau 12-27 giờ để xác định hoạt độ enzyme.

Hoạt độ của β-1,3-glucanase được xác định phương pháp so (Wu et al., 2018) Trộn 500 µL dịch enzyme với 500 µL đệm 100 mM sodium acetate chứa 0,5% laminarin (pH 7,0), ủ ở 50°C trong 60 phút. Sau đó, bổ sung 2 mL dung dịch axit 3,5-dinitrosalicylic 1% (DNS), đun sôi để phát triển màu trong thời gian 10 phút. Độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ (Spectro UV-2650, Labomed, Mỹ), nồng độ glucose trong dịch phản ứng được xác định dựa trên đường chuẩn glucose. Một đơn vị hoạt độ của β-1,3-glucanase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1 µmol đường khử trong thời gian 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (Tram et al., 2023). Protein hòa tan tổng số được xác định bằng phương pháp Bradford (1976) ở bước sóng 595 nm dựa trên đường chuẩn BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, Mỹ) (Bradford, 1976). Hoạt độ riêng của β-1,3-glucanase được tính bằng cách chia hoạt độ chung (Unit/mL) cho protein tổng số (mg/mL).

Hoạt độ β-1,3-glucanase được khảo sát ở các thời điểm nuôi cấy: 0 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 20 giờ, 24 giờ, 28 giờ, 32 giờ (Lagerlöf et al., 2015; Dewi et al., 2016).

2.2.5.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ β-1,3-glucanase được khảo sát dựa trên phương pháp của Loc et al. (2020), có điều chỉnh cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm, bao gồm:

- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme được khảo sát trong khoảng từ 30-70 °C. Độ bền nhiệt được khảo sát sau khi ủ dịch chiết enzyme từ 30-70°C trong 30 phút. Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase được xác đính bằng phương pháp DNS với laminarin 0,5% làm cơ chất.

- Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của enzyme được khảo sát trong khoảng pH từ 4,0 – 9,0. Đệm sử dụng cho tối ưu pH là đệm citrate 20 mM (pH 4,0 – 5,0), đệm phosphate 20 mM (pH 6,0 – 8,0) và đệm glycine-NaOH 20 mM (pH 9,0). Để xác định độ bền pH, dịch enzyme thô được kết tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$ 70% bão hòa ở 4 °C trong 2 giờ, sau đó được hòa tan trở lại trong các đệm có pH khác nhau. Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase được xác đính bằng phương pháp DNS với laminarin 0,5% làm cơ chất tại nhiệt độ tối ưu.

- Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính enzyme được khảo sát bằng cách ủ phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase với Al^{3+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} và Fe^{3+} ở nồng độ 5 mM trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Khảo sát hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase được xác đính bằng phương pháp DNS với laminarin 0,5% làm cơ chất với dung dịch đệm có pH tối ưu và tại nhiệt độ tối ưu.

- Ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính của enzyme được khảo sát bằng cách ủ phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase với SDS 1%, EDTA 1 mM, urea 1 M và Triton X-100 1% trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase được xác đính bằng phương pháp DNS với laminarin 0,5% làm cơ chất với dung dịch đệm có pH tối ưu và tại nhiệt độ tối ưu.

2.2.5.3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase

Ảnh hưởng của các yếu tố đến sinh tổng hợp β-1,3-glucanase ở ba chủng *Bacillus* tuyển chọn được khảo sát theo phương pháp đơn biến. Các yếu tố ảnh hưởng được khảo sát lần lượt bao gồm: nguồn cơ chất, loại môi trường, nguồn nitơ bổ sung, tỉ lệ cấy giống, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, pH khởi đầu của môi trường nuôi cấy, tốc độ lắc.

Trong mỗi thí nghiệm, một yếu tố cần xác định giá trị tối ưu được thay đổi, các yếu tố còn thì được giữ cố định ở giá trị cơ bản. Các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 được nuôi cấy độc lập trong các bình tam giác 250 mL chứa môi trường lên men lỏng. Sau các khoảng thời gian xác định, dịch nuôi cấy được thu nhận để đo OD và ly tâm để đo hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase thông qua phản ứng DNS như đã mô tả ở mục 2.2.5.1. Kết quả thu được từ mỗi bước khảo sát sẽ là cơ sở để thiết lập giá trị chuẩn cho các thí nghiệm kế tiếp, nhằm xây dựng quy trình lên men tối ưu cho từng chủng *Bacillus* nghiên cứu (Putri et al., 2021).

Ảnh hưởng của cơ chất

Bốn loại cơ chất được khảo sát bao gồm: bột ngô (CT 1), bột đại mạch (CT 2), bột lúa mì (CT 3) và curdlan (CT 4) được bổ sung vào môi trường khoáng cơ bản để đạt nồng độ cuối cùng là 1% (w/v). Thành phần môi trường khoáng cơ bản sử dụng gồm: $NaNO_3$ (3 g), K_2HPO_4 (1 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g), KCl (0,5 g), và $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g) pha trong 1 lít nước cất. Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy ở 30 ^oC, pH 7,0, thời gian nuôi cấy 24 giờ, tốc độ lắc 150 rpm, tỉ lệ cấy giống 10%. Kết quả thí nghiệm thu được sẽ là cơ sở để lựa chọn nguồn cơ chất tối ưu cho nghiên cứu bước tiếp theo .

Ảnh hưởng của các loại môi trường

Khảo sát với 4 loại môi trường bao gồm: môi trường MPB (Molasses Peptone Broth – CT 1), NB (Nutrient Broth – CT 2), LB (Luria–Bertani Broth – CT 3) và NBY (Nutrient Broth Yeast extract - CT4). Các loại môi trường được bổ sung 1 % (w/v) bột ngô – là nguồn cơ chất thích hợp được xác định ở mục 2.2.5.3. Ba chủng *Bacillus* được nuôi cùng điều kiện nhiệt độ 30 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 150 rpm, thời gian 24 giờ, tỉ lệ cấy giống 10 %. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để lựa chọn loại môi trường tối ưu cho nghiên cứu bước tiếp theo (Lagerlöf et al., 2015; Dewi et al., 2016)

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung

Khảo sát với ba nguồn nitơ hữu cơ bao gồm cao nấm men (CT 1), tripton (CT 2) và peptone (CT 3) được bổ sung riêng biệt vào môi trường tối ưu đã được lựa chọn ở bước trước. Nồng độ các nguồn nitơ bổ sung đạt 1 % (w/v), bổ sung 1 % (w/v) cơ chất thích hợp bước trên. Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong cùng điều kiện ở 30 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 150 rpm, thời gian 24 giờ, tỉ lệ cấy giống 10 %. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để lựa chọn nguồn nitơ bổ sung tối ưu cho nghiên cứu bước tiếp theo (Thi et al, 2024).

Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống

Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường đã bổ sung cơ chất và nguồn nitơ tối ưu đã xác định ở các bước trước. Thay đổi tỉ lệ cấy giống ở các mức 1 %, 5 %, 7 % và 10 % (v/v). Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở 30 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 150 rpm, thời gian 24 giờ. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để lựa chọn tỉ lệ cấy giống tối ưu cho nghiên cứu bước tiếp theo (Thi et al, 2024).

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường đã tối ưu hóa về thành phần dinh dưỡng (cơ chất, nguồn nitơ và tỉ lệ cấy giống). Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở 30 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 150 rpm. Mẫu được thu nhận ở các mốc thời gian 0, 24, 36 và 48 giờ để phân tích mật độ tế bào và hoạt độ enzyme. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để lựa chọn thời gian nuôi cấy tối ưu cho nghiên cứu tiếp theo (Thi et al, 2024).

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường đã tối ưu về dinh dưỡng, cơ chất, tỉ lệ cấy giống đã tối ưu ở các bước trước. Điều kiện nuôi cấy được thực hiện ở mức nhiệt độ 25 °C, 30 °C, 35 °C và 37 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 150 rpm. Sau thời gian nuôi cấy tối ưu đã được xác định ở bước trên, mẫu được thu nhận để đo mật độ tế bào và hoạt tính enzyme. Kết quả thu được là cơ sở để lựa chọn nhiệt độ nuôi cấy tối ưu cho nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy

Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường đã tối ưu hóa về thành phần dinh dưỡng và tỉ lệ cấy giống. Quá trình nuôi cấy được khảo sát ở dải pH từ 5,0 đến 8,0; nhiệt độ nuôi cấy 30 °C, tốc độ lắc 150 rpm. Sau thời gian nuôi cấy tối ưu đã xác định ở bước trước, mẫu được thu nhận để phân tích mật độ tế bào và hoạt độ enzyme. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để xác định giá trị pH ban đầu của môi trường tối ưu cho nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong môi trường tối ưu với các tốc độ lắc lần lượt là 100, 150, 180 và 200 rpm. Các thông số về cơ chất, loại môi trường, nguồn nitơ bổ sung, tỉ lệ cấy giống, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, pH ban đầu của môi trường nuôi cấy được duy trì thống nhất với kết quả tối ưu ở các bước trước. Sau chu kỳ nuôi cấy tối ưu đã xác định ở bước trước, mẫu được thu thập để đo mật độ tế bào và đo hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase. Kết quả thí nghiệm thu được là cơ sở để xác định tốc độ lắc tối ưu cho nuôi cấy (Putri et al., 2021).

Sau khi lựa chọn điều kiện nuôi cấy, ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong điều kiện ban đầu và điều kiện lựa chọn (nguồn cơ chất, loại môi trường, nguồn nitơ bổ sung, tỉ lệ cấy giống, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy, pH khởi đầu của môi trường nuôi cấy, tốc độ lắc) để so sánh mật độ tế bào, hoạt độ β-1,3-glucanase và đường kính vòng ức chế của dịch nuôi cấy ly tâm loại tế bào đối với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17. Các chỉ tiêu được xác định theo các phương pháp đã mô tả ở các mục trên.

2.2.6. Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp ba chủng *Bacillus* trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng

2.2.6.1. Đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh trong điều kiện nhà lưới

Chuẩn bị hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (BAZ04):

Ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) được nuôi cấy độc lập trong môi trường LB. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 1 % curdlan, 1 % cao nấm men, tỉ lệ cấy giống 7 %, pH 7,0. Quá trình nuôi cấy được duy trì nhiệt độ nuôi 30 ^{o}C, tốc độ lắc 150 rpm, thời gian nuôi cấy 24 giờ. Dịch nuôi của từng chủng đơn lẻ sau

đó được chuẩn hóa về mật độ 10^8 CFU/mL trước khi trộn với nhau theo tỉ lệ 1 : 1 : 1 theo thể tích để tạo thành hỗn hợp dịch nuôi phối trộn 3 chủng *Bacillus* (ký hiệu là BAZ04) (Hình PL8.1 ở Phụ lục VIII).

Xử lý hạt giống và cây con: 15 g hạt lạc giống L14 được ngâm trong 2 mL dung dịch BAZ04 (10^8 CFU/mL) trong 1 giờ. Sau đó gieo hạt lạc đã xử lý vào các chậu nhựa có kích thước 35 x 30 x 30 cm chứa 5 kg đất đã khử trùng. Sau 14 ngày gieo hạt (cây con giai đoạn 2 – 4 lá, mỗi chậu được chuẩn hóa có 5 cây), tưới 20 mL dung dịch BAZ04 (10^8 CFU/mL) vào vùng gốc cây của mỗi chậu của các công thức; mỗi nghiệm thức gồm 3 chậu.

Lây nhiễm nấm bệnh: Sau 24 giờ kể từ khi xử lý với dung dịch BAZ04, tiến hành lây nhiễm nhân tạo nấm bệnh bằng cách tưới 20 mL dịch huyền phù bào tử nấm bệnh (*A. niger* QT1 hoặc *A. niger* H17) mật độ 10^6 bào tử/mL vào gốc cây lạc cho các nghiệm thức tương ứng. Thử nghiệm được thực hiện trong nhà lưới của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Các nghiệm thức được bố trí theo khối RCBD, lặp lại 3 lần độc lập. Các nghiệm thức được đặt nơi có điều kiện đồng nhất và chăm sóc như nhau. Bố trí các nghiệm thức được trình bày ở Bảng 2.4.

Bảng 2.4. *Nghiệm thức đánh giá hiệu lực ức chế nấm ở điều kiện nhà lưới*

Nghiệm thức	Nội dung
CT 1 (Đối chứng âm)	Cây lạc không gây nhiễm nấm và xử lý bằng nước vô trùng
CT 2 (Đối chứng bệnh)	Cây lạc được gây nhiễm nhân tạo nấm *A. niger* QT1 và xử lý bằng nước vô trùng
CT 3 (Xử lý)	Cây lạc được gây nhiễm nấm *A. niger* QT1 và xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (BAZ04)
CT 4 (Đối chứng bệnh)	Cây lạc được gây nhiễm nhân tạo nấm *A. niger* H17 và xử lý bằng nước vô trùng
CT 5 (Xử lý)	Cây lạc được gây nhiễm nấm *A. niger* H17 và xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (BAZ04).

Tỉ lệ cây chết được quan sát và ghi lại ở thời điểm 5, 7, 14, 21, 28 và 45 ngày sau lây nhiễm nấm cho mỗi nghiệm thức. Hiệu quả phòng chống bệnh được tính toán theo Yadav *et al.,* (2023):

$$\text{Hiệu quả phòng chống bệnh (\%)} = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Trong đó:

- Dc là tỉ lệ cây chết ở đối chứng bệnh tương ứng với từng chủng nấm (%);
- Dt: tỉ lệ cây chết ở nghiệm thức xử lý tương ứng (%).

2.2.6.2. Đánh giá hiệu quả thử nghiệm trên đồng ruộng

Bố trí thí nghiệm:

- Thí nghiệm được thực hiện tại bốn địa điểm: Hương Trà (đất nội đồng luân canh lạc) và Phú Vang (đất cát chuyên canh lạc), thuộc thành phố Huế; Triệu Phong (đất phù sa nội đồng luân canh lạc) và Nam Hải Lăng (đất cát pha luân canh cây lạc), thuộc tỉnh Quảng Trị từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2023, trong điều kiện bệnh phát sinh tự nhiên (Hình PL 9.1 ở Phụ lục IX và Hình PL10.1, PL 10.2 ở Phụ lục X).

- Tại mỗi vùng nghiên cứu, tổng diện tích thí nghiệm là 1000 m^2, gồm diện tích các ô thí nghiệm, hệ thống lối đi nội bộ và vùng đệm bảo vệ. Bố trí thí nghiệm theo khối

hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD) với 03 nghiệm thức, lặp lại 3 lần (tổng số 09 ô thí nghiệm). Kích thước ô thí nghiệm là 15 m x 2 m (30 m^2). Lối đi nội bộ rộng 0,5–1,0 m và dải đệm cách ly xung quanh rộng 5,2 m nhằm hạn chế lây nhiễm chéo và ảnh hưởng của hiệu ứng bờ (TCVN 12561:2022). Các nghiệm thức được trình bày ở Bảng 2.5.

Bảng 2.5. *Các nghiệm thức và liều lượng xử lý trong thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen trên đồng ruộng*

Nghiệm thức	Nội dung công thức	Liều lượng trên ha
CT 1	Phun hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 - BAZ04); mật độ vi khuẩn là 10^{10} CFU/mL, pha loãng bằng nước sạch.	10 lít
CT 2 (Đối chứng dương)	Phun chế phẩm *Trichoderma* thương mại; mật độ 10^9 CFU/g, pha loãng bằng nước sạch.	3 kg
CT 3 (Đối chứng âm)	Phun nước sạch	500 lít

Kỹ thuật xử lý và chăm sóc:

- Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) được chuẩn hóa đạt mật độ 10^{10} CFU/mL rồi phối trộn tỉ lệ 1 : 1 : 1 theo thể tích. Sử dụng liều lượng 10 L/ha, pha loãng bằng nước sạch đến thể tích 500 L/ha. Đối với mỗi ô thí nghiệm 30 m^2, sử dụng 30 mL hỗn hợp *Bacillus*, bổ sung nước sạch vừa đủ 3 L. Ở đối chứng dương, pha chế phẩm *Trichoderma* thương mại theo khuyến cáo in trên bao bì đạt thể tích 3 L/ô thí nghiệm. Ở ô đối chứng âm, phun với 3 L nước sạch. Tất cả các nghiệm thức, phun tập trung vào bề mặt luống đất trước lúc gieo hạt. Sử dụng thiết bị phun riêng biệt giữa các nghiệm thức.

- Tất cả các ô thí nghiệm được áp dụng đồng nhất về giống L14, khoảng cách trồng là 10 cm × 30 cm. Nền phân bón được áp dụng thống nhất cho các công thức thí nghiệm với liều lượng tính trên 1 ha gồm: 40 kg N, 60 kg P_2O_5, 80 kg K_2O và 500 kg $Ca(OH)_2$. Phân bón được chia thành ba đợt: (i) Bón lót trước khi gieo hạt: 100% lượng lân, 50% lượng đạm, 50% lượng kali và 50% lượng vôi; (ii) Bón thúc lần 1 khi cây có 3–4 lá: 50% lượng đạm và 50% lượng kali còn lại; (iii) Bón thúc lần 2 vào giai đoạn ra hoa: 50% lượng vôi còn lại. Mật độ gieo trồng, tưới nước và các biện pháp quản lý đồng ruộng khác theo quy trình canh tác địa phương.

Thu thập số liệu:

- Điều tra, theo dõi tỉ lệ bệnh, chỉ số bệnh và phân cấp bệnh được thực hiện theo TCVN 13268-3:2021. Định kỳ hằng tuần, điều tra cây bệnh và cây chết trên diện tích 10 m^2 (2 × 5 m) giữa mỗi ô thí nghiệm. Phân biệt bệnh héo rũ gốc mốc đen (*A. niger*) qua lớp bào tử đen ở gốc; bệnh mốc trắng (*S. rolfsii*) qua hệ sợi trắng và hạch nấm; bệnh lở cổ rễ (*R. solani*) qua vết lõm nâu sẫm ở cổ rễ. Trong mỗi đợt điều tra, lấy ngẫu nhiên các mẫu cây lạc biểu hiện triệu chứng bệnh HRGMĐ đem về phòng thí nghiệm phân lập trên môi trường PDA và quan sát hình thái nấm để hỗ trợ xác định tác nhân.

- Đánh giá hiệu lực phòng, chống bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp các chủng *Bacillus* được tham khảo các nguyên tắc khảo nghiệm hiệu lực sinh học trên đồng ruộng quy định tại TCVN 12561:2022.

$$\text{Tỉ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây điều tra}} \text{ x } 100$$

- Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng, hình thái, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lạc được thực hiện theo QCVN 01-57:2011/BNNPTNT. Các chỉ tiêu theo dõi gồm:

+ Chiều cao cây (cm): Đo từ đốt lá mầm đến đỉnh sinh trưởng của 10 cây/ô thí nghiệm rồi tính giá trị trung bình.

+ Tổng số cành (cành): Được theo dõi lúc thu hoạch và đếm 10 cây/ ô thí nghiệm. tính giá trị trung bình.

+ Xác định tổng số hoa/cây = tổng số tia/cây lúc thu hoạch và đếm 10 cây/ ô thí nghiệm, tính giá trị trung bình.

+ Tổng số quả/cây (quả): Đếm tổng số quả 10 cây/ô thí nghiệm, tính giá trị trung bình.

+ Số quả chắc/cây (quả): Đếm tổng số quả chắc 10 cây/ ô thí nghiệm, tính giá trị trung bình.

$$\text{+ Xác định tỉ lệ hoa hữu hiệu (\%)} = \frac{\text{Số quả chắc/cây}}{\text{Tổng số hoa/cây}} \text{ x } 100$$

+ Khối lượng 100 quả khô (g): Sau khi phơi quả khô, mỗi nghiệm thức đếm ngẫu nhiên 100 quả 3 lần, cân cả 3 mẫu. Khối lượng 100 quả được tính bằng trung bình của 3 mẫu.

+ Khối lượng 100 hạt (g): Lấy ngẫu nhiên và cân 3 mẫu/1 ô thí nghiệm, 100 quả khô/mẫu.

+ NSLT (tấn/ha): Năng suất lý thuyết được tính dựa trên số quả chắc/cây, khối lượng 100 quả và số cây thực thu trên đơn vị diện tích theo công thức sau:

$$\text{NSLT (tấn/ha)} = \frac{N_{tt}\ (\text{cây/m}^2) \times Q_{qc}\ (\text{quả/cây}) \times P_{100}\ (\text{g})}{10\,000}$$

Trong đó:

N_{tt}: số cây thực thu/m² (đã loại trừ cây chết và hàng biên)

Q_{qc}: số quả chắc/cây

P_{100}: khối lượng 100 quả khô (g)

+ Năng suất thực thu NSTT (tấn/ha): Tính năng suất thực thu dựa trên năng suất quả khô thu được trên thực tế của các ô thí nghiệm.

2.3. XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các thí nghiệm được thực hiện với ít nhất 03 lần lặp độc lập; kết quả trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (M ± SD). Số liệu được xử lý bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 26.0 và Microsoft Excel 2016. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được đánh giá bằng ANOVA một hoặc hai yếu tố, kết hợp với phép thử Duncan, Fisher's LSD hoặc so sánh từng cặp có điều chỉnh Bonferroni. Tính đồng nhất phương sai được kiểm tra bằng kiểm định Levene. Phân tích hồi quy tuyến tính được sử dụng để đánh giá mối quan hệ giữa hoạt độ enzyme và hiệu quả ức chế nấm bệnh thông qua hệ số xác định (R^2). Ngưỡng ý nghĩa thống kê được xác định ở $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN NẤM *ASPERGILLUS* SP. GÂY BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC ĐEN TRÊN CÂY LẠC

3.1.1. Phân lập và nhận diện chủng nấm bệnh dựa trên đặc điểm hình thái

Từ các mẫu bệnh phẩm phần cổ rễ (vùng chuyển tiếp giữa thân và rễ) của 80 cây lạc biểu hiện triệu chứng điển hình của bệnh HRGMĐ được thu thập tại các vùng trồng lạc chuyên canh ở tỉnh Quảng Trị (40 mẫu) và thành phố Huế (40 mẫu) (Hình 3.1 và PL2.1; PL2.2 ở Phụ lục II), chúng tôi đã tiến hành phân lập nấm bệnh dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường PDA.



Hình 3.1. *Địa điểm thu thập mẫu bệnh và mẫu đất phân lập vi sinh vật đối kháng*

Kết quả phân lập, đã thu được 60 mẫu nấm phân lập (isolates). Các mẫu nấm này bước đầu được phân loại dựa trên các đặc trưng hình thái khuẩn lạc và cấu trúc bào tử dưới kính hiển vi. Kết quả khảo sát cho thấy sự hiện diện phổ biến của các chủng nấm có đặc điểm tương đồng với chi *Aspergillus*, đồng thời phản ánh mức độ đa dạng về hình thái của tác nhân gây bệnh tại các địa điểm nghiên cứu.

Trong số các mẫu nấm phân lập được, 09 chủng nấm tiêu biểu được lựa chọn để nghiên cứu chuyên sâu, bao gồm 05 chủng (QT1, QT2, QT3, QT4 và QT7) phân lập từ cây lạc bị bệnh tại Quảng Trị và 04 chủng (H6, H17, H18 và H19) phân lập từ cây lạc bị bệnh tại thành phố Huế. Việc lựa chọn các chủng này được thực hiện trên cơ sở chúng được phân lập từ những cây lạc có triệu chứng bệnh rõ rệt, đại diện cho các vùng sản xuất trọng điểm, xuất hiện ở nhiều giai đoạn sinh trưởng khác nhau, với mật độ và tỉ lệ bệnh cao, đồng thời thể hiện đặc điểm hình thái khuẩn lạc điển hình của chi *Aspergillus* và có sự khác biệt nhất định giữa các chủng. Số lượng chủng được lựa chọn cũng đảm bảo tính đại diện và tính khả thi cho việc triển khai các thí nghiệm tiếp theo (Bảng 3.1).

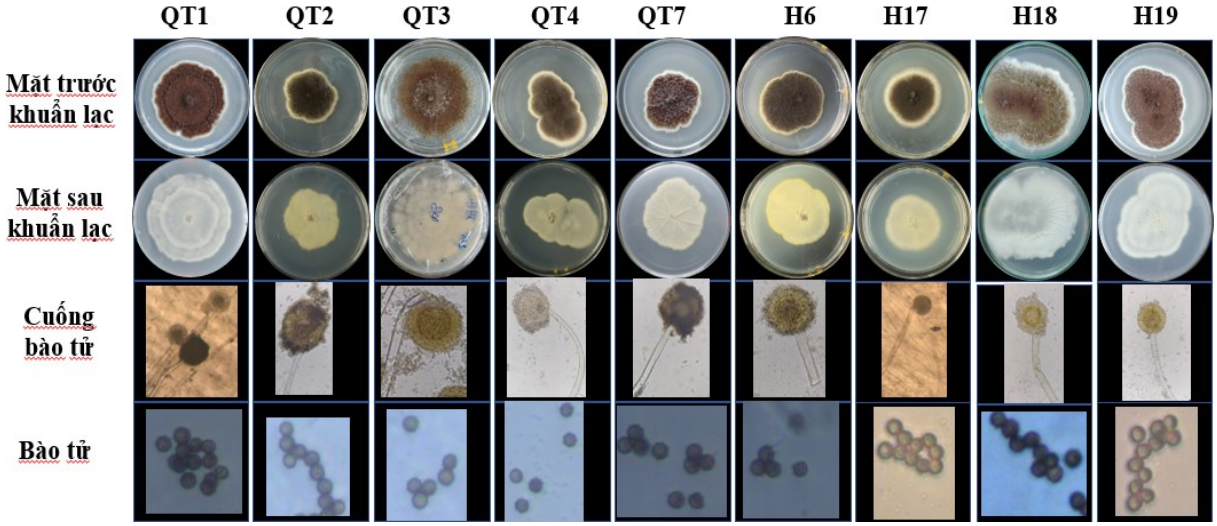
Bảng 3.1. *Đặc điểm các chủng nấm phân lập điển hình gây bệnh héo rũ gốc mốc đen tại các vùng khảo sát ở Quảng Trị và thành phố Huế*

STT	Ký hiệu chủng nấm	Địa điểm thu mẫu*	Triệu chứng cây lạc bị bệnh được sử dụng để phân lập nấm bệnh
1	QT1	Nam Cửa Việt, tỉnh Quảng Trị 16°50'51.9"N; 107°10'46.6"E	HRGMĐ; giống lạc L14, cây bị bao phủ bởi bào tử nấm màu đen, cây héo, khô và chết
2	QT2	Ba Lòng, tỉnh Quảng Trị 16°39'27.9"N 106°56'50.3"E	HRGMĐ; giống lạc L16, lá vàng, phần cổ rễ có nấm đen bao phủ, thối gốc
3	QT3	Cam Lộ, tỉnh Quảng Trị 16°48'29.4"N 106°57'50.6"E	HRGMĐ; giống lạc TB15, cây bị bao phủ bởi bào tử nấm màu đen, cây héo, khô và chết
4	QT4	Mỹ Thủy, tỉnh Quảng Trị 16°43'28.7"N 107°20'41.2"E	HRGMĐ; giống lạc Sen Lai; gốc cây bị bao phủ bởi bào tử nấm màu đen, cây chết
5	QT7	Nam Đông Hà, tỉnh Quảng Trị 16°50'07.4"N 107°06'37.9"E	HRGMĐ; giống lạc L14, lá vàng, thối gốc, có nấm bào tử màu đen bao phủ
6	H6	Phong Thái, thành phố Huế 16°32'58.9"N 107°26'46.1"E	HRGMĐ; giống lạc TK10, gốc cây lạc bị bao phủ bởi nấm có bào tử màu đen, cây héo, khô và chết
7	H17	Đan Điền, thành phố Huế 16°33'49.9"N 107°29'18.6"E	HRGMĐ; giống lạc L16, lá bị héo vàng, thối cổ rễ, gốc thân và rễ bị nấm có bào tử màu đen bao phủ
8	H18	Hương Trà, thành phố Huế 16°32'06.3"N 107°27'40.9"E	HRGMĐ; giống lạc L14, cây bị bao phủ bởi bào tử nấm màu đen, cây héo, khô và chết
9	H19	Phú Vang, thành phố Huế 16°27'02.7"N 107°44'46.4"E	HRGMĐ; giống lạc Ran, cây bị bao phủ bởi bào tử nấm màu đen, cây héo, khô và chết

(theo tên đơn vị hành chính mới của chính quyền 2 cấp)*

Khi được nuôi cấy trên môi trường PDA, các chủng nấm QT1, QT2, QT3, QT4, QT7, H6, H17, H18 và H19 cho thấy sự đa dạng nhất định về màu sắc cũng như hình thái khuẩn lạc, phản ánh những khác biệt hình thái giữa các chủng nấm được phân lập. Nhìn chung, bề mặt khuẩn lạc chủ yếu có dạng nhung hoặc hơi bông, với rìa khuẩn lạc rõ nét, đều và ổn định trong quá trình sinh trưởng. Màu sắc mặt trước của khuẩn lạc biến thiên trong khoảng từ nâu đậm đến xám đen; một số chủng biểu hiện màu nâu đậm nổi

bật kèm theo viền vàng ở rìa, trong khi một số chủng khác ban đầu có màu trắng và chuyển dần sang nâu rồi đen theo thời gian nuôi cấy. Ở mặt sau khuẩn lạc, màu sắc thường là trắng kem hoặc vàng nhạt, đồng thời xuất hiện cấu trúc vòng đồng tâm đặc trưng, cho thấy kiểu sinh trưởng điển hình của nhóm nấm này trong môi trường nuôi cấy trên đĩa Petri (Hình 3.2).

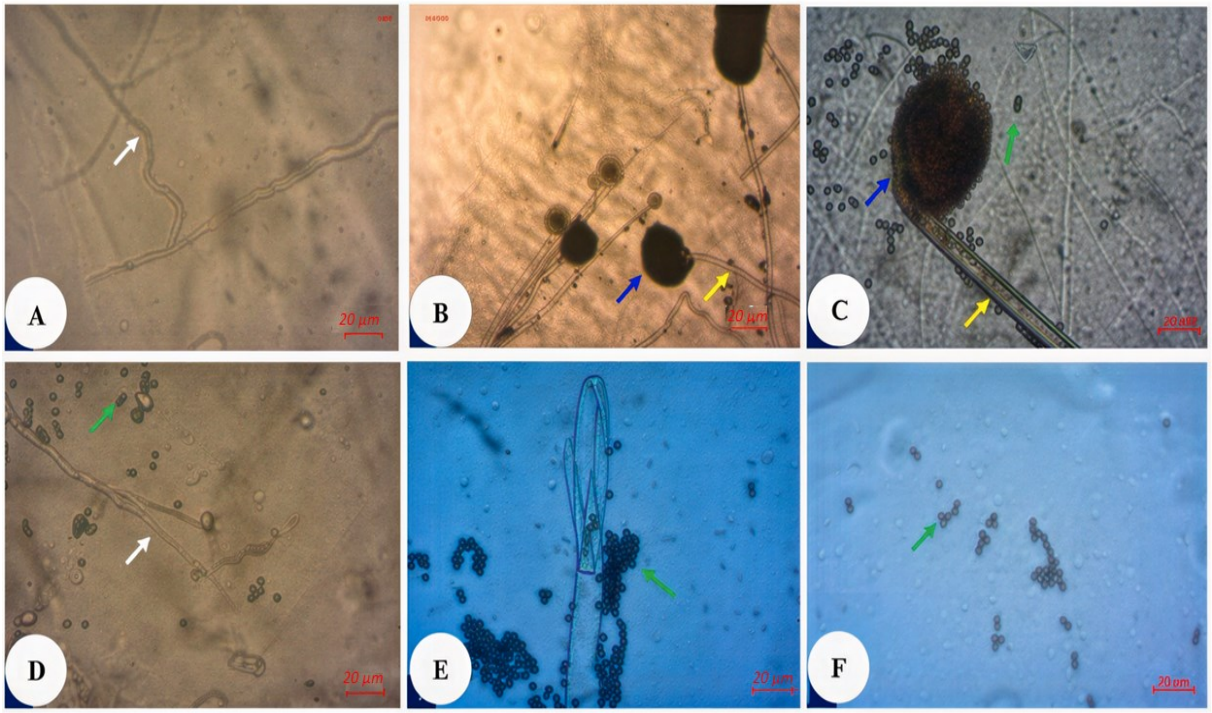


Hình 3.2. *Đặc điểm hình thái các chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên môi trường PDA*

Tất cả các chủng nấm đều thể hiện khả năng sinh trưởng nhanh, sau 6 ngày nuôi cấy, khuẩn lạc phát triển phủ kín bề mặt đĩa Petri đường kính 9 cm. Quan sát các đặc điểm vi thể dưới kính hiển vi cho thấy khuẩn ty (hyphae) của cả 9 chủng đều có vách ngăn rõ và phân nhánh, phù hợp với đặc điểm hình thái của nấm sợi (Hình 3.3 A, D). Cành bào tử phân sinh (conidiophore) có chiều dài dao động trong khoảng 300–1000 µm, bề mặt nhẵn và trong suốt; phần đỉnh phình rộng tạo thành bóng đỉnh (vesicle) hình cầu, có màu sẫm và đường kính khoảng 130 – 145 µm (Hình 3.3 B, C). Bào tử phân sinh (conidia) của các chủng nấm có hình cầu, bề mặt thô ráp, màu sắc từ nâu đậm đến nâu đen, với kích thước dao động trong khoảng 2–4 µm (Hình 3.3E, F).

Kết quả phân tích tổng hợp các đặc điểm hình thái cho thấy cả 9 chủng nấm được phân lập từ cây lạc có biểu hiện bệnh héo rũ gốc mốc đen (HRGMĐ) đều mang những dấu hiệu đặc trưng của chi *Aspergillus*. Các đặc điểm quan sát được trong nghiên cứu có sự tương đồng với những mô tả đã công bố về loài *Aspergillus niger*. Đáng chú ý, Bajaya et al. (2022b) ghi nhận rằng trên môi trường PDA, nấm sinh trưởng với tốc độ cao, khuẩn lạc lan rộng và có thể bao phủ toàn bộ bề mặt đĩa nuôi cấy trong thời gian chỉ vài ngày. Hệ sợi nấm ban đầu có màu trắng hoặc trắng hơi vàng, sau 3–5 ngày nhanh chóng chuyển sang màu đen carbon đậm với mật độ bào tử dày đặc che phủ hoàn toàn hệ sợi nấm (Kumar et al., 2020; Kumari & Singh, 2016). Quan sát mặt sau của đĩa nuôi cấy cho thấy màu trắng đục hoặc vàng nhạt, không xuất hiện sắc tố sẫm màu xâm lấn vào môi trường thạch (Akhtar et al., 2014; Bajaya et al., 2022b). Dưới kính hiển vi quang học, các isolate thể hiện cấu trúc vi thể đặc trưng với giá bào tử mọc trực tiếp từ vách ngăn, dài và có vách dày nhẵn. Bào tử hình cầu mang cấu trúc hai lớp, chuỗi bào tử trần

màu nâu đen carbon (Akhtar et al., 2014; El-Dawy et al., 2024). Các thông số về kích thước bào tử và đường kính bào tử của isolate nghiên cứu có sự tương đồng cao với mô tả của Kumari & Singh (2016) về nấm *Aspergillus niger* gây bệnh héo rũ trên cây lạc tại Ấn Độ. Về màu sắc khuẩn lạc của *A. niger*, Samson et al. (2014) ghi nhận rằng khuẩn lạc của *A. niger* thường có màu đen đặc trưng. Bên cạn đó cũng có báo cáo cho biết sự biến đổi về màu sắc khuẩn lạc, dao động từ nâu nhạt đến nâu đậm, có thể xuất phát từ điều kiện nuôi cấy khác nhau hoặc sự khác biệt di truyền giữa các chủng (Dania et al., 2021; Šimonovičová et al., 2021). Các nghiên cứu về di truyền học cho thấy màu sắc bào tử của *A. niger* có liên quan chặt chẽ đến các gen tham gia vào chu trình sinh tổng hợp polyketide và sự bất hoạt của một hoặc nhiều gen trong chu trình này có thể dẫn đến sự thay đổi sắc tố, biểu hiện ở các gam màu từ vàng nhạt, xanh ôliu, nâu, đen, hoặc thậm chí mất màu hoàn toàn (Segers et al., 2018). Jørgensen và cs. (2011) cho rằng, màu đen đặc trưng này là kết quả của sự tổng hợp melanin qua con đường 1,8-DHN, một đặc tính giúp nấm chống chịu tốt với điều kiện môi trường đất khắc nghiệt. Mức độ biểu hiện của gen 4'-phosphopantetheinyl transferase được cho là có mối liên hệ trực tiếp với màu sắc bào tử, trong khi điều kiện nuôi cấy có thể điều chỉnh quá trình này thông qua ảnh hưởng đến các giai đoạn phát triển của nấm. Các bằng chứng nêu trên củng cố nhận định rằng sự biến thiên màu sắc quan sát được ở các chủng trong nghiên cứu là đặc điểm thích nghi mang tính di truyền của *A. niger*, đồng thời không làm sai lệch các tiêu chí phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và đặc tính nuôi cấy.



Hình 3.3. *Đặc điểm hình thái vi thể của các chủng A. niger QT1 và H17 trên môi trường PDA. Mũi tên trắng: khuẩn ty (hyphae); mũi tên xanh dương: bóng đỉnh (vesicle); mũi tên vàng: Cành bào tử phân sinh (conidiophore); mũi tên xanh lá cây: Bào tử phân sinh (conidia); thanh đỏ: thước đo tham chiếu. (A, D): Khuẩn ty/sợi nấm (hyphae); (B, C): Cuống bào tử trần và bóng đỉnh; (E, F): Bào tử trần. (Quan sát dưới kính hiển vi quang học, độ phóng đại 40x, thanh tỉ lệ = 20 µm).*

Sự hiện diện phổ biến của *A. niger* tại khu vực nghiên cứu tương đồng với ghi nhận của Vũ (2022) về sự xuất hiện của loài nấm này trong nhóm tác nhân gây bệnh thối mầm và héo rũ gốc trên cây lạc ở miền Trung Việt Nam. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu phân loại học hiện đại của Bian et al. (2022) việc xác định chính xác các loài trong series *Nigri* (như *A. niger, A. welwitschiae, A. tubingensis*) chỉ dựa trên hình thái là không thể do sự chồng lấn quá lớn về các đặc điểm cấu trúc. Vì vậy, các kết quả mô tả hình thái trong mục này, dù tuân thủ nghiêm ngặt quy trình quốc tế của Samson et al. (2014) và tiêu chuẩn Việt Nam (Thuận et al., 2022), vẫn chỉ được xem là bước sàng lọc sơ bộ. Kết quả này cần được khẳng định lại bằng quy tắc Koch và phương pháp sinh học phân tử ở bước tiếp theo để đảm bảo độ chính xác và tính khoa học cho luận án.

3.1.2. Kiểm chứng theo quy tắc Koch và tuyển chọn chủng nấm có khả năng gây bệnh cao

Nhằm kiểm chứng một cách có hệ thống vai trò gây bệnh của các chủng nấm phân lập đối với triệu chứng HRGMĐ đã được ghi nhận trên cây lạc ngoài đồng ruộng, 09 chủng nấm đại diện đã được lựa chọn để tiến hành định danh theo quy tắc Koch. Thí nghiệm được thực hiện trên giống lạc L14 trong điều kiện nhà lưới để đánh giá khả năng gây bệnh của từng chủng nấm. Kết quả định danh theo quy tắc Koch của 09 chủng nấm trên giống lạc L14 trong điều kiện nhà lưới được tổng hợp và trình bày ở Bảng 3.2 và Hình 3.4, PL3.1 ở Phụ lục III.

Bảng 3.2. *Kết quả lây nhiễm nhân tạo các chủng nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên giống lạc L14 trong điều kiện nhà lưới*

STT	Chủng phân lập	Thời gian xuất hiện triệu chứng đầu tiên (ngày)	Tỉ lệ bệnh (%)	Tỉ lệ cây chết (%)
1	**QT1**	**3-4**	**100^{a}**	**100,0^{a}**
2	QT2	3-4	100^{a}	95,6^{b}
3	QT3	5-6	100^{a}	86,0^{c}
4	QT4	3-4	100^{a}	97,7^{ab}
5	QT7	3-4	100^{a}	98,0^{ab}
6	H6	4-6	100^{a}	85,7^{c}
7	**H17**	**3-4**	**100^{a}**	**100,0^{a}**
8	H18	4-5	100^{a}	97,8^{ab}
9	H19	4-5	100^{a}	95,6^{b}
10	Đối chứng	-	0,0^{b}	0,0^{d}

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, p<0,05). Đối chứng: cây lạc không bị nhiễm nấm bệnh.



Hình 3.4. *Lây nhiễm các chủng nấm gây héo rũ gốc mốc đen lên cây lạc L14 khỏe theo quy tắc Koch: các lô thí nghiệm và đối chứng (A), cây lạc chết do bị nhiễm nấm nhân tạo (B), khuẩn lạc nấm bệnh được phân lập lại từ cây lạc bị bệnh (C).*

Kết quả lây nhiễm nhân tạo cho thấy toàn bộ 09 chủng nấm đều thể hiện khả năng gây bệnh trên giống lạc L14 với các biểu hiện điển hình của bệnh HRGMĐ, tỉ lệ bệnh đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức lây nhiễm. Thời gian xuất hiện triệu chứng được ghi nhận trong khoảng 3–6 ngày sau lây nhiễm, phản ánh mức độ xâm nhiễm và phát triển tương đối nhanh trong điều kiện nhà lưới. Tuy nhiên, kết quả xử lý thống kê chưa ghi nhận có sự sai có ý nghĩa về tỉ lệ bệnh giữa các chủng ($p > 0,05$), chứng tỏ mức độ gây nhiễm ban đầu của các chủng là tương đương nhau.

Kết quả về tỉ lệ cây lạc chết ghi nhận sự có sự biến động trong khoảng 85,7% đến 100% giữa các chủng nấm. Trong đó, hai chủng *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 gây tỉ lệ cây chết cao hơn so với các chủng khác, với sự sai khác đạt mức ý nghĩa thống kê, qua đó cho thấy chủng này có khả năng gây hại mạnh hơn trong điều kiện thí nghiệm. Kết quả này có thể do sự khác biệt về độc lực hoặc khả năng gây tổn thương mô của từng chủng nấm, mặc dù tỉ lệ gây bệnh ban đầu không khác biệt đáng kể. Mức độ gây hại của chủng có độc tính mạnh nhất trong luận án tương đồng với báo cáo của Andge et al. (2017), khi tác nhân *A. niger* có thể gây tỉ lệ héo rũ lên đến 80% trong điều kiện thực nghiệm. Trong khi đó, nghiên cứu của Junjadia et al. (2025) đã chỉ ra rằng việc kết hợp lây nhiễm qua cả hạt và đất giúp tối ưu hóa khả năng gây bệnh của nấm (đạt 75,79%) so với các phương pháp đơn lẻ.

Các triệu chứng bệnh quan sát được trên cây lạc sau lây nhiễm nhân tạo tương đồng rõ rệt với triệu chứng được ghi nhận ngoài đồng ruộng, bao gồm sự xuất hiện các vết đen tại vùng thân gốc, mô bị thối mềm, bề mặt thân và cổ rễ phủ lớp bào tử màu đen, dẫn đến hiện tượng cây bị gãy đổ và chết hoàn toàn trong khoảng 6–14 ngày sau lây nhiễm (Hình 3.4). Sự tương đồng này cho thấy mô hình lây nhiễm nhân tạo đã tái hiện được đặc điểm bệnh lý của bệnh HRGMĐ trong điều kiện sản xuất. Đặc biệt, sự xuất hiện của khối bào tử màu đen bao phủ vùng cổ rễ bị tổn thương hoàn toàn tương đồng với mô tả của Bajaya et al. (2022b).

Kết quả tái phân lập nấm từ các cây lạc bị bệnh HRGMĐ trong lây nhiễm nhân tạo đã thu được các khuẩn lạc nấm có đặc điểm hình thái và sinh học trùng với chủng ban đầu. Điều này cho phép khẳng định tính ổn định về đặc tính gây bệnh của các dòng nấm đã phân lập, đồng thời đáp ứng được đầy đủ các yêu cầu của quy tắc Koch. Ngược lại, các cây lạc ở nghiệm thức đối chứng, không có hiện tượng cây chết, không ghi nhận sự biểu hiện của bệnh HRGMĐ và khi phân lập không ghi nhận sự xuất hiện của *Aspergillus* sp. Điều này chứng tỏ, rằng các triệu chứng quan sát được trong các nghiệm thức xử lý là kết quả trực tiếp của quá trình lây nhiễm nhân tạo.

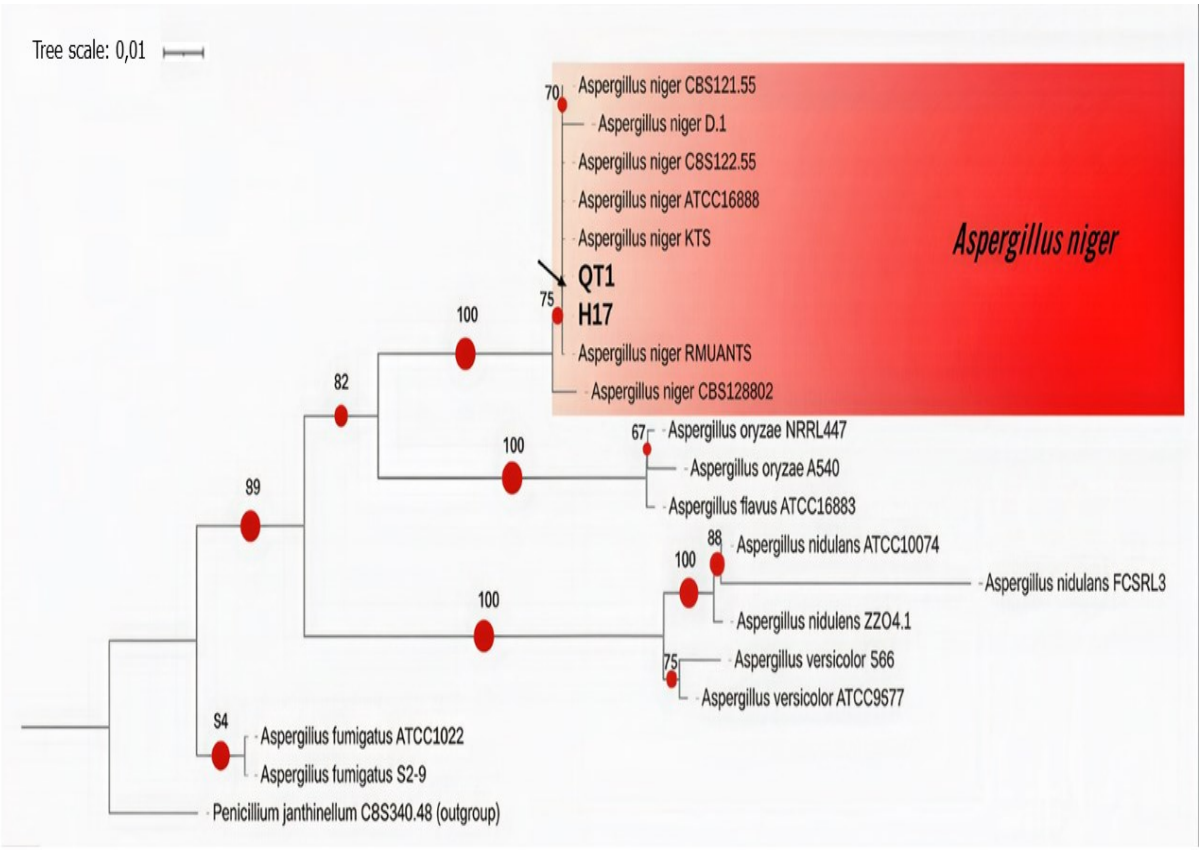
Kết quả thu được trong nghiên cứu của luận án tương đồng với các công bố về kết hợp đánh giá đặc điểm hình thái của nấm gây bệnh với định danh theo quy tắc Koch để tăng độ tin cậy trong xác định tác nhân gây bệnh thuộc chi *Aspergillus*. Những kết quả của mục này củng cố thêm cơ sở khoa học cho việc xác định vai trò của các chủng nấm phân lập trong việc gây bệnh HRGMĐ trên cây lạc.

Tuy nhiên, kết quả tuyển chọn dựa trên đặc điểm hình thái và kiểm tra theo quy tắc Koch cũng được xem xét trong giới hạn nhất định. Bởi vì, theo Sklenář et al. (2017), việc định danh chỉ dựa trên các đặc điểm hình thái đối với nấm *Aspergillus* là một thách thức lớn và có nguy cơ nhầm lẫn cao. Minh chứng là nghiên cứu của Guo et al. (2021) đã xác nhận các loài đồng hình như *A. tubingensis* cũng gây ra triệu chứng mảng thối đen tương tự nhưng có mức độ độc tính hoàn toàn khác biệt so với *A. niger*. Do đó, việc lựa chọn các chủng có khả năng gây bệnh cao thông qua quy trình Koch là bước đệm quan trọng để đánh giá hiệu quả của các tác nhân đối kháng sinh học trong các nội dung tiếp theo của luận án.

Trên cơ sở đặc điểm hình thái khuẩn lạc và mức độ gây bệnh ghi nhận trong các thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo, hai chủng nấm *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 đại diện cho 2 vùng nghiên cứu được lựa chọn để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Đây là 2 chủng nấm có mức độ độc lực cao (gây chết 100% cho cây lạc trong 3 - 4 ngày sau lây nhiễm), chủng QT1 đại diện cho khu vực tỉnh Quảng Trị và chủng H17 đại diện cho thành phố Huế.

3.1.3. Định danh chủng nấm bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả khuếch đại vùng ITS bằng cặp mồi ITS1/ITS4 ở hai chủng nấm QT1 và H17 cho thấy phản ứng PCR tạo ra sản phẩm có chiều dài xấp xỉ 599 bp. Đoạn DNA được khuếch đại bao gồm vùng ITS và trình tự gen 5.8S rRNA, cung cấp dữ liệu phục vụ quá trình định danh các chủng nấm ở cấp độ phân tử. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy trình tự vùng ITS của cả hai chủng QT1 và H17 có độ tương đồng 100% so với các trình tự tham chiếu của *A. niger*, bao gồm các chủng KT5, RMUAN75, ATCC16888, CBS122.55 và D1, được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu NCBI. Phân tích cây phát sinh chủng loại cũng khẳng định hai chủng QT1 và H17 tập hợp trong cùng một nhánh riêng biệt, đồng thời thể hiện mối quan hệ di truyền gần gũi nhất với nhóm các chủng tham chiếu nêu trên. Trình tự nucleotide của vùng ITS1–ITS4 tương ứng với hai chủng đã được đăng ký trong ngân hàng gen NCBI với các số hiệu OQ561195 (*A. niger* QT1) và OQ561194 (*A. niger* H17) (Hình 3.5).



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

Tổng hợp các kết quả phân tích trình tự vùng gen ITS kết hợp với xây dựng cây phát sinh chủng loại cho thấy hai chủng QT1 và H17 có độ tương đồng trình tự đạt 100% với trình tự của các chủng *Aspergillus niger* được sử dụng làm tham chiếu. Kết quả này xác định vị trí phân loại của hai chủng nghiên cứu thuộc phân chi nấm đen (*Aspergillus* section *Nigri*), cụ thể là nằm trong phức hợp loài *Aspergillus niger* complex. Kết quả này tương đồng với ghi nhận của George và Ramteke (2019) khi định danh chủng *A. niger* LKO1 gây bệnh mốc đen, cũng đạt mức độ tương đồng tuyệt đối ở vùng ITS.

Việc kết hợp đánh giá đặc điểm hình thái, kiểm chứng khả năng gây bệnh theo nguyên lý Koch và phân tích trình tự vùng ITS sau khuếch đại PCR là hướng tiếp cận đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu nhằm nâng cao độ tin cậy khi xác định tác nhân nấm gây bệnh. Hiệu quả của cách tiếp cận này đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trên khoai lang trắng (Dania et al., 2021) và quả lựu (Guo et al., 2021). Xét về phương diện phân loại, nhiều loài thuộc chi *Aspergillus* có những đặc điểm hình thái gần giống nhau, khiến việc nhận diện và phân biệt chính xác giữa các loài trở nên khó khăn nếu chỉ căn cứ vào các dấu hiệu kiểu hình.

Sử dụng kết trình tự vùng ITS kết hợp với phân tích phát sinh chủng loại được xem là công cụ có độ tin cậy cao trong định danh loài nấm, đặc biệt đối với các nhóm nấm có mức độ tương đồng hình thái lớn (Susca et al., 2016; George & Ramteke, 2019). Mặc dù một số nghiên cứu lưu ý rằng chỉ thị ITS đôi khi không đủ để phân biệt một số loài "ẩn" (cryptic species) trong nhóm *A. niger* complex (Susca et al., 2016), nhưng các cập nhật phân loại mới đây đã củng cố đáng kể cho kết luận của luận án. Theo

quan điểm của Bian et al. (2022), số lượng loài trong series *Nigri* đã được đề xuất tinh giảm dựa trên phân tích đa gen và toàn bộ hệ gen, trong đó loài *A. welwitschiae* – vốn thường gây nhầm lẫn với *A. niger* – hiện được xác định là đồng danh (synonym) của *A. niger*. Vùng gen ITS là mã vạch DNA tiêu chuẩn giúp định danh chính xác ở cấp độ chi và nhóm loài, tuy nhiên do tính chất bảo tồn cao của vùng gen này giữa các loài ẩn cận kề trong phức hợp *A. niger* complex, việc phân biệt triệt để *A. niger* với các loài liên quan như *A. tubingensis* hay *A. welwitschiae* đòi hỏi phải phân tích thêm các chỉ thị phân tử thứ cấp như Beta-tubulin (*BenA*) hoặc Calmodulin (*CaM*) trong các nghiên cứu phân loại chuyên sâu tiếp theo (Varga et al., 2011; Samson et al., 2014).

Trong bối cảnh việc định danh chủng nấm đen phức tạp (Steenwyk et al., 2024), luận án đã áp dụng cách tiếp cận "đa diện" (Samson et al., 2014) nhằm đảm bảo tính chính xác và khách quan trong phân loại. Kết hợp giữa triệu chứng bệnh học trên cây lạc tại tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế, đặc điểm hình thái (Dania et al., 2021) và trình tự ITS (Schoch et al., 2012) về tác nhân gây bệnh cũng với các cập nhật phân loại mới (Bian et al., 2022) để kết luận về tác nhân gây bệnh HRGMĐ trên cây lạc. Trên cơ sở đó, hai chủng QT1 và H17 đã được sử dụng làm tác nhân gây bệnh mục tiêu để tuyển chọn và đánh giá khả năng đối kháng của các chủng VSV phân lập từ đất trồng lạc tại Quảng Trị và Huế. Kết quả nghiên cứu nhằm đề xuất các biện pháp kiểm soát *A. niger* theo hướng bền vững, hiệu quả và phù hợp với điều kiện thực tiễn tại địa phương.

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 thu thập tại các vùng trồng lạc nhiễm bệnh HRGMĐ, bao gồm 06 mẫu đất tại tỉnh Quảng Trị và 06 mẫu đất tại thành phố Huế, chúng tôi đã tiến hành phân lập và sàng lọc các VSV nhằm xác định khả năng ức chế nấm bệnh. Kết quả, ghi nhận 144 chủng, gồm 138 chủng vi khuẩn và 06 chủng nấm thể hiện hoạt tính đối kháng đối với hai chủng *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 (Bảng 3.3).

Số lượng lớn các chủng VSV được phân lập phản ánh tính đa dạng của quần thể VSV đất tại các vùng trồng lạc, đồng thời cho thấy đất trồng lạc là nguồn tiềm năng để khai thác các chủng VSV có hoạt tính đối kháng sinh học. Việc các chủng vi khuẩn và nấm phân lập đều thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng của cả hai chủng nấm bệnh QT1 và H17 cho thấy phổ đối kháng tương đối rộng, tạo cơ sở thuận lợi cho các bước tuyển chọn, đánh giá chuyên sâu và khai thác ứng dụng các chủng VSV tiềm năng trong phòng trừ bệnh HRGMĐ trên cây lạc ở các vùng nghiên cứu.

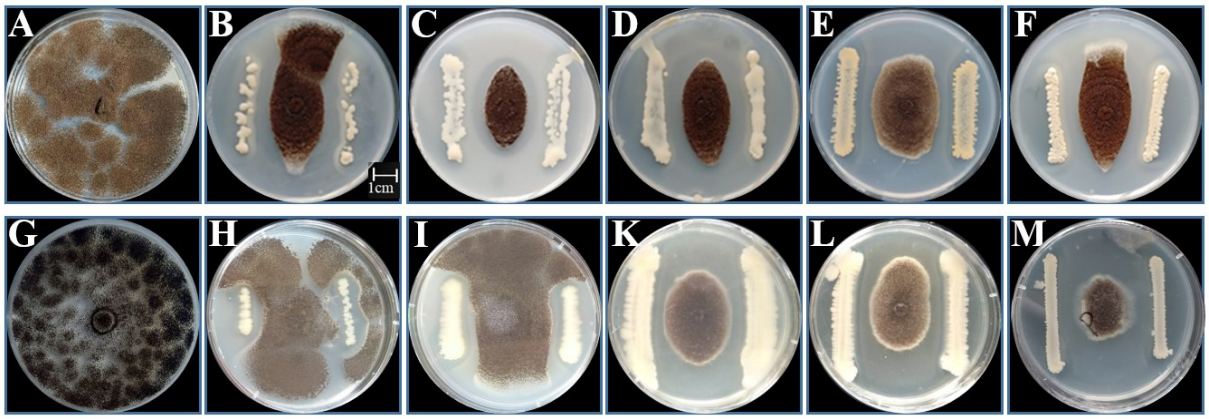
Bảng 3.3. *Khả năng kháng nấm A. niger của các chủng vi khuẩn phân lập*

Kích thước vùng ức chế D_{iz} (mm)	Đối kháng với chủng nấm QT1		Đối kháng với chủng nấm H17	
	Số chủng	Tỉ lệ (%)	Số chủng	Tỉ lệ (%)
<10	36	26,09	45	32,61
10-20	83	60,14	79	57,25
>20	19	13,77	14	10,14

Bảng 3.3 cho thấy mức độ đối kháng với *A. niger* QT1 và H17 khác nhau rõ rệt giữa các chủng vi khuẩn. Cụ thể, nhóm chủng vi khuẩn tạo kích thước vùng ức chế (Diz) từ 10–20 mm chiếm tỉ lệ cao nhất, đạt 57,25% (79 chủng) đối với chủng nấm H17 và 60,14% (83 chủng) đối với chủng nấm QT1. Trong khi đó, nhóm chủng vi khuẩn có D_{iz} > 20 mm chiếm 13,77% (19 chủng) đối với QT1 và 10,14% (14 chủng) đối với H17. Nhóm vi khuẩn có D_{iz} < 10 mm chiếm 26,09% (36 chủng) đối với QT1 và 32,61% (45 chủng) đối với H17.

Phân tích số liệu phân bố thực nghiệm này, chúng tôi thiết lập ngưỡng D > 20 mm làm tiêu chuẩn để xác định nhóm có hoạt tính đối kháng mạnh, nhằm tuyển chọn những chủng vi khuẩn bản địa ưu tú nhất (chiếm khoảng 10,14% - 13,77%) có khả năng tạo ra đường kính vùng ức chế tổng ổn định trước tốc độ phát triển mạnh của hệ sợi nấm bệnh *A. niger*.

Sự khác nhau về hiệu lực ức chế giữa 138 chủng vi khuẩn cho thấy nguồn vi khuẩn phân lập từ đất trồng lạc tại địa phương có khả năng đối kháng khá đa dạng, trong đó nhiều chủng ức chế được cả *A. niger* QT1 và H17 với mức độ khác nhau. Điều này cho thấy tiềm năng trong việc khai thác nguồn vi khuẩn bản địa làm đối tượng nghiên cứu tiếp theo, nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng mạnh và ổn định, phục vụ cho định hướng phát triển các biện pháp phòng trừ sinh học bệnh HRGMĐ trên cây lạc (Hình 3.6).



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).*

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy cả 6 chủng nấm đều đối kháng với A. niger QT1 và H17 ở các mức độ khác nhau. Trong đó, phần lớn các chủng khảo sát biểu hiện đường kính vùng phát triển của nấm đối kháng D_{ca} < 50 mm, chiếm tỉ lệ từ 66,67% đến 83,33%. Nhóm tiếp theo, có D_{ca} từ 50 – 60 mm, chiếm tỉ lệ thấp (16,67%). Tuy nhiên có 01 chủng có D_{ca} > 60 mm đối với dòng nấm bệnh QT1, nhưng không có chủng nào có D_{ca} > 60 mm đối với chủng nấm bệnh H17.

Bảng 3.4. *Khả năng đối kháng nấm A. niger của các chủng nấm phân lập*

Đường kính vùng phát triển của nấm đối kháng D_{ca} (mm)	**Đối kháng với *A. niger* QT1**		**Đối kháng với *A. niger* H17**	
	Số chủng	**Tỉ lệ (%)**	**Số chủng**	**Tỉ lệ (%)**
<50	4	66,67	5	83,33
50-60	1	16,67	1	16,67
>60	1	16,67	0	0

Tổng số 144 chủng VSV được sàng lọc, gồm 74 chủng phân lập từ đất trồng lạc ở Quảng Trị và 70 chủng ở thành phố Huế (Bảng 3.4). Các chủng phân lập thể hiện hoạt tính đối kháng ở những mức độ khác nhau, cho thấy sự đa dạng về đặc tính sinh học của VSV đất trồng lạc. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây, Hà và Hòa (2012) đã thực hiện phân lập thành công các chủng nấm đối kháng *Trichoderma* từ các mẫu đất trồng lạc tại Quảng Thọ (thành phố Huế) và Cam Lộ (tỉnh Quảng Trị). Trong nghiên cứu của Bình et al. (2024), chủng xạ khuẩn XKH6 được thu nhận từ đất vùng rễ cây nghệ tại Hưng Yên đã thể hiện hoạt tính đối kháng với nhiều tác nhân nấm gây bệnh trên thực vật, bao gồm *A. niger, C. gloeosporioides, F. oxysporum, P. digitatum và A. flavus*. Tương tự, Chang et al. (2025) ghi nhận đất cát tại các vùng canh tác lạc là môi trường có triển vọng trong việc phân lập và tuyển chọn những chủng *Bacillus* có khả năng hạn chế sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *A. niger.* Anith et al. (2021), cho rằng phương pháp nuôi cấy kép (*dual culture*) trên đĩa thạch là phương pháp sàng lọc *in vitro* dòng đầu tiên được sử dụng rộng rãi nhất để tuyển chọn sơ bộ các tác nhân đối kháng. Sử dụng phương pháp này để sàng lọc, xác định các chủng VSV có triển vọng thông qua sự cạnh tranh không gian hoặc tiết ra các hoạt chất ngoại bào. Hiệu suất đối kháng (%) thu được trong nghiên cứu này cũng tương đồng với công bố gần đây của Kampa et al. (2025) về khả năng ức chế nấm gây bệnh héo rũ mốc đen lạc của *Bacillus* và *Trichoderma* với hiệu suất ức chế *A. niger* (đạt trên 68%). Cơ chế tác động của VSV đối kháng được cho rằng rất đa dạng, có thể trực tiếp tấn công nấm bệnh hoặc ký sinh nấm (Köhl et al,. 2019). Du & Li (2024) cho rằng các chủng *Bacillus* (như *B. thuringiensis* TG5 hoặc *B. subtilis* R4D2) có khả năng cư trú tốt tại vùng rễ lạc và làm giảm sự xuất hiện của các mầm bệnh do nấm như *A. niger.*

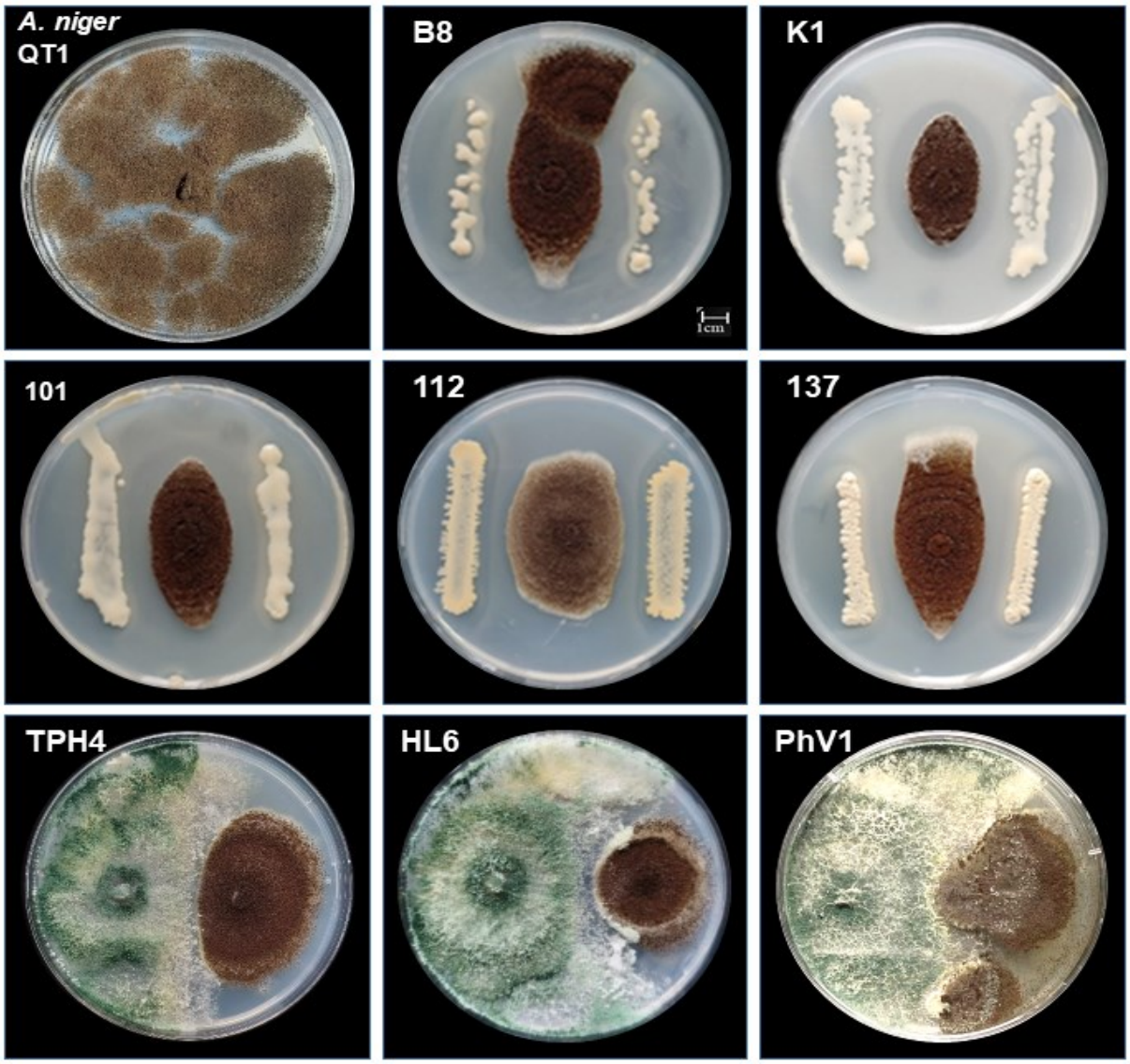
Từ kết quả sàng lọc sơ bộ, 16 chủng VSV có tiềm năng đối kháng được lựa chọn, gồm 10 chủng vi khuẩn (H1, K1, K2, B8, 45K, 46K, 101, 112, 118 và 137) và 6 chủng nấm (VL1, Đak3, HL6, PhĐ3, TPH4 và PhV1). Các chủng này tiếp tục được đánh giá *in vitro* với *A. niger* QT1 và H17 kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.

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}

Ghi chú: 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 (Mean) ± Độ lệch chuẩn (Standard deviation).

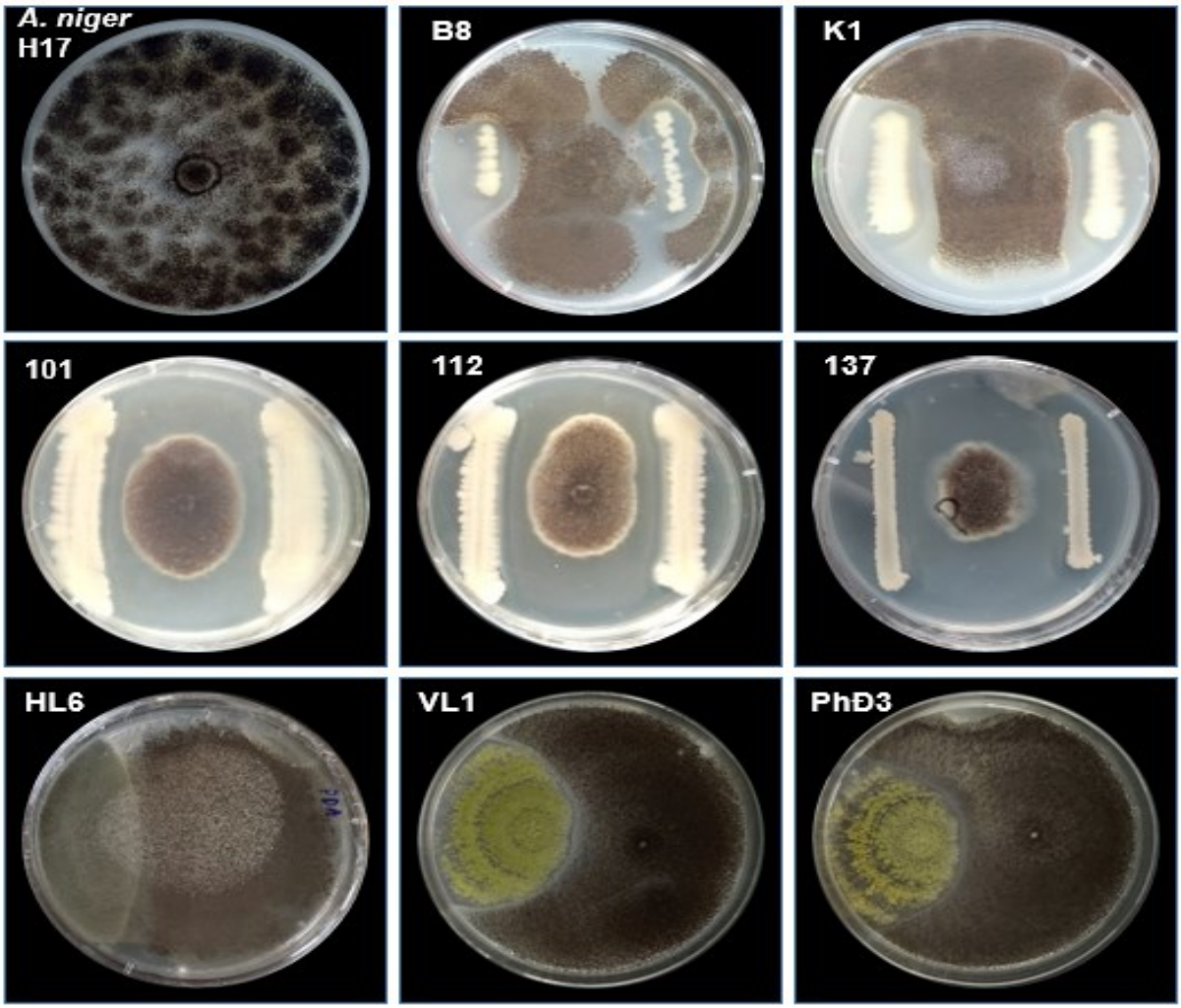
Kết quả đánh giá cho thấy toàn bộ 16 chủng VSV được lựa chọn đều thể hiện khả năng đối kháng với cả hai chủng nấm gây bệnh *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 sau 6 ngày nuôi cấy, với tỉ lệ ức chế dao động trong khoảng từ 23,28% đến 77,41%. Nhìn chung, phần lớn các chủng VSV có mức độ ức chế đối với chủng *A. niger* QT1 cao hơn so với chủng *A. niger* H17, thể hiện qua khoảng biến thiên tỉ lệ ức chế đạt từ 41,05% đến 77,41% đối với *A. niger* QT1, trong khi đối với *A. niger* H17 chỉ dao động từ 23,28% đến 57,63% (Hình 3.7 và 3.8).



Hình 3.7. *Khả năng đối kháng với A. niger QT1 của các chủng vi sinh vật trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy (B8, K1, 101, 112, 137 là các chủng vi khuẩn; TPH4, HL6, PhV1 là các chủng nấm)*

Kết quả khảo sát ghi nhận một số chủng có tỉ lệ ức chế trên 50% với *A. niger* QT1, tiêu biểu gồm HL6 (77,41%), K1 (61,60%), PhV (61,48 %), 101 (58,60 %), 137 (57,14%), B8 (55,38 %), 112 (52,10 %) và TPH4 (50,37 %). Ngược lại, chỉ có 03 chủng có tỉ lệ ức chế trên 50% đối với *A. niger* H17, bao gồm 137 (57,63 %), 101 (54,56 %) và 112 (52,28 %). Kết quả này cho thấy các chủng 101, 112 và 135 thể hiện khả năng đối kháng ổn định đối với cả hai chủng gây bệnh *A. niger* QT1 và *A. niger* H17.

Bên cạnh đó, một số chủng VSV thể hiện tỉ lệ ức chế dưới 50% đối với chủng *A. niger* H17 bao gồm VL1 (35,82 %), PhĐ3 (27,64 %), TPH4 (26,91 %) và PhV1 (23,28 %). Mức độ đối kháng với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 của các chủng VSV khác nhau, cho thấy tính đa dạng trong phổ và cường độ đối kháng, đồng thời cung cấp cơ sở thực nghiệm quan trọng cho việc lựa chọn các chủng VSV tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu.



Hình 3.8. *Khả năng đối kháng với A. niger H17 của các chủng vi sinh vật trên môi trường PDA sau 6 ngày nuôi cấy (B8, K1, 101, 112, 137 là các chủng vi khuẩn; HL6, VL1 và PhĐ3 là các chủng nấm)*

Các kết quả thu được về sự dao động và tính đa dạng của tỉ lệ ức chế đối với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 ở các chủng VSV khảo sát trong nghiên cứu này phù hợp và tương đồng với nhiều công bố trước đây về việc ứng dụng đối kháng sinh học nhằm kiểm soát nấm *A. niger* trong điều kiện *in vitro*. Cụ thể, tỉ lệ ức chế nấm QT1 và H17 có sự khác biệt rõ rệt giữa các chủng VSV, phản ánh mức độ đối kháng sinh học không đồng nhất và cho thấy sự khác nhau về phổ cũng như cường độ ức chế giữa các tác nhân vi sinh. Xu hướng biến động này đã được ghi nhận phổ biến trong các nghiên cứu trước, trong đó hiệu quả ức chế *A. niger* phụ thuộc đáng kể vào loài và chủng VSV được sử dụng dưới điều kiện *in vitro*. Nhiều công trình đã chỉ ra rằng các chủng *Trichoderma* bản địa thường thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh trong thí nghiệm nuôi cấy kép, điển hình như nghiên cứu trên cây mè (*Sesamum indicum*) cho thấy *Trichoderma viride* đạt tỉ lệ ức chế 78,20 % và *T. harzianum* đạt 73,07 %. Gawarkar et al. (2022) ghi nhận *B. subtilis* và *P. fluorescens* ức chế *A. niger* gây bệnh trên cây mè với tỉ lệ lần lượt là 41,66% và 28,20%, cung cấp thêm cơ sở tham khảo cho kết quả của nghiên cứu này.

Dựa trên kết quả ở Bảng 3.5, trong số 16 chủng VSV được đánh giá, có 11 chủng thể hiện khả năng đối kháng với cả hai chủng *A. niger* QT1 và H17, gồm 01 chủng nấm HL6 và 10 chủng vi khuẩn H1, K1, K2, B8, 45K, 46K, 101, 112, 118 và 137. Các chủng này được lựa chọn để tiếp tục đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào, làm cơ sở cho bước sàng lọc tiếp theo.

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

Hoạt động đối kháng giữa VSV với nấm bệnh đã được nhiều nghiên cứu ghi nhận là có mối liên hệ chặt chẽ với khả năng phá hủy cấu trúc thành tế bào nấm thông qua hoạt động của các enzyme ngoại bào. Trong đó, các enzyme đóng vai trò quan trọng tham gia vào quá trình thủy phân thành tế bào nấm bao gồm chitinase, cellulase, protease và β-glucanase. Những enzyme này có khả năng phân giải các thành phần cấu trúc chủ yếu của thành tế bào nấm như chitin, cellulose, glycoprotein và β-glucan, từ đó gây ra tổn thương cấu trúc, làm suy yếu hoặc hủy hoại tế bào nấm bệnh.

Cơ chế đối kháng dựa trên hoạt động enzyme ngoại bào không chỉ góp phần ức chế trực tiếp sự sinh trưởng và phát triển của nấm gây bệnh, mà còn được đánh giá là thân thiện với môi trường, hạn chế các tác động bất lợi đến hệ sinh thái và mang lại hiệu quả sinh thái tích cực trong phòng trừ bệnh hại cây trồng. Từ kết quả đối kháng, các chủng VSV được lựa chọn tiếp tục đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào để làm cơ sở cho bước sàng lọc tiếp theo. Thông qua việc xác định đường kính vùng thủy phân cơ chất đặc hiệu trên môi trường thạch đĩa. Kết quả đánh giá được trình bày tại Bảng 3.6 và Hình 3.9, làm cơ sở lựa chọn các chủng VSV cho bước sàng lọc tiếp theo.

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}

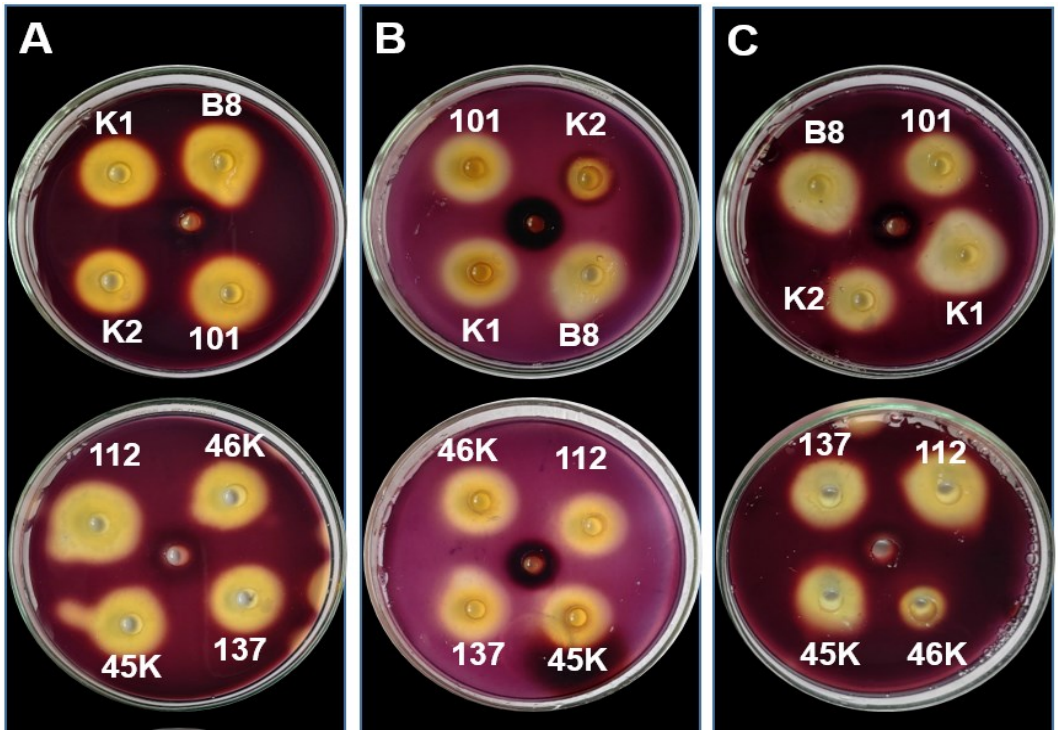
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD: Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn.

Kết quả trình bày tại Bảng 3.6 cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào của 11 chủng VSV đối kháng mạnh có sự khác biệt rõ rệt, thể hiện qua đường kính vùng thủy phân cơ chất đối với ba nhóm enzyme quan trọng là β-1,3-glucanase, chitinase và cellulase. Sự khác biệt này được khẳng định bằng phân tích thống kê Duncan, trong đó các giá trị mang chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đối với enzyme β-1,3-glucanase, các chủng vi khuẩn B8 (26,17 mm) và K1 (24,97 mm) cho đường kính vùng thủy phân lớn nhất, thuộc nhóm cao nhất (a–ab) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với phần lớn các chủng còn lại. Các chủng 101 (23,20 mm) và 112 (23,93 mm) cũng thể hiện hoạt tính enzyme cao, thuộc nhóm b, trong khi 137 (21,03 mm) cho giá trị ở mức trung bình nhưng vẫn cao hơn nhóm thấp. Ngược lại, HL6 (18,30 mm) và H1 (18,50 mm) thuộc nhóm thấp nhất, cho thấy hoạt tính β-1,3-glucanase yếu hơn so với các chủng vi khuẩn ưu thế.

Về chitinase, hai chủng vi khuẩn B8 (26,10 mm) và K1 (25,83 mm) tiếp tục thể hiện hoạt tính cao nhất, thuộc nhóm a, cho thấy khả năng phân giải chitin vượt trội. Các chủng 101 (22,53 mm), 112 (22,87 mm) và 137 (20,47 mm) nằm trong nhóm trung bình (bc–c), song vẫn cao hơn các chủng có hoạt tính thấp như HL6 (18,45 mm) và 118 (18,17 mm). Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn được lựa chọn không chỉ mạnh về một enzyme đơn lẻ mà còn thể hiện khả năng sinh chitinase tương đối đồng đều và ổn định.

Đối với cellulase, các chủng B8 (25,77 mm) và K1 (25,47 mm) tiếp tục thuộc nhóm cao nhất (a), trong khi 101 (21,23 mm), 112 (21,90 mm) và 137 (20,67 mm) thuộc nhóm trung bình (bc–c). Mặc dù không đạt giá trị cực đại như B8 và K1, các chủng này vẫn thể hiện hoạt tính cellulase đáng kể, cao hơn rõ rệt so với các chủng có hoạt tính thấp như HL6 (17,68 mm) và H1 (17,70 mm).



***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*

Sự có mặt của cellulase trong các chủng vi sinh vật đối kháng có gây tổn hại đến mô thực vật tại các vết thương hay không cũng được xem xét cẩn thận trong nghiên cứu. Nhiều nghiên cứu công bố đã chỉ ra cellulase từ các chủng *Bacillus* nghiên cứu đóng vai trò là tác nhân kích kháng lành tính (ISR/DTI) chứ không gây hoại tử mô như nấm bệnh. Sự phân hủy cellulose cục bộ, có kiểm soát tại vết thương giải phóng các mảnh oligosaccharide ngắn (DAMPs) (Bacete et al., 2018). Thực vật nhận diện tín hiệu này sẽ kích hoạt dòng ion Ca^{2+} nội bào, sản sinh ROS, tăng hoạt tính enzyme phòng vệ POD (Peroxidase), PAL (Phenylalanine ammonia-lyase), PPO (Polyphenol oxidase) và cảm ứng con đường Acid Jasmonic/Ethylene. Quá trình này thúc đẩy phân chia tế bào tầng bần, lắng đọng lignin và callose để tạo mô sẹo đóng kín vết thương, tăng cường độ bền cơ học bảo vệ cây (Bacete et al., 2018; Pontiggia et al., 2020; F. Yang et al., 2023). Bên cạnh đó, vi khuẩn vùng rễ (PGPR) sở hữu hệ thống điều hòa nghiêm ngặt gen sinh cellulase ngoại bào (như endoglucanase họ GH5) (Beauregard et al., 2013; Saberi Riseh et al., 2024; Yang et al., 2024). Khác với nấm bệnh tấn công ồ ạt, vi khuẩn vùng rễ (PGPR) điều tiết nghiêm ngặt các gen sinh enzyme ngoại bào trong quá trình tương tác trực tiếp với vật chủ để hỗ trợ quá trình bám dính (Saberi Riseh et al., 2024; F. Yang et al., 2024). Sự nới lỏng nhẹ vách tế bào thực chất là "chìa khóa" giúp vi khuẩn nội sinh hòa bình, tạo hàng rào sinh học bảo vệ rễ trước nấm hoại sinh mà không suy giảm sức sống của cây (Bacete et al., 2018). Ngoài ra, bằng chứng thực nghiệm và dữ liệu bộ gen của *B. velezensis* cho thấy sự hiện diện của các cụm gen mã hóa cho enzyme ngoại bào (chitinase, cellulase, β-1,3-1,4-glucanase) và tính an toàn sinh học (F. Yang et al., 2023; Hu et al., 2023; Figueiredo et al., 2025). Bộ gen của các chủng *B. velezensis* chứa tổ hợp gen mã hóa enzyme lytic đi kèm cụm gen hình thành biofilm, định cư rễ (*sacB*, *spo0A*, *epsA-O*) (Hu et al., 2023; Jin et al., 2025). Ở Việt Nam, Huy et al., (2017) cũng phát hiện sự hiện diện của hoạt tính cellulase ở các chủng *Trichoderma* bản địa tiết enzyme phân hủy vách tế bào nấm bệnh cũng góp phần cũng cố thêm kết quả của luận án. Tuy vậy, các nghiên cứu tiếp theo của luận án tiếp tục thiết kế các thử nghiệm độc tính thực tế của các chủng VSV đối kháng được lựa chọn đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc và sự phát triển của cây con để đánh giá tính an toàn của các chủng VSV đối kháng đối với cây lạc.

Kết quả ở Bảng 3.6 cho thấy khả năng sinh enzyme ngoại bào khác nhau giữa 11 chủng VSV khảo sát. Nhìn chung, các chủng có hoạt tính enzyme cao cũng thể hiện khả năng đối kháng tốt với nấm bệnh, cho thấy hoạt tính enzyme ngoại bào có thể liên quan đến khả năng đối kháng của các chủng VSV.Trong đó, hai chủng vi khuẩn B8 và K1 nổi bật với hoạt tính enzyme cao nhất trên cả ba nhóm enzyme, trong khi các chủng 101, 112 và 137 thể hiện hoạt tính ổn định ở mức trung bình–cao, không chỉ tập trung vào một enzyme đơn lẻ.

Trên cơ sở đánh giá tổng hợp hoạt tính của cả ba nhóm enzyme, năm chủng vi khuẩn B8, K1, 101, 112 và 137 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo do đáp ứng đồng thời các tiêu chí: (i) Hoạt tính enzyme ngoại bào cao hoặc trung bình–cao đối với cả ba enzyme trong tập hợp các chủng được khảo sát; (ii) Sự ổn định tương đối giữa các

chỉ tiêu đánh giá, không chỉ nổi trội ở một enzyme đơn lẻ; (iii) Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với nhóm có hoạt tính thấp, qua đó thể hiện tiềm năng đối kháng sinh học rõ rệt. Riêng chủng nấm HL6, mặc dù có đường kính vùng thủy phân nhỏ hơn so với các chủng vi khuẩn, song đây là chủng nấm đối kháng mạnh đã được tuyển chọn ở bước sàng lọc trước, đồng thời đại diện cho nhóm VSV đối kháng khác về mặt phân loại. Việc giữ lại chủng HL6 nhằm bổ sung tính đa dạng sinh học trong nhóm chủng nghiên cứu, qua đó tạo cơ sở cho việc so sánh và đánh giá vai trò tương đối của vi khuẩn và nấm trong cơ chế đối kháng sinh học thông qua hoạt động enzyme ngoại bào.

Bên cạnh đó, dữ liệu nghiên cứu thực nghiệm thu được của chúng tôi cho thấy các chủng VSV có khả năng đối kháng với *A. niger* có biểu hiện hoạt tính của các enzyme ngoại bào β-glucanase, chitinase và cellulase. Đây là những enzyme có vai trò quan trọng trong phá vỡ thành tế bào nấm bệnh. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với nhiều công bố trước đây về cơ chế đối kháng sinh học kiểm soát nấm bệnh của các VSV (Saberi Riseh et al., 2024). Chẳng hạn như chitinase của chủng *B. licheniformis* MY75 có được chứng minh có vai trò quan trọng trong ức chế sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử hai loại nấm bệnh *Gibberella saubinetii* và *A. niger* (Xiao et al., 2009). Chủng *Streptomyces* BITDG-11 có hoạt tính cao của chitinase, β-1,3-glucanase và lipase có liên hệ với khả năng đối kháng *F. oxysporum* gây bệnh héo rũ chuối (Zhang et al., 2021). Chủng *B. velezensis* CE 100 có khả năng sinh chitinase, protease và β-l,3-glucanase ức chế sự phát triển và nảy mầm bào tử của *C. gloeosporioides* và kiểm soát bệnh thán thư quả óc chó (Choub et al., 2021). Phân tích hệ gen, tin sinh học và khối phổ đã xác định β-glucanase của *B. subtilis* CW14 có khả năng ức chế *A. ochraceus* (Zhao et al., 2022). Cơ chế cho sự đối kháng sinh học này gồm sinh ra các hợp chất có hoạt tính sinh học, tăng cường miễn dịch cho cây trồng hoặc sự thiết lập lối sống cộng sinh (Ali et al., 2024). Các nghiên cứu gần đây cũng cho rằng, trong điều kiện *in vitro, F. oxysporum* bị một số chủng *Bacillus* bản địa như *B. subtilis* BK7.1, *B. mojavensis* EG6.4 và *B. velezensis* LSD4.2 ức chế sự phát triển thông qua cơ chế tiết hợp chất kháng nấm và khả năng cạnh tranh sinh học (Nurhariyati et al., 2025). Những kết quả này củng cố vai trò của các VSV sinh enzyme ngoại bào trong kiểm soát sinh học nấm gây bệnh thực vật.

Kết quả đánh giá cho thấy các chủng VSV có mức độ đối kháng khác nhau đối với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17. Trên cơ sở kết quả đối kháng và khả năng sinh enzyme ngoại bào, năm chủng vi khuẩn (B8, K1, 101, 112, 137) và một chủng nấm (HL6) đã được lựa chọn. Các chủng này được tiếp tục nghiên cứu nhằm đánh giá tiềm năng kiểm soát sinh học nấm bệnh

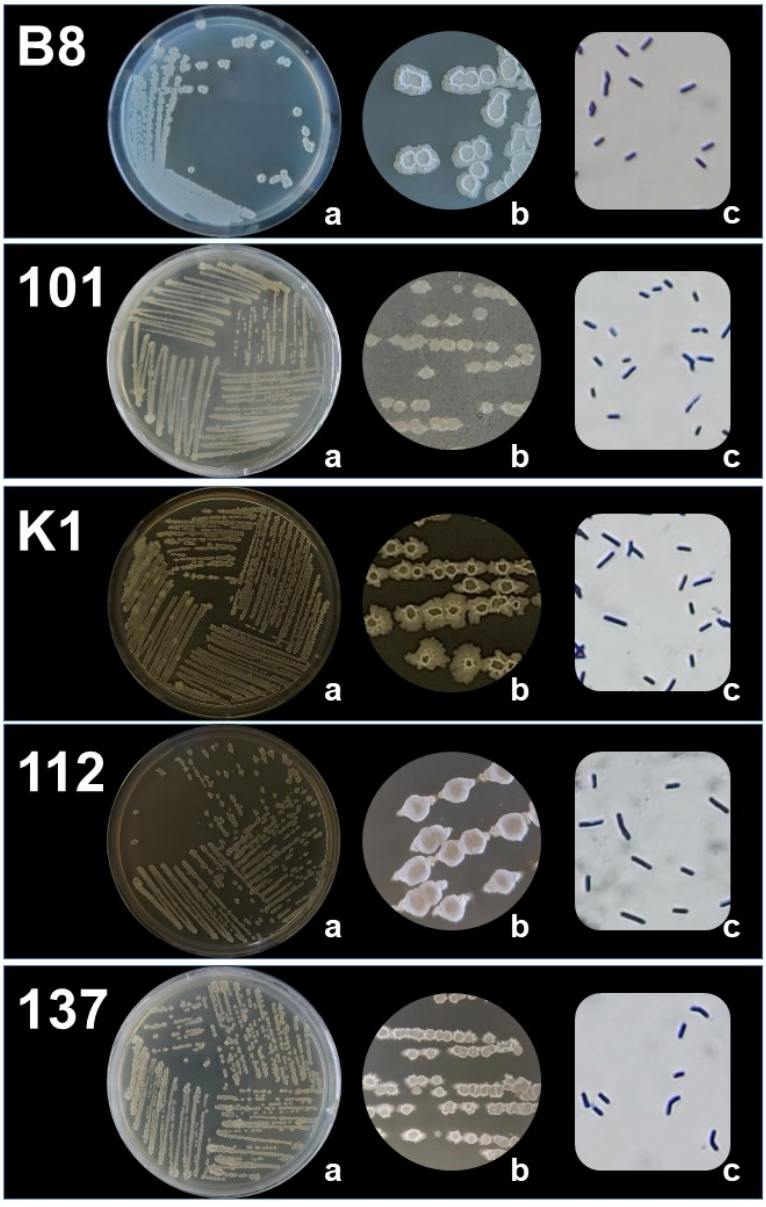
3.2.3. Định danh các chủng vi sinh vật sau sàng lọc đối kháng và hoạt tính enzyme ngoại bào

3.2.3.1. Định danh các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn B8, K1, 101, 112 và 137 được định danh thông qua các đặc điểm hình thái, đặc tính hóa sinh và kết hợp với phân tích trình tự nucleotide gen 16S-DNA, kết quả thu được như sau:

Đặc điểm hình thái của 5 chủng vi khuẩn đối kháng

Trên môi trường LBA, quan sát cho thấy có sự đa dạng về đặc điểm hình thái giữa các chủng vi khuẩn. Màu sắc (trắng đục, trắng kem, màu vàng nhạt, vàng sẫm), hình dạng (hình tròn, hình tròn không đều, kéo dài, xòe rìa, bất đối xứng), bề mặt (nhăn nheo, lồi nhẹ, nhẵn, mịn, hơi dẹt) và rìa khuẩn lạc (gợn sóng, răng cưa, trơn, nhẵn). Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy tế bào của 5 chủng vi khuẩn đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que, ngắn, đứng đơn lẻ hoặc cặp đôi (Hình 3.10).



Hình 3.10. *Hình thái khuẩn lạc trên môi trường LBA (a, b) và tế bào nhuộm Gram (c) các chủng vi khuẩn đối kháng B8, K1, 101, 112, 137 quan sát dưới kính hiển vi quang học (X 100).*

Những đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn B8, K1, 101, 112 và 137 bước đầu này đã sơ bộ nhận định rằng cả 5 chủng vi khuẩn đều thuộc chi *Bacillus*. Để kiểm chứng thêm cho nhận định trên, chúng tôi đã kiểm tra đặc tính hóa sinh, kết quả được trình bày sau đây.

Đặc tính hoá sinh của 5 chủng vi khuẩn đối kháng

- Các chủng B8, 101 và 112 có khả năng đồng hoá/lên men 23 trong số 49 loại carbohydrate, bao gồm: glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl α-D-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-sucrose, D-raffinose, tinh bột, glycogen và gentiobiose. Trong khi đó, chủng K1 và chủng 137 có khả năng lên men 23 loại carbohydrate, bao gồm: glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-Galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl α-D-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-sucrose, D-Trehalose, D-raffinose và glycogen (Bảng 3.7).

Bảng 3.7. *Đặc tính hóa sinh của 5 chủng vi khuẩn đối kháng được phân lập sử dụng bộ kit API 50 CHB*

STT	Thử nghiệm hoá sinh	Chủng B8	Chủng 101	Chủng K1	Chủng 112	Chủng 137
0	Control	-	-	-	-	-
1	Glycerol	+	+	+	+	+
2	Erythritol	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+
5	D-Ribose	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	+	+	+	+	+
7	L-Xylose	-	-	-	-	-
8	D-Adonitol	-	-	-	-	-
9	Methyl-ß-D-xylopyranoside	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	-	-	+	-	+
11	D-Glucose	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-
17	Inositol	+	+	+	+	+
18	D-Mannitol	+	+	+	+	+
19	D-Sorbitol	+	+	+	+	+
20	Methyl a-D-mannopyranoside	-	-	-	-	-
21	Methyl a-D-glucopyranoside	+	+	+	+	+
22	N-Acetylglucosamine	-	-	-	-	-

STT	Thử nghiệm hoá sinh	Chủng B8	Chủng 101	Chủng K1	Chủng 112	Chủng 137
23	Amygdalin	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+
25	Esculin	+	+	+	+	+
26	Salicin	+	+	+	+	+
27	D-Cellobiose	+	+	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+	+
29	D-Lactose	+	+	+	+	+
30	D-Melibiose	-	-	-	-	-
31	D-Sucrose	+	+	+	+	+
32	D-Trehalose	-	-	+	-	+
33	Inulin	-	-	-	-	-
34	D-Melezitose	-	-	-	-	-
35	D-Raffinose	+	+	+	+	+
36	Tinh bột	+	+	ND	+	ND
37	Glycogen	+	+	+	+	+
38	Xylitol	-	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	-	+	-
40	D-Turanose	-	-	-	-	-
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-
47	Kali gluconate	-	-	-	-	-
48	Kali 2-ketogluconate	-	-	-	-	-
49	Kali 5-ketogluconate	-	-	-	-	-

Chú thích: (+) dương tính; (−) âm tính; ND: không xác định.

Tổng hợp kết quả đặc tính sinh hóa thu được qua bộ kit API 50 CHB, cả 05 chủng vi khuẩn phân lập phù hợp với đặc điểm thuộc chi *Bacillus* sp. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây về ứng dụng hệ thống API 50 CHB trong nhận diện và đặc trưng hóa sinh hóa các chủng *Bacillus* (Logan & Berkeley, 1984). Tuy nhiên, việc định danh *Bacillus* sp. chỉ dựa trên đặc điểm sinh hoá là chưa đủ để đảm bảo độ chính xác cao và cần thiết phải bổ sung các phương pháp định danh phân tử.

Định danh phân tử 5 chủng vi khuẩn đối kháng

Kết quả phân tích trình tự vùng 16S rRNA của 5 chủng vi khuẩn tuyển chọn được khuếch đại bằng cặp mồi 27F/1492R được thể hiện ở Bảng 3.8 và Hình 3.11. Bên cạnh

đó, phân tích phát sinh loài dựa trên trình tự vùng gen này cũng được thể hiện ở Hình 3.11. Kết quả chỉ số tương đồng vùng 16S-rRNA phân lập so sánh với các chủng tham chiếu được thể hiện ở Bảng 3.8, cây phát sinh loài xây dựng dựa trên các trình tự này được trình bày ở Hình 3.11.

Phân tích BLASTn chỉ ra rằng, cả 5 chủng vi khuẩn đều ghi nhận mức độ tương đồng cao với các loài thuộc chi *Bacillus* bao gồm *B. velezensis*, *B.siamensis và B. amyloliquefaciens*. Trong đó, các chủng phân lập B8, 101 và 112 có mức độ tương đồng 100% với "chủng TYPE" *B. siamensis* KCTC 13613 (KY643639). Kết quả này cũng tương đồng với báo cáo về chủng *B. siamensis* YB-1631 phân lập từ rễ cây lúa mì (tỉ lệ tương đồng là 99,9% với KCTC 13613) (Q. Dong et al., 2023). Trong khi, hai mẫu phân lập137 và K1 có mức độ tương đồng 99,93% với *B. velezensis* FZB42 (mã số truy cập NR_075005) (Chen et al., 2007; Yao et al., 2025) và các "chủng TYPE" như *B. velezensis* BCRC17467 (EF433407), *B. velezensis* NRRLB-41580T (KY694464) (Nga et al., 2024). Các kết quả này cho thấy, 5 chủng phân lập có mức độ tương đồng cao với các loài đã được mô tả thuộc chi *Bacillus*.

Bảng 3.8. *Chỉ số tương đồng vùng 16S rRNA giữa các chủng lựa chọn và chủng tham chiếu*

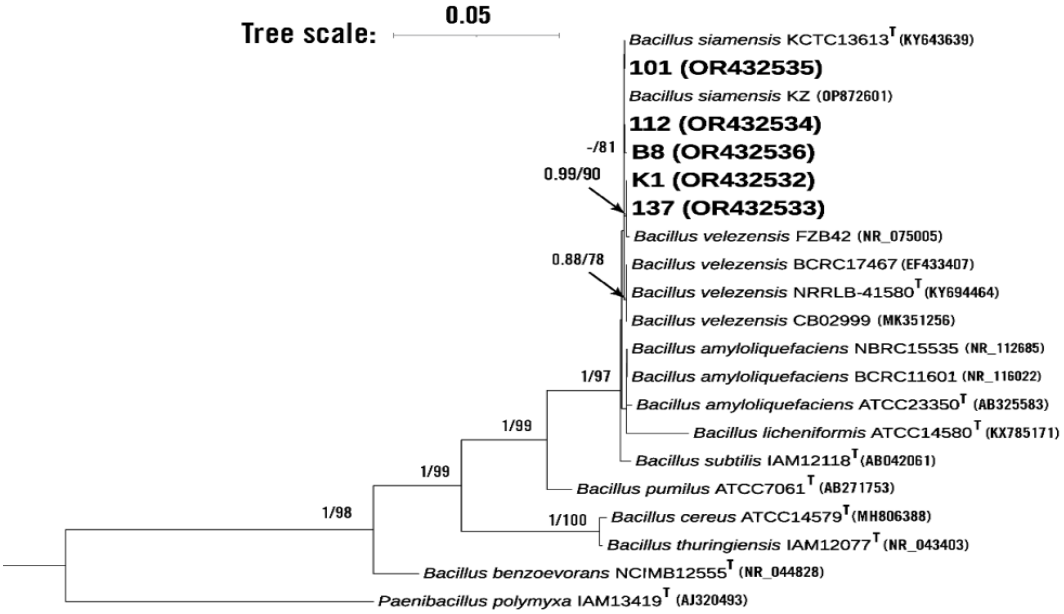
Ký hiệu chủng phân lập	Kích thước vùng 16S ghi nhận (Nu)	Tỉ lệ tương đồng (%)	Chủng tham chiếu	Số hiệu đăng ký dữ liệu NCBI của các chủng phân lập
B8	1394	100	*B. siamensis* KCTC 13613 (KY463639)	OR432536
K1	1393	99,93	*B. velezensis* FZB42 (NR_075005)	OR432532
101	1394	100	*B. siamensis* KCTC 13613 (KY463639)	OR432535
112	1394	100	*B. siamensis* KCTC 13613 (KY463639)	OR432534
137	1393	99,93	*B. velezensis* FZB42 (NR_075005)	OR432533

Cây phát sinh loài được trình bày ở Hình 3.11 cho thấy ba chủng vi khuẩn B8, 101 và 112 nằm chung nhánh với "chủng TYPE" *B. siamensis* KCTC 13613, giá trị bootstrap cao (>90%), cho thấy mức độ tương đồng rất cao giữa chúng. Trong khi đó, chủng vi khuẩn K1 và 137 cùng cấu trúc trong một nhánh độc lập có sự xuất hiện của *B. velezensis* FZB42, "chủng TYPE" *B. velezensis* NRRLB-41580 và các chủng *B. velezensis* BCRC17467, *B. velezensis* CB02999 với giá trị bootstrap cao, củng cố kết quả so sánh trình tự bằng BLAST (Nga et al., 2024).

Kết quả phân tích đặc điểm kiểu hình (như nhuộm Gram dương, tế bào hình que, sinh nội bào tử và hình thái khuẩn lạc đặc trưng) kết hợp với so sánh BLAST và cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA cho phép xác định 05 chủng vi khuẩn phân lập B8, K1, 101, 112 và 137 thuộc về chi *Bacillus* và có quan hệ tiến hóa cực kỳ gần gũi với các loài *Bacillus siamensis* và *Bacillus velezensis*. Các trình tự 16S rRNA của 5 chủng phân lập đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu NCBI với các số hiệu

tương ứng là OR432536, OR432532, OR432535, OR432534, OR432533. Trong nghiên cứu này, các đặc điểm kiểu hình đặc trưng kết hợp với độ tương đồng trình tự 16S rRNA đạt mức tối đa (99,9% - 100%) so với các chủng chuẩn đã cung cấp các bằng chứng phân loại học quan trọng (Ali et al., 2020; Gorai et al., 2021; Vasaıt et al., 2023; Yao et al., 2025). Do đó, 05 chủng được định danh là *B. siamensis* B8, 101, 112 và *B. velezensis* K1, 137, sau đó được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tuy nhiên, trong phân loại học VSV hiện đại, phức hợp loài *Bacillus subtilis*, đặc biệt là nhóm 'operational group *Bacillus amyloliquefaciens*' gồm các loài *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* và *B. velezensis* là một trong những nhóm có vị trí phân loại học rất phức tạp (Fan et al., 2017; Borriss et al., 2026). Do tính chất bảo thủ rất cao của gen bảo thủ 16S rRNA trong nhóm này (thường đạt độ tương đồng trình tự trên 99% giữa các loài), việc chỉ sử dụng chỉ thị đơn gen 16S rRNA kết hợp hình thái sinh hóa truyền thống đôi khi gặp thách thức trong việc phân định ranh giới loài một cách tuyệt đối (Fan et al., 2017; Chun et al., 2019; Zhao et al., 2025). Do đó, việc tiếp tục làm sáng tỏ các đặc điểm tiến hóa chi tiết để khai thác sâu các cụm gen thứ cấp của các chủng bản địa này, các phân tích đa gen (MLSA) hướng đến gen *gyrA* (Yao et al., 2025) gen *gyrB* và *rpoB* (Borriss et al., 2026; Q. Dong et al., 2023; Zhao et al., 2025) hoặc giải trình tự toàn hệ gen để tính toán chỉ số ANI và dDDH (Dunlap et al., 2016; Fan et al., 2017; Chun et al., 2019; Zhao et al., 2025) sẽ là những bước hoàn thiện quan trọng được triển khai trong các nghiên cứu tiếp theo sau luận án.



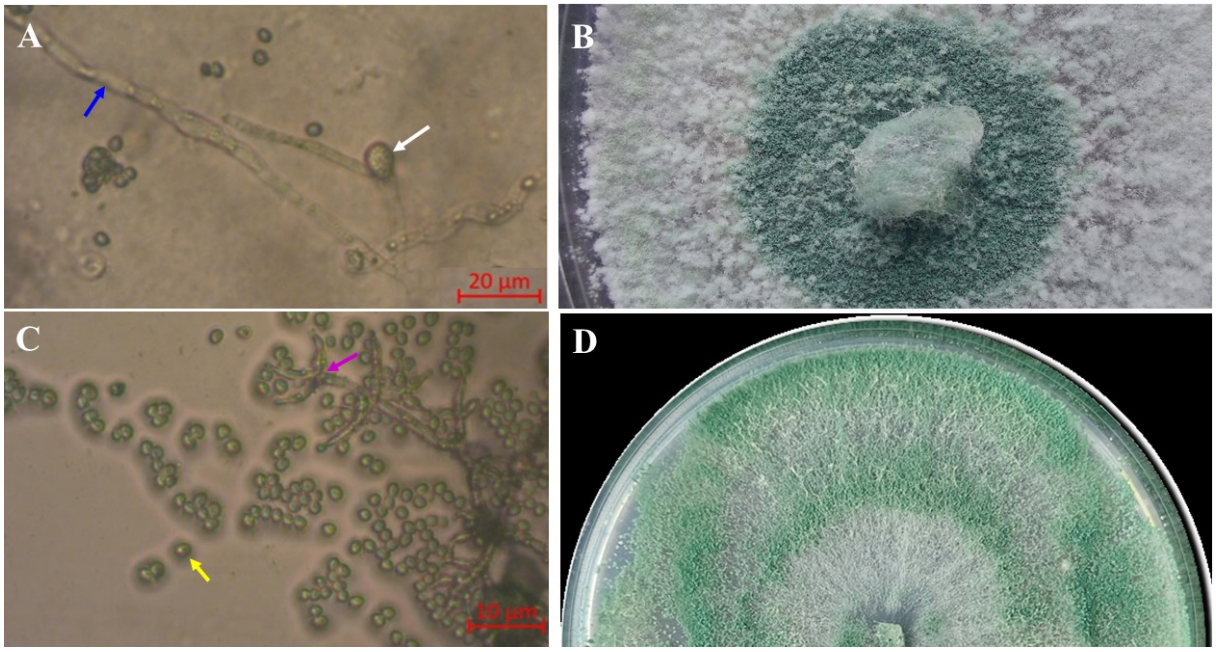
Hình 3.11. *Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của gen 16S rRNA của các chủng phân lập B8, K1, 101, 112, 137 và các chủng tham chiếu, Paenibacillus polymyxa được sử dụng làm nhóm ngoài*

Nhiều loài *Bacillus*, đặc biệt *B. siamensis* và *B. velezensis*, kiểm soát sinh học hiệu quả nhiều nấm gây bệnh như *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. và *Colletotrichum* spp. (Cao et al., 2018; Putri et al., 2020; L. Zhou et al., 2022; J. Zhou et al. (2022); Yao et al., 2025). Các chủng *Bacillus* đối kháng có khả năng tiết ra hệ enzyme phân giải thành tế bào nấm gồm β-1,3-glucanase (M. Zhang et al, 2024; Y. Zhang et al, 2024), chitinase, cellulase, lipase (Ali et al., 2020; Gorai et al., 2021; Aphaiso et al., 2024; Zhao

et al., 2025). Các enzyme này phá hủy thành tế bào nấm bằng cách thủy phân các polymer phức tạp như β-1,3-glucan, chitin và cellulose, dẫn tới làm suy yếu tính toàn vẹn của thành tế bào, rò rỉ nguyên sinh chất, gây biến dạng sợi nấm, ức chế sự nảy mầm của bào tử ; ức chế sự sinh trưởng của sợi nấm, cuối cùng dẫn đến nấm bị chết (Ali et al., 2020; Chen et al., 2021; Gorai et al., 2021; Yin et al., 2022 ; Q. Dong et al., 2023). Nghiên cứu đã báo cáo chủng *B. siamensis* QN2MO-1 (có 8 gen β-1,3-glucanase, 4 gen chitinase) ức chế sự phát triển của nấm bệnh héo rũ cà chua do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici (Fol)* gây ra (M. Zhang et al., 2024). Bên cạnh cơ chế phân hủy thành tế bào, *B. siamensis* và *B. velezensis* còn có thể sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp như lipopeptide; terpene, fengycin và surfactin, iturin (Putri et al., 2020; Gorai et al., 2021; Moreira et al., 2025), amylocyclicin, bacilysin, difficidin, macrolactin, plantazolicin có khả năng kháng nấm bệnh (Chun et al., 2019; Putri et al., 2020; Borriss et al., 2026). Đồng thời, các chủng *B. siamensis* và *B. velezensis* còn có khả năng kích hoạt khả năng cảm ứng kháng bệnh toàn thân (induced systemic resistance, ISR) của cây ký chủ thông qua con đường axit jasmonic và axit salicylic (Putri et al., 2020; Dutilloy et al., 2024; Yao et al., 2025; Borriss et al., 2026). Nhiều chủng *Bacillus* còn có cơ chế bổ trợ như hình thành màng sinh học (Choi et al., 2021), cạnh tranh dinh dưỡng (Zhao et al., 2025), sản xuất siderophore (Gorai et al., 2021), không gian sống (Yao et al., 2025) giúp chúng chiếm ưu thế tại vùng rễ và hạn chế sự phát triển của mầm bệnh. Các nghiên cứu cũng chỉ ra, *Bacillus* được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như đất, vùng rễ cây (Vasait et al., 2023), nội sinh trong mô thực vật (Gorai et al., 2021; Moreira et al., 2025) cho thấy khả năng phân bố đa dạng. Nhiều chủng *Bacillus* có khả năng sản sinh IAA (Gorai et al., 2021; Yin et al., 2022), thúc đẩy tăng trưởng thực vật (Moreira et al., 2025; Yao et al., 2025). Kết hợp các cơ chế đối kháng và khả năng thích nghi đa dạng giúp *Bacillus* trở thành tác nhân sinh học triển vọng trong phòng trừ bệnh hại nấm (L. Zhou et al., 2022; J. Zhou et al., 2022; Dutilloy et al., 2024; Moreira et al., 2025; Borriss et al., 2026).

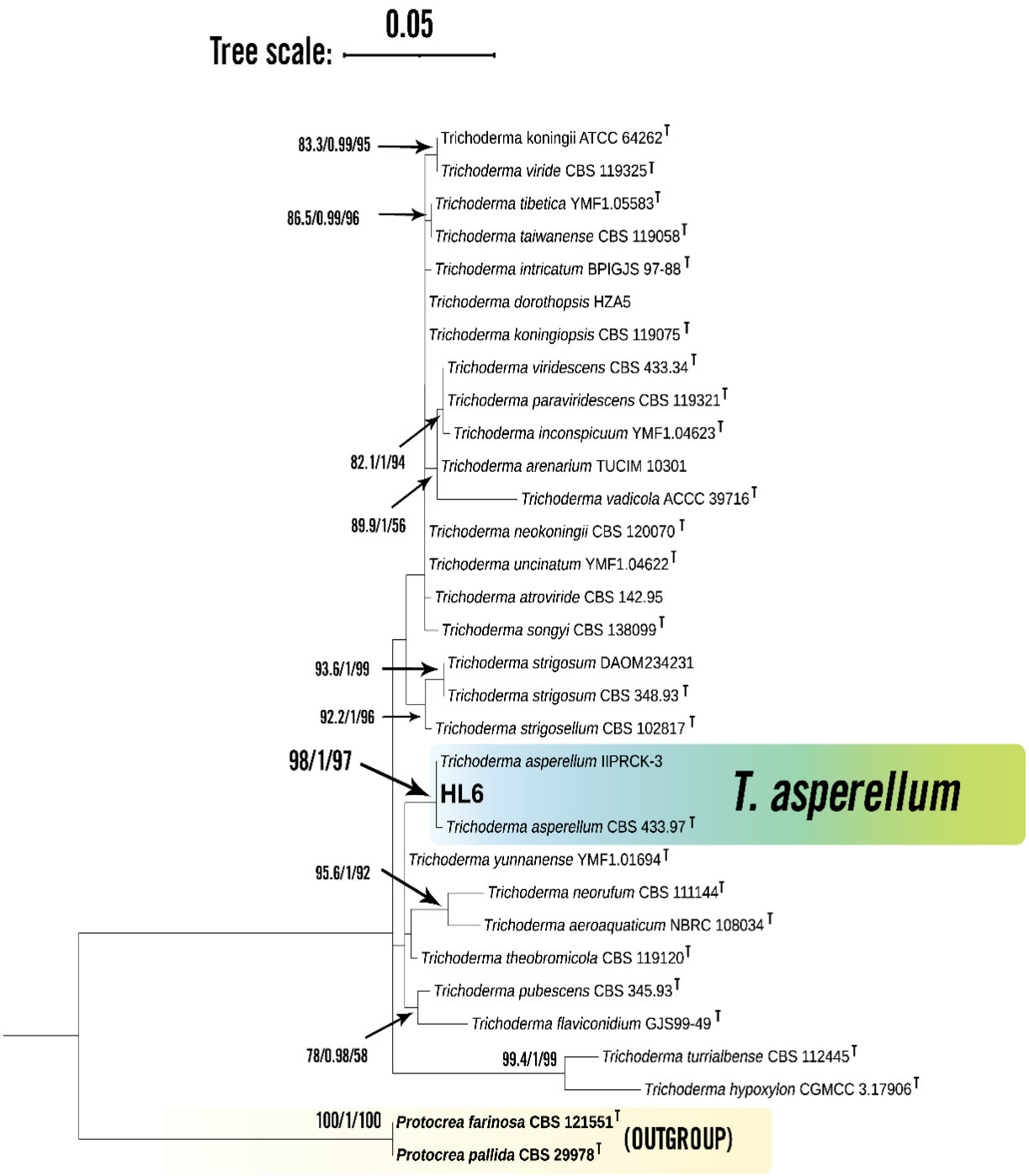
3.2.3.2. Định danh chủng nấm

Chủng nấm HL6 nuôi cấy trên môi trường PDA cho thấy sợi nấm có màu trắng, khuẩn lạc hơi xốp, sinh trưởng nhanh, sau 6 ngày đạt tới 90 mm và hình thành nhiều bào tử. Bào tử thường trong suốt đến xanh lục nhạt, hình cầu, bề mặt nhẵn, thể bình dạng hình trụ (Hình 3.12). Hình thái chủng nấm HL6 có nhiều đặc điểm tương đồng với các loài thuộc chi *Trichoderma* đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu. Chẳng hạn như các chủng *T. asperellum* được báo cáo có khuẩn lạc màu xanh đậm trên môi trường PDA, bào tử hình cầu đến gần hình cầu, kích thước 2,5–3 µm (Raja et al., 2023), có khuẩn lạc phát triển nhanh, dày và xốp, thể bình mọc đối xứng và thành chùm 2-3 thể bình (Huy et al., 2017). Trong khi đó các chủng *T. harzianum* có khuẩn lạc màu xanh trắng đến xanh nhạt trên PDA. Bào tử hình cầu đến gần hình cầu hoặc hình trứng thuôn ngắn, kích thước 1,5–2 µm (Raja et al., 2023).



Hình 3.12. *Đặc điểm hình thái chủng nấm HL6 trên môi trường PDA: (A) sợi nấm và (C) bào tử quan sát dưới kính hiển vi Olympus BX51 (độ phóng đại 40X); (B và D) khuẩn lạc*

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy xuất hiện băng ở vị trí khoảng 600 bp so với thang chuẩn. Kết quả so sánh bằng công cụ BLASTn trên GenBank, cho thấy trình tự vùng ITS của chủng phân lập HL6 ghi nhận mức độ tương đồng 100% với trình tự của chủng tham chiếu của *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 (chủng TYPE). Kết quả phân tích phát sinh loài thông qua sử dụng mô hình JC lựa chọn theo Bayesian information criterion (BIC) cũng cho thấy chủng phân lập HL6 được cấu trúc trong cụm đơn ngành với cùng các chủng tham chiếu như *T. asperellum* CBS 433.97 và *T. asperellum* PRCK-3 với các tham số hỗ trợ cao (Hình 3.13). Dựa trên tổ hợp đặc trưng hình thái vi thể điển hình của loài và trình tự vùng ITS đạt độ tương đồng tuyệt đối trên cơ sở dữ liệu quốc tế, chủng nấm đối kháng HL6 bước đầu được định danh là *Trichoderma asperellum*. Tuy nhiên, do vùng ITS có mức độ bảo tồn di truyền rất cao, các loài cận duyên đồng hình như *T. asperellum*, *T. asperelloides* và *T. yunnanense* có thể có vùng ITS tương đồng (Cai & Druzhinina, 2021). Khắc phục giới hạn phân giải của chỉ thị đơn lẻ này, hướng nghiên cứu tiếp theo sau luận án có thể bổ sung giải trình tự hai gen mã hóa protein có độ đa hình cao là *tef1* và *rpb2* để tiến hành phân tích phả hệ đa locus (multilocus phylogeny) (Dou et al., 2020; Cai & Druzhinina, 2021). Đồng thời, khảo sát bổ sung các đặc điểm sinh lý. sinh thái đặc trưng để hoàn thiện hồ sơ nhận diện chủng HL6 theo hướng phân loại đa pha (polyphasic taxonomy), để bảo đảm tính chính xác khoa học cao về mặt phân loại (Cai & Druzhinina, 2021).



Hình 3.13. *Cây phát sinh chủng loài dựa trên trình tự ITS của chủng nấm HL6. Tại mỗi nút, các giá trị biểu thị các giá trị tham số hỗ trợ theo thứ tự lần lượt là SH-aLRT/ xác suất hậu nghiệm Bayesian (BPP)/ultrabootstrap (UFB) ML. Các chủng TYPE tham chiếu đại diện được ký hiệu bằng "T". Thanh tỉ lệ biểu thị tỉ lệ thay thế nucleotide trên mỗi vị trí. Hai chủng Protocrea farinosa CBS 121551 và Protocrea pallida CBS 29978 được sử dụng làm nhóm ngoài.*

Kết quả nhận diện sơ bộ chủng HL6 tương đồng với các đặc trưng phân loại học của loài *Trichoderma asperellum* đã được ghi nhận trong các công trình nghiên cứu trước đó. Ở miền Trung Việt Nam, sự hiện diện phổ biến của loài nấm đối kháng *T. asperellum* thu nhận từ các mẫu đất trồng lạc đã được báo cáo trong các

báo cáo trước đây. Theo kết quả khảo sát của Hà & Hòa (2012) tại Huế và Quảng Trị đã phân lập thành công 40 chủng *Trichoderma* bản địa từ 8 mẫu đất nông nghiệp trồng lạc, tiêu và ớt, trong đó xác định được nhiều chủng có hoạt lực đối kháng mạnh mẽ và kìm hãm khả năng phát sinh hạch nấm của tác nhân gây bệnh hại rễ *S. rolfsii* H001 phân lập từ đất trồng lạc địa phương. Chủng đối kháng đặc hiệu *T. asperellum* PQ34 cũng được phát hiện từ lớp đất mặt trồng ớt tại Huế (Loc et al., 2020). Huy at el., (2017) đã phân lập được nhiều chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* từ đất nông nghiệp tại các tỉnh miền Bắc của Việt Nam. Dựa trên đặc điểm hình thái và tự vùng ITS rDNA**,** nhiều chủng nấm được xác nhận là *T. asperellum và T. harzianum.* Trong số đó, *T. asperellum* được xác nhận là xuất hiện khá phổ biến và thể hiện hiệu lực đối kháng mạnh đối với nấm bệnh *R. solani* và *Sclerotinia sclerotiorum*. Alwadai et al. (2022) phân lập các chủng *Trichoderma* đối kháng từ đất bằng môi trường chọn lọc TSM và PDA, làm thuần các chủng nấm bằng cách cấy chuyền và sử dụng ITS để định danh phân tử nấm. Raja et al. (2023) đã phân lập 35 chủng nấm từ đất vùng rễ cây lạc tại vùng bán khô hạn Ấn Độ và đã phân loại chúng thành 4 loài chủ yếu gồm *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* và *T. citrinoviride*, đồng thời xác nhận hai nhóm loài *T. asperellum* và *T. harzianum* thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh mẽ, ức chế nấm gây bệnh héo rũ *S. rolfsii*. Cơ chế kiểm soát sinh học của *Trichoderma* chống lại nấm bệnh hại đất thường thông qua nhiều cơ chế như mycoparasitism, kháng sinh và kích hoạt hệ thống tự vệ của cây trồng. *T. asperellum và T. harzianum* sở hữu các enzyme phân hủy vách tế bào như chitinase, glucanase và protease để kìm hãm trực tiếp tản nấm hại (Loc et al., 2020; Chen et al., 2023; Raja et al., 2023; Kredics et al., 2024). Chi *Trichoderma* thể hiện khả năng kiểm soát sinh học có hiệu quả chống lại nhiều loài nấm, vi khuẩn, tuyến trùng gây bệnh ở thực vật và được ứng dụng rộng rãi vào sản xuất nông nghiệp (Chen et al., 2023; Kredics et al., 2024).

Trên cơ sở đánh giá hoạt tính đối kháng, khả năng tiết mạnh mẽ các enzyme ngoại bào và kết quả phân loại học, 06 chủng VSV ưu việt đã được lựa chọn để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo bao gồm *B. siamensis* B8, *B. velezensis* K1, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và *T. asperellum* HL6 để đánh giá việc ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt lạc.

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

Khi xử lý hạt giống lạc L14 với các chủng *B. siamensis* B8, *B. velezensis* K1, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và *T. asperellum* HL6, tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc lần lượt là 98,33 %, 98,33 %, 99,00%, 99,33 %, 99,67 %, 99,33 %. Trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng hạt lạc được ngâm với nước vô trùng tỉ lệ hạt nảy mầm đạt 98,67 % nhưng không khác biệt ở mức có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức xử lý ($p > 0,05$) (Bảng 3.9 và Hình PL4.1 ở Phụ lục IV).

Bảng 3.9. *Tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc L14, khi được xử lý bằng dịch nuôi cấy các chủng vi sinh vật đối kháng B8, K1, 101, 112, 137 và HL6*

Số TT	Công thức	Tỉ lệ hạt nảy mầm (%)
1	Đối chứng	98,67 ± 1,16
2	Xử lý với *B. siamensis* B8	98,33 ± 0,58
3	Xử lý với *B. velezensis* K1	98,00 ± 1,00
4	Xử lý với *B. siamensis* 101	99,00 ± 1,00
5	Xử lý với *B. siamensis* 112	99,33 ± 1,16
6	Xử lý với *B. velezensis* 137	99,67 ± 0,58
7	Xử lý với *T. asperellum* HL6	99,33 ± 0,58

Ghi chú: M ± SD: Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn và sự sai khác không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05 (Duncan's test)

Như vậy có thể thấy rằng 6 chủng *B. siamensis* B8, *B. velezensis* K1, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và *T. asperellum* HL6 không gây ảnh hưởng bất lợi đến sự nảy mầm và sinh trưởng ban đầu của cây lạc trong điều kiện thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với các nghiên cứu về *Bacillus* và *Trichoderma* đã được công bố ở Việt Nam và cũng như trên thế giời. Chủng *Bacillus sp.* S20D12 làm tăng tốc độ mọc mầm của lạc ở giai đoạn 7 ngày sau gieo (Cương et al. (2019). Chế phẩm *Bacillus* bản địa an toàn đối với hạt giống lạc L23, không ảnh hưởng trong 10 ngày đầu nhưng làm tăng tỉ lệ mọc ở ngày thứ 15 sau gieo (Vũ; 2022). Ayyandurai et al. (2021) sử dụng phương pháp cuộn khăn giấy đã chứng minh hạt lạc giống sau khi xử lý bằng các bào tử nấm đối kháng *Trichoderma* vùng rễ hoàn toàn an toàn và mọc mầm khỏe mạnh. Raja et al., (2023) cho biết khi xử lý hạt lạc bằng các chủng nấm đối kháng *Trichoderma* bản địa cải thiện đáng kể sự nảy mầm và chiều dài rễ/thân mầm, đồng thời đối kháng mạnh với *Sclerotium rolfsii*. Trong khi đó, nghiên cứu của Liang et al. (2024) chỉ ra hỗn hợp nội sinh khuẩn (*B. tequilensis*, *S. epidermidis*, *B. siamensis*) nâng cao tỉ lệ nảy mầm của lạc dưới stress mặn thông qua enzyme chống oxy hóa và điều hòa stress thẩm thấu. Kampa et al. (2025) cho biết các chủng *B. subtilis* (S4KB5, S8KB2) và *T. asperellum* (Tricho1, Tricho2) làm tăng tỉ lệ nảy mầm, chiều dài rễ, chiều dài thân và chỉ số vigour của giống lạc Kadiri-6 khi đối kháng nấm hại *A. niger*.

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 HRGMĐ của các chủng VSV đối kháng riêng rẽ trong điều kiện nhà lưới được trình bày ở Bảng 3.10. Kết quả sàng lọc nhà lưới cho thấy, ở nghiệm thức đối chứng âm, không gây nhiễm nấm bệnh và chỉ xử lý bằng nước vô trùng, tỉ lệ cây chết luôn duy trì ở mức 0,00% trong suốt 45 ngày thí nghiệm. Ngược lại, ở nghiệm thức đối chứng bệnh, nhiễm nấm bệnh chủng *A. niger* và xử lý bằng nước vô trùng ghi nhận toàn bộ cây lạc bị chết 14 NSNNB. Các cây lạc bị chết đều có biểu hiện

đặc trưng của bệnh HRGMĐ, phân lập lại nấm bệnh từ cây lạc bị chết này và kiểm tra hình thái, bào tử nấm bệnh cho thấy các chủng nấm tương đồng với các chủng nấm QT1 và H17 lây nhiễm vào.

Ở nghiệm thức xử lý các chủng VSV đối kháng *B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* K1 và *B. velezensis* 137 và *T. asperellum* HL6 đều ghi nhận làm giảm tỉ lệ cây lạc chết do bệnh HRGMĐ. Hiệu quả phòng trừ bệnh của 6 chủng VSV đối kháng với chủng nấm *A. niger* QT1 dao động từ 93,33 – 100 %, không có khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các nghiệm thức. Hiệu quả phòng trừ *A. niger* H17 dao động từ 26,67 - 80,00 %. Trong đó, các nghiệm thức xử lý với *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 cho hiệu quả phòng trừ đạt tương ứng là 73,33%, 80,00% và 73,33% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Nghiệm thức cho hiệu quả phòng trừ dưới 50% gồm *T. asperellum* HL6 (46,67 %), *B. siamensis* B8 (40,00 %) và *B. velezensis* K1 (26,67 %).

Trong các nghiên cứu trước đây, nhiều chủng VSV đối kháng của chi *Bacillus* và *Trichoderma* được báo cáo có khả năng kháng nấm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Chủng *B. velezensis* CB13 làm giảm tỉ lệ mắc bệnh do *S. rolfsii* dao động từ 65,44 – 94,92 % (Jia et al., 2023), chủng *B. velezensis* GA1 cũng giúp cây lạc giảm tỉ lệ mắc nấm bệnh thông qua cơ chế đối kháng trực tiếp với nấm bệnh đồng thời kích thích cơ chế tự bảo vệ của cây (Korangi Alleluya et al, 2023). Xử lý hạt lạc với *B. siamensis* YB-1632 giúp giảm tỉ lệ nhiễm *S. rolfsii* từ 93,33 % xuống còn 11,67 % và giảm mức độ bệnh từ 65,85 % xuống 6,79 % (Chang et al., 2025). Trong khi đó, 20 chủng *T. asperellum* phân lập từ đất và rễ cây đều có khả năng hạn chế bệnh nấm ở cổ rễ cây cà chua, trong đó chủng A10 thể hiện hiệu quả cao nhất với khả năng ức chế hơn 80% (Shanmugaraj et al., 2023). Khi sử dụng phối hợp, tổ hợp vi khuẩn MC1 làm giảm tỉ lệ bệnh cổ rễ trên lạc và đậu gà xuống thấp lần lượt là 9,33 % và 8,33 % (Kampa et al., 2025).

Dựa vào hiệu quả phòng trừ bệnh HRGMĐ với 2 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, chúng tôi lựa chọn ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 cho các nghiên cứu tiếp.

Bảng 3.10. *Sàng lọc khả năng phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của các chủng vi sinh vật đối kháng trong điều kiện nhà lưới*

Nghiệm thức	Tỉ lệ (%) cây lạc bị chết do lây nhiễm *A. niger* QT1 tại các thời điểm điều tra					Hiệu quả phòng trừ bệnh 45 NSNNB (%)	Tỉ lệ (%) cây lạc bị chết do lây nhiễm *A. niger* H17 tại các thời điểm điều tra					Hiệu quả phòng trừ bệnh 45 NSNNB (%)
	7 NSNNB	14 NSNNB	21 NSNNB	28 NSNNB	45 NSNNB		7 NSNNB	14 NSNNB	21 NSNNB	28 NSNNB	45 NSNNB	
CT1 (Đối chứng âm)	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-
CT2, CT3 (Xử lý **B8)**	0,00 ± 0,00 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	**93,33 ± 11,55** ^{a}	26,67 ± 11,55 ^{b}	46,67 ±11,55 ^{cd}	60,00 ± 0,00 ^{bc}	60,00 ± 0,00 ^{bc}	60,00 ± 0,00 ^{bc}	**40,00 ± 0,00** ^{de}
CT4, CT5 (Xử lý **K1)**	0,00 ± 0,00 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	**93,33 ± 11,55** ^{a}	26,67 ± 11,55 ^{b}	73,33 ± 11,55 ^{b}	73,33 ± 11,55 ^{b}	73,33 ± 11,55 ^{b}	73,33 ± 11,55 ^{b}	**26,67 ± 11,55** ^{e}
CT6 CT7 (Xử lý **101)**	0,00 ± 0,00 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	**93,33 ± 11,55** ^{a}	20,00 ±20,00 ^{bc}	26,67 ±11,55 ^{de}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	**73,33 ± 11,55** ^{ab}
CT8, CT9 (Xử lý **112)**	0,00 ± 0,00 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	6,67 ± 11,55 ^{c}	**93,33 ± 11,55** ^{a}	13,33 ±11,55 ^{bc}	20,00 ± 20,00 ^{e}	20,00 ± 20,00 ^{f}	20,00 ± 20,00 ^{f}	20,00 ± 20,00 ^{f}	**80,00 ± 11,55** ^{a}
CT10, CT11 (Xử lý **137)**	0,00 ± 0,00 ^{c}	0,00 ± 0,00 ^{c}	0,00 ± 0,00 ^{c}	0,00 ± 0,00 ^{c}	0,00 ± 0,00 ^{c}	**100 ± 0,00** ^{a}	13,33 ±11,55 ^{bc}	26,67 ±11,55 ^{de}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	26,67 ± 11,55 ^{ef}	**73,33 ± 11,55** ^{ab}
CT12, CT13 (Xử lý **HL6)**	2,22 ± 0,38 ^{c}	4,5 ± 3,8 ^{c}	4,5 ± 3,8 ^{c}	4,5 ± 3,8 ^{c}	4,5 ± 3,8 ^{c}	**95,55 ± 11,55** ^{a}	33,33 ± 11,55 ^{b}	53,33 ± 11,55 ^{c}	53,33 ±11,55 ^{cd}	53,33 ±11,55 ^{cd}	53,33 ±11,55 ^{cd}	**46,67 ± 11,55** ^{cd}
CT14, CT15 (Đối chứng bệnh)	60,00 ± 20,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	**0,00 ± 0,00** ^{c}	66,67 ± 11,55 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	100 ± 0,00 ^{a}	**0,00 ± 0,00** ^{f}

Ghi chú: 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.

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). Kết quả ở cấp độ *in vitro*, ba chủng *Bacillus* tuyển chọn có tính tương thích, không trực tiếp đối kháng nhau. Đây là cơ sở thực nghiệm ban đầu đáp ứng điều kiện cần để tiến hành phối trộn ba chủng *Bacillus* thành hỗn hợp dịch nuôi nhằm hướng tới kiểm soát sinh học đa chủng (Niu et al., 2020).



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.*

Sự không đối kháng lẫn nhau giữa các chủng *B. siamensis* 101*, B. siamensis* 112 *và B. velezensis* 137 trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp và có thể giải thích dựa trên các đặc điểm phân loại học và phát sinh chủng loại di truyền hiện đại. Theo Fan et al. (2017), các loài *B. siamensis* và *B. velezensis* có mối quan hệ di truyền gần gũi, cùng với *B. amyloliquefaciens* tạo thành một đơn vị phân loại trên cấp loài (operational group *B. amyloliquefaciens*) thuộc phức hợp loài *B. subtilis.* Kết quả thực nghiệm này cũng đồng nhất với các nghiên cứu tương thích trên các chủng vi khuẩn vùng rễ chi *Bacillus* được công bố gần đây. Kampa et al. (2025) khi khảo sát khả năng đồng nuôi cấy của ba chủng vi khuẩn vùng rễ thuộc loài *Bacillus subtilis* (gồm B3, S4KB5 và S8KB2) đã ghi nhận các chủng này tương thích sinh học và không xuất hiện vùng vô khuẩn nào tại điểm tiếp xúc. Lực et al. (2025) cũng chứng minh hai chủng vi khuẩn vùng rễ lúa là *Bacillus* 55 và *Bacillus* 61 hoàn toàn có thể phối trộn ổn định trong một huyền phù huyền hợp đồng nhất theo tỉ lệ mật số 1:1. Sự tương thích này là cơ sở để phối hợp các chủng nhằm khai thác bổ trợ các cơ chế có lợi như đối kháng nấm, kích thích sinh trưởng và cảm ứng khả năng phòng vệ của cây (Niu et al., 2020; Kampa et al., 2025; Li et al., 2025). Vì vậy, tổ hợp ba chủng trên có tiềm năng phát triển thành chế phẩm đa chủng, tuy nhiên hiệu quả và tính ổn định của tổ hợp cần tiếp tục được đánh giá trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng.

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*

Cả ba chủng *Bacillus* tuyển chọn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) đều có khả năng sinh chitinase, β-1,3-glucanase và cellulase, trong đó β-1,3-glucanase biểu hiện hoạt tính rõ và ổn định hơn. Kết quả này đáng chú ý vì β-glucan là một thành phần quan trọng, chiếm khoảng 48% thành phần hệ sợi của loài *A. niger* (Krake et al., 2024). Ở nấm sợi nói chung, chitin và β-1,3/β-1,6-glucan tạo nên phần quan trọng

của lớp khung thành tế bào (Ost et al., 2025). Trong cấu trúc thành tế bào nấm *Aspergillus*, β-1,3-glucan được ghi nhận chiếm từ 65% đến 90% tổng hàm lượng β-glucan (Bowman & Free, 2006). Các nghiên cứu cấu trúc ở *Aspergillus* cho thấy β-1,3-glucan tham gia mạng polysaccharide liên kết chặt chẽ với chitin và protein tạo thành một mạng lưới có vai trò duy trì cấu trúc thành tế bào, bảo vệ tế bào (Ishibashi et al., 2010; Gow & Lenardon, 2023; Gao et al., 2023; Krake et al., 2024; Dickwella Widanage et al., 2024; Ost et al., 2025). Đáng chú ý, β-1,3-glucanase đã được chứng minh có khả năng ức chế sinh trưởng và làm biến đổi hình thái hệ sợi của *A. niger* (Gao et al., 2023), đồng thời hoạt tính enzyme này cũng được ghi nhận ở *Bacillus* có khả năng đối kháng *Aspergillus* (Jin et al., 2023; Aphaiso et al., 2024). Trong khi đó, chitinase và các VSV phân giải chitin đã được nghiên cứu khá rộng trong kiểm soát sinh học nấm gây bệnh thực vật (Xiao et al., 2009; Loc et al., 2020). Từ kết quả thu được của luận án và những cơ sở trên, β-1,3-glucanase được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu nhằm làm rõ hơn sự liên quan của enzyme này đến khả năng đối kháng *A. niger* của các chủng *Bacillus* tuyển chọn.

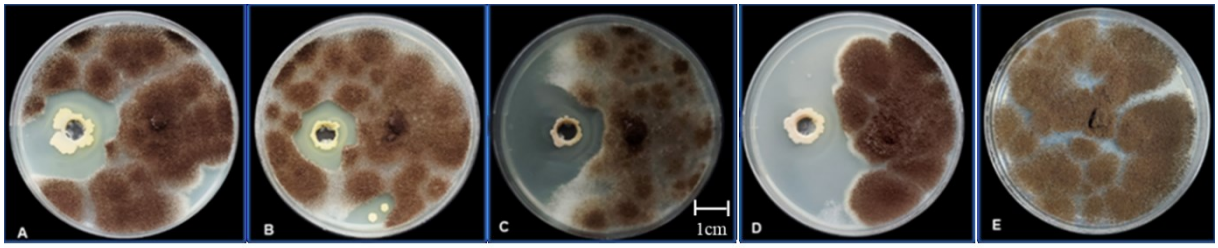
3.2.7.1. Khả năng đối kháng và ức chế A. niger trên môi trường đặc

Khả năng đối kháng *A. niger* của ba chủng *Bacillus B. siamensis* 112 và B. *velezensis* 137 trong đánh giá đơn lẻ và hỗn hợp bằng phương pháp nuôi cấy kép được trình bày ở Bảng 3.11, Hình 3.15. Cả bốn nghiệm thức đều thể hiện khả năng đối kháng với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17. Đối với *A. niger* QT1, ghi nhận chủng *B. siamensis* 101 có tỉ lệ ức chế sinh trưởng nấm đạt 56,5 %, trong khi *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 có tỉ lệ ức chế sinh trưởng lần lượt là 53,6 % và 58,1 %, trong khi hỗn hợp ba chủng *Bacillus* cho tỉ lệ ức chế sinh trưởng nấm đạt 60,8 % và khác biệt có ý nghĩa thống kê các nghiệm thức còn lại với *với* $p < 0,05$. Tương tự, khả năng ức chế *A. niger* H17 của *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và hỗn hợp ba chủng *Bacillus* lần lượt là 52,9%; 49,6%; 54,4% và 58,6%.

Bảng 3.11. *Khả năng đối kháng A.niger của các chủng Bacillus đơn lẻ và hỗn hợp*

Chủng *Bacillus*	**Tỉ lệ ức chế sinh trưởng các chủng nấm bệnh**	
	Chủng *A.niger* QT1 (%)	**Chủng *A.niger H17***
B. siamensis 101	$56,5 \pm 0,21^{c}$	$52,9 \pm 0,11^{c}$
B. siamensis 112	$53,6 \pm 0,38^{d}$	$49,6 \pm 0,18^{d}$
B. velezensis 137	$58,1 \pm 0,36^{b}$	$54,4 \pm 0,10^{b}$
Hỗn hợp 3 chủng	$\mathbf{60,8 \pm 0,39^{a}}$	$\mathbf{58,6 \pm 0,23^{a}}$
Đối chứng	$0,0 \pm 0,00^{e}$	$0,0 \pm 0,00^{e}$

Ghi chú: 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 3.15. *Khả năng đối kháng A.niger QT1 của các chủng Bacillus đơn lẻ và hỗn hợp: B. siamensis 101 (A), B. siamensis 112 (B),, B. velezensis 137 (C), hỗn hợp ba (D) và Đối chứng (E).*

Khả năng ức chế A. niger bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch:

Kết quả thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được trình bày ở Bảng 3.12 và Hình 3.16. Kết quả cho thấy dịch thô nuôi cấy khi loại bỏ tế bào các chủng *Bacillus* đơn lẻ và hỗn hợp đều thể hiện khả năng đối kháng với *A. niger* ở các mức độ khác nhau. Đường kính vùng ức chế chủng *A. niger* QT1 của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và hỗn hợp lần lượt là 26,6 mm, 25,4 mm, 28,3 mm và 30,8 mm. Trong khi đó, đường kính vùng ức chế chủng *A. niger* H17 của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 và hỗn hợp lần lượt là 21,1 mm, 20,3 mm, 23,5 mm và 26,8 mm.

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

Nguồn dịch thô	**Đường kính ức chế sinh trưởng các chủng nấm bệnh**	
	Chủng *A.niger* QT1 (mm)	**Chủng *A.niger* H17 (mm)**
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]

Ghi chú: 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.



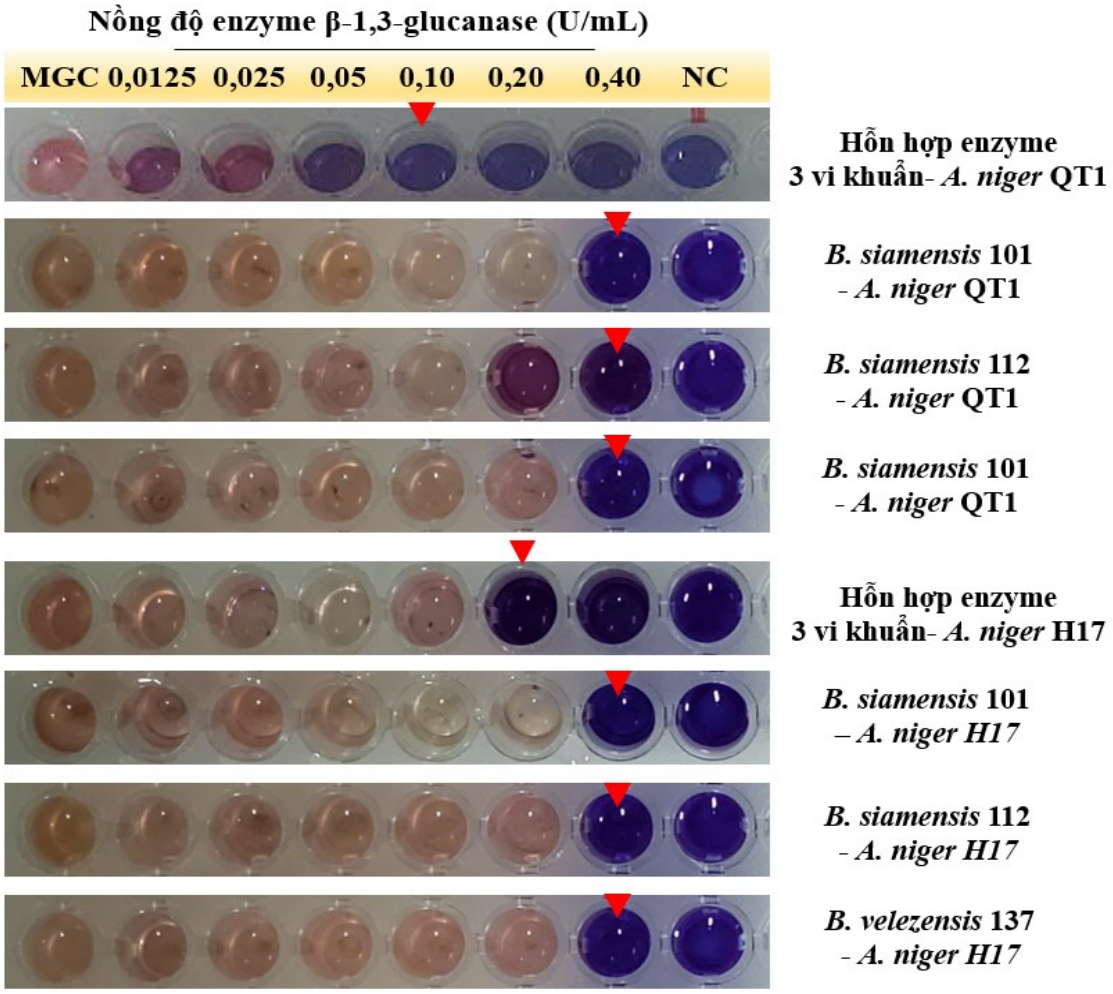
Hình 3.16. *Khả năng đối kháng A. niger H17 của các chủng Bacillus đơn lẻ và hỗn hợp: B. siamensis 101 (**101**), B. siamensis 112 (**112**), B. velezensis 137 (**137**) và hỗn hợp enzyme của 3 chủng Bacillus (**101+112+137**); Đối chứng (**ĐC**)*

Kết quả nghiên cứu của luận án tương đồng với Yin et al. (2022), khi *B. velezensis* GSBZ09 làm giảm sự phát triển khuẩn lạc *A. niger* trong điều kiện *in vitro*. Khả năng đối kháng của *Bacillus* có thể liên quan đến nhiều nhóm chất được tạo ra trong quá trình sinh trưởng. Kuzin et al. (2019) ghi nhận các phân đoạn thu từ dịch nuôi cấy *B. pumilus* B-13176 có hoạt tính kháng *A. niger*, trong khi Figueiredo et al. (2025) cho thấy các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi của *B. velezensis* CNPMS-22 ức chế mạnh sự phát triển hệ sợi của nấm này. Tuy nhiên, mức độ đối kháng phụ thuộc vào từng chủng và điều kiện thử nghiệm; một số chủng *Bacillus* thậm chí không biểu hiện khả năng ức chế *A. niger*. Những kết quả trên cho thấy hoạt tính đối kháng của *Bacillus* có thể liên quan đến sự

tham gia của nhiều yếu tố như chất chuyển hóa thứ cấp, enzyme ngoại bào và các hợp chất dễ bay hơi. Vì vậy, khả năng ức chế *A. niger* ghi nhận trong nghiên cứu là cơ sở để tiếp tục đánh giá tiềm năng kiểm soát sinh học của các chủng *Bacillus* tuyển chọn.

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

Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá thông qua sử dụng thuốc thử resazurin. Hoạt động trao đổi chất và chuyển hóa năng lượng của tế bào khi thử nghiệm với thuốc thử resazurin được biểu thị qua chỉ số màu (Chakansin et al., 2022; Serrano et al., 2023). Thử nghiệm được thực hiện trên đĩa có 96 vi giếng với các độ pha loãng hoạt độ enzyme của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase các chủng riêng rẽ và hỗn hợp, kết quả được thể hiện ở Hình 3.17 và Bảng 3.13. Giá trị MIC của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 nằm trong khoảng 0,0125 – 0,4 U/mL. Cả hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 đều thể hiện mức độ nhạy cảm cao với giá trị MIC ghi nhận lần lượt là 0,1 U/mL, 0,2 U/mL và giá trị MFC.



Hình 3.17. *Thử nghiệm resazurin để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).*

Dung dịch resazurin, được sử dụng làm chất chỉ thị tăng trưởng của nấm, việc chuyển màu từ xanh sang hồng biểu thị sự sống của các tế bào (viable cell); MGC (Microbial growth control): đối chứng tăng trưởng; NC: đối chứng âm tính (môi trường).

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

Nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào	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**

Chú thích: 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.

Kết quả ở Hình 3.17 và Bảng 3.13 cho thấy, phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase các chủng đơn lẻ *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều có giá trị MIC = MFC = 0,4 U/mL khi xử lý bào tử hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17, chứng tỏ enzyme tiết ra có khả năng diệt nấm rõ rệt ngay tại hoạt độ ức chế. Tuy nhiên, khi phối hợp enzyme β-1,3-glucanase với tỉ lệ 1: 1: 1 về hoạt độ, hiệu quả kháng nấm tăng lên rõ rệt, MIC = 0,1 U/mL, MFC = 0,2 U/mL đối với QT1 và MIC = 0,2 U/mL, MFC = 0,4 U/mL đối với H17, tỉ lệ MFC/MIC = 2. Sự khác nhau về giá trị MIC, MFC giữa hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 có thể do sự khác nhau về cấu trúc bào tử của nấm như độ dày, cấu trúc bề mặt, tính nhạy cảm của bào tử nấm đối với enzyme.

Trong thử nghiệm xác định MIC và MFC, dịch huyền phù bào tử nấm *A. niger* (10^6 bào tử/mL) được sử dụng làm tác nhân nuôi cấy ban đầu, đích tác động sinh học trực tiếp của enzyme và thước đo tăng trưởng được theo dõi thông qua sự hình thành hệ sợi nấm (Serrano et al., 2023). Bản chất của phản ứng chỉ thị màu resazurin dựa trên sự khử phân tử này từ màu xanh sang resorufin màu hồng bởi hoạt tính của các enzyme oxidoreductase nội bào (Chakansin et al., 2022). Ở trạng thái bào tử ngủ ban đầu, hoạt động trao đổi chất diễn ra rất hạn chế. Sự chuyển màu chỉ thị sang hồng chỉ được ghi nhận khi các bào tử nảy mầm và phát triển mạnh mẽ thành hệ sợi nấm có hoạt động hô hấp chủ động (Serrano et al., 2023). Ở các nghiệm thức xử lý với enzyme β-1,3-glucanase, đặc biệt là công thức hỗn hợp ở hoạt độ 0,1–0,2 U/mL, giếng thạch vẫn giữ màu xanh của resazurin, cho thấy hoạt động chuyển hóa của nấm bị ức chế mạnh. Hiệu quả này có thể liên quan đến khả năng thủy phân *β*-1,3-glucan của thành tế bào nấm, qua đó ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào và sự phát triển của hệ sợi biểu hiện qua chất chỉ thị (Ishibashi et al., 2010).

Hiệu quả kháng nấm cao hơn của hỗn hợp ba dung dịch enzyme có thể liên quan đến tác động phối hợp tăng cường giữa các β-1,3-glucanase có đặc tính cấu trúc và cơ chế tác động khác nhau. Các miền liên kết glucan có thể hỗ trợ enzyme nhận biết và tương tác với cơ chất β-glucan (Otsuka et al., 2022), trong khi sự phân giải β-1,3-glucan có thể gây tổn thương cấu trúc sợi nấm *Aspergillus*, như đã được ghi nhận đối với β-1,3-glucanase bgls27 (Fang et al., 2024). Vì vậy, sự phối hợp các nguồn enzyme khác nhau có thể góp phần làm tăng mức độ tác động lên thành tế bào *A. niger* so với từng enzyme riêng lẻ. Tuy nhiên, kết quả resazurin chủ yếu phản ánh sự suy giảm hoạt động chuyển hóa của tế bào; bằng chứng trực tiếp về tác động của enzyme lên cấu trúc thành tế bào *A. niger* được phân tích ở mục 3.2.7.5.

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

Khả năng khuếch tán của enzyme có thể không đồng đều qua môi trường thạch đĩa (môi trường đặc). Trong khi đó, môi trường lỏng (lắc) cho phép các sợi nấm và bào tử tiếp xúc hoàn toàn với dung dịch enzyme từ mọi hướng. Khi lớp thành tế bào mới hình thành của ống mầm và khuẩn ty bị hệ enzyme phân giải liên tục, sợi nấm bị ngừng kéo dài, gãy nứt cơ học, làm triệt tiêu khả năng tích lũy sinh khối khô của nấm sợi trong bình nuôi cấy lỏng. Do đó, nhằm đánh giá khả năng ứng dụng β-1,3-glucanase từ các chủng *Bacillus* đã tuyển chọn trong kiểm soát nấm bệnh, nghiên cứu tiếp tục khảo sát tác động riêng lẻ và hỗn hợp của ba nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase (*B. siamensis* 101*, B. siamensis* 112 *và B. velezensis* 137) đến sự tích lũy sinh khối khô của hai chủng nấm gây bệnh HRGMĐ là *A. niger* QT1 và H17 trong môi trường lỏng. Dựa vào các giá trị MIC, MFC được xác định ở mục 3.2.7.2 và điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn dãy hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (U/mL) thử nghiệm là 0,2 : 0,4 : 0,8 : 1,6 để khảo sát theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.3.2. Mức độ ảnh hưởng đến giảm sinh khối được phân tích chi tiết dựa trên hai chỉ số: sinh khối khô tuyệt đối và hiệu suất ức chế (tỉ lệ % giảm sinh khối).

Biến động về sinh khối khô tuyệt đối của các chủng nấm bệnh dưới ảnh hưởng của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase:

Kết quả thực nghiệm về sự thay đổi khối lượng sinh khối khô tuyệt đối (mg) của hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 được trình bày tương ứng tại Bảng 3.14 và 3.15. Phân tích số liệu xử lý thông kê ANOVA hai yếu tố (nguồn enzyme – yếu tố 1; hoạt độ enzyme – yếu tố 2) cho thấy xu hướng chung là sinh khối khô tuyệt đối của cả hai chủng nấm đều giảm khi hoạt độ β-1,3-glucanase trong môi trường tăng dần. Kết quả này cung cấp bằng chứng về mối tương quan nghịch có ý nghĩa giữa hàm lượng enzyme bổ sung và khả năng tích lũy sinh khối của nấm bệnh.

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

Ghi chú: 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 3.14 cho thấy sinh khối khô của *A. niger* QT1 giảm có ý nghĩa thống kê khi hoạt độ β-1,3-glucanase tăng từ 0,2 lên 1,6 U/mL ở cả bốn nguồn phân đoạn enzyme khảo sát ($p < 0,05$). Phân tích ANOVA hai yếu tố cho thấy nguồn phân đoạn enzyme, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và tương tác giữa hai yếu tố đều ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sinh khối khô của nấm ($p \leq 0,001$). Ở hoạt độ 0,2 U/mL, sinh khối khô không khác biệt có ý nghĩa giữa các nguồn phân đoạn enzyme ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tại các hoạt độ từ 0,4 đến 1,6 U/mL, hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* cho sinh khối thấp hơn có ý nghĩa so với các mẫu riêng lẻ *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 ($p < 0,05$). Tại 1,6 U/mL, hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* cho sinh khối thấp nhất (6,43 mg). Kết quả cho thấy tác động của các phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với sinh khối nấm phụ thuộc vào nguồn enzyme và hoạt độ sử dụng.

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

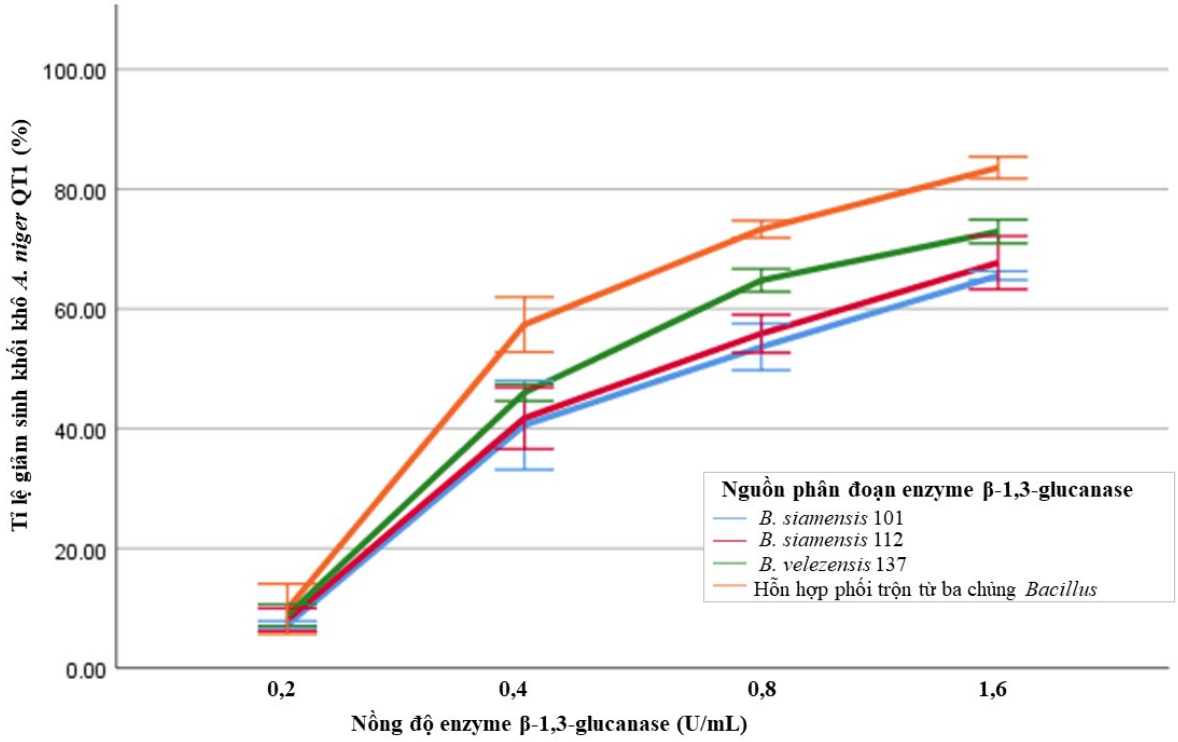
Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (M ± SD; n = 3). Trong cùng một hàng, các giá trị mang chữ cái thường khác nhau (a–c) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mức hoạt độ enzyme; trong cùng một cột, các giá trị mang chữ cái hoa không có ký tự chung (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).

Bảng 3.15 cho thấy sinh khối khô của *A. niger* H17 giảm khi hoạt độ β-1,3-glucanase tăng từ 0,2 lên 1,6 U/mL ở cả bốn nguồn enzyme khảo sát. Phân tích ANOVA hai yếu tố cho thấy nguồn enzyme ($F(3,32) = 22,075$; $p < 0,001$) và hoạt độ enzyme ($F(3,32) = 307,487$; $p < 0,001$) đều ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến sinh khối khô của nấm, trong khi tương tác giữa hai yếu tố không có ý nghĩa thống kê ($F(9,32) = 1,784$; $p = 0,110$). Ở hoạt độ 0,2 U/mL, sinh khối khô dao động từ 29,68 đến 30,60 mg và không khác biệt có ý nghĩa giữa các nguồn enzyme ($p > 0,05$). Khi tăng hoạt độ lên 0,4 U/mL, hỗn hợp từ ba chủng *Bacillus* cho sinh khối thấp nhất (15,40 mg), khác biệt có ý nghĩa so với các mẫu riêng lẻ còn lại ($p < 0,05$). Tại 0,8 và 1,6 U/mL, hỗn hợp từ ba chủng *Bacillus* tiếp tục cho sinh khối thấp nhất, lần lượt đạt 10,30 và 7,53 mg, khác biệt có ý nghĩa so với các mẫu riêng lẻ *B. siamensis* 101 và *B. siamensis* 112 nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với *B. velezensis* 137 ($p > 0,05$). Trong từng nguồn enzyme, sinh

khối khô giảm có ý nghĩa khi tăng hoạt độ từ 0,2 lên 0,4 và từ 0,4 lên 0,8 U/mL ($p < 0,05$). Tuy nhiên, mức giảm khi tăng hoạt độ từ 0,8 lên 1,6 U/mL chưa đạt ý nghĩa thống kê ở cả bốn nguồn enzyme ($p > 0,05$). Kết quả cho thấy sinh khối khô của *A. niger* H17 chịu ảnh hưởng của nguồn enzyme và hoạt độ sử dụng, trong đó hỗn hợp từ ba chủng *Bacillus* cho giá trị sinh khối thấp nhất ở các mức hoạt độ từ 0,4 đến 1,6 U/mL.

Hiệu suất ức chế (%) của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đối với các chủng nấm bệnh:

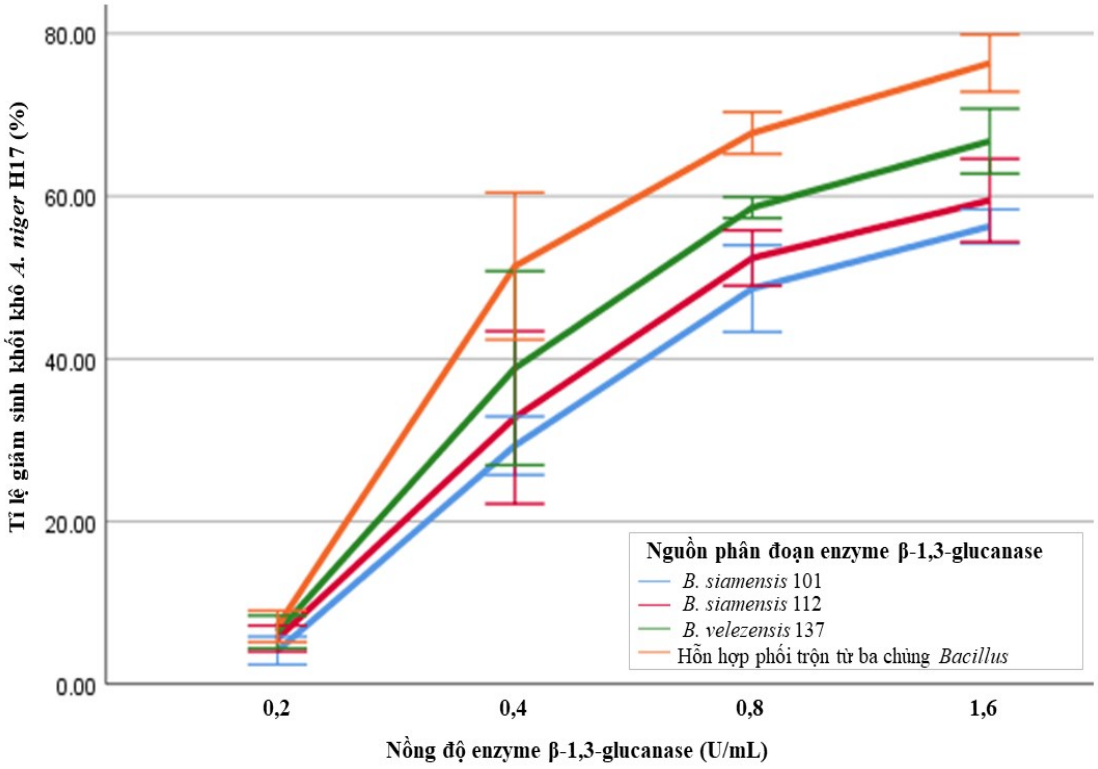
Hiệu suất ức chế đối với chủng *A. niger* QT1 được trình bày ở Hình 3.18 và Bảng PL 5.1 ở Phụ lục V; hiệu suất ức chế đối với chủng *A. niger* H17 được trình bày ở Hình 3.19 và Bảng PL 5.2 ở Phụ lục V. Phân tích dữ liệu cho thấy các phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase đều làm giảm sinh khối khô của *A. niger* QT1 và H17 sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu suất ức chế nhìn chung tăng theo hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase, trong đó phân đoạn enzyme hỗn hợp từ ba chủng *Bacillus* thể hiện hiệu quả cao nhất. Mức độ ức chế có sự khác biệt giữa hai chủng nấm bệnh, cho thấy khả năng đáp ứng không hoàn toàn giống nhau đối với các phân đoạn enzyme khảo sát.



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*

Đồ thị ở Hình 3.18 và Bảng PL 5.1 cho thấy tỉ lệ giảm sinh khối tăng theo hoạt độ β-1,3-glucanase cả bốn nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào. Ở hoạt độ enzyme 0,2 U/mL, tỉ lệ giảm sinh khối tương đối thấp, chỉ đạt từ 7,28 % đến 9,90 %. Tại ngưỡng 0,4 U/mL khi hiệu suất tăng gấp 5 đến 6 lần. Trong đó, nguồn hỗn hợp đạt tỉ lệ ức chế 57,38 %, vượt trội rõ ràng so với nguồn enzyme từ *B. siamensis* 101 (40,60 %), nguồn từ *B. siamensis* 112 (41,75 %) và nguồn từ *B. velezensis* 137 (46,02 %). Tại hoạt độ cao

nhất (1,6 U/mL), nguồn hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* đạt tỉ lệ giảm sinh khối cao nhất lên tới 83,58 %, kế đến là nguồn từ *B. velezensis* 137 (72,93 %) và sau cùng là *B. siamensis* 112 (67,72 %) và nguồn *B. siamensis* 101 (65,56 %).



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*

Đồ thị ở Hình 3.19 và Bảng PL 5.2, cho thấy tỉ lệ giảm sinh khối khô của *A. niger* H17 tăng theo hoạt độ β-1,3-glucanase ở cả bốn nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào. Tại 0,2 U/mL, tỉ lệ giảm sinh khối đạt 4,12–7,11%; tăng lên 29,32–51,40% ở 0,4 U/mL và 56,28–76,35% ở 1,6 U/mL. Trong đó, nguồn enzyme hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* luôn cho hiệu quả ức chế cao nhất, đạt 76,35% tại 1,6 U/mL, tiếp đến là *B. velezensis* 137 (66,76%), *B. siamensis* 112 (59,47%) và *B. siamensis* 101 (56,28%).

Kết quả cho thấy hiệu quả làm giảm sinh khối khô của *A. niger* H17 phụ thuộc vào hoạt độ và nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào. Đặt biệt, ở cùng nguồn enzyme và hoạt độ khảo sát, tỉ lệ giảm sinh khối khô của H17 đều thấp hơn QT1. Chẳng hạn, tại 1,6 U/mL, nguồn enzyme hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* làm giảm sinh khối QT1 83,58%, trong khi H17 đạt 76,35%.

Phân tích dữ liệu ở đồ thị Hình 3.18, 3.19 và Bảng PL 5.1, 5.2 còn cho thấy, hiệu quả làm giảm sinh khối khô của *A. niger* QT1 và H17 phụ thuộc vào hoạt độ và nguồn phân đoạn enzyme ngoại bào. Có sự khác biệt về độ nhạy cảm giữa chủng *A. niger* QT1 và chủng *A. niger* H17 khi xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase. Ở cùng nguồn enzyme và hoạt độ khảo sát, tỉ lệ giảm sinh khối khô của H17 đều thấp hơn QT1 ở thử nghiệm đơn lẻ hay thử nghiệm hỗn hợp. Chẳng

hạn, tại 1,6 U/mL, nguồn enzyme hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus* làm giảm sinh khối QT1 83,58%, trong khi H17 đạt 76,35%. Điều này có thể là do sự khác biệt trong cấu trúc tế bào *A. niger* H17 so với *A. niger* QT1 hoặc khả năng sinh trưởng của *A. niger* H17 ít bị tác động hơn so với *A. niger* QT1. Hàm lượng β-glucana tổng số hoặc độ dày của lớp β-glucana trong cấu trúc thành tế bào ban đầu của chủng *A. niger* H17 có thể cao hơn chủng *A. niger* QT1, hoặc lớp glucan bao bọc bên ngoài của chủng *A. niger A. niger* H17 dày đặc hơn, làm cản trở không gian (steric hindrance) không cho enzyme tiếp cận liên kết glycoside (Xie et al., 2023; Xu et al., 2026). Ngoài ra, cơ chế tự vệ chủ động của hai chủng nấm *A. niger* QT1 và H17 có thể khác nhau. Trong môi trường lỏng, chủng *A. niger* có khả năng kích hoạt mạnh mẽ hơn hệ thống gen biểu hiện các enzyme protease ngoại bào nhằm phân hủy hoặc làm bất hoạt một phần các phân tử enzyme β-1,3-glucanase ngoại sinh (Wang et al., 2025). Đồng thời, xu hướng tiết ma trận ngoại bào (extracellular polymeric substances - EPS) tạo lớp màng sinh học (biofilm) bao quanh hệ sợi của các chủng *A. niger* có thể diễn ra mạnh hơn, đóng vai trò như một tấm lá chắn cơ học bảo vệ nấm trước sự tấn công của enzyme (Chatterjee & Das, 2020; L. Wang et al., 2024). Tuy nhiên, các cơ chế này cần được kiểm chứng trực tiếp trên chủng QT1 và H17.

Ở cùng hoạt độ enzyme (U/mL) nhưng hiệu quả kháng nấm thực tế trên sợi nấm đích vẫn có sự khác biệt rõ rệt trong các nghiệm thức. Điều này có thể được giải thích bằng nhiều nguyên nhân. Trong khi hoạt độ glucanase được xác định ngắn hạn trên cơ chất laminarin tinh sạch và hòa tan (Scafati et al., 2022; Vela-Corcia et al., 2026), thành tế bào sống của nấm *A. niger* lại là một mạng lưới polymer đa chiều cực kỳ phức tạp chứa chitin liên kết chặt với β-glucan ở bên trong và được bao bọc bởi lớp polysaccharide cùng các glycoprotein ở phía ngoài (Ost et al., 2025). Do đó, chỉ số hoạt tính đo trên cơ chất chuẩn không phản ánh đồng nhất khả năng tiếp cận và phân giải cấu trúc thành tự nhiên của sợi nấm (Ost et al., 2025). Bên cạnh đó, các enzyme β-1,3-glucanase từ các chủng vi khuẩn khác nhau có thể có sự khác biệt về cấu trúc phân tử và hiệu suất xúc tác thực tế. Các dạng nội cắt (endo-β-1,3-glucanase thuộc họ GH16) có khả năng cắt ngẫu nhiên các liên kết nội mạch glucan của vách tế bào (Vela-Corcia et al., 2026), giải phóng nhanh các đoạn oligomer ngắn và gây tổn thương cấu trúc thành tế bào hiệu quả hơn dạng ngoại cắt (exo-glucanase) (Scafati et al., 2022). Sự hiện diện của miền liên kết carbohydrate (CBM) cũng đóng vai trò quan trọng giúp tăng ái lực bám giữ sợi nấm của enzyme (Xie et al., 2023; F. Yang et al., 2023), đồng thời độ bền hóa lý giúp enzyme duy trì hoạt tính ổn định trước các protease ngoại bào và điều kiện nhiệt độ biến động (Meng et al., 2024; Vela-Corcia et al., 2026).

Trong nghiên cứu của luận án, nguồn enzyme ở dạng phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ dịch nuôi cấy có thể chứa tổ hợp các enzyme ngoại bào đồng tiết như chitinase, cellulase và protease (Song et al., 2026), hiệu quả kháng

nấm thực tế còn phụ thuộc vào tác động hỗ trợ giữa các nhóm enzyme này (Jin et al., 2025; Song et al., 2026). Trong mối tương tác phối hợp đó, β-1,3-glucanase sẽ tấn công và phân giải lớp glucan bao phủ phía ngoài trước, làm lộ ra khung chitin ở lớp bên trong thành tế bào nấm (Vela-Corcia et al., 2026), tạo điều kiện thuận lợi cho chitinase đồng hành tấn công phân hủy khung chitin, dẫn đến hiện tượng sợi nấm bị biến dạng, phình to và nứt vỡ tế bào tiêu diệt nấm vượt trội (Song et al., 2026).

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng tương đồng với các công bố gần đây ở trong và ngoài nước. Nghiên cứu của Thi et al., (2024) ghi nhận dịch chiết enzyme β-1,3-glucanase thô thu nhận từ chủng *B. siamensis* ML3 duy trì ở hoạt độ 1,44 U/mL chỉ kìm hãm sự tăng trưởng của các chủng nấm sợi gây hại như *Lasiodiplodia theobromae* (40,28%), *F. salawesiensi* (15,22%), và *C. endophyticum* (28,57%). Nghiên cứu của Dung et al., (2025) ghi nhận β-1,3-glucanase ngoại bào từ *B. tequilensis* ML6 có khả năng ức chế sinh trưởng *in vitro* của các chủng *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên ớt, với mức ức chế tăng khi hoạt độ enzyme tăng từ 0,10 đến 0,40 U/mL. Ở hoạt độ 0,40 U/mL, mức ức chế đạt 72–99% tùy chủng nấm. Trong khi đó, chủng *B. siamensis* 3BS12-4 thể hiện hoạt tính kháng nấm *A. flavus* với tỉ lệ ức chế là 43,10%. Sự ức chế *A. flavus* của *B. siamensis* 3BS12-4 chủ yếu là do ECC, với nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt nấm tối thiểu là 0,512 g/ml (Aphaiso et al., 2024). Thử nghiệm với các chủng vi khuẩn được áp dụng riêng lẻ và theo nhóm cho thấy chủng SpS5 của *B. halotolerans* được áp dụng riêng lẻ và theo nhóm với các chủng vi khuẩn tương thích khác đã cải thiện năng suất khoai tây và khả năng bảo vệ chống lại *R. solani* so với đối chứng, nhưng không thấy hiệu quả tăng cường của nhóm so với từng chủng vi khuẩn riêng lẻ (Debez et al., 2024). Bằng cách ngâm hạt kết hợp tưới đất, hoặc phun lá, hoặc ngâm hạt kết hợp tưới đất và phun lá với hỗn hợp vi khuẩn phân lập từ vùng rễ gồm *Bacillus* 55 và *Bacillus* 61 ở mật độ 10^6, 10^7 và 10^8 (CFU/mL) đã có hiệu quả giảm bệnh đạo ôn lá với mức độ tương đương nhau (Lực et al., 2025). Trong khi đó, hỗn hợp *Bacillus* sp. H16v8 và *Bacillus* sp. HGD9229 được chứng minh không chỉ cải thiện sự phát triển tế bào mà còn làm tăng hàm lượng protein và sản xuất enzyme phân giải chất độc. Hiệu quả phân giải AFB_1 của dịch nổi từ nuôi cấy hỗn hợp tăng 87,7 % so với H16v8 và 55,3 % so với HGD9229 nuôi riêng lẻ (L. Wang et al., 2021). Chủng *B. pumilus* INR7, *B. subtilis* GB03 và *Curtobacterium flaccumfaciens* đã được thử nghiệm riêng lẻ tổ hợp để kiểm soát các nấm gây bệnh thực vật khác nhau trên dưa chuột, bao gồm *C. orbiculare*. Trong các thử nghiệm nhà kính, *B. pumilus* trong tổ hợp được chứng minh là có tác dụng ức chế mầm bệnh hiệu quả hơn so với việc sử dụng *B. pumilus* đơn lẻ. Trong các thử nghiệm thực địa, hiệu quả của tổ hợp trong việc gây ra kháng thể toàn thân cảm ứng (ISR) đã được xác nhận – tổ hợp này đã ức chế các triệu chứng bệnh thán thư (Dobrzyński et al., 2023).

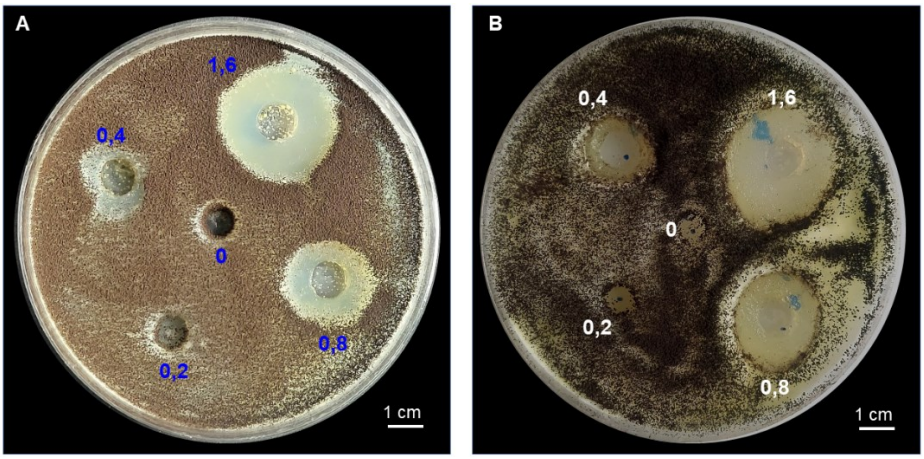
3.2.7.4 Mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và đường kính vùng ức chế A. niger

Mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của hỗn hợp *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 và đường kính vùng ức chế *A. niger* QT1 và H17 được thể hiện ở Bảng 3.16, Hình 3.20, Bảng 3.16 và Hình PL 6.1 ở Phụ lục VI.

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*

Hoạt độ (U/mL)	**Đường kính ức chế sinh trưởng các chủng nấm bệnh (mm)**	
	Chủng *A.niger* QT1	Chủng *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}

Ghi chú: 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: Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn.



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**)*

Kết quả bảng (Bảng 3.16 và Hình 3.20) cho thấy, khi tăng hoạt độ enzyme từ 0,4 lên 0,8 và 1,6 U/mL thì đường kính ức chế sinh trưởng nấm bệnh tăng tuyến tính. Đối với chủng *A. niger* QT1, đường kính ức chế sinh trưởng tăng lên tương ứng là 23,5 mm, 26,4 mm và 33,3 mm. Kết quả cũng tương tự đối với chủng *A. niger* H17 với đường kính ức chế sinh trưởng tăng tương ứng là 20,7 mm, 25,2 mm và 30,3 mm. Điều này chỉ ra enzyme β -1,3-glucanase có thể là tác nhân gây ức chế nấm. Ở hoạt độ thấp (0,2 – 0,4 U/mL), số lượng phân tử enzyme ít, sự phá hủy cấu trúc thành tế bào ít hơn nên đường kín vòng đối kháng khó được quan sát bằng mắt thường hoặc có kích thước nhỏ. Khi tăng hoạt độ lên cao từ 0,8 – 1,6 (U/mL), số phân tử enzyme nhiều hơn, vùng khuếch tán rộng hơn và giữ được hoạt độ đủ mạnh để phân giải thành tế bào, tế bào bị phá hủy nhiều hơn, vòng đối kháng mở rộng hơn.

Kết quả hồi quy tuyến tính giữa hoạt độ β-1,3-glucanase và đường kính ức chế hai chủng *A. niger* QT1 và H17 được trình bày ở Bảng 3.17. Chủng *A. niger* QT1 thể hiện sự nhạy cảm cao hơn với enzyme thông qua hệ số góc của phương trình hồi quy (a = 18,609) so với chủng *A. niger* H17 (a = 17,191). Các đồ thị P-P Plot cho thấy dữ liệu phân phối chuẩn, đảm bảo tính tin cậy của mô hình hồi quy được trình bày ở Hình PL 6.1 ở Phụ lục VI.

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

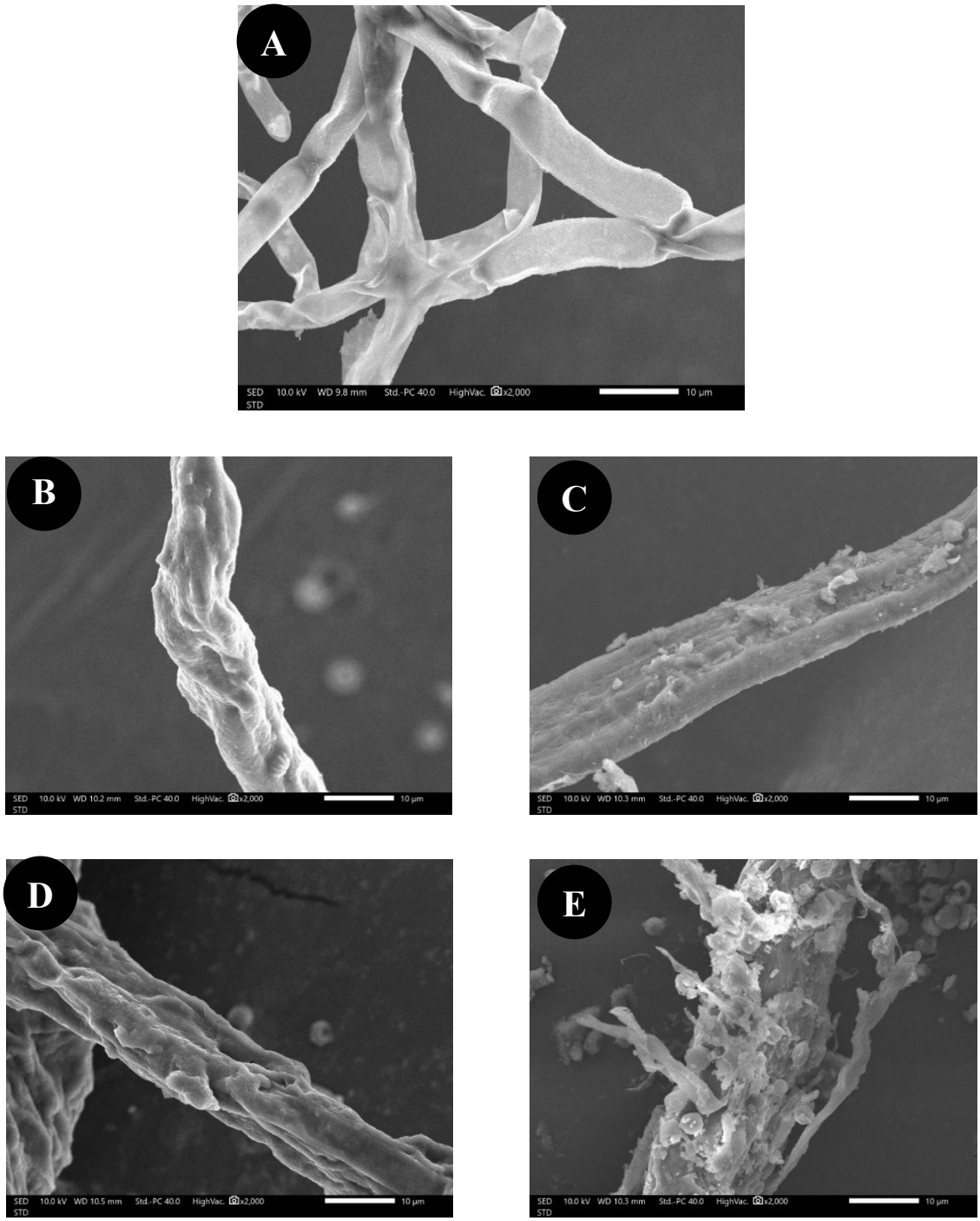
Kết quả ở Bảng 3.17 ghi nhận hệ số xác định R^2 = 0,634 – 0,641 với mức ý nghĩa p = 0,002. Trong khoảng khảo sát, hoạt độ β-1,3-glucanase của phân đoạn enzyme ngoại bào từ hỗn hợp ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 có mối tương quan dương với đường kính ức chế hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 (p = 0,002). Kết quả này 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

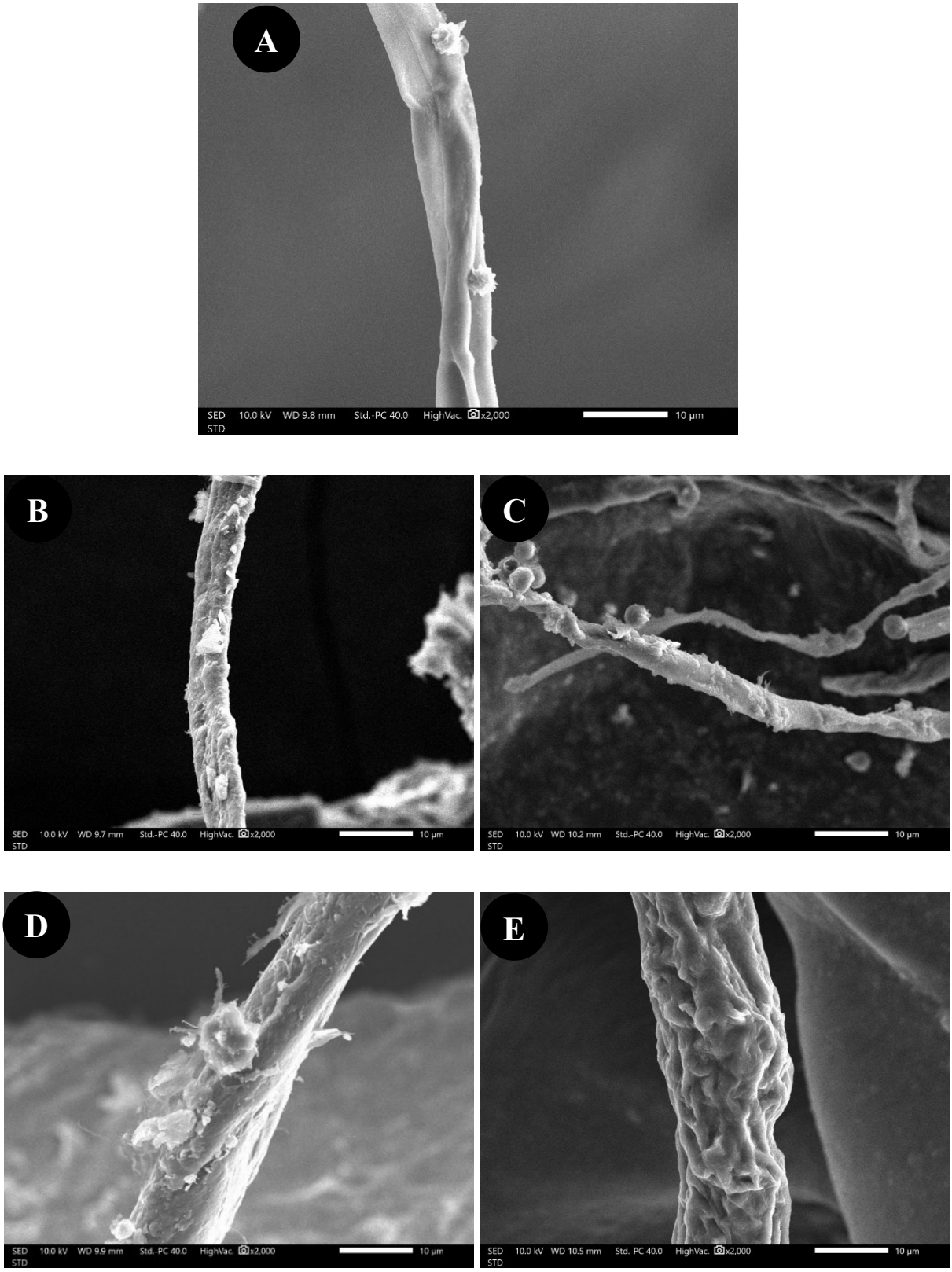
Để đánh giá khả năng thủy phân thành tế bào nấm *A. niger* của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase chúng tôi đã ủ dịch phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 với các mẫu riêng lẻ và mẫu hỗn hợp 3 dung dịch enzyme trong 6 giờ ở 37 ºC, quan sát phân tích ảnh SEM của các mẫu xử lý và so sánh với mẫu đối chứng để phát hiện các hình thái tổn thương trên thành tế bào nấm bệnh. Kết quả cho thấy, ở mẫu đối chứng (xử lý bằng phân đoạn enzyme ngoại bào bất hoạt ở 100 °C trong 10 phút, không phát hiện hoạt tính β-1,3-glucanase), hình thái sợi nấm hoàn toàn bình thường. Minh chứng hình ảnh vật lý học trực quan SEM của tất cả các mẫu được xử lý bằng phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase riêng lẻ và hỗn hợp 3 dung dịch enzyme của 3 chủng *Bacillus* đều cho thấy thành tế bào sợi nấm bị biến dạng, gấp nếp, tạo các lỗ thủng hoặc thành tế bào bị vỡ (Hình 3.21 và 3.22).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong cấu trúc thành tế bào của *A. niger*, β-1,3-glucan là thành phần khung chịu lực chủ đạo, đảm nhiệm chức năng duy trì hình dạng, tính toàn vẹn cơ học và khả năng sống sót của tế bào nấm. Kang et al. (2018) đã xác định hơn 81% các gốc glucopyranosyl trong phân đoạn alkali-insoluble của thành tế bào *A. niger* là 3-linked, tương ứng với β-1,3-glucan, minh chứng cho vai trò đặc biệt quản trọng của thành phần này trong khung polysaccharide cứng. Bowman & Free (2006) cũng nhấn mạnh rằng trong nấm sợi, glucan chiếm khoảng 50–60% khối lượng khô của thành tế bào và tới 65–90% lượng glucan đó là β-1,3-glucan, vượt trội hơn hẳn so với chitin, vốn chỉ chiếm khoảng 10–20%. Yoshimi et al. (2016) khẳng định β-1,3-glucan có nhánh β-1,6 kết hợp với chitin tạo thành khung polysaccharide alkali-insoluble, đóng vai trò chịu lực chính cho thành tế bào. Ost et al. (2025) cũng tổng kết trong nhóm nấm sợi, β-1,3-glucan luôn là thành phần chủ lực, phối hợp với chitin để

hình thành cấu trúc lõi vách cứng, qua đó củng cố nhận định β-1,3-glucan là mục tiêu tối ưu khi thiết kế giải pháp kiểm soát sinh học. Ngoài ra, β-1,3-glucanse còn là đích tác động chính của nhóm thuốc kháng nấm echinocandin, điều này khẳng định vai trò bắt buộc của nó trong sự sống của nấm (Hu et al., 2023).



Hình 3.21. *Ảnh SEM về ảnh hưởng của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase từ ba chủng Bacillus đơn lẻ và hỗn hợp đến thành tế bào sợi nấm chủng A. niger QT1. Hình ảnh sợi nấm ở mẫu đối chứng với độ phóng đại x 2000 (**A**) được xử lý bởi enzyme bất hoạt bằng nhiệt độ; nhóm xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase từ các chủng: B. siamensis 101 (**B**), chủng B. siamensis 112 (**C**), chủng B. velezensis 137 (**D**) và hỗn hợp enzyme ngoại bào của 3 vi khuẩn với tỉ lệ 1: 1 : 1 (**E**).*



Hình 3.22. *Ảnh SEM về ảnh hưởng của enzyme β-1,3-glucanase từ ba chủng Bacillus đơn lẻ và hỗn hợp đến thành tế bào sợi nấm chủng A. niger H17.*

*Hình ảnh sợi nấm ở mẫu đối chứng với độ phóng đại x 2000 (**A**) được xử lý bởi enzyme bất hoạt bằng nhiệt độ; nhóm xử lý với phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính enzyme β-1,3-glucanase từ các chủng: B. siamensis 101 (**B**), chủng B. siamensis 112 (**C**), chủng B. velezensis 137 (**D**) và hỗn hợp enzyme ngoại bào của 3 vi khuẩn với tỉ lệ 1: 1 : 1 (**E**).*

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về vai trò của enzyme ngoại bào từ *Bacillus* trong tác động lên cấu trúc nấm. Aphaiso et al. (2024) ghi nhận qua SEM rằng dịch ngoại bào của *B. siamensis* 3BS12-4, có hoạt tính protease, β-1,3-glucanase và chitinase cao, làm phá vỡ sợi nấm *A. flavus*. B. Zhang et al. (2026) cũng báo cáo về sự biến đổi cấu trúc màng và sự lộ diện của liên kết β-(1,3)-glucan trên vách tế bào *A. niger* dưới tác động của chất diện hoạt sinh học.

Với kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi ưu tiên nghiên cứu β-1,3-glucanase như một công cụ sinh học tiềm năng để phá vỡ tính toàn vẹn thành tế bào nhằm kiểm soát *A. niger*. Enzyme này có khả năng thủy phân liên kết β-1,3-glycosidic, trực tiếp tấn công và phá hủy khung polysaccharide chịu lực chính của thành tế bào, dẫn đến mất ổn định, ly giải và tiêu diệt tế bào nấm. Đặc biệt, β-1,3-glucan không hiện diện trong cấu trúc tế bào thực vật hay động vật, nên việc sử dụng β-1,3-glucanase mang lại tính chọn lọc cao, an toàn và thân thiện với môi trường.

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

3.2.8.1. Hoạt tính tan máu trên môi trường thạch máu

Hoạt tính làm tan máu của 3 chủng vi khuẩn phân lập *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 được đánh giá bằng cách quan sát các vòng tan máu trên đĩa thạch máu. Kết quả, cả 3 chủng vi khuẩn này đều không để lại biểu hiện hoạt tính làm tan máu trên đĩa thạch trong điều kiện thử nghiệm.

Kết quả này cũng tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây như chủng *B. velezensis* GSBZ09 được sử dụng để kiểm soát sinh học ngăn chặn bệnh thối trắng nho do *Coniella vitis* gây ra (Yin et al., 2022) hay chủng *B. velezensis* LB-Y-1 cũng không làm tan hồng cầu và có khả năng sản xuất nhiều loại enzyme bao gồm protease, cellulase, phytase, amylase (Li et al., 2023).

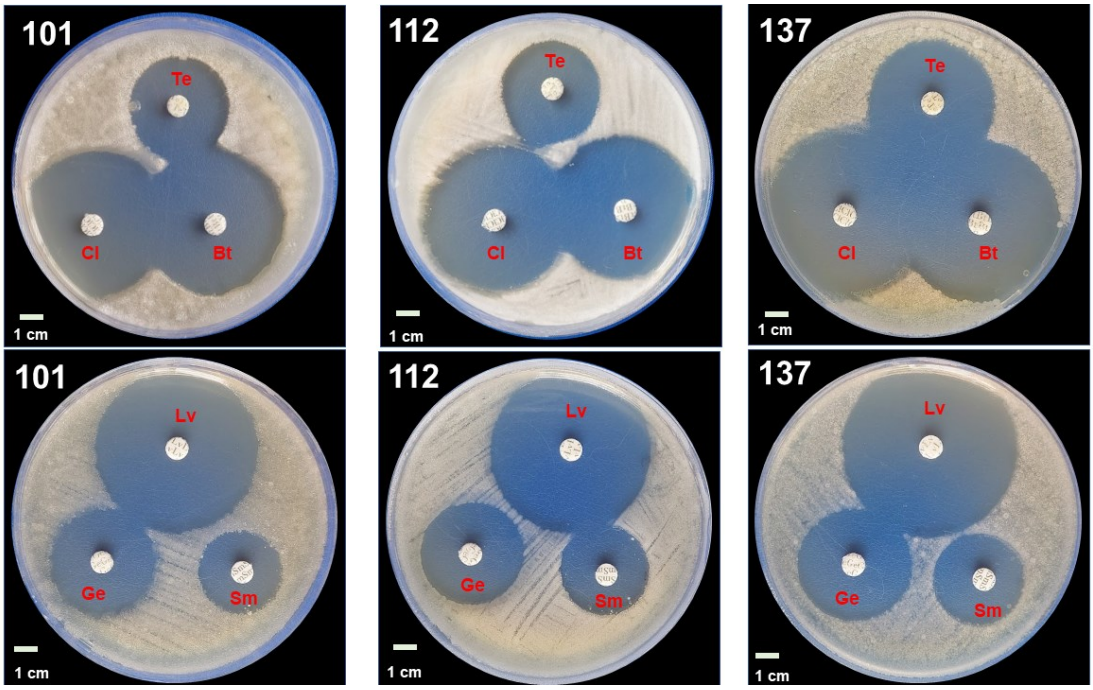
3.2.8.2. Độ nhạy cảm với kháng sinh

Độ nhạy cảm kháng sinh của 3 chủng *Bacillus* phân lập *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đã được khảo sát với 6 loại kháng sinh tetracyline (Te – 30 µg), chloramphenicol (Cl - 30 µg), trimethoprim (Bt – 25 µg), levofloxacin (Lv-5 µg), gentamicin (Ge-10 µg) và streptomycin (Sm-10 µg), kết quả thể hiện ở Bảng 3.18. và Hình 3.23.

Bảng 3.18. *Tính mẫn cảm với kháng sinh của các chủng B. siamensis 101, B. siamensis 112 và B. velezensis 137*

Loại kháng sinh	Đường kính vòng ức chế (mm) và sự mẫn cảm					
	***B. siamensis* 101**		***B. siamensis* 112**		***B. velezensis* 137**	
Tetracyline (30 µg)	27,7 ± 0,6	**S**	28,3 ± 0,4	**S**	34,7 ± 0,3	**S**
Chloramphenicol (30 µg)	43,3 ± 0,5	**S**	42,3 ± 0,3	**S**	46,3 ± 0,6	**S**
Trimethoprim (25µg),	41,7 ± 0,3	**S**	41,0 ± 0,3	**S**	44,7 ± 0,3	**S**
Levofloxacin (5 µg),	47,0 ± 0,4	**S**	46,0 ± 0,5	**S**	48,7 ± 0,6	**S**
Gentamicin (10 µg)	31,3 ± 0,7	**S**	28,3 ± 0,3	**S**	31,0 ± 0,5	**S**
Streptomycin (10 µg)	23,7 ± 0,5	**S**	25,7 ± 0,4	**S**	25,3 ± 0,2	**S**

Ghi chú: Kháng (R); Trung gian (I) và Mẫn cảm (S). Giá trị ngưỡng kháng sinh (breakpoint) của Bacillus spp. Độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng Bacillus được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa kháng sinh trên môi trường Mueller–Hinton agar, tham khảo nguyên tắc thử nghiệm của CLSI (2016). Đường kính vòng ức chế được ghi nhận bằng milimét (mm) để đánh giá mức độ ức chế sinh trưởng của vi khuẩn trong điều kiện thí nghiệm. M ± SD: Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn.



Hình 3.23. *Độ nhạy cảm với kháng sinh của B. siamensis 101, B. siamensis 112 và B. velezensis 137 sau 24 giờ nuôi cấy ở 30 °C*

Kết quả ở Bảng 3.18 cho thấy cả 3 chủng *Bacillus* là *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều mẫn cảm với 6 loại kháng sinh thử nghiệm. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu về hiện tượng kháng sinh của *Bacillus* của nhiều tác giả. Trong nghiên cứu về khả năng kiểm soát bệnh thối trắng nho do *Coniella vitis* bằng chủng tiềm năng *B. velezensis* GSBZ09, tác giả ghi nhận chủng GSBZ09 không thể hiện tính kháng đối với nhiều loại kháng sinh như chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, gentamicin, vancomycin, kanamycin, ampicillin và rifampicin (Yin et al., 2022). Tương tự, *B. velezensis* LB-Y-1 được lựa chọn làm chế phẩm sinh học nhạy cảm với 24 loại kháng sinh thường dùng, có thể tạo ra nhiều enzyme và không làm tan tế bào máu (Ajuna et al., 2023). Trong khi đó, nghiên cứu về chủng phân lập và cơ chế ức chế nấm gây bệnh đạo ôn lúa của *B. siamensis* B-612 cho thấy, chủng B-612 chỉ kháng với erythromycin (15 μg) nhưng lại nhạy cảm với hầu hết các loại kháng sinh được thử nghiệm, bao gồm penicillin (10 μg), qxacillin (30 μg), ampicillin (10 μg), carbenicillin (100 μg), piperacillin (100 μg), cephalexin (30 μg), cefamezin (30 μg), cefradine (30 μg), cefuroxim (30 μg), ceftazidime (30 μg), ceftriaxone (30 μg), cefoperazone (75 μg), doxycycline (30 μg), amikacin (30 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), neomycin (30 μg), tetracycline (30 μg) và minocycline (30 μg) (Y. Yang et al., 2023). Việc đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh là một trong những nội dung quan trọng khi xem xét đặc tính an toàn của các chủng *Bacillus* có tiềm năng ứng dụng sinh học. Heo et al. (2022) đã khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của 123 chủng *B. velezensis*, cung cấp cơ sở tham khảo cho việc đánh giá đặc tính nhạy cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn thuộc loài này.

Kết quả khảo sát cho thấy cả ba chủng *Bacillus* được lựa chọn đều mẫn cảm với 6 loại kháng sinh được khảo sát. Điều này chỉ ra rằng, cả 3 chủng nghiên cứu không mang gen kháng kháng sinh qua đó góp phần khả định mức độ an toàn sinh học khi làm giảm nguy cơ phát tán tính kháng kháng sinh ra môi trường. Kết quả nghiên cứu này cũng đem lại khả năng kiểm soát chủ động trong quá trình sản xuất và ứng dụng thực tế. Nếu trường hợp xảy ra sự cố sinh học ngoài ý muốn, các chủng *Bacillus* này có thể dễ dàng bị can thiệp y tế hoặc sinh học thông thường. Đây cũng là cơ sở bước đầu về tính an toàn, hỗ trợ cho việc lựa chọn các chủng *Bacillus* tiềm năng phục vụ phát triển chế phẩm sinh học. Tuy nhiên, theo các hướng dẫn đánh giá VSV hiện đại, việc đánh giá toàn diện nguy cơ kháng kháng sinh còn có thể bao gồm xác định MIC, phân tích gene kháng thuốc thu nhận và khả năng liên kết với các yếu tố di truyền di động. Các nội dung này cần được tiếp tục thực hiện khi phát triển các chủng thành chế phẩm thương mại.

3.2.8.3. Độc tính cấp tính đối với giun đất

Kết quả khảo sát ở các nồng độ 10^7, 10^8, 10^9 CFU/g đất khô, các chủng *Bacillus* về chỉ tiêu tỉ lệ tử vong và giảm sinh khối của giun đất được trình bày ở Bảng 3.19. Ở lô đối chứng, tỉ lệ chết và tỉ lệ giảm tổng sinh khối của giun đất lần lượt dưới 10 % và 20 %. Các giá trị này đáp ứng tiêu chí về tỉ lệ chết và hao hụt sinh khối ở đối chứng theo TCVN 5961:1995 (ISO 11268-1:1993) và ISO 11268-1:2012.

Sau 7 ngày phơi nhiễm, tỉ lệ chết của giun đất ở các nghiệm thức dao động từ 2,50% đến 5,00%, trong khi đối chứng đạt 5,00%. Phân tích bằng mô hình tuyến tính tổng quát với phân phối nhị thức cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ chết giữa các nghiệm thức (Likelihood Ratio $\chi^2 = 1,877$; df = 12; $p > 0,05$). Kết quả bước đầu cho thấy các nghiệm thức xử lý bằng *Bacillus* không làm gia tăng tỉ lệ chết của giun đất so với đối chứng trong 7 ngày khảo sát.

Sau 14 ngày phơi nhiễm, tỉ lệ chết của giun đất ở các nghiệm thức xử lý bằng *Bacillus* dao động từ 5,00% đến 7,50%, tương đương hoặc thấp hơn đối chứng (7,50%). Kết quả phân tích bằng mô hình tuyến tính tổng quát với phân phối nhị thức cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỉ lệ chết giữa các nghiệm thức (Likelihood Ratio $\chi^2 = 0,959$; df = 12; $p > 0,05$). Kết quả này cho thấy chưa phát hiện sự gia tăng tỉ lệ chết của giun đất ở các nghiệm thức xử lý so với đối chứng trong điều kiện khảo sát.

Bảng 3.19. *Ảnh hưởng của các chủng Bacillus tuyển chọn đến tỉ lệ chết và biến động khối lượng của giun đất (Eisenia fetida) sau 14 ngày thử nghiệm*

Loại	**Nồng độ vi khuẩn bổ sung (CFU/g)**	**Tỉ lệ chết trung bình (%)**		**Giảm khối lượng trung bình**	
		Ngày 7	**Ngày 14**	**Tỉ lệ (%)**	**p**
Đối chứng	0	5,00 ± 5,77	7,50 ± 9,57	10,85 ± 4,06	0,897
B. siamensis 101	10^7	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,68 ± 3,66	0,182
	10^8	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,79 ± 3,70	0,725
	10^9	2,50 ± 5,00	5,00 ± 5,77	10,69 ± 5,70	0,823
B. siamensis 112	10^7	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,99 ± 3,39	0,698
	10^8	2,50 ± 5,00	7,50 ± 9,57	10,73 ± 5,25	0,708
	10^9	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,95 ± 5,13	0,667
B. velezensis 137	10^7	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,90 ± 1,57	0,292
	10^8	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,71 ± 5,23	0,729
	10^9	2,50 ± 5,00	5,00 ± 5,77	10,86 ± 4,82	0,877
Hỗn hợp 3 dịch nuôi ba chủng *Bacillus*	10^7	5,00 ± 5,77	7,50 ± 5,00	10,62 ± 2,83	0,919
	10^8	5,00 ± 5,77	5,00 ± 5,77	10,73 ± 5,49	0,919
	10^9	2,50 ± 5,00	7,50 ± 9,57	10,29 ± 4,31	0,123

Ghi chú: M: Trung bình mẫu (Mean) và sự sai khác không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05 (Duncan's test); M ± SD: Trung bình mẫu ± Độ lệch chuẩn (n=4). So sánh với đối chứng bằng phép kiểm định Dunnett hai phía sau ANOVA một yếu tố.

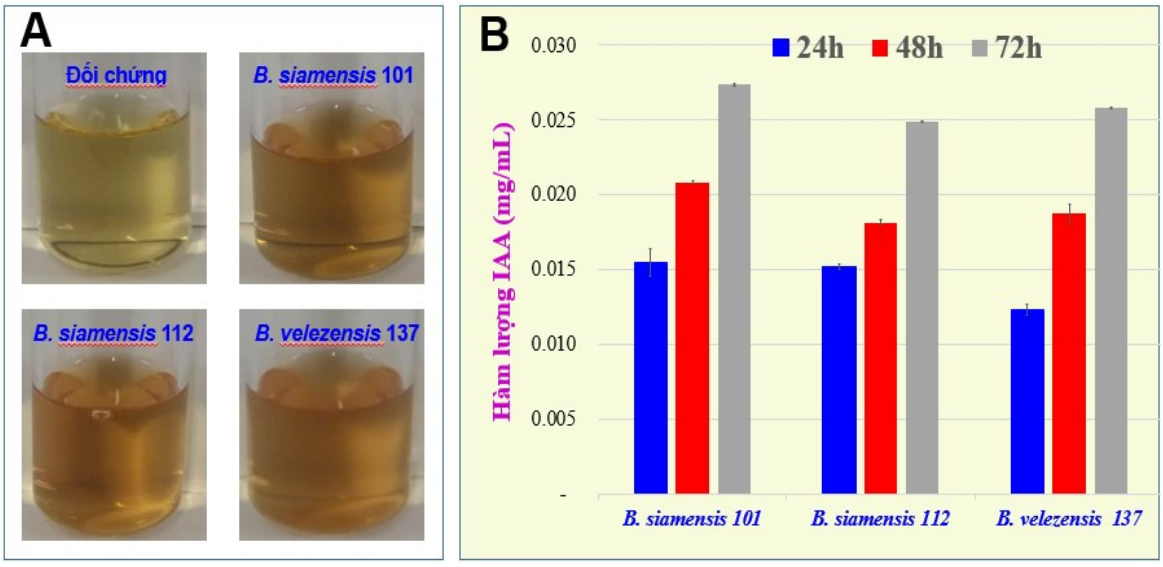
Bên cạnh đó, sau 14 ngày phơi nhiễm, tỉ lệ giảm tổng sinh khối giun đất ở các nghiệm thức xử lý bằng *Bacillus* dao động từ 10,29% đến 10,99%, trong khi đối chứng đạt 10,85%. Phân tích phương sai một yếu tố cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ($F(12,39) = 0,007$; $p > 0,05$). Kết quả so sánh Dunnett

cũng chưa phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa từng nghiệm thức xử lý và đối chứng ($p > 0,05$). Như vậy, chưa ghi nhận sự gia tăng đáng kể về mức giảm tổng sinh khối giun đất ở các nghiệm thức xử lý trong điều kiện khảo sát.

Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các công bố trước đây về ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* đến động vật đất. Nghiên cứu với ảnh hưởng của *B. amyloliquefaciens* UCMB5113 trên hai loài giun đất *Aporrectodea caliginosa* và *A. longa* được thực hiện bằng 3 cách (qua thức ăn, trộn vào đất, ngâm trực tiếp), kết quả cho thấy không có sự khác biệt về tỉ lệ sống sót, sinh trưởng và sinh sản ngay cả khi sử dụng nồng độ cao tương đương với mức có thể gặp trong sản xuất nông nghiệp (Lagerlöf et al., 2015). Trên cây chuối, việc phối hợp *B. velezensis* HN03 với phân trùn quế góp phần làm giảm mức độ bệnh héo do *Fusarium*, đồng thời tác động đến cấu trúc cộng đồng vi sinh vật và điều kiện dinh dưỡng đất (Wu et al., 2020). Trên cây dưa hấu, *B. velezensis* WB làm tăng khả năng ức chế bệnh héo do *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* trong đất không khử trùng, có liên quan đến sự gia tăng độ phong phú của các nhóm vi khuẩn Hyphomicrobiaceae và Chitinophagaceae (Luo et al., 2023). Xiao et al. (2026) ghi nhận rằng việc bổ sung *Bacillus* spp., riêng lẻ hoặc kết hợp với giun đất, có thể cải thiện một số đặc tính dinh dưỡng và hoạt tính enzyme của đất, đồng thời làm thay đổi cấu trúc quần xã vi sinh vật. Những kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng *Bacillus* spp. trong cải thiện chất lượng đất và hỗ trợ phát triển nền nông nghiệp bền vững.

3.2.8.4. Khả năng sinh IAA

Khả năng sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA) của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 được trình bày ở Hình 3.24. Trong khoảng thời gian từ 24 - 72 giờ nuôi cấy cho thấy, cả ba chủng *Bacillus* đều có khả năng sản xuất IAA, với hàm lượng tăng dần theo thời gian và đạt mức cao nhất sau 72 giờ. Cụ thể, sau 72 giờ, chủng *B. siamensis* 101 đạt hàm lượng IAA cao nhất là 0,027 mg/mL, tiếp theo là *B. velezensis* 137 (0,026 mg/mL) và *B. siamensis* 112 (0,025 mg/mL). Sự khác biệt về hiệu suất sản xuất IAA giữa các chủng sau 72 giờ là không đáng kể, cho thấy cả ba chủng *Bacillus* đều có tiềm năng trong việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Hình PL7.1 ở Phụ lục VII.



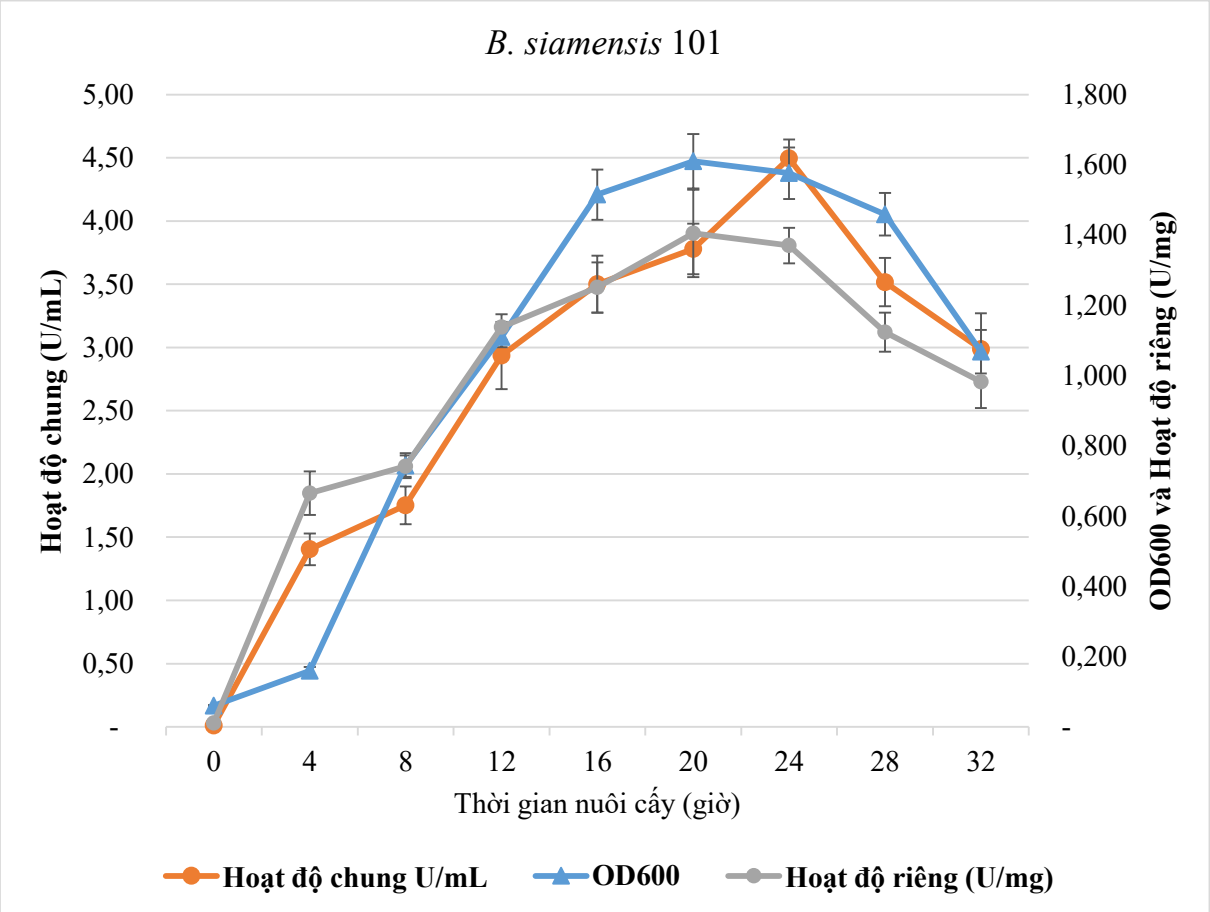
Hình 3.24. *Định tính khả năng sinh Indole-3-acetic acid (IAA) của ba chủng Bacillus được tuyển chọn (**A**), xác định hàm lượng IAA (**B**)*

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với các công bố trước đây. Chẳng hạn như, Yin et al. (2022) đã báo cáo chủng *B. velezensis* GSBZ09 được phân lập từ cây nho có khả năng sinh IAA, siderophore, hòa tan lân, sinh các enzyme ngoại bào cellulase, protease, amylase và lipase và có hoạt tính đối kháng với nhiều loại nấm bệnh và vi khuẩn gây bệnh trên nho.

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

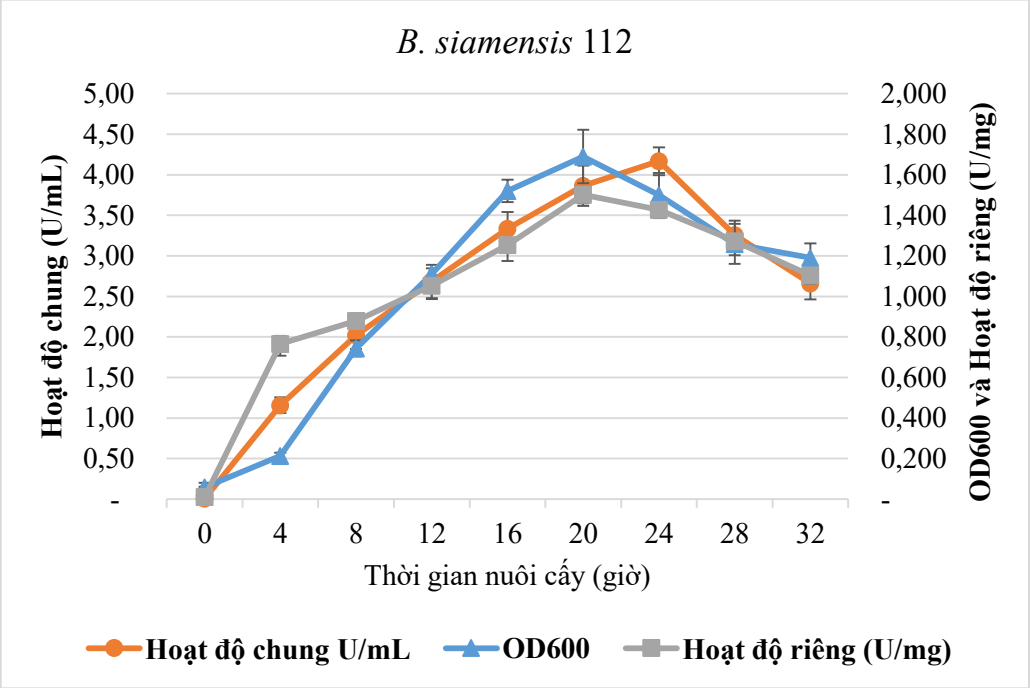
3.3.1. Sự biến đổi hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase theo thời gian nuôi cấy

Ba chủng *Bacillus* tuyển chọn được nuôi riêng rẽ trong môi trường khoáng bổ sung 1% curdlan làm chất cảm ứng để sản xuất β-1,3-glucanase. Trong 32 giờ khảo sát, hoạt độ β-1,3-glucanase của ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 đều có xu hướng tăng trong 24 giờ đầu nuôi cấy, sau đó giảm dần ở các thời điểm tiếp theo. Sinh trưởng của các chủng thể hiện qua giá trị OD_{600}, đạt cực đại vào khoảng 20 giờ nuôi cấy. Đối với chủng *B. siamensis* 101, kết quả trình bày ở Hình 3.25 cho thấy hoạt độ enzyme tăng theo thời gian nuôi cấy và đạt giá trị tối đa 4,49 U/mL sau 24 giờ. Hoạt độ riêng đạt cực đại 1,40 U/mg tại thời điểm 20 giờ, trùng với thời điểm giá trị OD_{600} đạt mức cao nhất.



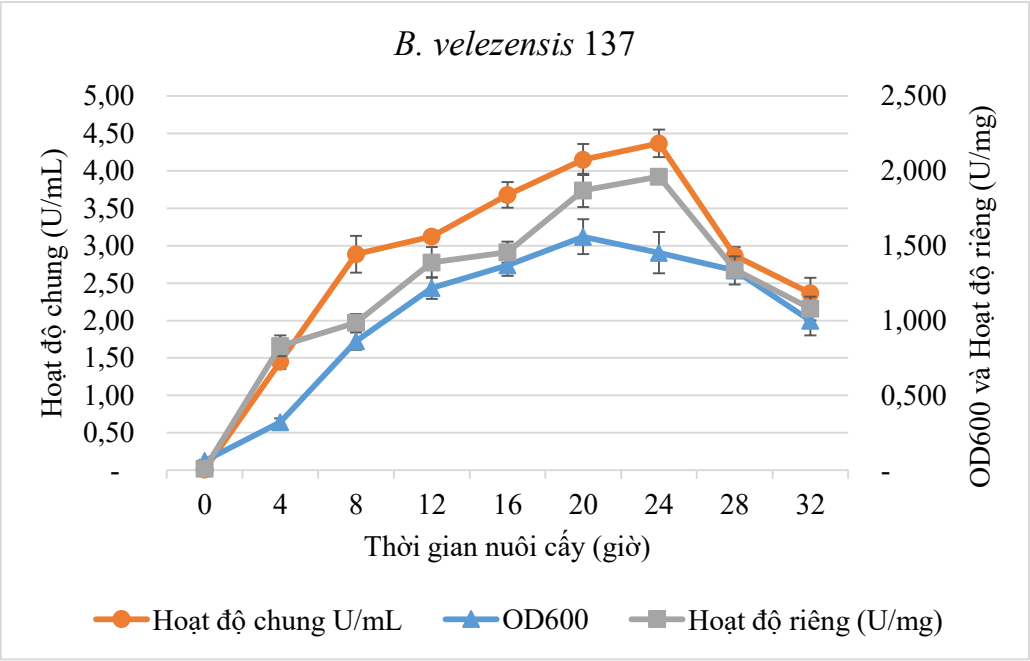
Hình 3.25. *Hoạt độ β-1,3-glucanase của B. siamensis 101 theo thời gian nuôi cấy*

Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của chủng *B. siamensis* 112 tăng trong 24 giờ đầu nuôi cấy và đạt giá trị cực đại 4,17 U/mL sau 24 giờ. Hoạt độ riêng đạt cực đại 1,50 U/mg tại thời điểm 20 giờ nuôi cấy, trong khi giá trị OD_{600} cũng đạt mức cao nhất vào khoảng 20 giờ nuôi cấy (Hình 3.26).



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

Đối với chủng *B. velezensis* 137, hoạt độ chung và hoạt độ riêng đều tăng trong 24 giờ nuôi cấy ban đầu, giá trị đỉnh của hoạt độ chung là 4,37 U/mL, giá trị đỉnh của hoạt độ riêng là 1,96 U/mg, giá trị OD_{600} đạt đỉnh lúc sau 20 giờ nuôi cấy (Hình 3.27).



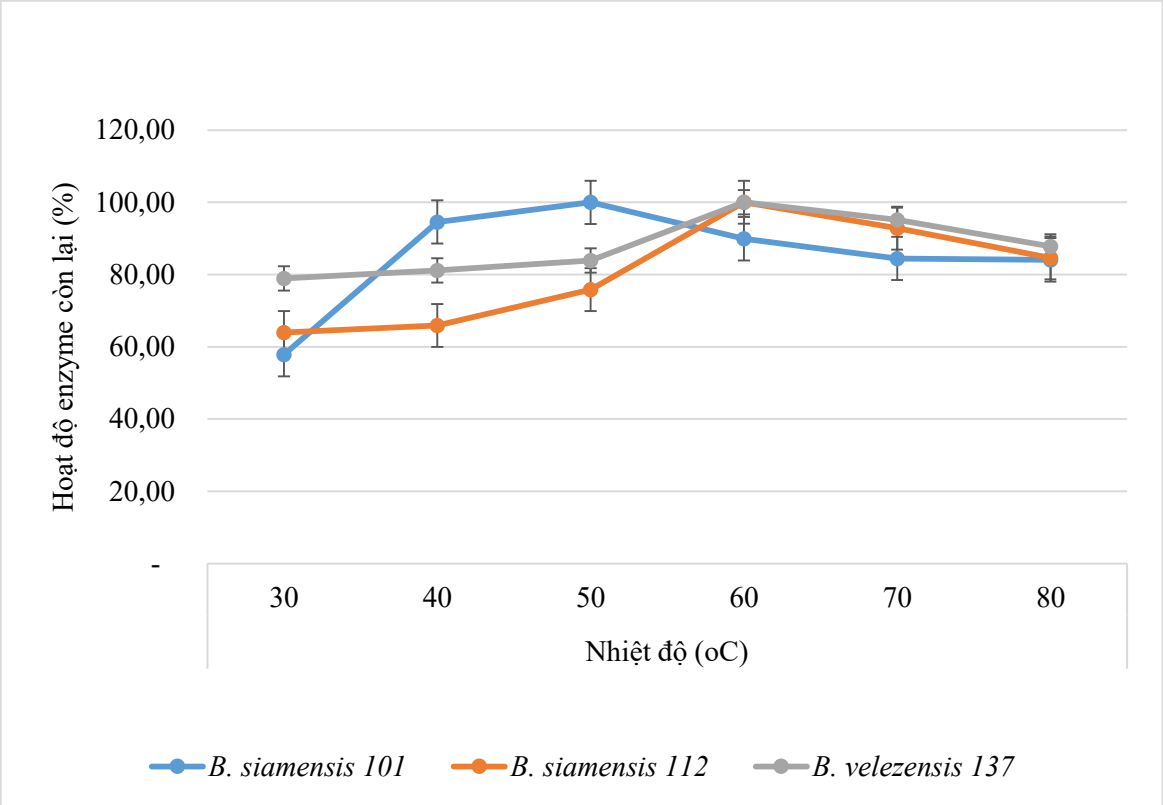
Hình 3.27. *Hoạt độ β-1,3-glucanase của B. velezensis 137 theo thời gian nuôi cấy*

Như vậy, trong ba chủng *Bacillus* được khảo sát, chủng *B. siamensis* 101 có hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase cao nhất và ổn định hơn trong 24 giờ, chủng *B. velezensis* 137 có ưu thế đạt mức cao ở giai đoạn sớm, chủng *B. siamensis* 112 ở thấp hơn hai chủng *B. siamensis* 101 và *B. velezensis* 137. Thời gian phù hợp nuôi cấy 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* để thu enzyme β-1,3-glucanase là 20-24 giờ.

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

3.3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Nhiệt độ ảnh hưởng đến sự ổn định về cấu trúc của trung tâm phản ứng của enzyme, do đó ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme. Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hoạt độ của enzyme được thể hiện ở 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*

Hình 3.28 cho thấy, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng đều thay đổi theo nhiệt độ, đạt giá trị cực đại ở khoảng 50 - 60 ºC, sau đó hoạt độ giảm dần khi nhiệt độ tiếp tục tăng.

Đối với chủng *B. siamensis* 101, hoạt độ enzyme tăng khi nhiệt độ tăng từ 30 °C - 50 °C và đạt cực đại tại 50 °C. Khi nhiệt độ vượt quá 60 °C, hoạt độ enzyme giảm dần nhưng vẫn duy trì trên 84% so với giá trị cực đại. Kết quả cho thấy enzyme của chủng này hoạt động hiệu quả trong khoảng nhiệt độ 40 - 50 °C, với nhiệt độ tối ưu là 50 °C.

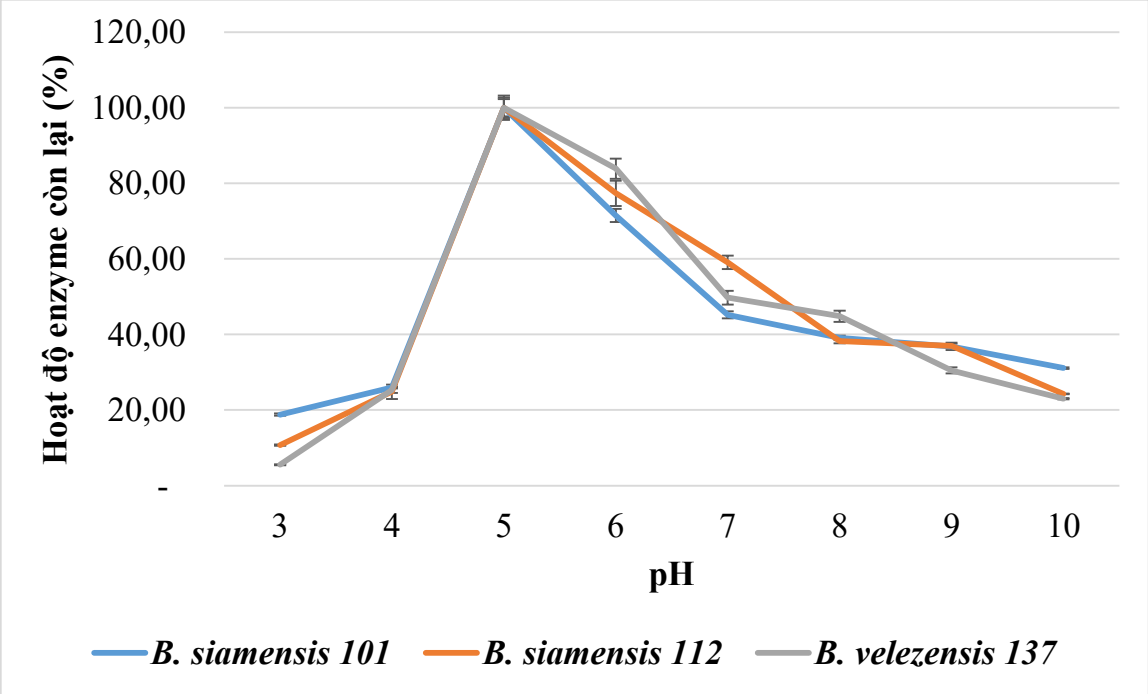
Trong khi đó, hai chủng *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137, hoạt độ enzyme đều đạt cực đại ở 60 °C, sau đó giảm dần khi nhiệt độ tiếp tục tăng. Ở chủng *B. siamensis* 112, hoạt độ enzyme tăng trong khoảng 30 °C đến 60 °C, sau đó giảm nhưng vẫn duy trì trên 84% tại 80 °C. Đối với chủng *B. velezensis* 137, hoạt độ enzyme tăng từ khoảng

60% lên 100% khi nhiệt độ tăng từ 40 °C đến 60 °C, rồi giảm xuống còn khoảng 87% ở 80 °C. Kết quả khảo sát thực nghiệm cho thấy, nhiệt độ phù hợp nhất cho sự biểu hiện hoạt tính enzyme của hai chủng *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 là 60 °C, đối với chủng *B. siamensis* 101 là 50 °C.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây về enzyme β-1,3-glucanase từ các loài *Bacillus*. Nogi & Horikoshi (1990) cho biết khả năng bền nhiệt của β-1,3-glucanase ngoại bào từ *Bacillus* sp. AG-430 có nhiệt độ tối ưu khoảng 60 °C - 65 °C và vẫn giữ tới 90% hoạt độ sau khi ủ ở 100 °C trong 10 phút. Khalid et al. (2021) báo cáo *B. velezensis* Y1 có β-glucanase tối ưu ở 65 °C. Putri et al. (2021) báo cáo β-glucanase của *B. subtilis* W3.15 có hoạt độ tối ưu trong khoảng 60 °C - 80 °C và có khả năng đối kháng mạnh với *F. oxysporum*.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Hoạt độ của enzyme còn phụ thuộc vào các nhóm chức năng liên quan đến quá trình gấp cuộn của chuỗi polypeptide. Các nhóm chức năng này được cho rằng nhạy cảm với độ pH. Chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của các enzyme β-1,3-glucanase của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Hình 3.29.



Hình 3.29. *Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase*

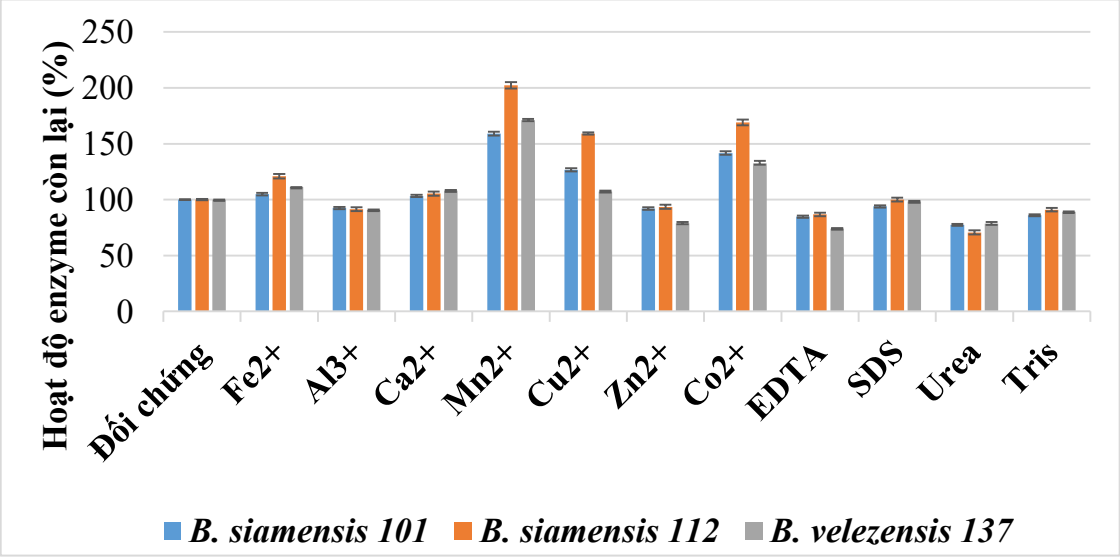
Trong khoảng pH 3,0 đến10,0, β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus* đạt hoạt độ cực đại tại pH 5,0 (100%) và giảm mạnh ở pH quá axit hoặc quá kiềm. Chủng *B. siamensis* 101, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase đạt ở mức thấp (18,79 % và 25,95 %) ở các giá trị pH 3,0 và pH 4,0; hoạt độ đạt cực đại (100 %) ở pH 5,0, sau đó giảm xuống còn 71,49 % ở pH 6,0 và 45,21 % ở pH 7,0; hoạt độ tiếp tục giảm xuống khi pH chuyển sang kiềm 39,08 % (pH 8,0), 36,84 % (pH 9,0) và 31,10 % (pH 10,0). Kết quả cho thấy, enzyme từ chủng *B. siamensis* 101 hoạt động phù hợp trong khoảng pH 4,0 đến 5,0 và

hoạt độ giảm dần sau khi đạt cực đại ở pH 5,0. Chủng *B. siamensis* 112, hoạt độ cũng đạt mức thấp 10,71 % (pH 3,0) và 24,83 % (pH 4,0); đạt cực đại ở pH 5,0, sau đó giảm xuống còn 77,36 % (pH 6,0), 59,08 % (pH 7,0); hoạt độ tiếp tục giảm xuống còn 38,28 %, 37,00 % và 24,27 % tương ứng với các giá trị pH 8,0, pH 9,0 và pH 10,0. Chủng *B. velezensis* 137, hoạt độ chỉ đạt 5,53 % (pH 3,0) và 25,26 % (pH 4,0); đạt cực đại (100 %) ở pH 5,0, giảm xuống còn 83,89 % (pH 6,0); giảm mạnh xuống còn 49,74 % (pH 7,0), 44,83 % (pH 8,0), 30,50 % (pH 9,0) và 23,02 % (pH 10,0). Kết quả cho thấy β-1,3-glucanase từ ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều đạt cực đại ở pH 5,0.

Kết quả nghiên cứu này, tương đồng với báo cáo của Xu et al. (2016) trên *B. velezensis* ZJ20, trong đó enzyme tinh khiết thể hiện hoạt độ tối ưu tại pH 5,0 và duy trì ổn định trên dải pH rộng, đồng thời phá hủy cấu trúc sợi nấm bệnh. Khalid et al. (2021) đã ghi nhận chủng *B. velezensis* Y1 sản xuất β-glucanase với pH tối ưu khoảng 6,0. Caseiro et al. (2022) báo cáo pH tối ưu của β-1,3-glucanase khoảng 5,0 đến 6,5. Tương tự, Quang et al. (2024) báo cáo β-1,3-glucanase từ *P. polymyxa* AT4 cho hoạt độ tối ưu ở pH 6,0 và duy trì ổn định trong khoảng pH 5,0 đến 7,0.

3.3.2.3. Ảnh hưởng của ion kim loại và các chất hóa học đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase

Các ion kim loại và các chất hóa học khi có mặt trong môi trường có thể làm tăng hoặc làm giảm hoạt tính của enzyme theo những cơ chế khác nhau. Do đó, việc xác định được những ion kim loại, các chất hóa học nào ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme có ý quan trọng trong ứng dụng vào thực tiễn. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng ion kim loại và các chất hóa học đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 được thử nghiệm với Fe^{2+}, Al^{3+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, EDTA, SDS, Urea và Tris, kết quả nghiên cứu được trình bày ở 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*

Hoạt độ β-1,3-glucanase của cả ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 lên 132 – 202 % so với đối chứng khi có mặt Mn^{2+} và Co^{2+}. Trong đó, xử lý với ion Mn^{2+}, hoạt độ enzyme đạt tới 202,36 % ở chủng *B. siamensis* 112, đạt 171,18 % ở chủng *B. velezensis* 137 và đạt 159,11 % ở chủng *B. siamensis* 101. Tương tự, xử lý với ion Co^{2+}, hoạt độ enzyme của các chủng 112, 137 và 101 đạt được tương ứng là 169,15 %, 132,41% và 141,71 %. Trong khi đó, các ion Ca^{2+}, Cu^{2+} làm tăng nhẹ hoạt độ enzyme (104 – 121 %). Ngược lại, các ion như Al^{3+}, Zn^{2+} có xu hướng làm giảm hoạt độ enzyme xuống thấp hơn so với đối chứng, chỉ đạt khoảng 78 – 93 %. Xử lý với Al^{3+} hoạt độ enzyme của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đạt được lần lượt là 92,53 %, 91,46 % và 90,67 %; xử lý với Zn^{2+} hoạt độ enzyme của các chủng 101, 112 và 135 đạt được lần lượt là 91,93 %, 93,59 % và 78,89 %. Đối với các hóa chất, EDTA, Urea và Tris đều làm giảm đáng kể hoạt độ của 3 chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 xuống còn 70 – 91 %. Riêng SDS có sự khác biệt đáng kể, duy trì hoạt độ 100 % ở *B. siamensis* 112, làm giảm hoạt độ enzyme của *B. siamensis* 101 (93,92 %) và *B. velezensis* 137 (98,33 %).

So sánh với các nghiên cứu đã được công bố, kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng. Có thể thấy hoạt độ của enzyme β-1,3-glucanase bị tác động bởi các loại ion kim loại, các chất hóa học khác nhau và còn tùy theo loài VSV và môi trường sống. Khi có mặt của kim loại Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} làm hoạt tính của enzyme sẽ tăng mạnh, nguyên nhân có thể do các ion này đóng vai trò tham gia vào hoạt động xúc tác tại trung tâm hoạt động của enzyme. Ngược lại, EDTA, Urea, Tris có thể đóng vai trò như chất kìm hãm và làm giảm hoạt tính của enzyme. Enzyme β-1,3-glucanase ngoại bào của *B. clausii* NM-1 phân lập từ bào ngư *Haliotis discus hannai* có hoạt động rất ổn định ở pH 5,3-11,5. Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của enzyme tăng lên khi có $CaCl_2$ (Miyanishi et al., 2003). Enzyme β-1,3-glucanase từ loài nấm *Penicillium expansum* được biểu hiện trong *E. coli* có nhiệt độ hoạt động tối ưu là 55 ^oC, pH 6,0. Đệm Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 (pH 6,0), SDS, TritonX-100 và một số ion kim loại (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+} và Zn^{2+}) có tác dụng ức chế hoạt động enzyme và NaCl giúp tăng cường hoạt động enzyme (Wang. et al., 2023).

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

3.3.3.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng, sinh tổng hợp β-1,3-glucanase của ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 được thực hiện theo mục 2.2.5.3. Các chủng được nuôi trong môi trường khoáng theo Dewi et al. (2016), bổ sung 1% bột ngô, bột đại mạch, bột lúa mì hoặc curdlan trong 24 giờ. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.20.

Bảng 3.20. *Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase*

Nguồn cacbon	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)
Bột ngô	**3,56±0,04 [a]**	**5,93±0,82 [a]**	**1,79±0,05 [a]**	**7,13±0,90 [a]**	**2,82±0,03 [a]**	**7,20±1,03 [a]**
Đại mạch	2,59±0,03 [c]	4,04±0,43 [c]	**1,74±0,03 [a]**	**6,71±1,72 [a]**	1,23±0,03 [c]	5,00±1,51 [c]
Lúa mì	3,15±0,01 [b]	5,21±0,50 [b]	0,93±0,04 [b]	5,02±0,23 [b]	1,69±0,02 [b]	6,00±1,14 [b]
Curdlan	**3,54±0,02 [a]**	**6,13±0,61 [a]**	**1,80±0,06 [a]**	**7,24±0,31 [a]**	**2,84±0,07 [a]**	**7,30±0,70 [a]**

Ghi chú: 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.

Bảng 3.20 cho thấy ba chủng *Bacillus* đều sinh trưởng và sinh β-1,3-glucanase trên bốn nguồn cacbon khảo sát, với hoạt độ enzyme đạt từ 0,93 đến 3,56 U/mL. *B. siamensis* 101 có hoạt độ cao nhất trên cả bốn cơ chất. Bột ngô cho hoạt độ β-1,3-glucanase cao nhất ở cả ba chủng (1,79–3,56 U/mL) và gần tương đương curdlan sau 24 giờ nuôi cấy. Do dễ tìm và chi phí thấp hơn, bột ngô được chọn làm nguồn cacbon cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.3.2. Ảnh hưởng của loại môi trường nuôi cấy

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và hoạt độ β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* được khảo sát theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.5.3. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.21.

Bảng 3.21. *Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

Môi trường	*B. siamensis* 101		*B. siamensis* 112		*B. velezensis* 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)
MPB	2,82±0,50 [c]	**5,30±1,02 [a]**	2,07±0,22 [c]	**7,01±1,31 [a]**	2,44 ±0,20 [c]	**6,72±1,22 [a]**
NB	3,67±0,39 [b]	**4,81±0,62 [a]**	3,62±0,21 [b]	**6,52±1,72 [a]**	3,29±0,22 [b]	**5,23±1,23 [a]**
LB	**4,58±0,20 [a]**	**7,52±0,34 [a]**	**4,15±0,30 [a]**	**9,73±0,33 [a]**	**4,30±0,33 [a]**	**8,54±0,51 [a]**
NBY	2,18±0,11 [c]	**4,51±0,61 [a]**	2,42±0,10 [c]	**7,33±0,84 [a]**	2,19±0,12 [c]	**5,31±0,34 [a]**

Ghi chú: 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. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô; 10 % giống, 30 °C, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Kết quả ở Bảng 3.21 cho thấy môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137. Ở cả ba chủng, hoạt độ enzyme thay đổi rõ rệt giữa các môi trường, trong đó môi trường LB cho kết quả cao nhất. Cụ thể, hoạt độ enzyme của chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 trong môi trường LB lần lượt đạt 4,58; 4,15 và 4,30 U/mL, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các môi trường MPB, NB và NBY. Trong khi đó, môi trường NBY cho hoạt độ enzyme thấp nhất, chỉ đạt từ 2,18–2,42 U/mL.

Về sinh khối, mật độ tế bào vi khuẩn dao động trong khoảng $4,5\times10^9$ đến $9,7\times10^9$ CFU/mL, cho thấy các chủng *Bacillus* đều có khả năng sinh trưởng tốt trong các loại môi trường được khảo sát. Tuy nhiên, sinh khối cao nhất được ghi nhận ở môi trường LB (7,5 - $9,7\times10^9$ CFU/mL), tiếp đến là NB (4,8 - $6,5\times10^9$ CFU/mL), MPB và NBY có sinh khối thấp hơn nhưng không sai khác có ý nghĩa thống kê so với NB.

Như vậy, môi trường LB vừa đảm bảo khả năng phát triển tế bào mạnh, vừa kích thích quá trình sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase cao nhất. Nguyên nhân có thể do thành phần dinh dưỡng của môi trường LB (peptone và cao nấm men) cung cấp đầy đủ nguồn cacbon và nitơ dễ hấp thu, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp enzyme ngoại bào. Các môi trường khác như MPB hay NBY có thể thiếu các yếu tố dinh dưỡng hoặc không cân bằng về nguồn dinh dưỡng, dẫn đến hoạt tính enzyme thấp hơn.

Kết quả này cho thấy LB là môi trường phù hợp cho sự sinh trưởng ban đầu của các chủng *Bacillus* nghiên cứu, được lựa chọn để triển khai các khảo sát chi tiết về điều kiện nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung

Ba nguồn nitơ hữu cơ gồm cao nấm men, tripton và peptone (nồng độ 1,0 %) được thêm vào môi trường nuôi cấy các chủng *Bacillus* được tuyển chọn theo phương pháp ở mục 2.2.5.3. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 3.22.

Bảng 3.22. *Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

Nguồn nitơ	***B. siamensis* 101**		***B. siamensis* 112**		***B. velezensis* 137**	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)
Cao nấm men	**4,88±0,21^a**	**7,64±0,33^a**	**4,20±0,60^a**	**9,12±0,52^a**	**4,36±0,52^a**	**8,74±0,30^a**
Tripton	3,04±0,40^b	5,41±0,30^b	2,99±0,51^c	8,10±0,61^b	3,03±0,20^b	6,32±0,22^c
Peptone	3,39±0,24^b	5,50±0,31^b	3,15±0,10^b	8,72±0,70^b	3,34±0,22^b	7,80±0,54^b

Ghi chú: 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. Điều kiện lên men: 1 % (w/v) bột ngô; 10 % giống, 30 ^oC, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Dữ liệu ở Bảng 3.20 cho thấy, cả ba chủng đều sinh trưởng tốt và tích luỹ enzyme β-1,3-glucanase cao nhất khi được nuôi cấy với cao nấm men. Hoạt độ enzyme và sinh khối tương ứng của chủng *B. siamensis* 101 là 4,88 U/mL, $7,6\times10^9$ CFU/mL; chủng *B. siamensis* 112 là 4,02 U/mL, $9,1\times10^9$ CFU/mL và *B. velezensis* 137 là 4,36 U/mL, $8,7\times10^9$ CFU/mL. So sánh giữa các chủng cho thấy *B. siamensis* 101 có hoạt độ enzyme cao nhất, chứng tỏ khả năng cảm ứng mạnh hơn so với *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 ($p < 0,05$). Do đó, cao nấm men đã được lựa chọn làm nguồn nitơ chủ đạo nhờ khả năng thúc đẩy đồng thời sự tăng trưởng sinh khối và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase cho cả ba chủng *Bacillus*.

3.3.3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống

Tỉ lệ cấy giống ảnh hưởng đến mật độ tế bào vi khuẩn, ảnh hưởng đến thời gian pha lag, do đó ảnh hưởng đến sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp enzyme của tế bào. Để thăm dò ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase chúng tôi tiến hành nuôi cấy ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đã được tuyển chọn với tỉ lệ cấy giống lần lượt là 1 %, 5 %, 7 % và 10 %. Kết quả nghiên cứu ở Bảng 3.23 cho thấy, tỉ lệ cấy giống từ 1 % đến 10% ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và sinh khối ba chủng *Bacillus.*

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)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào ($x10^9$ CFU/mL)
1	$0,93\pm0,44^c$	$1,51\pm0,21^b$	$1,70\pm0,20^c$	$2,40\pm0,41^b$	$1,88\pm0,51^c$	$1,81\pm0,34^b$
5	$3,89\pm0,23^b$	$\mathbf{7,20\pm0,61^a}$	$\mathbf{3,92\pm0,21^a}$	$\mathbf{8,40\pm0,31^a}$	$3,90\pm0,11^b$	$\mathbf{7,33\pm0,54^a}$
7	$\mathbf{4,98\pm0,11^a}$	$\mathbf{7,71\pm0,43^a}$	$\mathbf{4,32\pm0,20^a}$	$\mathbf{8,50\pm0,22^a}$	$\mathbf{4,39\pm0,41^a}$	$\mathbf{8,80\pm0,41^a}$
10	$\mathbf{3,92\pm0,12^a}$	$\mathbf{7,42\pm0,41^a}$	$3,72\pm0,24^b$	$\mathbf{8,11\pm0,63^a}$	$3,80\pm0,40^b$	$\mathbf{8,32\pm0,32^a}$

Ghi chú: 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. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô ; 1 % (w/v) cao nấm men, 30 °C, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Bảng 3.23 cho thấy, tỉ lệ cấy giống 7 % (v/v) là phù hợp nhất cho sinh trưởng và tích lũy enzyme β-1,3-glucanase đối với cả ba chủng *Bacillus*. Tại điều kiện này, hoạt độ enzyme đạt mức cao nhất, cụ thể: chủng *B. siamensis* 101 đạt 4,98 U/mL, chủng *B. siamensis* 112 đạt 5,32 U/mL và chủng *B. velezensis* 137 đạt 5,39 U/mL. Các giá trị này khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các tỉ lệ cấy giống còn lại, điều này cho thấy 7 % là ngưỡng cấy giống thích hợp để đạt hiệu suất sinh tổng hợp enzyme cao nhất.

Khi tiếp tục tăng tỉ lệ cấy giống lên 10 %, hoạt độ enzyme có xu hướng giảm mạnh, chỉ còn 3,92 U/mL (chủng *B. siamensis* 101) và 3,72 U/mL (chủng *B. siamensis*

112). Sự suy giảm này có thể do mật độ tế bào quá cao dẫn đến sự cạnh tranh và cạn kiệt nhanh chóng nguồn dinh dưỡng, đồng thời sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp có thể gây ức chế ngược quá trình sinh tổng hợp β-1,3-glucanase. Ngược lại, tại các tỉ lệ cấy giống thấp hơn 7 %, hoạt lực enzyme thu được cũng không cao, dao động trong khoảng từ 1,70 U/mL đến 3,92 U/mL. Mật độ tế bào dao động từ $1,5\times10^9$ đến $8,8\times10^9$ CFU/mL. Tỉ lệ cấy giống 1% cho mật độ tế bào khác biệt có ý nghĩa thống kê, trong khi các mức 5%, 7% và 10% không khác biệt có ý nghĩa ở cả ba chủng. Với kết quả thu được như trên, chúng tôi lựa chọn tỉ lệ cấy giống 7 % (v/v) để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến sinh trưởng và hoạt độ β-1,3-glucanase của vi khuẩn. Kết quả ở Bảng 3.24 cho thấy cả ba chủng *Bacillus* đạt hoạt độ enzyme cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy. Trong đó, hoạt độ enyzme của chủng *B. siamensis* 101 đạt cao nhất là 5,15 U/mL, chủng *B. siamensis* 112 là 4,40 U/mL và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các thời điểm khảo sát khác. Riêng chủng *B. velezensis* 137, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase đạt cao nhất trong thời điểm khảo sát 24 giờ (4,41 U/mL) và 36 giờ (3,9 U/mL), chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.24. *Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh tổng hợp 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)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)
0	0,19±0,10^c	0,00002±0,3^b	2,60±0,13^b	0,00002±0,51^b	0,58±0,33 ^{c}	0,000015±0,50^b
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**

Ghi chú: 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. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô; 1 % (w/v) cao nấm men, tỉ lệ cấy giống 7 %, 30 ^oC, pH 7,0, 150 rpm.

Về sinh khối, mật độ tế bào vi khuẩn dao động trong khoảng $3,6\times10^9$ đến $8,9\times10^9$ CFU/mL. Sinh khối cao nhất được ghi nhận trong 24 giờ đầu nuôi cấy đạt $7,5\times10^9$ CFU/mL với chủng *B. siamensis* 101, đạt $8,9\times10^9$ CFU/mL ở chủng *B. siamensis* 112 và $8,4\times10^9$ CFU/mL ở chủng *B. velezensis* 137.

Căn cứ vào kết quả này chúng tôi lựa chọn thời gian nuôi cấy là 24 giờ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ nuôi cấy là yếu tố đặc biệt quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng sinh khối và khả năng sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của VSV. Do đó, để xác định ngưỡng nhiệt độ phù hợp, cả ba chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong các điều kiện đã lựa chọn từ các khảo sát trước đó, với các dải nhiệt độ thay đổi khác nhau. Kết quả khảo sát được thể hiện chi tiết tại 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*

	***B. siamensis* 101**		***B. siamensis* 112**		***B. velezensis* 137**	
t°C	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (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]**

Ghi chú: 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. Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô ; 1 % (w/v) cao nấm men, tỉ lệ cấy giống 7 %, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Kết quả khảo sát thể hiện ở Bảng 3.25 cho thấy, khi tăng nhiệt độ từ 25 °C đến 30 °C thì sinh khối và hoạt độ enzyme của cả ba chủng *Bacillus* đều tăng. Ở nhiệt độ 30 °C, cả ba chủng đều ghi nhận mức sinh khối và hoạt độ enzyme cao nhất với các giá trị ở các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* 137 lần lượt là 5,24 U/mL, 4,49 U/mL và 4,52 U/mL. Khi tăng nhiệt độ lên 35 °C và 37 °C mặc dù sinh khối duy trì ở mức cao nhưng hoạt độ của enzyme giảm xuống rõ rệt, ghi nhận 2,91 U/mL ở chủng *B. siamensis* 101; 2,79 U/mL ở chủng *B. siamensis* 112 và 2,59 U/mL ở chủng *B. velezensis* 137. Điều này có thể là do suy giảm sinh tổng hợp enzyme hoặc biến tính prôtêin. Với kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi lựa chọn 30 °C cho các khảo sát thực nghiệm tiếp theo.

3.3.3.7. Ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy

pH môi trường nuôi cấy là yếu tố môi trường quan trọng có ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh tổng hợp enzyme của VSV. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng và tích lũy enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* được trình bày ở 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)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (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}

Ghi chú: 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. Điều kiện nuôi cấy: 1% (w/v) bột ngô; 1% (w/v) cao nấm men; tỉ lệ cấy giống 7%; 30 ^{o}C; 150 rpm; thời gian 24 giờ.

Kết quả ở Bảng 3.26 cho thấy cả ba chủng *Bacillus* có khả năng chịu được pH tương đối rộng từ pH 5,0 đến pH 8,0; sinh trưởng, phát triển tốt và hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase cao ở pH 6,5 và pH 7,0. Ở pH 5,0–6,0, sinh khối và hoạt độ enzyme đều thấp. Điều này có thể do môi trường axit không thuận lợi cho quá trình trao đổi chất của các chủng *Bacillus*. Khi môi trường nuôi cấy có pH trung tính, ghi nhận mật độ tế bào và cả hoạt độ enzyme đều tăng lên, trong đó tại pH 7,0 ghi nhận các giá trị cực đại ở cả ba chủng. Tuy nhiên, khi tăng lên pH 7,5 và pH 8,0, hoạt độ enzyme giảm rõ rệt và sinh khối cũng có xu hướng giảm, cho thấy ở môi trường kiềm nhẹ cũng làm giảm hoạt độ và giảm sự sinh trưởng. Xu hướng này được ghi nhận tương tự ở cả 3 chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137. Nhìn chung, pH phù hợp cho cả ba chủng nằm trong khoảng 6,5 đến 7,0, ở khoảng pH này vừa đảm bảo sinh trưởng tối đa, vừa thuận lợi cho sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase. Kết quả này cũng phù hợp với các *Bacillus* ưa môi trường trung tính. Do đó, pH 7,0 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.3.8. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc ảnh hưởng đến việc cung cấp oxi, mức độ phân tán tế bào, các chất trong môi trường nuôi cấy VSV. Qua đó, tốc độ lắc ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme ngoại bào, do đó cần xác định mức thích hợp cho nuôi cấy. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* được trình bày ở Bảng 3.27.

Bảng 3.27. *Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme β-1,3-glucanase của các chủng Bacillus*

Tốc độ lắc (rpm)	***B. siamensis* 101**		***B. siamensis* 112**		***B. velezensis* 137**	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)
100	2,28±0,79^c	1,34±0,31^b	2,02±0,45^c	**1,51±0,23^a**	2,17±0,91^c	**1,80±0,41^a**
150	**5,66±0,11^a**	**7,60±0,44^a**	**4,61±0,10^a**	**8,71±0,60^a**	**4,62±0,31^a**	**8,22±0,53^a**
180	4,55±0,28^b	**7,41±0,24^a**	3,90±0,39^b	**8,24±0,43^a**	3,86±0,44^b	**8,13±0,33^a**
200	3,79±0,82^b	**7,42±0,31^a**	3,76±0,63^b	**8,51±0,74^a**	3,59±0,50^b	**8,04±0,41^a**

Ghi chú: 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 (Standard deviation). Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô; 1 % (w/v) cao nấm men; giống 7 %, 30 °C, pH 7,0, thời gian 24 giờ.

Kết quả ở Bảng 3.27 cho thấy, ở tốc độ lắc 100rpm hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và sinh khối tế bào của cả ba chủng *Bacillus* đều được ở mức thấp dao động từ 1,3 - 2,8 ×10^9 CFU/mL và hoạt độ enzyme cũng thấp ở mức từ 2,02-2,28 U/mL. Tuy nhiên, khi tốc độ lắc tăng lên ở các giá trị 150, 180 và 200 rpm thì đều ghi nhận sinh khối của cả ba chủng tăng cao đạt từ 7,4 – 8,7 CFU/mL khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các giá trị ghi nhận ở tốc độ lắc 100 rpm. Ở tốc độ lắc 150 rpm, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng đều đạt cực đại, chủng *B. siamensis* 101 đạt 5,66 U/mL và sinh khối đạt 7,6 x 10^9 CFU/mL, chủng *B. siamensis* 112 đạt 4,61 U/mL và sinh khối đạt 8,7 x 10^9 CFU/mL, chủng *B. velezensis* 137 đạt 4,62 U/mL và sinh khối đạt 8,2 x 10^9 CFU/mL. Sự suy giảm khả năng sinh trưởng và sản xuất enzyme ở tốc độ lắc thấp có thể liên quan đến tình trạng hạn chế oxygen hòa tan, làm ảnh hưởng đến hoạt động trao đổi chất của tế bào. Khi tốc độ lắc được điều chỉnh tăng dần, hiệu quả chuyển khối oxygen và mức độ đồng nhất của môi trường nuôi cấy được cải thiện, qua đó tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của *Bacillus* và quá trình sinh tổng hợp enzyme. Tuy nhiên, ở khoảng 180–200 rpm, hoạt độ β-1,3-glucanase có xu hướng giảm mặc dù sinh khối vẫn duy trì ở mức cao. Hiện tượng này có thể bắt nguồn từ tác động bất lợi của lực cắt cơ học ở tốc độ khuấy trộn lớn, gây ảnh hưởng đến khả năng tiết enzyme hoặc độ ổn định cấu trúc của enzyme. Trên cơ sở kết quả thực nghiệm, 150 rpm được xác định là tốc độ lắc phù hợp nhất trong các điều kiện khảo sát, đáp ứng đồng thời yêu cầu sinh trưởng và tạo thành β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus*.

Dữ liệu từ các Bảng 3.20 đến 3.28, các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) ở quy mô phòng thí nghiệm đã được xác lập như sau: Môi trường LB lỏng; 1% (w/v) bột ngô; 1 % (w/v) cao nấm men; tỉ lệ cấy giống 7 %; thời gian nuôi cấy 24 giờ; nhiệt độ nuôi cấy 30 - 35 °C; pH ban đầu môi trường nuôi cấy 7,0; tốc độ lắc 150 rpm.

Để đánh giá kết quả khảo sát thực nghiệm, ba chủng *Bacillus* gồm *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 được so sánh giữa điều kiện nuôi cấy ban đầu và điều kiện nuôi cấy lựa chọn sau khảo sát. Các chỉ tiêu đánh giá gồm mật độ tế bào, hoạt độ β-1,3-glucanase và khả năng đối kháng (đường kính vòng ức chế của dịch nuôi cấy ly tâm loại tế bào) với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17. Kết quả so sánh được trình bày tại Bảng 3.28.

Bảng 3.28. *Mật độ tế bào, hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase và khả năng đối kháng nấm A. niger của ba chủng Bacillus trước và sau khi lựa chọn điều kiện nuôi cấy*

TT	*Chủng*	Điều kiện nuôi cấy	Mật độ tế bào (x10^9 CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Đường kính vòng ức chế nấm QT1 (mm)	Đường kính vòng ức chế nấm H17 (mm)
1	*B. siamensis* 101	Ban đầu	5,90±0,11 ^{d}	3,56±0,04 ^{c}	26,60±0,52 ^{b}	21,11±0,40^{b}
		Lựa chọn	**7,50±0,62^{bc}**	**5,68±0,31^{a}**	**26,31±0,90 ^{b}**	**20,62± 0,43^{b}**
2	*B. siamensis* 112	Ban đầu	7,11±0,12 ^{c}	1,79±0,05 ^{e}	25,44±0,50 ^{b}	20,31±0,51 ^{b}
		Lựa chọn	**8,80±0,24 ^{a}**	**4,81±0,23 ^{b}**	**25,60±0,22 ^{b}**	**19,74±0,54 ^{b}**
3	*B. velezensis* 137	Ban đầu	7,22±0,50 ^{bc}	2,83±0,03 ^{d}	**28,33±0,64 ^{a}**	**23,50±0,52 ^{a}**
		Lựa chọn	**8,31±0,43^{ab}**	**4,70±0,07 ^{b}**	**27,92±0,44 ^{a}**	**22,90±0,54 ^{a}**

Ghi chú: 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.

Kết quả ở Bảng 3.28 cho thấy, việc điều chỉnh các yếu tố nuôi cấy (môi trường, nguồn nitơ, chất cảm ứng, pH, thời gian nuôi, tỉ lệ cấy giống và tốc độ lắc) đã cải thiện khả năng sinh trưởng và gia tăng hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase của cả ba chủng *Bacillus* được tuyển chọn. So với điều kiện ban đầu, mật độ tế bào (10^9 CFU/mL) của các chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 lần lượt tăng từ 5,90 lên 7,50; 7,11 lên 8,80 và 7,22 lên 8,31 CFU/mL. Hoạt độ β-1,3-glucanase (U/mL) cũng tăng tương ứng từ 3,56 lên 5,68; 1,79 lên 4,81 và 2,83 lên 4,70 U/mL. Kết quả cho thấy điều kiện nuôi cấy lựa chọn đã cải thiện cả mật độ tế bào và hoạt độ β-1,3-glucanase ở ba chủng nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam gần đây về tối ưu hóa sản xuất enzyme từ vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, trong đó các yếu tố như nguồn cacbon cảm ứng (laminarin, curdlan), nguồn nitơ hữu cơ và pH tối ưu có ảnh hưởng quyết định đến khả năng tiết enzyme β-1,3-glucanase (Dewi et al., 2016; Zhang et al., 2022; A et al., 2024; Thi et al., 2024).

Kết quả ở Bảng 3.28 cũng ghi nhận hiện tượng mật độ tế bào vi khuẩn và hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase trong dịch nuôi cấy của cả 03 chủng *Bacillus* gia tăng rõ rệt (ở chủng *B. siamensis* 112, hoạt độ β-1,3-glucanase tăng từ 1,79 U/mL lên 4,81 U/mL), nhưng đường kính vòng ức chế sự sinh trưởng của nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 trên đĩa thạch lại không gia tăng tương ứng theo quan hệ tuyến tính. Ở chủng *B. siamensis* 101 và *B. siamensis* 112, sự thay đổi vòng ức chế là không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$), trong khi chủng *B. velezensis* 137 vẫn duy trì giá trị cao nhất, cơ bản ổn định. Dữ liệu này cho thấy mối liên hệ giữa khả năng sinh β-1,3-glucanase và hoạt tính đối kháng không đơn thuần theo quan hệ tuyến tính. Hiện tượng này có thể được giải thích do dịch nuôi cấy ly tâm loại tế bào chứa nhiều sản phẩm ngoại bào và hoạt tính đối kháng quan sát được là kết quả tổng hợp của các thành phần có trong dịch nuôi. Bên cạnh đó, đường kính vòng ức chế còn phụ thuộc vào khả năng khuếch tán của các thành phần hoạt tính trong môi trường thạch

Đường kính vòng ức chế trong phép thử khuếch tán trên thạch chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố, bao gồm nồng độ và hệ số khuếch tán của chất kháng nấm, thời gian khuếch tán và ngưỡng nồng độ cần thiết để ức chế sự phát triển của vi sinh vật (Shen et al., 2024). Bên cạnh đó, cấu trúc mạng gel có thể ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán của các phân tử sinh học. Các nghiên cứu trên gel agarose cho thấy kích thước lỗ xốp phụ thuộc vào nồng độ polymer và điều kiện hình thành gel, từ đó có thể ảnh hưởng đến sự di chuyển của các phân tử trong môi trường (Fatin-Rouge et al., 2004). Mặc dù có kích thước phân tử tương đối nhỏ, khả năng khuếch tán của β-1,3-glucanase trong môi trường thạch vẫn có thể chịu ảnh hưởng của cấu trúc mạng gel và các tương tác giữa protein với thành phần môi trường. Những yếu tố này có khả năng làm giảm tốc độ khuếch tán của enzyme so với trong dung dịch tự do, qua đó ảnh hưởng đến sự phân bố enzyme trong môi trường thạch (Gutenwik et al., 2004).

Kết hợp với các kết quả về khả năng ức chế nấm của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase ở các dữ liệu liên quan đến giảm sinh khối, có MIC, MFC, hiệu ứng phụ thuộc hoạt độ và gây biến dạng thành quan sát bằng SEM, có thể nhận định enzyme này là một thành phần có liên quan và góp phần vào hoạt tính đối kháng *A. niger* của các chủng *Bacillus* được tuyển chọn. Tuy nhiên, mức độ đối kháng quan sát được có thể là kết quả tổng hợp của nhiều yếu tố sinh học khác nhau, trong đó β-1,3-glucanase không phải là yếu tố duy nhất quyết định. Vì vậy, việc xác định các điều kiện thích hợp cho sinh tổng hợp β-1,3-glucanase trong nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc làm rõ đặc tính sinh enzyme của các chủng *Bacillus*, đồng thời cung cấp cơ sở để tiếp tục đánh giá vai trò của enzyme này trong hệ thống đối kháng với *A. niger*.

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

Hiệu quả phòng trừ bệnh HRGMĐ của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137- ký hiệu là BAZ04) trong điều kiện nhà lưới được đánh giá thông qua theo dõi tỉ lệ cây lạc chết sau khi gây nhiễm nhân tạo hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17. Thí nghiệm được bố trí với đầy đủ các nhóm đối chứng âm, đối chứng bệnh và nghiệm thức xử lý, nhằm đảm bảo đánh giá hiệu quả phòng trừ. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Hình 3.31 và Bảng 3.29.



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 ba chủng Bacillus; 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.*

Bảng 3.29. *Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng Bacillus trong nhà lưới*

Nghiệm thức	Tỉ lệ cây chết ở các ngày sau nhiễm nấm *A.niger* QT1 (%)							Tỉ lệ cây chết ở các ngày sau nhiễm nấm *A.niger* H17(%)						
	5 NSNNB	7 NSNNB	14 NSNNB	21 NSNNB	28 NSNNB	45 NSNNB	Hiệu quả phòng trừ ở 45 NSNNB (%)	5 NSNNB	7 NSNNB	14 NSNNB	21 NSNNB	28 NSNNB	45 NSNNB	Hiệu quả phòng trừ ở 45 NSNNB (%)
CT 1 (Đối chứng âm)	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	-	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{b}	0,00 ±0,00^{c}	0,00 ±0,00^{c}	-
CT 2 – Nhiễm *A. niger* QT1 và **CT4 –** Nhiễm *A. niger* H17 (Đối chứng bệnh)	**26,67 ±11,55** ^{a}	**60,00 ±20,00**^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	0,00 ±0,00 ^{b}	**26,67 ±11,55** ^{a}	**26,67 ±11,55**^{a}	**60,00 ±20,00**^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	**100 ±0,00** ^{a}	0,00 ±0,00 ^{b}
CT 3 và CT 5 (Xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus*)	0,00 ±0,00 ^{b}	0,00 ±0,00 ^{b}	0,00 ±0,00 ^{b}	0,00 ±0,00 ^{b}	0,00 ±0,00 ^{b}	0,00 ±0,00 ^{b}	**100** ±0,00 ^{a}	0,00 ±0,00 ^{b}	26,67 ±11,55^{a}	26,67 ±11,55^{a}	26,67 ±11,55^{a}	26,67 ±11,55^{b}	26,67 ±11,55^{b}	**73,33 ±11,55** ^{a}

Ghi chú: 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.

Kết quả theo dõi thí nghiệm ở nhà lưới cho thấy, ở nghiệm thức đối chứng âm (CT 1), không gây nhiễm nấm bệnh và chỉ xử lý bằng nước vô trùng, tỉ lệ cây chết luôn duy trì ở mức 0,00% trong suốt 45 ngày thí nghiệm. Các giá trị này không có biến động và không sai khác thống kê giữa các thời điểm quan sát, phản ánh điều kiện nhà lưới ổn định và cây lạc sinh trưởng bình thường khi không có tác động của tác nhân gây bệnh. Điều này cho thấy hiện tượng cây chết ở các nghiệm thức còn lại là do ảnh hưởng trực tiếp của nấm *A. niger*, chứ không phải do các yếu tố bất lợi của môi trường thí nghiệm.

Ngược lại, ở các nghiệm thức đối chứng bệnh, xử lý bằng bào tử *A. niger* ở nồng độ 10^6 bào tử/mL, nghiệm thức CT2 nhiễm chủng *A. niger* QT1, nghiệm thức CT 4 nhiễm nấm bệnh chủng *A. niger* H17 và không xử lý với hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus*,. Kết quả, xuất hiện cây lạc bị chết với triệu chứng bệnh HRGMĐ điển hình trong tuần thứ nhất, tỉ lệ chết lên đến 100% sau 2 đến 3 tuần sau nhiễm nấm bệnh tùy chủng nấm bệnh. Trong đó, ở nghiệm thức CT2, đối chứng bệnh với *A. niger* QT1, tỉ lệ cây lạc chết ghi nhận 26,67 % ở 5 NSNNB, tăng lên 60,00 % ở 7 NSNNB và chết 100 % ở 14 NSNNB. Ở nghiệm thức CT4, đối chứng bệnh với chủng *A. niger* H17, tỉ lệ cây biểu hiện bệnh HRGMĐ bị chết ghi nhận 26,67 % ở 5 NSNNB, tăng lên 60,00 % ở 14 NSNNB và chết 100 % ở 21 NSNNB. Các giá trị này đều sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Các cây lạc bị chết đều có biểu hiện đặc trưng của bệnh HRGMĐ, phân lập lại nấm bệnh từ cây lạc bị chết và kiểm tra hình thái, bào tử nấm bệnh cho thấy các chủng nấm tương đồng với các chủng nấm *A. niger* QT1 và *A. niger* H17 lây nhiễm vào. Kết quả này một lần nữa cho thấy hai chủng nấm *A. niger* QT1 và H17 sử dụng trong thí nghiệm có độc lực cao và mô hình gây nhiễm nhân tạo được thiết lập là phù hợp để đánh giá hiệu quả phòng trừ.

Trong khi đó, ở các nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp phối trộn dịch nuôi ba chủng *Bacillus* nồng độ (10^8 CFU/mL) ở giai đoạn hạt và cây con, sau đó lây nhiễm nhân tạo nấm bệnh ở nồng độ 10^6 bào tử/mL, nghiệm thức CT3 lây nhiễm với chủng *A. niger* QT1, nghiệm thức CT5 lây nhiễm với chủng *A. niger* H17, cho kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng bệnh. Trong đó, ở nghiệm thức CT3, không ghi nhận cây bị bệnh HRGMĐ, không ghi nhận cây chết, trong toàn bộ 45 NSNNB. Ở nghiệm thức xử lý CT5, ghi nhận hiệu quả phòng trừ không cao bằng QT1. Tỉ lệ cây chết ở nghiệm thức CT5 duy trì ở mức 26,67% từ 7 NSN đến 45 NSNNB, thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng bệnh (100 % cây chết). Các nghiệm thức xử lý có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$).

Kết quả thu được từ Bảng 3.29 ghi nhận hiệu quả phòng trừ bệnh HRGMĐ của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đối với *A. niger* H17 là 73,33 % và 100 % đối với *A. niger* QT1, sau 45 ngày theo dõi. Sự khác nhau về hiệu quả phòng trừ đối với hai chủng nấm bệnh *A. niger* QT1 và H17 có thể liên quan đến sự khác biệt về đặc tính của từng chủng nấm. Kết quả này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* có khả năng hạn chế bệnh trong điều kiện nhà lưới. Hỗn hợp dịch nuôi của ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) chứa tế bào sống và có thể chứa các enzyme, chất chuyển hóa được tạo ra trong quá trình nuôi cấy. Khi được xử lý vào đất, các chủng *Bacillus* còn có thể tham gia đối kháng thông qua cạnh tranh dinh dưỡng và tương tác trong vùng rễ. Do đó, hiệu quả

phòng trừ bệnh HRGMĐ ở nhà lưới có thể là kết quả của nhiều yếu tố liên quan đến hoạt động của các chủng *Bacillus* và các sản phẩm do chúng tạo ra. Những kết quả thu được trong nghiên cứu này có sự tương đồng với các nhận định đã được công bố về tiềm năng đối kháng nấm bệnh thực vật của các nhóm VSV thuộc chi *Streptomyces, Pseudomonas* và *Bacillus*. Đặc biệt, các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu và được khai thác làm tác nhân kiểm soát sinh học nhờ khả năng ức chế một số loài nấm gây bệnh trên cây trồng (Jangir et al., 2018; Andrić et al., 2020).

Hiệu quả phòng trừ bệnh HRGMĐ trong khoảng 45 NSNNB ở nhà lưới cung cấp bằng chứng thực nghiệm quan trọng về hiệu lực của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus (B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo ở nhà lưới. Kết quả này cho thấy tiềm năng của hỗn hợp dịch nuôi cấy *Bacillus* trong kiểm soát sinh học bệnh HRGMĐ hại lạc và là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo trong điều kiện đồng ruộng.

3.4.2. Hiệu quả thử nghiệm trên đồng ruộng

3.4.2.1. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển cây lạc

Ảnh hưởng chiều cao thân chính

Ở cây lạc, chiều cao thân chính là một trong những chỉ tiêu hình thái được sử dụng để đánh giá tình trạng sinh trưởng và có liên quan đến khả năng hình thành năng suất. Chỉ tiêu này phụ thuộc vào đặc tính di truyền của giống cũng như điều kiện canh tác. Khi cây đạt chiều cao phù hợp, cấu trúc thân và tán có thể phát triển hài hòa, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình ra hoa, hình thành quả và tích lũy chất đồng hóa. Sự sinh trưởng cân đối còn góp phần nâng cao khả năng thích nghi với điều kiện môi trường, qua đó hỗ trợ quá trình hình thành và phát triển năng suất cây lạc. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến chiều cao thân lạc được trình bày ở Bảng 3.30. Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có ảnh hưởng tích cực đến chiều cao thân chính của giống lạc L14**,** tuy nhiên mức độ tác động khác nhau theo giai đoạn sinh trưởng và điều kiện sinh thái của từng vùng trồng**.**

Giai đoạn cây con, tại các địa điểm Phú Vang và Hương Trà, chiều cao cây giữa các nghiệm thức chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, dao động trong khoảng 3,56 - 4,55 cm**.** Điều này cũng phù hợp với sinh trưởng ban đầu của cây lạc chủ yếu phụ thuộc vào nguồn dinh dưỡng dự trữ trong hạt, nên tác động của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* sinh học chưa biểu hiện rõ. Tuy nhiên, tại địa điểm Nam Hải Lăng và Triệu Phong, chiều cao cây ở các nghiệm thức xử lý đạt 4,21 - 4,77 cm**,** cao hơn rõ rệt so với đối chứng âm (CT3) từ 3,05 - 3,23 cm**,** vượt $LSD_{0,05}$, chứng tỏ hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có khả năng hỗ trợ sinh trưởng sớm trong điều kiện đất cát ven biển nghèo dinh dưỡng.

Giai đoạn ra hoa, ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* bắt đầu thể hiện rõ hơn. Tại Phú Vang và Hương Trà, sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* cho chiều cao cây đạt 17,86 - 18,07 cm**,** cao hơn đối chứng âm (CT3) từ 1,93 - 2,78 cm. Đặc biệt, tại địa điểm Nam Hải Lăng**,** chiều cao cây ở nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* và nghiệm thức sử dụng chế phẩm *Trichoderma* đạt 19,12 - 20,52 cm**,** cao hơn đối

chứng âm (CT3) 3,28 - 4,68 cm, vượt $LSD_{0,05}$ (2,85 cm). Kết quả này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* thúc đẩy sinh trưởng thân chính trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng mạnh, khi nhu cầu dinh dưỡng và hoạt động trao đổi chất của cây tăng cao.

Giai đoạn hình thành quả lạc, sự khác biệt giữa các nghiệm thức trở nên rõ rệt và ổn định hơn. Tại địa điểm Nam Hải Lăng, chiều cao cây ở nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* và nghiệm thức sử dụng chế phẩm *Trichoderma* đạt 31,63 - 32,39 cm, cao hơn đối chứng âm (24,16 cm) từ 7,47 - 8,23 cm; tại Triệu Phong, mức tăng đạt 6,05 - 9,10 cm so với đối chứng âm. Ngay cả tại các vùng thuộc thành phố Huế, ở nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* vẫn cho chiều cao cao hơn đối chứng âm từ 1,88–2,88 cm, cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* duy trì ưu thế sinh trưởng ở giai đoạn sinh sản, góp phần tạo nền tảng thuận lợi cho quá trình hình thành quả lạc.

Bảng 3.30. *Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến chiều cao thân chính ở các giai đoạn phát triển của giống lạc L14 trên đồng ruộng*

Công thức	Cây con (cm)	Ra hoa (cm)	Hình thành quả (cm)	Trước thu hoạch (cm)
Phú Vang, thành phố Huế				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**4,38±0,26 a**	**18,07±1,72a**	**28,22 ±1,31a**	**34,82 ±2,19 a**
Trichoderma (CT2)	**3,56±0,28 a**	**17,12±1,03ab**	**27,43±1,89ab**	**33,56±2,65 ab**
Đối chứng âm (CT3)	**3,91±0,36a**	16,14 ±1,10 b	26,34 ±1,58 b	32,49 ±3,05 b
LSD 0.05	*1,20*	*1,57*	*1,78*	*2,01*
Hương Trà, thành phố Huế				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**4,55±0,25a**	**17,86±1,71 a**	**29,43 ± 2,24 a**	**34,91 ± 2,34 a**
Trichoderma (CT2)	**4,13 ±0,30 a**	**17,54 ±1,40 a**	**28,94 ± 1,62 ab**	32,31 ± 2,46 b
Đối chứng âm (CT3)	**4,48 ±0,39 a**	15,08± 1,27 b	26,55 ± 2,44 b	32,44 ± 2,92 b
LSD 0.05	*1,42*	*1,45*	*2,68*	*2,06*
Nam Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**4,61 ±0,26 a**	**19,12± 1,26 a**	**32,39 ± 1,94 a**	**37,68 ± 1,36 a**
Trichoderma (CT2)	**4,21 ±0,25 a**	**20,52 ±1,52 a**	**31,63 ± 2,45 a**	**36,49 ± 3,25 a**
Đối chứng âm (CT3)	3,23 ±0,16 b	15,84 ± 1,28 b	24,16 ± 1,93 b	30,17 ± 2,11 b
LSD 0.05	*0,62*	*2,85*	*1,72*	*2,68*
Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**4,63 ±0,43 a**	**19,46 ±1,16 a**	**31,21 ±2,68 a**	**36,28 ± 2,82 a**
Trichoderma (CT2)	**4,77 ±0,36 a**	**18,92 ±1,66 a**	**28,16 ±2,78 a**	**35,75 ± 2,86 a**
Đối chứng âm (CT3)	3,05 ±0,30 b	14,52 ±1,32 b	22,11 ± 2,03 b	27,89 ± 2,37 b
LSD 0.05	*0,75*	*1,55*	*3,56*	*1,66*

Ghi chú: Các giá trị là trung bình theo từng địa điểm; so sánh thống kê ($LSD_{0,05}$) và ký hiệu chữ cái được thực hiện riêng cho từng vùng.

Giai đoạn trước thu hoạch, tác động của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* thể hiện rõ nhất, đặc biệt tại các vùng trồng lạc thuộc tỉnh Quảng Trị. Tại địa điểm Nam Hải Lăng, ở nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đạt 37,68 cm, cao hơn đối chứng âm 7,51 cm; tại Triệu Phong, ở nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* và nghiệm thức sử dụng chế phẩm *Trichoderma* cao hơn đối chứng âm 7,86 - 8,39 cm, các sai khác đều có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* không chỉ kích thích sinh trưởng sớm mà còn giúp duy trì tốc độ sinh trưởng thân chính đến cuối vụ, nhất là trong điều kiện bất lợi về đất đai.

Nhìn chung, hỗn hợp dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* làm tăng chiều cao thân chính cây lạc L14 so với đối chứng âm và không khác biệt có ý nghĩa so với chế phẩm *Trichoderma*. Sự gia tăng chiều cao thân chính của cây lạc trong nghiệm thức sử dụng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có thể liên quan đến khả năng hỗ trợ sinh trưởng của *Bacillus* thông qua điều hòa sinh trưởng và tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây (Bhattacharyya & Jha, 2011; Khoso et al., 2024). Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các công bố gần gần đây, ghi nhận *Bacillus* và *Trichoderma* có khả năng hỗ trợ sinh trưởng cây trồng trong điều kiện dinh dưỡng hạn chế hoặc chịu stress môi trường, đồng thời góp phần duy trì sinh trưởng ở giai đoạn sinh sản và cải thiện năng suất (Khoso et al., 2024; Bigatton et al., 2024).

Ảnh hưởng đến tổng số cành

Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến tổng số cành ở các giai đoạn phát triển của giống L14 trên ruộng lạc ở thành phố Huế và tỉnh Quảng Trị được thể hiện ở Bảng 3.31.

Giai đoạn cây con: tại các vùng Phú Vang và Hương Trà, tổng số cành giữa các nghiệm thức chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với giá trị dao động từ 2,33 - 3,66 cành/cây. Tuy nhiên, tại Nam Hải Lăng và Triệu Phong, đối chứng âm (CT3) cho số cành thấp hơn có ý nghĩa (Nam Hải Lăng: 2,97 cành; Triệu Phong: 2,73 cành) so với các nghiệm thức xử lý (3,47 - 3,93 cành), vượt $LSD_{0,05}$, phản ánh vai trò hỗ trợ sinh trưởng sớm của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* trong điều kiện đất cát ven biển.

Giai đoạn ra hoa, ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* bắt đầu thể hiện rõ hơn. Tại Phú Vang, CT1 đạt 4,60 cành/cây, cao hơn đối chứng âm (CT3) là 3,67 cành/cây, chênh lệch 0,93 cành, xấp xỉ $LSD_{0,05}$ (0,95). Xu hướng tương tự được ghi nhận tại Hương Trà, Nam Hải Lăng và Triệu Phong, trong đó các nghiệm thức xử lý (CT1, CT2) đều cho số cành cao hơn đối chứng âm (CT3) từ 0,53 - 0,83 cành/cây.

Giai đoạn hình thành quả, sự khác biệt giữa các nghiệm thức trở nên rõ rệt và ổn định hơn. Tại Phú Vang, CT1 và CT2 đạt 5,24 - 5,45 cành/cây, cao hơn đối chứng âm (3,95 cành/cây). Tại Hương Trà, CT1 đạt 4,32 cành/cây, cao hơn đối chứng âm 0,99

cành; tại Nam Hải Lăng và Triệu Phong, mức tăng dao động từ 0,87 - 1,17 cành/cây, tất cả đều có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* thúc đẩy mạnh quá trình phân cành khi cây bước vào giai đoạn sinh trưởng sinh sản.

Bảng 3.31. *Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến tổng số cành ở các giai đoạn phát triển của giống L14 trên đồng ruộng*

Công thức	Cây con	Ra hoa	Hình thành quả	Trước thu hoạch
Phú Vang, thành phố Huế				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**3,66±0,22^{a}**	**4,60±0,32^{a}**	**5,45±0,49 ^{a}**	**5,67 ± 0,39 ^{a}**
Chế phẩm *Trichoderma* (CT2)	**3,54±0,31^{a}**	**4,35±0,34^{a}**	**5,24±0,35 ^{a}**	**5,41 ± 0,43 ^{a}**
Đối chứng âm (CT3)	**3,23±0,23^{a}**	**3,67±0,28^{a}**	3,95 ± 0,26 ^{b}	4,10 ± 0,26 ^{b}
LSD $_{0.05}$	*0,48*	*0,95*	*1,15*	*0,74*
Hương Trà, thành phố Huế				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**2,67±0,16^{a}**	**3,67±0,25^{a}**	**4,32 ± 0,31 ^{a}**	**4,67 ± 0,32 ^{a}**
Trichoderma (CT2)	**2,42±0,21^{a}**	**3,53±0,31^{a}**	**4,25 ± 0,37 ^{a}**	**4,47 ± 0,39 ^{a}**
Đối chứng âm (CT3)	**2,33±0,17^{a}**	**3,00±0,23^{a}**	3,33 ± 0,26 ^{b}	3,67 ± 0,23 ^{b}
LSD $_{0.05}$	*0,52*	*0,75*	*0,68*	*0,66*
Nam Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị*				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**3,93±0,24^{a}**	**4,30±0,34^{a}**	**4,93 ± 0,34 ^{a}**	**5,10± 0,31 ^{a}**
Trichoderma (CT2)	**3,77±0,18^{a}**	**4,23±0,37^{a}**	**4,70 ± 0,41 ^{a}**	**4,83± 0,43 ^{a}**
Đối chứng âm (CT3)	2,97±0,26^{b}	3,57±0,23^{b}	3,80 ± 0,29 ^{b}	4,03 ± 0,29 ^{b}
LSD $_{0.05}$	*0,61*	*0,66*	*0,64*	*0,52*
Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị				
Hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1)	**3,80±0,21^{a}**	**4,10±0,39^{a}**	**4,67 ± 0,18 ^{a}**	**4,80±0,24 ^{a}**
Trichoderma (CT2)	**3,47±0,31^{a}**	**4,03±0,35^{a}**	**4,33± 0,22 ^{a}**	**4,60± 0,26 ^{a}**
Đối chứng âm (CT3)	2,73±0,16^{b}	3,27±0,28^{b}	3,50 ± 0,19 ^{b}	3,57 ± 0,35 ^{b}
LSD $_{0.05}$	*0,59*	*0,69*	*0,46*	*0,71*

Ghi chú: Các giá trị là trung bình theo từng địa điểm; so sánh thống kê ($LSD_{0,05}$) và ký hiệu chữ cái được thực hiện riêng cho từng vùng (Theo đơn vị hành chính mới của chính quyền 2 cấp)*

Trước thu hoạch, tác động tích cực của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* được duy trì và thể hiện rõ nhất. Tại Phú Vang, CT1 đạt 5,67 cành/cây, cao hơn đối chứng 1,57 cành; tại Hương Trà, mức tăng đạt 1,00 cành; tại Nam Hải Lăng và Triệu Phong, CT1 cho số cành cao hơn đối chứng từ 1,07 - 1,23 cành/cây, vượt $LSD_{0,05}$. Nhìn chung, CT1 luôn cho giá trị cao nhất, tiếp đến là CT2, trong khi đối chứng đạt thấp nhất ở tất cả các vùng.

Sự gia tăng tổng số cành của cây lạc khi xử lý hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có thể liên quan đến hoạt động của các vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật, đặc biệt các loài thuộc chi *Bacillus*, thông qua việc kích thích sinh trưởng chồi bên, điều hòa cân bằng hormone (auxin–cytokinin) và cải thiện khả năng hấp thu dinh dưỡng khoáng (Khoso et al., 2024). Các nghiên cứu đã cho thấy PGPR có vai trò quan trọng trong thúc đẩy phân cành và tăng số nhánh hữu hiệu**,** từ đó góp phần nâng cao tiềm năng năng suất của cây trồng (Backer et al., 2018).

Hiệu quả của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* thể hiện rõ rệt hơn tại các vùng trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế so với đối chứng và cho kết quả tương đương với sử dụng chế phẩm *Trichoderma*. Kết quả này phù hợp với nhận định rằng VSV vùng rễ giúp cây thích nghi tốt hơn với điều kiện bất lợi**,** thông qua cải thiện sinh trưởng bộ rễ và khả năng khai thác dinh dưỡng trong đất (Santoyo et al., 2021).

Như vậy, việc tăng tổng số cành/cây ở các nghiệm thức xử lý, đặc biệt là hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus*, cho thấy tiềm năng tích cực trong việc nâng cao sinh trưởng sinh dưỡng và tạo tiền đề cho tăng số cành hữu hiệu và năng suất lạc ở các khu vực thử nghiệm ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế.

3.4.2.2. Hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc đen của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus

Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến bệnh HRGMĐ thử nghiệm trên 2 vùng trồng lạc ở thành phố Huế và 2 vùng trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị với giống lạc L14 được trình bày ở 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 ba 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 ± 0,31[b]	1,75 ± 0,11 [b]	1,78 ± 0,14 [b]	2,21 ± 0,28 [b]
Đối chứng âm (CT3)	**10,71±1,05 [a]**	**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*

Ghi chú: Các giá trị là trung bình theo từng địa điểm; so sánh thống kê ($LSD_{0,05}$) và ký hiệu chữ cái được thực hiện riêng cho từng vùng.

Kết quả Bảng 3.32 cho thấy, tại 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 (HRGMĐ) ở nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* (CT1) và chế phẩm *Trichoderma* (CT2) đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng âm (CT3) ở mức $LSD_{0,05}$.

Cụ thể, tại Phú Vang (thành phố Huế), tỉ lệ cây chết ở CT1 là 3,57 %, thấp hơn đáng kể so với đối chứng (10,71 %, $LSD_{0,05}$ = 2,61). Tương tự, ở Hương Trà, tỉ lệ bệnh HRGMĐ giảm từ 6,57% (CT3) xuống 1,16% (CT1); tại Nam Hải Lăng, từ 4,13% (CT3) xuống 1,38% (CT1); và tại Triệu Phong, từ 8,16% (CT3) xuống 2,11% (CT1). Mức giảm này đều vượt ngưỡng $LSD_{0,05}$ tương ứng, cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có hiệu quả thống kê trong giảm tỉ lệ cây chết do bệnh HRGMĐ ở điều kiện thực nghiệm ruộng mô hình. Khi so sánh tỉ lệ cây chết ở nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1) không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức xử lý bằng chế phẩm *Trichoderma* (CT2) ($p > 0,05$).

Kết quả giảm tỉ lệ cây chết do bệnh HRGMĐ cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có khả năng hạn chế bệnh trên cây lạc L14 trong điều kiện đồng ruộng. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu ghi nhận khả năng hạn chế nấm bệnh của *Bacillus* thông qua nhiều cơ chế khác nhau (Andargie et al., 2025). Tuy nhiên, hiệu quả phòng trừ ngoài đồng ruộng còn chịu ảnh hưởng của điều kiện môi trường, canh tác và áp lực bệnh (Lamichhane et al., 2022; Awoke et al., 2025). Bên cạnh đó, thực tế đồng ruộng, không loại trừ khả năng cây lạc chịu tác động đồng nhiễm (co-infection) hoặc nhiễm thứ cấp của các nấm bệnh truyền qua đất khác (*S. rolfsii, R. solani*). Do đó, mặc dù đã kết hợp chẩn đoán triệu chứng và phân lập mẫu đại diện, chưa thể quy toàn bộ cây chết ngoài đồng ruộng cho *A. niger* do khả năng đồng nhiễm các tác nhân gây bệnh khác. Vì vậy, hiệu quả phòng trừ của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* có thể phản ánh tác động đối kháng với *A. niger* và các nấm bệnh khác trong đất. Cần tiếp tục xác định vai trò của từng tác nhân gây bệnh và đánh giá qua nhiều vụ để làm rõ tính ổn định của hiệu quả phòng trừ.

3.4.2.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến năng suất lạc

Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực thu lạc được trình bày ở Bảng 3.33 và Hình 3.32 cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1) tác động tích cực và đồng bộ đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lạc giống L14, tuy mức độ ảnh hưởng có khác nhau giữa các vùng nghiên cứu. Hỗn hợp dịch nuôi cấy ba chủng *Bacillus* làm tăng tỉ lệ hoa hữu hiệu, số quả chắc và khối lượng hạt, qua đó góp phần cải thiện năng suất lạc L14 trong điều kiện đồng ruộng.

Ảnh hưởng đến các yếu tố cấu thành năng suất

Tổng số hoa/cây ở hai vùng ở thành phố Huế nhìn chung không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức, dao động từ 53,10–54,30 hoa/cây (Phú Vang, Hương Trà). Điều này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* không làm thay đổi đáng kể số hoa hình thành, phù hợp với đặc điểm sinh lý của cây lạc là số hoa chịu ảnh hưởng mạnh của yếu tố giống và điều kiện khí hậu. Tuy nhiên, tại các vùng Quảng Trị, CT1 cho số hoa cao hơn rõ rệt (Nam Hải Lăng: 55,30 hoa; Triệu Phong: 56,93 hoa) so với CT3 (50,60–52,47 hoa), điều này có thể nhờ khả năng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* thúc đẩy sinh trưởng mạnh hơn trong điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu tại các vùng thử nghiệm ở Quảng Trị.

Tổng số quả/cây và tỉ lệ hoa hữu hiệu (%) chịu tác động rõ rệt của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus*. Tại Phú Vang, CT1 đạt 21,63 quả/cây và 23,93% hoa hữu hiệu, cao hơn đối chứng (19,50 quả; 21,87%). Xu hướng này lặp lại ở Hương Trà và đặc biệt rõ tại Nam Hải Lăng và Triệu Phong, nơi CT1 cho 24,63–25,93 quả/cây và 25,64–26,46% hoa hữu hiệu, cao hơn đối chứng từ 2,30–3,30 quả/cây và 2,35–3,76%, vượt $LSD_{0,05}$. Điều này cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* làm tăng hiệu quả chuyển hóa hoa thành quả, một yếu tố liên quan đến tăng năng suất lạc.

Số quả chắc/cây, sự khác biệt giữa các nghiệm thức rất rõ rệt. Ở Phú Vang, CT1 đạt 12,87 quả chắc/cây, cao hơn đối chứng 1,04 quả; tại Hương Trà, mức tăng đạt 3,20 quả; tại Nam Hải Lăng, Triệu Phong, mức tăng đạt 3,06–2,40 quả chắc/cây, tất cả đều có ý nghĩa thống kê. Điều này khẳng định hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* giúp giảm rụng quả non và tăng tỉ lệ quả chắc, là yếu tố trực tiếp nâng cao năng suất thực thu.

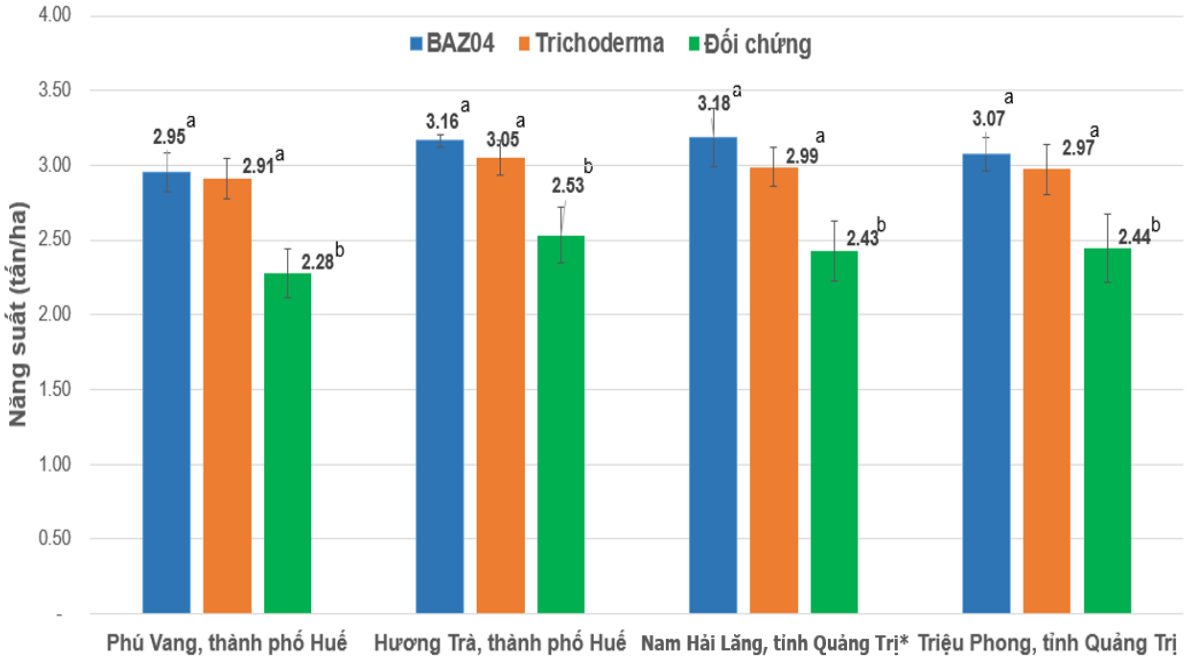
Về khối lượng 100 quả khô và 100 hạt, CT1 nhìn chung cho giá trị cao hơn hoặc tương đương CT2 và cao hơn đối chứng tại hầu hết các vùng. Đặc biệt tại Phú Vang, khối lượng 100 quả khô ở CT1 đạt 139,51 g, cao hơn đối chứng 17,48 g; khối lượng 100 hạt tăng từ 32,23 g (CT3) lên 34,98 g (CT1). Mặc dù ở một số vùng Quảng Trị, sai khác về khối lượng 100 quả khô chưa vượt $LSD_{0,05}$, nhưng xu hướng tăng đồng nhất cho thấy hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* góp phần cải thiện quá trình tích lũy vật chất vào hạt.

Bảng 3.33. *Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus đến các yếu tố cấu thành năng suất lạc giống L14 trong điều kiện đồng ruộng*

Công thức	Tổng số hoa/cây (hoa)	Tổng số quả/cây (quả)	Tỉ lệ hoa hữu hiệu (%)	Số quả chắc/cây (quả)	Khối lượng 100 quả khô (gam)	Khối lượng 100 hạt (gam)	Năng suất lý thuyết (tấn/ha)	Năng suất thực tế (tấn/ha)
Phú Vang, thành phố Huế								
CT1	**53,80± 4,95** [a]	**21,63± 2,08** [a]	**23,93±1,34** [a]	**12,87 ± 0,77** [a]	**139,51± 8,65** [a]	**34,98± 2,34** [a]	**4,21 ± 0,39** [a]	**2,95 ± 0,28** [a]
CT2	**53,73± 4,08** [a]	**21,23± 1,70** [ab]	**23,01 ± 1,38** [a]	12,37 ± 0,96 [b]	**137,57 ± 7,70** [a]	**34,11 ± 2,59** [a]	**3,94 ± 0,31** [a]	**2,91 ± 0,23** [a]
CT3 (Đ/c âm)	**54,10 ± 5,30** [a]	19,50 ± 1,64 [b]	21,87 ± 1,09 [b]	11,83 ± 0,95 [c]	122,03 ± 7,08 [b]	32,23 ± 2,90 [b]	3,31 ± 0,32 [b]	2,28 ± 0,19 [b]
LSD 0,05	*2,47*	*1,76*	*1,08*	0,41	7,15	*0,99*	*0,51*	*0,49*
Hương Trà, thành phố Huế								
CT1	**54,30 ± 5,00** [a]	**22,23 ± 1,47** [a]	**24,01± 2,21** [a]	**13,03 ± 1,20** [a]	**146,01 ± 9,78** [a]	**36,87 ± 2,21** [a]	**4,63 ± 0,28** [a]	**3,16 ± 0,19** [a]
CT2	**53,87 ± 4,09** [a]	**22,13± 1,64** [a]	**23,97 ± 1,82** [a]	**12,87 ± 0,98** [a]	138,48 ± 9,14 [b]	**35,45 ± 2,75** [a]	**4,61 ± 0,41** [a]	**3,05 ± 0,24** [a]
CT3 (Đ/c âm)	**53,10 ± 5,20** [a]	20,27 ± 1,84 [a]	**22,05 ± 2,16** [a]	9,83± 0,96 [b]	123,14 ± 8,62 [c]	32,08± 2,56 [b]	3,23 ± 0,29 [b]	2,53± 0,22 [b]
LSD 0,05	*2,30*	*2,44*	6,08	*2,75*	*4,13*	*1,75*	*0,59*	*0,39*
Nam Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị*								
CT1	**55,3 ± 1,99** [a]	**24,63 ± 2,27** [a]	**25,64± 1,72** [a]	**14,13 ± 0,93** [a]	**160,33 ± 8,97** [a]	**36,98 ± 2,88** [a]	**5,29 ± 0,31** [a]	**3,18 ± 0,29** [a]
CT2	**54,27 ± 4,83** [a]	**23,30 ± 1,77** [a]	**24,79 ± 1,88** [a]	**13,47 ± 1,02** [a]	**159,12 ± 7,73** [a]	**35,77± 1,75** [ab]	**4,85± 0,34** [a]	**2,99 ± 0,23** [a]
CT3 (Đ/c âm)	50,60 ± 3,54 [b]	20,33 ± 1,99 [b]	21,88± 1,97 [b]	11,07± 0,91 [b]	**158,67 ± 8,19** [a]	**33,75 ± 1,86** [a]	3,41 ± 0,17 [b]	2,43± 0,24 [b]
LSD 0,05	*1,84*	*1,62*	*2,37*	*1,75*	*3,93*	*2,74*	*0,51*	0,29
Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị								
CT1	**56,93± 3,76** [a]	**25,93 ± 1,55** [a]	**26,46 ± 0,95** [a]	**15,07 ± 1,32** [a]	**160,46 ± 8,99** [a]	**38,44± 3,54** [a]	**5,35 ± 0,32** [a]	**3,07 ± 0,26** [a]
CT2	**55,80 ± 4,13** [a]	**24,90 ± 2,19** [a]	**25,99 ± 2,31** [a]	**14,50 ± 1,43** [a]	**159,67 ± 9,58** [a]	**37,21± 2,83** [a]	**5,23 ± 0,41** [a]	**2,97 ± 0,24** [a]
CT3 (Đ/c âm)	52,47 ± 4,25 [b]	22,63±2,05[b]	**24,11 ± 1,69** [a]	12,67± 1,16 [b]	**159,21 ± 7,96** [a]	34,32 ± 3,36 [b]	3,92± 0,35 [b]	2,44± 0,20 [b]
LSD 0,05	*1,84*	*2,04*	*2,97*	1,14	*8,42*	*2,46*	*0,41*	*0,31*

Ghi chú: Các giá trị là trung bình theo từng địa điểm; so sánh thống kê ($LSD_{0,05}$) và ký hiệu chữ cái được thực hiện riêng cho từng vùng (Theo đơn vị hành chính mới của chính quyền 2 cấp)*

Ảnh hưởng đến năng suất lạc



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 (* Theo tên đơn vị hành chính mới của chính quyền 2 cấp) chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p < 0,05 (Duncan's test). M ± SD: Trung bình mẫu (Mean) ± độ lệch chuẩn (Standard deviation).*

Dữ liệu ở Hình 3.32 cho thấy năng suất thực thu (NSTT) của nghiệm thức CT1 đều tăng rõ rệt so với nghiệm thức đối chứng. Cụ thể, tại khu vực Phú Vang, NSTT tăng từ 2,28 tấn/ha ở CT3 lên 2,95 tấn/ha ở CT1, trong khi tại Hương Trà, NSTT ghi nhận mức tăng từ 2,53 tấn/ha lên 3,16 tấn/ha khi áp dụng CT1. Tương tự, tại Nam Hải Lăng và Triệu Phong, NSTT của CT1 đạt lần lượt 3,18 và 3,07 tấn/ha, cao hơn so với đối chứng trong khoảng 0,63 - 0,75 tấn/ha. Tổng hợp bốn địa điểm thử nghiệm, NSTT ở CT1 tăng 24,90–30,86% so với đối chứng âm. Kết quả phân tích thống kê cho thấy không ghi nhận sự sai khác có ý nghĩa giữa hai nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp dịch nuôi ba chủng *Bacillus* (CT1) và chế phẩm sinh học thương mại *Trichoderma* (CT2) (p > 0,05).

Kết quả nghiên cứu của luận án tương đồng với những nghiên cứu gần đây về VSV kích thích sinh trưởng thực vật (PGPR), đặc biệt là các chủng thuộc chi *Bacillus*. Thông qua việc cải thiện khả năng hấp thu và sử dụng dinh dưỡng của cây, điều hòa cân bằng hormone sinh trưởng (auxin–cytokinin), làm giảm stress sinh học liên quan đến bệnh hại vùng rễ, các chủng *Bacillus* không chỉ thúc đẩy sự phát triển sinh dưỡng của cây mà còn giúp nâng cao tỉ lệ đậu quả và tích lũy vật chất khô ở cây trồng thuộc họ đậu (Patel et al., 2023; Khoso et al., 2024). Bên cạnh đó, hiệu quả của hỗn hợp dịch nuôi ba

chủng *Bacillus* được ghi nhận rõ ràng hơn trên các vùng đất cát của tỉnh Quảng Trị, nơi điều kiện đất nghèo dinh dưỡng và chịu áp lực bệnh hại cao. Các chế phẩm vi sinh có *Bacillus* thường có khả năng hạn chế nấm bệnh và hỗ trợ sinh trưởng cây trồng, cho hiệu quả vượt trội trong những điều kiện sinh thái bất lợi (Hashem et al., 2019; Santoyo, et al., 2021; W. Dong et al., 2023).

Như vậy, ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 có khả năng đối kháng với nấm bệnh *A. niger*, đồng thời còn có khả năng sinh IAA và có thể tác động đến sinh trưởng của cây lạc. Năng suất thực thu tăng so với đối chứng trong thử nghiệm trên đồng ruộng có thể là kết quả tổng hợp của giảm bệnh, kích thích sinh trưởng, cải thiện một số yếu tố cấu thành năng suất của lạc. Kết quả thực nghiệm này cùng với việc đáp ứng các chỉ tiêu khảo sát về an toàn sinh học, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ bệnh HRGMĐ và nâng cao năng suất lạc của hỗ hợp ba chủng *Bacillus* được tuyển chọn. Tuy nhiên, thử nghiệm mới được thực hiện tại bốn địa điểm trong một vụ, do đó cần tiếp tục đánh giá qua nhiều vụ và điều kiện canh tác khác nhau để xác định tính ổn định của hiệu quả của hỗ hợp ba chủng *Bacillus* được tuyển chọn (Hình PL 9.1 ở Phụ lục IX và PL 10.1, PL 10.2 ở Phụ lục X.

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 MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt

Bộ Khoa học và Công nghệ. (2022). *Thuốc bảo vệ thực vật – Khảo nghiệm hiệu lực sinh học trên đồng ruộng* (TCVN 12561:2022).

Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường. (1995). *Chất lượng đất – Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm lên giun đất (Eisenia fetida) – Phần 1: Xác định độ độc cấp tính bằng phép thử trên nền nhân tạo* (TCVN 5961:1995).

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. (2011). *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lạc* (QCVN 01-57:2011/BNNPTNT).

Bùi Thanh Đạo, Ngô Thanh Phong, & Cao Ngọc Điệp. (2021). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA trong cây đậu phộng (lạc) (*Arachis hypogaea* L.) trồng tại 03 huyện miền núi tỉnh Bình Định. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 57*(6), 125–131. https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.179

Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật thành phố Huế. (2025). *Báo cáo tổng kết sản xuất trồng trọt và bảo vệ thực vật năm 2025, triển khai sản xuất vụ Đông Xuân 2025–2026*.

Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật Thừa Thiên Huế. (2024). *Báo cáo tổng kết sản xuất trồng trọt và bảo vệ thực vật năm 2024, triển khai sản xuất vụ Đông Xuân 2024–2025* (Báo cáo số 476/BC-TTBVTV).

Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Quảng Trị. (2024). *Đánh giá kết quả thực hiện nhiệm vụ năm 2024, triển khai kế hoạch năm 2025* (Báo cáo số 1486/BC-TTBVTV).

Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Quảng Trị. (2025). *Đánh giá kết quả hoạt động năm 2025 và kế hoạch thực hiện nhiệm vụ năm 2026* (Báo cáo số 587/BC-TTBVTV).

Chu Thanh Bình, Nguyễn Việt Hà, Nguyễn Hữu Thắng, Đào Ngọc Ánh, & Trần Bảo Trâm. (2024). Đánh giá khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 66*(11), 55–60. https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/3087

Cục Bảo vệ thực vật. (2021). *Bảo vệ thực vật – Phương pháp điều tra sinh vật gây hại – Phần 3: Nhóm cây công nghiệp* (TCVN 13268-3:2021). Bộ Khoa học và Công nghệ.

Đoàn Thị Kiều Tiên, Dương Hoài Phong, Phạm Văn Lực, & Nguyễn Thị Thu Nga. (2025). Hiệu quả của vi khuẩn vùng rễ trong phòng trừ bệnh chết cây con trên cây bắp (*Zea mays* L.) do nấm *Rhizoctonia solani* Kuhn trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 61*(2B), 206–212. https://doi.org/10.22144/ctujos.2025.042

Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Hồng Vân, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Nguyễn Hữu Nhân, Cao Đăng Nguyên, & Nguyễn Hoàng Lộc. (2014). Khảo sát tính chất lý hóa của endo-β-1,4-glucanase từ *Trichoderma asperellum* SH16. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng, 9*(82), 71–74.

Lê Như Cương. (2015). Kỷ yếu kết quả nghiên cứu đối với 3 loại nấm gây bệnh cây trồng (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora palmivora*). Trong *Báo cáo hội nghị khoa học các biện pháp phòng trừ sâu bệnh không gây ô nhiễm môi sinh* (tr. 84–90). Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Lê Như Cương, Hoàng Kim Toản, Nguyễn Xuân Vũ, Thái Thị Huyền, & Lê Thị Thu Thảo. (2019). Hiệu quả kích thích sinh trưởng và nâng cao năng suất của vi khuẩn *Bacillus* cho cây lạc ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 128*(3C), 13–22. https://doi.org/10.26459/hueuni-jard.v128i3C.5229

Lê Như Cương, Nguyễn Thị Nhung, & Nguyễn Thị Diễm. (2018). Khả năng kháng nấm và hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc trắng lạc (*Sclerotium rolfsii*) của dung dịch nano bạc. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 127*(3A), 161–171. https://doi.org/10.26459/hueuni-jard.v127i3A.4461

Nguyễn Bảo Hảo. (2004). Tình hình nhiễm nấm *Aspergillus* spp. trên hạt giống một số cây trồng và ảnh hưởng của nấm gây bệnh đến sự nảy mầm và sức sống của cây con. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp, 2*, 9–12.

Nguyễn Đức Huy, Phạm Quang Nguyên, Nguyễn Thị Thanh Hồng, Hà Giang, Nguyễn Văn Viên, & Nguyễn Tất Cảnh. (2017). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của *Trichoderma asperellum* đối với tác nhân gây bệnh cây có nguồn gốc trong đất. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 15*(12), 1593–1604.

Nguyễn Hoàng Anh, Nguyễn Thị Thanh Thủy, & Nguyễn Văn Hoàng. (2017). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme beta-glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 15*(1), 85–91.

Nguyễn Khanh Vân, & Bùi Minh Tăng. (2003). Đặc điểm hình thế thời tiết gây mưa, lũ, lụt lớn và đặc biệt lớn các tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên - Huế. *Vietnam Journal of Earth Sciences, 25*(4), 339–345. https://vjs.ac.vn/jse/article/view/11432

Nguyễn Phú Dũng, Đào Thị Mỹ Tiên, Nguyễn Thị Thái Sơn, Nguyễn Trương Hồng Công, & Huỳnh Hữu Lợi. (2025). Định danh và khả năng tiết enzyme đối kháng của *Bacillus amyloliquefaciens* BA5ATT với *Phytophthora palmivora* gây bệnh vàng lá, thối rễ sầu riêng tại xã Long Kiến, tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 61*(Chuyên đề: Nông nghiệp bền vững vì an ninh lương thực và an toàn thực phẩm), 214–222. https://doi.org/10.22144/ctujos.2025.234

Nguyễn Thị Thu Huyền, Nguyễn Đức Huy, Nguyễn Bảo Hưng, Lê Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Minh Nga, & Trần Quốc Dung. (2024). Khả năng đối kháng bệnh thán thư do *Colletotrichum fructicola* CL5 trên ớt của β-1,3-glucanase sinh tổng hợp từ *Bacillus* spp. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 133*(3A), 49–60. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v133i3A.7379

Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Đức Huy, Cao Thị Thuyết, Nguyễn Bảo Hưng, Nguyễn Quang Cơ, Thái Thị Huyền, Nguyễn Thị Ái Nhung, Nguyễn Thị Thanh Hải, & Nguyễn Xuân Hiếu. (2025). *Báo cáo tổng kết đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ: Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung* (Mã số CT-2022.09.DHH.04). Đại học Huế.

Nguyễn Tiến Long, Đặng Thanh Long, Phan Nhật Phát, Cao Thị Thuyết, Nguyễn Quang Cơ, & Nguyễn Thị Thu Thuỷ. (2023). Khả năng chịu hạn, tình hình sâu bệnh hại và năng suất của tập đoàn dòng, giống lạc tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 132*(3A), 155–169. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v132i3A.6987

Nguyễn Vũ Thuận, Đặng Oanh, Nguyễn Thị Thanh Mai, & Đặng Thị Khuyên. (2022). Khảo sát mức độ nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong ngô, lạc ở một số hộ gia đình thuộc 3 huyện Ea H'Leo, Cư M'Gar, Krông Pắc tại tỉnh Đắk Lắk năm 2016. *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm, 5*(2), 414–421.

Nguyễn Xuân Vũ. (2022). *Nghiên cứu sử dụng chế phẩm vi khuẩn có ích Bacillus trong sản xuất lạc ở Quảng Nam* [Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế]. https://hueuni.edu.vn/portal/vi/data/bandtdhlocal/20220314_132618_noidungluanvu.pdf

Phạm Thị Diễm Thi, Nguyễn Thị Bích Thảo, Nguyễn Đức Chung, Trương Thị Phương Lan, & Hoàng Tấn Quảng. (2024). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme β-1,3-glucanase của chủng *Bacillus siamensis* ML3. Trong *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Công nghệ Sinh học 2024* (tr. 311–317). Đại học Huế.

Phạm Văn Lực, Nguyễn Hoàng Tú, Phan Minh Trí, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Lê Hữu Nghị, Đoàn Thị Kiều Tiên, & Nguyễn Thị Thu Nga. (2025). Hiệu quả của hỗn hợp vi khuẩn *Bacillus* spp. trong phòng trị bệnh đạo ôn lá và cổ bông trên lúa do nấm *Pyricularia oryzae* ở điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 61*(1B), 142–151. https://doi.org/10.22144/ctujos.2025.014

Tổng cục Thống kê. (2024). *Niên giám thống kê 2023*. Nhà xuất bản Thống kê. https://www.gso.gov.vn/

Trần Thị Thu Hà, & Phạm Thị Hòa. (2012). Khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm bệnh hại cây trồng *Sclerotium rolfsii* Sacc trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế, 75A*(6), 49–55. https://doi.org/10.26459/jard.v75i6.3158

Trần Văn Tý, Trần Thị Thu Hà, Hoàng Thị Thái Hòa, & Trịnh Thị Sen. (2017). Ảnh hưởng của phân hữu cơ Bokashi, chế phẩm *Trichoderma* và *Pseudomonas* đến sinh trưởng, phát triển và năng suất lạc trên đất xám bạc màu tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 126*(3C), 207–216. https://doi.org/10.26459/hueuni-jard.v126i3C.4198

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

Ajuna, H. B., Lim, H.-I., Moon, J.-H., Won, S.-J., Choub, V., Choi, S.-I., Yun, J.-Y., & Ahn, Y. S. (2023). The prospect of hydrolytic enzymes from *Bacillus* species in the biological control of pests and diseases in forest and fruit tree production. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(23), Article 16889. https://doi.org/10.3390/ijms242316889

Akhtar, N., Shoaib, A., Munir, S., Ali, A., & Khurshid, S. (2014). Isolation, identification and enzyme production profile of *A. niger*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, *24*(5), 1438–1443.

Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., & Johnson, D. V. (Eds.). (2019). *Advances in plant breeding strategies: Nut and beverage crops* (Vol. 4). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5

Ali, M. A., Ahmed, T., Ibrahim, E., Rizwan, M., Chong, K. P., & Yong, J. W. H. (2024). A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities. *Heliyon*, *10*(10), Article e31573. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31573

Ali, M. A., Ren, H., Ahmed, T., Luo, J., An, Q., Qi, X., & Li, B. (2020). Antifungal effects of rhizospheric *Bacillus* species against bayberry twig blight pathogen *Pestalotiopsis versicolor*. *Agronomy*, *10*(11), Article 1811. https://doi.org/10.3390/agronomy10111811

Ali, S. (2026). Decoding *Bacillus* spp.: Antimicrobial diversity, biocontrol mechanisms, and safe deployment in plant disease management. *Plants*, *15*(12), Article 1834. https://doi.org/10.3390/plants15121834

Alwadai, A. S., Perveen, K., & Alwahaibi, M. (2022). The isolation and characterization of antagonist *Trichoderma* spp. from the soil of Abha, Saudi Arabia. *Molecules*, *27*(8), Article 2525. https://doi.org/10.3390/molecules27082525

Andargie, Y. E., Lee, G., Kim, M.-J., Fentie, E. G., Jeong, M., Tagele, S. B., Lim, K., Azizoglu, U., & Shin, J.-H. (2025). Soil microbial load modulation improves plant-microbe interactions and bioinoculant efficacy in pathogen-stressed soils. *Frontiers in Plant Science*, *16*, Article 1712997. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1712997

Andge, R. B., Parate, R. L., Sawai, H. R., & Kalaskar, R. R. (2017). In vitro studies on management of collar rot caused by *Aspergillus niger* in groundnut. *Journal of Soils and Crops*, *27*(1), 80–83.

Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, *11*, Article 1350. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350

Anith, K. N., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *73*(2), 229–236. https://doi.org/10.1111/lam.13495

Aphaiso, P., Mahakhan, P., & Sawaengkaew, J. (2024). *Bacillus siamensis* 3BS12-4 extracellular compounds as a potential biological control agent against *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(8), 1671–1679. https://doi.org/10.4014/jmb.2402.02053

Awoke, R. W., Okello, D., Mafurah, J., & Kimurto, P. (2025). Agricultural technologies and practices for groundnut diseases management in Africa: A review. *Discover Agriculture*, *3*, Article 206. https://doi.org/10.1007/s44279-025-00377-3

Ayyandurai, M., Akila, R., Manonmani, K., Theradimani, M., & Vellaikumar, S. (2021). Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science*, *13*(4), 1172–1179. https://doi.org/10.31018/jans.v13i4.2936

Bacete, L., Mélida, H., Miedes, E., & Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: Cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, *93*(4), 614–636. https://doi.org/10.1111/tpj.13807

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*, Article 1473. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473

Bajaya, T., Ghasolia, R. P., Bajya, M., & Shivran, M. (2022a). Management of collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*) by fungicides and mineral nutrients. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, *92*(2), 273–277. https://doi.org/10.56093/ijas.v92i2.122251

Bajaya, T., Ghasolia, R. P., Bajya, M., Choudhary, M., Shivran, M., Kumari, P., & Sharma, J. (2022b). Isolation, identification, pathogenicity and host range of *Aspergillus niger* causing collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*). *The Pharma Innovation Journal*, *11*(2), 1441–1445.

Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *84*(1), Article e00049-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00049-19

Bamba, T., Aoki, R., Hori, Y., Ishikawa, S., Yoshida, K., Taoka, N., Kobayashi, S., Yasueda, H., Kondo, A., & Hasunuma, T. (2024). High-throughput evaluation of hemolytic activity through precise measurement of colony and hemolytic zone sizes of engineered *Bacillus subtilis* on blood agar. *Biology Methods and Protocols*, *9*(1), Article bpae044. https://doi.org/10.1093/biomethods/bpae044

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4_ts), 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493

Baumann, K., Carnicer, M., Dragosits, M., Graf, A. B., Stadlmann, J., Jouhten, P., Maaheimo, H., Gasser, B., Albiol, J., Mattanovich, D., & Ferrer, P. (2010). A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Systems Biology*, *4*, Article 141. https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-141

Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(16), E1621–E1630. https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110

Begoude, B. A. D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P. R., & Jijakli, M. H. (2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and a_w on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 845–854. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03305.x

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1327–1350. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9

Bhunjun, C. S., Phillips, A. J. L., Jayawardena, R. S., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's postulates. *Pathogens*, *10*(9), Article 1096. https://doi.org/10.3390/pathogens10091096

Bian, C., Kusuya, Y., Sklenář, F., D'hooge, E., Yaguchi, T., Ban, S., Visagie, C. M., Houbraken, J., Takahashi, H., & Hubka, V. (2022). Reducing the number of accepted species in *Aspergillus* series *Nigri*. *Studies in Mycology*, *102*, 95–132. https://doi.org/10.3114/sim.2022.102.03

Bigatton, E. D., Ayoub, I., Castillejo, M. Á., Merlo, C., Vázquez, C., Archilla, M. V., Bruno, M., Martín, M. P., Pizzolitto, R. P., Dubini, L. E., Lucini, E. I., & Haro, R. J. (2025). Plant growth-promoting rhizobacteria on peanut seedlings (*Arachis hypogaea* L.): Isolation, taxonomical, and functional characterization. *Oil Crop Science*, *10*(2), 87–99. https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2025.04.003

Bigatton, E. D., Verdenelli, R. A., Haro, R. J., Ayoub, I., Barbero, F. M., Martín, M. P., Dubini, L. E., Jorrín Novo, J. V., Lucini, E. I., & Castillejo, M. A. (2024). Metagenomic analysis to assess the impact of plant growth-promoting rhizobacteria on peanut (*Arachis hypogaea* L.) crop production and soil enzymes and microbial diversity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *72*(41), 22385–22397. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c05687

Biswal, A. K., Ozias-Akins, P., & Holbrook, C. C. (2024). Recent technological advancements for identifying and exploiting novel sources of pest and disease resistance for peanut improvement. *Agronomy*, *14*(12), Article 3071. https://doi.org/10.3390/agronomy14123071

Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*(1), 15–25. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR

Bongomin, F., Punt, M., de Jong, A., Verweij, P. E., van Rhijn, N., & Denning, D. W. (2026). The black aspergilli (*Aspergillus niger* complex) and their role in human, animal, and plant diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, *39*(3), Article e00158-25. https://doi.org/10.1128/cmr.00158-25

Borriss, R., Gao, X., & Fan, B. (2026). *Bacillus velezensis* as a model for plant-associated beneficial bacilli. *Journal of Bacteriology*, *208*(3), Article e00519-25. https://doi.org/10.1128/jb.00519-25

Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, *28*(8), 799–808. https://doi.org/10.1002/bies.20441

Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2021). In honor of John Bissett: Authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, *107*(1), 1–69. https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4

Camerini, G., Maini, S., & Riedel, M. (2018). *Ostrinia nubilalis* parasitoids in northern Italy: Past and present. *Biological Control*, *122*, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.011

Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, *8*, Article 4360. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z

Caseiro, C., Dias, J. N. R., de Andrade Fontes, C. M. G., & Bule, P. (2022). From cancer therapy to winemaking: The molecular structure and applications of β-glucans and β-1,3-glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6), Article 3156. https://doi.org/10.3390/ijms23063156

Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., & Boonrungsiman, S. (2022). Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions. *Analytical Biochemistry*, *637*, Article 114449. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449

Chang, Y., Dong, Q., Zhang, L., Goodwin, P. H., Xu, W., Xia, M., Zhang, J., Sun, R., Wu, C., Wu, K., Xu, S., & Yang, L. (2025). Peanut growth promotion and biocontrol of blight by *Sclerotium rolfsii* with rhizosphere bacterium, *Bacillus siamensis* YB-1632. *Agronomy*, *15*(3), Article 568. https://doi.org/10.3390/agronomy15030568

Chatterjee, S., & Das, S. (2020). Developmental stages of biofilm and characterization of extracellular matrix of manglicolous fungus *Aspergillus niger* BSC-1. *Journal of Basic Microbiology*, *60*(3), 231–242. https://doi.org/10.1002/jobm.201900550

Chen, L., Champramary, S., Sahu, N., Indic, B., Szűcs, A., Nagy, G., Maróti, G., Pap, B., Languar, O., Vágvölgyi, C., Nagy, L. G., Kredics, L., & Sipos, G. (2023). Dual RNA-Seq profiling unveils mycoparasitic activities of *Trichoderma atroviride* against haploid *Armillaria ostoyae* in antagonistic interaction assays. *Microbiology Spectrum*, *11*(3), Article e04626-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.04626-22

Chen, X., Huang, H., Zhang, S., Zhang, Y., Jiang, J., Qiu, Y., Liu, J., & Wang, A. (2021). *Bacillus velezensis* WZ-37, a new broad-spectrum biocontrol strain, promotes the growth of tomato seedlings. *Agriculture*, *11*(7), Article 581. https://doi.org/10.3390/agriculture11070581

Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, *25*(9), 1007–1014. https://doi.org/10.1038/nbt1325

Choi, Y., Pham, H., Nguyen, M. P., Tran, L. V. H., Kim, J., Kim, S., Lee, C. W., Song, J., & Kim, Y.-H. (2021). A native conjugative plasmid confers potential selective advantages to plant growth-promoting *Bacillus velezensis* strain GH1-13. *Communications Biology*, *4*, Article 582. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02107-z

Choub, V., Ajuna, H. B., Won, S.-J., Moon, J.-H., Choi, S.-I., Maung, C. E. H., Kim, C.-W., & Ahn, Y. S. (2021). Antifungal activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and growth promotion of walnut (*Juglans regia* L.) trees. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), Article 10438. https://doi.org/10.3390/ijms221910438

Chun, B. H., Kim, K. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group—*B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*—revealed by pan-genome analysis. *Food Microbiology*, *77*, 27–40. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.001

Collinge, D. B., Jensen, D. F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M. W., & Shaw, R. H. (2022). *Biological control of plant diseases—What has been achieved and what is the direction? Plant Pathology*, *71*(5), 1024–1047. https://doi.org/10.1111/ppa.13555

Cournault, Q., Gibot-Leclerc, S., Monnier, N., & Steinberg, C. (2025). Modes of action and inhibitory activity of *Trichoderma* species on potato and tomato pathogenic *Phytophthora infestans*: A review. *Fungal Biology Reviews*, *52*, Article 100414. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2025.100414

Dania, V. O., Fajemisin, A. O., & Azuh, V. O. (2021). Morphological and molecular characterization of *Aspergillus niger* causing postharvest rot of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). Archives of Phytopathology and Plant Protection. https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1983365

De Marco, J. L., Valadares-Inglis, M. C., & Felix, C. R. (2003). Production of hydrolytic enzymes by Trichoderma isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology*, *34*, 33–38.

Debez, I. B. S., Alaya, A. B., Karkouch, I., Khiari, B., Garcia-Caparros, P., Alyami, N. M., Debez, A., Tarhouni, B., & Djébali, N. (2024). In vitro and in vivo antifungal efficacy of individual and consortium *Bacillus* strains in controlling potato black scurf and possible development of spore-based fungicide. *Biological Control*, *193*, Article 105527. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105527

Dėlkus, M., Ivanauskas, A., Žižytė-Eidetienė, M., Lukša-Žebelovič, J., Vepštaitė-Monstavičė, I., Brokevičiūtė, S., & Šimkutė, N. (2026). *Bacillus* species in agriculture: Functional traits, biocontrol performance, and regulatory safety assessment. *Agriculture*, *16*(4), Article 413. https://doi.org/10.3390/agriculture16040413

Dewi, R. T. K., Mubarik, N. R., & Suhartono, M. T. (2016). Medium optimization of β-glucanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *28*(2), 116–125. https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-195

Dhumal, M. S., Arekar, J. S., Govekar, Y. R., & Potphode, P. D. (2022). In vitro evaluation of bioagents and botanicals against *Aspergillus niger* (Van Tieghem) causing storage rot of onion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *11*(1), 293–300. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2022.1101.035

Dickwella Widanage, M. C., Gautam, I., Sarkar, D., Mentink-Vigier, F., Vermaas, J. V., Ding, S.-Y., Lipton, A. S., Fontaine, T., Latgé, J.-P., Wang, P., & Wang, T. (2024). Adaptative survival of *Aspergillus fumigatus* to echinocandins arises from cell wall remodeling beyond β-1,3-glucan synthesis inhibition. *Nature Communications*, *15*, Article 6382. https://doi.org/10.1038/s41467-024-50799-8

Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (Eds.). *(2013)*. Development of *Aspergillus niger*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Divya Rani, V., Sudini, H., Reddy, P. N., Kumar, K. V. K., & Uma Devi, G. (2018). Resistance screening of groundnut advanced breeding lines against collar rot and stem rot pathogens. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, *6*(1), 467–474. https://doi.org/10.18782/2320-7051.5494

Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1194606. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606

Dong, Q., Liu, Q., Goodwin, P. H., Deng, X., Xu, W., Xia, M., Zhang, J., Sun, R., Wu, C., Wang, Q., Wu, K., & Yang, L. (2023). Isolation and genome-based characterization of biocontrol potential of *Bacillus siamensis* YB-1631 against wheat crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum*. *Journal of Fungi*, *9*(5), Article 547. https://doi.org/10.3390/jof9050547

Dong, W., Liu, H., Ning, Z., Bian, Z., Zeng, L., & Xie, D. (2023). Inoculation with *Bacillus cereus* DW019 modulates growth, yield and rhizospheric microbial community of cherry tomato. *Agronomy*, *13*(6), Article 1458. https://doi.org/10.3390/agronomy13061458

Dou, K., Lu, Z., Wu, Q., Ni, M., Yu, C., Wang, M., Li, Y., Wang, X., Xie, H., Chen, J., & Zhang, C. (2020). MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(18), Article e01532-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20

Du, H., & Li, C. (2024). Study on the mechanism of peanut resistance to *Fusarium oxysporum* infection induced by *Bacillus thuringiensis* TG5. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1251660. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251660

Dunlap, C. A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(3), 1212–1217. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858

Dutilloy, E., Argüelles Arias, A., Richet, N., Guise, J.-F., Duban, M., Leclère, V., Selim, S., Jacques, P., Jacquard, C., Clément, C., Aït Barka, E., & Esmaeel, Q. (2024). *Bacillus velezensis* BE2 controls wheat and barley diseases by direct antagonism and induced systemic resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*(1), Article 64. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12864-y

El-Dawy, E. G. A. M., Hussein, M. A., & El-Nahas, S. (2024). Description and management of Aspergillus section Nigri causing post-harvest bulbs rot of onion. *Scientific Reports*, *14*, Article 6076. https://doi.org/10.1038/s41598-024-53849-9

El-Shora, H. M., El-Sharkawy, R. M., Khateb, A. M., & Darwish, D. B. (2021). Production and immobilization of β-glucanase from *Aspergillus niger* with its applications in bioethanol production and biocontrol of phytopathogenic fungi. *Scientific Reports*, *11*, Article 21000. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00237-2

Elshami, N. H., El-Housseiny, G. S., Yassien, M. A., & Hassouna, N. A. (2025). Statistical and neural network modeling of β-glucanase production by *Streptomyces albogriseolus* (PQ002238), and immobilization on chitosan-coated magnetic microparticles. *Bioresources and Bioprocessing*, *12*, Article 32. https://doi.org/10.1186/s40643-025-00862-z

Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023). Potential use of Bacillus spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. *Current Research in Biotechnology*, *5*, Article 100128. https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100128

Etesami, H., Yadegari, A. H., Otabek, U., Zahro, B., Shavakatullo, N., & Tolqinjon, A. (2026). The root's hidden ally: How the rhizosheath microbiome fortifies crops against drought. *aBIOTECH*, *7*(1), Article 100015. https://doi.org/10.1016/j.abiote.2025.100015

Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "operational group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, *8*, Article 22. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022

Fang, X., Liu, H., Du, Y., Jiang, L., Gao, F., Wang, Z., Chi, Z., Shi, B., & Zhao, X. (2024). *Bacillus siamensis* targeted screening from highly colitis-resistant pigs can alleviate ulcerative colitis in mice. *Research*, *7*, Article 0415. https://doi.org/10.34133/research.0415

Fatin-Rouge, N., Starchev, K., & Buffle, J. (2004). Size effects on diffusion processes within agarose gels. *Biophysical Journal*, *86*(5), 2710–2719. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74325-8

Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). β-Glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, *90*, 53–60. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004

Figueiredo, J. E. F., Diniz, G. F. D., Marins, M. S., Silva, F. C., Ribeiro, V. P., Lanza, F. E., Oliveira-Paiva, C. A., & Cruz-Magalhães, V. (2025). *Bacillus velezensis* CNPMS-22 as biocontrol agent of pathogenic fungi and plant growth promoter. *Frontiers in Microbiology*, *16*, Article 1522136. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1522136

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). FAOSTAT statistical database. https://www.fao.org/faostat/

Francioli, D., Kampouris, I. D., Kuhl-Nagel, T., Babin, D., Sommermann, L., Behr, J. H., Chowdhury, S. P., Zrenner, R., Moradtalab, N., Schloter, M., Geistlinger, J., Ludewig, U., Neumann, G., Smalla, K., & Grosch, R. (2025). Microbial inoculants modulate the rhizosphere microbiome, alleviate plant stress responses, and enhance maize growth at field scale. *Genome Biology*, *26*(1), Article 148. https://doi.org/10.1186/s13059-025-03621-7

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 337–359. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924

Gajera, H., Rakholiya, K., & Vakharia, D. (2011). Bioefficacy of *Trichoderma* isolates against *Aspergillus niger* Van Tieghem inciting collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Journal of Plant Protection Research, 51(3). https://doi.org/10.2478/v10045-011-0040-x

Gajera, H. P., & Vakharia, D. N. (2012). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(1), 43–52.

Gangaraj, R., Kundu, A., Rana, V. S., Das, A., Chawla, G., Prakash, G., Debbarma, R., Nagaraja, A., Bainsla, N. K., Gupta, N. C., & Kamil, D. (2023). Metabolomic profiling and its association with the bio-efficacy of *Aspergillus niger* strain against Fusarium wilt of guava. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1142144. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142144

Gao, F., Liu, X., Dong, R., Liao, M., Qin, X., Wang, X., Zhang, W., Huang, H., Luo, H., Yao, B., Wang, Y., & Tu, T. (2023). Exploring the antifungal mechanism of β-1,3-glucanase for effectively inhibiting the food contamination by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. *LWT–Food Science and Technology*, *187*, Article 115342. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115342

Gawarkar, S. V., Deshmukh, R. G., Matte, A. D., & Patil, M. J. (2022). In vitro management of *Aspergillus niger* of sesamum (*Sesamum indicum*). *The Pharma Innovation Journal*, *11*(12), 768–770.

George, M., & Ramteke, P. W. (2019). Morphology, molecular identification and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal nuclear DNA (rDNA) sequence of a pathogenic fungal isolate *Aspergillus niger* LKO1. *Tropical Plant Research*, *6*(2), 166–170. https://doi.org/10.22271/tpr.2019.v6.i2.024

Gharsallah, H., Cheffi, M., Mallek, R., Omri, N., Triki, M. A., Öztop, M. H., & Zarai, Z. (2025). Antifungal potential of Bacillus strains: Implications for biocontrol strategies in food safety and sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *16*, Article 1615252. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1615252

Ghewande, M. P., Desai, S., & Basu, M. S. (2002). *Diagnosis and management of major diseases of groundnut*. National Research Centre for Groundnut.

Gorai, P. S., Ghosh, R., Mandal, S., Ghosh, S., Chatterjee, S., Gond, S. K., & Mandal, N. C. (2021). *Bacillus siamensis* CNE6- a multifaceted plant growth promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad spectrum antifungal activities and host colonizing potential. *Microbiological Research*, *252*, Article 126859. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126859

Gow, N. A. R., & Lenardon, M. D. (2023). Architecture of the dynamic fungal cell wall. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(4), 248–259. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00796-9

Goyal, R. K., Mattoo, A. K., & Schmidt, M. A. (2021). Rhizobial–host interactions and symbiotic nitrogen fixation in legume crops toward agriculture sustainability. *Frontiers in Microbiology*, *12*, Article 669404. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669404

Guo, M. J., Wang, Q. T., Cheng, Y. H., & Hou, C. L. (2021). Identification of *Aspergillus tubingensis* causing pomegranate fruit rot in China. *Australasian Plant Pathology*, *50*, 233–240. https://doi.org/10.1007/s13313-020-00769-7

Gutenwik, J., Nilsson, B., & Axelsson, A. (2004). Effect of hindered diffusion on the adsorption of proteins in agarose gel using a pore model. *Journal of Chromatography A*, *1048*(2), 161–172. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.052

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98.

Hashem, A., Tabassum, B., & Abd_Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(6), 1291–1297. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004

Heo, G., Kong, H., Kim, N., Lee, S., Sul, S., Jeong, D.-W., & Lee, J.-H. (2022). Antibiotic susceptibility of *Bacillus velezensis*. *FEMS Microbiology Letters*, *369*(1), Article fnac017. https://doi.org/10.1093/femsle/fnac017

Hoang Ha My A, Vo Thi Ngoc Trai, & Nguyen Bao Hung. (2024). Effect of culture conditions on β-1,3-glucanase production by *Paenibacillus polymyxa* M6. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, *133*(3D), 67–82. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v133i3D.7706

Hoang Tan Quang, Tran Thi Ngoc Tram, Hoang Tien Hien, Ton Nu Minh Thi, & Pham Thi Diem Thi. (2024). Characterization and antifungal activity of extracellular β-1,3-glucanase from *Paenibacillus polymyxa* AT4. *Research Journal of Biotechnology, 19*(12), 126–133. https://doi.org/10.25303/1912rjbt1260133

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, *87*(1), 4–10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

Hu, J., Wang, Z., & Xu, W. (2023). Genome sequence of *Bacillus velezensis* LZN01 inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum and producing myriocin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *37*(1), Article 2227731. https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2227731

Igiehon, B. C., Babalola, O. O., & Hassen, A. I. (2024). Rhizosphere competence and applications of plant growth-promoting rhizobacteria in food production – A review. *Scientific African*, *23*, Article e02081. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02081

International Organization for Standardization. (2012). Soil quality—Effects of pollutants on earthworms—Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* (ISO Standard No. 11268-1:2012). https://www.iso.org/standard/53527.html

Ishibashi, K., Kurone, Y., Motoi, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Shirasu, Y., & Ohno, N. (2010). The influence of β-glucan on the growth and cell wall architecture of *Aspergillus* spp. *Microbiology and Immunology*, *54*(11), 666–672. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00264.x

Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of Bacillus sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Biological Control*, *123*, 60–70. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018

Jia, S., Song, C., Dong, H., Yang, X., Li, X., Ji, M., & Chu, J. (2023). Evaluation of efficacy and mechanism of *Bacillus velezensis* CB13 for controlling peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1111965. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1111965

Jiang, H.-Z., Liu, L.-Y., Yang, R.-D., Chen, J., & Jin, J. (2025). Genome mining and metabolite profiling uncover the biocontrol and plant growth-promoting capacities of *Bacillus velezensis* TCS001. *Biological Control*, *211*, Article 105928. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2025.105928

Jin, M., Tang, Y., Yang, R., Zeng, Q., Duan, M., Li, J., & Meng, J. (2025). Identification and genomic insights into the biological control and growth-promoting mechanism of *Bacillus velezensis* L11-7, a potential biocontrol agent of passion fruit stem basal rot. *Microorganisms*, *13*(9), Article 2084. https://doi.org/10.3390/microorganisms13092084

Jin, X., Wang, J.-K., & Wang, Q. (2023). Microbial β-glucanases: Production, properties, and engineering. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(4), Article 106. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03550-2

Junjadia, G., Verma, J. R., Ram, D., Kumawat, M. M., Kumar, M., & Kumar, S. (2025). Isolation, identification and pathogenicity of collar rot of groundnut (*Arachis hypogaea*) caused by *Aspergillus niger* van Tieghem. *Biological Forum*, *17*(6), 04–08. https://doi.org/10.65041/BiologicalForum.2025.17.6.2

Jørgensen, T. R., Park, J., Arentshorst, M., van Welzen, A. M., Lamers, G., vanKuyk, P. A., Damveld, R. A., van den Hondel, C. A. M., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Ram, A. F. J. (2011). The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(5), 544–553. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.01.005

Kader, M., Xu, L., Fang, L., Wufuer, R., Zhang, M., Wei, N., Wang, D., & Zhang, Z. (2025). The antimicrobial extract derived from *Pseudomonas* sp. HP-1 for inhibition of *Aspergillus flavus* growth and prolongation of maize seed storage. *Foods*, *14*(10), Article 1774. https://doi.org/10.3390/foods14101774

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Kampa, R., Vittal, R., Basha, S. A., Pushpavalli, S. N. C. V. L., & Bokka, V. (2025). Plant growth-promoting microbial consortia for effective biocontrol of groundnut collar rot and chickpea wilt. *Plant Pathology*, *74*(5), 1121–1141. https://doi.org/10.1111/ppa.14078

112. Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, *9*, Article 2747. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05199-0

Keshmirshekan, A., de Souza Mesquita, L. M., & Ventura, S. P. M. (2024). Biocontrol manufacturing and agricultural applications of *Bacillus velezensis*. *Trends in Biotechnology*, *42*(9), 1147–1162. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2024.02.003

Khalid, A., Ye, M., Wei, C., Dai, B., Yang, R., Huang, S., & Wang, Z. (2021). Production of β-glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *51*(6), 586–597. https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1833344

Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H., & Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, *11*, Article 100341. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341

Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, *10*, Article 845. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845

Korangi Alleluya, V., Argüelles Arias, A., Ribeiro, B., De Coninck, B., Helmus, C., Delaplace, P., & Ongena, M. (2023). *Bacillus* lipopeptide-mediated biocontrol of peanut stem rot caused by *Athelia rolfsii*. *Frontiers in Plant Science*, *14*, Article 1069971. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1069971

Krake, S., Conzelmann, C., Heuer, S., Dyballa, M., Zibek, S., & Hahn, T. (2024). Production of chitosan from *Aspergillus niger* and quantitative evaluation of the process using adapted analytical tools. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *29*(6), 942–954. https://doi.org/10.1007/s12257-024-00124-3

Kredics, L., Büchner, R., Balázs, D., Allaga, H., Kedves, O., Racić, G., Varga, A., Nagy, V. D., Vágvölgyi, C., & Sipos, G. (2024). Recent advances in the use of *Trichoderma*-containing multicomponent microbial inoculants for pathogen control and plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(5), Article 162. https://doi.org/10.1007/s11274-024-03965-5

Kruijt, M., Tran, H., & Raaijmakers, J. M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(2), 546–556. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04244.x

Kumar, C. V., Saifulla, M., Reddy, M. G., Naveenkumar, R., & Prabhukarthikeyan, S. R. (2020). Occurrence, pathogenicity and assessment of groundnut genotypes resistance to *Aspergillus niger* inciting collar rot disease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *9*(11), 874–886. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.105

Kumari, M., & Singh, M. (2016). Morphological and pathogenic variabilities among *Aspergillus niger* isolates associated with Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Plant Protection Sciences*, *24*(2), 364–368.

Kumawat, G., Rajpurohit, D., Vyas, D., Bhojiya, A. A., Upadhyay, S. K., & Jain, D. (2025). Characterization of green-synthesized zinc oxide nanoparticles and its influence on post-harvest shelf-life of garlic against black mold disease caused by *Aspergillus niger*. *Frontiers in Microbiology*, *16*, Article 1532593. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1532593

Kusaka, H., Imai, Y., Kobayashi, H., Doan, Q.-V., & Ngo-Duc, T. (2024). Influence of foehn winds of Truong Son Mountains on the high temperatures observed in North-Central Vietnam during 31 May–5 June 2017. *Journal of Applied Meteorology and Climatology*, *63*(5), 597–616. https://doi.org/10.1175/JAMC-D-23-0010.1

Kuzin, A. I., Tagaev, A. A., Ovchinnikova, T. V., Kuznetsova, N. I., Nikolaenko, M. A., Morozova, O. A., & Azizbekyan, R. R. (2019). Study of the strain *Bacillus pumilus* B-13176 and its metabolites with fungicidal and antibacterial activities against *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *55*(7), 748–755. https://doi.org/10.1134/S0003683819070056

Lagerlöf, J., Ayuke, F., Bejai, S., Jorge, G., Lagerqvist, E., Meijer, J., Muturi, J. J., & Söderlund, S. (2015). Potential side effects of biocontrol and plant-growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria on earthworms. *Applied Soil Ecology*, *96*, 159–164. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.014

Lamichhane, J. R., Corrales, D. C., & Soltani, E. (2022). Biological seed treatments promote crop establishment and yield: A global meta-analysis. *Agronomy for Sustainable Development*, *42*, Article 45. https://doi.org/10.1007/s13593-022-00761-z

Landa, B. B., Hervás, A., Bettiol, W., & Jiménez-Díaz, R. M. (1997). Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Phytoparasitica*, *25*(4), 305–318. https://doi.org/10.1007/BF02981092

Le Nhu Cuong, Hoang Kim Toan, Thai Thi Huyen, Tran Thi Le, Phan Thi Phuong Nhi, & Raaijmakers, J. M. (2018). Isolation, characterization and comparative analysis of plant-associated bacteria for suppression of soil-borne diseases of field-grown groundnut in Vietnam. *Biological Control*, *121*, 256–262. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.014

Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W256–W259. https://doi.org/10.1093/nar/gkz239

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293–W296. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301

Li, C., Li, S., Dang, G., Jia, R., Chen, S., Deng, X., Liu, G., Beckers, Y., & Cai, H. (2023). Screening and characterization of *Bacillus velezensis* LB-Y-1 toward selection as a potential probiotic for poultry with multi-enzyme production property. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1143265. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1143265

Li, S., Li, J., Yuan, M., Ren, J., Jiao, Y., Zhao, L., Wang, Y., Yan, Z., Li, J., Du, J., Wang, H., & Yang, C. (2025). Dual benefits of *Bacillus velezensis* LJ-19: Contact-dependent biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion in cucumber. *Frontiers in Plant Science*, *16*, Article 1711383. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1711383

Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS ONE*, *11*(9), Article e0162125. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125

Liang, Q., Tan, D., Chen, H., Guo, X., Afzal, M., Wang, X., Tan, Z., & Peng, G. (2024). Endophyte-mediated enhancement of salt resistance in *Arachis hypogaea* L. by regulation of osmotic stress and plant defense-related genes. *Frontiers in Microbiology*, *15*, Article 1383545. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383545

Logan, N. A., & Berkeley, R. C. W. (1984). Identification of Bacillus strains using the API system. *Journal of General Microbiology*, *130*(7), 1871–1882. https://doi.org/10.1099/00221287-130-7-1871

Lora, S., & Begum, T. (2022). Biological control of collar rot disease of groundnut caused by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, *10*(3), 10–16. https://doi.org/10.18782/2582-2845.8914

Luo, S., Wang, Z., & Xu, W. (2023). *Bacillus velezensis* WB invokes soil suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum by inducing particular taxa. *Annals of Agricultural Sciences*, *68*(2), 159–170. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2023.12.005

Majeed, T., Lee, C. C., Orts, W. J., Tabassum, R., Shah, T. A., Bin Jardan, Y. A., Dawoud, T. M., & Bourhia, M. (2024). Characterization of a thermostable protease from *Bacillus subtilis* BSP strain. *BMC Biotechnology*, *24*, Article 49. https://doi.org/10.1186/s12896-024-00870-5

Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, *71*(1), 7–14. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016

Mendes, I. C., Souza, L. M., Sousa, D. M. G., Lopes, A. A. C., Reis-Junior, F. B., Lacerda, M. P. C., & Malaquias, J. V. (2019). Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. *Applied Soil Ecology*, *139*, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.025

Meng, X., Cai, H., Luo, Y., Zhao, X., Fu, Y., Zou, L., Zhou, Y., & Tu, M. (2024). Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* LSR7 against rubber red root rot disease. *Journal of Fungi*, *10*(12), Article 849. https://doi.org/10.3390/jof10120849

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015

Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S. K., & Arora, N. K. (2020). Microbial enzymes in biocontrol of phytopathogens. In N. K. Arora, J. Mishra, & V. Mishra (Eds.), *Microbial enzymes: Roles and applications in industries* (pp. 259–285). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10

Miyanishi, N., Hamada, N., Kobayashi, T., Imada, C., & Watanabe, E. (2003). Purification and characterization of a novel extracellular β-1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *95*(1), 45–51. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80116-2

Mohammed, A., & Chala, A. (2014). Incidence of Aspergillus contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Eastern Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(8), 759–765.

Moreira, R. F., Pires, E. B. E., Sousa, O. F., Alves, G. B., Viteri Jumbo, L. O., Santos, G. R., Maia, L. J., Ribeiro, B. M., Smagghe, G., Perino, E. H. B., Hausmann, R., Oliveira, E. E., & Aguiar, R. W. S. (2025). A novel neotropical *Bacillus siamensis* strain inhibits soil-borne plant pathogens and promotes soybean growth. *Microorganisms*, *13*(6), Article 1366. https://doi.org/10.3390/microorganisms13061366

Mosquera, S., Leveau, J. H. J., & Stergiopoulos, I. (2021). Repeated exposure of *Aspergillus niger* spores to the antifungal bacterium *Collimonas fungivorans* Ter331 selects for delayed spore germination. *Applied and Environmental Microbiology, 87*(12), Article e00233-21. https://doi.org/10.1128/AEM.00233-21

Nath, K., & Patel, V. P. (2022). Evaluation of different fungicides and bio-agents to minimize the collar rot disease of groundnut caused by *Aspergillus niger* Van Tiegham. *International Journal of Tropical Agriculture, 40*(1–2), 159–165.

Ngo Thanh Son, Hoang Le Huong, Tran Thi Phuong, & Tran Trong Phuong. (2024). Assessing change impacts on flood and drought hazard in Thua Thien Hue province using standardized precipitation index (SPI). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1345*(1), Article 012022. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1345/1/012022

Nguyen Hoang Loc, Hoang Tan Quang, Nguyen Bao Hung, Nguyen Duc Huy, Truong Thi Bich Phuong, & Tran Thi Thu Ha. (2011). *Trichoderma asperellum* Chi42 genes encode chitinase. *Mycobiology*, *39*(3), 182–186. https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.182

Nguyen Hoang Loc, Nguyen Duc Huy, Hoang Tan Quang, Tran Thuy Lan, & Tran Thi Thu Ha. (2020). Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. *Mycology*, *11*(1), 38–48. https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1703839

Nguyen Thi Minh Nga, Nguyen Xuan Hieu, Nguyen Tien Long, Nguyen Duc Huy, & 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 Journal of Science, 51*(2), Article e2024022. https://doi.org/10.12982/CMJS.2024.022

Nguyen Van Thang, Nguyen Dang Mau, Doan Quang Van, Bui Minh Tuan, Mai Van Khiem, Duong Van Kham, Tran Thanh Thuy, Trinh Hoang Duong, Tran Thi Tam, Nguyen Huu Quyen, Luong Xuan Thai, & Tran Duy Hien. (2023). Orographic effect and the opposite trend of rainfall in Central Vietnam. *Advances in Meteorology*, *2023*, Article 7256634. https://doi.org/10.1155/2023/7256634

Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R. R., Sederoff, H., Chiang, V. L., & Borriss, R. (2020). Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Frontiers in Microbiology, 11*, Article 585404. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585404

156. Nji, Q. N., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2023). Soil *Aspergillus* species, pathogenicity and control perspectives. *Journal of Fungi, 9*(7), Article 766. https://doi.org/10.3390/jof9070766

Nogi, Y., & Horikoshi, K. (1990). A thermostable alkaline β-1,3-glucanase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. AG-430. *Applied Microbiology and Biotechnology, 32*(6), 704–707. https://doi.org/10.1007/BF00173872

Nurhariyati, T., Salamun, Supriyanto, A., Sinurat, T. B. M., Yuliana, F., Geraldi, A., Pratiwi, I. A., Nafidiastri, F. A., & Izzuddin, M. (2025). The potential of local *Bacillus* sp. BK7.1, EG6.4, and LSD4.2 as biocontrol agents against the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Biodiversitas, 26*(7), 3273–3280. https://doi.org/10.13057/biodiv/d260719

Ost, K. J., Student, M., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher, B. M., Ram, A. F. J., & Dirks-Hofmeister, M. E. (2025). Cell walls of filamentous fungi – challenges and opportunities for biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology, 109*, Article 125. https://doi.org/10.1007/s00253-025-13512-3

Otsuka, Y., Sato, K., Yano, S., Kanno, H., Suyotha, W., Konno, H., Makabe, K., & Taira, T. (2022). GH-16 type β-1,3-glucanase from *Lysobacter* sp. MK9-1 enhances antifungal activity of GH-19 type chitinase, and its glucan-binding domain binds to fungal cell-wall. *Journal of Applied Glycoscience, 69*(3), 49–56. https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022_0002

Pal, K. K., Dey, R., & Tilak, K. V. B. R. (2014). Fungal diseases of groundnut: Control and future challenges. In A. Goyal & C. Manoharachary (Eds.), *Future challenges in crop protection against fungal pathogens* (pp. 1–29). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1188-2_1

Pan, S., Li, Z., Wang, J., Li, X., Meng, L., Chen, Y., Su, M., & Li, Z. (2023). Electron microscopic imaging and NanoSIMS investigation on physiological responses of *Aspergillus niger* under Pb(II) and Cd(II) stress. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10*, Article 1096384. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1096384

Pande, S., & Rao, J. N. (2000). Changing scenario of groundnut diseases in Andhra Pradesh, Karnataka, and Tamil Nadu states of India. *International Arachis Newsletter, 20*, 42–44.

Patel, M., Islam, S., Husain, F. M., Yadav, V. K., Park, H.-K., Yadav, K. K., Bagatharia, S., Joshi, M., Jeon, B.-H., & Patel, A. (2023). *Bacillus subtilis* ER-08, a multifunctional plant growth-promoting rhizobacterium, promotes the growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) plants under salt and drought stress. *Frontiers in Microbiology, 14*, Article 1208743. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1208743

Pham Gia Tung, Nguyen Hoang Khanh Linh, Nguyen Thu Hang, Nguyen Quang Tan, Tran Thi Minh Chau, & Nguyen Trung Hai. (2024). Assessment on some of sandy soil properties in Phu Vang district, Thua Thien Hue province. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, *133*(3D), 5–18. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v133i3D.7616

Plakys, G., Gasparavičiūtė, R., Vaitekūnas, J., Rutkienė, R., & Meškys, R. (2022). Characterization of *Paenibacillus* sp. GKG endo-β-1,3-glucanase, a member of family 81 glycoside hydrolases. *Microorganisms, 10*(10), Article 1930. https://doi.org/10.3390/microorganisms10101930

Pontiggia, D., Benedetti, M., Costantini, S., De Lorenzo, G., & Cervone, F. (2020). Dampening the DAMPs: How plants maintain the homeostasis of cell wall molecular patterns and avoid hyper-immunity. *Frontiers in Plant Science, 11*, Article 613259. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.613259

Putri, B. R., Santoso, I., & Yasman, Y. (2020). Antagonistic potential of *Bacillus siamensis* LDR against *Aspergillus niger* ABP and ART. *AIP Conference Proceedings, 2242*(1), Article 050017. https://doi.org/10.1063/5.0012314

Putri, R. E., Mubarik, N. R., Ambarsari, L., & Wahyudi, A. T. (2021). Antagonistic activity of glucanolytic bacteria *Bacillus subtilis* W3.15 against *Fusarium oxysporum* and its enzyme characterization. *Biodiversitas, 22*(9), 4067–4077. https://doi.org/10.13057/biodiv/d220956

Raja, M., Sharma, R. K., Jambhulkar, P. P., Pandian, R. T. P., & Sharma, P. (2023). Comparative evaluation of native *Trichoderma* species from groundnut rhizosphere against stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Indian Phytopathology, 76*(2), 481–492. https://doi.org/10.1007/s42360-023-00610-3

Rani, V. D., Kishan, H., Reddy, P. N., Devi, G. U., & Kumar, K. V. K. (2017). Evaluation of fungicides and herbicides against groundnut collar rot pathogen *Aspergillus niger* under in vitro conditions. *International Journal of Plant Protection, 10*(1), 128–133. https://doi.org/10.15740/HAS/IJPP/10.1/128-133

Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control, 144*, Article 104240. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240

Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, *7*(12), Article 1045. https://doi.org/10.3390/jof7121045

Rodriguez, R., Santos, C., Simões, M. F., Soares, C., Santos, C., & Lima, N. (2019). Polyphasic, including MALDI-TOF MS, evaluation of freeze-drying long-term preservation on *Aspergillus* (section Nigri) strains. *Microorganisms, 7*(9), Article 291. https://doi.org/10.3390/microorganisms7090291

Rohtas, Saharan, H. S., & Rathi, A. S. (2016). Management of collar rot of groundnut with bio-agent, botanicals and chemicals. *Biosciences Biotechnology Research Asia, 13*(3), 1657–1663. https://doi.org/10.13005/bbra/2314

Saberi Riseh, R., Vatankhah, M., Hassanisaadi, M., & Ait Barka, E. (2024). Unveiling the role of hydrolytic enzymes from soil biocontrol bacteria in sustainable phytopathogen management. *Frontiers in Bioscience–Landmark*, *29*(3), Article 105. https://doi.org/10.31083/j.fbl2903105

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology, 78*, 141–173. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. d. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology, 10*(6), Article 475. https://doi.org/10.3390/biology10060475

Scafati, V., Troilo, F., Ponziani, S., Giovannoni, M., Scortica, A., Pontiggia, D., Angelucci, F., Di Matteo, A., Mattei, B., & Benedetti, M. (2022). Characterization of two 1,3-β-glucan-modifying enzymes from *Penicillium sumatraense* reveals new insights into 1,3-β-glucan metabolism of fungal saprotrophs. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 15*(1), Article 138. https://doi.org/10.1186/s13068-022-02233-8

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(16), 6241–6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Segers, F. J. J., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2018). *Aspergillus niger* mutants affected in conidial pigmentation do not have an increased susceptibility to water stress during growth at low water activity. *Letters in Applied Microbiology, 66*(3), 238–243. https://doi.org/10.1111/lam.12846

Serrano, R., González-Menéndez, V., Tormo, J. R., & Genilloud, O. (2023). Development and validation of a HTS platform for the discovery of new antifungal agents against four relevant fungal phytopathogens. *Journal of Fungi, 9*(9), Article 883. https://doi.org/10.3390/jof9090883

Shanmugaraj, C., Kamil, D., Kundu, A., Singh, P. K., Das, A., Hussain, Z., Gogoi, R., Shashank, P. R., Gangaraj, R., & Chaithra, M. (2023). Exploring the potential biocontrol isolates of *Trichoderma asperellum* for management of collar rot disease in tomato. *Horticulturae, 9*(10), Article 1116. https://doi.org/10.3390/horticulturae9101116

Sharma, P., Sharma, A., Godika, S., Sharma, R. L., Sharma, M., & Choudhary, S. (2023). Management of collar rot disease of groundnut incited by *Aspergillus niger* through seed treatment. *The Pharma Innovation Journal*, *12*(6), 156–159.

Shen, W., Xue, R., Liu, Y., Sun, S., Chen, X., Sun, D., Ouyang, H., Li, Y., Xu, J., Dong, X., Ji, F., & Xu, W. (2024). Principle investigation and method standardization of inhibition zone assay based on antimicrobial peptides extracted from black soldier fly larvae. *BioTech*, *13*(3), Article 31. https://doi.org/10.3390/biotech13030031

Šimonovičová, A., Vojtková, H., Nosalj, S., Piecková, E., Švehláková, H., Kraková, L., Drahovská, H., Stalmachová, B., Kučová, K., & Pangallo, D. (2021). *Aspergillus niger* environmental isolates and their specific diversity through metabolite profiling. *Frontiers in Microbiology*, *12*, Article 658010. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658010

Sklenář, F., Jurjević, Ž., Zalar, P., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Kolařík, M., Houbraken, J., Chen, A. J., Yilmaz, N., Seifert, K. A., Coton, M., Déniel, F., Gunde-Cimerman, N., Samson, R. A., Peterson, S. W., & Hubka, V. (2017). Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section Restricti. *Studies in Mycology*, *88*, 161–236. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.002

Song, X., Zhang, X., Li, Y., Wei, G., Guo, Z., He, K., Chi, Y., & Xu, M. (2026). Novel antifungal metabolites from *Bacillus velezensis* XYDY-1 effectively control peanut Cylindrocladium black rot caused by *Calonectria ilicicola*. *BMC Microbiology*. Advance online publication. https://doi.org/10.1186/s12866-025-04687-w

Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of art and future perspectives of biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(2), 185–194. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5

Steenwyk, J. L., Balamurugan, C., Raja, H. A., Gonçalves, C., Li, N., Martin, F., Berman, J., Oberlies, N. H., Gibbons, J. G., Goldman, G. H., Geiser, D. M., Houbraken, J., Hibbett, D. S., & Rokas, A. (2024). Phylogenomics reveals extensive misidentification of fungal strains from the genus *Aspergillus*. *Microbiology Spectrum*, *12*(4), Article e03980-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.03980-23

Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehermann, G., Vetukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, *94*, 665–676. https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7

Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, *19*, Article 173. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8

Sulochana, M. B., Jayachandra, S. Y., Anil Kumar, S. K., & Dayanand, A. (2014). Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Journal of Basic Microbiology*, *54*, 418–424. https://doi.org/10.1002/jobm.201200770

Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A. F., & Moretti, A. (2016). Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Frontiers in Microbiology*, *7*, Article 1412. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01412

Takahashi, M., Yano, S., Horaguchi, Y., Otsuka, Y., Suyotha, W., Makabe, K., Konno, H., & Kokeguchi, S. (2023). α-1,3-Glucanase from the gram-negative bacterium *Flavobacterium* sp. EK-14 hydrolyzes fungal cell wall α-1,3-glucan. *Scientific Reports*, *13*, Article 21420. https://doi.org/10.1038/s41598-023-48627-y

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Teertstra, W. R., Tegelaar, M., Dijksterhuis, J., Golovina, E. A., Ohm, R. A., & Wösten, H. A. B. (2017). Maturation of conidia on conidiophores of *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, *98*, 61–70. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.005

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

Torres, M. J., Pérez Brandan, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. subtilis and B. amyloliquefaciens against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, *182*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005

Tran Thi Ngoc Tram, Hoang Tan Quang, Nguyen Quang Hoang Vu, Phan Thi Thao Nguyen, Ton Nu Minh Thi, Truong Thi Bich Phuong, & Pham Thi Diem Thi. (2023). Isolation of bacteria displaying potent antagonistic activity against fungi causes anthracnose disease in chili. *Biodiversitas*, *24*(9), 4919–4926. https://doi.org/10.13057/biodiv/d240934

Tran Thi Thu Trang, Trinh Le Hung, Do Thi Phuong Thao, & Le Van Phu. (2026). Drought risk assessment in Quang Tri Province, Vietnam using Landsat multi-temporal remote sensing data and machine learning algorithm. *Bulletin of Geography. Physical Geography Series*, *30*, 25–37. https://doi.org/10.12775/bgeo-2026-0002

Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W232–W235. https://doi.org/10.1093/nar/gkw256

Ueki, A., Takehara, T., Ishioka, G., Kaku, N., & Ueki, K. (2020). β-1,3-Glucanase production as an anti-fungal enzyme by phylogenetically different strains of the genus *Clostridium* isolated from anoxic soil that underwent biological disinfestation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(12), 5563–5578. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10626-8

van Leeuwen, M. R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, *74*, 59–70. https://doi.org/10.3114/sim0009

Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., & Samson, R. A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, *69*, 1–17. https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.01

Vasait, R., Bhamare, S., Jamdhade, S., & Savkar, Y. (2023). Antibacterial compound of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus siamensis*: Screening, characterization, and evaluation. *International Journal of Secondary Metabolite*, *10*(2), 175–189. https://doi.org/10.21448/ijsm.1258717

Vela-Corcia, D., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2026). Insight into novel biochemical features and function of novel antifungal GH16-β-glucanase from *Bacillus velezensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *340*, Article 150106. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2026.150106

Villalba-Villalba, A. G., Cruz-Campas, M. E., & Azuara-Gómez, G. V. (2018). *Aspergillus niger* Tiegh., isolated in Sonora, Mexico: Metal tolerance evaluation. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, *24*(2), 131–146. https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.023

Vineela, D. R. S., Beura, S. K., Dhal, A., & Swain, S. K. (2020). Efficacy of bio-agents, botanicals, organic amendments against groundnut pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Aspergillus niger* in-vitro. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *9*(3), 1206–1210.

Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, *9*(9), Article 1988. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988

Wang, J., Xie, X., Li, B., Yang, L., Song, F., Zhou, Y., & Jiang, M. (2025). Complete genome analysis and antimicrobial mechanism of *Bacillus velezensis* GX0002980 reveals its biocontrol potential against mango anthracnose disease. *Microbiology Spectrum*, *13(6)*, Article e02685-24. https://doi.org/10.1128/spectrum.02685-24

Wang, K., Huai, S., Tan, Z., Ngea, G. L. N., Godana, E. A., Shi, J., Yang, Q., Zhang, X., Zhao, L., & Zhang, H. (2023). A first expression, purification and characterization of endo-β-1,3-glucanase from *Penicillium expansum*. *Journal of Fungi*, *9(10)*, Article 961. https://doi.org/10.3390/jof9100961

Wang, L., Huang, J., Chen, S., Su, X., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Wang, Z., Zeng, Q., Wang, Q., & Li, Y. (2024). Endogenous cell wall degrading enzyme LytD is important for the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Plant Science*, *15*, Article 1381018. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1381018

Wang, L., Huang, W., Sha, Y., Yin, H., Liang, Y., Wang, X., Shen, Y., Wu, X., Wu, D., & Wang, J. (2021). Co-cultivation of two *Bacillus strains* for improved cell growth and enzyme production to enhance the degradation of aflatoxin B_1. *Toxins*, *13(7)*, Article 435. https://doi.org/10.3390/toxins13070435

Wang, S., Xu, M., Han, Y., & Zhou, Z. (2024). Exploring mechanisms of antifungal lipopeptide iturin A from *Bacillus against Aspergillus niger*. *Journal of Fungi*, *10(3)*, Article 172. https://doi.org/10.3390/jof10030172

Wang, Z., Fu, X., & Kuramae, E. E. (2024). Insight into farming native microbiome by bioinoculant in soil-plant system. *Microbiological Research*, *285*, Article 127776. https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127776

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.

Win, T. T., Bo, B., Malec, P., Khan, S., & Fu, P. (2021). Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential bio-control agent to suppress *Fusarium soil* borne fungal phytopathogens. *Journal of Plant Pathology*, *103*, 549–561. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00780-x

Wu, Q., Dou, X., Wang, Q., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2018). Isolation of β-1,3-glucanase-producing microorganisms from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology. *Molecules*, *23(7)*, Article 1555. https://doi.org/10.3390/molecules23071555

Wu, Q., Li, H., Wang, S., Zhang, Z., Zhang, Z., Jin, T., Hu, X., & Zeng, G. (2022). Differential expression of genes related to growth and aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus* when inhibited by *Bacillus velezensis* strain B2. *Foods*, *11(22)*, Article 3620. https://doi.org/10.3390/foods11223620

Wu, X., Shan, Y., Li, Y., Li, Q., & Wu, C. (2020). The soil nutrient environment determines the strategy by which *Bacillus velezensis* HN03 suppresses *Fusarium wilt* in banana plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, Article 599904. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.599904

Xiao, L., Xie, C.-C., Cai, J., Lin, Z.-J., & Chen, Y.-H. (2009). Identification and characterization of a chitinase-produced *Bacillus showing* significant antifungal activity. *Current Microbiology*, *58(5)*, 528–533. https://doi.org/10.1007/s00284-009-9363-5

Xiao, Y., Zhang, M., Zhong, H., Tibihenda, C., Li, X., Jusselme, M. D., Chao, Q., Mao, R., & Zhang, C. (2026). Combined effects of earthworms and *Bacillus spp*. enhance soil ecosystem multifunctionality and reshape microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, *17*, Article 1799265. https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1799265

Xie, L., Liu, L., Luo, Y., Rao, X., Di, Y., Liu, H., Qian, Z., Shen, Q., He, L., & Li, F. (2023). Complete genome sequence of biocontrol strain *Bacillus velezensis* YC89 and its biocontrol potential against sugarcane red rot. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1180474. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1180474

Xu, T., Li, M., Dong, X., Zhao, J., Ling, J., Yang, Y., Mao, Z., Xie, B., Zhou, L., & Li, Y. (2026). Genophenotypic insights into biocontrol and growth-promoting mechanisms of *Bacillus velezensis* BV25 against tomato *Fusarium wilt*. *BMC Microbiology*, *26*, Article 350. https://doi.org/10.1186/s12866-026-04919-7

Xu, T., Zhu, T., & Li, S. (2016). β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*, Article 26. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1985-0

Xue, X., Wang, R., Tu, T., Shi, P., Ma, R., Luo, H., Yao, B., & Su, X. (2015). The N-terminal GH10 domain of a multimodular protein from *Caldicellulosiruptor bescii* is a versatile xylanase/β-glucanase that can degrade crystalline cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(11), 3823–3833. https://doi.org/10.1128/AEM.00432-15

Yaadesh, S., Tomar, G. S., Kaushik, R., Prasanna, R., & Grover, M. (2023). Azospirillum-*Bacillus associations*: Synergistic effects on in vitro PGP traits and growth of pearl millet at early seedling stage under limited moisture conditions. *3 Biotech*, *13(3)*, Article 90. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03503-4

Yadav, D. K., Devappa, V., Kashyap, A. S., Kumar, N., Rana, V. S., Sunita, K., & Singh, D. (2023). Boosting the biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* DSBA-11 through physical and chemical mutagens to control bacterial wilt disease of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microorganisms*, *11(7)*, Article 1790. https://doi.org/10.3390/microorganisms11071790

Yang, F., Jiang, H., Ma, K., Wang, X., Liang, S., Cai, Y., Jing, Y., Tian, B., & Shi, X. (2023). Genome sequencing and analysis of *Bacillus velezensis* VJH504 reveal biocontrol mechanism against cucumber *Fusarium wilt*. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1279695. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1279695

Yang, F., Wang, X., Jiang, H., Yao, Q., Liang, S., Chen, W., Shi, G., Tian, B., Hegazy, A., & Ding, S. (2024). Mechanism of a novel *Bacillus subtilis* JNF2 in suppressing *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerium* and enhancing cucumber growth. *Frontiers in Microbiology*, *15*, Article 1459906. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1459906

Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Zhou, Z., Zhang, J., Yang, J., Gao, X., Chen, R., Huang, Z., Xu, Z., & Li, L. (2023). Isolation of *Bacillus siamensis* B-612, a strain that is resistant to rice blast disease and an investigation of the mechanisms responsible for suppressing rice blast fungus. *International Journal of Molecular Sciences*, *24(10)*, Article 8513. https://doi.org/10.3390/ijms24108513

Yao, Y., Wang, L., Zhai, H., Dong, H., Wang, J., Zhao, Z., & Xu, Y. (2025). *Bacillus velezensis* A-27 as a potential biocontrol agent against *Meloidogyne incognita* and effects on rhizosphere communities of celery in field. *Scientific Reports*, *15(1)*, Article 1057. https://doi.org/10.1038/s41598-024-83687-8

Yin, X., Li, T., Jiang, X., Tang, X., Zhang, J., Yuan, L., & Wei, Y. (2022). Suppression of grape white rot caused by *Coniella vitis* using the potential biocontrol agent *Bacillus velezensis* GSBZ09. *Pathogens*, *11(2)*, Article 248. https://doi.org/10.3390/pathogens11020248

Yoshimi, A., Miyazawa, K., & Abe, K. (2016). Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus species*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *80(9)*, 1700–1711. https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1177446

You, W., Ge, C., Jiang, Z., Chen, M., Li, W., & Shao, Y. (2021). Screening of a broad-spectrum antagonist—*Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits. *Biological Control*, *157*, Article 104584. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104584

Yu, R., Liu, J., Wang, Y., Wang, H., & Zhang, H. (2021). *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. *Frontiers in Chemistry*, *9*, Article 701022. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.701022

Yuan, Z., Wang, S., Dong, X., Wang, X., & Liu, F. (2026). *Bacillus velezensis* M03 enhances peanut stress resistance and optimizes soil microecology, thereby increasing its resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*, *17*, Article 1788450. https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1788450

Zakaria, L. (2024). An overview of *Aspergillus species* associated with plant diseases. *Pathogens*, *13(9)*, Article 813. https://doi.org/10.3390/pathogens13090813

Zhang, B., Zhang, L., Pang, Z., Zhang, W., Wang, F., Fan, J., & Zhang, B. (2026). Surfactin-induced β-(1,3)-glucan exposure in *Aspergillus niger* cell wall: A molecular perspective. *Foods*, *15*(4), Article 788. https://doi.org/10.3390/foods15040788

Zhang, K., Wang, L., Si, H., Guo, H., Liu, J., Jia, J., Su, Q., Wang, Y., Zang, J., Xing, J., & Dong, J. (2022). Maize stalk rot caused by *Fusarium graminearum* alters soil microbial composition and is directly inhibited by *Bacillus siamensis* isolated from rhizosphere soil. *Frontiers in Microbiology*, *13*, Article 986401. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.986401

Zhang, L., Yang, M., Zhang, B., Li, Y., Shao, L., Wang, Z., Wang, Y., Tang, Y., Hu, Y., Li, P., Sun, Z., & Liu, N. (2026). *Bacillus velezensis* 802 with antagonistic activity against *Aspergillus flavus*: Genome characterization, secondary metabolites and antifungal mechanism. *Frontiers in Microbiology*, *17*, Article 1942172. https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1942172

Zhang, L., Zhang, H., Huang, Y., Peng, J., Xie, J., & Wang, W. (2021). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrolling *Fusarium wilt* of banana caused by *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* tropical race 4. *Frontiers in Microbiology*, *12*, Article 763038. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.763038

Zhang, M., Li, X., Pan, Y., Qi, D., Zhou, D., Chen, Y., Feng, J., Wei, Y., Zhao, Y., Li, K., Wang, W., Zhang, L., & Xie, J. (2024). Biocontrol mechanism of *Bacillus siamensis* sp. QN2MO-1 against tomato fusarium wilt disease during fruit postharvest and planting. *Microbiological Research*, *283*, Article 127694. https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127694

Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2023). Biocontrol mechanisms of Bacillus: Improving the efficiency of green agriculture. *Microbial Biotechnology*, *16*(12), 2250–2263. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348

Zhang, Y., Zhang, N., Bi, X., Bi, T., Baloch, F. B., Miao, J., Zeng, N., Li, B., & An, Y. (2024). Growth promotion on maize and whole-genome sequence analysis of *Bacillus velezensis* D103. *Microbiology Spectrum*, *12*(12), Article e01147-24. https://doi.org/10.1128/spectrum.01147-24

Zhao, D., Wu, Y., Qu, J., Fang, L., Liu, C., Zhang, L., Zhang, M., Wang, J., & Li, Z. (2025). Complete genome sequence and comparative analysis of *Bacillus velezensis* Lzh-5, a fungal antagonistic and plant growth-promoting strain. *BMC Microbiology*, *25*, Article 230. https://doi.org/10.1186/s12866-025-03938-0

Zhao, M., Liu, D., Liang, Z., Huang, K., & Wu, X. (2022). Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* CW14 and its β-glucanase against *Aspergillus ochraceus*. *Food Control*, *131*, Article 108475. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108475

Zhen, X., Huo, W., Sanz-Saez, A., Miao, Y., Chen, C. Y., & Batchelor, W. D. (2024). Drought-tolerant peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties can mitigate negative impacts of climate change on yield in the Southeastern U.S. *Computers and Electronics in Agriculture*, *222*, Article 109054. https://doi.org/10.1016/j.compag.2024.109054

Zhou, J., Li, Z., Wu, J., Li, L., Li, D., Ye, X., Luo, X., Huang, Y., Cui, Z., & Cao, H. (2017). Functional analysis of a novel β-(1,3)-glucanase from *Corallococcus* sp. strain EGB containing a fascin-like module. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(16), Article e01016-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01016-17

Zhou, J., Xie, Y., Liao, Y., Li, X., Li, Y., Li, S., Ma, X., Lei, S., Lin, F., Jiang, W., & He, Y.-Q. (2022). Characterization of a *Bacillus velezensis* strain isolated from *Bolbostemmatis Rhizoma* displaying strong antagonistic activities against a variety of rice pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *13*, Article 983781. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983781

Zhou, L., Wang, J., Wu, F., Yin, C., Kim, K. H., & Zhang, Y. (2022). Termite nest associated *Bacillus siamensis* YC-9 mediated biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Frontiers in Microbiology*, *13*, Article 893393. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893393

PHỤ LỤC

Phụ lục I

HÓA CHẤT, DUNG DỊCH ĐỆM, MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

1. Hóa chất

K_2HPO_4; $MgSO_4.7H_2O$; $NaNO_3$; KCl; $FeSO_4.7H_2O$ (Xilong Chemical, Trung Quốc); Tryptone, 3,5-dinitrosalicylic (DNS), glucose, phenol, chloroform, isopropanol (Merck, Đức); curdlan; laminarin; peptone; yeast extract; meat extract (HIMEDIA, Ấn Độ); agar (Hải Long, Việt Nam); CTAB (ABT- Việt Nam); Bacto agar, EDTA, IPTG, X-gal (Bio-Rad, Mỹ); bovine serum albumin (Nacalai, Nhật Bản); zeocine, imidazole…

2. Các dung dịch và đệm

Đệm Phosphate-Citrate (NaH_2PO_4 0,2 M và acid citric 0,1 M) với các mức pH 4,0-6,0; đệm Phosphate (NaH_2PO_4 0,2 M và Na_2HPO_4 0,2 M) với các mức pH 6,0-8,0; đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoethanol); đệm sodium citrate (pH 2,0-4,0), đệm sodium acetate (pH 4,0-6,0), đệm potassium phosphate (pH 6,0-8,0), đệm Tris-HCl (pH 8,0-9,0).

3. Môi trường nuôi cấy

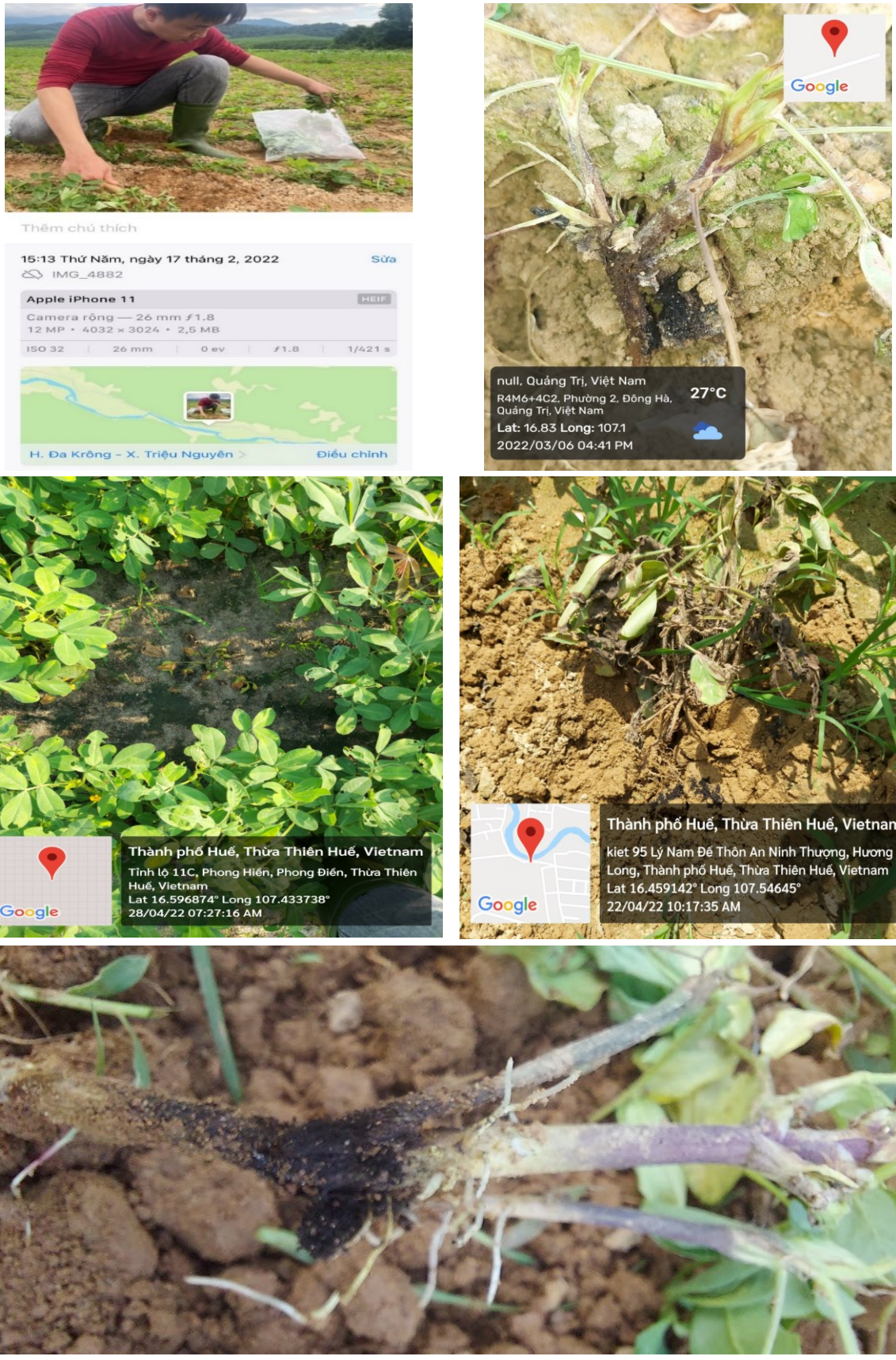
Bảng PL1.1. *Các loại môi trường chính sử dụng trong nghiên cứu*

TT	Tên môi trường	Thành phần môi trường
1	Môi trường sàng lọc hoạt tính glucanase	Men bánh mì (5 g), FeSO4·7H2O (0.5 g), MgSO4·7H2O (0.5 g), KCl (0.5 g), NaNO3 (3 g), K2 HPO 4 (1 g), agar (20 g)
2	PDA (Potato Dextrose Agar)	- Khoai tây (thái lát): 200g (lấy nước chiết) - Glucose (Dextrose): 20g - Agar: 15–20g - Nước cất vừa đủ: 1000ml
3	PDB (Potato Dextrose Broth)	- Khoai tây (thái lát): 200g (lấy nước chiết) - Glucose (Dextrose): 20g - Nước cất vừa đủ: 1000ml

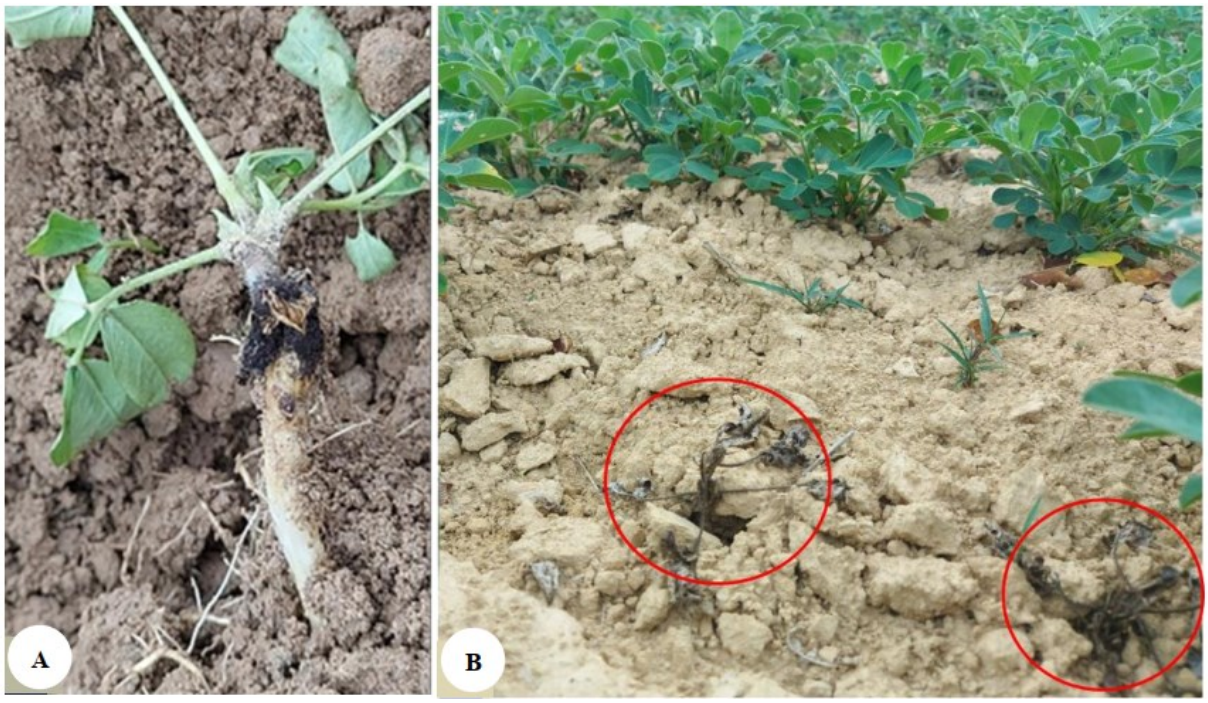
TT	Tên môi trường	Thành phần môi trường
4	WA (Water Agar)	- Agar: 15–20g - Nước cất: 1000ml
5	LB (Luria-Bertani Miller)	- Tryptone: 10g - Yeast Extract (Cao nấm men): 5g - NaCl: 10g (Miller) hoặc 5g (Lennox) - Agar: 15g (nếu là LB Agar) - Nước cất vừa đủ: 1000ml
6	NA (Nutrient Agar)	- Peptone: 5g - Beef Extract (Cao thịt): 3g - Agar: 15g - Nước cất vừa đủ: 1000ml
7	NB (Nutrient Broth)	- Peptone: 5g - Beef Extract (Cao thịt): 3g - Nước cất vừa đủ: 1000ml

Phụ lục II

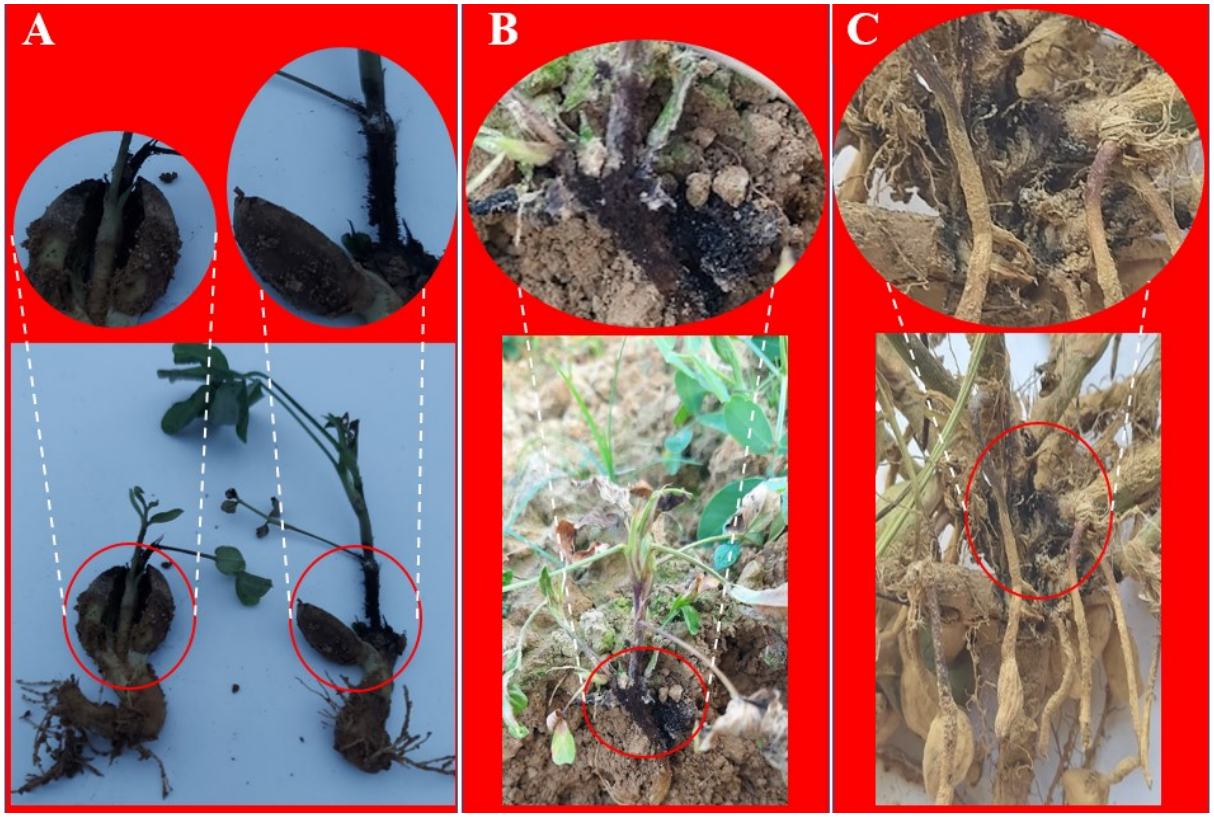
KHẢO SÁT TÌNH HÌNH BỆNH LẠC VÀ THU MẪU NGHIÊN CỨU



Hình PL2.1. *Một số địa điểm khảo sát tình hình bệnh lạc và thu mẫu nghiên cứu khu vực cây lạc bị nhiễm bệnh héo rũ gốc mốc đen*



Triệu chứng héo rũ gốc mốc đen được quan sát trên giống lạc L14 ngoài đồng ruộng. A. Hình ảnh cận cảnh cây bị thối ở vùng cổ rễ; B. Cây xuất hiện triệu chứng bệnh héo rũ gốc mốc đen tại tỉnh Quảng Trị (Vòng tròn đỏ chỉ cây bị bệnh HRGMĐ trên cây lạc).



Cây lạc bị nhiễm bệnh héo rũ gốc mốc đen xuyên suốt quá trình phát triển từ khi nảy mầm (A), cây con (B) và trưởng thành tạo quả (C)

Hình PL2.2. *Một số triệu chứng về cây lạc bị bệnh héo rũ gốc mốc đen thu được trong quá trình khảo sát*

Phụ lục III

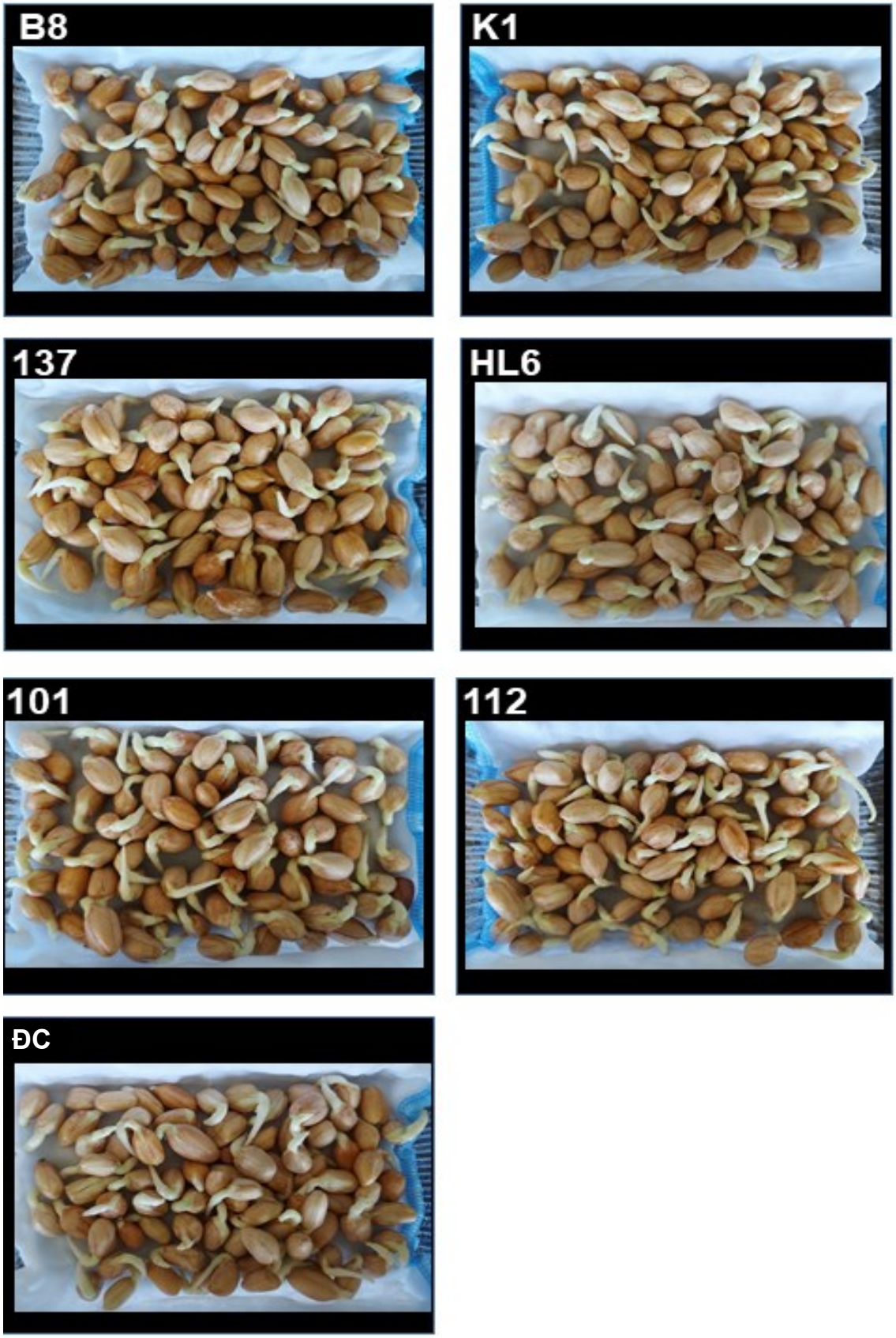
TRIỆU CHỨNG BỆNH HÉO RŨ GỐC MỐC ĐEN TRÊN CÂY LẠC SAU KHI LÂY NHIỄM NHÂN TẠO VỚI NẤM *Aspergillus niger*



Hình PL3.1. *Triệu chứng bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc trong thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo bằng nấm Aspergillus niger.*

Phụ lục IV

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG B8, K1, 101, 112, 137 VÀ HL6 ĐẾN TỈ LỆ NẢY MẦM CỦA HẠT LẠC



Hình PL4.1. *Ảnh hưởng của các chủng vi sinh vật đối kháng B8, K1, 101, 112, 137 và HL6 đến tỉ lệ nảy mầm của hạt lạc giống L14*

Phụ lục V

ẢNH HƯỞNG CỦA PHÂN ĐOẠN ENZYME NGOẠI BÀO CÓ HOẠT TÍNH B-1,3-GLUCANASE ĐẾN SINH KHỐI KHÔ CỦA *A. NIGER*

Bảng PL5.1. *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*

Nguồn enzyme β-1,3-glucanase	**Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (U/mL)**				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
B. siamensis 101	-	7,28±0,57	40,60±7,44	53,65±3,89	65,56±0,73
B. siamensis 112	-	8,12±1,89	41,75±5,14	55,87±3,18	67,72±4,44
B. velezensis 137	-	8,89±1,80	46,02±1,41	64,78±1,91	72,93±1,98
Hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus*	-	**9,90±4,19**	**57,38±4,59**	**73,29±1,44**	**83,58±1,82**

Ghi chú: Đối chứng 0 U/mL sử dụng nước cất vô trùng, được bố trí chung cho 4 nguồn enzyme. Hiệu suất giảm sinh khối khô H (%) được tính theo sinh khối khô của nghiệm thức so với đối chứng chung không bổ sung enzyme (0 U/mL). Giá trị H của đối chứng được quy ước bằng 0%. *M ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3).*

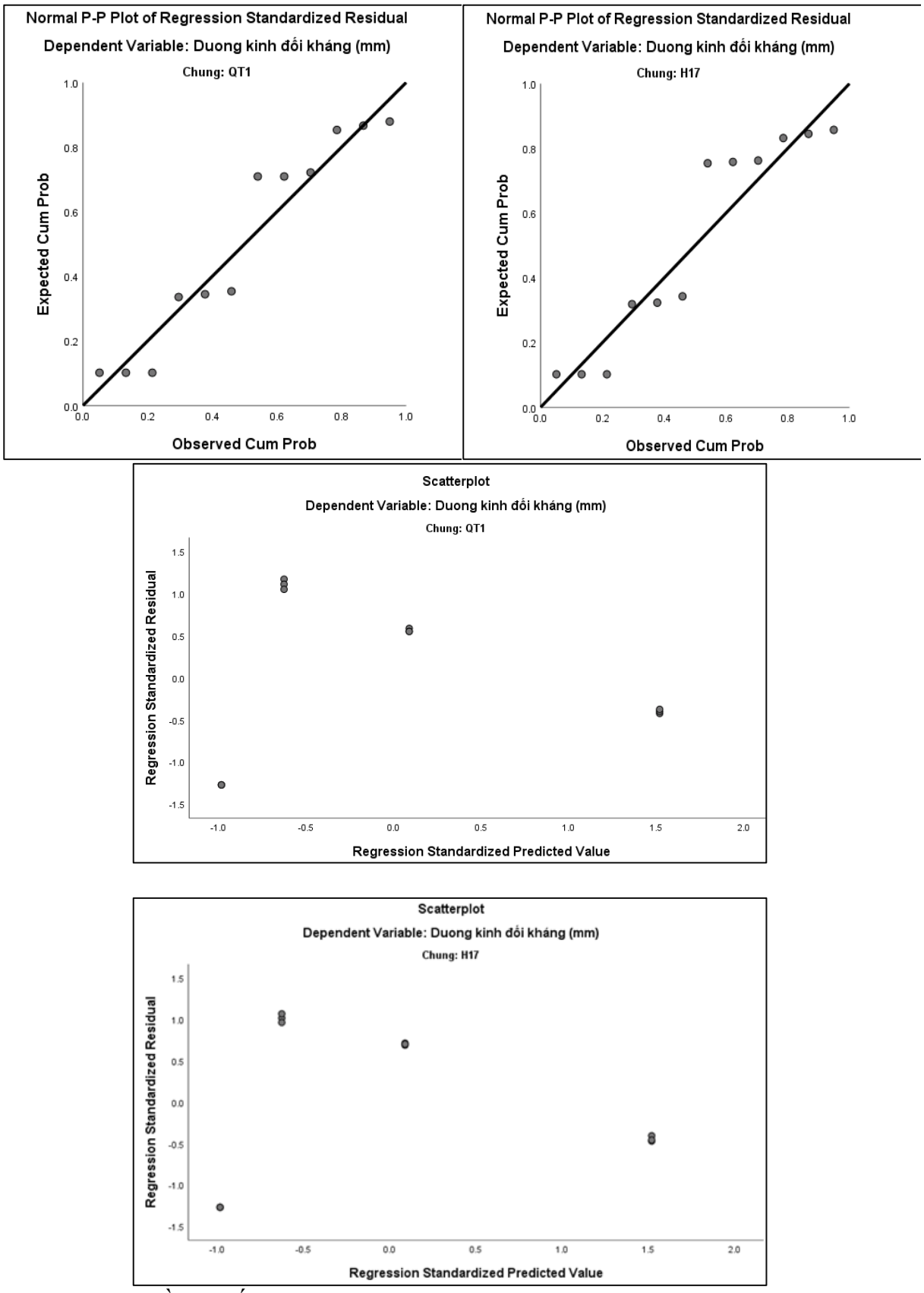
Bảng PL5.2. *Tỉ lệ % giảm sinh khối khô của A. niger H17 dưới tác động của phân đoạn enzyme ngoại bào có hoạt tính β-1,3-glucanase*

Nguồn enzyme β-1,3-glucanase	**Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase (U/mL)**				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
B. siamensis 101	-	4,12±1,72	29,32±3,60	48,64±5,35	56,28±2,09
B. siamensis 112	-	5,61±1,59	32,79±10,62	52,39±3,40	59,47±5,11
B. velezensis 137	-	6,42 ±2,02	38,85±11,92	58,59±1,29	66,76±4,00
Hỗn hợp phối trộn từ ba chủng *Bacillus*	**-**	**7,11±1,93**	**51,40±9,04**	**67,76±2,58**	**76,35±3,51**

Ghi chú: Đối chứng 0 U/mL sử dụng nước cất vô trùng, được bố trí chung cho 4 nguồn enzyme và không đưa vào ANOVA hai nhân tố. Hiệu suất giảm sinh khối khô H (%) được tính theo sinh khối khô của nghiệm thức so với đối chứng chung không bổ sung enzyme (0 U/mL). Giá trị H của đối chứng được quy ước bằng 0%. *M ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3).*

Phụ lục VI

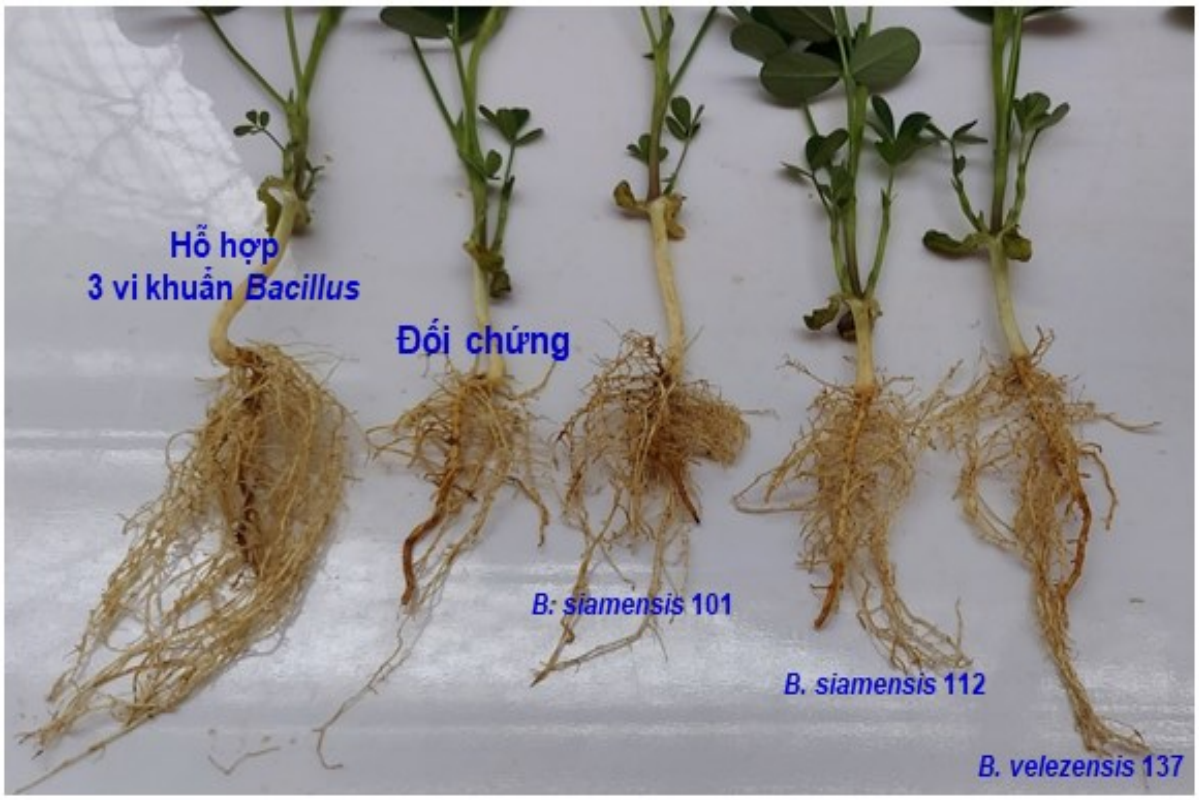
KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HOẠT ĐỘ ENZYME B-1,3-GLUCANASE VỚI ĐƯỜNG KÍNH VÙNG ỨC CHẾ *A. niger* QT1 VÀ *A. niger* H17



Hình PL6.1. *Đồ thị mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase với đường kính vùng ức chế A. niger QT1 và A. niger H17*

Phụ lục VII

KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH PHÁT TRIỂN RỄ CÂY LẠC CỦA CÁC CHỦNG *BACILLUS* ĐƯỢC TUYỂN CHỌN



Hình PL7.1. *Khả năng kích thích phát triển rễ của các chủng Bacillus được tuyển chọn*

Phụ lục VIII
CHUẨN BỊ HỖN HỢP DỊCH NUÔI BA CHỦNG *Bacillus*









Hình PL8.1. *Quá trình chuẩn bị hỗn hợp dịch nuôi ba chủng Bacillus (B. siamensis 101, B. siamensis 112 và B. velezensis 137)*

Phụ lục IX
CÁC ĐỊA ĐIỂM THỬ NGHIỆM Ở ĐỒNG RUỘNG





Địa điểm 1: Hương Trà, thành phố Huế





Địa điểm 2: Phú Vang, thành phố Huế





Địa điểm 3: Hải Lăng (nay thuộc xã Nam Hải Lăng), tỉnh Quảng Trị





Địa điểm 4: Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị

Hình PL9.1. *Các địa điểm thử nghiệm hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy 3 chủng Bacillus trên ruộng trồng lạc ở tỉnh Quảng Trị và thành phố Huế*

Phụ lục X

GIẤY XÁC NHẬN KHU VỰC THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỒNG RUỘNG

UBND THỊ XÃ HƯƠNG TRÀ
UBND PHƯỜNG HƯƠNG VÂN

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XÁC NHẬN

Ủy ban nhân dân phường Hương Vân, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế xác nhận Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã bố trí mô hình thử nghiệm ứng dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ trên cây lạc thuộc nội dung nghiên cứu của đề tài: ***"Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung"***. Mã số: CT-2022.09.DHH.04. do TS. Nguyễn Thị Thu Thủy làm chủ nhiệm đề tài như sau:

1. Cơ quan chủ trì đề tài: Đại học Huế
2. Cơ quan thực hiện đề tài: Viện công nghệ sinh học
3. Nội dung thực hiện

Mô hình thử nghiệm ứng dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ trên cây lạc.

Diện tích thực hiện: 1000 m^2

Mô hình thử nghiệm được bố trí trên ruộng của gia đình ông Hồ Đăng Minh

Hiệu lực phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc của chế phẩm vi sinh đạt hiệu quả hơn 85%

4. Thời gian thực hiện: từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2023

Hương Vân, ngày 22 tháng 6 năm 2023
TM. UBND phường Hương Vân
KT. CHỦ TỊCH
PHÓ CHỦ TỊCH

Lê Minh Hóa

UBND HUYỆN PHÚ VANG
UBND TT PHÚ ĐA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XÁC NHẬN

Trung tâm dịch vụ nông nghiệp, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế xác nhận Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã bố trí mô hình thử nghiệm ứng dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ trên cây lạc thuộc nội dung nghiên cứu của đề tài: ***"Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung"***. Mã số: CT-2022.09.DHH.04. do TS. Nguyễn Thị Thu Thủy làm chủ nhiệm đề tài như sau:

1. Cơ quan chủ trì đề tài: Đại học Huế
2. Cơ quan thực hiện đề tài: Viện công nghệ sinh học
3. Nội dung thực hiện

Mô hình thử nghiệm ứng dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ trên cây lạc

Diện tích thực hiện: 1000 m^2

Mô hình thử nghiệm được bố trí trên ruộng của gia đình ông Trần Hiếu tại tổ dân phố Viễn Trình, thị trấn Phú Đa, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Hiệu lực phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc của chế phẩm vi sinh đạt hiệu quả hơn 85%.

4. Thời gian thực hiện mô hình: từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2023

Phú Vang, ngày 30 tháng 6 năm 2023
UBNN TT PHÚ ĐA
PHÓ CHỦ TỊCH

Hồ Xuân Long

Hình PL10.1. *Giấy xác nhận các địa điểm thử nghiệm ở thành phố Huế*

UBND HUYỆN HẢI LĂNG
UBND xã Hải Phong

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XÁC NHẬN

Ủy ban nhân dân xã Hải Phong, huyện Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị xác nhận Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã bố trí mô hình thử nghiệm sử dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc thuộc nội dung nghiên cứu của đề tài: ***"Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung"*** do **TS. Nguyễn Thị Thu Thủy** làm chủ nhiệm đề tài như sau:

1. Cơ quan chủ trì đề tài: Đại học Huế
2. Cơ quan thực hiện đề tài: Viện công nghệ sinh học
3. Nội dung thực hiện

Mô hình thử nghiệm sử dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc
Diện tích thực hiện: 1000 m^2
Mô hình thử nghiệm được bố trí trên ruộng của gia đình ông Hoàng Tấn Lợi tại thôn Câu Hà, xã Hải Phong, huyện Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị.

4. Thời gian thực hiện: từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2023.

Hải Phong, ngày 29 tháng 6 năm 2023
TM. UBND xã Hải Phong
TM.UBND XÃ HẢI PHONG
P. CHỦ TỊCH
Nguyễn Khánh Tặng

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

GIẤY XIN XÁC NHẬN

Kính gửi: Uỷ ban nhân dân xã Triệu Thành, huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị.

Tôi tên Nguyễn Xuân Hiếu, hiện đang công tác tại Trường THCS&THPT Cửa Việt, tỉnh Quảng Trị, đang học nghiên cứu sinh tại Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế, là thành viên tham gia thực hiện đề tài ***"Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung"*** do **TS. Nguyễn Thị Thu Thủy** làm chủ nhiệm đề tài. Trong quá trình thực hiện đề tài, nhóm nghiên cứu có triển khai nghiên cứu trên ruộng của gia đình bà Lê Thị Thao tại Thôn An Tiêm, xã Triệu Thành, nay tôi xin Uỷ ban nhân dân xã Triệu Thành xác nhận cho chúng tôi các nội dung như sau: Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế đã bố trí mô hình thử nghiệm sử dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc thuộc nội dung nghiên cứu của đề tài: ***"Nghiên cứu và phát triển chế phẩm vi sinh có hoạt tính enzyme cao phòng chống bệnh héo rũ trên cây lạc trồng ở khu vực miền Trung"*** do **TS. Nguyễn Thị Thu Thủy** làm chủ nhiệm đề tài như sau:

1. Cơ quan chủ trì đề tài: Đại học Huế
2. Cơ quan thực hiện đề tài: Viện Công nghệ Sinh học
3. Nội dung thực hiện:

- Mô hình thử nghiệm sử dụng chế phẩm vi sinh phòng chống nấm bệnh héo rũ lạc
- Diện tích thực hiện: 1000 m^2
- Mô hình thử nghiệm được bố trí trên ruộng của gia đình bà Lê Thị Thao tại Thôn An Tiêm, xã Triệu Thành, huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị.

4. Thời gian thực hiện: từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2023./.

Triệu Thành, ngày 29 tháng 6 năm 2023

NGƯỜI XIN XÁC NHẬN
Nguyễn Xuân Hiếu

XÁC NHẬN CỦA UBND XÃ TRIỆU THÀNH
TM. ỦY BAN NHÂN DÂN
CHỦ TỊCH
Nguyễn Thế Phương

Hình PL10.2. *Giấy xác nhận các địa điểm thử nghiệm ở tỉnh Quảng Trị*

ĐẠI HỌC HUẾ

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

XÁC NHẬN HOÀN THÀNH CHỈNH SỬA LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Xuân Hiếu

Đề tài luận án: 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**

Ngày bảo vệ cấp Đại học Huế: 26/8/2026

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC	NGHIÊN CỨU SINH
PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Thủy	Nguyễn Xuân Hiếu

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG	XÁC NHẬN CỦA ĐƠN VỊ ĐÀO TẠO
GS.TS. Trần Đăng Hoà	PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải