

# TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NHÂN NUÔI CHUNG VI KHUẨN VÙNG RỄ *Bacillus subtilis* RB.CJ41 KHÁNG NẤM *Fusarium* sp.

Trịnh Thị Huyền Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Trung<sup>1</sup>, Đinh Lan Trinh<sup>2</sup>, Trần Thị Phương Hạnh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên  
<sup>2</sup>Trung tâm Thông tin - Ứng dụng Khoa học và Công nghệ tỉnh Đắk Lắk

\*Tác giả liên hệ: tthtrang@ttn.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.10.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.03.2024

## TÓM TẮT

*Bacillus subtilis* RB.CJ41 là chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu, có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro*. Mục tiêu của nghiên cứu là lựa chọn điều kiện nhân nuôi thích hợp chủng *B. subtilis* RB.CJ41. Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các đơn yếu tố môi trường gồm nguồn C/N, nguồn cacbon, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và MgSO<sub>4</sub> đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng RB.CJ41. Kết quả ghi nhận, bã đậu, mannitol và MgSO<sub>4</sub> tác động lớn nhất đến mật độ và hoạt tính kháng nấm của chủng RB.CJ41. Phương trình bậc hai mô tả sự phụ thuộc của hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. với ba biến khảo sát có dạng "Hoạt tính kháng nấm (%) = 11,66 – 0,9452A + 1,00B + 0,2713C – 0,5625 AB – 0,5625 AC – 0,0625 BC – 2,28A<sup>2</sup> – 2,73 B<sup>2</sup> – 1,84 C<sup>2</sup>" được xác định thông qua phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – cấu trúc có tâm (CCD). Kết quả phân tích cho thấy, khoảng giá trị 7 g/l đến 8 g/l đối với bã đậu, 6 g/l đến 7 g/l đối với mannitol và 4 g/l đến 5 g/l đối với MgSO<sub>4</sub> được xác định là khoảng tối ưu để thu được hoạt tính kháng nấm cao khi nhân nuôi chủng vi khuẩn vùng rễ *B. subtilis* RB.CJ41.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, *Fusarium* sp., tối ưu hóa, vi khuẩn vùng rễ.

## Optimization of Cultural Conditions for Rhizobacterium *Bacillus subtilis* RB.CJ41 Against *Fusarium* sp.

## ABSTRACT

Rhizobacterium *Bacillus subtilis* RB.CJ41 isolated from black pepper has antifungal activity against *Fusarium* sp. under *in vitro* and *ex vitro* conditions. The objective of the study was to select the appropriate culture conditions of the strain *B. subtilis* RB.CJ41. The single effect of environmental factors including C/N source, carbon sources, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub> sources was investigated on the density and *Fusarium* sp antifungal activity of the strain RB.CJ41. The results showed that bean residue, mannitol and MgSO<sub>4</sub> had the greatest impact on density and antifungal activity of strain RB.CJ41. Using Response Surface Methodology (RSM) - Central Composite Design (CCD), a quadratic equation describing the dependence of *Fusarium* sp. antifungal activity with three survey variables was determined in the form "Antifungal activity (%) = 11.66 – 0.9452A + 1.00B + 0.2713C – 0.5625AB – 0.5625AC – 0.0625BC – 2.28A<sup>2</sup> – 2.73B<sup>2</sup> – 1.84C<sup>2</sup>". Analytical results showed the optimal range for high antifungal activity of rhizobacterium *B. subtilis* RB.CJ41 was 7 g/l to 8 g/l for bean residue, 6 g/l to 7 g/l for mannitol and 4 g/l to 5 g/l for MgSO<sub>4</sub>.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Fusarium* sp, optimization, rhizobacteria.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Fusarium* sp. là loại nấm gây bệnh trong đất có khả năng hình thành bào tử áo với thành dày nên dễ dàng sống sót trong điều kiện khắc nghiệt mà không cần có mặt của cây ký chủ (Huang & cs., 2015). Chúng gây thiệt hại về kinh tế trên nhiều loại nhiều cây trồng khác nhau. Vì vậy,

nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các bệnh phát sinh từ đất thường phức tạp và khó quản lý (Ye & cs., 2020). Cho đến nay, các chất diệt nấm nguồn gốc hóa học như prochloraz, bromuconazol, propiconon và benomyl đã được sử dụng khá phổ biến để phòng trừ bệnh do *Fusarium* gây ra. Tuy nhiên, phương pháp này thường gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng tới

sức khỏe của người nông dân và chất lượng sản phẩm giảm do chứa các độc tố. Do vậy, để kiểm soát được bệnh do nấm *Fusarium* sp. gây nên là thách thức lớn đối với sản xuất nông nghiệp. Hiện nay, chiến lược an toàn và bền vững nhằm tăng năng suất và lợi nhuận trong sản xuất nông nghiệp là sử dụng các tác nhân kiểm soát sinh học để quản lý mầm bệnh thực vật (Ye & cs., 2020; Shafi & cs., 2017).

Nhiều loài thuộc chi *Bacillus* như *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* được xem như tác nhân kiểm soát sinh học có hiệu quả kháng lại nhiều loại mầm bệnh thực vật (Shafi & cs., 2017). Trong số đó, *Bacillus subtilis* là loài được nghiên cứu rộng rãi nhất hiện nay (Rajkumar & cs., 2018; Putri & cs., 2021). Chúng có khả năng đối kháng với nấm *Fusarium* sp. nhờ vào khả năng sinh ra các hợp chất kháng như iturin A, bacillomycin, fengycin, surfactin, bacilysin, tasA macrolactin, bacillaene và mersacidin (Khedher & cs., 2021; Zhu & cs., 2020; Vehapi & cs., 2022). Chính vì vậy, kế thừa kết quả nghiên cứu từ chương trình đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học trong phát triển bền vững cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ở Tây Nguyên” sau khi phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn tiềm năng *Bacillus subtilis* RB.CJ41 từ vùng rễ cây hồ tiêu có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro* (Trịnh Thị Huyền Trang & cs., 2020), nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa điều kiện môi trường nhân nuôi chủng *B. subtilis* RB.CJ41 có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. làm cơ sở cho các nghiên cứu xác định các hợp chất thứ cấp có khả năng kháng nấm và sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh do nấm *Fusarium* sp.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* RB.CJ41 (Accession LC602155) đã được phân lập từ vùng rễ cây hồ tiêu và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

Nấm bệnh *Fusarium* sp. F.TNU01 (LC702439) được phân lập trên cây hồ tiêu bị bệnh vàng lá chết chậm do Viện Công nghệ sinh học và Môi trường cung cấp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của đơn yếu tố đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41

Chuẩn bị sinh khối nấm *Fusarium* sp.: Nấm *Fusarium* sp. được nuôi cấy trong 50ml môi trường Potato glucose (PG) lỏng, ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi cấy 5 ngày, điều chỉnh để đạt mật độ  $10^7$  CFU/ml. Ly tâm dịch nuôi cấy (4.000 vòng/phút trong 5 phút) thu cặn chứa sinh khối *Fusarium* sp. và hấp khử trùng ở  $121^{\circ}\text{C}$ , 1atm, thời gian 15 phút nhằm bất hoạt nấm bệnh.

Sinh khối nấm *Fusarium* sp. sử dụng để tiến hành khảo sát ngưỡng tối ưu của các đơn yếu tố trong thành phần môi trường (Trịnh Thị Huyền Trang, 2022) bao gồm nguồn C/N, nguồn cacbon,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41 và thay đổi lần lượt từng yếu tố, cố định các yếu tố còn lại. Kết quả nghiên cứu của yếu tố trước sẽ được sử dụng trong nghiên cứu yếu tố tiếp theo.

Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn: Chủng RB.CJ41 được chuyển từ ống giống vào bình tam giác có chứa 50ml môi trường LB lỏng, pH 7 đã hấp khử trùng ở  $121^{\circ}\text{C}$  trong 20 phút. Nuôi trên máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi 24h, điều chỉnh để đạt mật độ  $10^8$  CFU/ml. Bổ sung 1ml dịch vi khuẩn ở mật độ này khi thực hiện các thí nghiệm khảo sát ngưỡng tối ưu của các đơn yếu tố.

Nguồn C/N (8 g/l) bao gồm bã sắn, bã đậu, bánh dầu, bột vỏ tôm là các nguồn thu nhận từ phế phụ phẩm nông nghiệp và nguồn thương mại làm đối chứng (cao thịt/pepton = 5/3). Sau khi lựa chọn được nguồn C/N thích hợp, khảo sát các nồng độ khác nhau 0 g/l, 4 g/l, 8 g/l, 12 g/l và 16 g/l. Nguồn cacbon (2 g/l) bao gồm

glucose, galactose, sucrose, lactose, manitol. Sau khi lựa chọn được nguồn cacbon thích hợp, khảo sát nồng độ khác nhau 0 g/l, 2 g/l, 4 g/l, 6 g/l và 8 g/l. Nồng độ khảo sát của  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và  $\text{MgSO}_4$  lần lượt 0 g/l, 2 g/l, 4 g/l, 6 g/l và 8 g/l.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ vi khuẩn (CFU/ml) và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp.

### 2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. từ dịch nuôi cấy chủng RB.CJ41

Nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* RB.CJ41 có bổ sung sinh khối nấm *Fusarium* sp. ở điều kiện nhiệt độ 37°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 4 ngày. Dịch nuôi cấy được ly tâm (13.000 vòng/5 phút ở 4°C) để thu dịch trong. Phần dịch trong này được lọc qua màng lọc kích thước 0,2µm nhằm loại bỏ vi khuẩn, sau đó bổ sung vào môi trường PGA và cấy nấm *Fusarium* sp. (đường kính 1cm) vào giữa đĩa petri. Ở đĩa đối chứng, nấm *Fusarium* sp. (đường kính 1cm) được cấy vào giữa đĩa petri. Đường kính tản nấm *Fusarium* sp. được xác định sau 7 ngày nuôi cấy (Trịnh Thị Huyền Trang, 2022). Hiệu suất đối kháng nấm bệnh *Fusarium* sp. của dịch nuôi cấy được tính theo công thức Abott:

Cách tính hiệu suất đối kháng:

$$AE (\%) = [(C - T)/C] \times 100$$

Trong đó: AE (antagonistic efficacy): hiệu suất đối kháng; C: đường kính tản nấm ở đĩa đối chứng; T: đường kính tản nấm ở công thức thí nghiệm.

### 2.2.3. Ảnh hưởng của đa yếu tố môi trường đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - cấu trúc có tâm (CCD)

Qua kết quả khảo sát ở thí nghiệm ảnh hưởng của các đơn yếu tố đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41. Nghiên cứu đã xác định được các yếu tố môi trường tác động mạnh nhất đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *Bacillus subtilis* RB.CJ41 bao gồm bã đậu, mannitol và  $\text{MgSO}_4$ . Các yếu tố này được lựa chọn để thiết kế

thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - cấu trúc có tâm (CCD).

Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính kháng nấm (%). Mô hình tối ưu hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:  $Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2$ . Trong đó:  $b_0$  là hệ số hồi quy tại tâm,  $b_1, b_2, b_3$  là các hệ số tuyến tính;  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  là các hệ số bình phương;  $b_{12}, b_{13}, b_{23}$  là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; A, B và C là các biến độc lập.

### 2.4.3. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Sau khi xác định được hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. từ thí nghiệm theo RSM-CCD, nhập hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. vào ma trận được tạo từ phần mềm Design-Expert 12.0.1.0 để xác định phương trình hồi quy. Phần mềm sẽ dự đoán hàm mục tiêu là hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. (HSDK %) đạt giá trị cao nhất dựa trên ba yếu tố khảo sát. Sau đó thí nghiệm kiểm định giá trị mô hình dự đoán bằng thực nghiệm với 3 lần lặp lại.

### 2.4.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 22 với  $P < 0,05$  và Microsoft Excel 2016. Phần mềm Design-Expert (phiên bản 12.0.1.0, Copyright©2016, Stat-Ease Inc., USA) theo mô hình CCD được sử dụng để xác định hệ số xác định tương quan  $R^2$  của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. ở quy mô phòng thí nghiệm.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của đơn yếu tố đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn C/N

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt về mật độ thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm. Nghiệm thức sử dụng bã đậu có mật độ vi khuẩn và hiệu suất đối kháng nấm bệnh cao nhất lần lượt gấp từ 1,18-2,07 lần và 1,2-2,25

Tối ưu hóa điều kiện nhân nuôi chủng vi khuẩn vùng rễ *Bacillus subtilis* RB.CJ41 kháng nấm *Fusarium* sp.

lần so với các nghiệm thức còn lại. Mỗi chủng vi sinh vật thường có một nguồn C/N và nồng độ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển cũng như tổng hợp các hợp chất thứ cấp kháng nấm. Li & cs. (2019) đã chỉ ra rằng môi trường tối ưu của *Bacillus* spp. gồm glucoses 20 g/l, bột đậu nành 30 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g/l.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nguồn bã đậu đến mật độ và hoạt tính kháng nấm của

chủng *B. subtilis* RB.CJ41 được trình bày ở bảng 4 cho thấy, nghiệm thức môi trường sử dụng nồng độ bã đậu 8 g/l có mật độ vi khuẩn cao nhất gấp từ 1,26-2,34 lần so với các nghiệm thức còn lại. Sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê với P < 0,01. Bên cạnh đó, cũng có sự khác biệt về mặt thống kê (P < 0,05) khi sử dụng nồng độ bã đậu 8 g/l, hiệu suất đối kháng nấm gấp từ 1,31-2,33 lần so với các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 1. Giá trị bã đậu, mannitol và MgSO<sub>4</sub> dùng trong phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương pháp cấu trúc có tâm (CCD)**

Tên yếu tố	Mức				
	-α	-1	0	+1	+α
A: Bã đậu (g/l)	1,27	4	8	12	14,72
B: Mannitol (g/l)	2,63	4	6	8	9,36
C: MgSO <sub>4</sub> (g/l)	0,63	2	4	6	7,36

**Bảng 2. Mô hình thực nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - cấu trúc có tâm (CCD) để tối ưu hóa hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp.**

STT	A: Bã đậu (g/l)	B: Mannitol (g/l)	C: MgSO <sub>4</sub> (g/l)	HSDK (%)
1	-1	-1	-1	2,5
2	1	-1	-1	5
3	-1	1	-1	7,5
4	1	1	-1	5
5	-1	-1	1	5
6	1	-1	1	2,5
7	-1	1	1	7
8	1	1	1	5
9	-α	0	0	7,5
10	+α	0	0	2,5
11	0	-α	0	2,5
12	0	+α	0	5
13	0	0	-α	5
14	0	0	+α	7,5
15	0	0	0	12,5
16	0	0	0	12,5
17	0	0	0	12,5
18	0	0	0	10
19	0	0	0	12,5
20	0	0	0	10

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn C/N đến mật độ và hiệu suất đối kháng nấm bệnh của chủng *B. subtilis* RB.CJ41**

Nguồn C/N	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	HSDK (%)
ĐC	44,00 <sup>b</sup> $\pm$ 2,00	12,50 <sup>b</sup> $\pm$ 2,50
Bã đậu	56,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,00	15,00 <sup>a</sup> $\pm$ 2,50
Bánh dầu	27,00 <sup>c</sup> $\pm$ 5,00	9,16 <sup>bc</sup> $\pm$ 1,44
Bột sắn	47,33 <sup>ab</sup> $\pm$ 6,65	10,00 <sup>b</sup> $\pm$ 2,50
Bột vỏ tôm	38,33 <sup>bc</sup> $\pm$ 6,11	6,66 <sup>c</sup> $\pm$ 1,44
CV%	6,51	8,34
P	**	*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ ; ĐC: Đối chứng, HSDK: Hiệu suất đối kháng.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ bã đậu đến mật độ và hiệu suất đối kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41**

Nồng độ bã đậu (g/l)	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	HSDK (%)
0	32,00 <sup>d</sup> $\pm$ 3,00	7,50 <sup>c</sup> $\pm$ 2,50
4	57,00 <sup>b</sup> $\pm$ 4,35	13,33 <sup>b</sup> $\pm$ 1,44
8	71,66 <sup>a</sup> $\pm$ 3,05	17,50 <sup>a</sup> $\pm$ 2,50
12	55,33 <sup>b</sup> $\pm$ 4,50	12,50 <sup>b</sup> $\pm$ 2,50
16	41,66 <sup>c</sup> $\pm$ 2,08	9,16 <sup>c</sup> $\pm$ 1,44
CV%	7,22	8,67
P	**	*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ ; HSDK: Hiệu suất đối kháng.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ và hiệu suất đối kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41**

Nguồn cacbon	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	HSDK (%)
Galactose	161,33 <sup>e</sup> $\pm$ 3,51	10,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,50
Glucose	143,00 <sup>d</sup> $\pm$ 4,58	5,83 <sup>b</sup> $\pm$ 1,44
Lactose	200,00 <sup>b</sup> $\pm$ 4,58	7,50 <sup>b</sup> $\pm$ 2,50
Sucrose	172,00 <sup>c</sup> $\pm$ 3,00	9,16 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,44
Mannitol	216,33 <sup>a</sup> $\pm$ 6,11	12,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2,50
CV%	3,98	8,44
P	*	*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*  $P < 0,05$ . HSDK: Hiệu suất đối kháng.

### 3.1.2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Kết quả từ bảng 5 cho thấy, mật độ vi khuẩn cao nhất ở môi trường sử dụng mannitol gấp từ

1,08-1,51 lần so với các nghiệm thức còn lại. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $P < 0,05$ . Bên cạnh đó, hiệu suất đối kháng nấm (%) của mannitol cũng gấp từ 1,25-2,14 lần so với

các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Phạm Tấn Việt & cs. (2019) ghi nhận, glucose là nguồn cacbon thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc *Fusarium* từ *B. subtilis* NN12. Eswari & cs. (2016) cũng ghi nhận chủng *Bacillus subtilis* nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glucose (2 g/l) sẽ tăng hàm lượng các chất hoạt động bề mặt.

### 3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ mannitol

Kết quả bảng 6 cho thấy, có sự khác biệt về mật độ thống kê giữa nghiệm thức sử dụng mannitol với nồng độ 6 g/l so với các nghiệm thức còn lại. Mật độ vi khuẩn cao nhất gấp 1,37 lần so với không sử dụng mannitol. Bên cạnh đó, khi sử dụng mannitol ở nồng độ 6 g/l hiệu suất đối kháng gấp từ 1,21-1,61 lần so với các nghiệm thức còn lại nhưng không có sự khác biệt ở nghiệm thức sử dụng nồng độ mannitol 8 g/l.

### 3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$

Kết quả bảng 7 cho thấy, mật độ vi khuẩn không có sự khác biệt về mật độ thống kê ở nghiệm thức sử dụng nồng độ  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  4-8 g/l, cao nhất ở nghiệm thức sử dụng nồng độ  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  6 g/l và thấp nhất khi không sử dụng  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ . Mặc dù, có sự tác động của  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  đến mật độ vi khuẩn nhưng không có sự tác động  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  đến hiệu suất đối kháng nấm *Fusarium* sp.. Cụ thể, khi không sử dụng  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  hiệu suất đối kháng gấp 1,15-1,72 lần so với các nghiệm thức còn lại.

### 3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ $\text{MgSO}_4$

Kết quả bảng 8 cho thấy, mật độ vi khuẩn cũng như hiệu suất đối kháng đều tăng dần khi sử dụng nồng độ  $\text{MgSO}_4$  từ 0 g/l đến 4 g/l sau đó giảm dần đến nồng độ  $\text{MgSO}_4$  8 g/l. Ở nồng độ  $\text{MgSO}_4$  4 g/l mật độ vi khuẩn gấp 1,21-2,06 lần và hiệu suất đối kháng gấp 1,14 đến 1,85 lần so với các nghiệm thức còn lại.

Như vậy, chủng RB.CJ41 sinh trưởng, phát triển và có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. cao trong môi trường có nguồn C/N hữu cơ là bã đậu nồng độ 8 g/l, nguồn cacbon là mannitol nồng độ 6 g/l;  $\text{MgSO}_4$  4 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  6 g/l. Tuy nhiên, yếu tố tác động lớn nhất đến mật độ và hoạt tính kháng nấm của chủng *B. subtilis* RB.CJ41 là bã đậu, mannitol và  $\text{MgSO}_4$ . Vì vậy, nghiên cứu tiếp theo được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của ba yếu tố này hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - cấu trúc có tâm (CCD).

### 3.2.2. Tối ưu hóa hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp.

Ảnh hưởng của bã đậu, mannitol và  $\text{MgSO}_4$  đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. được mô tả dưới dạng mô hình bậc hai bởi các đơn vị được mã hóa.

$Y = 11,66 - 0,9452A + 1,00B + 0,2713C - 0,5625AB - 0,5625AC - 0,0625BC - 2,28A^2 - 2,73B^2 - 1,84C^2$ ; Trong đó, Y là hoạt tính kháng nấm (%), A là bã đậu (g/l), B là mannitol (g/l), C là  $\text{MgSO}_4$  (g/l).

**Bảng 6. Ảnh hưởng nồng độ đường mannitol đến mật độ và hiệu suất đối kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41**

Nồng độ mannitol (g/l)	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	Hiệu suất đối kháng (%)
0	122,33 <sup>d</sup> ± 3,51	15,00 <sup>b</sup> ± 2,50
2	134,00 <sup>c</sup> ± 5,56	15,83 <sup>b</sup> ± 1,44
4	147,33 <sup>b</sup> ± 4,04	18,33 <sup>b</sup> ± 1,44
6	168,33 <sup>a</sup> ± 4,16	24,16 <sup>a</sup> ± 1,44
8	150,00 <sup>b</sup> ± 2,64	20,00 <sup>ab</sup> ± 2,50
CV%	9,55	5,2
P	**	**

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*\*:  $P < 0,01$ ; HSDK: Hiệu suất đối kháng.

**Bảng 7. Ảnh hưởng nồng độ  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  đến mật độ và hiệu suất đối kháng nấm *Fusarium sp.* của chủng *B. subtilis* CJ41**

Nồng độ $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ (g/l)	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	HSDK(%)
0	110,00 <sup>c</sup> $\pm$ 7,00	25,83 <sup>a</sup> $\pm$ 1,44
2	119,33 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,08	15,00 <sup>c</sup> $\pm$ 2,50
4	122,67 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,21	19,16 <sup>bc</sup> $\pm$ 1,44
6	133,33 <sup>a</sup> $\pm$ 5,85	22,50 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,50
8	124,33 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,02	20,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,50
CV(%)	1,91	5,17
P	**	**

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*\*:  $P < 0,01$ ; HSDK: Hiệu suất đối kháng.

**Bảng 8. Ảnh hưởng nồng độ  $\text{MgSO}_4$  đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium sp.* của chủng *B. subtilis* RB. CJ41**

Nồng độ $\text{MgSO}_4$ (g/l)	Mật độ VK ( $\times 10^6$ CFU/ml)	HSDK (%)
0	32,00 <sup>c</sup> $\pm$ 8,88	10,83 <sup>c</sup> $\pm$ 1,44
2	44,67 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,51	12,50 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,05
4	66,00 <sup>a</sup> $\pm$ 3,00	20,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,44
6	54,33 <sup>b</sup> $\pm$ 3,05	17,50 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,89
8	40,33 <sup>c</sup> $\pm$ 2,08	14,16 <sup>bc</sup> $\pm$ 2,05
CV(%)	6,95	6,67
P	**	**

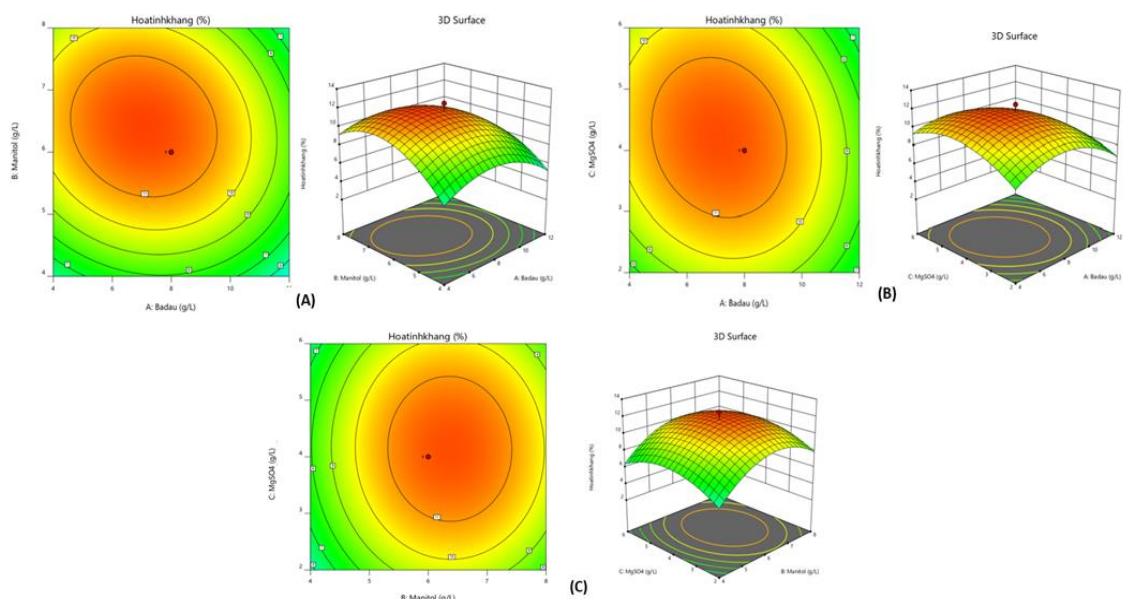
Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan; \*\*:  $P < 0,01$ ; HSDK: Hiệu suất đối kháng.

**Bảng 9. Phân tích ANOVA về hoạt tính kháng *Fusarium sp.***

Nhân tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P	Ý nghĩa
Mô hình	226,61	9	25,18	13,89	0,0002	Ý nghĩa
A - Bã đậu	12,20	1	12,20	6,73	0,0267	
B - Mannitol	13,75	1	13,75	7,59	0,0203	
C - $\text{MgSO}_4$	1,00	1	1,00	0,5545	0,4736	
AB	2,53	1	2,53	1,40	0,2646	
AC	2,53	1	2,53	1,40	0,2646	
BC	0,0313	1	0,0313	0,0172	0,8981	
A <sup>2</sup>	75,24	1	75,24	41,52	<0,0001	
B <sup>2</sup>	107,16	1	107,16	59,13	<0,0001	
C <sup>2</sup>	48,95	1	48,95	27,01	0,0004	
Sự không phù hợp	18,12	10	1,81			
Pure Error	9,79	5	1,96	1,17	0,4320	Không ý nghĩa
Total	8,33	5	1,67			
	244,74	19				

Ghi chú:  $CV = 19,30\%$  ;  $R^2 = 0,9260$ ;  $Pred - R^2 = 0,6229$  ;  $Adj R^2 = 0,8593$ ;  $Adeq Precision = 9,8752$ .

Tối ưu hóa điều kiện nhân nuôi chủng vi khuẩn vùng rễ *Bacillus subtilis* RB.CJ41 kháng nấm *Fusarium* sp.



Ghi chú: (A) tương tác giữa bã đậu và mannitol; (B) tương tác giữa bã đậu và  $MgSO_4$ ; (C) tương tác giữa mannitol và  $MgSO_4$ .

**Hình 1. Biểu đồ đáp ứng bề mặt 2D và 3D của hoạt tính kháng (%) theo các cặp yếu tố ảnh hưởng**

**Bảng 10. Kết quả thực nghiệm ảnh hưởng của bã đậu, mannitol và  $MgSO_4$  đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của dịch nuôi cấy vi khuẩn**

Std	A: Bã đậu (g/l)	B: Mannitol (g/l)	C: $MgSO_4$ (g/l)	Hoạt tính kháng lý thuyết (%)	Hoạt tính kháng thực nghiệm (%)
1	4	4	2	2,50	3,28
2	12	4	2	5,00	3,64
3	4	8	2	7,50	6,54
4	12	8	2	5,00	4,65
5	4	4	6	5,00	5,08
6	12	4	6	2,50	3,19
7	4	8	6	7,00	8,08
8	12	8	6	5,00	3,94
9	1,27283	6	4	7,50	6,78
10	14,7272	6	4	2,50	3,60
11	8	2,63641	4	2,50	2,26
12	8	9,36359	4	5,00	5,63
13	8	6	0,636414	5,00	5,99
14	8	6	7,36359	7,50	6,90
15	8	6	4	12,50	11,66
16	8	6	4	12,50	11,66
17	8	6	4	12,50	11,66
18	8	6	4	10,00	11,66
19	8	6	4	12,50	11,66
20	8	6	4	10,00	11,66



**Bảng 11. Thực nghiệm hoạt tính kháng nấm từ mô hình**

Chỉ tiêu	Trung bình dự đoán	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Trung bình thực nghiệm	95%PI High
Hoạt tính kháng nấm	11,6556	1,3462	5	0,868627	9,72021	11,75	13,591

Bảng 9 cho thấy, với giá trị p của mô hình nhỏ hơn 0,0002 và giá trị P của kiểm định sự không phù hợp là 0,4320 (không có ý nghĩa thống kê) ở mức ý nghĩa 5%, điều này cho thấy mô hình có sự phù hợp. Hệ số xác định tương quan  $R^2$  tính được là 0,9260 cho thấy có 92,60% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình. Giá trị  $R^2$  tiên đoán là 0,6229 phù hợp với  $R^2$  điều chỉnh 0,8593. Kết quả xác định hoạt tính kháng được thể hiện trong bảng 10 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt - phương pháp cấu trúc có tâm sử dụng phần mềm Design - Expert 12.0.1.0. Hoạt tính kháng cao nhất đạt 11,66% trong môi trường có hàm lượng bã đậu 8 g/l, mannitol 6 g/l và  $MgSO_4$  4 g/l

Các yếu tố trong thí nghiệm có sự tương tác với nhau theo từng cặp yếu tố và được thể hiện trong biểu đồ đáp ứng bề mặt dạng 2D và 3D (Hình 1). Biểu đồ đáp ứng bề mặt trong hình 1A cho thấy có sự tương tác giữa bã đậu và mannitol đến hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. khi  $MgSO_4$  được cố định là 4 g/l. Hoạt tính kháng nấm thay đổi và đạt cực đại khi nồng độ của bã đậu thay đổi từ 7 g/l đến 8 g/l và mannitol dao động trong khoảng từ 6 g/l đến 7 g/l. Bên cạnh đó, hình 1B cũng cho thấy có sự tương tác giữa bã đậu và  $MgSO_4$  đến hoạt tính kháng nấm khi mannitol được cố định 6 g/l. Hoạt tính kháng thay đổi và đạt cực đại khi nồng độ của bã đậu thay đổi từ 7 g/l đến 8 g/l và  $MgSO_4$  dao động trong khoảng từ 4 g/l đến 5 g/l. Ngoài ra, hình 1C cũng cho thấy có sự tương tác giữa  $MgSO_4$  và mannitol đến hoạt tính kháng khi bã đậu được cố định là 8 g/l. Hoạt tính kháng thay đổi và đạt cực đại khi nồng độ của mannitol thay đổi từ 5 g/l đến 6 g/l và  $MgSO_4$  dao động trong khoảng từ 4 g/l đến 5 g/l.

Kết quả thực nghiệm để đánh giá hiệu quả của mô hình được trình bày tại bảng 11 cho thấy mô hình hoàn toàn phù hợp khi hoạt tính kháng nấm đạt 11,75% nằm trong khoảng giá trị cho phép 9,72% đến 13,59%.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được ba yếu tố của môi trường gồm bã đậu, mannitol và  $MgSO_4$  ảnh hưởng đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng *B. subtilis* RB.CJ41. Phương trình đa thức bậc hai mô tả sự phụ thuộc của hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. vào các biến khảo sát đã được xác định có dạng “ $Y = 11,66 - 0,9452A + 1,00B + 0,2713C - 0,5625AB - 0,5625 AC - 0,0625 BC - 2,28A^2 - 2,73B^2 - 1,84C^2$ ”. Khoảng giá trị của bã đậu, mannitol và  $MgSO_4$  được xác định lần lượt 7 g/l đến 8 g/l, 6 g/l đến 7 g/l và 4 g/l đến 5 g/l là khoảng tối ưu để thu được hoạt tính kháng nấm cao đạt 11,66% của vi khuẩn *B. subtilis* RB.CJ41.

Nghiên cứu tiếp theo cần đánh giá thêm ảnh hưởng các yếu tố nhiệt độ, thời gian, tốc độ lắc kết hợp với điều kiện tối ưu nêu trên nhằm thu được các hợp chất kháng nấm cũng như sản xuất chế phẩm phòng trừ bệnh do nấm *Fusarium* sp. gây ra.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Eswari J.S., Anand M. & Venkateswarlu C. (2016). Optimum culture medium composition for lipopeptide production by *Bacillus subtilis* using response surface model-based ant colony optimization. *Sadhana*. 41: 55-65.
- Huang X.Q., Wen T., Zhang J.B., Meng L., Zhu T.B., Liu L.L. & Cai Z.C. (2015). Control of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* by biological soil disinfestation with incorporation of various organic matters. *European journal of plant pathology*. 143: 223-235.
- Khedher S.B., Mejdoub-Trabelsi B. & Tounsi S. (2021). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*. 152: 104444.
- Li Y., Xu Y., Li W., Yang Y., Wang L., Yu J., Wang, C. & Li, X. (2019). Study on Optimizing Nutrition and Fermentation Conditions for Compound

- Bacillus* spp. American Journal of Molecular Biology. 9(2): 75-84.
- Phuong Thị Hương & Vũ Văn Hạnh (2018). Lựa chọn điều kiện lên men cho sinh trưởng chủng *Bacillus subtilis* BSVN15 ứng dụng trong sản xuất chế phẩm probiotic trong chăn nuôi. Tạp chí Công nghệ sinh học. 16(1): 167-172.
- Phạm Tấn Việt, Đinh Thị Ngọc Ngân, Lê Thị Ngọc Ly, Nguyễn Thị Kim Huệ, Lê Thị Vy Hiền, Nguyễn Thị Diệu Hạnh & Nguyễn Ngọc Ân (2022). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng ức chế *Fusarium oxysporum* và *Fusarium equiseti* của *Bacillus subtilis* NN12. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 59: 57- 67.
- Putri R.E., Mubarik N.R., Ambarsari L. & Wahyudi A.T. (2021). Antagonistic activity of glucoanolytic bacteria *Bacillus subtilis* W3. 15 against *Fusarium oxysporum* and its enzyme characterization. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 22(9): 4067-4077.
- Rajkumar K., Naik M.K., Amaresh Y.S. & Chennappa G. (2018). Induction of systemic resistance by *Bacillus subtilis* isolates against *Fusarium* wilt of chilli. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7(7): 2669-2680.
- Shafi J., Tian H. & Ji M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 31(3): 446-459.
- Trinh T.H.T., Wang S.L., Nguyen V.B., Phan T.Q., Doan M.D., Tran T.P.H., Nguyen T.H, Le T.A.H., Ton T.Q.& Nguyen A.D. (2022). Novel nematocidal compounds from shrimp shell wastes valorized by *Bacillus velezensis* RB. EK7 against black pepper nematodes. Agronomy. 12(10): 2300.
- Trình Thị Huyền Trang, Lê Thị Ánh Hồng, Trần Minh Định, Nguyễn Anh Dũng & Trần Thị Phương (2020). Tuyển chọn vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro*. Tạp chí Khoa học Đại học Tây Nguyên. 42: 50-58.
- Trình Thị Huyền Trang (2022). Tuyển chọn, nghiên cứu đặc tính kháng tác nhân gây bệnh và tạo chế phẩm phòng trừ bệnh rễ của các chủng vi khuẩn vùng rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) tại Tây Nguyên. Luận án tiến sĩ Công nghệ sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Vehapi M., Ýnan B., Kayacan-Cakmakoglu S., Sagdic O. & Özçimen D. (2022). Optimization of growth conditions for the production of *Bacillus subtilis* using central composite design and its antagonism against pathogenic fungi. Probiotics and Antimicrobial Proteins. pp. 1-12.
- Ye X., Li Z., Luo X., Wang W., Li Y., Li R., Yang B., Qiao Y., Zhou J., Fan J., Wang H., Cao H., Cui Z., & Zhang R. (2020). A predatory myxobacterium controls cucumber *Fusarium* wilt by regulating the soil microbial community. Microbiome. 8: 1-17.
- Zhu J., Tan T., Shen A., Yang X., Yu Y., Gao C., Li Z., Cheng Y., Chen J., Guo L., Sun X., Yan Z., Li J., & Zeng L. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. Journal of Plant Pathology. 102: 433-441.