

Selection of native *Bacillus* strains with the ability plant growth promoting and controlling root-knot nematode *Meloidogyne* spp.

Van T. Tran¹, Dieu T. H. Nguyen², Khanh T. V. Nguyen¹, Quang M. Nguyen¹, Hoang P. T. Truong¹,
Ha T. T. Tran³, Da U. T. Dao¹, Hue T. T. Vo², & Don D. Le²

¹Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Chemical and Food Technology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 11, 2025

Revised: July 18, 2025

Accepted: July 29, 2025

Keywords

Bacillus

Meloidogyne spp.

Root-knot nematodes

*Corresponding author

Tran Thi Van

Email:

van.tranthi@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The study aimed to identify beneficial indigenous microorganisms to control root-knot nematodes on vegetables. This research isolated, selected, and identified three promising indigenous *Bacillus* strains (*Bacillus velezensis* BHMT 4.1, *B. amyloliquefaciens* CCCX 2.2, and *B. subtilis* CCCX 2.1) for controlling root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and promoting vegetable plant growth. The study qualitatively assessed several plant growth-promoting traits of *Bacillus* strains. All of them were capable of producing IAA (indole-3-acetic acid), solubilizing phosphate (with solubilization halos ranging from 1.57 to 2.0 mm), and producing siderophores (with siderophore production indices from 3.33 to 6.33 mm). Furthermore, three *Bacillus* strains exhibited nematicidal activity against the second juvenile stage (J2) and inhibited egg hatching of *Meloidogyne* spp. *B. velezensis* BHMT 4.1 strain demonstrated the highest mortality rate of 66.67% against J2 after 48 h and achieved a 44% inhibition rate of egg hatching after 7 days. These findings suggest that indigenous *Bacillus* strains have strong potential for application in the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on vegetables.

Cited as: Tran, V. T., Nguyen, D. T. H., Nguyen, K. T. V., Nguyen, Q. M., Truong, H. P. T., Tran, H. T. T., Dao, D. U. T., Vo, H. T. T., & Le, D. D. Selection of native *Bacillus* strains with the ability plant growth promoting and controlling root-knot nematode *Meloidogyne* spp. *The Journal of Agriculture and Development* 25(2), 64-82.

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật và kiểm soát tuyến trùng bướu rễ *Meloidogyne* spp.

Trần Thị Vân¹, Nguyễn Thị Hồng Diệu², Nguyễn Thị Vân Khanh¹, Nguyễn Minh Quang¹,

Trương Phước Thiên Hoàng¹, Trần Thị Thu Hà³, Đào Uyên Trân Đa¹, Võ Thị Thuý Huệ² & Lê Đình Đôn²

¹Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Công Nghệ Hóa Học và Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 11/06/2025

Ngày chỉnh sửa: 18/07/2025

Ngày chấp nhận: 29/07/2025

Từ khóa

Bacillus spp.

Meloidogyne spp.

Tuyến trùng bướu rễ

*Tác giả liên hệ

Trần Thị Vân

Email:

van.tranthi@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Với mục tiêu tìm kiếm các vi sinh vật bản địa có lợi để sản xuất thử nghiệm các chế phẩm sinh học trong phòng trừ tuyến trùng gây hại trên các loại rau, nghiên cứu này đã phân lập, tuyển chọn và xác định được 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có triển vọng trong việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây hại rễ và kích thích sinh trưởng (KTST) cây rau. Bằng phương pháp định danh hình thái, sinh hóa và giải trình tự vùng 16S rRNA đã xác định được 3 loài vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1, *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và *B. subtilis* CCCX 2.1. Nghiên cứu đã khảo sát định tính một số đặc điểm KTST của vi khuẩn, kết quả, 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh IAA, hòa tan phosphate (với vòng phân giải đạt từ 1,57 - 2,0 mm) và tổng hợp siderophore (với hiệu số sinh siderophore đạt 3,33 - 6,33 mm). Hơn nữa, 3 chủng đều có khả năng gây chết đối với ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 và kiểm soát sự nở trứng của tuyến trùng *Meloidogyne* spp. Trong đó, chủng *B. velezensis* BHMT4.1 có khả năng gây chết ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 với tỉ lệ cao nhất 66,67% sau 48 giờ và kiểm soát tỉ lệ ức chế nở trứng tuyến trùng đạt 44% sau 7 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa đã phân lập rất có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây hại trên cây rau.

1. Đặt Vấn Đề

Tuyến trùng bướu rễ (*Meloidogyne* spp.; root-knot nematodes; RKN) là tuyến trùng ký sinh thực vật thường được quan sát thấy và gây hại nhiều nhất trong sản xuất rau (Jones & ctv., 2013). Cây bị nhiễm tuyến trùng bướu rễ có lá

vàng, còi cọc, các triệu chứng thiếu chất dinh dưỡng và nhiễm trùng thứ cấp bởi các mầm bệnh khác (Hunt & Handoo, 2009). Năng suất cây trồng bị mất do nhiễm tuyến trùng phụ thuộc vào loài tuyến trùng hiện có, quần thể tuyến trùng ban đầu và các giống cây trồng được

trồng (Ornat & Sorribas, 2008). Theo Sasser & Carter (1985), năng suất mất 22 - 30% đối với cây cà chua bị nhiễm *M. incognita*. Tương tự như vậy, Sikora & Fernandez (2005) đã báo cáo rằng, năng suất giảm hơn 30% ở ba loại cây rau dễ bị nhiễm tuyến trùng (cà tím, cà chua và dưa leo) ở nhiều vùng nông nghiệp nhiệt đới và cận nhiệt đới. Có 4 loại tuyến trùng chính *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* và *M. hapla*, cũng như một số loài mới nổi như *M. enterolobii* và *M. chitwoodi*, gây ra phần lớn thiệt hại cho mùa màng (Moens & ctv., 2009). Chúng tác động vào rễ cây gây hư rễ, cây không hút được nước, dinh dưỡng, làm cho các tác nhân gây bệnh khác tấn công vào rễ (Sasser, 1980; Mai, 1985). Những phương pháp phòng trừ tuyến trùng gây bướu rễ như phơi đất, ngâm đất, dùng giống cây có kiểu gen kháng, và kiểm soát bằng hóa chất được sử dụng. Hiện nay, phương pháp phổ biến nhất để ngăn ngừa tuyến trùng gây hại là dùng thuốc hoá học; tuy nhiên, sử dụng thuốc hoá học về lâu dài sẽ gây kháng thuốc, hơn nữa nhiều thuốc hoá học trừ tuyến trùng đã bị hạn chế sử dụng bởi dư lượng độc tố không đảm bảo sức khỏe con người và môi trường tự nhiên. Do đó, việc nghiên cứu những biện pháp thay thế trong phòng trừ tuyến trùng gây bướu rễ là rất cần thiết.

Vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sinh trưởng thực vật (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) là một nhóm vi khuẩn có lợi chỉ chiếm 2 - 5% vi khuẩn vùng rễ, giúp tăng hấp thụ chất dinh dưỡng, tăng trưởng, tăng năng suất cây trồng, và thường thể hiện hoạt động kiểm soát sinh học chống lại các tác nhân gây bệnh thực vật (Liu, 2013). PGPR được tìm thấy gồm vi khuẩn gram âm và gram dương. Tuy nhiên, phần lớn là vi khuẩn gram âm, chỉ có một số ít vi khuẩn gram dương được báo cáo (Kloepper & ctv., 2004).

Trong tất cả các chi vi khuẩn được xác định là PGPR, *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. là hai chi chiếm ưu thế đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi cho cây trồng (Podile & Kishore, 2006). Cơ chế hoạt động của vi khuẩn đối kháng trong quá trình kiểm soát sinh học tuyến trùng bao gồm ký sinh bắt buộc, giảm khả năng xâm lấn, ức chế tăng trưởng do cạnh tranh chất dinh dưỡng và kháng kháng sinh liên quan đến các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học hoặc chất chuyển hóa thứ cấp (Mendoza & ctv., 2008).

Trên thế giới, các sản phẩm đã được thương mại hóa để kiểm soát tuyến trùng như BioNem-WP do AgrGreen phát triển với *B. firmus* là thành phần chính, có hiệu quả chống lại *M. incognita*, *M. hapla*, *Heterodera* spp., *Tylenchulus semipenetrans*, *Xiphinema index* và *Ditylenchus dipsaci* (Keren-Zur & ctv., 2000). BioYield với thành phần chính là *B. amyloliquefaciens* IN937a và *B. subtilis* GB03, được Gustafson phát triển để kiểm soát các tác nhân gây bệnh trong đất và ngăn chặn quần thể *M. incognita* ở cà chua (Kloepper & ctv., 2004; Burkett-Cadena & ctv., 2008). *Bacillus firmus* GB-126, được Bayer CropScience tiếp thị dưới tên thương mại VOTiVO, được sử dụng để kiểm soát *M. incognita*, *Ditylenchus dipsaci* và *Rotylenchulus reniformis* trong ngô, bông, lúa miến, đậu nành và củ cải đường (Castillo & ctv., 2013). Pathway consortia, hỗn hợp PGPR của *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *P. fluorescens*, *Streptomyces* spp. và *Trichoderma* spp., là sản phẩm kiểm soát sinh học được bào chế dưới dạng lỏng, dạng hạt và dạng thixotropic để kiểm soát *Meloidogyne* spp. và *R. reniformis* (Askary, 2015). Ở Việt Nam bước đầu có một số nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học từ vi khuẩn, giúp giảm việc sử dụng phân hóa học, an toàn với môi trường và giảm chi phí

sản xuất. Tuy nhiên, việc sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ tuyến trùng gây bệnh trên các cây trồng nói chung và cây rau nói riêng với hiệu quả cao, ổn định chưa có nhiều vì chưa tìm được nhiều chủng vi khuẩn bản địa có đồng thời cả khả năng kích thích sinh trưởng (KTST) và kiểm soát tuyến trùng. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc, tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có cả khả năng KTST và kiểm soát tuyến trùng gây bệnh bướu rễ trên cây rau.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Địa điểm thu thập nguồn mẫu

Mẫu đất và rễ cây rau ăn lá thu thập tại Củ Chi và Hóc Môn (TP. Hồ Chí Minh), Cẩm Mỹ và Biên Hoà (Đồng Nai), vi khuẩn được phân lập, làm thuần, lưu giữ tại Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây bướu rễ trên cây rau được thu thập tại vườn trồng rau ăn lá (mồng toi, dền, cải xanh, cải ngọt) ở Củ Chi, Hóc Môn (TP. Hồ Chí Minh), lưu giữ và nhân nguồn tại nhà lưới Bệnh cây, Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường.

Hạt giống cây mồng toi của Công ty TNHH TM Trang Nông (2E, Lê Quang Sung, Phường 2, Quận 6, TP.HCM) được sử dụng trồng để giữ nguồn tuyến trùng trong nhà lưới.

2.3. Thu thập và phân lập mẫu

Những vườn rau được chọn để lấy mẫu là vườn chưa từng sử dụng các chế phẩm hay thuốc

có nguồn gốc từ vi sinh vật trước đó. Thu thập, phân lập mẫu vi khuẩn nội sinh rễ theo phương pháp nghiên cứu của Wang & Liang (2014), trong đó mẫu rễ được lấy từ các cây không bị nhiễm bệnh và biểu hiện sức sống khỏe mạnh. Các vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ mẫu đất bao quanh rễ theo phương pháp của Burgess & ctv. (2009).

2.4. Nhân nuôi nguồn tuyến trùng, thu trứng và ấu trùng J2

Tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây bệnh được chuẩn bị theo phương pháp của Hooper & ctv. (2005), nhân nuôi tuyến trùng trong cây mồng toi sạch bệnh theo phương pháp của Pérez & ctv. (2011). Hạt giống cây mồng toi được khử trùng với 70% ethanol trong 5 phút, NaOCl 1% trong 10 phút và rửa lại bằng nước cất khử trùng 4 lần. Gieo hạt (3 - 5 hạt/chậu) vào các chậu đất đã được khử trùng (duy trì 3 cây/chậu) và thêm 200 tuyến trùng tuổi 2 (J2) vào trong mỗi chậu đất. Bón phân NPK (8-16-8) 1 lần trước khi gieo hạt 2 ngày (2 g/chậu). Đặt cây trong nhà lưới ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$, chăm sóc cây đến khi xuất hiện bướu rễ, nhổ cây và thu tuyến trùng phục vụ cho các nội dung nghiên cứu.

Phương pháp thu trứng (Godinez-Vidal và ctv., 2024): Rửa sạch rễ cây nhiễm tuyến trùng, loại bỏ hết đất bám vào rễ. Cho rễ (1 - 3 cây) vào máy xay, xay nhỏ. Cho NaOCl 10% vào rễ (thêm nước vừa đủ để phủ kín rễ, khoảng 350 mL/1 lít). Trộn và lắc rễ trong 3 phút. Đặt các loại rây mắt lưới 170, 500 và 500 vào xô nhựa theo thứ tự rây 170 lưới ở trên cùng. Đổ rễ đã xay vào rây trên cùng và rửa sạch bằng nước máy đến khi hết NaOCl (dùng chày đập nhẹ vào thành rây để tránh làm tắc lỗ rây). Bỏ phần rễ cây ở rây trên

cùng, rửa sạch cặn bẩn trong rây mắt lưới 500 đến khi hết NaOCl, nhẹ nhàng gom trứng tuyến trùng ở một bên rây. Dùng bình rửa để thu gom trứng cùng với nước máy vào cốc nhựa sạch. Nhẹ nhàng rửa sạch các mảnh vụn mịn trong rây mắt lưới 500 cuối cùng. Cẩn thận gom lại trứng tuyến trùng rể ở một bên của rây cuối cùng này để tránh trứng bị lọt qua lưới. Dùng chai rửa để gom trứng vào cốc nhựa.

Phương pháp tách ấu trùng J2: Tách lọc ấu trùng J2 di động trong rể bằng phương pháp Baermann cải tiến (Hooper và ctv., 2005). Mẫu rể được cân 5 g, cắt nhuyễn và trải đều lên rây lọc tinh, cho nước tiết trùng vào rể để nước vừa đủ chạm đáy rây, sau 24 giờ thu huyền phù tuyến trùng dưới rây để quan sát dưới kính hiển vi soi nổi ở độ phóng đại 40X. Tách lọc ấu trùng tuổi 2 di động trong đất bằng phương pháp Baermann cải tiến sử dụng khay nông (Bell & Watson, 2001). Cân 100 g đất trải đều lên rây lọc tinh, cho nước tiết trùng vào rể để nước vừa đủ chạm đáy rây, ủ trong tối ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Thu dịch huyền phù dưới rây và quan sát thu nhận J2 dưới kính hiển vi soi nổi (40X).

2.5. Chọn lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng KTST dựa vào khả năng sinh IAA, hoà tan phosphate và sản sinh siderophore

Khảo sát khả năng sản xuất IAA của vi khuẩn *Bacillus* spp.: Dựa trên phương pháp của Bric & ctv. (1991) cải tiến. Cấy vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường LB lỏng (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, nước 1 lít, pH 7,0 ± 0,2) bổ sung 0,1% L - tryptophan với nồng độ 1000 µg/L, ủ ở 30°C, trên máy lắc ổn nhiệt (Cole-Parme, Anh) tốc độ 150 vòng/phút

trong 5 ngày. Ly tâm (200 rpm, 15 phút, 4°C) dịch nuôi cấy thu dịch nổi. Chuyển 1 mL dịch nổi vào các ống nghiệm và bổ sung thêm thuốc thử Salkowski (15 mL FeCl₃ 0,5M, 300 mL H₂SO₄ 98%) (Glickmann & Dessaux, 1995;) với tỉ lệ 1:2 (dịch mẫu:thuốc thử Salkowski) ủ ở nhiệt độ phòng 30°C, trong tối, 30 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tương ứng 3 ống nghiệm cho mỗi chủng vi khuẩn *Bacillus*. Theo dõi sự xuất hiện màu đỏ đến hồng trong dịch nuôi cấy có bổ sung 0,1% L-tryptophan cho thấy sự có mặt của IAA.

Khảo sát khả năng hòa tan phosphate của vi khuẩn *Bacillus* spp.: Khả năng hòa tan phosphate được xác định dựa trên kích thước vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường Pikovskaya (Pikovskaya, 1948). Cấy vi khuẩn *Bacillus* lên đĩa môi trường thạch Pikovskaya (Glucose 10 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, NaCl 0,2 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, KCl 0,2 g, Yeast extract 0,5 g, MnSO₄.H₂O 0,002 g, FeSO₄.7H₂O 0,002 g), ủ ở 30°C trong 3 ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi chủng *Bacillus*, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri. Khả năng hòa tan phosphate của vi khuẩn được xác định bằng cách đo vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Chỉ số hòa tan phosphate (PSI) được xác định bằng công thức: $PSI = [\text{đường kính khuẩn lạc (mm)} + \text{đường kính vùng trong suốt quanh khuẩn lạc (mm)}] / \text{đường kính khuẩn lạc (mm)}$.

Khảo sát khả năng sinh siderophore của vi khuẩn *Bacillus* spp.: Khảo sát khả năng sinh siderophore bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường CAS agar (Louden & ctv., 2011). Cấy vi khuẩn *Bacillus* spp. lên môi trường CAS agar (Chrome Azure S (CAS) 60,5 mg, Hexadecyltrimetyl amoni bromua (HDTMA) 72,9 mg, Piperazin 1,4-bis (acid 2-ethanesulfonic)

(PIPETS) 30,24 g, 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong 10 mM HCl 10 mL, Agar 9 g, pH 6,8 - 7,0). Ủ đĩa ở 30°C trong 48 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi vi khuẩn *Bacillus*, mỗi lần lặp lại là một đĩa petri. Quan sát và đo đường kính vùng màu vàng cam xung quanh khuẩn lạc. Khả năng tạo siderophore của vi khuẩn *Bacillus* được đánh giá bằng hiệu số sinh siderophore = D - d (mm), với D là đường kính vòng màu vàng cam hay vùng sản xuất siderophore (mm), d là đường kính khuẩn lạc (mm).

2.6. Đánh giá ảnh hưởng của huyền phù và dịch nổi vi khuẩn *Bacillus* spp. lên ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp.

Tùng khuẩn lạc vi khuẩn *Bacillus* spp. (1 mL) được cấy vào bình Erlenmeyer 250 mL chứa 49 mL môi trường (10 g/L peptone, 10 g/L glucose, 1 g/L KH_2PO_4 và 0,5 g/L MgSO_4), lắc ở tốc độ 200 vòng/phút, ở 30°C trong 24 giờ, cho đến khi đạt 10^8 cfu/mL. Lấy 20 ml của mỗi mẫu sau nuôi cấy, ly tâm ở tốc độ 5.590 rpm trong 20 phút, và thu thập phần dịch nổi không có tế bào, lọc qua xy lanh (0,2 μm). Cặn tế bào của mỗi mẫu nuôi cấy được thu thập, rửa sạch và ly tâm ở tốc độ 5.590 rpm trong 20 phút, huyền phù trong 20 mL nước cất vô trùng sử dụng cho thí nghiệm.

Hút 500 μL dịch huyền phù vi khuẩn (10^8 cfu/mL) (với dịch nổi vi khuẩn cũng làm tương tự) cho vào mỗi giếng của bản nhựa Biolog 12 giếng, bổ sung 500 μL (tỉ lệ 1:1) dịch chứa 100 ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 vào mỗi giếng, ủ ở 25°C trong 48 giờ, theo dõi ấu trùng J2 chết ở các mốc thời gian (24 và 48 giờ với huyền phù vi khuẩn; 4, 6 và 8 giờ với dịch nổi). Ấu trùng J2 chết được đánh giá bằng cách, cho tiếp xúc với NaOH 1M trong vòng 2 phút, nếu ấu trùng không cử động sau 2 phút tiếp xúc với NaOH 1 M được coi là

đã chết (Xiang & Lawrence, 2016). Bên cạnh đó, lượng ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 chết được đánh giá dựa theo nghiên cứu của Rajasekharan & ctv. (2018), khi cho tiếp xúc với đèn LED (450 - 490 nm) trong vòng 120 giây quan sát sự chuyển động, những ấu trùng không cử động trong vòng 120 giây chiếu đèn LED được xem như đã chết. Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Nghiệm thức đối chứng là ủ tuyến trùng trong nước cất tiệt trùng.

Tỉ lệ (%) chết ấu trùng J2 được tính bằng công thức: $D = (T/C) \times 100$ với D là tỉ lệ ấu trùng J2 chết (%); T là số lượng J2 (con) chết sau xử lý, C là số lượng J2 (con) ban đầu.

Tỉ lệ chết của J2 so với đối chứng được tính dựa trên công thức của Mahesha & ctv. (2017): $\text{TLC} (\%) = [(C - T)/C] \times 100$, Trong đó: TLC là tỉ lệ ấu trùng J2 chết so với đối chứng (%); C là số lượng J2 còn sống của nghiệm thức đối chứng (%); T là số lượng J2 còn sống của nghiệm thức xử lý.

2.7. Đánh giá ảnh hưởng của dịch huyền phù tế bào và dịch nổi vi khuẩn *Bacillus* spp. đến tỉ lệ nở trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp.

Hút 500 μL dịch chứa trứng (khoảng 100 ± 5 trứng) cho vào giếng của bản nhựa Biolog 12 giếng, thêm 500 μL (tỉ lệ 1:1) huyền phù vi khuẩn (10^8 cfu/mL) hoặc dịch nổi vi khuẩn của mỗi chủng vi khuẩn vào mỗi giếng riêng biệt, đặt ở nhiệt độ 30°C. Theo dõi tỉ lệ nở trứng ở các mốc thời gian. Các thí nghiệm được thực hiện hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, nghiệm thức đối chứng ủ trứng trong nước cất tiệt trùng. Theo dõi số lượng trứng nở sau 7 ngày và tính toán theo công thức:

Tỉ lệ nở tương đối (%) = (số trứng đã nở thành ấu trùng J2/số trứng ban đầu trong dung dịch nước) x 100

Tỉ lệ ức chế nở (%) = 100 - Tỉ lệ nở tương đối (%)

Tỉ lệ ức chế nở trứng so với đối chứng (%) được tính toán dựa trên công thức của Mahesha & ctv. (2017): $TLC1\ (%) = [(C1 - T1)/C1] \times 100$, Trong đó: TLC1 là tỉ lệ ức chế nở trứng của vi khuẩn so với đối chứng (%); C1 là số lượng trứng nở thành ấu trùng J2 của nghiệm thức đối chứng (%); T1 là số lượng trứng nở thành ấu trùng J2 của nghiệm thức xử lý.

2.8. Định danh các chủng vi khuẩn bằng phân tích trình tự vùng gen 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các đĩa chứa môi trường LB agar, các khuẩn lạc đơn được lựa chọn sau 24 giờ ở 37°C. DNA bộ gen vi khuẩn được tách chiết sử dụng kit The DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Malaysia). Khuếch đại gen 16S rRNA thông qua PCR sử dụng cặp mồi 27 F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') và 1492 R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (DeLong, 1992), đoạn gen được nhân lên có kích thước > ~1.300 bp và được giải trình tự tại Công ty 1 st Base (Malaysia). Trình tự nucleotide được tham chiếu BLAST so với cơ sở dữ liệu NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Các trình tự có độ tương đồng hơn 99% được sử dụng để căn chỉnh và phân tích phát sinh loài bằng chương trình MEGA (phiên bản 12) (Tamura & ctv., 2021). Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp phân cụm

Neighbor-Joining. Tỉ lệ các cây sao chép trong đó các đơn vị phân loại có liên quan được nhóm lại với nhau trong thử nghiệm bootstrap (1.000 lần) được hiển thị bên cạnh các nhánh.

2.9. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng Excel 2007, phần mềm phân tích thống kê Statistical Analysis Systems (SAS) và phân tích phương sai (ANOVA).

3. Kết Quả

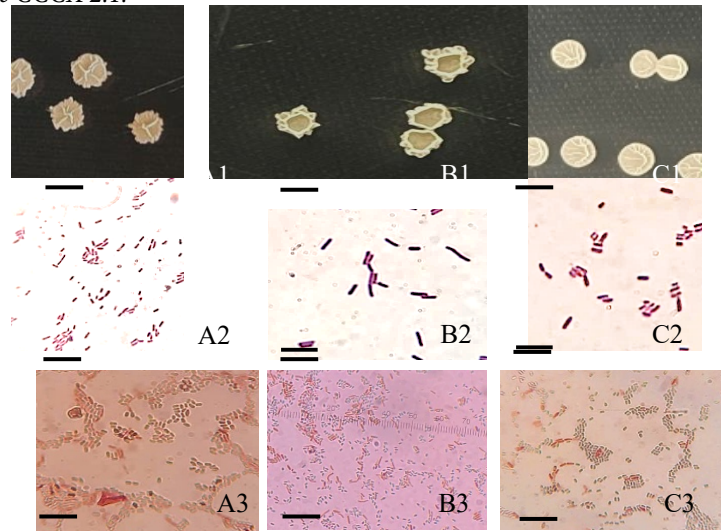
3.1. Kết quả thu thập, phân lập và xác định các đặc tính hình thái sinh hóa của vi khuẩn

Từ 50 mẫu rễ và đất vùng rễ thu thập trên cây rau ăn lá ở vùng trồng rau TP. Hồ Chí Minh (Củ Chi, Hóc Môn) và Đồng Nai (Biên Hoà, Cẩm Mỹ), đã phân lập được 20 mẫu vi khuẩn. Với các đặc điểm nhận dạng như trực khuẩn hình que, gram dương, sinh nội bào tử, di động, khuẩn lạc tròn hoặc hơi méo, có màu trắng trong đến trắng đục, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa. Hai mươi chủng vi khuẩn được xác định thuộc chi *Bacillus* dựa theo khóa phân loại vi khuẩn học của Begrey (Berkeley & ctv., 1984; Sneath & ctv., 1987). Tiếp tục thực hiện đánh giá sơ bộ khả năng chết của tuyến trùng trong dịch vi khuẩn của 20 mẫu đã phân lập, thu được 3 mẫu vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng giết chết tuyến trùng *Meloidogyne* sp. gây bệnh bướu rễ cao nhất với tỉ lệ chết trên 50%. Hình thái của 3 mẫu vi khuẩn chọn lọc ra từ các chủng *Bacillus* spp. cho những thí nghiệm tiếp theo được thể hiện trong Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái và sinh hoá của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. đã phân lập

Đặc điểm sinh hóa	BHMT 4.1	CCCX 2.2	CCCX 2.1
Gram	+	+	+
Hình dạng	Que	Que	Que
Màu sắc	Trắng vàng nhạt	Trắng kem nhạt	Trắng nhạt
Nội bào tử	có	có	có
Khả năng di động	Di động	Di động	Di động
MR test	+	+	+
VP test	+	+	+
Indol	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+
Thủy phân tinh bột	+	+	+
Thủy phân gelatin	+	-	+
Urease test	-	-	-
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
H ₂ S	-	+	-
Glucose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Sucrose	+	-	+
Loài <i>Bacillus</i>	<i>B. velezensis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. subtilis</i>

VP: Vogues-Proskauer's; MR: Methyl red; H2S: Hydrogen sulfide; (+): dương tính; (-): âm tính. BHMT 4.1: vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1; CCCX 2.2: vi khuẩn *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và CCCX 2.1: vi khuẩn *B. subtilis* CCCX 2.1.

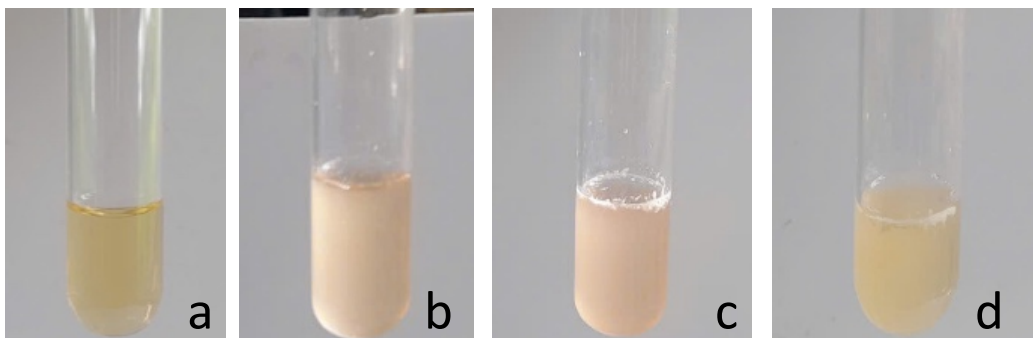


Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc (A1, B1, C1), hình dạng tế bào và kết quả nhuộm Gram (A2, B2, C2), nội bào tử (A3, B3, C3) của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. đã phân lập từ rễ và đất cây rau ăn lá. Mẫu BHMT 4.1 (A1, A2,A3), mẫu CCCX 2.2 (B1, B2, B3), mẫu CCCX 2.1 (C1, C2, C3).
Scale bar: 10 μ m.

3.2. Khảo sát khả năng sản xuất IAA của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Kết quả khảo sát định tính khả năng sản xuất IAA của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* cho thấy, 3 chủng đều có khả năng sản xuất IAA làm thay đổi màu môi trường có bổ sung 0,1% L-tryptophan khi cho thuốc thử Salkowski, tạo màu hồng nhạt (Hình 2). Trong đó, 2 chủng CCCX 2.1 và BHMT 4.1 có khả năng sản xuất IAA mạnh nhất tạo màu hồng nhạt khi phản ứng với thuốc thử Salkowski sau 5 ngày nuôi cấy. Theo Swain & ctv. (2007),

B. subtilis có khả năng sản xuất IAA. Chủng *B. amyloliquefaciens* FZB42 có các gen *dhaS*, *patB* có khả năng sinh IAA (He & ctv., 2013). Nhiều vi khuẩn *Bacillus* spp. được xác định có tiềm năng sản xuất IAA như *B. velezensis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. weihenstephanensis*, *B. cereus*, *B. toyonensis*, và *B. subtilis* (Wagi & Ahmed, 2019). Mohite (2013) khẳng định trong điều kiện nuôi cấy các nhau, các vi khuẩn *Bacillus* spp. có sự khác biệt về loài thì khả năng sản xuất IAA cũng khác nhau.



Hình 2. Kết quả định tính khả năng sản xuất IAA của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. sau 5 ngày nuôi cấy. a) Đối chứng; b) Chủng BHMT 4.1; c) Chủng CCCX 2.1; d) Chủng CCCX 2.2.

Trong 3 mẫu *Bacillus* phân lập, có 2 mẫu (CCCX 2.2 và BHMT 4.1) biểu hiện vòng phân giải rõ ràng xung quanh khuẩn lạc, cho thấy sự hòa tan phosphate trên môi trường thạch Pikovaskaya. Mẫu CCCX 2.2 có vòng phân giải trung bình 1,57 mm, mẫu BHMT4.1 đạt 2,0 mm. Chủng CCCX 2.1 không xuất hiện vòng phân giải quanh khuẩn lạc. Kết quả ghi nhận, mẫu vi khuẩn CCCX 2.2 có hiệu số phân giải cao nhất với giá trị trung bình của 3 lần lặp lại đạt khoảng $1,67 \pm 0,58$ mm.

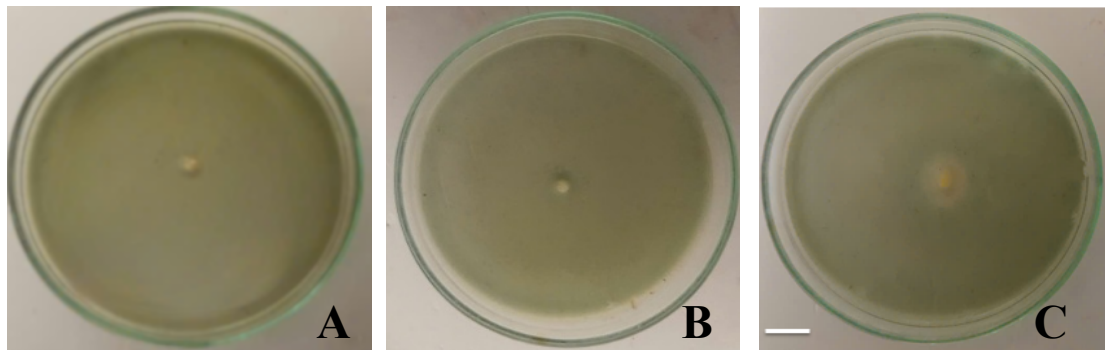
Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy, phosphate có ảnh hưởng đến tuyến trùng bấu rễ. Nghiên

cứu của Terefe & ctv. (2009), chỉ ra rằng vi khuẩn hòa tan phosphate *B. firmus* có khả năng ức chế quần thể *M. incognita* trong rễ cà chua. Nghiên cứu của El-Hadad & ctv. (2011), cho thấy khi tiêm chủng *B. megaterium* vào đất có thể ngăn chặn quần thể RKN trong đất thông qua việc điều chỉnh khả năng hòa tan phosphate và khoáng hóa. Các thí nghiệm trong điều kiện *in vitro* của Habash & Al-Banna (2011) cho kết luận, các vật liệu chứa canxi phosphonate và magie phosphonate có hiệu quả trong việc ức chế nở trứng và gây ra tỉ lệ tử vong 100% ở J2.

3.4. Khảo sát khả năng sinh siderophore của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Vi khuẩn cần sắt để phục vụ cho chức năng chuyển hóa và truyền tín hiệu, quan trọng nhất là một số đặc điểm độc lực. Siderophore là hợp chất do vi khuẩn tiết vào môi trường để thu nhận các ion sắt (Fe^{3+}) từ môi trường xung quanh (khi sống trong điều kiện thiếu sắt), do đó giúp cây trồng chống lại stress do thiếu sắt gây nên. *Bacillus* spp. đã phát triển một cơ chế để thu nhận sắt bằng cách sử dụng siderophore. *Bacillus* spp. được biết đến là có khả năng sản xuất nhiều

loại siderophore như bacillibactin, pyoverdine, pyochelin, schizokinen, petrobactin,... đóng vai trò quan trọng trong sự tồn tại của nó (Khan & ctv., 2016). Kết quả ghi nhận, sau 48 giờ nuôi cấy 3 chủng *Bacillus* spp. trên môi trường CAS agar đều có hiện tượng môi trường nuôi cấy chuyển sang màu trắng cam nhạt xung quanh khuẩn lạc (Hình 3), cho thấy các chủng có khả năng sản xuất siderophore. Tuy nhiên, chỉ có 2 chủng vi khuẩn CCCX 2.2 và BHMT 4.1 thể hiện khả năng sinh siderophore tốt nhất với hiệu số sinh siderophore có giá trị trung bình lần lượt là khoảng 6,33 và 3,33 mm.



Hình 3. Kết quả khảo sát định tính khả năng sinh siderophore của vi khuẩn *Bacillus* spp. trên môi trường CAS agar. A: CCCX 2.1; B: CCCX 2.2; C: BHMT 4.1. Scale bar = 1 cm.

3.5. Đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* spp. lên ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỉ lệ kiểm soát ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 của dịch huyền phù tế bào vi khuẩn *Bacillus* spp. dao động từ 54,67% đến 66,67% sau 48 giờ đồng nuôi cấy, trong đó, chủng BHMT 4.1 có tỉ lệ gây chết ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 cao nhất đạt 66,67%, tỉ lệ

chết của ấu trùng J2 so với đối chứng là 64,19%, tiếp theo là chủng CCCX 2.1 với tỉ lệ gây chết ấu trùng là 61,33% và tỉ lệ chết so với đối chứng đạt 58,64 % (Bảng 2). Ấu trùng J2 khi chết đuối thẳng ra, khi cho tiếp xúc với NaOH 1 M trong vòng 2 phút ấu trùng J2 hoàn toàn không cử động (Hình 4) (Xiang & Lawrence, 2016).

Bảng 2. Tác động của dịch huyền phù tế bào vi khuẩn *Bacillus* spp. đến ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp. trong 24 giờ và 48 giờ sau khi đồng nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*

Chủng vi khuẩn	24 giờ		48 giờ	
	Tỉ lệ chết của J2 (%)	Tỉ lệ chết của J2 so với ĐC (%)	Tỉ lệ chết của J2 (%)	Tỉ lệ chết của J2 so với ĐC (%)
ĐC	2,67 ^b ± 1,16	0,00 ^c	6,67 ^c ± 2,31	0,00 ^c
BHMT 4.1	38,00 ^a ± 8,00	36,35 ^a ± 7,60	66,67 ^a ± 4,62	64,19 ^a ± 5,75
CCCX 2.1	43,33 ^a ± 3,06	41,79 ^b ± 2,65	61,33 ^{ab} ± 6,11	58,64 ^{ab} ± 5,82
CCCX 2.2	39,33 ^a ± 5,77	37,64 ^a ± 6,32	54,67 ^b ± 2,31	52,05 ^b ± 6,34

Trong cùng một cột, các số liệu có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$). Số liệu trong bảng thể hiện số liệu trung bình (Mean) ± Độ lệch chuẩn (SD) từ 3 lần lặp lại. ĐC: đối chứng; BHMT 4.1: vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1; CCCX 2.2: vi khuẩn *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và CCCX 2.1: vi khuẩn *B. subtilis* CCCX 2.1.

Dịch nổi từ các chủng *Bacillus* spp. có khả năng gây chết cho ấu trùng J2 với tỉ lệ cao, đặc biệt là chủng BHMT4.1 với 90,4% sau 8 giờ (Bảng 3). *Bacillus* spp. gây chết nhanh cho J2 ở thời điểm 4 - 6 giờ, nhưng từ 6 - 8 giờ tỉ lệ chết của J2 tăng nhẹ. Điều này cho thấy, dịch nổi các chủng *Bacillus* spp. gây chết nhanh cho ấu trùng

J2 ở thời gian đầu và bền vững khi đạt ngưỡng. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố như *B. subtilis* có thể gây chết 85 - 92% ấu trùng J2 sau 8 giờ với dịch nổi. *B. velezensis* tiết surfactin gây chết 93% ấu trùng J2 sau 8 giờ (Tian & ctv., 2022).

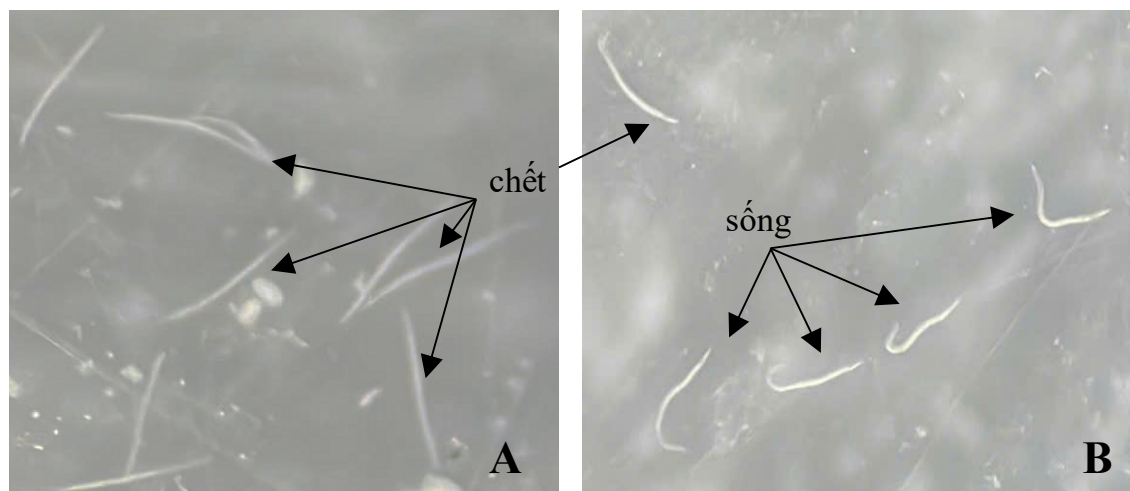
Bảng 3. Tác động của dịch nổi các chủng *Bacillus* spp. đến ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp. sau khi đồng nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*

Chủng vi khuẩn	Tỉ lệ chết (%) của J2 với dịch nổi <i>Bacillus</i> spp.		
	4 giờ	6 giờ	8 giờ
ĐC	3,73 ^c ± 0,7	8,5 ^c ± 1,0	11,6 ^c ± 1,0
BHMT 4.1	83,7 ^a ± 2,3	87,7 ^a ± 3,9	90,4 ^a ± 0,8
CCCX 2.1	65,5 ^b ± 3,0	74,5 ^b ± 1,4	84,2 ^b ± 2,0
CCCX 2.2	73,1 ^a ± 2,5	80,6 ^a ± 1,2	88,7 ^b ± 0,9

Trong cùng một cột, các số liệu có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$). Số liệu trong bảng thể hiện số liệu trung bình (Mean) ± Độ lệch chuẩn (SD) từ 3 lần lặp lại. ĐC: đối chứng; BHMT 4.1: vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1; CCCX 2.2: vi khuẩn *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và CCCX 2.1: vi khuẩn *B. subtilis* CCCX 2.1.

Nghiên cứu của nhóm tác giả Xiang & ctv. (2014) về ảnh hưởng của 19 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. lên ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 sau 48 giờ cho thấy, vi khuẩn gây chết ấu trùng J2 đạt từ 52,6 - 88,3%. Hu & ctv. (2022) công bố đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn nội sinh từ mô thực vật và phát hiện ra ba trong số chúng là *B. cereus* BCM2, *B. cereus* SZ5 và *B. altitudinis*

CCM7 thể hiện hoạt tính diệt tuyến trùng đối với *M. incognita*, với tỉ lệ gây chết cao hơn 90% trong cả ba trường hợp. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. bản địa trong nghiên cứu này có tỉ lệ kiểm soát ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp. là tương đối giống với kết quả đã được Xiang & ctv. (2014) và Hu & ctv. (2022) công bố.



Hình 4. Ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp. chết ở các nghiệm thức chụp ở vật kính 10X, (A): Nghiệm thức chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. (BHMT4.1), (B): Nghiệm thức đối chứng.

3.6. Đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn *Bacillus* spp. đến tỉ lệ nở trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch huyền phù tế bào của 3 chủng vi khuẩn khảo sát đều có ảnh hưởng đến tỉ lệ nở và ức chế nở trứng sau 5 và 7 ngày (Bảng 4). Trong đó, chủng BHMT 4.1 có tỉ

lệ ức chế nở trứng cao nhất sau 7 ngày với 44%, kế đến là chủng CCCX 2.1 với 42,67% và thấp nhất là chủng CCCX 2.2 với 33,33%. Các nghiệm thức dịch huyền phù tế bào của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. đều có tỉ lệ nở trứng của tuyến trùng rất khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch huyền phù tế bào vi khuẩn *Bacillus* spp. đến sự nở trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong điều kiện *in vitro*

Chủng vi khuẩn	5 ngày			7 ngày		
	Tỉ lệ nở trứng (%)	Tỉ lệ ức chế nở trứng (%)	Tỉ lệ ức chế nở so với ĐC (%)	Tỉ lệ nở trứng (%)	Tỉ lệ ức chế nở trứng (%)	Tỉ lệ ức chế nở so với ĐC (%)
ĐC	81,33 ^b ± 4,62	18,67 ^b ± 4,62	0,00 ^b	96,00 ^b ± 2,00	4,00 ^b ± 2,00	0,00 ^b
BHMT 4.1	47,33 ^a ± 7,02	52,67 ^a ± 7,02	41,98 ^a ± 5,88	56,00 ^a ± 9,17	44,00 ^a ± 9,17	41,69 ^a ± 9,18
CCCX 2.1	50,00 ^a ± 7,21	50,00 ^a ± 7,21	38,64 ^a ± 6,67	57,33 ^a ± 4,16	42,67 ^a ± 4,16	40,20 ^a ± 5,57
CCCX 2.2	49,33 ^a ± 12,22	50,67 ^a ± 12,22	39,77 ^a ± 12,12	66,67 ^a ± 7,57	33,33 ^a ± 7,57	30,52 ^a ± 8,26

Trong cùng một cột, các số liệu có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$). Số liệu trong bảng thể hiện số liệu trung bình (Mean) ± Độ lệch chuẩn (SD) từ 3 lần lặp lại. ĐC: đối chứng; BHMT 4.1: vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1; CCCX 2.2: vi khuẩn *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và CCCX 2.1: vi khuẩn *B. subtilis* CCCX 2.1.

Kết quả thí nghiệm về sự tác động của dịch nổi vi khuẩn *Bacillus* spp. cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn đều ức chế sự nở trứng mạnh (từ 40 - 70%) sau 72 giờ đồng nuôi cấy. Trong đó, chủng BHMT4.1 có tỉ lệ nở trứng từ 32,8 - 54% sau 72

giờ (Bảng 5). Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Basyony & Abo-Zaid (2018), khi sử dụng dịch nổi *Bacillus* B10 và B8 để kiểm soát tuyến trùng *M. incognita* cho tỉ lệ nở trứng đạt 44,7 và 46,3%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch nổi vi khuẩn *Bacillus* spp. đến sự nở trứng tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong điều kiện *in vitro*

Chủng vi khuẩn	Tỉ lệ nở trứng (%) của J2 với dịch nổi <i>Bacillus</i> spp.		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
ĐC	66 ^a ± 5,0	83,8 ^a ± 6,0	97,5 ^a ± 1,2
BHMT 4.1	30,6 ^b ± 3,0	36,4 ^b ± 2,9	44,3 ^b ± 7,0
CCCX 2.1	32,8 ^b ± 5,8	42,5 ^b ± 3,5	54,0 ^b ± 2,5
CCCX 2.2	37,5 ^b ± 3,8	41,4 ^b ± 5,8	45,7 ^b ± 3,5

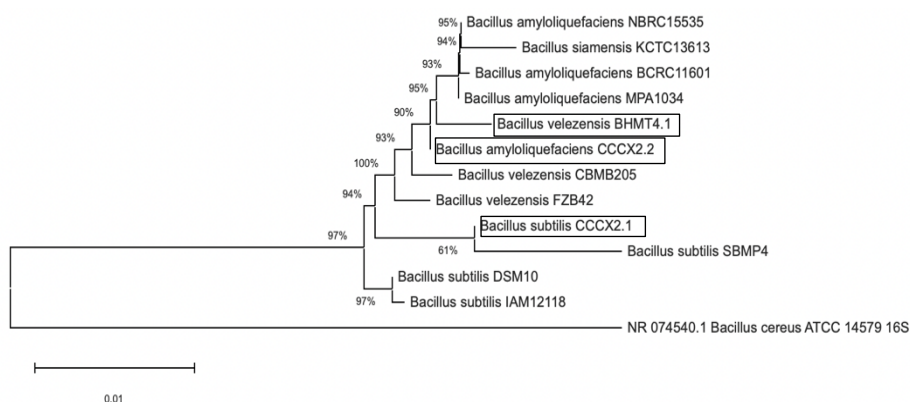
Trong cùng một cột, các số liệu có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$). Số liệu trong bảng thể hiện số liệu trung bình (Mean) ± Độ lệch chuẩn (SD) từ 3 lần lặp lại. ĐC: đối chứng; BHMT 4.1: vi khuẩn *Bacillus velezensis* BHMT 4.1; CCCX 2.2: vi khuẩn *B. amylolifequacien* CCCX 2.2 và CCCX 2.1: vi khuẩn *B. subtilis* CCCX 2.1.

Puttawong và ctv. (2024) cho biết, dịch huyền phù và dịch nổi *B. subtilis* làm tỉ lệ nở trứng *M. incognita* chỉ còn 44 - 57% tùy chủng và nồng độ, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy chủng CCCX2.2 có tỉ lệ nở trứng của tuyến trùng phù hợp với nghiên cứu trên. Một nghiên cứu khác cho thấy chủng *B. velezensis* Bv-25 cho tỉ lệ ức chế nở trứng lên đến 95 - 98% (Tian và ctv., 2022). Trong nghiên cứu này chủng BHMT4.1 cho khả năng kiểm soát nở trứng 44%, thấp hơn so với nghiên cứu của Tian & ctv. (2022). Một số *Bacillus* spp. khác từ nho, dưa leo, cà tím cũng làm giảm 42 - 84% số lượng J2 và giảm số nốt sần/rễ (El-Nagdi & Abd-El-Khair, 2019). Điều này cho thấy, mỗi loài vi khuẩn khác nhau sẽ có hoạt tính enzyme, có các gen phản ứng phòng vệ là khác nhau nên khả năng tác động lên tuyến trùng cũng sẽ khác nhau.

3.7. Định danh các chủng vi khuẩn bằng phân tích trình tự vùng gen 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn được định danh phân tử bằng cách giải trình tự 16S rRNA. Cây phát sinh loài cho thấy sự phân tách rõ rệt giữa nhóm

B. subtilis, *B. amyloliquefaciens* và *B. velezensis* (Hình 4). Chủng CCCX2.2 tương đồng với chủng *B. amyloliquefaciens* BCRC11601 và NBRC15535 với bootstrap 93 và 95%. Chủng BHMT4.1 có độ tương đồng cao với chủng *B. velezensis* FZB42 (99,36%) với bootstrap 93% và *B. velezensis* CBMB205 với bootstrap 90%. Dựa trên vị trí phân nhánh và mối quan hệ gần giữa các chủng, cho thấy mẫu BHMT4.1 thuộc loài *B. velezensis* với độ tương đồng cao trên vùng 16S rRNA. Mặt khác, BHMT4.1 nằm cùng nhánh với một số chủng *B. amyloliquefaciens* cho thấy, trình tự 16S rRNA giữa 2 loài này rất giống nhau, kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước là chúng được xem là cùng một loài trong lịch sử phân loại (Dunlap & ctv., 2016). Để làm rõ hơn sự khác biệt giữa các chủng *B. amyloliquefaciens* và *B. velezensis* cần giải trình tự thêm vùng gen *ropB* và *gyrB*. Chủng *B. subtilis* CCCX2.1 tương đồng cao với chủng *B. subtilis* DSM10 và IAM12118 với bootstrap 97%. Chủng *B. cereus* ATCC 14579 được sử dụng để làm nhóm ngoài cho thấy sự tách biệt với nhóm các chủng *Bacillus* đã phân lập được.



Hình 4. Cây phát sinh loài của các loài *Bacillus* dựa trên trình tự gen 16S rRNA được xây dựng bằng phương pháp neighbor-joining sử dụng phần mềm MEGA 12.0. Các giá trị bootstrap được hiển thị tại các điểm nhánh. *Bacillus cereus* (ANR 074540.1) được sử dụng làm nhóm ngoài.

4. Thảo Luận

Bacillus spp. là một trong những chi vi khuẩn phổ biến và ứng dụng nhiều nhất trong kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. (Engelbrecht & ctv., 2022). *Bacillus* spp. gây tử vong ấu trùng *Meloidogyne* spp. nhờ vào khả năng sản xuất các hoạt chất sinh học có vai trò quan trọng trong sự phát triển của cây trồng cũng như trong quá trình kiểm soát tuyến trùng. Các hợp chất có hoạt tính sinh học hoặc các chất chuyển hóa thứ cấp có thể gây độc cho tuyến trùng và do đó giết chết tuyến trùng (Mendoza & ctv., 2008). Bên cạnh đó, sự hiện diện của vi khuẩn gây nhiều tác động khác nhau lên trứng tuyến trùng như hoại tử, kết tụ và hình thành màng sinh học giữ trứng và ấu trùng nở ra; ngoài ra, có bằng chứng về kích thước trứng nhỏ hơn, chất lượng trứng kém và chậm phát triển vì không quan sát thấy giai đoạn nào gần với thời điểm nở, do đó trứng có thể đang tạo ra trạng thái ngủ đông tùy ý do sự hiện diện của vi khuẩn (Jiménez-Aguirre & ctv., 2023). Một số vi sinh vật đối kháng như *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. tạo màng sinh học giải phóng các enzyme chitinase, protease... phá vỡ vỏ trứng tuyến trùng, màng bọc trứng tuyến trùng ngăn trứng nở ra. Do đó, giúp khống chế mật số tuyến trùng trong tự nhiên (Basyony & Abo-Zaid, 2018). Lipopeptide vòng của surfactin và iturin do *B. subtilis* tạo ra có khả năng ức chế sự nở trứng của *M. incognita* và đóng vai trò quan trọng trong việc tăng tỉ lệ tử vong của ấu trùng (Kavitha và ctv., 2012).

Tác dụng đối kháng của các chủng *Bacillus* khác nhau trên trứng *Meloidogyne* spp. từng được trình bày trong nghiên cứu của Lee & Kim (2015). Các tác giả này đã báo cáo tác dụng kiểm

soát sinh học đối với *Meloidogyne* spp. của các chủng *Bacillus* spp. bản địa như gây hại cho cấu trúc bên ngoài của ấu trùng và vỏ trứng. Trong nghiên cứu này, 3 chủng vi khuẩn *B. velezensis* BHMT 4.1, *B. amyloliquefaciens* CCCX 2.2 và *B. subtilis* CCCX 2.1 đã được phân lập từ vùng đất và rễ trồng rau ăn lá có khả năng sản xuất IAA, hòa tan phosphate và sản xuất siderophore. Tuy nhiên, nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở khảo sát khả năng định tính, nên cần có thêm nghiên cứu để định lượng hoạt tính IAA, khả năng hòa tan phosphate và hàm lượng siderophore của các chủng vi khuẩn *Bacillus*. Bên cạnh đó, ghi nhận về khả năng kiểm soát trứng và ấu trùng *Meloidogyne* spp. J2 trong điều kiện *in vitro* đã cho thấy các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. rất có tiềm năng trong kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. Việc áp dụng những chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa này lên cây trồng trong nhà lưới và ở điều kiện đồng ruộng là điều kiện cần thiết cần phải thực hiện trước khi ứng dụng chúng trong điều kiện sản xuất thực địa.

5. Kết Luận

Đã phân lập và định danh bằng hình thái, sinh hóa và giải trình tự vùng gen 16S RNA được 3 chủng *Bacillus* phân lập từ vùng rau ăn lá bao gồm *B. velezensis* BHMT 4.1, *B. amyloliquefaciens* CCCX 2.2 và *B. subtilis* CCCX 2.1. Cả 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh IAA, hòa tan phosphate và sản sinh siderophore. Hơn nữa, 3 chủng đều có khả năng gây chết đối với ấu trùng J2 và kiểm soát sự nở trứng của tuyến trùng. Trong đó, chủng *B. velezensis* BHMT 4.1 có khả năng gây chết ấu trùng J2 *Meloidogyne* spp. với tỉ lệ cao nhất 66,67% sau 48 giờ và kiểm soát tỉ lệ ức chế nở trứng tuyến trùng đạt 44% sau 7 ngày.

Kết quả cho thấy, 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa đã phân lập rất có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây hại trên cây rau.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn giữa các tác giả. Kết quả này chưa từng công bố trên các tạp chí khoa học khác.

Lời Cảm Ơn

Tác giả xin cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài với mã số BO2025-NLS-05.

Tài liệu tham khảo (References)

- Askary, T. H. (2015). Limitation, research needs, and future prospects. In Askary, T. H., & Martinelli, P. R. P. (Eds.), *Biocontrol agents of phytonematodes* (446-454). Wallingford, UK: CAB International.
- Basyony, A. G., & Abo-Zaid, G. A. (2018). Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using an eco-friendly formulation from *Bacillus subtilis*, lab. and greenhouse studies. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28, 87. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0094-4>.
- Bell N. L. & Watson R. N. (2001). Optimising the whitehead and hemming tray method to extract plant parasitic and other nematodes from two soil under pasture. *Nematology* 3(2), 179-185.
- Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., Shute, L. A., & Capey, A. G. (1984). Identification of *Bacillus* species. In Bergan, T. (Ed.), *Methods in microbiology* (291-328). Florida, USA: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70397-0](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70397-0).
- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2), 535-538. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>.
- Burgess, L. W., Knight, T. E., Tesoriero, L., & Hien, T. P. (2009). *Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam*. Canberra, Australia: Australian Center for International Agricultural Research.
- Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K. S., Van Santen, E., & Kloepper, J. W. (2008). Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control* 47(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.008>.
- Castillo, J. D., Lawrence, K. S., & Kloepper, J. W. (2013). Biocontrol of the reniform nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on cotton. *Plant Disease* 97(7), 967-976. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0978-RE>.
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 89(12), 5685-5689. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5685>.
- 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* and *Bacillus oryzicola* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(3), 1212-1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>.
- El-Hadad, M. E., Mustafa, M. I., Selim, S. M., El-Tayeb, T. S., Mahgoob, A. E. A., & Aziz, N. H. A. (2011). The nematicidal effect of some bacterial biofertilizers on *Meloidogyne incognita* in sandy soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(1), 105-113. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100014>.
- El-Nagdi, W. M. A., & Abd-El-Khair, H. (2019). Application of *Bacillus* species for controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita*

- in eggplant. *Bulletin of The National Research Centre* 43, 154. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0187-6>.
- Engelbrecht, G., Claassens, S., Mienie, C. M., & Fourie, H. (2022). Filtrates of mixed *Bacillus* spp. inhibit second-stage juvenile motility of root-knot nematodes. *Rhizosphere* 22, 100528. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100528>.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2), 793-796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>.
- Godinez-Vidal, D., Edwards, M. S., & Groen, C. S. (2024). Root-knot nematode egg extraction. *Protocols.io*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.eq2lyj5nqlx9/v1>.
- Habash, S., & Al-Banna, L. (2011). Phosphonate fertilizers suppressed root knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. *Journal of Nematology* 43(2), 95-100.
- He, P., Hao, K., Blom, J., Rückert, C., Vater, J., Mao, Z., Wu, Y., Hou, M., He, P., He, Y., & Borriss, R. (2013). Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subspecies plantarum B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *Journal of Biotechnology* 164(2), 281-291. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.12.014>.
- Hooper, D. J., Hallmann, J., & Subbotin, S. A. (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In Luc, M., Sikora, R. A., & Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (2nd ed., 53-86). Retrieved February 15, 2025, from <https://doi.org/10.1079/9780851997278.0053>.
- Hunt, D., & Handoo, Z. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (Eds.), *Root-knot nematodes* (55-88). London, UK: CAB International.
- Hu, Y., You, J., Wang, Y., Long, Y., Wang, S., Pan, F., & Yu, Z. (2022). Biocontrol efficacy of *Bacillus velezensis* strain YS-AT-DS1 against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Frontiers in Microbiology* 22(13), 1035748. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1035748>.
- Jiménez-Aguirre, M. A., Hurtado, P. B. E., Gonzalez-Cardona, C., Ceballos, N., Cardona-Agudelo, D. L., & Montoya-Estrada, N. C. (2023). Antagonist effect of native bacteria of the genus *Bacillus* on the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in tomato germplasm. *Chilean Journal of Agricultural Research* 83(5), 565-578. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392023000500565>.
- Jones, T. J., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9), 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.
- Kavitha, P. G., Jonathan, E. I., & Nakkeeran, S. (2012). Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 40(2), 203-206.
- Keren-Zur, M., Antonov, J., Bercovitz, A., Feldman, K., Husid, A., Kenan, G., Markov, N., & Rebhun, M. (2000). *Bacillus firmus* formulations for the safe control of root-knot nematodes. In *Proceedings of The Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases* (47-52). Brighton, UK: British Crop Protection Council.
- Khan, A., Doshi, H. V., & Thakur, M. C. (2016). *Bacillus* spp.: A prolific siderophore producer. In Arora, A. M., & Mehnaz, S. (Eds.), *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol* (1st ed., 309-323). Retrieved February

- 15, 2026, from https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11), 1259-1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>.
- Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2015). Antagonistic potential of *Bacillus pumilus* L1 against root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Phytopathology* 164(1), 29-39. <https://doi.org/10.1111/jph.12421>.
- Liu, Z., Budiharjo, A., Wang, P., Shi, H., Fang, J., Borriss, R., Zhang, K., & Huang X. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(23), 1081-1090. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5247-5>.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education* 12(1), 51-53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>.
- Mahesha, H. S., Ravichandra, N. G., Rao, M. S., Narasegowda, N. C., Sonyal, S., & Hotkar, S. (2017). Bio-efficacy of different strains of *Bacillus* spp. against *Meloidogyne incognita* under *in vitro*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11), 2511-2517. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.295>.
- Mai, W. F. (1985). Plant-parasitic nematodes: their threat to agriculture. In Sasser, J. N., & Carter, C. C. (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne, Volume 1: Biology and control* (11-17). Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Mendoza, A., Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2008). *In vitro* activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology* 18(4), 377-389. <https://doi.org/10.1080/09583150801952143>.
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites*. In Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (Eds), *Root-knot nematodes* (1-17). Wallingford, UK: CAB International.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13(3):638-649. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>.
- Ornat, C., & Sorribas, F. J. (2008). Integrated management of root-knot nematodes in Mediterranean horticultural crops. In Ciancio A., & Mukerji, K. G. (Eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes* (295-320). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Pérez, A. L., Escuer, M., Diez-Rojo, M. A., & Robertson, L. (2011). Host range of *Meloidogyne arenaria* (neal, 1889) chitwood, 1949 (nematoda: *Meloidogynidae*) in Spain. *Nematopica* 41(1), 130-140.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17, 362-370.
- Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria. In Gnanamanickam, S. S. (Ed.), *Plant-associated bacteria* (195-230). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Puttawong, K., Beesa, N., Kasem, S., Jindapunnapat, K., Chinnesri, B., & Sasnarukkit, A. (2024). Potential of *Bacillus* spp. against root-knot nematode, *Meloidogyne enterolobii* parasitizing chili (*Capsicum annuum* L.). *Crop Protection*

- 184, 106780. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106780>.
- Rajasekharan, S. K., Raorane, C. J., & Lee, J. (2018). LED based real-time survival bioassays for nematode research. *Scientific Reports* 8(1), 11531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30016-5>.
- Sasser, J. N. (1980). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64, 36-41. <https://doi.org/10.1094/PD-64-36>.
- Sasser, J. N., & Carter, C. C. (1985). Overview of international Meloidogyne Project 1975-1984. In Sasser, J. N., & Carter, C. C. (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne, Volume 1: Biology and control* (19-25). North Carolina, USA: State University Graphics.
- Sikora, R. A., & Fernandez, E. (2005). Nematode parasites of vegetables. In Luc, M., Sikora, R. A., & Bridge, J. (Eds.), *Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (319-392). Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1987). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume 2. Retrieved February 10, 2025, from <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19872040344>.
- Swain, R. M., Naskar, K. S., & Ray, C. R. (2007). Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Polish Journal of Microbiology* 56(2), 103-110.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA12: Molecular evolutionary genetics analysis version 12. *Molecular Biology Evolution* 38(7), 3022-3027.
- Terefe, M., Tefera, T., & Sakhuja, P. K. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology* 100(2), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.004>.
- Tian, X., Zhao, X., Zhao, S., Zhao, J., & Mao, Z. (2022). The biocontrol functions of *Bacillus velezensis* strain Bv-25 against *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Microbiology* 9, 843041. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.843041>.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ* 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>.
- Wang, X., & Liang, G. (2014). Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt *Ralstonia solanacearum*. *BioMed Research International* 2014, 465435. <https://doi.org/10.1155/2014/465435>.
- Xiang, N., & Lawrence, K. S. (2016). Optimization of *in vitro* techniques for distinguishing between live and dead second stage juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. *PLoS One* 11(5), e0154818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154818>.
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., & Mcinroy, J. A. (2014). *In vitro* screening of biological control agents on *Meloidogyne incognita*. In *Proceedings of The 2014 Beltwide Cotton Conference* (258-260). Louisiana, USA: National Cotton Council of America. Retrieved February 11, 2025, from <http://www.cotton.org/beltwide/proceedings>.