

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN XUÂN HIẾU

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

Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

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

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

Phản biện 1:

.....
.....
.....
.....

Phản biện 2:

.....
.....
.....
.....

Phản biện 3:

.....
.....
.....
.....

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

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

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

DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

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

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

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

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

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

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

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

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

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

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

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Tuyển chọn các chủng vi sinh vật (VSV) bản địa sinh enzyme ngoại bào (chitinase, β -1,3- glucanase) đối kháng mạnh với nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc. Đánh giá hiệu quả đối kháng trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*, làm rõ cơ chế tác động, làm cơ sở khoa học đề xuất giải pháp phòng trừ sinh học an toàn, hiệu quả.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Nội dung 1: Phân lập, giám định chủng nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc.

- Nội dung 2: Tuyển chọn các chủng VSV bản địa đối kháng nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh.

- Nội dung 3: Xác định hoạt lực nhóm enzyme ngoại bào đối kháng *Aspergillus* sp.

- Nội dung 4: Đánh giá khả năng ức chế nấm *Aspergillus* sp. gây bệnh của các VSV tuyển chọn trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

4. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Các chủng *Aspergillus* sp. gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên lạc tại Quảng Trị và Huế.

- Các chủng VSV bản địa đối kháng cao và sinh enzyme (chitinase, β -1,3- glucanase) mạnh từ đất trồng lạc Quảng Trị và Huế.

- Giống Lạc L14 của địa phương.

5. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

5.1. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 12/2021 đến tháng 6/2025.

5.2. Địa điểm nghiên cứu

Thu mẫu bệnh và đất; thí nghiệm đồng ruộng tại vùng trồng lạc Quảng Trị, Huế; phân lập, tuyển chọn VSV, nghiên cứu enzyme, thử nghiệm *in vitro*, nhà lưới tại Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế; chụp ảnh SEM tại Phòng thí nghiệm Khoa học Vật liệu, Trường Đại học Sư phạm Đà Nẵng.

6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Luận án đã xác định *Aspergillus niger* là tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc tại Quảng Trị và Huế; tuyển chọn, định danh ba chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137) bản địa đối kháng mạnh, sinh enzyme ngoại bào cao và làm rõ cơ chế đối kháng thông qua enzyme β -1,3-glucanase. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu enzyme hoạt tính cao, bước đầu đánh giá hiệu quả hỗn hợp ba chủng *Bacillus* (chế phẩm BAZ04) trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

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

7.1. Ý nghĩa khoa học

Luận án xác định tác nhân gây bệnh héo rũ gốc mốc đen trên cây lạc, tuyển chọn các chủng *Bacillus* bản địa đối kháng mạnh và làm rõ cơ chế đối kháng thông qua enzyme β -1,3-glucanase.

7.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng chế phẩm BAZ04 phòng trừ sinh học an toàn, hiệu quả và bền vững trong sản xuất lạc.

Chương 1

TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

Lạc là cây trồng kinh tế quan trọng ở duyên hải miền Trung Việt Nam nhưng đang bị hạn chế năng suất do bệnh héo rũ gốc mốc đen, chủ yếu do nấm *Aspergillus niger* – loài nấm đất khó phòng trừ vì tồn tại lâu dài và xâm nhiễm qua rễ. Các biện pháp hóa học hiện nay tiềm ẩn rủi ro môi trường và kháng thuốc, do đó kiểm soát sinh học được xem là hướng tiếp cận bền vững. Trong đó, vi sinh vật đối kháng như *Bacillus*, *Trichoderma* có khả năng ức chế nấm bệnh thông qua enzyme ngoại bào, đặc biệt là β -1,3-glucanase phân giải thành tế bào nấm. Tuy nhiên, các nghiên cứu gắn với điều kiện sinh thái địa phương tại Quảng Trị và Huế còn hạn chế, vì vậy việc tuyển chọn vi sinh vật đối kháng bản địa và làm rõ vai trò của enzyme β -1,3-glucanase là cần thiết và có ý nghĩa khoa học, thực tiễn.

Chương 2

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- **Phân lập, tuyển chọn VSV:** Phân lập, giám định *Aspergillus* sp. gây bệnh và tuyển chọn VSV đối kháng bản địa bằng phương pháp đồng nuôi cấy và khuếch tán trên đĩa thạch; định danh dựa trên trình tự ITS (nấm) và 16S rRNA (vi khuẩn).

- **Nghiên cứu enzyme và cơ chế đối kháng:** Xác định hoạt lực β -1,3-glucanase, điều kiện nuôi cấy; đánh giá cơ chế đối kháng (MIC–MFC, giảm sinh khối, SEM).

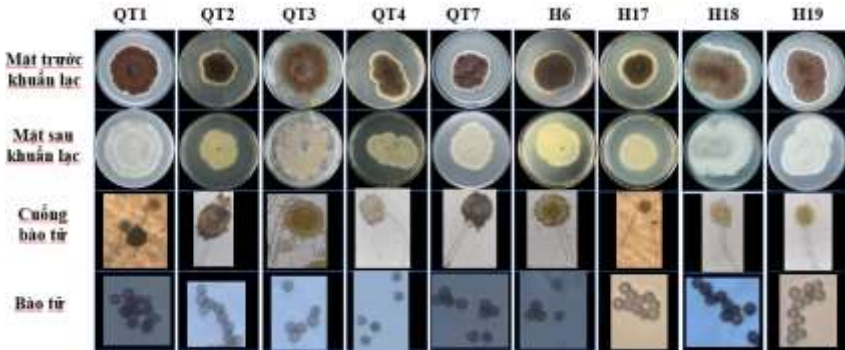
- **Đánh giá hiệu quả và an toàn sinh học:** Đánh giá hiệu quả ức chế nấm (*in vitro*, *in vivo*, nhà lưới) và an toàn sinh học (tan huyết, nhạy cảm kháng sinh, ảnh hưởng đến động vật đất), khả năng sinh IAA của các chủng tuyển chọn.

Chương 3

NỘI DUNG, KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và định danh nấm bệnh

Định danh bằng hình thái: Đã lựa chọn 9 chủng nấm bệnh đặc trưng vùng bệnh để nghiên cứu chuyên sâu (Hình 3.2).

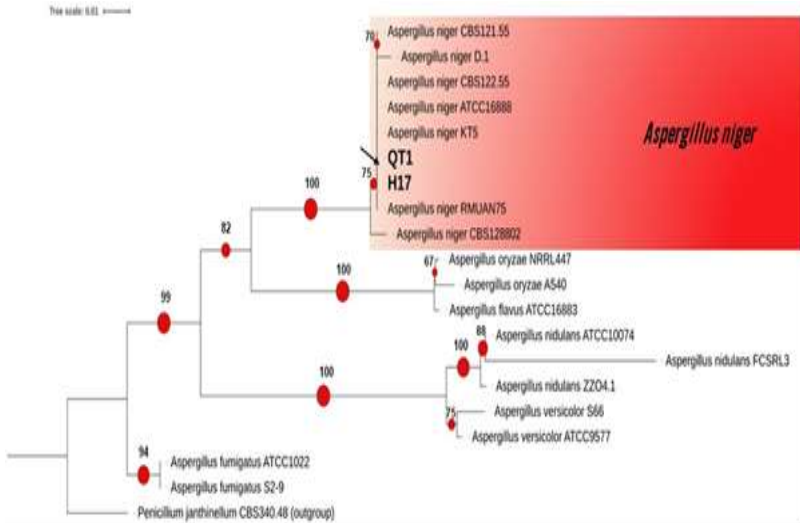


Hình 3.2. Đặc điểm hình thái của các mẫu nấm gây bệnh héo rũ gốc mắc đen hại lạc nuôi cấy trên môi trường PDA

Kiểm tra theo quy tắc Koch và tuyển chủng độc tính mạnh:

Cả 9 chủng nấm đều gây bệnh (100%), xuất hiện triệu chứng sau 3–6 ngày; tỷ lệ cây chết đạt 85,7–100%, trong đó QT1 và H17 gây chết cao nhất với sai khác có ý nghĩa thống kê.

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



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

3.2. Phân lập, tuyển chọn chủng VSV đối kháng nấm *A. niger*

3.2.1. Phân lập và sàng lọc sơ bộ chủng đối kháng

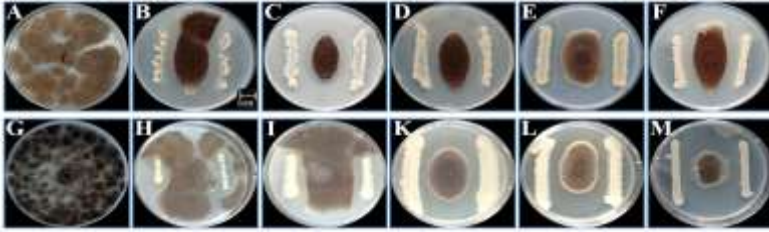
Từ 12 mẫu đất trồng lạc tại Quảng Trị và Huế, phân lập được 144 chủng VSV đối kháng với *A. niger* QT1 và H17; trong đó chọn 16 chủng tiềm năng để đánh giá đối kháng *in vitro* (Bảng 3.5; Hình 3.6).

Bảng 3.5. Tỷ lệ ức chế của các chủng VSV đối kháng với nấm bệnh QT1 và H17 sau 6 ngày nuôi cấy

STT	Chủng phân lập	Tỷ lệ ức chế (%)	
		QT1	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

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

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



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

3.2.2. Tuyển chọn các chủng VSV đối kháng sinh enzyme ngoại bào mạnh

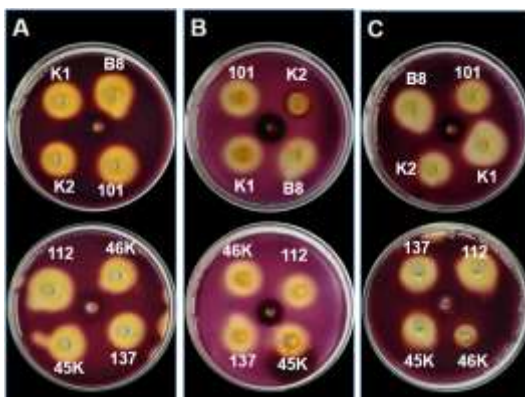
Tiếp tục sàng lọc hoạt tính enzyme các chủng đối kháng mạnh qua đường kính vùng thủy phân trên thạch đĩa, thu được 11 kết quả trình bày Bảng 3.6 và Hình 3.9.

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

TT	Chủng VSV	Đường kính vùng thủy phân (mm)		
		1,3- β -glucanase	Chitinase	Cellulase
1	H1	18,50 $\pm$ 0,20 ^d	20,47 $\pm$ 0,15 ^c	17,70 $\pm$ 0,62 ^d
2	K1	24,97 $\pm$ 0,15 ^{ab}	25,83 $\pm$ 0,15 ^a	25,47 $\pm$ 0,06 ^a
3	K2	22,77 $\pm$ 0,25 ^{bc}	23,30 $\pm$ 0,20 ^b	24,03 $\pm$ 0,15 ^{ab}
4	B8	26,17 $\pm$ 0,42 ^a	26,10 $\pm$ 0,10 ^a	25,77 $\pm$ 0,25 ^a
5	45K	20,07 $\pm$ 0,31 ^{cd}	19,37 $\pm$ 0,15 ^{cd}	18,73 $\pm$ 0,21 ^{cd}
6	46K	22,23 $\pm$ 0,38 ^{bc}	22,93 $\pm$ 0,21 ^{bc}	22,97 $\pm$ 0,15 ^b
7	101	23,20 $\pm$ 0,36 ^b	22,53 $\pm$ 0,06 ^{bc}	21,23 $\pm$ 0,31 ^{bc}

TT	Chủng VSV	Đường kính vùng thủy phân (mm)		
		1,3- β -glucanase	Chitinase	Cellulase
8	112	23,93 $\pm$ 0,31 ^b	22,87 $\pm$ 0,23 ^{bc}	21,90 $\pm$ 0,79 ^{bc}
9	118	21,03 $\pm$ 0,15 ^c	18,17 $\pm$ 0,15 ^d	20,10 $\pm$ 0,10 ^c
10	137	21,03 $\pm$ 0,15 ^c	20,47 $\pm$ 0,06 ^c	20,67 $\pm$ 0,31 ^c
11	HL6	18,30 $\pm$ 0,18 ^d	18,45 $\pm$ 0,15 ^d	17,68 $\pm$ 0,20 ^d

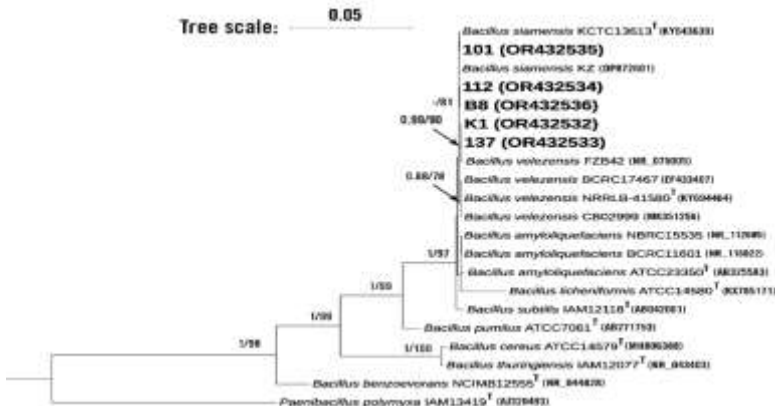
Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ Độ lệch chuẩn



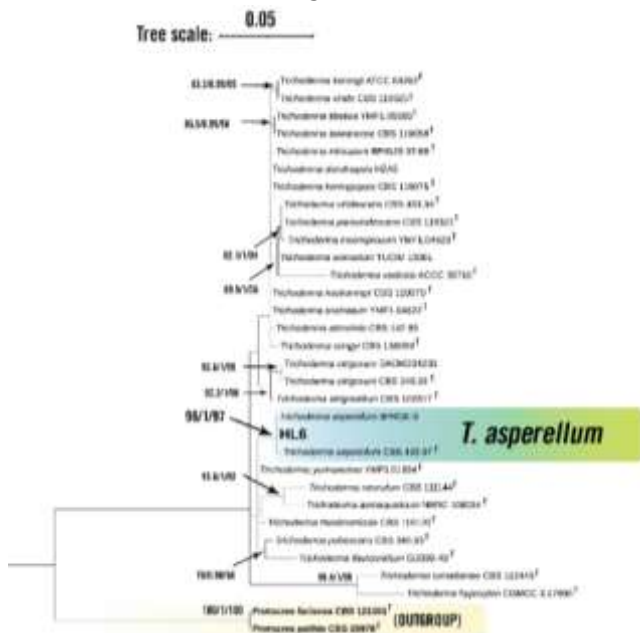
Hình 3.9. Hoạt tính enzyme β -1,3-glucanase (A), chitinase (B) và Cellulase (C) của một số chủng vi sinh vật phân lập

3.2.3. Định danh các chủng vi sinh vật đối kháng

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



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



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

3.2.4. Sàng lọc các chủng vi sinh vật đối kháng an toàn đối với sự nảy mầm của hạt lạc

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

3.2.5. Sàng lọc khả năng đối kháng nấm *A. niger* trong điều kiện nhà lưới

Xét trung bình trên cả hai chủng nấm bệnh QT1 và H17, các chủng *Bacillus* 101 và 112 đạt hiệu quả cao nhất (86,67%), tiếp theo là *Bacillus* 137 (83,33%), *Trichoderma* HL6, *Bacillus* B8 và K1 cho hiệu quả thấp hơn 80%.

3.2.6. Đánh giá tính tương thích giữa các chủng vi khuẩn đối kháng



Hình 3.14. Kiểm tra khả năng đối kháng giữa 3 chủng *Bacillus* được lựa chọn trên môi trường LBA sau 48 nuôi cấy

3.2.7. Nghiên cứu vai trò và cơ chế đối kháng của enzyme β -1,3-glucanase đối với *A. niger* trong điều kiện *in vitro*

3.2.7.1. Đánh giá khả năng ức chế *A. niger* trên môi trường đặc

Bảng 3.12. Thử nghiệm đối kháng với nấm bệnh *A. niger* của dịch nuôi cấy thô đã loại bỏ tế bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

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

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

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

Bảng 3.13. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và giá trị nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của các chủng trên đĩa vi giếng 96

Nguồn enzyme	Kiểm soát nấm bệnh <i>A. niger</i> QT1			Kiểm soát nấm bệnh <i>A. niger</i> H17		
	MIC MFC MFC/MIC			MIC MFC MFC/MIC		
	MIC	MFC	MFC/MIC	MIC	MFC	MFC/MIC
<i>B. siamensis</i> 101	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
<i>B. siamensis</i> 112	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
<i>B. velezensis</i> 137	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
Hỗn hợp 3 vi khuẩn	0,1	0,2	2	0,2	0,4	2

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

3.2.7.3. Đánh giá khả năng ức chế *A. niger* trên môi trường lỏng

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

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của enzyme β -1,3-glucanase đến sinh khối (khô) của *A. niger* QT1

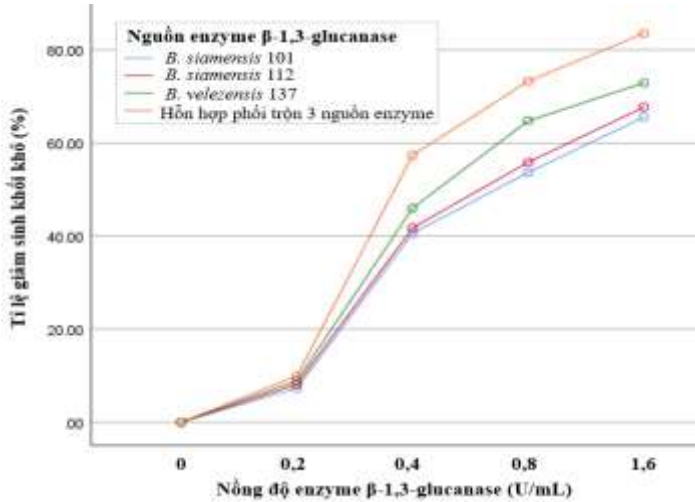
Nguồn enzyme β -1,3-glucanase	Nồng độ enzyme β -1,3-glucanase (U/mL)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
<i>B. siamensis</i> 101	3,92 $\pm$ 0,12 ^e	3,63 $\pm$ 0,11 ^{dC}	2,32 $\pm$ 0,22 ^{cC}	1,81 $\pm$ 0,11 ^{bC}	1,35 $\pm$ 0,07 ^{aC}
<i>B. siamensis</i> 112	3,92 $\pm$ 0,12 ^e	3,60 $\pm$ 0,10 ^{dC}	2,28 $\pm$ 0,18 ^{cC}	1,73 $\pm$ 0,08 ^{bC}	1,26 $\pm$ 0,14 ^{aC}
<i>B. velezensis</i> 137	3,92 $\pm$ 0,12 ^e	3,57 $\pm$ 0,18 ^{dB}	2,11 $\pm$ 0,04 ^{cB}	1,38 $\pm$ 0,06 ^{bB}	1,06 $\pm$ 0,04 ^{aB}
Hỗn hợp phối trộn 3 nguồn enzyme	3,92$\pm$0,12^e	3,53$\pm$0,12^{dA}	1,67$\pm$0,15^{cA}	1,05$\pm$0,04^{bA}	0,64$\pm$0,07^{aA}
Phân tích ANOVA (p-value)					
Nguồn enzyme (Nhân tố 1)				p < 0,001	
Nồng độ enzyme (Nhân tố 2)				p < 0,001	
Tương tác (nguồn enzyme x nồng độ enzyme)				p < 0,001	

Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) chỉ sự sai khác giữa các nồng độ enzyme có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). Các chữ cái khác nhau (A, B, C...) chỉ sự sai khác giữa nguồn enzyme có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation).

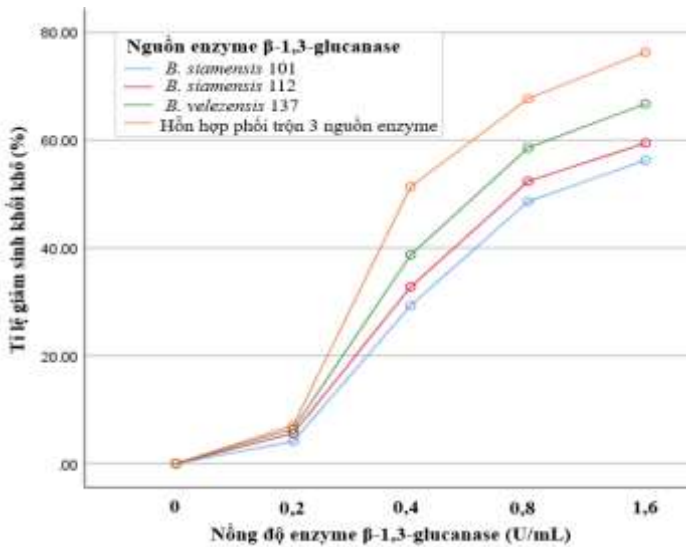
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của enzyme β -1,3-glucanase đến sinh khối (khô) của *A. niger* H17

Nguồn enzyme β -1,3-glucanase	Nồng độ enzyme β -1,3-glucanase (U/mL)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
<i>B. siamensis</i> 101	3,19 $\pm$ 0,20 ^{eC}	3,06 $\pm$ 0,16 ^{dC}	2,25 $\pm$ 0,13 ^{cC}	1,63 $\pm$ 0,11 ^{bC}	1,39 $\pm$ 0,08 ^{aC}
<i>B. siamensis</i> 112	3,19 $\pm$ 0,20 ^{eBC}	3,01 $\pm$ 0,20 ^{dB}	2,13 $\pm$ 0,22 ^{cBC}	1,52 $\pm$ 0,12 ^{bBC}	1,29 $\pm$ 0,10 ^{aBC}
<i>B. velezensis</i> 137	3,19 $\pm$ 0,20 ^{eB}	2,99 $\pm$ 0,13 ^{dB}	1,94 $\pm$ 0,51 ^{cB}	1,32 $\pm$ 0,10 ^{bB}	1,06 $\pm$ 0,16 ^{aB}
Hỗn hợp phối trộn 3 nguồn enzyme	3,19$\pm$0,20^{eA}	2,97$\pm$0,23^{dA}	1,54$\pm$0,19^{cA}	1,03$\pm$0,02^{bA}	0,75$\pm$0,10^{aA}
Phân tích ANOVA (p-value)					
Nguồn enzyme (Yếu tố 1)				p < 0,001	
Nồng độ enzyme (Yếu tố 2)				p < 0,001	
Tương tác (nguồn enzyme x nồng độ enzyme)				p = 0,085	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) chỉ sự sai khác giữa các nồng độ enzyme có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). Các chữ cái khác nhau (A, B, C...) chỉ sự sai khác giữa nguồn enzyme có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation).



Hình 3.18. Đồ thị tỉ lệ % giảm sinh khối (khô) của nấm bệnh *A. niger* QTI dưới ảnh hưởng của enzyme β -1,3-glucanase



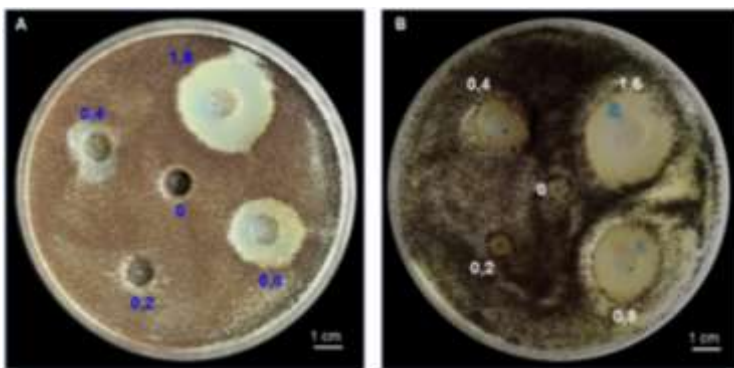
Hình 3.19. Đồ thị tỉ lệ % giảm sinh khối (khô) của nấm bệnh *A. niger* H17 dưới ảnh hưởng của enzyme β -1,3-glucanase

3.2.7.4. Mối tương quan giữa hoạt độ enzyme β -1,3-glucanase và hiệu quả đối kháng nấm *A. niger*

Bảng 3.16. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm bệnh *A. niger* của hỗn hợp enzyme β -1,3-glucanase tinh sạch của các chủng vi khuẩn ở các nồng độ khác nhau bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

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

Ghi chú: ND (Not determined): không xác định



Hình 3.20. Thử nghiệm khả năng ức chế của hỗn hợp enzyme β -1,3-glucanase từ các chủng *Bacillus* phân lập đến chủng nấm *A. niger* QT1 (A) và *A. niger* H17 (B)

3.2.7.5. Đánh giá tác động của enzyme β -1,3-glucanase đến thành tế bào nấm *A. niger*

Quan sát ảnh SEM, mẫu đối chứng có bào tử và sợi nấm hình thái bình thường, trong khi xử lý bằng enzyme β -1,3-glucanase gây biến dạng và nứt vỡ thành tế bào sợi nấm, đồng thời ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của bào tử trên môi trường PDA.

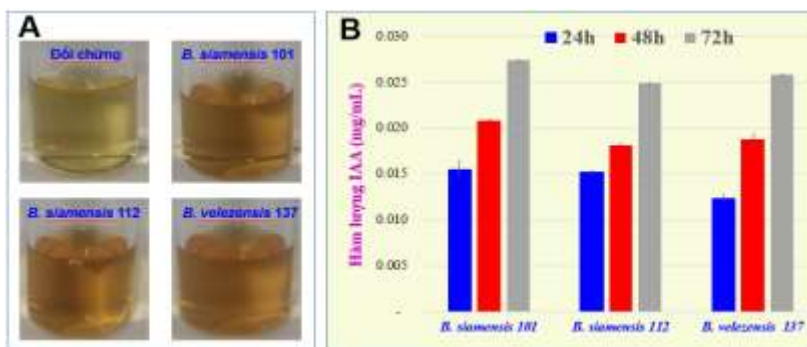
3.2.8. Đánh giá an toàn sinh học và khả năng trợ sinh của các vi khuẩn *Bacillus* tuyển chọn

Khả năng làm tan tế bào máu: Kết quả, cả 3 chủng vi khuẩn *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều không để lại biểu hiện hoạt tính làm tan máu trên đĩa thạch.

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

Ảnh hưởng đến động vật đất: Các chủng *Bacillus* tuyển chọn (đơn lẻ và phối hợp, 10^7 – 10^9 CFU/mL) không gây độc cấp tính đối với *Eisenia fetida*; tỷ lệ chết và giảm sinh khối ở mức cho phép theo ISO 11268-1:1993 và không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p > 0,05$).

Khả năng sinh IAA: Ba chủng *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 đều sinh tổng hợp IAA, với hàm lượng tăng theo thời gian nuôi cấy và đạt cực đại sau 72 giờ (0,025–0,027 mg/mL), không khác biệt đáng kể giữa các chủng, cho thấy tiềm năng thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Hình 3.24).

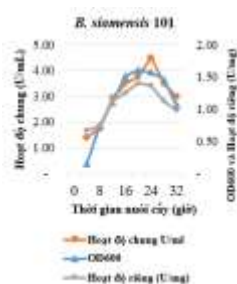


Hình 3.24. Định tính khả năng sinh Indole-3-acetic acid (IAA) của các chủng *Bacillus* được tuyển chọn (A), xác định hàm lượng IAA (B)

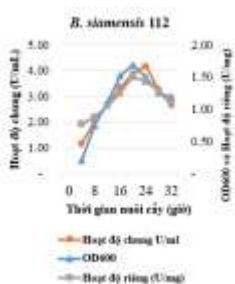
3.3. Nghiên cứu hoạt lực và các yếu tố ảnh hưởng đến enzyme β -1,3-glucanase của các chủng vi sinh vật đối kháng nấm *A. niger*

3.3.1. Đường cong tích lũy enzyme β -1,3-glucanase

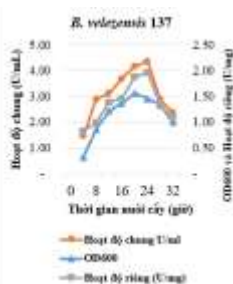
Thời điểm thích hợp thu enzyme là 20–24 giờ cho cả ba chủng *Bacillus*: *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, và *B. velezensis* 137 (Hình 3.25, 3.26 và 3.27).



Hình 3.25. Đường cong tích lũy enzyme β -1,3-glucanase chủng *B. siamensis* 101



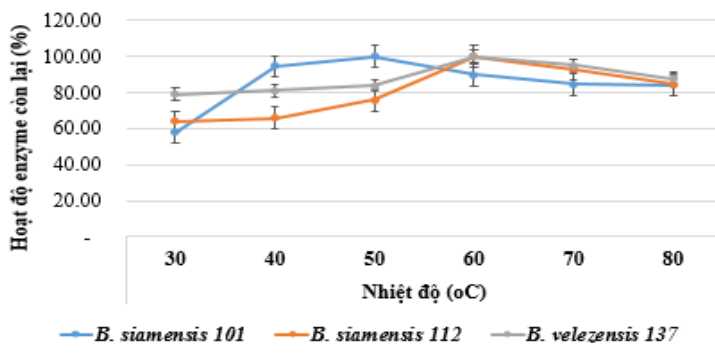
Hình 3.26. Đường cong tích lũy enzyme β -1,3-glucanase chủng *B. siamensis* 112



Hình 3.27. Đường cong tích lũy enzyme β -1,3-glucanase chủng *B. velezensis* 137

3.3.2. Khảo sát ảnh hưởng các yếu tố đến hoạt độ của enzyme β -1,3-glucanase

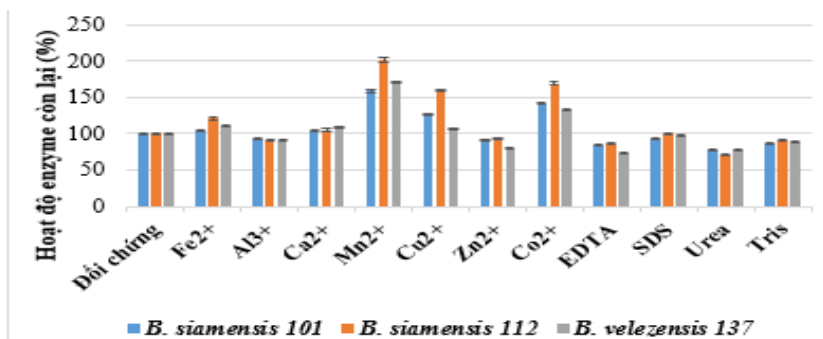
Ảnh hưởng của nhiệt độ: Hoạt tính enzyme β -1,3-glucanase của ba chủng *Bacillus* đạt cực đại khoảng 50–60°C; *B. siamensis* 101 tối ưu ở 50°C, còn *B. siamensis* 112 và *B. velezensis* 137 tối ưu ở 60°C (Hình 3.28).



Hình 3.28. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ enzyme của các chủng vi khuẩn

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

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



Hình 3.30. Ảnh hưởng ion kim loại và các chất hóa học đến hoạt độ enzyme β -1,3-glucanase của chủng vi khuẩn

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

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

Ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy: Môi trường LB là lựa chọn tốt cho nuôi cấy các chủng *Bacillus*.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung: Dịch chiết nấm men được xác định là nguồn nitơ tối ưu.

Ảnh hưởng của tỉ lệ cấy giống: Tỉ lệ cấy giống 7% cho kết quả tốt nhất (Bảng 3.23).

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của tỷ lệ cấy giống đến khả năng sinh trưởng và tích lũy enzyme β -1,3-glucanase của các chủng *Bacillus*

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

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation). Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô ; 1 % (w/v) cao nấm men, 30 °C, pH 7,0, 150 rpm, 24 giờ.

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy: Thời gian 24 giờ cho hoạt độ, sinh khối tốt nhất đối cho 3 chủng *Bacillus* (Bảng 3.24).

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

Thời gian (giờ)	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)
0	0,19 $\pm$ 0,10 ^c	0,00002$\pm$0,3^a	2,60 $\pm$ 0,13 ^b	0,00002$\pm$0,51^a	0,58 $\pm$ 0,33 ^c	0,000015$\pm$0,50^a

	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
Thời gian (giờ)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)
24	5,15±0,40 ^a	7,52±0,51 ^a	4,40±0,21 ^a	8,94 ±0,90 ^a	4,41±0,51 ^a	8,44±0,53 ^a
36	3,66±0,52 ^b	6,34±0,53 ^a	3,92±0,24 ^b	7,72 ±0,91 ^a	3,90±0,14 ^a	7,34±0,81 ^a
48	1,63±0,53 ^c	3,62±1,14 ^a	1,96±0,41 ^c	4,22 ±0,54 ^a	2,08±0,93 ^b	3,82 ±1,14 ^a

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation). Điều kiện nuôi cấy: 1 % (w/v) bột ngô; 1 % (w/v) cao nấm men, tỉ lệ cấy giống 7 %, 30 °C, pH 7,0, 150 rpm.

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy: Nhiệt độ 30°C cho hoạt độ, sinh khối tốt nhất đối với 3 chủng *Bacillus* (Bảng 3.25).

	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
t°C	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ CFU/mL)	Hoạt độ enzyme (U/mL)	Sinh khối ($\times 10^9$ 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±0,73	0,50±0,21 ^b
30	5,24 ± 0,44 ^a	7,42±0,23 ^a	4,49± 0,11 ^a	9,11±0,52 ^a	4,52±0,54 ^a	8,24±0,41 ^a
35	3,9±0,42 ^b	7,02±0,60 ^a	3,66±0,32 ^a	8,82±0,43 ^a	3,52±0,52 ^a	8,52±0,54 ^a
37	2,91±0,60 ^b	7,04±0,51 ^a	2,79±0,44 ^a	8,14±0,31 ^a	2,59±0,40 ^b	7,91±0,72 ^a

Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy: pH 7,0 cho hoạt độ, sinh khối tốt nhất đối cho 3 chủng *Bacillus* (Bảng 3.26).

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

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

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

Ảnh hưởng của tốc độ lắc: Tốc độ lắc 150 rpm, cho hoạt độ, sinh khối tốt nhất đối với 3 chủng *Bacillus*.

Môi trường nuôi cấy thu enzyme β -1,3-glucanase: LB lỏng; nguồn N bổ sung là nấm men; Tỷ lệ cấy giống: 7%; Thời gian nuôi cấy: 24 giờ; Nhiệt độ nuôi cấy: 30-35° C; pH môi trường nuôi cấy là 7,0; Tốc độ lắc: 150rpm.

3.4. Đánh giá khả năng đối kháng nấm *A. niger* của các chủng *Bacillus* trong điều kiện *in vivo*

3.4.1. Hiệu lực ức chế nấm bệnh *A. niger* trong điều kiện nhà lưới

Sau nhiễm nấm, công thức đối chứng ghi nhận tỷ lệ cây chết tăng mạnh (60% sau 7 ngày và 100% sau 14–21 ngày), trong khi

cây lạc xử lý hỗn hợp dịch nuôi cấy của 3 vi khuẩn (ký hiệu là BAZ04) không xuất hiện bệnh và duy trì tỷ lệ chết 0% trong suốt thí nghiệm (Hình 3.31).



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

3.4.2. Hiệu quả sinh học của hỗn hợp *Bacillus* (BAZ04) trên đồng ruộng

Ảnh hưởng của hỗn hợp *Bacillus* đến một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển cây lạc: làm tăng chiều cao thân chính và tổng số cành của giống lạc L14 trong các giai đoạn sinh trưởng tại Huế và Quảng Trị.

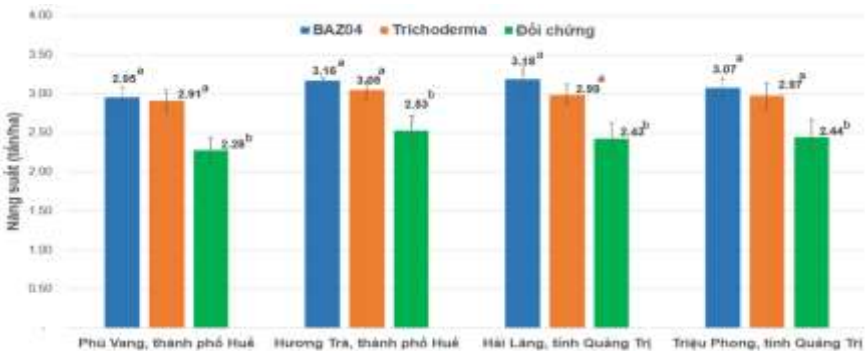
Ảnh hưởng của hỗn hợp *Bacillus* đến bệnh héo rũ gốc mốc đen: làm giảm rõ rệt bệnh héo rũ gốc mốc đen trên giống lạc L14 tại các vùng thí nghiệm ở Huế và Quảng Trị (Bảng 3.32).

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi 3 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 Lãng, tỉnh Quảng Trị	Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị
Hỗn hợp dịch nuôi 3 chủng <i>Bacillus</i> (CT1)	3,57 ± 0,33 ^a	1,16 ± 0,06 ^a	1,38 ± 0,11 ^a	2,11 ± 0,20 ^a
<i>Trichoderma</i> (CT2)	4,08 ± 0,31 ^a	1,75 ± 0,11 ^a	1,78 ± 0,14 ^a	2,21 ± 0,28 ^a
Đôi chứng (CT3)	10,71 ± 1,05 ^b	6,57 ± 0,62 ^b	4,13 ± 0,35 ^b	8,16 ± 0,69 ^b
LSD _{0,05}	2,61	3,05	1,07	2,13

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

Ảnh hưởng của hỗn hợp dịch nuôi cấy 3 vi đến năng suất lạc và các yếu tố cấu thành năng suất: cải thiện đồng bộ các yếu tố cấu thành năng suất và làm tăng năng suất thực thu của lạc L14 trong sản xuất lạc ở các vùng thử nghiệm tại Huế và Quảng Trị (Hình 3.32).



Hình 3.32. Năng suất lạc trên các địa điểm thử nghiệm ở Hương Trà, Phú Vang, Triệu Phong và Nam Hải Lãng. 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). $M \pm SD$: Trung bình mẫu (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (Standard deviation).

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 bệnh từ cây lạc bị bệnh HRGMĐ trồng ở Quảng Trị và Huế. Kiểm tra theo quy tắc Koch và thử nghiệm độc tính trên 09 chủng tuyển chọn cho tỷ lệ chết cây từ 85,7 - 100%. Kết quả giám định hình thái và phân tử (ITS) 02 chủng đại diện gây chết 100% (QT1, H17) xác định tác nhân gây bệnh là loài *Aspergillus niger*.

2. Tuyển chọn được 03 chủng vi khuẩn (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112; *B. velezensis* 137) và 01 chủng nấm (*T. asperellum* HL6) bản địa đối kháng mạnh với *A. niger*. Ba chủng *Bacillus* được lựa chọn biểu hiện hoạt tính enzyme ngoại bào cao (chitinase, β -1,3-glucanase, cellulase), sinh IAA và đảm bảo an toàn sinh học: không tan máu, không độc với giun đất (10^9 CFU/mL), miễn cảm với 06 loại kháng sinh (tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, levofloxacin, gentamicin và streptomycin) và không ảnh hưởng đến nảy mầm hạt lạc.

3. Trong khảo sát đơn yếu tố, enzyme 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, 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 enzyme β -1,3-glucanase: LB lỏng (bổ sung 1% bột ngô, 1% cao nấm men), pH 7,0, 30 – 35 °C, 150 rpm, tỉ lệ cấy giống 7%, nuôi 24 giờ. Phối trộn enzyme theo tỉ lệ 1:1:1 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* qua quan sát SEM.

4. Hỗn hợp dịch nuôi cấy 3 chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112; *B. velezensis* 137) tỷ lệ 1 : 1 : 1 theo thể tích ở nồng độ 10^8 CFU/mL giúp ức chế *A. niger* hiệu quả hơn đơn lẻ trong điều kiện *in vitro* và nhà lưới. Hỗn hợp duy trì tỷ lệ cây chết do HRGMĐ thấp (1,16 - 3,56%), tương đương *Trichoderma* thương mại và tăng năng suất lạc từ 20,5 - 22,7% so với đối chứng.

Kiến nghị

Triển khai khảo nghiệm đồng ruộng đối với hỗn hợp phối trộn dịch nuôi cấy 3 chủng *Bacillus* (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112; *B. velezensis* 137) nhằm hoàn thiện quy trình sản xuất, hướng tới thương mại hóa sản phẩm và mở rộng ứng dụng trên các đối tượng cây trồng khác tại miền Trung./.

HUE UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY
---o0o---

NGUYEN XUAN HIEU

**STUDY ON THE BIOLOGICAL ANTAGONISM
AGAINST *ASPERGILLUS* sp. CAUSING COLLAR ROT
DISEASE ON GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGAEA*)
IN QUANG TRI PROVINCE AND HUE CITY**

**Major: Biology
Code: 9420101**

DOCTORAL THESIS IN BIOLOGY

HUE, 2026

The project was completed at: Institute of Biotechnology,
Hue University

Scientific Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nguyễn Thị Thu
Thủy

Reviewer 1:

.....
.....
.....

Reviewer 2:

.....
.....
.....

Reviewer 3:

.....
.....
.....

The thesis will be defended at the Hue University Thesis
Evaluation Council, meeting at Hue University, at
.....

Thesis can be found at the following libraries:

1. National Library of Vietnam.
2. Hue University Learning Resource Center.
3. Library of Institute of Biotechnology, Hue University.

LIST OF PUBLISHED WORKS

[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.

<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.

<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.

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

[4]. **Nguyen Xuan Hieu**, Nguyen Duc Huy, Ton Duc Hong, Nguyen Tien Long, Thai Thi Huyen, Nguyen Thi Thu Thuy (2024). **Evaluation of *Trichoderma asperellum* HL6 against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut**. Hue University Journal of Science: *Agriculture and Rural Development*, 133(3C), 41-55.

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

INTRODUCTION

1. RATIONALE AND SIGNIFICANCE OF THE STUDY

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an important upland crop in central Vietnam, contributing to sandy soil improvement and farmers' livelihoods. However, its productivity is severely constrained by collar rot caused by *Aspergillus niger*, leading to serious yield losses and potential food safety risks due to ochratoxin A production. Current disease control relies mainly on chemical fungicides, which cause environmental pollution and resistance. Therefore, the study entitled **“Biological antagonism against *Aspergillus* sp. causing collar rot of peanut in Quảng Trị and Huế City”** aims to develop safe and effective biological control solutions to support sustainable peanut production.

2. RESEARCH OBJECTIVES

To screen and select indigenous microbial strains producing extracellular enzymes (chitinase and β -1,3-glucanase) with strong antagonistic activity against *Aspergillus* sp. causing peanut collar rot; to evaluate their antagonistic efficacy under in vitro and in vivo conditions; and to elucidate the underlying mechanisms as a scientific basis for proposing safe and effective biological control strategies.

3. RESEARCH CONTENTS

Content 1: Isolation and identification of *Aspergillus* sp. causing peanut collar rot (black mold).

Content 2: Screening and selection of indigenous microbial strains antagonistic to pathogenic *Aspergillus* sp.

Content 3: Determination of the activity of extracellular enzymes antagonistic to *Aspergillus* sp.

Content 4: Evaluation of the inhibitory effects of selected microbial strains against pathogenic *Aspergillus* sp. under in vitro and in vivo conditions.

4. RESEARCH SUBJECTS

- *Aspergillus* sp. strains causing peanut collar rot in Quảng Trị and Huế.
- Indigenous antagonistic microbial strains with strong production of extracellular enzymes (chitinase and β -1,3-glucanase) isolated from peanut-cultivated soils in Quảng Trị and Huế.
- The local peanut cultivar L14.

5. SCOPE OF THE STUDY

5.1. Study period: From December 2021 to June 2025.

5.2. Study locations: Disease and soil sampling and field experiments were conducted in peanut-growing areas of Quảng Trị and Huế; laboratory and net-house experiments at Hue University; SEM analysis at the University of Science and Education – The University of Danang.

6. NOVEL CONTRIBUTIONS OF THE DISSERTATION

The study identified *Aspergillus niger* as the causal agent of peanut collar rot in Quảng Trị and Huế and selected three indigenous *Bacillus* strains (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, and *B. velezensis* 137) with strong antagonistic activity. The β -1,3-glucanase-mediated antagonistic mechanism was clarified, culture conditions were optimized for high enzyme activity, and the efficacy of the mixed formulation BAZ04 was preliminarily evaluated under in vitro and in vivo conditions.

7. SCIENTIFIC AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF THE DISSERTATION

7.1. Scientific significance

The dissertation identified the causal agent of peanut collar rot, selected indigenous *Bacillus* strains with strong antagonistic activity, and elucidated the antagonistic mechanism mediated by β -1,3-glucanase.

7.2. Practical significance

The results demonstrate the potential application of the BAZ04 formulation as a safe, effective, and sustainable biological control solution for peanut production.

Chapter 1

OVERVIEW OF THE RESEARCH PROBLEM

Peanut production in central Vietnam is severely constrained by collar rot caused by the soil-borne fungus *Aspergillus niger*. As chemical control poses environmental and resistance risks, biological control using antagonistic microorganisms such as *Bacillus* and *Trichoderma*, particularly through β -1,3-glucanase activity, represents a sustainable alternative. However, studies under local ecological conditions in Quảng Trị and Huế remain limited, highlighting the need to select indigenous antagonistic microorganisms and clarify the role of β -1,3-glucanase.

Chapter 2

RESEARCH METHODS

Isolation and screening of microorganisms: Pathogenic *Aspergillus* sp. were isolated and identified, and indigenous antagonistic microorganisms were screened by dual-culture and agar diffusion assays, with molecular identification based on ITS (fungi) and 16S rRNA (bacteria) gene sequences.

Enzyme characterization and antagonistic mechanisms: β -1,3-glucanase activity and optimal conditions were determined, and antagonistic mechanisms were evaluated through minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) assays, fungal biomass reduction, and scanning electron microscopy (SEM).

Efficacy and biosafety evaluation: Antifungal efficacy was evaluated under in vitro, in vivo, and net-house conditions, while biosafety was assessed based on hemolytic activity, antibiotic susceptibility, effects on soil organisms, and indole-3-acetic acid (IAA) production.

Chapter 3

RESEARCH CONTENTS AND RESULTS

3.1. Isolation and identification of the pathogenic fungus

Nine representative pathogenic fungal strains from diseased areas were selected for detailed morphological analysis (Figure 3.2).

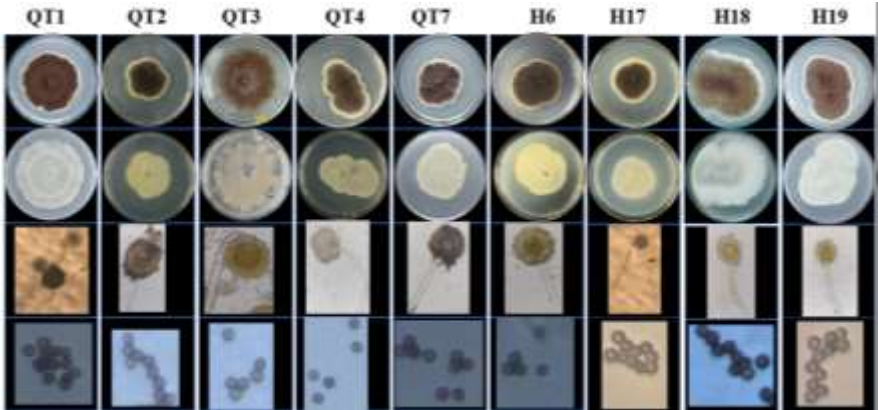


Figure 3.2. Morphological characteristics of fungal isolates causing peanut collar rot (black mold) cultured on PDA medium

Pathogenicity test based on Koch's postulates: All nine fungal strains were pathogenic, causing symptoms within 3–6 days, with plant mortality ranging from 85.7% to 100%; strains QT1 and H17 showed the highest and statistically significant mortality.

Molecular identification: were identified by morphological characteristics and ITS1–ITS4 sequence analysis, showing 100% similarity to *Aspergillus niger*, thereby confirming the pathogenic strains as *A. niger* (Figure 3.5).

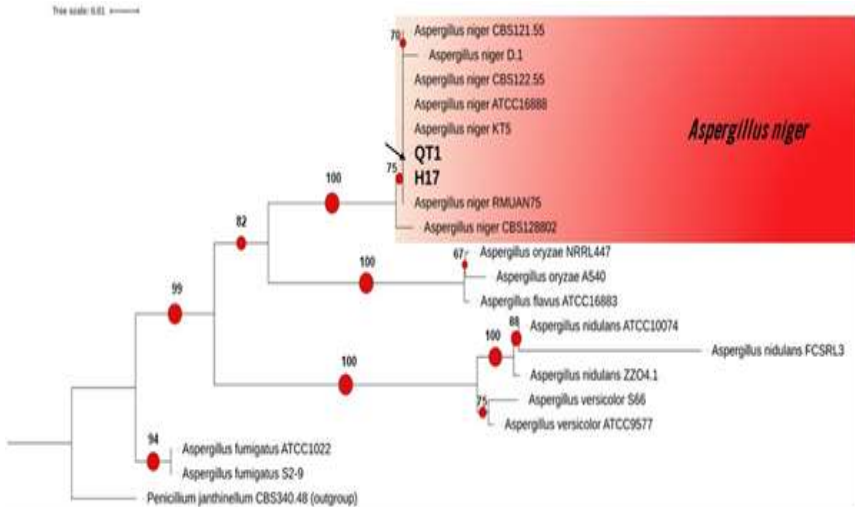


Figure 3.5. Phylogenetic tree of *A. niger* strains QT1 and H17

3.2. Isolation and screening of antagonistic microorganisms against *A. niger*

3.2.1. Isolation and primary screening of antagonistic strains

From 12 soil samples collected from peanut fields in Quảng Trị and Huế, 144 microbial strains antagonistic to *A. niger* QT1 and H17 were isolated. Among these, 16 potential strains were selected for in vitro antagonistic evaluation (Table 3.5; Figure 3.6).

Table 3.5. Inhibition rates of microbial strains antagonistic to pathogenic fungi QT1 and H17 after 6 days of incubation

No.	Isolated strain	Inhibition rate (%)	
		QT1	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

No.	Isolated strain	Inhibition rate (%)	
		QT1	H17
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

Different letters within the same column indicate statistically significant differences among means at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: mean $\pm$ standard deviation.

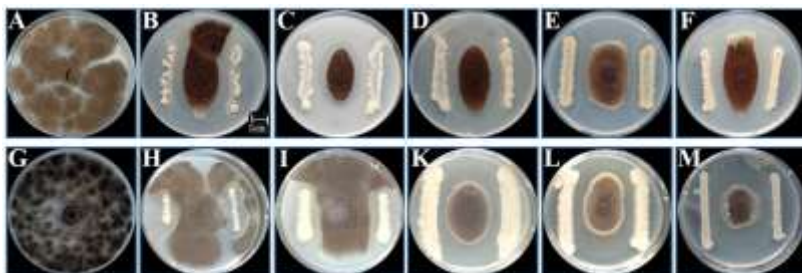


Figure 3.6. Antagonistic activity of bacterial strains against the pathogenic fungus on PDA after 6 days (QT1: A–F; H17: G–M; strains B8, K1, 101, 112, and 137).

3.2.2. Selection of antagonistic microorganisms with strong extracellular enzyme activity

Further screening based on hydrolysis zone diameters identified 11 strongly antagonistic strains with notable extracellular enzyme activity (Table 3.6; Figure 3.9).

Table 3.6. Extracellular enzyme production capacity of strongly antagonistic microbial strains (mm)

No.	Microbial strain	Hydrolysis zone diameter (mm)		
		1,3- β -glucanase	Chitinase	Cellulase
1	H1	$18,50 \pm 0,20^d$	$20,47 \pm 0,15^c$	$17,70 \pm 0,62^d$
2	K1	$24,97 \pm 0,15^{ab}$	$25,83 \pm 0,15^a$	$25,47 \pm 0,06^a$
3	K2	$22,77 \pm 0,25^{bc}$	$23,30 \pm 0,20^b$	$24,03 \pm 0,15^{ab}$
4	B8	$26,17 \pm 0,42^a$	$26,10 \pm 0,10^a$	$25,77 \pm 0,25^a$
5	45K	$20,07 \pm 0,31^{cd}$	$19,37 \pm 0,15^{cd}$	$18,73 \pm 0,21^{cd}$
6	46K	$22,23 \pm 0,38^{bc}$	$22,93 \pm 0,21^{bc}$	$22,97 \pm 0,15^b$
7	101	$23,20 \pm 0,36^b$	$22,53 \pm 0,06^{bc}$	$21,23 \pm 0,31^{bc}$

No.	Microbial strain	Hydrolysis zone diameter (mm)		
		1,3- β -glucanase	Chitinase	Cellulase
8	112	23,93 $\pm$ 0,31 ^b	22,87 $\pm$ 0,23 ^{bc}	21,90 $\pm$ 0,79 ^{bc}
9	118	21,03 $\pm$ 0,15 ^c	18,17 $\pm$ 0,15 ^d	20,10 $\pm$ 0,10 ^c
10	137	21,03 $\pm$ 0,15 ^c	20,47 $\pm$ 0,06 ^c	20,67 $\pm$ 0,31 ^c
11	HL6	18,30 $\pm$ 0,18 ^d	18,45 $\pm$ 0,15 ^d	17,68 $\pm$ 0,20 ^d

Different letters within the same column indicate statistically significant differences among means at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: mean $\pm$ standard deviation.

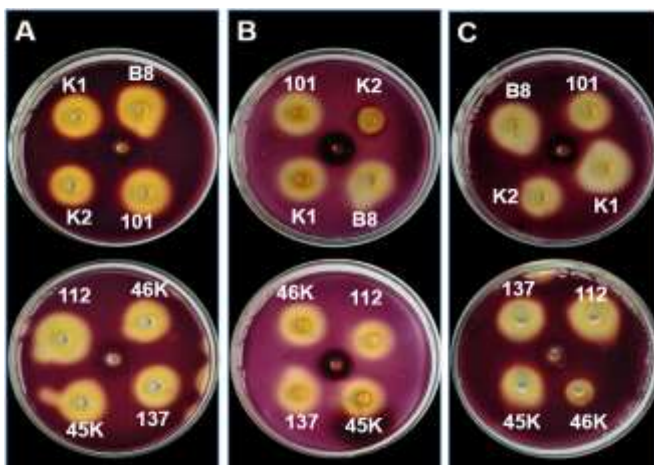


Figure 3.9. Enzymatic activities of β -1,3-glucanase (A), chitinase (B), and cellulase (C) of selected isolated microbial strains

3.2.3. Identification of antagonistic Microorganisms

Six strongly antagonistic isolates with high extracellular enzyme activity were identified by morphological and molecular analyses, including five *Bacillus* strains (*B. siamensis* B8, *B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, *B. velezensis* K1, and *B. velezensis* 137) and one fungal isolate identified as *Trichoderma asperellum* (Figures 3.11 and 3.13).

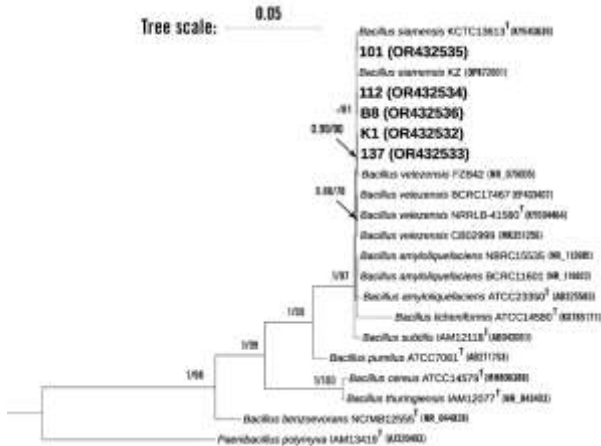


Figure 3.11. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of isolates B8, K1, 101, 112, and 137 and reference strains, with *Paenibacillus polymyxa* used as the outgroup.

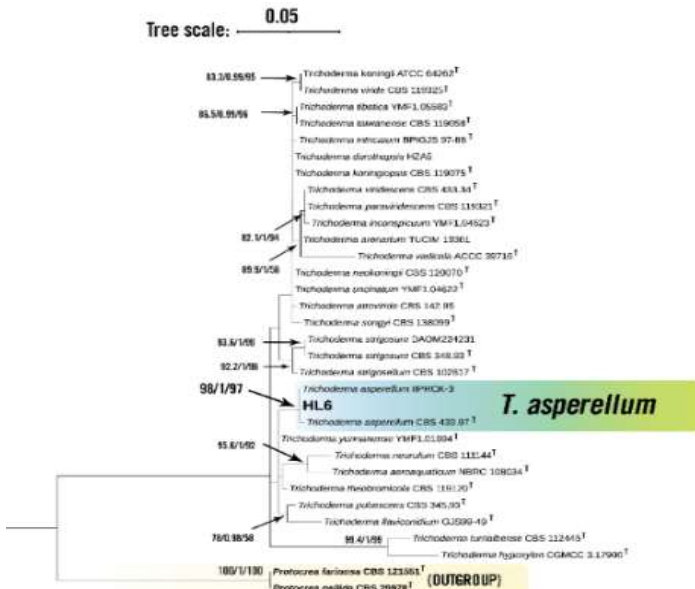


Figure 3.13. Phylogenetic tree based on ITS sequences of the fungal isolate HL6.

3.2.4 Screening antagonistic microorganisms safe for peanut germination

Peanut seeds (L14) treated with 6 selected microbial strains showed high germination rates (98.33–99.67%), comparable to the control with no statistically significant difference.

3.2.5. Screening for antagonism against *A. niger* in net-house conditions

Across both pathogenic strains (QT1 and H17), *Bacillus* 101 and 112 achieved the highest efficacy (86.67%), followed by *Bacillus* 137 (83.33%). *Trichoderma* HL6, *Bacillus* B8, and K1 showed lower efficiencies, all below 80%.

3.2.6. Compatibility assessment of antagonistic bacterial strains



Figure 3.14. Antagonistic interaction among the three selected *Bacillus* strains on LBA medium after 48 h of incubation.

3.2.7. Role and antagonistic mechanism of beta-1,3-glucanase against *A. niger* in vitro

3.2.7.1. Evaluating *A. niger* inhibition on solid media

Table 3.12. Antagonistic activity against *A. niger* of cell-free culture filtrates from individual and mixed *Bacillus* strains assessed by the agar diffusion method

Bacterial strain	Diameter of growth inhibition of pathogenic fungal strains (mm)	
	<i>A.niger</i> QT1	<i>A.niger</i> H17
<i>B. siamensis</i> 101	26,6± 0,54 ^c	21,1± 0,44 ^c
<i>B. siamensis</i> 112	25,4±0,46 ^c	20,3±0,46 ^c
<i>B. velezensis</i> 137	28,3±0,61 ^b	23,5±0,53 ^b
Mixture of three <i>Bacillus</i> strains	30,8±0,58^a	26,8±0,66^a
Control	0,0±0,00 ^d	0,0±0,00 ^d

3.2.7.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

Individual beta-1,3-glucanase from *B. siamensis* 101, 112, and *B. velezensis* 137 showed MIC = MFC = 0.4 U/mL against *A. niger* QT1 and H17. When combined at a 1:1:1 ratio, fungicidal efficacy significantly increased, with MIC/MFC reaching 0.1/0.2 U/mL (QT1) and 0.2/0.4 U/mL (H17), maintaining an MFC/MIC ratio of 2 (Table 3.13).

Table 3.13. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of the tested strains determined using a 96-well microplate assay

Enzyme source	Pathogen control <i>A. niger</i> QT1			Pathogen control <i>A. niger</i> H17		
	MIC	MFC	MFC/MIC	MIC	MFC	MFC/MIC
	MIC	MFC	MFC/MIC	MIC	MFC	MFC/MIC
<i>B. siamensis</i> 101	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
<i>B. siamensis</i> 112	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
<i>B. velezensis</i> 137	0,4	0,4	1	0,4	0,4	1
Hỗn hợp 3 vi khuẩn	0,1	0,2	2	0,2	0,4	2

MFC was defined as the concentration at which no fungal growth was observed on PDA plates after 48 h following subculturing from the corresponding microplate wells.

3.2.7.3. Evaluating *A. niger* Inhibition in Liquid Media

The inhibition of pathogenic fungal biomass by individual and combined bacterial strains is shown in Table 3.13. and 3.14.

Table 3.14. Effect of beta-1,3-glucanase on the (dry) biomass of *A. niger* QT1

Beta-1,3-glucanase source	Nồng độ enzyme β -1,3-glucanase (U/mL)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
<i>B. siamensis</i> 101	3,92±0,12 ^e	3,63±0,11 ^{dC}	2,32±0,22 ^{cC}	1,81±0,11 ^{bC}	1,35±0,07 ^{aC}
<i>B. siamensis</i> 112	3,92±0,12 ^e	3,60±0,10 ^{dC}	2,28±0,18 ^{cC}	1,73±0,08 ^{bC}	1,26±0,14 ^{aC}
<i>B. velezensis</i> 137	3,92±0,12 ^e	3,57±0,18 ^{dB}	2,11±0,04 ^{cB}	1,38±0,06 ^{bB}	1,06±0,04 ^{aB}
Enzyme blend from three sources	3,92±0,12^e	3,53±0,12^{dA}	1,67±0,15^{cA}	1,05±0,04^{bA}	0,64±0,07^{aA}

ANOVA analysis (P-value)Enzyme source (Factor 1) $p < 0,001$ Enzyme concentration (Factor 2) $p < 0,001$ Interaction (Enzyme source $\times$ Enzyme concentration) $p < 0,001$

Different letters (a, b, c...) indicate statistically significant differences between enzyme concentrations at $p < 0.05$ (Duncan's test). Different capital letters (A, B, C...) indicate statistically significant differences between enzyme sources at $p < 0.05$ (Duncan's test). M $\pm$ SD: Mean $\pm$ Standard deviation.

Table 3.15. Effect of beta-1,3-glucanase on the (dry) biomass of *A. niger* H17

Beta-1,3-glucanase source	Nồng độ enzyme β -1,3-glucanase (U/mL)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
<i>B. siamensis</i> 101	3,19±0,20 ^{eC}	3,06±0,16 ^{dC}	2,25±0,13 ^{cC}	1,63±0,11 ^{bC}	1,39±0,08 ^{aC}
<i>B. siamensis</i> 112	3,19±0,20 ^{eBC}	3,01±0,20 ^{dB}	2,13±0,22 ^{cBC}	1,52±0,12 ^{bBC}	1,29±0,10 ^{aBC}
<i>B. velezensis</i> 137	3,19±0,20 ^{eB}	2,99±0,13 ^{dB}	1,94±0,51 ^{cB}	1,32±0,10 ^{bB}	1,06±0,16 ^{aB}
Enzyme blend from three sources	3,19±0,20^{eA}	2,97±0,23^{dA}	1,54±0,19^{cA}	1,03±0,02^{bA}	0,75±0,10^{aA}

ANOVA analysis (P-value)Enzyme source (Factor 1) $p < 0,001$ Enzyme concentration (Factor 2) $p < 0,001$ Interaction (Enzyme source $\times$ Enzyme concentration) $p = 0,085$

Different letters (a, b, c...) indicate statistically significant differences between enzyme concentrations at $p < 0.05$ (Duncan's test). Different capital letters (A, B, C...) indicate statistically significant differences between enzyme sources at $p < 0.05$ (Duncan's test). M $\pm$ SD: Mean $\pm$ Standard deviation.

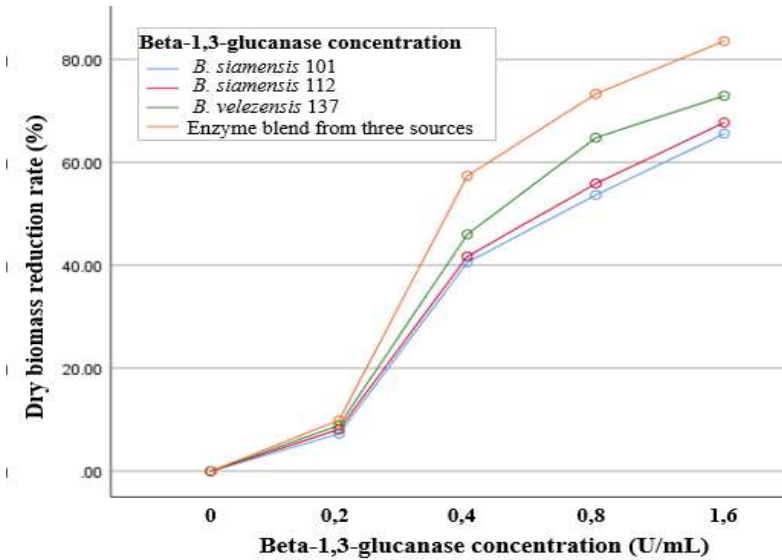


Figure 3.18. Percentage reduction of dry biomass in pathogenic *A. niger* QT1 under the effect of beta-1,3-glucanase

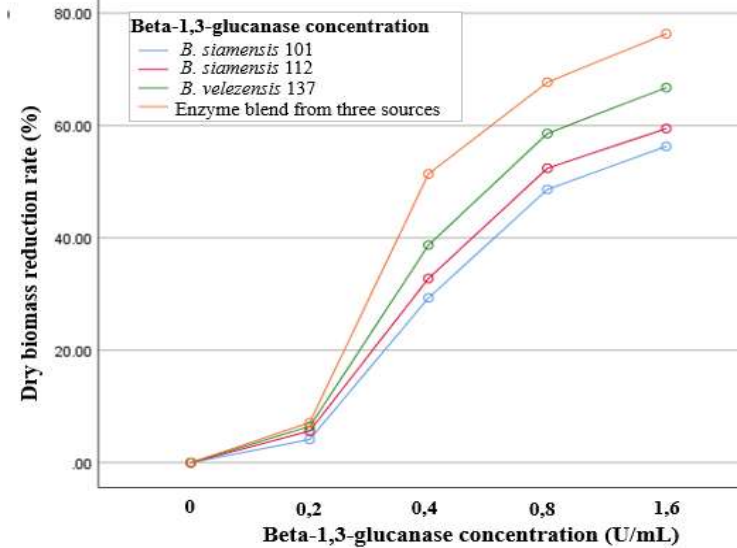


Figure 3.19. Percentage reduction of dry biomass in pathogenic *A. niger* H17 under the effect of beta-1,3-glucanase

3.2.7.4. Correlation between beta-1,3-glucanase activity and antagonistic efficacy against *A. niger*

Table 3.16. Antifungal activity of purified β -1,3-glucanase enzyme mixtures from bacterial strains at different concentrations against *A. niger*, assessed by the agar diffusion method

Concentration (U/mL)	Diameter of growth inhibition of pathogenic fungal strains (mm)	
	<i>A.niger</i> QT1	<i>A.niger</i> H17
0 (Control)	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

Note: ND (Not determined): not determined.

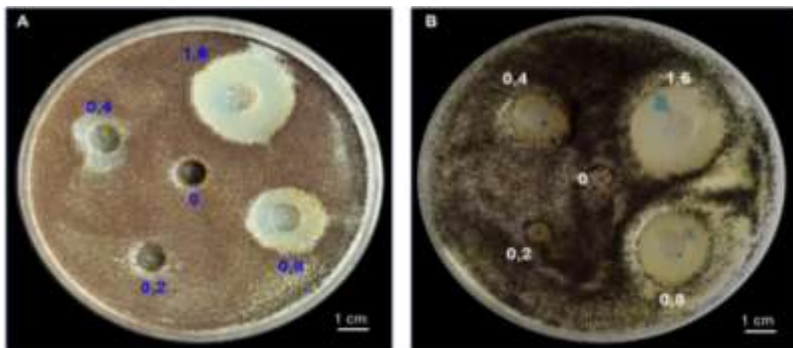


Figure 3.20. Inhibitory effects of the mixed β -1,3-glucanase enzymes from isolated *Bacillus* strains against *A. niger* QT1 (A) and *A. niger* H17 (B)

3.2.7.5. Impact of beta-1,3-glucanase on *A. niger*

Cell Walls SEM analysis showed that while control samples maintained normal spore and hyphal morphology, beta-1,3-glucanase treatment caused hyphal deformation and cell wall rupture. Additionally, the enzyme completely inhibited spore germination on PDA medium.

3.2.8. Biosafety and Plant Growth Promotion (PGP) of Selected *Bacillus* Strains

Hemolytic activity: *B. siamensis* 101, 112, and *B. velezensis* 137 showed no hemolytic activity on blood agar.

Antibiotic sensitivity: All three strains were sensitive to six antibiotics: Tetracycline, Chloramphenicol, Trimethoprim, Levofloxacin, Gentamicin, and Streptomycin.

Impact on soil fauna: Single and combined *Bacillus* strains (10^7 – 10^9 CFU/mL) showed no acute toxicity toward *Eisenia fetida*. Mortality and biomass loss were within ISO 11268-1:1993 standards and not statistically different from the control ($p > 0.05$).

IAA production: All three strains synthesized IAA, peaking at 72 hours (0.025–0.027 mg/mL), indicating strong plant growth promotion potential (Figure 3.24).

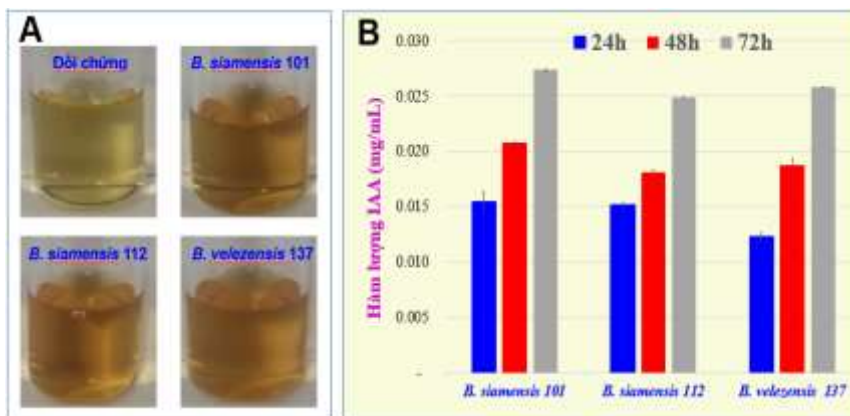


Figure 3.24. Qualitative analysis of Indole-3-acetic acid (IAA) production capacity by selected *Bacillus* strains (A) and quantification of IAA content (B)

3.3. Activity and influencing factors of beta-1,3-glucanase from antagonistic strains

3.3.1. beta-1,3-glucanase accumulation curve

Optimal enzyme harvest time is 20–24 hours for all three *Bacillus* strains: *B. siamensis* 101, 112, and *B. velezensis* 137 (Figs. 3.25–3.27).

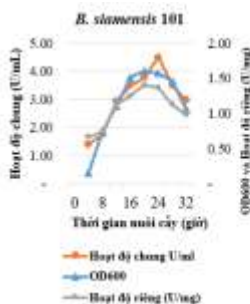


Figure 3.25. Cumulative curve of beta-1,3-glucanase production by *B. siamensis* 101

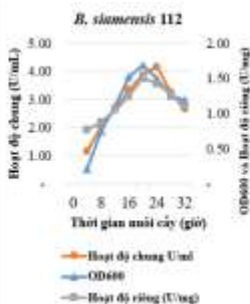


Figure 3.26. Cumulative curve of beta-1,3-glucanase production by *B. siamensis* 112

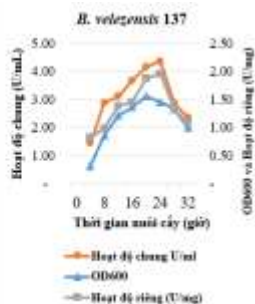


Figure 3.27. Cumulative curve of beta-1,3-glucanase production by *B. velezensis* 137

3.3.2. Factors influencing beta-1,3-glucanase

Activity effect of temperature: beta -1,3-glucanase activity for the three *Bacillus* strains peaked between 50–60°C. Specifically, *B. siamensis* 101 optimized at 50°C, while *B. siamensis* 112 and *B. velezensis* 137 optimized at 60°C (Figure 3.28).

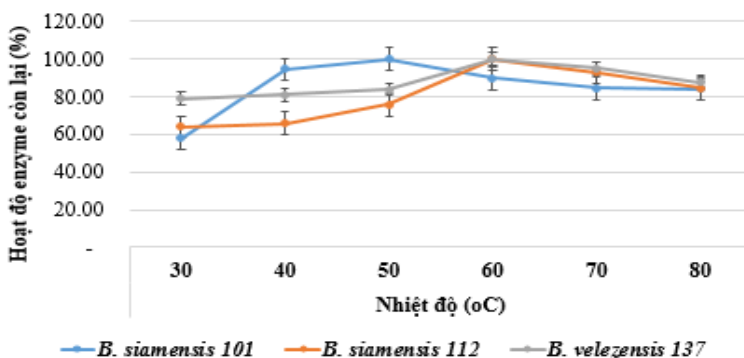


Figure 3.28. Effect of temperature on enzyme activity of the bacterial strains

Effect of pH: The β -1,3-glucanase of all three *Bacillus* strains exhibited optimal activity at pH 5,0 with a sharp decrease in activity under highly acidic or alkaline conditions.

Effect of metal ions and chemical agents: Mn^{2+} and Co^{2+} markedly enhanced β -1,3-glucanase activity of the three strains (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, and *B. velezensis* 137), increasing activity to 132–202% relative to the control. In contrast, EDTA, urea, and Tris significantly reduced enzyme activity to 70–91%.

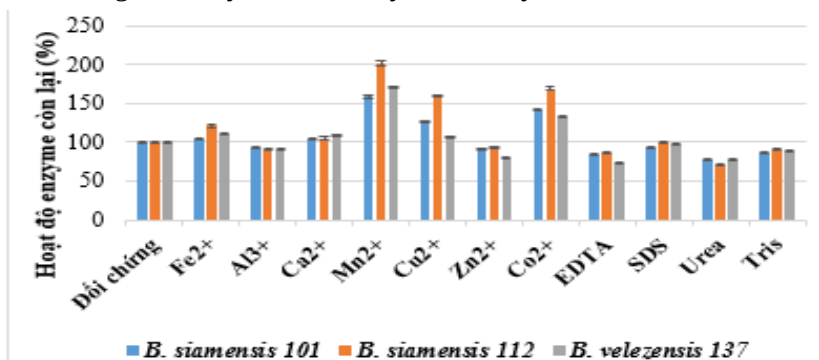


Figure 3.20. Effects of metal ions and chemical agents on β -1,3-glucanase activity of the bacterial strain

3.3.3. Factors affecting beta-1,3-glucanase biosynthesis

Effect of carbon sources: Corn starch and curdlan used as carbon sources resulted in β -1,3-glucanase production within 24 h comparable to curdlan and markedly higher than that obtained with barley and wheat.

Effect of culture media: LB medium was identified as the most suitable medium for primary seed culture of *Bacillus* strains.

Effect of nitrogen sources: Yeast extract was determined to be the optimal nitrogen source for enzyme production.

Effect of inoculum size: An inoculum size of 7% produced the best results for bacterial growth and β -1,3-glucanase accumulation (Table 3.23).

Table 3.23. *Effect of inoculum size on growth and β -1,3-glucanase accumulation of Bacillus strains*

Inoculum size (%)	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)
1	0,93 $\pm$ 0,44 ^c	1,51 $\pm$ 0,21 ^b	1,70 $\pm$ 0,20 ^c	2,40 $\pm$ 0,41 ^b	1,88 $\pm$ 0,51 ^c	1,81 $\pm$ 0,34 ^b
5	3,89 $\pm$ 0,23 ^b	7,20$\pm$0,61^a	3,92$\pm$0,21^a	8,40$\pm$0,31^a	3,90 $\pm$ 0,11 ^b	7,33$\pm$0,54^a
7	4,98$\pm$0,11^a	7,71$\pm$0,43^a	4,32$\pm$0,20^a	8,50$\pm$0,22^a	4,39$\pm$0,41^a	8,80$\pm$0,41^a
10	3,92$\pm$0,12^a	7,42$\pm$0,41^a	3,72 $\pm$ 0,24 ^b	8,11$\pm$0,63^a	3,80 $\pm$ 0,40 ^b	8,32$\pm$0,32^a

Different letters in the same column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Mean $\pm$ Standard deviation. Culture conditions: 1% (w/v) corn flour, 1% (w/v) yeast extract, 30°C, pH 7.0, 150 rpm, 24 hours.

Effect of incubation time: An incubation period of 24 h resulted in the highest enzyme activity and biomass for all three *Bacillus* strains (Table 3.24)

Table 3.24. *Effect of incubation time on growth and β -1,3-glucanase accumulation of Bacillus strains during primary seed culture*

Time (hours)	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass ($\times 10^9$ CFU/mL)
0	0,19 $\pm$ 0,10 ^c	0,00002$\pm$0,3^{a2}	2,60 $\pm$ 0,13 ^b	0,00002$\pm$0,51^{a0}	0,58 $\pm$ 0,33 ^c	0,000015$\pm$0,50^a

	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
Time (hours)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)
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

Different letters in the same column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Mean $\pm$ Standard deviation. Culture conditions: 1% (w/v) corn flour, 1% (w/v) yeast extract, 30°C, pH 7.0, 150 rpm.

Effect of cultivation temperature: A cultivation temperature of 30 °C resulted in the highest enzyme activity and biomass for all three *Bacillus* strains (Table 3.25).

Table 3.25. *Effect of cultivation temperature on growth and β -1,3-glucanase accumulation of Bacillus strains during primary seed culture*

	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
t°C	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (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

Effect of culture pH: A pH of 7,0 resulted in the highest enzyme activity and biomass for all three *Bacillus* strains (Table 3.26).

Table 3.26. Effect of culture pH on growth and β -1,3-glucanase activity of *Bacillus* strains during primary seed culture

pH	<i>B. siamensis</i> 101		<i>B. siamensis</i> 112		<i>B. velezensis</i> 137	
	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (x10 ⁹ CFU/mL)	Enzyme activity (U/mL)	Biomass (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

Different letters in the same column indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Mean $\pm$ Standard deviation. Culture conditions: 1% (w/v) corn flour, 1% (w/v) yeast extract, 7% inoculum size, 30°C, 150 rpm, 24 hours.

Effect of agitation speed: An agitation speed of 150 rpm resulted in the highest enzyme activity and biomass for all three *Bacillus* strains.

Culture conditions for β -1,3-glucanase production: Liquid LB medium; supplementary nitrogen source: yeast extract; inoculum size: 7%; incubation time: 24 h; cultivation temperature: 30–35 °C; culture pH: 7.0; agitation speed: 150 rpm.

3.4. In vivo Antagonistic Efficacy of *Bacillus* Strains Against *A. niger*

3.4.1. Inhibition of *A. niger* in Net-house Conditions Post-infection, the control group showed a rapid increase in mortality (60% after 7 days; 100% after 14–21 days). In contrast, peanut plants treated with the 3-strain bacterial consortium (coded **BAZ04**) showed no symptoms, maintaining a 0% mortality rate throughout the experiment (Fig 3.31)



Figure 3.31. Biological control of groundnut collar rot using *Bacillus* strains under net-house conditions following artificial inoculation with *Aspergillus niger*. Treatments included: **CT1**, non-inoculated plants treated with water only (negative control); **CT2**, plants inoculated with *A. niger* QT1 and treated with water only (positive control); **CT3**, plants inoculated with *A. niger* QT1 and treated with the BAZ04 formulation; **CT4**, plants inoculated with *A. niger* H17 and treated with water only (positive control); and **CT5**, plants inoculated with *A. niger* H17 and treated with the BAZ04 formulation.

3.4.2. Field efficacy of the *Bacillus* consortium (BAZ04)

Effect of the BAZ04 formulation on peanut growth and development: The BAZ04 formulation increased main stem height and total branch number of the peanut cultivar L14 at different growth stages in both Huế and Quảng Trị.

Effect of the BAZ04 formulation on collar rot (black mold) disease: The BAZ04 formulation markedly reduced the incidence and severity of peanut collar rot on the cultivar L14 at experimental sites in both Huế and Quảng Trị (Table 3.32).

Table 3.32. Percentage of plant mortality due to peanut collar rot (black mold) under different experimental treatments (%)

Treatment	Phu Vang, Hue	Huong Tra, Hue	Hai Lang, Quang Tri	Trieu Phong, Quang Tri
BAZ04 (CT1)	3,57 ± 0,33 ^a	1,16 ± 0,06 ^a	1,38 ± 0,11 ^a	2,11 ± 0,20 ^a
<i>Trichoderma</i> (CT2)	4,08 ± 0,31 ^a	1,75 ± 0,11 ^a	1,78 ± 0,14 ^a	2,21 ± 0,28 ^a
Control (CT3)	10,71 ± 1,05 ^b	6,57 ± 0,62 ^b	4,13 ± 0,35 ^b	8,16 ± 0,69 ^b
LSD _{0.05}	2,61	3,05	1,07	2,13

Different letters within the same column indicate statistically significant differences among means at $p < 0.05$.

Effect of the BAZ04 formulation on peanut yield and yield components: The BAZ04 formulation improved yield components and increased the actual yield of the peanut cultivar L14 under field production conditions in the experimental areas of Huế and Quảng Trị (Figure 3.32).

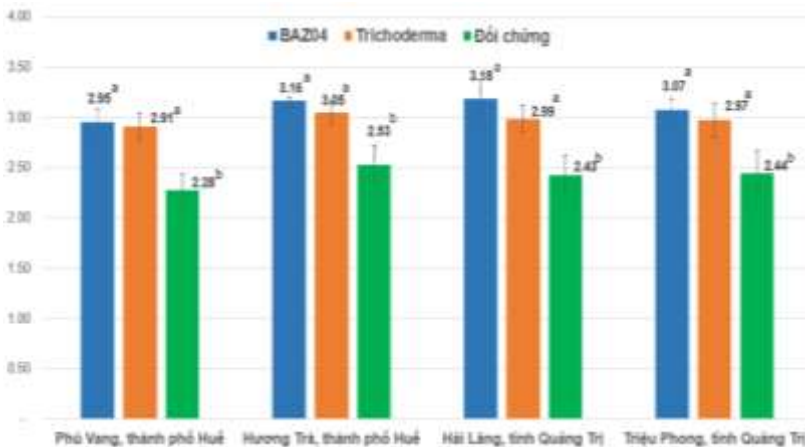


Figure 3.32. Peanut yield at testing sites in Hương Trà, Phú Vang, Triệu Phong, and Nam Hải Lăng. Different letters within the same location indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ (Duncan's test). $M \pm SD$: Mean $\pm$ Standard deviation.

CONCLUSIONS AND ECOMMENDATIONS

Conclusions

Based on the experimental results obtained, the thesis draws the following conclusions:

1. A total of 60 fungal disease isolates were isolated from collar rot-infected peanut plants in Quang Tri and Hue. Verification through Koch's postulates and pathogenicity testing of 09 selected strains yielded plant mortality rates ranging from 85.7% to 100%. Morphological identification and molecular analysis (ITS sequence) of two representative strains causing 100% mortality (QT1 and H17) confirmed the causal agent as *Aspergillus niger*.

2. Three bacterial strains (*Bacillus siamensis* 101, *Bacillus siamensis* 112, and *Bacillus velezensis* 137) and one fungal strain (*Trichoderma asperellum* HL6) indigenous to the region were selected for their strong antagonism against *A. niger*. The three selected *Bacillus* strains exhibited high extracellular enzymatic activities (chitinase, beta-1,3-glucanase, and cellulase), produced IAA, and demonstrated biosafety compliance: non-hemolytic, non-toxic to earthworms (at 10^9 CFU/mL), sensitive to six tested antibiotics (tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, levofloxacin, gentamicin, and streptomycin), and had no adverse effect on peanut seed germination.

3. In single-factor experiments, the beta-1,3-glucanase enzyme produced by the three bacterial strains (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, and *B. velezensis* 137) achieved maximum activity at pH 5.0 and 50–60 °C, was enhanced by Mn^{2+} and Co^{2+} , and was strongly inhibited by EDTA and urea. Optimal culture conditions for beta-1,3-glucanase harvesting from the three *Bacillus* strains were: Liquid LB broth (supplemented with 1% cornmeal and 1% yeast extract), pH 7.0, 30–35 °C, 150 rpm, 7% inoculum size, and a incubation time of 24 hours. Formulating the enzymes at a 1:1:1 ratio reduced both MIC (0.1–0.2 U/mL) and MFC (0.2–0.4 U/mL), inducing cell wall deformation and rupture in *A. niger* as observed via SEM.

4. A culture broth mixture containing the three *Bacillus* strains (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, and *B. velezensis* 137) combined at a 1:1:1 volume ratio at a concentration of 10^8 CFU/mL inhibited *A. niger* more effectively than individual strains under both *in vitro* and greenhouse conditions. The consortium maintained a low incidence of collar rot-induced mortality (1.16–3.56%), comparable to commercial *Trichoderma*, while increasing peanut yield by 20.5–22.7% relative to the control.

Recommendations

Conduct field trials using the culture broth consortium of the three *Bacillus* strains (*B. siamensis* 101, *B. siamensis* 112, and *B. velezensis* 137) to optimize the production process, aiming toward product commercialization and expanding its application to other crops in Central Vietnam./.