

R

BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC NĂM 2002

I-Đề tài nghiên cứu khoa học: chương trình CNSH-04-12

- Tên đề tài nhánh: *Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc sâu sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng.*

- Chủ trì: Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

- Mục tiêu nghiên cứu của đề tài:

Nâng cao năng lực sản xuất thuốc sâu sinh học (NPV, V-Bt) để đưa ra sử dụng trong phòng trừ một số đối tượng sâu hại cây trồng đặc biệt là phục vụ các vùng sản xuất rau màu nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc hoá học đảm bảo sản phẩm an toàn cho người tiêu dùng, bảo vệ môi trường và tài nguyên vi sinh vật có ích trên đồng ruộng.

- Nội dung nghiên cứu chính:

- 1) Thu thập các nguồn virus côn trùng để có giống chuẩn cung cấp cho việc nghiên cứu và sản xuất chế phẩm.
- 2) Nuôi một số loài sâu như: Sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu keo da láng (*Spodoptera exigua*), sâu tơ (*Plutella xylostella*)... với số lượng lớn để cung cấp cho các thí nghiệm để sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt.
- 3) Sản xuất các chế phẩm NPV-Ha và V-Bt cấp cho các địa phương thử nghiệm và sử dụng trong mô hình phòng trừ sâu hại.
- 4) Tập huấn phương pháp sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học cho địa phương.
- 5) Xây dựng mô hình về ứng dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học trên lạc vụ xuân hè tại Sóc Sơn, Hà Nội, trên rau vụ đông tại Mê Linh, Vĩnh Phúc.

II- Kết quả thực hiện:

Xanh

- Điều tra thu thập được 30 mẫu virus sâu, 10 mẫu virus sâu khoang, 15 mẫu virus sâu xanh và 10 mẫu virus sâu cuốn lá lớn để tạo nguồn virus cho sản xuất.
- Nuôi sâu xanh (*H. armigera*) với số lượng lớn để sản xuất chế phẩm. Bộ phận nuôi sâu đã cung cấp được 100.000 sâu xanh tuổi 4 để sản xuất chế phẩm virus. Bên cạnh đó từng bước đã cải tiến được dụng cụ nuôi sâu.

5388 - 4¹
717105

BÁO CÁO ĐỊNH KỲ
TÌNH HÌNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

(6 tháng 1 lần, trước 15/3 và 15/9 hàng năm)

Nơi nhận báo cáo :

1. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 39 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

- Vụ kế hoạch

- Vụ Quản lý chuyên ngành

2. Văn phòng chương trình : KC 04

1. Tên đề tài :	2. Ngày báo cáo
Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học	13.03.2002 Kỳ 1
3	Cơ quan chủ trì : Viện Bảo vệ thực vật- Chèm- Từ Liêm-Hà Nội Chủ nhiệm đề tài : TS. Nguyễn Văn Tuất
4	Thời gian thực hiện : 10/2001 đến 3/2002
5	Tổng kinh phí thực hiện : 2.900 triệu đồng
6	Sau khi thẩm định xong tháng 10/2001, Ban chủ nhiệm đề tài khẩn trương họp phân công nhiệm vụ, duyệt đề cương và ký kết hợp đồng với các đơn vị tham gia bao gồm : • <i>Các cơ quan nghiên cứu hoàn thiện quy trình và chuyển giao công nghệ</i> - Trung tâm sinh học Viện bảo vệ thực vật - Bộ môn Bệnh cây Viện Bảo vệ thực vật - Viện Công nghệ sinh học - Viện Công nghiệp thực phẩm - Viện Di truyền nông nghiệp - Trung tâm Công nghệ Sinh học- Đại học Quốc gia Hà Nội - Viện Sinh thái Tài nguyên Sinh vật - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam - Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long • <i>Các cơ quan ứng dụng triển khai công nghệ</i> - Chi cục Bảo vệ thực vật Hải Phòng - Chi cục Bảo vệ thực vật Hà Nam - Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Bình - Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận

Nội dung thực hiện chính :

1. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất và sử dụng thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng để phòng trừ sâu bệnh, dịch hại trên một số loại cây trồng (rau màu, cây ăn quả và cây công nghiệp...), bao gồm:

- Chế phẩm sinh học virus côn trùng (NPV) trừ sâu hoạt lực cao
- Chế phẩm sinh học NPV-Bt trừ sâu
- Chế phẩm sinh học nấm côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria*
- Chế phẩm sinh học *Trichoderma*, tuyến trùng
- Chế phẩm sinh học Momosertatin + Bt
- Chế phẩm sinh học xạ khuẩn

2. Thử nghiệm đánh giá hiệu quả chế phẩm

3. Xây dựng mô hình ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trong hệ thống phòng trừ tổng hợp dịch hại cây trồng

4. Tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật nông dân ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trong phòng trừ dịch hại cây trồng.

KẾT QUẢ THỰC HIỆN GIAI ĐOẠN 10/2001- 3/2002

1. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm trừ sâu sinh học có nguồn gốc virút và vi khuẩn.

+ Nghiên cứu sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt do Trung tâm sinh học- Viện Bảo vệ thực vật thực hiện.

Tiến hành điều tra thu thập các nguồn vi rút côn trùng, phân lập, tuyển chọn, bảo quản phục vụ cho công tác nghiên cứu sản xuất chế phẩm có hoạt lực cao.

- Nuôi một số loài sâu như sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu keo da láng (*Spodoptera exigua*) với số lượng lớn để nhiễm NPV sản xuất chế phẩm.
- Đã sản xuất 4 loại chế phẩm NPV, V-Bt đủ sử dụng cho 10 ha cây trồng và chuyển giao cho chương trình 4 kg chế phẩm Viha, Viha-Bt, ViSl, VSl-Bt để sử dụng cho 4 ha rau mầu tại các địa phương tham gia thử nghiệm chế phẩm.
- Đã làm việc với cán bộ địa phương, bố trí điều tra định kỳ sâu hại lạc để tiến hành xây dựng mô hình ứng dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học NPV, V-Bt trên diện tích 10 ha lạc vụ xuân hè 2002 tại HTX Đồng- Phú Minh, Sóc Sơn- Hà Nội.

+ Nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt trừ sâu hại cây trồng do 2 đơn vị là Viện Công nghệ sinh học và Viện Công nghiệp thực phẩm thực hiện.

- Tiến hành lựa chọn môi trường, tuyển chọn các chủng Bt có hoạt lực cao, sản xuất được 20 kg Bt dạng bột thấm nước 16000IU/mg và 100 lít Bt dạng sữa 4000 IU/ml. Chế phẩm đang được gửi cho các địa phương tiếp tục theo dõi đánh giá hiệu quả.

2. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm nấm có ích

- + Chế phẩm nấm có ích trừ côn trùng *Beauveria* và *Metarhizium* do 2 đơn vị là Viện Bảo vệ thực vật và Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long thực hiện.
- Đã tiến hành thu thập các nguồn nấm *Beauveria* và *Metarhizium* từ nhiều địa phương làm dữ liệu cho công tác đánh giá tuyển chọn các nguồn nấm có hoạt lực cao. Phân lập tuyển chọn bổ sung thêm 3 chủng nấm mới, trong đó có 2 chủng nấm xanh và 1 chủng nấm trắng.
- Nghiên cứu nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm đã có từ trước bằng cách truyền qua côn trùng rồi phân lập và thuần hoá lại để nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm *Beauveria* và *Metarhizium* cũ.
- Đánh giá hiệu lực diệt côn trùng của 2 chế phẩm trên được thực hiện trên diện rộng tại vườn cây ăn quả ở Ô Môn- Cần Thơ. Kết quả cho thấy chế phẩm nấm xanh có hiệu quả rất tốt (tỷ lệ chết đạt từ 70-90%) đối với côn trùng chích hút như các loài rầy hại lúa, rầy hại xoài, bọ xít hại nhãn, bọ xít hại lúa. Chế phẩm nấm xanh cũng có hiệu lực khá cao (tỷ lệ chết từ 55-85%) đối với sâu non của côn trùng thuộc bộ cánh vảy như sâu tơ, sâu xanh, sâu đo hại rau đậu, sâu cuốn lá nhỏ. Kết quả thí nghiệm chứng tỏ rằng đối với sâu non của côn trùng bộ cánh vảy thì nấm trắng có hiệu lực cao hơn nấm xanh, nhưng đối với côn trùng chích hút thì nấm xanh lại có hiệu lực mạnh hơn nấm trắng.
- Đã sản xuất được 145 kg chế phẩm nấm xanh và nấm trắng có mật độ bào từ $1,2 - 1,8 \times 10^9$ bào tử/gr dùng để trừ các loại sâu hại lúa, rau và cây ăn quả.
- Đã sản xuất được 100 kg M.a. và B.b phòng trừ sâu hại dừa.
- + Nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* trừ bệnh hại cây trồng do Viện Bảo vệ thực vật thực hiện.
- Tiếp tục thu thập, tuyển chọn các nguồn *Trichoderma* có tính đối kháng cao. Sản xuất được 40 kg chế phẩm cung cấp cho điểm phòng trừ bệnh hại lạc tại Nam Định. Kết quả đang được tiếp tục theo dõi đánh giá.

3. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất tuyến trùng EPN trừ sâu hại cây trồng bằng in vivo và in vitro. Nội dung do 2 đơn vị là Viện Sinh thái tài nguyên sinh vật và Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam thực hiện.

- Đã tiến hành điều tra, thu thập các loài EPN để phòng trừ sinh học đối với cây trồng, nghiên cứu cơ chế xâm nhập, tìm vật chủ của EPN và công nghệ nuôi cấy tạo sinh khối EPN sản xuất chế phẩm phục vụ công tác phòng trừ sâu hại cây trồng.

- Tiến hành nuôi nhân thành công 3 chủng EPN là S- CTL, S-XSA và STN10. Sản lượng nhân nuôi đạt $15-20 \times 10^6$ IJs/bình có dung tích 500ml chứa 40 gr môi trường nhân nuôi. Sản xuất được 110 lít chế phẩm tiêu chuẩn nồng độ 1500×10^6 IJs.

4. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất các chế phẩm hoá sinh, kháng sinh trừ sâu bệnh hại cây trồng.

- Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm *Momosertatin* từ hạt gác trừ sâu hại rau do Trung tâm công nghệ sinh học- Đại học quốc gia Hà Nội thực hiện. Đã hoàn thiện công nghệ sản xuất được 50 lít chế phẩm, hiệu quả trừ sâu đạt 60- 75%. Đang tiến hành nghiên cứu phối hợp với Bt để nâng cao hiệu lực chế phẩm.
- Nghiên cứu sản xuất thuốc kháng sinh trừ bệnh DITACIN và nấm đối kháng KETOMIUM phòng trừ nấm và vi khuẩn gây hại cây trồng do Viện Di truyền thực hiện đang được tiến hành nghiên cứu sản xuất . Kết quả bước đầu cũng đang được theo dõi đánh giá.

5. Xây dựng mô hình ứng dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng.

Được tiến hành bởi 6 đơn vị bao gồm :

- Chi cục Bảo vệ thực vật Hải Phòng, Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Bình: Xây dựng mô hình sử dụng các chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu hại rau, màu.
- Chi cục Bảo vệ thực vật Hà Nam, Chi cục Bảo vệ thực vật Nam Định, Chi cục Bảo vệ thực vật Khánh Hoà: Xây dựng mô hình sử dụng Chế phẩm sinh học trừ bệnh hại lạc, rau màu và trừ bọ cánh cứng hại dừa.
- Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận: Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm EPN trừ sâu hại nho.
- Các Chi cục Bảo vệ thực vật đã chọn xong điểm và đã tiến hành thí nghiệm, kết quả đang được tiếp tục theo dõi, đánh giá. Riêng Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Thuận sẽ dời Viện Sinh thái tài nguyên sinh vật gửi tiếp chế phẩm EPN để tiếp tục triển khai.

13. Tình hình sử dụng kinh phí để thực hiện đề tài tính đến kỳ báo cáo

TT	Thời gian sử dụng	Tổng số tiền đã sử dụng	Trong đó				
			Thuế khoán chuyên môn	Nguyên vật liệu năng lượng	Thiết bị máy móc	XD sửa chữa nhỏ	Chi khác
1	2	3	4	5	6	7	8
	Tổng kinh phí	640.405	101.700	203.550	293.400		41.755
	Trong đó						
a	Ngân sách SNKH	640.405	101.700	203.550	293.400		41.755
	Tính đến kỳ báo cáo	640.405	101.700	203.550	293.400		41.755
	Trong kỳ báo cáo						
	Cộng	640.405	101.700	203.550	293.400		41.755
b	Các nguồn vốn khác						

Kinh phí đã được cấp và sử dụng tính đến kỳ báo cáo

Tổng kinh phí đã được cấp : 700.000.000 đồng

Tổng kinh phí sử dụng : 700.000.000 đồng

Số kinh phí đã quyết toán : 640.405.994 đồng

Kinh phí còn chuyển năm 2002 : 59.594.006 đồng

14. Những vấn đề tồn tại cần giải quyết :

- Sản xuất chế phẩm còn chưa kịp thời để cung cấp cho các điểm mô hình , giá hành còn cao .
- Các thí nghiệm trong phòng và ngoài đồng cần phải được lặp lại nhiều lần để hằng định quy trình công nghệ tối ưu cho từng loại sản phẩm.
- Sự phối hợp để cùng sử dụng chế phẩm trên một đối tượng cây trồng giữa các đề tài nhánh chưa mạnh.
- Các đề tài nhánh chưa nêu bật được những ưu điểm nổi bật của của công nghệ

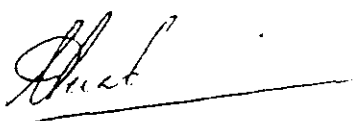
15. Dự kiến những công việc cần triển khai tiếp trong thời gian tới

- Tăng cường sản xuất chế phẩm để thử nghiệm trên các mô hình đã được giao, nâng cao chất lượng chế phẩm, hạ giá thành.
- Tạo những hợp điểm lớn để đủ sức thuyết phục, sử dụng nhiều loại sản phẩm trên một nhóm cây trồng.
- Đưa ra được những quy định nền có chất lượng cao để từng bước chuyển giao cho sản xuất hàng loạt chế phẩm.

6. Kết luận và kiến nghị

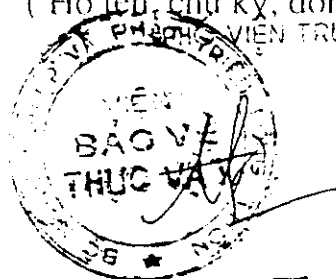
Đề tài đã tổ chức thực hiện theo yêu cầu của chương trình đặt ra. Đã có một số kết quả và đang tiếp tục triển khai các công việc nghiên cứu bổ sung và ứng dụng trên mô hình. Đảm bảo quy định hợp đồng về kỹ thuật và tài chính. Đề nghị được thông báo cấp vốn sớm để lập kế hoạch nghiên cứu trong năm 2002 và triển khai ứng dụng trong sản xuất thông qua mô hình. Các báo cáo tiến bộ của đề tài nhánh cần đi sâu về chuyên môn, kỹ thuật và tài chính. Đề nghị Bộ Khoa học & Môi trường cấp tiếp kinh phí để đề tài được tiếp tục.

Chủ nhiệm đề tài
(Họ tên, chữ ký)



TS. Nguyễn Văn Tuất

Thủ trưởng cơ quan chủ trì đề tài
(Họ tên, chữ ký, đóng dấu)



TS. Trần Quang Tuấn

CHƯƠNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC KC-04
NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
GIAI ĐOẠN 2001-2002

BÁO CÁO TIẾN ĐỘ VÀ KẾT QUẢ THỰC HIỆN NĂM 2002

ĐỀ TÀI:

"NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SỬ DỤNG
THUỐC SÂU SINH HỌC ĐA CHỨC NĂNG CHO MỘT SỐ LOẠI
CÂY TRỒNG BẰNG KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC"

MÃ SỐ: KC - 04.12
CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất
CƠ QUAN CHỦ TRÌ: Viện Bảo vệ thực vật- Bộ Nông nghiệp và PTNT

Hà nội, tháng 12 năm 2002.

BÁO CÁO TIẾN ĐỘ VÀ KẾT QUẢ THỰC HIỆN NĂM 2002

Đề tài: *Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học"*

Cơ quan chủ trì: Viện Bảo vệ thực vật

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Thời gian thực hiện: 1/2002 đến 12/2002

Kinh phí thực hiện: 1200 triệu đồng, trong đó:

- 755 triệu cho các hoạt động nghiên cứu khoa học
- 445 triệu cho thiết bị

Mục tiêu: Hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học BVTV đa chức năng để sử dụng trong hệ thống tổng hợp trong phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng nhằm giảm thiểu sử dụng thuốc hoá học, góp phần tạo ra các sản phẩm nông nghiệp sạch bảo vệ sức khoẻ con người và vệ sinh môi trường.

I. CÔNG VIỆC CHÍNH ĐÃ THỰC HIỆN:

1. Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất và sử dụng chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng để phòng trừ sâu bệnh, dịch hại trên một số loại cây trồng (rau màu, cây ăn quả và cây công nghiệp...) bao gồm:

- Chế phẩm virus côn trùng *NPV* trừ sâu hoạt lực cao.
- Chế phẩm *NPV* - *Bt* trừ sâu.
- Chế phẩm nấm côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria*.
- Chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* trừ bệnh hại cây trồng.
- Chế phẩm tuyến trùng có ích *EPN* trừ côn trùng.
- Chế phẩm *Momosertatin* (*MM*) + *Bt* trừ sâu hại rau.
- Chế phẩm kháng sinh *Ditacin* và nấm đối kháng *Ketomium* trừ bệnh hại cây trồng.

2. Thử nghiệm đánh giá hiệu quả chế phẩm.

3. Xây dựng mô hình ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trong hệ thống phòng trừ tổng hợp dịch hại cây trồng.

4. Tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trong phòng trừ dịch hại cây trồng.

5. Tiến hành mua thiết bị nổi lên men vi sinh vật bổ xung cho phòng thí nghiệm

II. NHỮNG HOẠT ĐỘNG ĐÃ TRIỂN KHAI:

1. Nghiên cứu phát triển công nghệ và hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm trừ sâu sinh học có nguồn gốc vi rút và vi khuẩn.

- Chế phẩm NPV, V - Bt:

Thu thập 20 mẫu NPV - Ha để đổi nguồn nâng cao chất lượng chế phẩm.

Liên tục nuôi nhân hàng loạt sâu xanh *Helicoverpa armigera*, cung cấp được 18000 sâu xanh sản xuất chế phẩm.

Sản xuất được 75 kg NPV - Ha để trừ sâu xanh đạt tiêu chuẩn $0,3 \times 10^9$ OB/gr để sử dụng cho 15 ha lạc.

Bước đầu phối hợp NPV với Bt trừ sâu xanh hại lạc đạt hiệu quả 48-50% dự kiến sẽ sử dụng NPV - Bt trừ sâu hại rau vụ đông 2002.

- Chế phẩm Bt:

Tuyển chọn được 8 chủng Bt có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng, đã chọn được môi trường lên men thích hợp cho các chủng trên.

Cải tiến nâng cao hiệu suất lên men, thu hồi, tạo chế phẩm dạng bột thấm nước từ các chủng Bt *kurstaki*, Bt *aizawai* có hoạt tính sinh học là 24000 IU/mg. và 13000IU/mg.

Sản xuất được 36 kg Bt Biotox dạng bột thấm nước đạt tiêu chuẩn 16000IU/mg và 100 lit Bt dạng sữa tiêu chuẩn 4000IU/ml.

Hiệu lực Biotox với sâu tơ đạt 80-94%, với sâu xanh đạt 62-70% trong phòng thí nghiệm.

2. Nghiên cứu phát triển công nghệ và hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm nấm có ích trừ sâu bệnh hại.

- Chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trừ côn trùng.

Đã phân lập và tuyển chọn bổ xung thêm 11 chủng nấm mới (6 chủng nấm xanh và 5 chủng nấm trắng).

Cải tiến quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm đạt tiêu chuẩn $1,6-2,5 \times 10^9$ Bt/gram.

Sản xuất được 100kg *Metarhizium anisopliae* trừ bọ hại dừa tại Phú Yên và Đà Nẵng.

Sản Xuất được 50 kg *Beauveria bassiana* trừ sâu hại cây lâm nghiệp tại Sơn La và Yên Bái.

Sản Xuất được 1060 kg chế phẩm nấm xanh *M.a(OM₂-B)* và nấm trắng *B.b(OM₁-R)* cung cấp cho các điểm phía nam phòng trừ rầy nâu hại lúa, sâu hại dừa và cây ăn quả.

- Chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* 3-3,2 x 10⁹Bt/gr cung cấp cho các vùng phòng trừ bệnh hại lạc và rau.

3. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm tuyến trùng có ích EPN (BIOSTAR) trừ sâu hại cây trồng.

Đã hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm tuyến trùng có ích EPN bằng in vitro quy mô dạng pilot.

Đã nhân nuôi thành công 7 chủng EPN là *S-CTL*, *STN10*, *H-MP11*, *H-NT3*, *H-BAT*, *S-XS4* và *S-TX1*. Sản lượng nhân nuôi đạt 15-20 x 10⁶IJs trên một bình 500ml. Công suất của pilot đạt 250-300 lít/đợt 30 ngày.

Sản xuất được 1500 lít chế phẩm *BIOSTAR* từ 7 chủng trên cung cấp cho các điểm trừ sâu xám hại thuốc lá, đậu tương, bộ hung hại mía.

4. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất các chế phẩm hoá sinh, kháng sinh trừ sâu bệnh hại cây trồng.

- Chế phẩm *Momosertatin* (*MM*) trừ sâu hại rau:

Hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm *Momosertatin* từ hạt gấc đạt tiêu chuẩn 2IU/lít.

Sản xuất được 100 lít chế phẩm cung cấp cho các điểm phòng trừ sâu tơ, sâu xanh hại rau đạt hiệu quả 45-65%.

Đang nghiên cứu phối trộn với *Bt* để tăng hiệu quả diệt sâu.

- Chế phẩm thuốc kháng sinh *Ditacin* và nấm đối kháng *Ketomium* trừ bệnh hại cây trồng.

Thu thập và tuyển chọn được 10 bộ giống gốc.

Sản xuất được 25kg *Ditacin* và 15 kg *Ketomium* tiến hành thử nghiệm trừ bệnh héo xanh trên các loại cây họ cà và bệnh thán thư trên các loại cây ăn quả: ớt, hồ tiêu bước đầu đạt hiệu quả cao.

III. THỬ NGHIỆM ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CHẾ PHẨM.

Đã hoàn thiện và phát triển công nghệ sản xuất được 8 loại chế phẩm trong đó có 2 loại chế phẩm từ vi rút, vi khuẩn, 3 loại chế phẩm từ nấm, 1 loại từ tuyến trùng và 2 loại chế phẩm kháng sinh và hoá sinh.

Tiến hành thử nghiệm đánh giá hiệu quả với sâu bệnh hại cây trồng.

1. Chế phẩm *NPV-Ha* sâu xanh 0,3 x 10⁹OB/gr trừ sâu xanh trong phòng thí nghiệm đạt hiệu quả 90-100%.

2. Chế phẩm *Bt* dạng sữa 4000 IU/ml, *Bt* dạng bột *Biotox* 16000IU/mg tiến hành đánh giá với sâu hại rau trong phòng thí nghiệm. Hiệu quả *Biotox* đạt 80-90% với sâu tơ và 62-70% với sâu xanh

3. Chế phẩm *Metarhizium anisopliae* 1,6-2,5 x 10⁹Bt/gr trừ bọ hại dừa tại Phú Yên, Đà Nẵng đạt hiệu quả 83,8-86,5%. Dạng nấm xanh trừ rầy, bọ xít trên lúa và cây ăn quả đạt 70-90%, nấm trắng đạt 50-85%

Chế phẩm *Beauveria bassiana* trừ sâu róm thông và sâu đo nâu hại bồ đề tại Sơn la, Yên Bái đạt hiệu quả 75-86,5%.

4. Chế phẩm nấm có ích *Trichoderma* 3-3,2 x 10⁹Bt/gr trừ bệnh lở cổ rễ bắp cải đạt 41,5-60%.

5. Chế phẩm tuyến trùng *EPN Biostar* 15-20 x 10⁶ IJs trừ sâu xám hại thuốc lá đạt hiệu quả 41%.

6. Chế phẩm hoá sinh *Momosertatin (MM)* 2IU/lít trừ sâu hại rau đạt 45-65%.

7. Chế phẩm *Ditacin* 8% và *Ketomium* 1,5 x 10⁶ Cfug trừ bệnh hại , hiệu quả chế phẩm đang được tiếp tục theo dõi.

IV. XÂY DỰNG MÔ HÌNH ỨNG DỤNG CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC TRONG HỆ THỐNG TỔNG HỢP PHÒNG TRỪ SÂU BỆNH HẠI CÂY TRỒNG.

- Xây dựng mô hình ứng dụng NPV, VbT trên diện tích 30 ha rau tại huyện Hoa Lư, tỉnh Ninh Bình, hiệu quả phòng trừ sâu khoang sau 9 ngày đạt 72,19-75,57%.

Tiến hành phòng trừ sâu xanh hại lạc tại Sóc Sơn Hà Nội hiệu quả đạt 48-50%.

- Xây dựng mô hình ứng dụng *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* phòng trừ cho 83 ha lúa hữu cơ và lúa chất lượng cao tại Cần Thơ, An Giang và Trà Vinh; 60 ha cây ăn trái (Cam, Quýt, Nhãn và Xoài tại Cần Thơ, Tiền Giang), 19 ha chè sạch ở Bảo Lộc; gần 3000 cây dừa tại Cần Thơ, hơn 8 ha Nho sạch tại Ninh Thuận.

Kết quả cho thấy: Chế phẩm nấm xanh có hiệu lực rất tốt (tỷ lệ chết đạt từ 70-90%) đối với côn trùng chích hút như các loài rầy hại lúa, rầy chổng cánh trên cam quýt, rầy mềm hại xoài, bọ xít hại nhãn, bọ xít hại lúa, bọ cánh cứng hại Dừa, mối hại cây trồng; Chế phẩm nấm trắng cũng có hiệu lực cao đối với rầy nâu, rầy xanh, bọ xít, ngoài ra còn có hiệu lực khá cao (tỷ lệ chết từ 50-85%) đối với sâu non của côn trùng thuộc bộ cánh vảy như: Sâu tơ, sâu xanh, sâu đo hại rau, đậu; sâu cuốn lá nhỏ hại lúa. Kết quả thử nghiệm còn chứng tỏ rằng đối với sâu non của côn trùng bộ cánh vảy thì nấm trắng có hiệu lực cao hơn nấm xanh, nhưng đối với côn trùng chích hút, mối và bọ cánh cứng hại Dừa thì nấm xanh lại có hiệu lực mạnh hơn nấm trắng.

- Xây dựng mô hình ứng dụng nấm đối kháng *Trichoderma* phòng trừ bệnh lở cổ rễ lạc trên quy mô 3 ha tại hợp tác xã Phù Vân, thị xã Phù Lý.

- Sử dụng 200 kg chế phẩm cung cấp cho các địa phương gồm:

+ Chi cục BVTV Nam Định sử dụng phòng trừ bệnh trên cây lạc xuân

- + Chi cục BVTV Lâm Đồng sử dụng phòng trừ bệnh trên cây rau
- + Chi cục BVTV Hải Phòng sử dụng phòng trừ bệnh trên cây khoai tây
- + Chi cục BVTV Nam Định sử dụng phòng trừ bệnh trên cây khoai tây
- + Chi cục BVTV Hà tây sử dụng phòng trừ bệnh trên cây rau

Hiệu quả phòng trừ được các địa phương đánh giá là có triển vọng đối với các loại nấm lở cổ rễ.

- Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm tuyến trùng *EBN BIOSTAR* trừ sâu xám hại thuốc lá trên diện tích 6000m² tại Ba Vì-Hà Tây, hiệu quả phòng trừ đạt 87%, trừ bọ hung hại mía tại Thạch Thành-Thanh Hoá hiệu quả phòng trừ đạt 41%.

- Đã tiến hành xây dựng mô hình ứng dụng các chế phẩm hoá sinh kháng sinh *Momosertatin*, *Ditacin* và *Ketomium* trên các loại Cây trồng rau màu, cây ăn quả. Kết quả đang được tiếp tục theo dõi đánh giá.

V. TẬP HUẤN, HUẤN LUYỆN.

Tập huấn nông dân kỹ thuật sử dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng được 10 lớp khoảng 500 lượt người.

VI. ĐÀO TẠO.

- Đề tài tiến hành nghiên cứu kết hợp với đào tạo bao gồm: 1 NCS Tiến sĩ, 4 Thạc sĩ và 16 sinh viên đại học.

Trong đó:

- + Chuyên ngành tuyến trùng sinh học
 - 1 NCS Tiến sĩ
 - 1 Thạc sĩ
 - 6 Sinh viên đã tốt nghiệp
- + Chuyên ngành Nghiên cứu thuốc trừ sâu sinh học *Br*
 - 3 Thạc sĩ (1 đã tốt nghiệp)
 - 10 Sinh viên (4 đã tốt nghiệp).

VII. MUA SẮM TRANG THIẾT BỊ:

Đã tiến hành xong các thủ tục đấu thầu mua nồi lên men vi sinh vật phục vụ thí nghiệm.

VIII. SẢN PHẨM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ (KẾT QUẢ KHCN) CỤ THỂ ĐÃ HOÀN THÀNH

TT	Tên sản phẩm	Đơn vị đo	Số lượng			
			Kế hoạch theo HP	Thực hiện		
				Trước kỳ BC	Trong kỳ BC	Tổng số
1	2	3	4	5	6	7
1.	Các chủng VSV thu thập được	chủng	100	50	21	71
2.	Quy trình sản xuất các chế phẩm sinh học BVTV	Quy trình công nghệ	7	5	2	7
3.	Chế phẩm sinh học tạo ra	Loại chế phẩm	7	5	2	7
4.	Mô hình trình diễn sử dụng các chế phẩm sinh học trừ sâu bệnh hại cây trồng	Mô hình trình diễn	7	5	—	5
5.	Tập huấn kỹ thuật	Người	700	300	200	500
6.	Đào tạo NCS, Th.s, Đại học	Người				21

IX. SỐ LƯỢNG SẢN PHẨM ĐÃ ĐƯỢC SỬ DỤNG HOẶC TIÊU THỤ VÀ DOANH THU BÁN SẢN PHẨM (NẾU CÓ)

TT	Tên sản phẩm	Đơn vị đo	Số lượng	Doanh thu Tr. d	Đơn vị sử dụng
1	NPV-Ha	kg	75	—	5kg/ha
2	Bt Biotox	kg	36	—	1,5kg/ha
3	Bt dạng sữa	lít	100	—	6kg/ha
4	<i>Metarhizium anisopliae</i> và <i>Beauveria bassiana</i>	kg	1210	—	5kg/ha
5	<i>Trichoderma</i>	kg	200	—	5kg/ha
6	Tuyến trùng EPN Biostar	lít	1500	—	?
7	Momocertatin	lít	100	—	?
8	Ditacin và Ketomium	kg	40	—	—

X. CHẤT LƯỢNG, YÊU CẦU KỸ THUẬT ĐỐI VỚI SẢN PHẨM

TT	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Đơn vị đo	Mức chất lượng	
			Kế hoạch	Thực hiện
1	2	3	4	5
1.	Chủng vi sinh vật có hoạt lực cao	chủng		20
2.	<i>NPV-Ha</i> Sâu xanh $0,3 \times 10^9$ OB/mg	Hiệu lực trừ sâu	70-80%	72,19- 75,57%
3.	<i>Bt</i> dạng bột <i>Biotox</i> 16000IU/mg	Hiệu lực trừ sâu	70-90%	80-90%
4	<i>Metarhizium anisopliae</i> $1,6-2,5 \times 10^9$ Bt/gr	Hiệu lực trừ sâu	70-90%	83,8-86,5%
5	<i>Beauveria bassiana</i> $1,6-2,5 \times 10^9$ Bt/gr	Hiệu lực trừ sâu	70-90%	75-86,5%
6	<i>Trichoderma</i> $3-3,2 \times 10^9$ Bt/gr	Hiệu lực trừ bệnh	70-80%	41,5-60%
7	Tuyến trùng <i>EPN Biostar</i> $15-20^6$ IJs	Hiệu lực trừ sâu	70-80%	41%
8	<i>Momocertatin</i> 2IU/lít	Hiệu lực trừ sâu	70-80%	45-65%
9	<i>Difacin</i> 8% và <i>Ketomium</i> $1,5 \times 10^6$ Cfu/g	Hiệu lực trừ bệnh	70-80%	-

XI. NHẬN XÉT ĐÁNH GIÁ CHUNG:

Đề tài đã thực hiện được một số nội dung chính bao gồm:

- Tiến hành điều tra thu thập các chủng sinh vật có ích và tuyển chọn các chủng có hoạt lực cao đối với sâu hại.
- Hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm sinh học và phát triển công nghệ nâng cao hiệu quả chế phẩm.
- Sản xuất được 8 loại chế phẩm bước đầu thử nghiệm đánh giá và áp dụng phòng trừ sâu bệnh có hiệu quả.
- Xây dựng được các mô hình ứng dụng chế phẩm phòng trừ sâu bệnh hại trên một số cây trồng lúa, rau màu, cây công nghiệp và cây ăn quả có hiệu quả.
- Tập huấn được 500 lượt người về kỹ thuật sử dụng chế phẩm sinh học trong hệ thống tổng hợp phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng.

Nhìn chung kết quả triển khai đảm bảo mục tiêu, nội dung đề ra.

XII. DỰ KIẾN KẾ HOẠCH THỰC HIỆN TRONG NĂM 2003:

Tiếp tục các hoạt động chuyên môn: Thu thập, tuyển chọn và bảo quản tập đoàn các chủng vi sinh vật có hoạt lực cao với sâu bệnh.

- Cải tiến từng bước qui trình sản xuất nâng cao chất lượng chế phẩm, sản xuất chế phẩm phục vụ sản xuất.

- Xây dựng các mô hình chuyển giao TBKT ứng dụng chế phẩm có hiệu quả

- Tập huấn, huấn luyện nông dân về kỹ thuật ứng dụng chế phẩm trong hệ thống các biện pháp tổng hợp phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng.

CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI

PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất

Phụ lục 1. DANH SÁCH CÁC ĐƠN VỊ PHỐI HỢP/ĐỀ TÀI NHÁNH

Số TT	Tên đề tài	Chủ nhiệm đề tài	Đơn vị thực hiện
1	Nghiên cứu sản xuất thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng NPV và V-Bt có hoạt lực cao trừ sâu xanh, sâu khoang, sâu keo da láng	Thạc sỹ Hoàng Thị Việt	Viện Bảo vệ thực vật Chèm-Từ Liêm-Hà Nội
2	Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất chế phẩm nấm có ích trừ côn trùng Metarhizium và Beauveria	PGS.TS Phạm thi Thuý	Viện Bảo vệ thực vật Chèm-Từ Liêm-Hà Nội
3	Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất chế phẩm nấm Trichoderma có hoạt lực cao trừ bệnh hại cây trồng.	Thạc sỹ Trần Thị Thuần	Viện Bảo vệ thực vật Chèm-Từ Liêm-Hà Nội
4	Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thuốc sâu sinh học tuyến trùng phòng trừ một số sâu hại cây trồng ở Việt Nam	TS Nguyễn Ngọc Châu	Viện Sinh thái Tài nguyên sinh vật
5	Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc Bt có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng	TS. Ngô Đình Quang Bính	Viện Công nghệ sinh học
6	Sản xuất chế phẩm sinh học Bacillus thuringiensis có hoạt lực cao diệt một số sâu hại cây trồng trong nông nghiệp.	TS. Hoàng Thị Hoài Trâm	Viện Công nghệ thực phẩm
7	Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm trừ sâu đa chức năng Momosertatin (MM) trừ sâu hại rau	GS.TS. Phạm Thị Trân Châu	Trung tâm CNSH Đại học Quốc gia Hà Nội
8	Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc trừ bệnh DITACIN (Thuốc kháng sinh và Ketonium) nấm đối kháng để phòng trừ nấm và vi khuẩn hại cây trồng.	TS. Nguyễn Văn Sơn	Viện Di truyền Nông nghiệp
9	Nghiên cứu sử dụng tuyến trùng trong phòng trừ sinh học sâu hại cây trồng	Th.S Nguyễn Văn Hoa	Viện Bảo vệ thực vật Chèm-Từ Liêm-Hà Nội
10	Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng Metarhizium và Beauveria trừ sâu hại cây trồng.	TS. Nguyễn Thị Lộc	Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long
11	Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu hại rau.	KS. Vũ Khắc Hiếu	Chi Cục BVTV Ninh Bình
12	Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm Bt trừ sâu hại rau	KS. Phùng Vũ Thị Thanh	Chi Cục BVTV Hải Phòng
13	Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm có ích Trichoderma trừ bệnh hại cây trồng cạn	KS. Lê Thị Luyện	Chi Cục BVTC Hà Nam

BÁO CÁO ĐỊNH KỲ TÌNH HÌNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI/DỰ ÁN

Nhận ngày:

...../...../200..

Kỳ

(Kỳ nộp trước 15/9 hàng năm)

Nơi nhận báo cáo:

1. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 39 Trần Hưng Đạo, Hà Nội
+ Vụ Kế hoạch
+ Vụ Quản lý chuyên ngành: Vụ KHCN Nông nghiệp.
2. Văn phòng Chương trình: KC.04 – Viện Di truyền Nông nghiệp.

1	Tên đề tài nhánh: Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học.	2	Ngày báo cáo /...../200 Kỳ:
3	Cơ quan chủ trì đề tài: Viện Bảo vệ thực vật		
Chủ nhiệm Đề tài/Dự án: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất			
4	Thời gian thực hiện: 12 tháng từ 01 / 01 /2003 đến 31 / 12 / 2003.		
5	Tổng kinh phí thực hiện: 800 triệu đồng.		
6	Công việc chính đã được thực hiện tính từ ngày 01/ 01/ 2003 đến kỳ báo cáo		
I. Tiếp tục hoàn thiện công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học : 1. Chế phẩm virus côn trùng NPV và NPV-Bt trừ sâu khoang, sâu xanh 2. Chế phẩm Bt trừ sâu hại rau màu. 3. Chế phẩm nấm côn trùng Beauveria và Metarhizium trừ sâu hại lúa, cây ăn quả và cây công nghiệp. 4. Chế phẩm nấm đối kháng Trichoderma trừ bệnh hại cây trồng. 5. Chế phẩm tuyến trùng EPN trừ sâu hại mía. 6. Chế phẩm hoá sinh Momosertatin trừ sâu hại rau.			
II. Đánh giá hiệu quả chế phẩm đối với các loại sâu bệnh hại cây trồng.			
III. Xây dựng các mô hình ứng dụng chế phẩm trong hệ thống tổng hợp phòng trừ sâu bệnh hại rau màu tại Hải Phòng, Hà Nam và Ninh Bình.			
IV. Tập huấn, huấn luyện kỹ thuật cho nông dân, ứng dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại rau màu, cây lương thực, cây công nghiệp và cây ăn quả. Tuyên truyền phổ biến mở rộng phạm vi ứng dụng.			

7 Số lượng (cộng lũy kế) sản phẩm khoa học và công nghệ (kết quả KHCN) cụ thể đã hoàn thành đến ngày báo cáo. Bảng 1						
TT	Tên sản phẩm	Đơn vị đo	Số lượng			
			Thực hiện			
			Kế hoạch theo hợp đồng	Trước kỳ báo cáo	Trong kỳ báo cáo	Tổng số
1	2	3	4	5	6	7
I	Chế phẩm sinh học BVTV.					
1	Chế phẩm NPV, V-Bt	kg	432	240	140	380
	- Chế phẩm ViHa	kg	120	120	-	120
	- Chế phẩm V-Bt	kg	210	120	60	180
	- Chế phẩm hỗn hợp NPV	kg	102	-	80	80
2	Chế phẩm Beauveria	kg	1588	700	685	1385
3	Chế phẩm Metarhizium	kg	1638	800	785	1585
4	Chế phẩm Bacillus thuringiensis (Bt)	kg	1125	420	337	757
5	Chế phẩm nấm đối kháng Trichoderma	kg	1000	450	100	550
6	Chế phẩm tuyến trùng EPN	lit	12605	2900	2900	5800
7	Chế phẩm Momosertatin	lit	2982	2000	600	2600
II	Mô hình ứng dụng chế phẩm sinh học.					
1	Mô hình rau tại Hà Nam, Ninh Bình, Hải Phòng.	ha	500	200	150	350
2	Mô hình phòng trừ sâu hại nhãn vải, Cam quýt tại các tỉnh phía Nam	ha	45	-	45	45
3	Mô hình phòng trừ bọ cánh cứng hại dừa	cây	800	-	800	800
III	Tập huấn, huấn luyện nông dân	lượt người	2000	500	300	800

8 Số lượng sản phẩm đã được sử dụng hoặc tiêu thụ và doanh thu bán sản phẩm (nếu có).					
Bảng 2					
TT	Tên sản phẩm	Đơn vị đo	Số lượng	Doanh thu (tr.đ)	Đơn vị sử dụng
1	Chế phẩm ViHa, V-Bt, hỗn hợp NPV.	kg	360	sản phẩm cung cấp	Vùng rau các tỉnh.
2	Chế phẩm Beauveria và Metarhizium	kg	2970	miễn phí	Các vùng rau màu, cây công nghiệp và CẢQ.
3	Chế phẩm Bt	kg	757		Các vùng rau.
	Chế phẩm Trichoderma	kg	150		Các vùng trồng rau, màu.
4	Chế phẩm tuyến trùng EPN	lit	3750		Vùng mía, thuốc lá.
5	Chế Phẩm Momosertatin	lit	2000		Các vùng rau

- Ghi chú: Cộng lũy kế các kỳ báo cáo trước

9 Chất lượng, yêu cầu kỹ thuật đối với sản phẩm trong kỳ báo cáo (loại I)				
Bảng 3				
TT	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Đơn vị đo	Mức chất lượng	
			Kế hoạch	Thực hiện
1	2	3	4	5
1	Chế phẩm ViHa, V-Bt, hỗn hợp NN.	Hiệu lực trừ sâu	70-80%	72-75%
2	Bt dạng bột : - Firibiotox P	-	70-90%	80-90%
	-BioBact WP	-	70-90%	70-75%
3	Beauveria bassiana	-	70-90%	75-85%
4	Metarhizium anisople	-	70-90%	75-85%
5	Trichoderma	-	70-80%	45-60%
6	Tuyến trùng EPN	-	70-80%	40-60%
7	Momosertatin	-	70-80%	45-65%

10

Yêu cầu khoa học đối với sản phẩm tạo ra (dạng kết quả II, III)

Bảng 4

TT	Tên sản phẩm	Yêu cầu khoa học	Chú thích
1	2	3	4
1	Các chế phẩm sinh học Bảo vệ thực vật	Có hiệu lực trừ sâu cao, dễ sử dụng, trừ được nhiều loại sâu hại.	
2	Mô hình sử dụng các chế phẩm sinh học trừ sâu bệnh hại cây trồng	Mô hình đạt hiệu quả cao có khả năng phổ biến trên diện rộng	

11

Nhận xét và đánh giá kết quả đạt được (trong thời gian liên quan đến báo cáo)

Tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện quy trình và cải tiến công nghệ nâng cao chất lượng của 6 loại chế phẩm sinh học BVTV.

Đã sản xuất được 5777 kg chế phẩm các loại. Tiến hành đánh giá thử nghiệm và áp dụng mô hình phòng trừ sâu bệnh hại một số cây trồng rau màu, cây ăn quả, cây công nghiệp đạt hiệu quả phòng trừ từ 40-85%.

Tập huấn được 300 lượt người về kỹ thuật áp dụng các chế phẩm sinh học trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu bệnh hại cây trồng.

12

Kinh phí

Bảng 5

a) Kinh phí lũy kế đã được cấp trước kỳ báo cáo là 1900 triệu đồng

b) Kinh phí đã được cấp trong kỳ báo cáo: 400 triệu đồng.

Đợt	Thời gian	Số tiền (triệu đồng)
1	/ 6 / 2003	400
2	/ / 200..	
3	/ / 200..	
Cộng lũy kế (a và b)		2300 triệu đồng

13	Tình hình sử dụng kinh phí để thực hiện Đề tài Dự án tính đến kỳ báo cáo (tr.đồng).							Bảng 6
TT	Thời gian sử dụng	Tổng số tiền đã sử dụng	Trong đó					
			Thuê khoán chuyên môn	Nguyên vật liệu, năng lượng	Thiết bị, máy móc	Xây dựng nhỏ, sửa chữa	khác	
1	2	3	4	5	6	7	8	
	Tổng kinh phí (a và b) Trong đó: <i>a) Ngân sách SNKH</i> - Tính đến kỳ báo cáo - Trong kỳ báo cáo Cộng	 1900 400 2300	 448,2 265,6 713,8	 453,55 75 528,55	 762 762	 40 40 80	 196,25 39,4 235,65	
	<i>b) Các nguồn vốn khác</i>							
Kinh phí đã được cấp và sử dụng tính đến kỳ báo cáo								
	Tổng kinh phí đã được cấp	1900 triệu đồng						
	Tổng kinh phí đã sử dụng	1860 triệu đồng						
	Số kinh phí đã quyết toán	1860 triệu đồng						
Các khoản chi lớn trong thời gian liên quan đến báo cáo								
1.Nghiên cứu hoàn thiện quy trình và sản xuất các chế phẩm sinh học								
Bảo vệ thực vật						1058 triệu		
2.Mua sắm thiết bị						762 triệu		
3.Hợp tác quốc tế, tập huấn tại Trung Quốc						40 triệu		
4.Xây dựng sửa chữa nhỏ						40 triệu		

14	Những vấn đề tồn tại cần giải quyết
Chất lượng chế phẩm sinh học chưa ổn định, hiệu lực trừ sâu có lúc cao lúc thấp. Mô hình áp dụng phụ thuộc vào thời vụ nên trong kỳ báo cáo đến tháng 9/2003 vẫn cần phải tiếp tục theo dõi đánh giá tiếp.	
15	Dự kiến những công việc cần triển khai tiếp trong thời gian tới Tiếp tục cải tiến công nghệ nâng cao chất lượng chế phẩm và tạo được các chế phẩm sinh học trừ sâu đa chức năng có hoạt lực cao với sâu bệnh hại. Sản xuất chế phẩm đủ số lượng theo kế hoạch đã đăng ký trong đề cương. Tiếp tục theo dõi đánh giá chất lượng chế phẩm. Tiếp tục chăm sóc và áp dụng các biện pháp kỹ thuật đánh giá kết quả thực hiện các mô hình ứng dụng các chế phẩm phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng tại các vùng sinh thái khác nhau. Tiếp tục tập huấn, huấn luyện nông dân đảm bảo kế hoạch.
16	Kết luận và kiến nghị Đề tài đã hoàn thành được mục tiêu nội dung đề ra trong thời gian thực hiện kỳ báo cáo. Tiếp tục hoàn thiện quy trình nâng cao chất lượng 6 loại chế phẩm sinh học theo hướng đa chức năng có hoạt lực trừ sâu cao. Đã tiến hành đánh giá hiệu quả chế phẩm và triển khai xây dựng mô hình áp dụng phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng tại các vùng rau ven thành phố, vùng sản xuất cây lương thực, cây màu, cây công nghiệp và cây ăn quả bước đầu có hiệu quả và đang được tiếp tục theo dõi đánh giá. Đã đăng ký được hai loại chế phẩm là Firibiotox-P 16.000IU/mg, dạng bột Firibiotox-C 3 tỷ bào tử/ml dịch cô đặc và ViSl $1,5 \times 10^9$ PIB/g bột, ViHa $1,5 \times 10^9$ PIB/g bột vào danh mục thuốc Bảo vệ thực vật sử dụng ở Việt Nam Tiếp tục thực hiện các nội dung theo kế hoạch năm 2003 đã đăng ký.
Chủ nhiệm Đề tài/Dự án (Họ tên, chữ ký)  PGS.TS. <i>Nguyễn Văn Tấn</i>	Thủ trưởng cơ quan chủ trì Đề tài/Dự án (Họ tên, chữ ký, đóng dấu)  PHÓ VIỆN TRƯỞNG TS. <i>Phan Quang Tiến</i>

CHƯƠNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC KC-04
NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ
SINH HỌC GIAI ĐOẠN 2001-2005

BÁO CÁO
THỰC HIỆN ĐỀ TÀI DỰ ÁN
(Một năm một lần, trước 31/12 hàng năm)

TÊN ĐỀ TÀI:

“NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SỬ DỤNG THUỐC SÂU SINH HỌC
ĐA CHỨC NĂNG CHO MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG
BẰNG KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC”

MÃ SỐ : KC 04-12
CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI : PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất
CƠ QUAN CHỦ TRÌ : Viện Bảo vệ thực vật – Bộ Nông nghiệp và PTNT

Hà Nội, tháng 12 năm 2004

**BÁO CÁO THỰC HIỆN
ĐỀ TÀI / DỰ ÁN**

Nhận ngày
...../...../ 200...
Kỳ :

(Một năm 1 lần, trước ngày 31/12 hàng năm)

Nơi nhận báo cáo :

1. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường, 39 Trần Hưng Đạo, Hà Nội
+ Vụ kế hoạch
+ Vụ quản lý chuyên ngành:.....
2. Văn phòng chương trình : KC.04
Viện di truyền Nông nghiệp, Đường Phạm Văn Đồng – Cầu Giấy – Hà Nội

1	Tên đề tài/Dự án: <i>Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học</i>	2	Ngày báo cáo / / 200... Kỳ :	
3	Cơ quan chủ trì: Chủ nhiệm Đề tài/ Dự án: PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất			
4	Thời gian thực hiện : 12 tháng từ 01/01/2004 đến 31 /12/2004			
5	Tổng kinh phí thực hiện : 200 triệu đồng			
6	Thống kê các kết quả đạt được đến kỳ báo cáo của Đề tài/ Dự án 6.1 Về số lượng (cộng tích lũy từ khi bắt đầu thực hiện Đề tài/Dự án)			
Bảng 1				
TT	Tên kết quả tạo ra	Đơn vị tính	Số lượng	Ghi chú
1	Số sản phẩm KHCN tạo ra (mẫu, sản phẩm, vật liệu, thiết bị, giống con, v.v ...) - Đã thu thập và phân lập được 70 chủng vi sinh vật và tuyển chọn được 26 chủng có hoạt lực cao với sâu bệnh - Đã đăng ký được 7 chế phẩm vào danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam - Đã chuyển giao được 2 công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học là : công nghệ sản xuất chế phẩm NPV và <i>Trichodema</i> cho chi cục BVTV Hải Phòng	Chủng Chế phẩm Công nghệ	70 7 2	
	- Chế phẩm virus đa diện NPV	Kg	1.500	

	-V-Bt	Kg	5.887	
	-Chế phẩm vi khuẩn <i>Bt Biotox</i> dạng bột	Kg	1.100	
	-Chế phẩm vi khuẩn <i>Bt</i> dạng sữa	Lít	1.100	
	-Chế phẩm nấm côn trùng <i>Metarhizium anasoplide</i>	Kg	3.275	
	- Chế phẩm nấm côn trùng <i>Beuveria bassiana</i>	Kg	2.355	
	- Chế phẩm tuyến trùng <i>EPN Biostar</i>	Lít	15.930	
	- Chế phẩm nấm đối kháng <i>Trichoderma</i>	Kg	2.100	
	Mô hình ứng dụng chế phẩm sinh học - Mô hình rau tại Hà Nam, Ninh Bình, Hải Phòng, Hà Tây, Vĩnh Phúc - Mô hình phòng trừ sâu hại nhãn vải, cam quýt tại các tỉnh phía Nam - Mô hình phòng trừ bọ cánh cứng hại dừa tại Cần Thơ và Bình Định	Ha	500	
	Tập huấn, huấn luyện nông dân sử dụng chế phẩm sinh học	Lượt người	3707	
	- Chế phẩm hoá sinh <i>Momosertatin</i>	Lít	3.443	
2	Số quy trình công nghệ/kỹ thuật tạo ra	Quy trình công nghệ	7	
3	Số sản phẩm KHCN khác (phương pháp, tiêu chuẩn, quy hoạch, chương trình máy tính, v.v...)	-	-	
4	Số bài báo khoa học đã được xuất bản trên các tạp chí khoa học quốc tế	Bài	10	
5	Số bài báo khoa học đã được xuất bản trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước	Bài	30	
6	Số hợp đồng chuyển giao công nghệ, dịch vụ KHCN, tiêu thụ sản phẩm đã ký kết	Hợp đồng	4	Hợp đồng thử nghiệm
7	Số doanh thu từ các hợp đồng nói trên	-	Sản phẩm cung cấp miễn phí	
8	- Số cán bộ đào tạo, nâng cao trình độ	Người	27	
	- Số cán bộ được đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ	Người	5	
	- Số cán bộ được đào tạo qua HTQT từ 3 tháng trở lên	Người	01	
9	Số lượt người được cử đi trao đổi, hợp tác quốc tế về KHCN	Người	4	

10	Số đơn vị đăng ký sáng chế đã nộp	-	-	
11	Số bằng độc quyền sáng chế đã được cấp	Bằng	1	
12	Số bằng độc quyền giải pháp hữu ích đã được cấp	-	-	
13	Số bằng độc quyền mẫu hữu ích đã được cấp	-	-	
14	Số giải thưởng về khoa học công nghệ đã được nhận	Giải thưởng	4	

6.2 Kết quả KHCN nổi bật (nêu tóm tắt và chỉ tiêu đạt được của 1-2 kết quả điển hình)

1. Đã thu thập phân lập được 70 chủng vi sinh và tuyển chọn được 26 chủng có hoạt lực cao với sâu bệnh.

2. Hoàn thiện 7 quy trình và xây dựng được 7 pilot sản xuất chế phẩm sinh học BVTV (NPV-Bt, NPV, Bt, *Metarhizium* và *Beauveria*, *Trichoderma*, tuyến trùng có ích *Biostar* và *Momosertatin*).

- Trong đó có:

+ Bảy chế phẩm đã được đăng ký vào danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam, (Quyết định của Bộ Nông nghiệp và PTNT số 46/2001/QĐ/BNN-BVTV, ngày 19/04/2001 và số 42/2003/QĐ-BNN, ngày 29/01/2003).

+ Hai chế phẩm Bt (*Bacillus thuringiensis*, *Kurstaki*) trừ sâu hại rau có tên thương mại:

- *Firibiotox* – P 16.000 IU/mg bột

- *Firibiotox* – C 3 tỷ bào tử/ml dịch cô đặc.

Số đăng ký 02/03 SRN ngày 12/02/2003

+ Hai chế phẩm NPV (*Nuclear polyhedrosis Virus*) trừ sâu hại rau màu, cây công nghiệp, có tên thương mại:

- *ViSI* 1,5 x 10⁹ PIB/g bột.

- *NPV-Ha* 1,5 x 10⁹ PIB/g bột.

Số đăng ký 02/03 SRN ngày 12/02/2003

+ Hai chế phẩm trừ côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria* có tên thương mại:

- *Boverit* 5,5 x 10⁸ bào tử/g = *Beauveria bassiana* Vuill.

Số đăng ký 92/01 SRN ngày 02/05/2001

- *Mat* 5,5 x 10⁸ bào tử/g = *Metarhizium anisopliae* Sorok

- (Chế phẩm của Viện bảo vệ thực vật)

Số đăng ký 14/01 FR ngày 02/05/2001

+ Hai chế phẩm nấm côn trùng *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* có tên thương mại.

- *Ometar*-1,2x10⁹bt/gr và *Biovip* 1,5x10⁹ bt/gr (chế phẩm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long)

Số đăng ký ngày 27/5/2003, số 63/2003/QĐ-Bộ Nông nghiệp và PTNT

Các chế phẩm được sử dụng phòng trừ sâu hại rau, màu, cây công nghiệp, cây lâm nghiệp đạt hiệu quả từ 70-85%.

+ Một chế phẩm *Trichoderma* có tên thương mại *TRIB*, 3,2x10⁹ bào tử/gam

Số đăng ký 212/04 ECR cấp ngày 29 tháng 4 năm 2004

Chế phẩm được sử dụng phòng trừ bệnh héo cây do nấm đất *Rhizocronia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, lở cổ rễ, thối hạch.

3. Xây dựng được 5 mô hình ứng dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại lúa, rau màu, cây công nghiệp, lâm nghiệp và cây ăn quả tại các tỉnh Hà Tây, Vĩnh Phúc, Hải Phòng, Ninh Bình và Hà Nam.

4. Tập huấn được trên 3707 lượt người về kỹ thuật sử dụng các chế phẩm sinh học và áp dụng phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng trên diện tích hơn 500 ha.

5. Đào tạo được 5 cán bộ có trình độ trên đại học, 22 sinh viên trong đó có nhiều sinh viên đã tốt nghiệp.

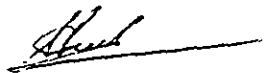
6. Tổ chức hội nghị quốc tế khu vực Thái bình dương về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường (17-21/11/2003).

7. Cử cán bộ tham dự hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc lần thứ 2 tại Hà Nội

8. Đã tham gia 3 Hội nghị Khoa học toàn quốc về công nghệ sinh học; đã được cấp 2 bằng độc quyền sáng chế nấm *Metarhizium anisopliae* số 3451 ngày 07 tháng 04 năm 2003 và Phương pháp sản xuất nấm *Beauveria bassiana* số 0141 ngày 18 tháng 02 năm 2004; Đã được Bộ Khoa học công nghệ & Liên hiệp các Hội Khoa học Việt Nam tặng cờ thi đua và biểu trưng vàng về thành tích áp dụng xuất sắc các công trình đạt giải thưởng khoa học công nghệ Việt Nam vào sản xuất năm 2002-2003; 2 giải thưởng Bông lúa vàng Việt Nam về sản xuất chế phẩm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* 1 giải thưởng hội thi sáng tạo kỹ thuật tỉnh Cần Thơ năm 2003.

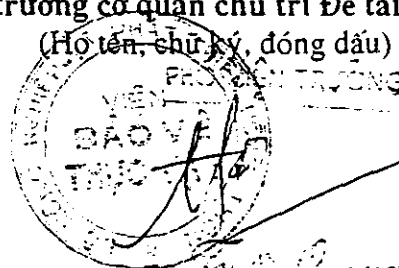
9. Đã có 40 bài báo chuyên ngành đăng trong và ngoài nước về sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

Chủ nhiệm đề tài
(Họ tên, chữ ký)



PGS.TS Nguyễn Văn Thước

Thủ trưởng cơ quan chủ trì Đề tài/ Dự án
(Họ tên, chữ ký, đóng dấu)



Thủ trưởng cơ quan chủ trì

**CHƯƠNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG NGHỆ
CẤP NHÀ NƯỚC KC-04**

**(Nghiên cứu Khoa học và phát triển công nghệ sinh học
giai đoạn 2001-2005)**

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SỬ DỤNG THUỐC SÂU SINH
HỌC ĐA CHỨC NĂNG CHO MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG
BẰNG KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC.**

Mã số : KC.04.12
Cơ quan chủ trì : VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất
Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật

Hà nội, tháng 9 năm 2004

CHƯƠNG TRÌNH KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP NHÀ NƯỚC KC-04
“NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC”
GIAI ĐOẠN 2001 - 2005

BÁO CÁO THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học

Mã số : KC.04.12
Cơ quan chủ trì : VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
Thời gian thực hiện : 36 tháng (từ 01/01/2002 đến 31/12/2004)
Tổng kinh phí thực hiện : 3.000 triệu đồng trong đó từ Ngân sách SNKH: 2.900 triệu đồng

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI:

PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất Viện trưởng Viện Bảo vệ thực vật

CÁC CƠ QUAN THAM GIA THỰC HIỆN ĐỀ TÀI:

- Viện Bảo vệ thực vật
- Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật
- Viện Công nghệ sinh học
- Trung tâm CNSH, Đại học quốc gia Hà Nội
- Viện Công nghiệp thực phẩm
- Viện lúa đồng bằng sông Cửu Long
- Chi cục BVTV Ninh Bình
- Chi cục BVTV Hà Nam
- Chi cục BVTV Hải Phòng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm qua, sản xuất nông nghiệp nước ta đã đạt được nhiều thành tựu to lớn, góp phần quan trọng vào ổn định và phát triển kinh tế xã hội, an ninh lương thực bước đầu được bảo đảm, đời sống của nhân dân ngày càng được nâng lên. Đạt được những thành tựu trên đây có một phần đóng góp đáng kể của khoa học công nghệ trong đó có KHCN Bảo vệ thực vật (BVTV).

Tuy nhiên việc thâm canh tăng vụ, chuyển đổi cơ cấu cây trồng, đưa các giống mới (đặc biệt là lúa, rau, cây ăn quả ...) có tiềm năng năng suất cao vào sản xuất nông nghiệp làm cho tình hình dịch hại cây trồng nông nghiệp cũng trở nên đa dạng, phức tạp. Việc sử dụng ngày càng nhiều các loại phân bón và thuốc BVTV có nguồn gốc hoá học đã gây nên mức độ báo động về sự kháng thuốc của nhiều loài sâu bệnh, sự nhiễm độc nghiêm trọng đối với người và môi trường. Đã có hàng nghìn ca nhiễm độc cấp tính thuốc BVTV phải đưa vào bệnh viện cấp cứu. Hàng trăm trường hợp tử vong do sự cố rủi ro, nhầm lẫn, phun rải thuốc không đúng kỹ thuật hoặc do ăn phải lương thực, thực phẩm chứa dư lượng hoá chất BVTV cao.

Để giảm thiểu lượng hoá chất BVTV trong sản xuất nông nghiệp, một trong những hướng đi của ngành BVTV Việt Nam là nghiên cứu sản xuất và sử dụng các chế phẩm sinh học BVTV.

Từ những năm 1990 trở lại đây, việc nghiên cứu sản xuất và sử dụng các chế phẩm sinh học BVTV bằng công nghệ sinh học (CNSH) đã được Nhà nước và các cơ quan khoa học quan tâm đầu tư và đã đạt được những kết quả bước đầu. Những chế phẩm như Bt, NPV, nấm côn trùng có ích (*Metarhizium*, *Beauveria*), nấm đối kháng *Trichoderma*, vi khuẩn huỳnh quang (*Pseudomonas fluorescent*)... khá an toàn với người, động vật và các vi sinh vật có ích, đã góp phần đáng kể vào chiến lược quản lý tổng hợp dịch hại (IPM) trong nền sản xuất nông nghiệp an toàn, xanh và bền vững của nước ta.

Tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu sử dụng những công nghệ sinh học hiện đại tạo ra các chế phẩm sinh học đa chức năng trừ sâu bệnh với quy mô lớn hơn, chất lượng tốt, đạt hiệu quả phòng trừ cao, thuận tiện và dễ sử dụng, nâng cao thị phần thuốc trừ sâu sinh học lên 10% trong hệ thống bảo vệ cây trồng nông lâm nghiệp nhằm giảm thiểu lượng thuốc hoá học để bảo vệ sức khỏe con người, động vật và môi trường. Đó là những vấn đề cấp thiết không chỉ đối với nước ta mà còn mang tính toàn cầu.

Sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng đáp ứng được những yêu cầu trên. Với sự phối hợp của các cơ quan: Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật; Viện Công nghệ sinh học; Trung tâm CNSH, Đại học quốc gia Hà Nội; Viện Công nghệ thực phẩm; Viện lúa đồng bằng sông Cửu long; Chi cục BVTV Ninh Bình; - Chi cục BVTV Hà Nam; Chi cục BVTV Hải Phòng, từ năm 2001- 2004 Viện Bảo vệ thực vật đã chủ trì thực hiện đề tài : ***Nghiên cứu sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học, thuộc chương trình khoa học công nghệ cấp nhà nước KC-04 “Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ sinh học”.***

MỤC TIÊU

- Cải tiến, hoàn thiện các quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học BVTV để giảm giá thành, hiệu quả cao và sản xuất với số lượng lớn phục vụ sản xuất.
- Giúp cán bộ kỹ thuật địa phương và nông dân nắm được phương pháp sản xuất và sử dụng các chế phẩm sinh học BVTV nhằm bảo vệ sức khỏe con người, động vật và môi trường.

NỘI DUNG

1. Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng bằng công nghệ sinh học để phòng trừ dịch hại trên một số loại cây trồng (rau, màu, cây ăn quả, cây công nghiệp, cây lâm nghiệp...).

- Chế phẩm sinh học virus côn trùng (NPV) và *NPV-Bt* trừ sâu hoạt lực cao.
- Chế phẩm sinh học Bt trừ sâu
- Chế phẩm sinh học nấm côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria*.
- Chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* trừ bệnh hại cây trồng
- Chế phẩm tuyến trùng sinh học EPN trừ sâu xám hại thuốc lá và sâu hại mía
- Chế phẩm hoá sinh *Momosertatin* trừ sâu hại rau.
- Chế phẩm kháng sinh *Ditacin* và nấm đối kháng *Ketomium* trừ bệnh hại cây trồng.

2. Đánh giá hiệu quả thuốc sâu sinh học đối với các loại sâu bệnh hại cây trồng.

3. Xây dựng các mô hình ứng dụng các thuốc sâu sinh học trong hệ thống phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng tại các tỉnh Hà Nội, Hà Tây, Hải Phòng, Hà Nam và Ninh Bình.

4. Tập huấn hướng dẫn cán bộ kỹ thuật và nông dân ứng dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trong phòng trừ dịch hại cây trồng.

5. Huấn luyện.

6. Đào tạo.

7. Mua sắm trang thiết bị.

8. Hợp tác quốc tế.

9. Những thành tích nổi bật.

KẾT QUẢ THỰC HIỆN

I. NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ VÀ HOÀN THIÊN QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TRỪ SÂU SINH HỌC CÓ NGUỒN GỐC VIRUS VÀ VI KHUẨN.

1. Chế phẩm NPV-Bt

Thu thập chọn lọc nguồn virus NPV sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*) có hoạt lực cao để sản xuất chế phẩm. Đã thu thập được 46 mẫu GV (granular virus) virus sâu tơ (*Plutella xylostela*) trên xu hào, bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc và Từ Liêm, Hà Nội.

- Thu thập được 47 mẫu virus NPV sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) trên lạc, cà chua ở Sóc Sơn – Hà Nội, Mê Linh- Vĩnh Phúc và An Hải- Hải Phòng.

- Thu thập được 41 nguồn virus NPV trên sâu khoang trên lạc, xu hào, bắp cải ở Từ Liêm- Hà Nội, Đan Phượng- Hoà Đức- Hà Tây, Mê Linh- Vĩnh Phúc.

- Thu thập được 10 mẫu virus NPV sâu cuốn lá lớn trên lúa ở Từ Liêm- Hà Nội.

Liên tục nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang với số lượng lớn để lấy nhiễm NPV phục vụ cho việc sản xuất chế phẩm và thí nghiệm sinh học.

- Lấy nhiễm được 224.600 sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) để sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt. Tỷ lệ sâu nhiễm virus là 81,6%. Tỷ lệ sâu xanh chết do virus đạt trung bình 84%. Lấy nhiễm được 27.800 sâu xanh và 37.200 sâu khoang (*Spodoptera litura*) tuổi 4 để sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt. Tỷ lệ sâu bị nhiễm virus là 85,6%

- Sản xuất được 1500kg chế phẩm NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước với liều lượng 4×10^7 PiB/g để phòng trừ sâu xanh, sâu khoang hại lạc cho hiệu quả 76-77% trừ sâu tơ hại rau đạt 75-89% sau 10 ngày phun thuốc với liều lượng sử dụng 1,0-1,2kg/ha cung cấp cho các địa phương Hà Nội, Hải Phòng, Hà Tây, Ninh Bình, Vĩnh Phúc trên 50 ha rau màu.

- Sản xuất được 5887 kg chế phẩm hỗn hợp Vi Ha, Vi S_L, V-Bt có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02% đạt 66,7-79,9% sau 5-7 ngày phun thuốc và hiệu lực trừ sâu khoang đạt 76,6%-80,5% sau 7 ngày phun thuốc.

Chất lượng chế phẩm NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước đạt 4×10^7 PiB/g, Vi Ha: 4×10^7 PiB/gr; Vi S_L: 4×10^7 PiB/g.

Sử dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu xanh, sâu khoang hại lạc cho hiệu quả 76-77%, trừ sâu tơ hại rau đạt 75-89% sau 10 ngày phun thuốc hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02% đạt 66,7-79,9% sau 5-7 ngày phun thuốc và hiệu lực trừ sâu khoang đạt 76,6%-80,5% sau 7 ngày phun thuốc. Hiệu quả trừ sâu khoang trên xu hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt đạt 75,6-80,5% sau 7 ngày thí nghiệm, trừ sâu tơ đạt 82,5-85,7% sau 5 ngày xử lý thuốc.

2. Chế phẩm Bt

Chọn lựa các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập ở Việt Nam có hoạt tính diệt sâu cao. 12 chủng Bt trong bộ sưu tập giống đã được nghiên cứu về sự phát triển tạo và tách bào tử, tinh thể độc tố diệt côn trùng khi nuôi cấy trên các môi trường chứa glucoza, cao nấm men, pepton và các muối khoáng.

+ Đã chọn được 8 chủng *Bt* có hoạt lực diệt sâu tơ cao, trong đó có 7 chủng là *Bt Kurstaki* và 1 chủng là *Bt entomocidus*. Đã chọn được 3 chủng giống *Bt* trên đều mang gene độc tố cry 1, tạo tinh thể độc tố diệt côn trùng trọng lượng phân tử 130 và 67kDa (kilodalton), có hoạt tính diệt sâu cao (chỉ số LD₅₀ từ 0,09-0,92) đối với sâu tơ (*Plutella xylostela*) và 1,98-3,02 đối với sâu xanh (*Helicoverpa armigera*). Từ các chủng trên sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học mang tên *Firibiotox*.

- Đã cải tiến công nghệ nhân giống lên men trên thiết bị lên men 500lit và 1500lit. Lựa chọn được phương án nhân giống, giống ổn định đạt hiệu quả lên men cao rút ngắn thời gian lên men nâng cao số lượng tinh thể diệt sâu.

- Đã sản xuất được 300l chế phẩm dịch cô đặc *Firibiotox-C* 3 tỷ bào tử/ml và 600kg dạng bột *Firibiotox - P* 16.000 IU/mg để trừ sâu hại rau, đậu đạt 72,2-84,7% hiệu quả trừ sâu.

+ Bằng phương pháp công nghệ gene đã tạo được 2 chủng *Bt* tổ hợp *Bacillus thuringiensis* VCM2-8 và *Bacillus thuringiensis* VCM2-7 mang tổ hợp gene *CryI A*, *CryIC*, *CryID* có hoạt phổ diệt sâu rộng. Có thể diệt cùng một lúc sâu khoang, sâu xanh, sâu keo da láng và sâu tơ mà trước đây các chủng *Bt* thông thường không có đặc tính này. Từ chủng *Bt* tái tổ hợp *Bt VCM2-8* đã sản xuất được 800 lít chế phẩm *Biobact 28FC* dạng sữa có hoạt lực 8.000IU/ml và 500kg chế phẩm *Biobac 28WP* dạng bột thấm nước hoạt lực 16.000 IU/mg để phòng trừ các loại sâu tơ, sâu khoang, sâu keo da láng. Hiệu quả trừ sâu của các chế phẩm trên đạt 85,5 và 87,8% sau 5 ngày phun thuốc.

+ Nghiên cứu ứng dụng cải tiến công nghệ sản xuất chế phẩm *Bt* trên giá thể rắn theo phương lên men hiếu khí từ Trung tâm di truyền và công nghệ sinh học Cuba rất phù hợp với điều kiện sản xuất của Việt Nam.

- Sử dụng lên men chìm cho sản xuất giống cấp 1 và lên men hiếu khí cho sản xuất chế phẩm. Cải tiến môi trường lên men sản xuất đảm bảo yếu tố cân bằng dinh dưỡng hơn và điều kiện hiếu khí.

- Chọn lọc nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa theo hướng ứng dụng phục vụ cho công nghệ này. Đã phân lập được 24 dòng vi khuẩn có hiệu lực trừ sâu trừ sau 3 ngày.

Đặc biệt có 2 dòng vi khuẩn có độc tính cao, có khả năng gây chết 95% sâu tơ trong vòng 2 ngày. Đã sản xuất được 365kg chế phẩm cung cấp cho các địa phương để phòng trừ sâu hại rau.

Công nghệ đơn giản của Cuba rất phù hợp với điều kiện Việt Nam có thể sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có trong nước làm giá thể cho sản xuất chế phẩm. Hiệu quả trừ sâu đạt 55-60% sau 4-5 ngày sử dụng.

3. Chế phẩm sinh học nấm côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria* trừ côn trùng.

+ Đã phân lập và tuyển chọn bổ sung thêm một số chủng nấm mới bao gồm : 9 chủng nấm *Metarhizium anisopliae* trên 7 loại sâu hại khác nhau như bọ cánh cứng hại dừa ở Bến Tre, sâu đo hại quế tại Quảng Nam, sâu xanh bướm trắng hại rau, sâu xanh đục quả đậu xanh, châu chấu hại lúa, ruồi đục quả cà phê, bọ xít xanh hại đậu tương. 3 chủng nấm *Metarhizium* trên bọ dừa ở Bến Tre, bọ xít nhện ở Hà Nội, sùng hại mía ở Thanh Hoá, 5 Chủng nấm *Beauveria* trên sâu róm thông ở Thanh Hoá, sâu xanh bướm trắng, bọ xít xanh ở Hà Nội, một đục quả cà phê và bọ hại dừa ở Phú Quốc.

+ Đã phân lập và tuyển chọn bổ sung thêm 11 chủng nấm mới (6 chủng nấm xanh và 5 chủng nấm trắng) và đã chọn được 3 chủng có hoạt lực diệt côn trùng rất cao và hiện đang dùng để sản xuất chế phẩm.

Nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm đã có từ trước đây bằng cách truyền qua côn trùng rồi phân lập và thuần hoá lại để nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm *Metarhizium* và *Beauveria*.

Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng nếu nấm trắng hoặc nấm xanh được nuôi cấy và truyền qua 4-5 lần trên môi trường nhân tạo thì khả năng sinh trưởng phát triển sự sinh bào tử và độ độc của chúng đối với côn trùng sẽ giảm đi một cách có ý nghĩa so với nấm mới trích từ côn trùng. Nhưng sau khi lây nhiễm nấm trở lại ký chủ của nó rồi phân lập và tạo thuần trở lại thì những đặc tính sinh học này của chúng đã được phục hồi trở lại.

Trong 3 năm qua chúng tôi đã nghiên cứu và cải tiến quy trình công nghệ để sản xuất chế phẩm *Metarhizium* và *Beauveria* đồng thời cải tiến các khâu kỹ thuật khác để hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm nấm *Metarhizium* và *Beauveria*, kết quả đã đạt công suất rất cao chất lượng chế phẩm tốt đạt $5,2 \times 10^9$ bt/g

Sản xuất được 2.355 kg *Beauveria* và 3275 kg *Metarhizium* trừ sâu keo da láng, sâu khoang ăn lá đậu tương cà sấu xanh đục quả đậu xanh trên diện tích 4 ha tại Thạch Môn- Thạch Hà- Hà Tĩnh. Hiệu quả của nấm với sâu xanh tương đối cao sau 7-10 ngày phun là 68,2%-72,3%, còn của nấm *Metarhizium* đạt cao hơn từ 69,2-75,1%. Hiệu quả của nấm *Metarhizium* trừ bộ hại dừa trên diện tích 15ha ở 3 huyện Phù Cát-Phù Mỹ và Hoài Nhơn- Bình Định đạt 63,63%-81,42% sau 2 tuần phun.

4. Chế phẩm tuyến trùng EPN trừ sâu xám hại thuốc lá và bộ hung hại mía

Đã tuyển chọn được 7 chủng tuyến trùng bản địa bao gồm S-BV1, S-TN 10, S-XS4, S-TK10, S-TX1, H-MF11 và H-NT3 đủ tiêu chuẩn của một chế phẩm sinh học BIOSTAR để phòng trừ sâu xám hại thuốc lá và bộ hung hại mía. Đây là các chủng EPN bản địa rất thích hợp cho việc sản xuất công nghệ và phòng trừ. Đã phân lập duy trì và bảo quản thường xuyên 7 vi khuẩn *Xenonhabdus* và *Photorhabdus* cùng 7 chủng tuyến trùng EPN sử dụng làm nguyên liệu ban đầu cho sản xuất công nghệ *invitro*

Đã sản xuất thành công thuốc sinh học tuyến trùng bằng công nghệ *invitro* trong môi trường chicken offal. Bằng công nghệ *invitro* đã sản xuất hơn 15.930 lít chế phẩm EPN đạt tiêu chuẩn cho phòng trừ sinh học $15-20 \times 10^8$ IJs.

5. Chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* trừ bệnh hại cây trồng

- Thu thập bổ sung thêm 4 nguồn nấm đối kháng *Trichoderma* làm cơ sở cho việc tuyển chọn nguồn có triển vọng phục vụ sản xuất chế phẩm.

- Đánh giá bổ sung khả năng ức chế của nấm *Trichoderma* đối với một số nấm bệnh (nấm giống sản xuất chế phẩm là: *Trichoderma harzianum* có hoạt lực cao được sử dụng làm nguồn nấm gốc để nhân nuôi, nấm phát triển tốt sinh khối lớn)

- Đưa ra quy trình sản xuất sử dụng chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma*.

- Đã sản xuất được 2.100 kg chế phẩm nấm *Trichoderma* đạt $3,2 \times 10^9$ bt/gr cung cấp cho các Chi cục Bảo vệ thực vật Ninh Bình, Hải Phòng và các địa phương Chương Mỹ, Hoài Đức – Hà Tây để trừ bệnh hạch do nấm *Sclerotinia*, bệnh lở cổ rễ do nấm *Rhizoctonia* ở giai đoạn cây con trên cây trồng cạn: rau, đậu đỗ và bệnh héo vàng do nấm *Fusarium*. Hiệu quả phòng trừ đối với các bệnh trên là 53-61%.

Cơ chế tác động của nấm đối kháng *Trichoderma*

Trong tự nhiên, các loài vi sinh vật trong quá trình sống đều có mối liên quan với nhau. Mối quan hệ đó thể hiện qua quan hệ cộng sinh, quan hệ đối kháng.

Sự biểu hiện tính đối kháng giữa các vi sinh vật rất đa dạng, gồm nhiều kiểu tác động khác nhau giữa loài vi sinh vật này với loài vi sinh vật khác. Vi sinh vật đối kháng thường tiết ra các chất kháng sinh, men hoặc các chất có hoạt tính sinh học cao khác. Các chất này thường độc hại đối với vật gây bệnh cây. Vi sinh vật đối kháng cạnh tranh sử dụng điều kiện sống của vật gây bệnh cây; hoặc vi sinh vật đối kháng có thể ký sinh lên vật gây bệnh cây.

Rất nhiều nghiên cứu về vi sinh vật đã cho thấy nấm *Trichoderma* là một trong những nhóm đứng đầu của vi sinh vật trong đất có tính đối kháng và được nghiên cứu rộng rãi ở nhiều nơi trên thế giới (Martin et al., 1985; Seiketov, 1982) [5,9]. Việc nghiên cứu tính đối kháng, đặc biệt là tác động chọn lọc của những chất đặc trưng do nấm *Trichoderma* tiết ra được nhiều nhà khoa học quan tâm và tiến hành nghiên cứu nhằm giải thích cơ chế tác động của nhóm nấm này đối với các vật gây bệnh cho cây trồng và sử dụng chúng trong phòng chống bệnh hại cây trồng. Tác động đối kháng của nấm *Trichoderma* đối với vi sinh vật gây bệnh cây được thông qua bởi một số cơ chế sau đây:

a) Cơ chế ký sinh:

Theo R. Weindling mô tả từ năm 1932 (Adams, 1990; Snyder et al., 1976) [1,10], tác giả gọi đó là hiện tượng "*giao thoa sợi nấm*". Trước tiên sợi nấm *Trichoderma* vây xung quanh sợi nấm gây bệnh cây, sau đó các sợi nấm *Trichoderma* thắt chặt lấy các sợi nấm, cuối cùng mới thấy nấm *Trichoderma* xuyên qua sợi nấm bệnh làm thủng màng ngoài của nấm bệnh, gây nên sự phân huỷ các chất nguyên sinh trong sợi nấm bệnh.

Những nghiên cứu chi tiết gần đây bằng kính hiển vi điện tử về vùng "*giao thoa sợi nấm*" cho thấy cơ chế chính của hiện tượng ký sinh ở nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh là sự xoắn của sợi nấm *Trichoderma* quanh sợi nấm vật chủ, sau đó xảy ra hiện tượng thủy phân thành sợi nấm vật chủ, nhờ đó mà nấm *Trichoderma* xâm nhập vào bên trong sợi nấm vật chủ. Điều này dẫn đến hiện tượng chất nguyên sinh ở sợi nấm vật chủ bị phá rối từng phần hoặc hoàn toàn. Cuối cùng, nguyên sinh chất bị mất đi và sợi nấm vật chủ bị phá vỡ, giải phóng các sợi nấm đang sinh sản của nấm *Trichoderma*. Hiện tượng tan rã Kitin có ở vùng xung quanh nơi xâm nhập của nấm *Trichoderma* (Dubey, 1995; Inbar et al., 1996; Mikala-Doukaga et al., 1979; Rousseau et al., 1996) [3,4,6,8].

Một điều quan trọng cho sự ký sinh của nấm *Trichoderma* trên nấm gây bệnh cây là các conidi của nấm *Trichoderma* sau khi mọc mầm tạo thành sợi nấm phải tiếp xúc được với nấm vật chủ và phải hình thành được thể giác bám. Thể giác bám này sẽ bám chắc và xâm nhập vào trong thành tế bào của nấm vật chủ. Tỷ lệ ký sinh sẽ tăng lên khi tăng sự tiếp xúc trực tiếp của nấm *Trichoderma* với nấm vật chủ (Inbar et al., 1996; Pereverzeva et al., 1995) [4,7].

b) Cơ chế kháng sinh:

Nấm *Trichoderma* có khả năng sinh ra một số kháng sinh. Khả năng sinh ra chất kháng sinh của các loài, các chủng không giống nhau. Chúng gồm:

* *Gliotoxin*: là chất kháng sinh được R.Weindling và O. Emerson mô tả năm 1936 do nấm *Trichoderma lignorum* tạo thành. *Trichoderma* sinh kháng sinh *Gliotoxin* với điều kiện hàm lượng oxy phải cao. Chất *Gliotoxin* được tích lũy nhiều trong dịch môi trường. Sự tích lũy tối đa chất *Gliotoxin* thường ở giai đoạn phát triển sớm của nấm *Trichoderma*. Chất *Gliotoxin* có phổ tác động rộng lên nhiều vi sinh vật: vi khuẩn, nấm (*Ascochyta, pisi; Botrytis, R.solani*).

* *Viridin*: là chất kháng sinh thứ hai do nấm *Trichoderma* tạo thành trong hoạt động sống của chúng (Bilal, 1974; Martin et al., 1975; Seiketov, 1982) [2,5,8]. Chất kháng sinh này được phát hiện vào năm 1945 (dẫn theo Seiketov, 1982) [8]. *Viridin* độc hơn rất nhiều so với *Gliotoxin* và có hoạt tính chống nấm cao.

Ngoài ra, đã xác định được một số chất kháng sinh khác do nấm *Trichoderma* sinh ra như: chất kháng sinh U-21693 được Meyer phát hiện năm 1996. Năm 1975, ở Nhật Bản, các tác giả Atsushi, Shunsuke đã phát hiện được 2 chất kháng sinh: *Trichoderma* và *Dermadin* có trong dịch nuôi cấy loài *T.koningii* và *T.aureoviride* (dẫn theo Seiketov, 1982) [8].

Nấm *Trichoderma* còn có khả năng sinh ra một số chất kháng sinh dễ bay hơi có hoạt tính sinh lý cao. Theo Hutchinson (1973) thì thành phần chính của những chất này là khí Cacbonic (CO₂) và etanol (Seiketov, 1982) [8].

c) Tác động của men:

Nhiều loài *Trichoderma* có khả năng sinh ra men phân giải (như men *laminarinaza, chitinaza,...*) (Score et al., 1994) []. Khi phát triển ở trên thành tế bào nấm vật chủ thì nấm *Trichoderma* có thể tiết ra những loại men gây suy biến thành tế bào NGB cho cây như men β -(1-3)-glukanase và *chitinaza* (Chet et al., 1981 và Jones & Watson, 1969-dẫn theo Martin et al., 1985; Chet et al, 1981, 1983) [].

d) Cơ chế cạnh tranh:

Nấm *Trichoderma* có thể biểu hiện tính đối kháng thông qua việc cạnh tranh với NGB cây về dinh dưỡng, nơi cư trú. Nấm *Trichoderma* thường định cư trước so với các NGB cây. Do đó, chúng chiếm các chỗ định cư cũng như dinh dưỡng của NGB (Green et al., 1996; Martin et al., 1985) [].

Hầu hết các cơ chế nêu trên về tính đối kháng của nấm *Trichoderma* được quan sát trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tại Viện Bảo vệ thực vật đã có các thí nghiệm về tính đối kháng của nấm *Trichoderma* về khả năng ký sinh, khả năng sinh các chất kháng sinh ... Các kết quả thí nghiệm đã được trình bày trong các bài báo trước.

6. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất các chế phẩm hoá sinh, kháng sinh trừ sâu bệnh hại cây trồng.

+ Chế phẩm *Momosertatin* trừ sâu hại rau. đã hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm *Momosertatin* từ hạt gạo đạt tiêu chuẩn 2IU/l. Sản xuất được 3443 lít chế phẩm cung cấp cho HTX Yên Nhân- Tiền Phong-Mê Linh-Vĩnh Phúc. và HTX Phương Viên, Song Phương- Hà Tây phòng trừ sâu tơ và sâu xanh ngoài đồng ruộng ở tuổi 1-2 đạt hiệu quả 61% sau 3 ngày và 7 ngày đạt 74,7%.

Đã phối trộn với *Bt* để nâng cao hiệu lực trừ sâu giảm giá thành. Trong năm 2002 đã thăm dò được tỷ lệ phối trộn *Momosertatin* với *Bt*, giá thành chế phẩm phun cho 01 sào là 100.000đ, đến năm 2003 xuống còn 71.250đ. Sản xuất được chế phẩm đậm đặc

gấp 4 lần do đó giảm được giá thành vận chuyển, tiến hành pha loãng tại ruộng trước khi phun.

+ Chế phẩm thuốc kháng sinh *Ditacin* và nấm đối kháng *Ketomium* trừ bệnh hại cây trồng.

- Thu thập và phân lập và tuyển chọn một số chủng xạ khuẩn để sản xuất chế phẩm tại Việt Nam. Nghiên cứu cơ chế đối kháng bệnh cây của các chủng của nấm vi khuẩn.

- Đã bổ sung 2 thành phần nấm, vi khuẩn vào danh mục có ích trừ bệnh hại ở Việt Nam

- Đã tạo ra 10 bộ giống gốc và lưu giữ các chủng có ích mới được phân lập bổ sung là nguồn vật liệu để sản xuất thuốc trừ bệnh.

- Xác định hiệu lực phòng bệnh của chế phẩm *Ditacin* đối với bệnh héo xanh bầu bí và héo xanh cà chua, tại các tỉnh Vĩnh Phúc, Hà Nam, Hưng Yên. Kết quả cho thấy chế phẩm *Ditacin* có hiệu lực trừ bệnh cao, an toàn đối với người, động vật có ích và môi trường.

- Xác định được hiệu lực trừ bệnh của nấm *Ketomium* đối với bệnh thán thư, bệnh sương mai hại cam chanh, bệnh thán thư hại ớt, hồ tiêu tại các tỉnh Vĩnh Phúc, Hà Nam, Hoà Bình và Lâm Đồng.

Đã sản xuất được 30kg thuốc trừ bệnh *Ditacin* và 20kg *Ketomium* với mật độ bào tử $1,5 \times 10^6$ cfu/g.

II. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ THUỐC SÂU SINH HỌC ĐỐI VỚI CÁC LOẠI SÂU BỆNH HẠI CÂY TRỒNG

Thử nghiệm đánh giá hiệu quả chế phẩm đối với các loại sâu bệnh hại cây trồng

Sau mỗi lần sản xuất chế phẩm của đề tài được kiểm tra đánh giá hiệu lực của các chế phẩm đối với sâu bệnh hại trước khi cung cấp cho các địa phương sử dụng.

1. Chế phẩm virus côn trùng NPV và NPV-Bt

Chế phẩm virus côn trùng NPV và NPV-Bt trừ sâu xanh, sâu khoang hại lạc cho hiệu quả 76-77% trừ sâu tơ đạt 75-89% sau 10 ngày phun thuốc. Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia SD đạt 66,7-79,9% sau 5-7 ngày phun thuốc và hiệu lực trừ sâu khoang đạt 76,6-80,5% sau 7 ngày phun thuốc.

2. Chế phẩm Bt

- Chế phẩm *BioBactWP* 28 dạng bột thấm nước (16.000IU/mg) và chế phẩm *BioBact. EC28* dạng sữa (4.000IU/ml) phòng trừ các loại sâu tơ, sâu khoang sâu keo da láng ở ngoài đồng ruộng đạt hiệu quả 87,8 và 85,5% sau 5 ngày phun.

- Chế phẩm *Firibiotox-P* dạng bột sử dụng trên đậu xanh, hiệu quả trừ sâu xanh đạt 74,5-80,2%, 69,5-79,7% đối với sâu đo ăn lá. Trên đậu tương sau 7-10 ngày phun *Firibiotox -P* cũng có hiệu quả cao, đạt 77,2-84,7% đối với sâu keo da láng và đạt 59,5-66,2% đối với sâu khoang ăn lá.

3. Chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana*

- Chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* trừ sâu róm thông, sâu keo da láng, sâu khoang ăn lá đậu tương ở Thạch Môn, Thạch Hà, Hà Tĩnh tỷ lệ sâu chết đạt 62,8-72,3% sau 7-10 ngày phun, còn nấm *Metarhizium anisopliae* đạt cao hơn từ 69,2-75,1%.

- Đánh giá hiệu lực diệt côn trùng của 2 chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* thông qua các thí nghiệm trên diện rộng tại ruộng vườn cây ăn quả ở Ô Môn – Cần Thơ. Kết quả cho thấy nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu lực rất tốt đối với côn trùng trích hút như các loài rầy hại lúa, rầy chổng cánh trên cam quýt, rầy mềm hại xoài, bọ xít hại nhãn, bọ xít hại lúa, bọ cánh cứng hại dừa, mối hại cây trồng (tỷ lệ chết 69-91%). Chế phẩm *Beauveria bassiana* cũng có hiệu lực cao đối với rầy nâu, rầy xanh, bọ xít (65-87%) ngoài ra còn có hiệu lực khá cao (tỷ lệ chết 51-65%) đối với sâu non của côn trùng thuộc bộ cánh vảy như sâu tơ, sâu xanh, sâu đo hại rau, sâu cuốn lá nhỏ hại lúa.

4. Chế phẩm tuyến trùng EPN trừ bọ hung hại cây mía và sâu xám hại thuốc lá.

Chế phẩm tuyến trùng EPN, Biostar 15-20 x 10⁸ IJS trừ sâu xám hại thuốc lá đạt hiệu quả 87% và bọ hung hại mía là 57%. Hai chủng tuyến trùng *S-DL* và *S-BV1 13-17* x 10⁶ IJS trong đó chủng *S-BV1* thu thập được vườn quốc gia Ba Vì cho hiệu quả diệt sâu tốt nhất. Sử dụng chủng *S-BV1* để phòng trừ sâu xám hại thuốc lá, xu hào, ngô đạt hiệu quả cao từ 64-65%.

5. Chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma*

Qua thử nghiệm trên đồng ruộng cho thấy nấm *Trichoderma* có khả năng ức chế sự phát triển của một số bệnh như bệnh lở cổ rễ do nấm *Rhizoctonia*, chết héo cây con, lá vàng do nấm *Fusarium*, thối hạch *Sclerotinia*. Kết quả trên đồng ruộng cho thấy ruộng xử lý có tỷ lệ bệnh là 1,47-1,51% trong khi đó ruộng đối chứng có tỷ lệ bệnh là 3,33-4,31%.

6. Chế phẩm hoá sinh *Momosertatin* (MM)

Chế phẩm hoá sinh *Momosertatin* trừ sâu hại rau đạt hiệu quả 61-74,7%.

III. XÂY DỰNG MÔ HÌNH ỨNG DỤNG CÁC CHẾ PHẨM THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC TRONG HỆ THỐNG PHÒNG TRỪ TỔNG HỢP TẠI CÁC TỈNH HÀ NỘI, HẢI PHÒNG, HÀ NAM, NINH BÌNH, HÀ TÂY.

+ Xây dựng mô hình ứng dụng thuốc trừ sâu sinh học *NPV*, *ViSi*, *ViHa*, *V-Bt* tại các địa phương với tổng diện tích là: 70 ha tại Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc, Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây. Vĩnh Bảo, Hải Phòng, Lý Nhân, Hà Nam. Đã áp dụng các chế phẩm sinh học trên để phòng trừ sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh trên rau đạt hiệu quả 62,35-75,7% sau 7 ngày phun.

+ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria* phòng trừ tổng hợp sâu keo da láng sâu khoang ăn lá đậu tương và sâu xanh đục quả đậu xanh trên diện tích 1ha ở Thạch Môn- Thanh Hà-Hà Tĩnh, tỷ lệ sâu chết đạt tới 62,8-75,1% sau 7-10 ngày phun.

- Mô hình 1ha phòng trừ sâu xanh hại bắp ở HTX Tân Hưng, Yên Bình-Yên Bái hiệu lực phòng trừ đạt 88% sau 10 ngày phun thuốc.

- Mô hình ứng dụng chế phẩm *Metarhizium* trừ bọ cánh cứng hại dừa 15ha ở Phù Cát-Phù Mỹ-Hoài Nhơn-Bình Định và ở Ô Môn- Cần Thơ, hiệu quả trừ sâu đạt 82,2-85,5%.

+ Đã phối hợp với Trung tâm Khuyến nông tỉnh Tiền Giang xây dựng được mô hình trình diễn ứng dụng 2 chế phẩm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana*

trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cam quýt, bưởi nhãn tại 3 xã Trung An, xã Tân Mỹ Chánh, Thới Sơn- Thành phố Mỹ Tho, xã Mỹ Long tỉnh Tiền Giang, huyện Cái Lậy tỉnh Tiền Giang với diện tích 24 ha cam quýt, 16 ha bưởi, 25 ha nhãn, 5 ha xoài và trên 1150 cây dừa.

Đã áp dụng 2 các chế phẩm trên cho 103 ha lúa hữu cơ và lúa chất lượng cao tại Cần Thơ, An Giang và Trà Vinh, 183,5 ha cây ăn trái (cam, quýt, nhãn và xoài) 19 ha chè sạch ở Bảo Lộc, trên 6000 cây dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang, 18 ha nho sạch ở Ninh Thuận. Phối hợp với Chi cục bảo vệ thực vật Cần Thơ xây dựng được mô hình trình diễn áp dụng 2 chế phẩm sinh học *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây nhãn và cây dừa tại huyện Ô Môn với diện tích 26 ha nhãn và gần 900 cây dừa

+ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm Bt

Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm Bt phòng trừ sâu tơ, sâu đo, sâu khoang, sâu xám, sâu keo da láng... trên diện tích 3ha tại Văn Tảo-Thường Tín-Hà Tây, 2,5ha tại Tiền Phong-Mê Linh-Vĩnh Phúc, 2,5ha Xã Thạch Môn-Thạch Hà-Hà Tĩnh, hiệu quả trừ sâu tơ đạt 71,6-73,8% sau 2-4 ngày phun, đối với sâu xanh đục quả 74,5-80,2% sau 7-10 phun; sâu đo ăn lá đạt 69,5-79,7%, trên đậu tượng 77,2-84,7%; sâu keo da láng 59,5-60,2%. Cung cấp các chế phẩm *Firibiotox-C* và *Biobac 28WP* cho các Chi cục bảo vệ thực vật tại các tỉnh Hải Phòng, Nam Hà, Ninh Bình áp dụng trên diện tích 98 ha để phòng trừ sâu hại rau. Qua việc ứng dụng chế phẩm sinh học Bt trên các ruộng rau cho thấy cây phát triển tốt hơn, xanh mượt hơn so với đối chứng, vì trong chế phẩm ngoài Protein tinh thể diệt côn trùng còn có các chất kích thích tăng trưởng, các chất khoáng như là loại phân bón lá cho cây.

+ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm tuyến trùng *EPN*, *S-BVI* trừ sâu xám hại thuốc lá tại Ba Vì- Hà Tây với diện tích 7.600m² vụ Thu, Đông-Xuân 2002-2003. Khả năng phòng trừ sâu xám ở điều kiện ngoài đồng của *S-BVI*, *S-CTL*, *S-TN10* và *S-XS4* là rất tốt: Xử lý bằng *EPN* (*S-CTL* hoặc *S-TN10* hoặc *S-XS4*) có thể hạn chế được cây thuốc lá bị sâu xám 80-95%. Nghiên cứu này còn cho thấy khả năng phòng trừ sâu xám của 2 chủng *EPN* bản địa là *S-TN10* và *S-XS4* không thua kém so với chủng *S-CTL* là một chủng nhập nội (Mô hình thử nghiệm phòng trừ bọ hung hại mía tại xã Thành Vinh-Thạch Thành-Thanh Hoá trên diện tích 3ha với liều xử lý 250.000IJ/m². Hiệu lực của chế phẩm *EPN* đối với ấu trùng bọ hung (65,8%) cao hơn so với bọ hung trưởng thành (53,6%). So với thuốc hoá học DIAPHOS 10H, thuốc sinh học *EPN* có hiệu lực phòng trừ thấp hơn ở những ngày đầu sau xử lý, nhưng tác dụng lâu dài đến 6 tháng và có hiệu quả phòng trừ tốt hơn bằng việc sử dụng chế phẩm sinh học *EPN* đã tạo ra môi trường thiên địch tiềm năng đối với sâu xám hại thuốc lá và bọ hung hại mía trên các ruộng mía thử nghiệm.

+ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm đối kháng *Trichoderma* tại HTX Đông Phương Yên-Long Phương, Hoài Đức-Hà Tây. Cung cấp chế phẩm cho các Chi Cục Bảo vệ thực vật Hải Phòng, Ninh Bình, Hà Nam phòng trừ bệnh lở cổ rễ do nấm

Rhizoctonia, bệnh héo vàng do nấm *Fusarium* và bệnh thối hạch do nấm *Sclerotinia* trên quy mô 10 ha, hiệu quả phòng trừ bệnh 56-62%.

+ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm hoá sinh *Momosertatin* tại 2 HTX Yên Nhân-Vĩnh Phúc, Phương Viên-Song Phương-Hoài Đức-Hà Tây với diện tích 10ha bắp cải, xu hào phòng trừ sâu tơ hại rau đạt hiệu quả từ 65-74%. Ở HTX Phương Viên-Song Phương- Hoài Đức- Hà Tây đã sử dụng nhiều loại thuốc trừ sâu nên tính kháng thuốc của sâu cao, mật độ sâu tơ là 50-60 con/cây bắp cải đang cuốn. Sau khi phun thuốc chế phẩm *Momosertatin* sau 5 ngày hiệu quả phòng trừ đạt 71,5%. Ruộng của nông dân phun thuốc hoá học có tác dụng nhanh nhưng sau 5 ngày hiệu quả chỉ còn 41%, có ruộng thuốc hoá học hầu như không có tác dụng bị sâu phá hoại hoàn toàn. Trong tất cả các ruộng rau đã thử nghiệm, cây rau phát triển tốt không còn hiện tượng cháy lá. Ứng dụng chế phẩm kháng sinh *Ketomium* trừ bệnh thán thư trên ớt và *Ditacin* trừ bệnh héo xanh cà chua tại Chi Cục bảo vệ thực vật Hải Phòng

IV. TẬP HUẤN HƯỚNG DẪN CÁN BỘ KỸ THUẬT VÀ NÔNG DÂN ỨNG DỤNG THUỐC SÂU SINH HỌC ĐA CHỨC NĂNG TRONG PHÒNG TRỪ DỊCH HẠI CÂY TRỒNG.

+ Mở 2 lớp tập huấn 100 người cho nông dân ở Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc và Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây về một số đối tượng sâu bệnh hại chính và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học *NPN, V-Bt* trừ sâu hại cây trồng

+ Tập huấn cho 417 nông dân tại Tiên phong, Mê linh, Vĩnh Phúc, Văn Tảo, Thường Tín Hà Tây về cách sử dụng *Bt* phòng trừ sâu bệnh trên rau

+ Tập huấn cho 200 hộ nông dân sử dụng nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa tại Phù cát, Phù Mỹ, Hoài Nhân-Bình Định và 200 hộ nông dân ở xã Thạch Môn, Huyện Thạch Hà, Hà Tĩnh sử dụng các chế phẩm nấm *Metarhizium* và *Beauveria* và *Bt* trừ sâu hại đậu tương và đậu xanh.

Trong 3 năm qua chúng tôi đã phối hợp với Trung tâm khuyến nông tỉnh Tiền Giang thực hiện một lớp tập huấn cho cán bộ của tỉnh về tiềm năng phòng trừ sinh học của 2 chế phẩm *Metarhizium* và *Beauveria* đối với sâu hại cây trồng và quy trình kỹ thuật phòng trừ tổng hợp sâu hại cây ăn trái, bọ cánh cứng hại dừa, sâu hại cam quýt, và quy trình IPM trên cây cam, quýt. Sâu hại cây dừa và biện pháp phòng trừ chế phẩm sinh học *Metarhizium*. Đã thực hiện được 11 lớp tập huấn cho nông dân ở tỉnh Tiền Giang (6 lớp tại thành phố Mỹ Tho và 4 lớp tại huyện Cái Lậy và 1 lớp tại Tân Lập, về IPM trên cam quýt, chanh bưởi ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *Beauveria* và *Metarhizium anisopliae* trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cam quýt bưởi nhãn, quy trình kỹ thuật ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *Metarhizium* và *Beauveria* trong hệ thống phòng trừ sâu hại trên cây nhãn. Quy trình kỹ thuật ứng dụng *Metarhizium* để quản lý bọ cánh cứng hại dừa. Tổng số nông dân đã tham gia trong 15 lớp tập huấn ở 2 tỉnh là 785 người.

+ Đã tập huấn 60 lượt cán bộ kỹ thuật và nông dân trồng mía ở Thạch Thành-Thanh Hoá về kỹ thuật sử dụng tuyến trùng có ích EPN phòng trừ bọ hung hại mía

Tại 3 Chi cục bảo vệ thực vật Hải Phòng, Ninh Bình, Hà Nam đã tập huấn 1945 lượt người về cách sử dụng chế phẩm sinh học trong việc phòng trừ sâu bệnh trên rau.

VI. ĐÀO TẠO

Đào tạo được 3 nghiên cứu sinh; cao học :3; 9 sinh viên bảo vệ xuất sắc khoá học tốt nghiệp trong đó có 1 sinh viên nước ngoài ; 3 sinh viên đang làm khoá học tốt nghiệp sinh viên thực tập 22 người

VII. MUA SẮM TRANG THIẾT BỊ

Đề tài đã trang bị cho các phòng thí nghiệm một số trang thiết bị như:

- Nồi lên men vi sinh vật Bioflo 110 của Mỹ, dung tích 14lít: 1 chiếc
- Buồng cấy vô trùng: 1 chiếc
- Tủ siêu lạnh: 1 chiếc
- Máy lắc dần: 1 chiếc
- Máy vi tính: 1 bộ (kèm máy in)
- Máy ảnh kỹ thuật số: 1 chiếc

VIII. HỢP TÁC QUỐC TẾ

Đã đón được một đoàn chuyên gia thuộc Viện nghiên cứu Vi rút học Vũ Hán, Trung Quốc giúp nghiên cứu và phát triển công nghệ sản xuất chế phẩm Bt có nguồn gốc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trừ sâu hại cây trồng và trừ muỗi.

Trong thời gian làm việc tại Việt Nam đoàn trao đổi và giúp phía Việt Nam thực hiện những nội dung sau:

- a. Phương pháp chọn lọc dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa có độc tính cao trừ sâu hại.
- b. Phương pháp bảo quản ổn định độc tính nguồn vi khuẩn Bt.
- c. Phương pháp sản xuất giống cấp 1 sử dụng cho lên men chìm sản xuất chế phẩm Bt quy mô công nghiệp.
- d. Phương pháp thử sinh học đánh giá hiệu lực dòng vi khuẩn Bt và đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt.
- e. Chiến lược trong nghiên cứu chọn lọc dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có độc tính cao sử dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học Bt.
- f. Công nghệ sản xuất chế phẩm *Bacillus thuringiensis* trên quy mô công nghiệp.
- g. Các giải pháp khả thi cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt tại biện BVTV nói chung và Việt Nam nói chung.

Kết thúc chuyến làm việc, đoàn chuyên gia đã tổ chức một hội thảo khoa học nhằm giới thiệu với cán bộ Việt Nam về tình hình nghiên cứu sản xuất và ứng dụng sản xuất chế phẩm Bt tại Vũ Hán.

Hoạt động của đoàn chuyên gia Trung quốc tại Việt Nam:

1. *Chọn lọc dòng vi khuẩn B. thuringiensis bản địa có độc tính cao trừ sâu hại.*

Trên cơ sở kinh nghiệm của chuyên gia *Yuan Zhiming*, công tác thu thập nguồn là một trong những nhân tố tiên quyết đảm bảo sự thành bại của sản xuất chế phẩm Bt.

1.1 Phương pháp thu thập nguồn vi khuẩn *B. thuringiensis* từ tự nhiên:

- Phương pháp thu thập vi khuẩn Bt từ đất chuyên canh cây trồng cạn.
 - Lý thuyết:
 - Thời điểm thu thập mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* trong năm.
 - Đặc điểm nông hoá thổ nhưỡng của đất lấy mẫu.
 - Đặc điểm canh tác và mức độ thâm canh của mảnh ruộng lấy mẫu.
 - Mức độ sử dụng thuốc trừ sâu của người dân trên mảnh đất lấy mẫu.
 - Thực hành
 - Tiến hành lấy mẫu đất phân lập trên đất chuyên canh rau.
 - Phương pháp thu thập vi khuẩn Bt từ côn trùng.
 - Lý thuyết:
 - Các loại côn trùng có nguồn vi khuẩn *B. thuringiensis*
 - Các loại vi sinh vật khác gây bệnh côn trùng ngoài vi khuẩn *B. thuringiensis* (vi rút, nấm, tuyến trùng, động vật nguyên sinh,...vv)
 - Triệu trứng và phương pháp nhận diện nguyên nhân gây chết
 - Thực hành:
 - Thu thập mẫu sâu tơ (*Plutella Xylostela*) chết do vi khuẩn *B. thuringiensis*

1.2 Phương pháp chọn lọc dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* có độc tính cao.

- Phương pháp phân lập dòng vi khuẩn *B. thuringiensis*
- Phương pháp xử lý và làm sạch mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* thu thập được.
- Phương pháp lọc dòng thuần vi khuẩn *B. thuringiensis*
- Phương pháp chọn lọc dòng vi khuẩn *B. thuringiensis*
- Phương pháp đánh giá độc tính trừ sâu của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis*
- Chiến lược tìm kiếm các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* có độc tính cao hơn và có phổ ký chủ cao hơn.

2 Bảo quản ổn định độc tính các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis*.

2.1 Phương pháp bảo quản ngắn hạn.

- Môi trường bảo quản ngắn hạn.
- Pha sinh trưởng của vi khuẩn sử dụng cho bảo quản ngắn hạn.
- Điều kiện môi trường (nhiệt độ, ẩm, pH...) sử dụng cho bảo quản ngắn hạn.

2.2 Phương pháp bảo quản dài hạn.

- Môi trường bảo quản dài hạn.

- Pha sinh trưởng của vi khuẩn sử dụng cho bảo quản dài hạn.
- Điều kiện môi trường (nhiệt độ, ẩm, pH...) sử dụng cho bảo quản dài hạn.

3 Phương pháp sản xuất giống cấp 1

3.1 Sản xuất giống cấp 1 trên máy lắc

- Môi trường dinh dưỡng sử dụng nhân sinh khối sản xuất giống cấp 1.
- Các pha sinh trưởng của vi khuẩn *B. thuringiensis*.
- Các điều kiện tối thích về nhiệt độ, ẩm độ, pH ..vv cho sản xuất giống cấp 1.

3.2 Sản xuất giống cấp 1 trên hệ thống lên men chìm Bio-flo 110 14 lít

- Điều kiện vệ sinh và các chế độ khử trùng trong hệ thống lên men.
- Các thông số kỹ thuật tối ưu cho sản xuất giống cấp 1.
- Môi trường dinh dưỡng cho sản xuất giống cấp 1

4. Công nghệ sản xuất chế phẩm Bt trên hệ thống lên men chìm quy mô 500 lít.

Trên cơ sở kinh nghiệm của tiến sỹ *Yuan Zhiming*, công nghệ lên men chìm quy mô >500 lít có mức độ đầu tư hợp lý, phù hợp với điều kiện sản xuất của viện BVTV. Đa phần các thiết bị đều có khả năng sản xuất và lắp đặt ở Việt Nam.

Riêng hệ thống điều khiển cần tính toán đầu tư cho tương lai có thể nâng cấp năng lực sản xuất tới 1.500 lít.

Với mức độ đầu tư ban đầu hạn chế, có thể chưa nhất thiết phải tập trung vào tạo chế phẩm dạng bột thấm nước. Có thể chỉ cần tạo được chế phẩm Bt dạng nước.

5 Thử sinh học đánh giá hiệu lực dòng vi khuẩn Bt và chế phẩm Bt.

- Môi trường thức ăn nhân tạo sử dụng cho thử sinh học đánh giá hiệu lực các dòng vi khuẩn Bt và thử chế phẩm sinh học Bt
- Phương pháp thử sinh học mới trên sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tránh tạp nhiễm nâng cao độ chính xác.

6. Các giải pháp khả thi cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt tại viện BVTV nói riêng và Việt nam nói chung.

Theo kinh nghiệm của chuyên gia, để phát triển được việc nghiên cứu ứng dụng chế phẩm Bt cần đầu tư vào một số nội dung sau:

- Coi trọng công tác chọn lọc nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa có độc tính trừ sâu cao, ổn định.
- Xây dựng phòng thí nghiệm trọng điểm đạt tiêu chuẩn để có thể đánh giá chính xác độc lực trừ sâu của các dòng *Bacillus thuringiensis*. Phòng thí nghiệm trọng điểm này sẽ đi đầu trong công tác chọn tạo giống, đánh giá tính kháng thuốc của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Mặt khác phòng này còn có thể cung cấp giống chuẩn cho các trung tâm nghiên cứu và ứng dụng khác.
- Xây dựng hệ thống lên men chìm quy mô từ 500 lít trở lên. Mức đầu tư có lẽ cần phải là từ 6.000 lít. Và 1-2 nồi lên men hoạt động chung 1 hệ thống điều khiển.

- Xây dựng phòng thí nghiệm thử sinh học đảm bảo đánh giá chính xác chất lượng chế phẩm xuất xưởng cũng như các chế phẩm thương mại.

- Tuyên truyền nâng cao nhận thức người dân về sử dụng các chế phẩm sinh học trong sản xuất nông nghiệp thay thế dần các loại hoá chất trừ sâu độc hại, nhằm nâng cao chất lượng cuộc sống và sức khỏe cộng đồng.

Đánh giá chung:

Hoạt động chuyên gia thuộc phạm vi đề tài KC 04-12 đã thu được những kết quả thiết thực phục vụ công tác nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học nói chung và chế phẩm Bt nói riêng. Kinh nghiệm cũng như các tài liệu khoa học cập nhật mà đề tài thu thập được từ chuyên gia đã và đang định hướng cho các nghiên cứu ứng dụng sản xuất chế phẩm Bt của viện BVTV trong những năm tiếp theo.

Ngoài các nội dung trao đổi về các vấn đề khoa học và công nghệ, Tiến sỹ *Yuan Zhiming*, trên cương vị của một nhà lãnh đạo viện nghiên cứu Virus Vũ Hán còn đề xuất một số nội dung hợp tác nghiên cứu trong thời gian tới.

IX. NHỮNG KẾT QUẢ NỔI BẬT

1. Đã thu thập phân lập được 70 chủng vi sinh và tuyển chọn được 26 chủng có hoạt lực cao với sâu bệnh.

2. Hoàn thiện 7 quy trình và xây dựng được 7 pilot sản xuất chế phẩm sinh học BVTV (*NPV-Bt*, *NPV*, *Bt*, *Metarhizium* và *Beauveria*, *Trichoderma*, tuyển trùng có ích *Biostar* và *Momosertatin*).

- Trong đó có:

+ Bảy chế phẩm đã được đăng ký vào danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam, (Quyết định của Bộ Nông nghiệp và PTNT số 46/2001/QĐ/BNN-BVTV, ngày 19/04/2001 và số 42/2003/QĐ-BNN, ngày 29/01/2003).

+ Hai chế phẩm Bt (*Bacillus thuringiensis*, *Kurstaki*) trừ sâu hại rau có tên thương mại:

- *Firibiotox* – P 16.000 IU/mg bột
- *Firibiotox* – C 3 tỷ bào tử/ml dịch cô đặc.

Số đăng ký 02/03 SRN ngày 12/02/2003

+ Hai chế phẩm NPV (*Nuclear polyhedrosis Virus*) trừ sâu hại rau màu, cây công nghiệp, có tên thương mại:

- *ViSI* 1,5 x 10⁹ PIB/g bột.
- *NPV-Ha* 1,5 x 10⁹ PIB/g bột.

Số đăng ký 02/03 SRN ngày 12/02/2003

+ Hai chế phẩm trừ côn trùng *Metarhizium* và *Beauveria* có tên thương mại:

- *Boverit* 5,5 x 10⁸ bào tử/g = *Beauveria bassiana* Vuill.

Số đăng ký 92/01 SRN ngày 02/05/2001

- *Mat* 5,5 x 10⁸ bào tử/g = *Metarhizium anisopliae* Sorok

(Chế phẩm của Viện bảo vệ thực vật)

Số đăng ký 14/01 FR ngày 02/05/2001

+ Hai chế phẩm nấm côn trùng *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* có tên thương mại .

-Ometar-1,2x10⁹bt/gr và Biovip 1,5x10⁹ bt/gr (chế phẩm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long)

Số đăng ký ngày 27/5/2003, số 63/2003/QĐ-Bộ Nông nghiệp và PTNT

Các chế phẩm được sử dụng phòng trừ sâu hại rau, màu, cây công nghiệp, cây lâm nghiệp đạt hiệu quả từ 70-85%.

+ Một chế phẩm *Trichoderma* có tên thương mại TRIB₁ 3,2x10⁹ bào tử/gam

Số đăng ký 212/04 ECR cấp ngày 29 tháng 4 năm 2004

Chế phẩm được sử dụng phòng trừ bệnh héo cây do nấm đất *Rhizocronia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, lở cổ rễ, thối hạch.

3. Xây dựng được 5 mô hình ứng dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại lúa, rau màu, cây công nghiệp, lâm nghiệp và cây ăn quả tại các tỉnh Hà Tây, Vĩnh Phúc, Hải Phòng, Ninh Bình và Hà Nam.

4. Tập huấn được trên 3707 lượt người về kỹ thuật sử dụng các chế phẩm sinh học và áp dụng phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng trên diện tích hơn 500 ha.

5. Đào tạo được 5 cán bộ có trình độ trên đại học, 22 sinh viên trong đó có nhiều sinh viên đã tốt nghiệp.

6. Tổ chức hội nghị quốc tế khu vực Thái bình dương về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường (17-21/11/2003).

7. Cử cán bộ tham dự hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc lần thứ 2 tại Hà Nội

8. Đã tham gia 3 Hội nghị Khoa học toàn quốc về công nghệ sinh học; đã được cấp 2 bằng độc quyền sáng chế nấm *Metarhizium anisopliae* số 3451 ngày 07 tháng 04 năm 2003 và Phương pháp sản xuất nấm *Beauveria bassiana* số 0141 ngày 18 tháng 02 năm 2004; Đã được Bộ Khoa học công nghệ & Liên hiệp các Hội Khoa học Việt Nam tặng cờ thi đua và biểu trưng vàng về thành tích áp dụng xuất sắc các công trình đạt giải thưởng khoa học công nghệ Việt Nam vào sản xuất năm 2002-2003; 2 giải thưởng Đồng lúa vàng Việt Nam về sản xuất chế phẩm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* 1 giải thưởng hội thi sáng tạo kỹ thuật tỉnh Cần Thơ năm 2003.

9. Đã có 40 bài báo chuyên ngành đăng trong và ngoài nước về sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

X. KINH PHÍ THỰC HIỆN

A . Kinh phí được sử dụng	: 2.900.000.000 đồng
1. Phụ cấp	: 4.050.000
2. Tiền điện	: 157.350.000
3. Văn phòng phẩm	: 11.600.000
4. Thông tin	: 5.000.000

5.Nghiệm thu, hội thảo	:	32.000.000
6.Công tác phí	:	55.000.000
7.Thuê mướn	:	1.088.000.000
8. Đoàn ra	:	40.000.000
9. Sửa chữa nhỏ	:	88.000.000
10.Vật tư	:	625.000.000
11.Thiết bị	:	762.000.000
12.Quản lý cơ sở	:	32.000.000

B. Kinh phí đã sử dụng, quyết toán : 2.553.254.543 đồng

1.Phụ cấp	:	4.050.000
2.Tiền điện	:	84.060.516
3.Văn phòng phẩm	:	7.000.000
4.Thông tin	:	5.000.000
5.Nghiệm thu, hội thảo	:	30.000.000
6.Công tác phí	:	48.774.600
7.Thuê mướn	:	900.641.700
8.Đoàn ra	:	39.102.600
9.Sửa chữa nhỏ	:	80.000.000
10.Vật tư	:	603.550.000
11.Thiết bị	:	726.075.127
12.Quản lý cơ sở	:	25.000.000

C. Kinh phí chi năm 2004 chưa quyết toán : 346.745.457

Trong đó : thuê chuyên gia	:	80.000.000
Chi đề tài :	:	266.745.457

D. Kinh phí nộp trả chương trình : 36.822.273

Thiết bị : 35.924.873

Đoàn ra : 897.400

XI. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

A. KẾT LUẬN:

Ngoài những kết quả đã nêu ở mục “IX. Những kết quả nổi bật”, một số nhận xét chính về đề tài như sau:

1. Đề tài đã hoàn thành được mục tiêu và nội dung đề ra. Nghiên cứu hoàn thiện các chủng vi sinh vật của dự án giai đoạn trước và bổ sung nhiều chủng có giá trị khoa học và thực tiễn cao hơn, sử dụng kỹ thuật mới để chẩn đoán nhanh và chính xác phục vụ cho phát triển sản phẩm có hiệu quả và khả năng áp dụng tốt.
2. Các đề tài nhánh đã biết phát huy các kết quả giai đoạn trước để xác định đúng các dạng sản phẩm, cũng như trao đổi, học hỏi được kinh nghiệm của chuyên gia, đồng nghiệp trong các Hội nghị trong nước và quốc tế để áp dụng cho công tác nghiên cứu của mình.
3. Đã tiến hành đánh giá hiệu quả của chế phẩm và triển khai xây dựng mô hình áp dụng phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng tại các vùng sản xuất rau, cây lương thực, cây màu, cây công nghiệp và cây ăn quả bước đầu có hiệu quả và đang tiếp tục theo dõi đánh giá.
4. Đã sử dụng một số chế phẩm sinh học BVTV để áp dụng trong chương trình sản xuất rau quả an toàn, và là cơ sở để ứng dụng các sản phẩm thương mại của nước ngoài.
5. Đã đăng ký được 7 chế phẩm vào danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng tại Việt Nam.
6. Đã chuyển giao được 2 công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học là công nghệ sản xuất chế phẩm NPV và *Trichoderma* cho Chi cục BVTV Hải Phòng.
7. Đề xuất được 7 quy trình sản xuất cho 7 loại thuốc trừ sâu sinh học và xây dựng được 5 mô hình trình diễn ứng dụng chế phẩm sinh học phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng tại 7 tỉnh.

B. NHỮNG THÁCH THỨC:

Tuy nhiên trong quá trình thực hiện đề tài còn có một số tồn tại cần được tiếp tục nghiên cứu, khắc phục trong giai đoạn tới:

- Chế phẩm sinh học chưa ổn định về chất lượng.
- Một số chế phẩm tuy công nghệ đã cải tiến nhưng chưa thực sự đạt được hiệu quả cao ngoài đồng ruộng.
- Giá thành sản xuất chưa thực sự phù hợp với nông dân.
- Đã nghiên cứu quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm Bt theo công nghệ của Cu-Ba phù hợp với điều kiện Việt Nam song thiết bị còn thiếu chưa đáp ứng ảnh hưởng đến chất lượng chế phẩm.

C. ĐỀ NGHỊ:

Qua kết quả nghiên cứu sản xuất thực nghiệm và ứng dụng các chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học, chúng tôi có một số đề nghị như sau:

1. Trong nghiên cứu:

- Tiếp tục có các đề tài nhánh để nghiên cứu hoàn thiện các tác nhân VSV có hoạt lực cao, khả năng ứng dụng rộng rãi, tính thích nghi rộng và phù hợp với điều kiện nhiệt đới.
- Nghiên cứu cơ chế hỗn hợp giữa các tác nhân với nhau và môi trường nuôi cấy và nhân sinh khối thích hợp. Nghiên cứu tạo dạng chế phẩm ổn định và bảo quản lâu dài.
- Nghiên cứu công nghệ sản xuất qui mô công nghiệp. Nghiên cứu cơ chế hỗn hợp và tạo dạng với các loại thuốc có nguồn gốc khác.
- Nghiên cứu dạng hỗn hợp thuốc BVTV sinh học bón vào đất kết hợp với phân vi sinh
- Nghiên cứu sản phẩm BVTV sinh học cho từng đối tượng sâu bệnh hại có tính chất đặc thù và dễ quen thuốc hoá học.

2. Trong chuyển giao công nghệ và ứng dụng vào sản xuất:

- Cần phải tăng cường công tác tuyên truyền, thông qua các chương trình sản có(IPM, VSATTP, vv) hoặc thành lập chương trình độc lập về các chế phẩm thuốc BVTV sinh học để nghiên cứu ứng dụng và.
- Để các chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học bảo vệ thực vật được sử dụng rộng rãi thì giá thành phải phù hợp, Nhà nước cần hỗ trợ thêm kinh phí để xây dựng nhà máy có công suất lớn với các trang thiết bị hiện đại, đồng bộ hoặc giao nhiệm vụ cho một số Doanh nghiệp hoặc Công ty có vốn Nhà nước thực hiện cùng nghiên cứu và sản xuất.

DANH SÁCH CÁC ĐỀ TÀI NHÁNH

ĐỀ TÀI KHCN KC.04.12

1. Sản xuất và ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV-Bt trừ sâu hại cây trồng

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Hoàng Thị Việt - Trung tâm Sinh học - Viện Bảo vệ thực vật

2. Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng và phát triển mô hình ứng dụng phòng trừ tổng hợp cho vùng rau Vân Tảo, Thường Tín, Hà Tây.

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS Ngô Đình Bính - Viện Công nghệ sinh học

3. Sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* hoạt lực cao để phòng trừ sâu hại một số cây trồng nông nghiệp.

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm - Viện Công nghệ thực phẩm

4. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt bằng phương pháp thủ công và ứng dụng trong phòng trừ sâu hại cây trồng nông lâm nghiệp.

Chủ nhiệm đề tài: TS. Trần Quang Tấn - Trung tâm - Sinh học Viện Bảo vệ thực vật

5. Nghiên cứu sản xuất thuốc trừ sâu sinh học *Metarhizium* và *Beauveria* trừ một số sâu hại cây trồng

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Phạm Thị Thuý Trung tâm Sinh học - Viện Bảo vệ thực vật

6. Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất và mở rộng ứng dụng *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* trong việc quản lý sâu hại cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang.

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nguyễn Thị Lộc - Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long

nhhiem, từ đó đã rút ngắn được thời gian, công nuôi sâu và sản xuất chế phẩm.

- Thay đổi nguồn virus cũ, sử dụng nguồn virus mới thu ngoài tự nhiên để nhhiem sâu sản xuất chế phẩm. Kết quả cho thấy, sử dụng nguồn virus mới cho tỷ lệ sâu bị nhhiem virus cao: 98-100% (nguồn cũ chỉ đạt 78-85%); tỷ lệ sâu bị nhhiem vi khuẩn và các yếu tố khác gây chết cho sâu thấp không đáng kể.
- Đã sản xuất được 200 kg chế phẩm NPV, V-Bt với lượng $0,3.10^9$ PIB/gr để triển khai đồng ruộng và cung cấp cho các địa phương. Năng xuất virus sâu xanh thu được đạt 91%. Kết quả kiểm tra chất lượng chế phẩm trong phòng thí nghiệm cho tỷ lệ sâu chết đạt 90-100%.- Đã chuyển giao chế phẩm ViHa, V-Bt cho chi cục BVTV Ninh Bình để phòng trừ sâu xanh trên diện tích 5ha cây trồng.
- Bước đầu nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt bằng phương pháp thủ công. Công việc đang được thực hiện và đánh giá.
- Tiến hành điều tra diễn biến mật độ sâu xanh trên lạc tại thôn Đông, xã Phú Minh, huyện Sóc Sơn, TP Hà Nội trong vụ xuân để thí nghiệm sử dụng chế phẩm NPV-Ha, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc. Kết quả điều tra cho thấy diễn biến mật độ sâu xanh hại lạc tại Phú Minh rất phức tạp. Sâu xanh phát sinh không tập trung thành đợt nên phần nào đã ảnh hưởng đến kết quả công việc. Năm đầu, để tài tiến hành thăm dò việc sử dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc trong vụ xuân cho thấy hiệu quả phòng trừ sâu xanh mới chỉ đạt từ 48 đến 50%. Diện tích triển khai 5ha.
- Để tài tiếp tục sử dụng chế phẩm để phòng trừ sâu hại rau vụ đông năm 2002 tại hợp tác xã Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc trên diện tích 5ha. Đã chuyển 50 lít chế phẩm NPV, V-Bt cho HTX để cấp cho nông dân sử dụng. Kết quả phòng trừ sâu tơ, sâu khoang trên rau của chế phẩm V-Bt, NPV đã tăng hơn so với các năm trước, giảm được 70-75% mật độ sâu hại.
- Đã chuyển giao quy trình và giúp chi cục BVTV Hải Phòng xây dựng cơ sở sản xuất chế phẩm NPV trừ sâu xanh phục vụ cho chương trình sản xuất cà chua an toàn của TP Hải Phòng. Đã mở được 2 lớp tập huấn cho nông dân với 100 người tham gia về sâu hại lạc, sâu hại rau và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại trên lạc và rau.
- **Tình hình sử dụng kinh phí:**
Tổng kinh phí được phân bổ là 90.000.000 đồng.
Đã quyết toán: 90.000.000 đồng.
Đã sử dụng để sản xuất chế phẩm, triển khai xây dựng mô hình thí nghiệm đúng theo yêu cầu của chương trình.

- **Nhận xét chung những thuận lợi, khó khăn trong quá trình thực hiện đề tài:**

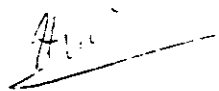
+ **Thuận lợi:** - Lực lượng cán bộ có trình độ chuyên sâu, có năng lực, công tác.

- Kinh phí được cung cấp kịp thời.

- Các phòng chức năng giải quyết được nhiều khó khăn cho đề tài.

+ **Khó khăn:** Phòng nuôi sâu, phòng sản xuất chế phẩm còn quá hẹp không đủ chỗ cho phát triển sản xuất.

Hà Nội, ngày 27 tháng 12 năm 2002
Chủ trì đề tài nhánh



Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

BÁO CÁO TÓM TẮT

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC NĂM 2002

I- Đề tài nghiên cứu khoa học: chương trình CNSH-04-12

- Tên đề tài nhánh: *Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc sâu sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng.*

- Chủ trì: Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

- Mục tiêu nghiên cứu của đề tài:

Nâng cao năng lực sản xuất thuốc sâu sinh học (NPV, V-Bt) để đưa ra sử dụng trong phòng trừ một số đối tượng sâu hại cây trồng đặc biệt là phục vụ các vùng sản xuất rau màu nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc hoá học đảm bảo sản phẩm an toàn cho người tiêu dùng, bảo vệ môi trường và tài nguyên vì sinh vật có ích trên đồng ruộng.

- Nội dung nghiên cứu chính:

- 1) Thu thập các nguồn virus côn trùng để có giống chuẩn cung cấp cho việc nghiên cứu và sản xuất chế phẩm.
- 2) Nuôi một số loài sâu như: Sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu keo da láng (*Spodoptera exigua*), sâu tơ (*Plutella xylostella*)... với số lượng lớn để cung cấp cho các thí nghiệm để sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt.
- 3) Sản xuất các chế phẩm NPV-Ha và V-Bt cấp cho các địa phương thử nghiệm và sử dụng trong mô hình phòng trừ sâu hại.
- 4) Tập huấn phương pháp sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học cho địa phương.
- 5) Xây dựng mô hình về ứng dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học trên lạc vụ xuân hè tại Sóc Sơn, Hà Nội, trên rau vụ đông tại Mê Linh, Vĩnh Phúc.

II- Kết quả thực hiện:

- Điều tra thu thập được 30 mẫu virus sâu, 10 mẫu virus sâu khoang, 15 mẫu virus sâu xanh và 10 mẫu virus sâu cuốn lá lớn để tạo nguồn virus cho sản xuất.
- Nuôi sâu xanh (*H. armigera*) với số lượng lớn để sản xuất chế phẩm. Bộ phận nuôi sâu đã cung cấp được 100.000 sâu xanh tuổi 4 để sản xuất chế phẩm virus. Bên cạnh đó từng bước đã cải tiến được dụng cụ nuôi sâu.

nhiễm, từ đó đã rút ngắn được thời gian, công nuôi sâu và sản xuất chế phẩm.

- Thay đổi nguồn virus cũ, sử dụng nguồn virus mới thu ngoài tự nhiên để nhiễm sâu sản xuất chế phẩm. Kết quả cho thấy, sử dụng nguồn virus mới cho tỷ lệ sâu bị nhiễm virus cao: 98-100% (nguồn cũ chỉ đạt 78-85%); tỷ lệ sâu bị nhiễm vi khuẩn và các yếu tố khác gây chết cho sâu thấp không đáng kể.
- Đã sản xuất được 200 kg chế phẩm NPV, V-Bt với lượng $0,3.10^9$ PIB/gr để triển khai đồng ruộng và cung cấp cho các địa phương. Năng suất virus sâu xanh thu được đạt 91%. Kết quả kiểm tra chất lượng chế phẩm trong phòng thí nghiệm cho tỷ lệ sâu chết đạt 90-100%.- Đã chuyển giao chế phẩm ViHa, V-Bt cho chi cục BVTV Ninh Bình để phòng trừ sâu xanh trên diện tích 5ha cây trồng.
- Bước đầu nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt bằng phương pháp thủ công. Công việc đang được thực hiện và đánh giá.
- Tiến hành điều tra diễn biến mật độ sâu xanh trên lạc tại thôn Đông, xã Phú Minh, huyện Sóc Sơn, TP Hà Nội trong vụ xuân để thí nghiệm sử dụng chế phẩm NPV-Ha, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc. Kết quả điều tra cho thấy diễn biến mật độ sâu xanh hại lạc tại Phú Minh rất phức tạp. Sâu xanh phát sinh không tập trung thành đợt nên phần nào đã ảnh hưởng đến kết quả công việc. Năm đầu, đề tài tiến hành thăm dò việc sử dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc trong vụ xuân cho thấy hiệu quả phòng trừ sâu xanh mới chỉ đạt từ 48 đến 50%. Diện tích triển khai 5ha.
- Đề tài tiếp tục sử dụng chế phẩm để phòng trừ sâu hại rau vụ đông năm 2002 tại hợp tác xã Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc trên diện tích 5ha. Đã chuyển 50 lít chế phẩm NPV, V-Bt cho HTX để cấp cho nông dân sử dụng. Kết quả phòng trừ sâu tơ, sâu khoang trên rau của chế phẩm V-Bt, NPV đã tăng hơn so với các năm trước, giảm được 70-75% mật độ sâu hại.
- Đã chuyển giao quy trình và giúp chi cục BVTV Hải Phòng xây dựng cơ sở sản xuất chế phẩm NPV trừ sâu xanh phục vụ cho chương trình sản xuất cà chua an toàn của TP Hải Phòng. Đã mở được 2 lớp tập huấn cho nông dân với 100 người tham gia về sâu hại lạc, sâu hại rau và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại trên lạc và rau.

Tình hình sử dụng kinh phí:

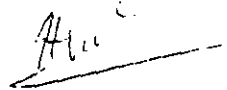
Tổng kinh phí được phân bổ là 90.000.000 đồng.

Đã quyết toán: 90.000.000 đồng.

Đã sử dụng để sản xuất chế phẩm, triển khai xây dựng mô hình thí nghiệm đúng theo yêu cầu của chương trình.

- *Nhận xét chung những thuận lợi, khó khăn trong quá trình thực hiện đề tài:*
- + *Thuận lợi:* - Lực lượng cán bộ có trình độ chuyên sâu, có năng lực công tác.
- Kinh phí được cung cấp kịp thời.
- Các phòng chức năng giải quyết được nhiều khó khăn cho đề tài.
- + *Khó khăn:* Phòng nuôi sâu, phòng sản xuất chế phẩm còn quá hẹp không đủ chỗ cho phát triển sản xuất.

Hà Nội, ngày 27 tháng 12 năm 2002
Chủ trì đề tài nhánh



Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CHƯƠNG TRÌNH KHCN CẤP NHÀ NƯỚC KC.04

***“NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC
ĐA CHỨC NĂNG CHO MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG
BẰNG KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC”***

BÁO CÁO

KẾT QUẢ HOẠT ĐỘNG ĐỀ TÀI NĂM 2003

KC.04-12

***Đề tài nhánh “ Sản xuất và ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt
trừ sâu hại cây trồng”***

Cơ quan thực hiện: Trung tâm phòng trừ và đa dạng sinh học

Viện bảo vệ thực vật

Chủ trì đề tài nhánh: Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

HÀ NỘI 2-2004

I. THÔNG TIN KHÁI QUÁT VỀ ĐỀ TÀI NHÁNH:

1. Tên đề tài nhánh: *“Sản xuất và ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng ”*
2. Thời gian thực hiện: 12 tháng (01/2003-12/2003)
3. Chủ trì đề tài nhánh: Thạc sỹ Hoàng Thị Việt
4. Địa điểm thực hiện: Viện BVTV- Đông Ngạc - Từ Liêm- Hà Nội
5. Kinh phí hoạt động: 90.000.000 đồng

II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU TRIỂN KHAI NĂM 2003:

1. Kế hoạch thực hiện năm 2003.

- 1.1.1 Thu thập các nguồn virus sâu hại để tạo nguồn mới cho sản xuất chế phẩm.
- 1.1.2 Nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ với số lượng lớn để phục vụ cho việc sản xuất và thí nghiệm sinh học.
- 1.1.3 Sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước để cấp cho mô hình sản xuất rau an toàn và địa phương sử dụng.
- 1.1.4 Mở các lớp tập huấn cho nông dân về quy trình sản xuất và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học trong phòng trừ sâu hại cây trồng.
- 1.1.5 Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn đối với một số cây rau.

2. Sản phẩm của đề tài:

- Thu thập nguồn virus gây bệnh côn trùng: 30-100 mẫu
- Nuôi nhân sâu xanh (*H. armigera*) và sâu khoang (*S.litura*) bằng thức ăn nhân tạo: 500.000 sâu để phục vụ cho việc lây nhiễm và sản xuất chế phẩm.
- Sản xuất được 190kg bao gồm: 3 loại chế phẩm Vi Ha, Vi S₁, V-Bt dạng bột khô theo đúng hợp đồng đã ký kết và đã cung cấp đầy đủ chế phẩm theo yêu cầu của 3 đề tài trong chương trình ứng dụng chế phẩm trừ sâu hại rau ở Hà Nam, Ninh Bình, Hải Phòng và 1 số vùng trồng rau khác.
- **Chất lượng sản phẩm:**
 - + Chất lượng thuốc được nâng cao từ 10^7 đến 10^9 PIB/gr chế phẩm
 - + Đã nghiên cứu thành công chất phụ gia để pha chế chế phẩm tăng hiệu của phòng trừ
 - + Đề tài đã sản xuất được hỗn hợp NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước để có thể trừ nhiều đối tượng sâu hại trong cùng một thời gian (trước đây cùng một loại chế phẩm chỉ trừ được một loài sâu)
- **Hiệu quả sản phẩm:**
 - + Hiệu quả trừ sâu tăng từ 60% lên 75-80%

+ Hai chế phẩm NPV là ViHa và ViS₁ đã được đăng ký trong danh mục thuốc BVTV được phép lưu hành ở Việt Nam.

3. Mô hình ứng dụng và chuyển giao công nghệ:

Mô hình ứng dụng:

Đề tài đã xây dựng được 2 mô hình sản xuất rau an toàn trên cơ sở sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học trên diện tích 12ha tại 2 HTX: 7ha su hào, súp lơ tại Yên Nhân - Tiền Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc và 5ha bắp cải tại Phương Viên - Song Phương - Hoài Đức - Hà Tây. Kết quả được các địa phương đánh giá cao, hiệu quả đạt 80-85%, thời gian giữa các lần phun NPV kéo dài hơn so với thuốc hoá học

4. Tập huấn và huấn luyện:

Đề tài đã mở được 4 lớp tập huấn với 230 lượt người tham gia tại 2 HTX: Yên Nhân - Tiền Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc và Phương Viên - Song Phương - Hoài Đức - Hà Tây về phương pháp và kỹ thuật ứng dụng các chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trong sản xuất rau an toàn.

5. Đào tạo:

6. Bài báo đăng trong nước, ngoài nước, báo cáo tại hội nghị khoa học:

Đề tài đã có 1 báo cáo khoa học tại hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc năm 2003, tổ chức tại Hà Nội và đã được đăng trong tuyển tập báo cáo của hội nghị.

7. Giải thưởng khoa học công nghệ

Hà nội 25/2/2004

Chủ trì đề tài nhánh

Thạc sỹ Hoàng Thị Việt

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT

ĐỀ TÀI KC - 04.12

BÁO CÁO

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

**Tên đề tài nhánh: “ SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM
HỖN HỢP NPV VÀ V-Bt TRỪ SÂU HẠI CÂY TRỒNG”**

Cơ quan chủ trì: Viện Bảo vệ Thực vật- Bộ NN & PTNT

Chủ trì đề tài: PGS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Đơn vị thực hiện đề tài nhánh: Trung tâm Sinh học

Chủ trì đề tài nhánh: ThS. Hoàng Thị Việt

Hà Nội, 12-2004

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

(Chương trình Công nghệ Sinh học KC 04-12)

Chủ nhiệm chương trình: PGS.TS. NGUYỄN VĂN TUẤT

**Đề tài nhánh: NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM
HỖN HỢP NPV VÀ V-Bt TRỪ SÂU HẠI CÂY TRỒNG
NĂM 2004**

**Hoàng Thị Việt, Trần Đình Phả,
Lương Thanh Cù, Nguyễn Thị Hoài Bắc,
Phạm Anh Tuấn, Lê Thị Bảo Ngọc.
*Trung tâm Sinh học, Viện Bảo vệ Thực vật***

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đặc trưng của côn trùng là chúng có vòng đời ngắn và chúng sinh sôi nảy nở cùng một lúc với số lượng trứng rất nhiều. Đặc trưng đó tạo ra cho côn trùng khả năng đề kháng thuốc diệt sâu rất nhanh. Chính vì vậy mà người trồng rau buộc phải sử dụng lượng thuốc diệt sâu nhiều hơn hoặc những loại thuốc mạnh hơn. Thế nhưng các thế hệ côn trùng tiếp theo lại có khả năng đề kháng được với những thuốc mới ấy.

Một nhân tố nữa là hoá chất đã diệt các thiên địch tự nhiên (các loài côn trùng ký sinh, bắt mồi, ăn thịt, nhện, ếch, chim) ăn côn trùng. Các thiên địch thường ít hơn về số lượng và có vòng đời sinh sản chậm hơn, do vậy chúng không thể tự tạo được khả năng đề kháng chống các loại thuốc trừ sâu như côn trùng, do đó chúng bị tiêu diệt và dần dần mất hết. Hậu quả là tạo nên một hệ sinh thái mất cân bằng mà ưu thế thuộc về côn trùng.

Cái vòng luẩn quẩn do việc sử dụng hoá chất diệt sâu gây nên, không những làm cho việc phòng trừ sâu bệnh càng khó giải quyết, mà còn ảnh hưởng đến sức khoẻ con người. Người nông dân sử dụng hoá chất chịu ảnh hưởng trước tiên, và tiếp đó là những người tiêu dùng ăn phải sản phẩm bị ô nhiễm các chất độc.

Hiện nay, cả biện pháp hoá học lẫn biện pháp sinh học đều được sử dụng trong phòng trừ sâu hại cây trồng. Nhưng việc lạm dụng thuốc hoá học trong phòng trừ sâu hại cây trồng đã làm cho số lượng các loài sâu hại có khả năng kháng thuốc hoá học ngày một tăng. Cho nên những người trồng rau, ngoài việc phải tăng số lần phun thuốc thì còn buộc phải sử dụng các loại thuốc hoá học có độ độc cao. Việc gia tăng lạm dụng thuốc hoá học trong sản xuất nông nghiệp nói chung và trong nghề trồng rau nói riêng đã làm mất cân bằng sinh thái, tiêu diệt các loài côn trùng và động vật có ích khác, gây ô nhiễm môi trường và

để lại dư lượng thuốc trong nông sản quá mức cho phép. Trong những năm qua, hướng nghiên cứu sử dụng các chế phẩm sinh học NPV, V-Bt trong phòng trừ sâu hại, đặc biệt là sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt để phòng trừ sâu hại rau đạt kết quả cao góp phần giảm thiểu việc sử dụng thuốc hoá học trong trồng rau, giảm tính kháng thuốc của sâu hại là một hướng đi đúng và rất cần thiết.

Để đáp ứng nhu cầu sản xuất rau an toàn cho sản phẩm rau đạt chất lượng cao đáp ứng nhu cầu thị trường hiện nay, đề tài tiếp tục triển khai việc sản xuất và ứng dụng chế phẩm NPV, V-Bt trong phòng trừ sâu hại rau họ hoa thập tự trên diện rộng tại nhiều vùng trồng rau.

Dưới đây là kết quả nghiên cứu trong năm 2004.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

- Thiết bị: điều hoà nhiệt độ, tủ sấy, tủ lạnh, máy xay sinh tố, lò sưởi, kính lúp, kính hiển vi phản pha...
- Dụng cụ: hộp lồng Petri, lọ penixillin, khay nhựa chia ô, lồng nuôi sâu, lọ thuỷ tinh có dung tích 100-1000 ml, ống đông các loại, kính tầm, panh, kéo...
- Vật liệu: xô màn, giấy bản...
- Nguyên liệu: bột đậu tương, bột đậu xanh, bã đậu, bột lõi ngô, bột bã bia, mật ong, đường, thạch, multivitamin, vitamin C, axit sorbic, fooc-môn...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nghiên cứu sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột

Để sản xuất được chế phẩm vi rút trừ sâu cần phải qua 3 công đoạn: nuôi sâu khoẻ; lây nhiễm sâu; pha chế và đóng gói chế phẩm.

- Công đoạn 1: nuôi sâu khoẻ

Ở công đoạn này cần 3 khu vực cách ly vô trùng: khu vực nuôi và giữ giống sâu để tái sản xuất, khu vực nuôi sâu khoẻ để xuất nhiễm, khu vực chế biến thức ăn.

Khi có trứng thì nuôi sâu tập thể bằng thức ăn nhân tạo trong hộp lồng Petri đến tuổi 2, sau đó tách nuôi cá thể trong lọ penixillin từ tuổi 3 đến tuổi 4. Khi sâu đến tuổi 4 thì chọn sâu xuất nhiễm và để giống tái sản xuất. Sâu để giống thì nuôi trong lọ penixillin đến cuối tuổi 5 sau đó chuyển sang khung nhựa chia ô để nuôi sâu tuổi 6. Sâu hoá nhộng ngay trong phân sâu và thức ăn thừa trong khung nhựa chia ô. Nhộng thu khi vỏ cứng và xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,5% trong 5 phút, rửa sạch bằng nước máy, để cho khô ráo ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Phân riêng nhộng đực, nhộng cái, bảo quản riêng rẽ chờ vũ hoá. Khi trưởng thành xuất hiện thì ghép cặp trong lồng nuôi. Hàng ngày kiểm tra cho ăn dung dịch mật ong và thu trứng.

- Công đoạn 2: lây nhiễm sâu

Sâu tuổi 4 được nuôi trong lọ penixilin bằng thức ăn nhân tạo được trộn đều với dung dịch vi rút với nồng độ 10^7 PIB/ml. Hàng ngày kiểm tra thu sâu chết bệnh và bảo quản trong tủ lạnh.

- Công đoạn 3: pha chế và đóng gói chế phẩm

Nghiên sâu chết bệnh, lọc bỏ cặn bã, ly tâm lấy thể vùi vi rút, kiểm tra số lượng thể vùi PIB/ml, thử sinh học, pha trộn phụ gia, sấy khô ở nhiệt độ $30-35^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm ngoài đồng ruộng

Đề tài tiến hành xây dựng một mô hình ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ hại rau tại hợp tác xã Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc trên diện tích 1ha.

- Thời gian tiến hành: tháng 9 - tháng 10 năm 2004.

- Phương pháp: dựa trên các ruộng của các hộ nông dân, khoanh vùng điều tra định kỳ 5-7 ngày một lần để theo dõi mật độ sâu để phun thuốc kịp thời. Phun khi trứng mới nở hoặc sâu tuổi còn nhỏ. Phun thuốc vào lúc chiều mát. Điều tra theo dõi mật độ sâu trước khi phun thuốc và sau khi phun thuốc 3, 5, 7 ngày để kiểm tra đánh giá hiệu lực của chế phẩm NPV, V-Bt ngoài đồng ruộng.

2.2 Xử lý số liệu

Kết quả đánh giá hiệu lực của chế phẩm ngoài đồng ruộng được xử lý theo công thức Henderson-Tilton.

3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt

Vi rút là loài sinh vật ký sinh bắt buộc của tế bào sống. Đối với vi rút động vật, cần phải lây nhiễm vi rút vào tế bào của con vật nhạy cảm thì mới nhân chúng lên được. Hiện nay trên thế giới để nuôi cấy vi rút người ta sử dụng cả phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên ký chủ hay nuôi cấy trên tế bào. Ở nước ta việc nuôi cấy vi rút chỉ mới thực hiện được bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên ký chủ. Bởi vậy, để sản xuất một lượng lớn chế phẩm vi rút trừ sâu thì khâu đầu tiên cực kỳ quan trọng là phải nhân sinh khối vi rút với số lượng lớn. Chính vì vậy, việc nuôi nhân sâu hàng loạt đóng một vai trò rất quan trọng trong sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu. Khi có sâu ở tuổi mẫn cảm với vi rút và cho sinh khối vi rút lớn thì phải lây nhiễm vi rút cho sâu bằng cách cho sâu ăn thức có nhiễm vi rút. Trong quá trình nuôi lây nhiễm vi rút cho sâu bằng thức ăn nhân tạo có trộn dịch vi rút có nhiều yếu tố khác như vi khuẩn, nấm, ruồi giấm... cũng lây nhiễm làm chết sâu. Để làm rõ các nguyên nhân làm giảm sản lượng sâu chết do vi rút trong điều kiện nuôi lây nhiễm vi rút hiện nay, chúng tôi tiếp tục theo dõi các yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng sâu chết do vi rút trong quá trình nuôi sâu để sản xuất chế phẩm sinh học, NPV, V-Bt trừ sâu. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Qua bảng 1 cho thấy, tỷ lệ sâu chết bệnh do vi-rút sau khi lây nhiễm vi-rút cho thấy tỷ lệ sâu chết bệnh trung bình do vi-rút thu được trung bình là 84,2%, tỷ lệ sâu chết do các yếu tố khác (vi khuẩn, nấm, ruồi giấm...) chiếm 12,4%, tỷ lệ sâu vào nhộng chiếm 3,4%. Với số lượng sâu nhiễm và tỷ lệ sâu chết do vi-rút này đã đảm bảo sản xuất được chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt đáp ứng yêu cầu của đề tài.

Bảng 1: Kết quả lây nhiễm sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 4 để sản xuất chế phẩm NPV năm 2004.

Thời gian	Số lượng sâu nhiễm (con)	Tỷ lệ sâu xanh chết (%) do			Điều kiện	
		Vi-rút	Vi-khuẩn, nấm, ruồi giấm...	Sâu vào nhộng	Nhiệt độ (°C)	Độ ẩm (%)
Tháng 3	10500	80,0	15,5	4,5	26,7	81,5
Tháng 4	12500	83,5	12,5	4,0	28,2	82,5
Tháng 5	11000	88,0	11,0	1,0	29,4	83,4
Tháng 6	12500	82,0	15,5	2,5	30,5	85,7
Tháng 7	8500	85,5	10,5	4,0	29,5	82,5
Tháng 8	9500	79,5	13,5	7,0	28,7	84,1
Tháng 9	5000	84,5	12,5	3,0	29,7	82,8
Tháng 10	4500	90,5	8,5	1,0	28,5	86,4
Tổng cộng	74000	-	-	-	-	-
Trung bình		84,2	12,4	3,4	-	-

Với số lượng sâu nhiễm trên đề tài đã sản xuất được 68 kg chế phẩm NPV, V-Bt với liều lượng sử dụng 1,0-1,2 kg/ha cung cấp cho địa phương sử dụng trên diện tích 10 ha (bảng 2).

Bảng 2: Số lượng chế phẩm NPV, V-Bt sản xuất trong năm 2004

TT	Loại chế phẩm	Số lượng sản xuất (kg)	Địa điểm ứng dụng	Diện tích ứng dụng
1	Hỗn hợp NPV (1,0-1,2kg/ha)	34	Hà Nội, Hà Tây, Vĩnh Phúc.	10ha
2	V-Bt (1,0-1,2kg/ha)	34		

3.2 Kết quả nghiên cứu pha chế chế phẩm hỗn hợp NPV

Với mục đích nâng cao hiệu quả phòng trừ sâu hại, giảm giá thành sản phẩm thuốc trừ sâu sinh học, nhóm nghiên cứu của đề tài đã nghiên cứu thêm chất phụ gia tạo sản phẩm hỗn hợp và đã tạo được các loại chế phẩm hỗn hợp NPV và V-Bt có chất lượng cao, tương đối ổn định. Kết quả thử hiệu lực chế phẩm hỗn hợp NPV trên sâu khoang tuổi 2 ở cả hai phương pháp tạo chế phẩm đều cho tỷ lệ sâu chết cao 92,8-96,5% sau 5 ngày thí nghiệm và 100% sau 7 ngày thí nghiệm (bảng 3).

Bảng 3: Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột (thí nghiệm trong phòng năm 2004)

Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng (g/lít)	Số sâu thí nghiệm	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi xử lý			Điều kiện nhiệt độ, ẩm độ
			3 ngày	5 ngày	7 ngày	
CT I	2,0	50	55,5	92,8	100	28°C; 82%
CT II	2,0	50	61,2	95,7	100	
ViS ₁	2,0	50	68,6	96,5	100	

Ghi chú: CTI- Pha chế hỗn hợp dịch thể NPV và sấy khô.

CTII- Sấy khô từng loại NPV sau đó hỗn hợp.

Bảng 4: Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột (Thí nghiệm trong phòng thí nghiệm năm 2004)

Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng (g/ lít)	Số sâu thí nghiệm	Tỷ lệ sâu chết sau khi xử lý (%)			Điều kiện nhiệt độ, ẩm độ
			3 ngày	5 ngày	7 ngày	
CT I	2,0	50	74,5	93,2	100	28°C; 82%
CT II	2,0	50	71,2	97,8	100	
ViHa	2,0	50	78,4	100	-	

Ghi chú: CTI- Pha chế hỗn hợp dịch thể NPV và sấy khô.

CTII- Sấy khô từng loại NPV sau đó hỗn hợp.

Đối với sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) thì hiệu quả của chế phẩm hỗn hợp NPV cũng cao ở cả hai công thức: sau 5 ngày xử lý tỷ lệ sâu xanh bị chết đạt 93,2-97,8%. Sử dụng ViHa thì tỷ lệ sâu chết 100% sau 5 ngày xử lý (bảng 4).

3.3 Hiệu quả xây dựng mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp NPV và V-Bt trên một số loài sâu hại rau

3.3.1 Mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu hại rau tại HTXNN Yên Nhân, Tiên Phong, Mè Linh, Vĩnh Phúc

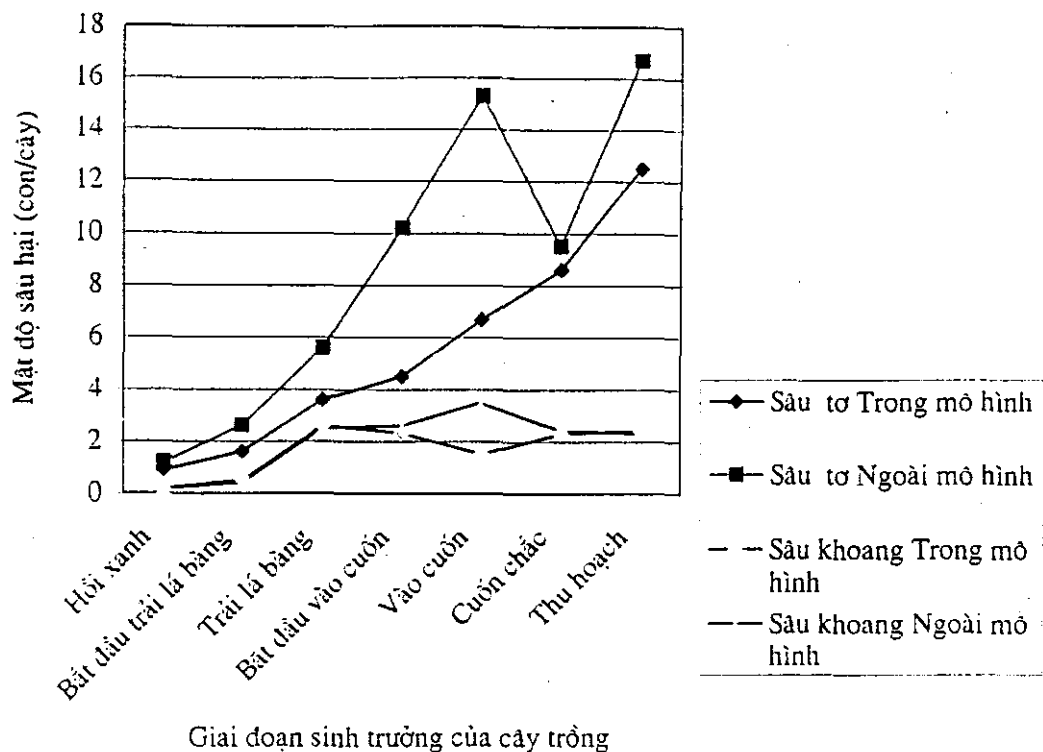
Hợp tác xã nông nghiệp Yên Nhân, Tiên Phong, Mè Linh, Vĩnh Phúc có diện tích trồng rau lớn trên 100 ha, chủ yếu trồng rau vào vụ đông và vụ xuân xen lẫn vụ lúa mùa trong năm. Trong các loại rau họ hoa thập tự, nông dân Yên Nhân chủ yếu trồng su hào, ngoài ra còn trồng cải ngọt, súp lơ, cải xanh... Trong những năm gần đây đề tài đã đưa thường xuyên các chế phẩm sinh học trừ sâu NPV, V-Bt, Bt vào ứng dụng trừ một số loài sâu hại rau do vậy nông dân vùng trồng rau bước đầu đã có thói quen và nhu cầu sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ sâu hại rau. Năm 2004 đề tài đã triển khai ứng dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trên diện tích 10ha rau của hợp tác xã.

3.3.2 Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang hại su hào tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mè Linh, Vĩnh Phúc

Bảng 5: Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại bắp cải tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mè Linh, Vĩnh Phúc – vụ đông năm 2004

TT	Thời gian sinh trưởng của su hào	Mật độ sâu hại			
		Sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>) (con/cây)		Sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>) (con/cây)	
		Trong mô hình	Ngoài mô hình	Trong mô hình	Ngoài mô hình
1	Hồi xanh	0,9	1,2	0,2	0,2
2	Bắt đầu trái lá bằng	1,6	2,6	0,5	0,4
3	Trái lá bằng	3,6	5,6	2,6	2,5
4	Bắt đầu vào cuốn	4,5	10,2	2,3	2,6
5	Vào cuốn	6,7	15,3	1,5	3,5
6	Cuốn chắc	8,6	9,5	2,3	2,4
7	Thu hoạch	12,5	16,7	2,4	2,3

Đồ thị 1. Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang (*Spodoptera litura*) hại bắp cải tại Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc- vụ đông năm 2004



Năm 2004 đề tài tiếp tục thử nghiệm hiệu lực chế phẩm hỗn hợp. Trong mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt cho thấy mật độ sâu tơ cao nhất vào cuối vụ tới 12,5 con/cây. Ngoài mô hình mật độ sâu tơ cũng tăng tới 16,7 con/cây. Đối với sâu khoang trong mô hình cao nhất đạt 2,6 con/cây, ở ngoài mô hình mật độ sâu cũng chỉ có 3,5 con/cây (bảng 5 và đồ thị 1)

3.3.3 Hiệu quả trừ sâu tơ, sâu khoang hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Từ các kết quả đánh giá về hiệu lực của chế phẩm trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đưa chế phẩm hỗn hợp V-Bt vào ứng dụng trong mô hình để trừ sâu khoang, sâu tơ hại rau. Điều tra sâu khoang trước phun thuốc cho thấy sâu khoang tuổi nhỏ chiếm tỷ lệ cao 85,7%. Kết quả điều tra sau phun thuốc ở công thức 1 sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt cho hiệu quả phòng trừ đạt 83,8% sau 7 ngày phun thuốc và giảm sau 9 ngày phun thuốc còn 63,8%. Ở ruộng phun thuốc hoá học (Pegasus 500SC)

thuốc có hiệu quả ngay từ những ngày đầu phun thuốc đạt 76,5-95,5% nhưng hiệu lực của thuốc giảm nhanh, sau 7 ngày chỉ còn 33,8% (bảng 6).

Bảng 6: Hiệu quả trừ sâu khoang (*S.litura*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - Vụ Đông sớm năm 2004

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt	20	0	0	42,7	72,5	83,8	63,8
2	Pegasus 500SC	1	76,5	88,9	95,5	52,4	32,6	-

Đối với sâu tơ điều tra trên ruộng trước khi phun cho thấy sâu tuổi nhỏ chiếm 73,2% tuổi lớn chiếm 13,5%, nhộng chiếm 13,3%. Kết quả điều tra cho thấy hiệu quả phòng trừ của chế phẩm V-Bt đối với sâu tơ đạt 82,5%-85,7% sau 5-7 ngày phun thuốc. Ở công thức phun thuốc hoá học hiệu quả đạt cao ngay từ ngày đầu phun thuốc : 75,9% và 77,8%-92,4% sau 2-3 ngày phun thuốc và hiệu lực của thuốc cũng giảm dần sau 5 ngày sử lý (bảng 7).

Bảng 7: Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - Vụ Đông sớm năm 2004

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt	20	0	48,5	78,3	83,6	89,6	55,4
2	Pegasus 500SC	1	77,9	88,5	78,6	45,3	36,5	-

3.4.1.4 Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Trong mô hình thí nghiệm trồng rau chú trọng việc sử dụng các chế phẩm sinh học trong phòng trừ sâu hại, người nông dân đã giảm được 2-3

lần phun thuốc hoá học, khoảng cách giữa các lần phun thuốc tăng lên dẫn đến giảm chi phí thuốc trừ sâu (bảng 8).

Bảng 8: Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc (tính cho một ha/vụ su hào)

Tt	Chỉ tiêu đánh giá	Trong mô hình	Ngoài mô hình	Hiệu quả
1	Số lần phun thuốc	2-3	5-6	Giảm 2-3
2	Thời gian giữa các lần phun (ngày)	10	5-6	Tăng 6-7
3	Chi phí cho 1 bình phun (đồng/bình)	7000	6000 – 9000 (11000)	Giảm 2 000 đến 2000
4	Chi phí thuốc trừ sâu (ngàn đồng/ha/vụ)	1450-1670	2540-2770	Giảm 910-1100

KẾT LUẬN:

1. Năm 2004, đề tài đã nhiễm được 74 000 sâu xanh tuổi 4 để sản xuất chế phẩm vi-rút. Tỷ lệ sâu nhiễm vi-rút thu được là 84,9% và sản xuất được 68 kg chế phẩm hỗn hợp NPV và V- Bt để triển khai ứng dụng trên 10 ha.
2. Đề tài đã xây dựng được một mô hình sử dụng chế phẩm sinh học NPV, V- Bt ở Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc trong phòng trừ một số loài sâu hại chính trên rau trên diện tích 10 ha. Kết quả đã giảm được một số lần phun thuốc trừ sâu, giảm tiền chi phí mua thuốc, tăng hiệu quả kinh tế cho người trồng rau.

Đề nghị

- Nhà nước cần tiếp tục đầu tư trợ giá cho nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng các chế phẩm sinh học nói chung và các chế phẩm sinh học NPV, V-Bt nói riêng trừ sâu hại trong sản xuất nông sản an toàn với mục đích tăng cường sức khỏe cho con người, động vật cũng như giảm thiểu ô nhiễm môi trường vì một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CHƯƠNG TRÌNH KHCN CẤP NHÀ NƯỚC KC.04

**“NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC
ĐA CHỨC NĂNG CHO MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG
BẰNG KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC”**

BÁO CÁO TỔNG KẾT

**ĐỀ TÀI NHÁNH: “SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM
HỖN HỢP NPV, V-Bt TRỪ SÂU HẠI CÂY TRỒNG”**

**Cơ quan thực hiện: Trung tâm Nghiên cứu các Biện pháp Sinh học,
Viện Bảo vệ Thực vật**

Chủ trì đề tài nhánh: ThS. Hoàng Thị Việt

HÀ NỘI 12-2004

Phần 1

THÔNG TIN KHÁI QUÁT VỀ ĐỀ TÀI NHÁNH

1. Tên đề tài nhánh: “*Sản xuất và ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng*”
2. Thời gian thực hiện: 10/2001-10/2004)
3. Chủ trì đề tài nhánh: ThS. Hoàng Thị Việt
4. Địa điểm thực hiện: Trung tâm Nghiên cứu các Biện pháp Sinh học,
Viện Bảo vệ Thực vật, Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội.
5. Kinh phí hoạt động:

Thời gian	Năm thứ nhất	Năm thứ hai	Năm thứ ba	Tổng cộng
	1/10/2001- 1/10/2002	1/10/2002- 1/10/2003	1/10/2003- 1/10/2004	
Kinh phí được cấp (triệu đồng)	90,00	90,00	17,00	197,00

Viết bằng chữ: Một trăm chín bảy triệu đồng chẵn.

6. Danh sách những người thực hiện chính:

TT	Họ và tên	Học hàm, học vị, chuyên môn	Cơ quan
1	Hoàng Thị Việt	Thạc sỹ	Viện Bảo vệ Thực vật
2	Trần Đình Phả	Tiến sỹ	Viện Bảo vệ Thực vật
3	Phạm Anh Tuấn	Thạc sỹ	Viện Bảo vệ Thực vật
4	Lương Thanh Cù	Kỹ sư	Viện Bảo vệ Thực vật
5	Nguyễn Thị Bắc	Kỹ sư	Viện Bảo vệ Thực vật
6	Lê Thị Bảo Ngọc	Kỹ sư	Viện Bảo vệ Thực vật
7	Hồ Văn Thế	Trung cấp KTNN	HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc
8	Nguyễn Văn Phương	Trung cấp KTNN	HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê

			Linh, Vĩnh Phúc
9	Trần Văn Tân	Đội trưởng đội sản xuất	HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc
10	Nguyễn Việt Dũng	Cán bộ kỹ thuật	HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc
11	Nguyễn Văn Sán	Cán bộ kỹ thuật	HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Phần 2

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU TRIỂN KHAI

1. Kế hoạch thực hiện

10/2001-10/2002	10/2002-10/2003	10/2003-10/2004
- Thu thập chọn lọc nguồn vi rút NPV sâu xanh (<i>H. armigera</i>), sâu khoang (<i>S. litura</i>) có hoạt lực cao để sản xuất chế phẩm. - Nuôi sâu xanh, sâu khoang với số lượng lớn để cung cấp thử sinh học và lấy nhiễm NPV để sản xuất chế phẩm. - Pha chế, sản xuất 4 loại chế phẩm ViHa, ViS₁, ViHa-Bt, ViS₁-Bt để trừ sâu hại cây trồng. - Tập huấn hướng dẫn nông dân về một số đối tượng sâu bệnh hại chính và phương pháp sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng. - Xây dựng mô hình sử dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc vụ xuân hè. - Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu khoang hại đỗ tương vụ hè thu.	- Thu thập các nguồn vi rút sâu hại để tạo nguồn mới cho sản xuất chế phẩm. - Nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ với số lượng lớn để phục vụ việc sản xuất và thí nghiệm sinh học. - Sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt dạng bột kho thấm nước để cấp cho mô hình sản xuất rau an toàn và cho các địa phương sử dụng. - Mở các lớp tập huấn cho nông dân về quy trình sản xuất và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học trong phòng trừ sâu hại cây trồng. - Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn đối với một số loại rau.	- Tiếp tục thu thập bổ sung nguồn vi rút từ quần thể sâu hại trong tự nhiên. - Nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang với số lượng lớn để phục vụ việc sản xuất và thí nghiệm sinh học. - Sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước để cấp cho mô hình sản xuất rau an toàn và địa phương sử dụng. - Tiến hành chuẩn bị hồ sơ để tổng kết và viết báo cáo tổng kết toàn bộ quá trình thực hiện đề tài từ 10/2001-10/2004.

2. Sản phẩm của đề tài

Nội dung	10/2001-10/2002	10/2002-10/2003	10/2003-10/2004
1. Thu thập thành phần sâu vi rút sâu hại	- GV sâu tơ (<i>Plutella xylostela</i>): 30 mẫu trên su hào, bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc và Từ Liêm, Hà Nội. - NPV sâu xanh (<i>H. armigera</i>): 15 mẫu trên lạc, cà chua ở Sóc Sơn, Hà Nội và An Hải, Hải Phòng. - NPV sâu khoang (<i>S. litura</i>): 10 mẫu trên lạc, bắp cải ở Từ Liêm, Hà Nội và Đan Phượng, Hà Tây. - NPV sâu cuốn lá lớn: 10 mẫu trên lúa ở Từ Liêm, Hà Nội.	- GV sâu tơ (<i>Plutella xylostela</i>): 10 mẫu trên su hào, bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc. - NPV sâu xanh (<i>H. armigera</i>): 10 mẫu trên cà chua ở Mê Linh, Vĩnh Phúc. - NPV sâu khoang (<i>S. litura</i>): 15 mẫu trên su hào bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc và Hoài Đức, Hà Tây.	- GV sâu tơ (<i>Plutella xylostela</i>): 6 mẫu trên su hào, bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc. - NPV sâu xanh (<i>H. armigera</i>): 12 mẫu trên cà chua ở Mê Linh, Vĩnh Phúc. - NPV sâu khoang (<i>S. litura</i>): 16 mẫu trên, bắp cải ở Mê Linh, Vĩnh Phúc và Hoài Đức, Hà Tây.
Nuôi nhân và lây nhiễm sâu bằng thức ăn nhân tạo để sản xuất chế phẩm	Sâu xanh (<i>H. armigera</i>) : lây nhiễm được 81 500 sâu để sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt. Tỷ lệ sâu xanh chết do vi rút đạt trung bình 84%.	Sâu xanh (<i>H. armigera</i>): lây nhiễm được 115 300 sâu để sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt. Tỷ lệ sâu nhiễm vi rút thu được là 81,6%.	Lây nhiễm được 27 800 sâu xanh (<i>Helicoverpa armigera</i>) và 37 200 sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>) tuổi 4 để sản xuất chế phẩm NPV, V-Bt. Tỷ lệ sâu nhiễm vi rút thu được là 85,6%.
Số lượng chế phẩm đã sản xuất	- Sản xuất 4 loại chế phẩm NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước: 200 kg với liều lượng $0,3 \times 10^9$ PIB/g.	- Sản xuất được 210 kg ba loại chế phẩm ViHa, ViS ₁ , V-Bt dạng bột khô: Hỗn hợp NPV (ViHa, ViS ₁): 90kg; V-Bt: 120 kg.	- Sản xuất được 37kg chế phẩm hỗn hợp ViHa, ViS ₁ , V-Bt dạng bột hoàn thành đủ số lượng chế phẩm như hợp đồng đã ký kết và đã cung cấp đủ chế phẩm theo yêu của đề tài.
Chất lượng chế phẩm	$0,3 \times 10^9$ PIB/g	ViHa: $1,5 \times 10^9$ PIB/g ViS ₁ : $1,5 \times 10^9$ PIB/g	ViHa: $1,5 \times 10^9$ PIB/g ViS ₁ : $1,5 \times 10^9$ PIB/g

Hiệu quả của chế phẩm đối với sâu hại	- Sử dụng chế phẩm NPVB, V-Bt trừ sâu xanh, sâu khoang hại lạc cho hiệu quả 76-77%, trừ sâu tơ hại rau đạt 75-89% sau 10 ngày phun thuốc.	- Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02% đạt 66,7-79,9% sau 5-7 ngày phun thuốc và hiệu lực trừ sâu khoang đạt 76,6-80,5% sau 7 ngày phun thuốc.	- Hiệu quả trừ sâu khoang trên su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt đạt 75,6- 80,5% sau 7 ngày thí nghiệm, trừ sâu tơ đạt 82,5- 85,7 % sau 5 ngày xử lý thuốc.
Tập huấn nông dân	2 lớp tập huấn: 100 nông dân tham gia	-	-
Xây dựng mô hình	-	Xây dựng được 2 mô hình sử dụng chế phẩm sinh học NPV, V-Bt ở Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc và Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây.	-

Phần 3

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

(Chương trình Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ sinh học
giai đoạn 2001-2005)

1. TÊN ĐỀ TÀI NHÁNH: "NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM HỖN HỢP NPV, V-Bt TRỪ SÂU HẠI CÂY TRỒNG"

Cơ quan chủ trì:

Trung tâm Nghiên cứu các Biện pháp Sinh học, Viện Bảo vệ Thực vật

Chủ nhiệm đề tài nhánh: ThS. Hoàng Thị Việt

Thời gian thực hiện: 3 năm từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004

Tổng kinh phí thực hiện: 197,0 triệu đồng chẵn (Viết bằng chữ: Một trăm chín mươi bảy triệu đồng chẵn).

2. NỘI DUNG THỰC HIỆN

Năm 2002	Năm 2003	Năm 2004
1. Thu thập chọn lọc nguồn vi rút sâu xanh (<i>H. armigera</i>), NPV sâu khoang (<i>S. litura</i>) có hoạt lực cao để sản xuất chế phẩm. 2. Nuôi sâu xanh, sâu khoang với số lượng lớn để cung cấp thử sinh học và nhiễm để sản xuất chế phẩm. 3. Pha chế sản xuất 4 loại chế phẩm ViHa, ViHa-Bt, ViSl-Bt để trừ sâu hại cây trồng. 4. Tập huấn hướng dẫn nông dân về một số đối tượng sâu bệnh chính và phương pháp sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học NPV, V-Bt trừ sâu hại cây trồng. 5. Xây dựng mô hình sử dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu xanh hại lạc vụ xuân hè. 6. Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm NPV, V-Bt trừ sâu khoang hại đỗ trong vụ hè thu trên diện tích 10ha.	1. Thu thập các nguồn vi rút sâu hại để tạo nguồn mới cho sản xuất chế phẩm. 2. Nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang, sâu keo da láng, sâu tơ với số lượng lớn để phục vụ cho việc sản xuất chế phẩm và thí nghiệm thử sinh học. 3. Sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt dạng bột khô thấm nước để cấp cho mô hình sản xuất rau an toàn và các địa phương sử dụng. 4. Chuyển giao quy trình sản xuất chế phẩm NPV theo phương pháp nuôi sâu hàng loạt cho cấp tỉnh và quy trình sản xuất NPV theo phương pháp thu sâu ngoài đồng ruộng cho các hộ nông dân trong mô hình. 5. Mở các lớp tập huấn cho cán bộ kỹ thuật các chi cục, cho nông dân các hợp tác xã về quy trình sản xuất chế phẩm và phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh học trong phòng trừ sâu hại cây trồng. 6. Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn với cây đậu đỗ, cà chua, dưa chuột, bắp cải su hào, cải ngọt, súp lơ. <i>Năm 2003 có một số nội dung cải tiến so với năm 2002 như: sản xuất chế phẩm hỗn hợp các NPV để dùng một một loại chế phẩm có thể trừ được nhiều đối tượng sâu hại trong cùng một lần phun.</i> <i>- Xây dựng mô hình sản xuất NPV theo phương pháp thủ công cho một hộ nông dân trong mô hình để tự sản xuất, sử dụng trên ruộng gia đình; Nâng cao chất lượng chế phẩm bằng cách tăng nồng độ vi rút, trong kế hoạch dự án yêu cầu là lượng vi rút phải đạt 10^7/gam chế phẩm, năm 2003 sản xuất với lượng 10^9/gam chế phẩm và thêm chất phụ gia mới.</i>	1- Thu thập các nguồn vi rút sâu hại để tạo nguồn mới cho sản xuất chế phẩm. 2- Nhân nuôi sâu xanh, sâu khoang với số lượng lớn để phục vụ cho việc sản xuất chế phẩm và thí nghiệm sinh học. 3- Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn với cây bắp cải, su hào, cải ngọt... <i>Năm 2004 có nội dung nghiên cứu nổi bật so với năm 2003 là sẽ tìm bước hợp lý hoá quy trình sản xuất chế phẩm để giảm giá thành sản phẩm xuống còn 250 000 đồng/kg chế phẩm với liều lượng sử dụng không đổi là 1,0 -1,2kg/ha cho một lần phun.</i>

3. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- Thiết bị: điều hoà nhiệt độ, tủ sấy, tủ lạnh, máy xay sinh tố, lò sưởi, kính lúp, kính hiển vi phản pha...
- Dụng cụ: hộp lồng Petri, lọ penixillin, khay nhựa chia ô, lồng nuôi sâu, lọ thuỷ tinh có dung tích 100-1000 ml, ống đong các loại, kính tám, panh, kéo...
- Vật liệu: xô màn, giấy bản...

- Nguyên liệu: Bột đậu tương, bột đậu xanh, bã đậu, bột lõi ngô, bột bã bia, mật ong, đường, thạch, multivitamin, vitamin C, axit sorbic, fooc-môn...

4. PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

4.1- Điều tra thu thập các nguồn vi rút sâu hại

- Thu thập riêng từng loại sâu bị bệnh ngoài đồng ruộng.
- Phân lập, xác định sâu chết do vi rút.
- Tách chiết lấy nguồn vi rút bằng phương pháp ly tâm.
- Thử sinh học để chọn nguồn vi rút có hoạt lực trừ sâu cao.
- Đưa nguồn vi rút mới vào sản xuất.

4.2- Sản xuất chế phẩm

4.2.1 Quy trình công nghệ nhân nuôi sâu hàng loạt bằng thức ăn nhân tạo

4.2.1.1 Quy trình công nghệ nuôi nhân hàng loạt sâu xanh (*Heliothis armigera* Hb.)

Quy trình công nghệ nuôi nhân hàng loạt sâu xanh (*Heliothis armigera* Hb.) bao gồm các bước sau:

a) Bước 1: Giai đoạn nuôi sâu non

Giai đoạn nuôi sâu non bao gồm các công đoạn sau:

- + Công đoạn I: Nuôi sâu tập thể
- + Công đoạn II: Nuôi sâu cá thể

+ Công đoạn 1: Nuôi sâu tập thể

Khi trứng thụ tinh sâu xanh ở giai đoạn đầu đen (sau khi trưởng thành đẻ trứng khoảng 2-4 ngày) thì cắt xô màn thành từng miếng nhỏ. Tiếp đến bỏ miếng xô màn trứng này vào hộp lồng Petri. Trong mỗi hộp lồng đặt khoảng 40-50 trứng thụ tinh. Hộp lồng Petri đặt như sau: đĩa to ở bên dưới, đĩa nhỏ úp lên trên. Bằng cách đặt hộp lồng như vậy sẽ hạn chế được sâu non bò ra khỏi hộp lồng Petri. Khi sâu non bắt đầu xuất hiện thì dùng xẻng dẹt chuyên dùng phết thức ăn vào cạnh đĩa Petri và để phần đĩa có thức ăn hướng về phía ánh sáng mạnh nhất trong phòng. Sâu non mới nở hoạt động mạnh, bò lung tung nhưng có tính hướng ánh sáng sẽ bò gần hết vào thức ăn. Khi trứng nở hết sâu (sau khoảng 3-4 ngày kể từ khi trứng bắt đầu nở ra sâu) thì loại bỏ xô màn ra khỏi hộp lồng Petri để tránh thức ăn khỏi bị mốc do xô màn và thêm không khí cho sâu phát triển tốt.

+ Công đoạn 2: Nuôi sâu cá thể

Sâu non sâu xanh có đặc tính ăn thịt lẫn nhau rất rõ rệt, đặc biệt là những sâu non từ tuổi 3 (khoảng 5-6 ngày sau khi nở) đến tuổi 6. Chính vì thế, nên khi sâu non đến tuổi 3 thì phải tiến hành tách nuôi sâu cá thể trong lọ penixillin hay trong khung nhựa chia ô. Sâu xanh bắt đầu ăn thịt lẫn nhau từ tuổi 2. Nhưng nếu tách nuôi cá thể sớm thì sâu chết nhiều ảnh hưởng đến sản lượng sâu tuổi 4- tuổi 5 đem xuất nhiệm vi rút để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu. Thời gian nuôi sâu cá thể ở giai đoạn này khoảng 5-6 ngày, tức khoảng sau 10-11 ngày sau khi trứng nở ra sâu thì tiến hành chọn giống và nếu để giống khoảng một nghìn sâu nuôi thì có khả năng cho khoảng 10 nghìn sâu non sâu xanh tuổi 4- tuổi 5 trong một lứa sâu kế tiếp. Kỹ thuật chọn sâu để giống như sau: những con sâu khỏe, phát triển trội hơn so với những con khác thì giữ lại làm giống cho thế hệ tiếp theo. Khi sâu sang tuổi 5 thì chọn sâu để giống lại một lần nữa. Những con sâu còi cọc, phát triển kém thì loại bỏ đem xuất lấy nhiệm vi rút để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu.

Khi sâu lột xác sang tuổi 6 thì chuyển sâu nuôi cá thể trong khung nhựa chia ô. Phía trên và phía dưới khung nhựa chia ô này đặt bằng kính. Hàng ngày kiểm tra và cho sâu ăn thêm thức ăn, nếu sâu ăn hết thức ăn đồng thời lau sạch nước đọng dưới kính đặt bằng côn.

b) Bước 2: Giai đoạn thu và bảo quản nhộng

Sâu non đầy sức sẽ ngừng ăn và chuyển sang giai đoạn tiền nhộng, sau đó sâu lột xác hoá nhộng. Sâu hoá nhộng ngay trong thức ăn thừa và phân sâu. Sâu hoá nhộng được khoảng 4-5 ngày thì tiến hành thu nhộng. Nhộng thu xong được rửa sạch và xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,5% trong khoảng 5-10 phút, sau đó rửa sạch lại nhiều lần dưới vòi nước máy. Sau khi rửa sạch, nhộng được trải đều nhẹ nhàng một lớp mỏng trên giấy bản và đặt trên khay nhựa để cho khô ráo ở nhiệt độ trong phòng từ 24-32°C. Tiếp theo thì xác định nhộng đực, nhộng cái và để tách riêng nhộng đực, nhộng cái. Sau đó cho nhộng riêng rẽ nhộng đực và nhộng cái vào lọ thủy tinh miệng rộng hay xô-can thủy tinh với số lượng 40-50 nhộng/lọ. Nắp lọ đựng nhộng đực nên bịt giấy khác màu với nắp lọ đựng nhộng cái. Khoảng 8-10 ngày sau khi thu nhộng thì nhộng chuyển sang màu đen. Khi nhộng sắp vũ hoá thì đặt vào lọ nút nhựa đựng dung dịch mật ong 10% + các loại vitamin tẩm vào bông thấm nước sạch để cho trưởng thành ăn thêm ngay sau khi xuất hiện. Trong lọ thủy tinh hay trong xô-can để những miếng giấy gấp nếp có kích thước 10x20cm làm nơi đậu cho trưởng thành ngay sau khi vũ hoá làm cho trưởng thành có nơi đậu ít bị dị dạng.

c) Bước 3: Giai đoạn ghép đôi trưởng thành và thu trứng

Khi có trưởng thành xuất hiện thì chọn ghép đôi các con trưởng thành to, khoẻ, hoạt động mạnh và không bị dị dạng. Trưởng thành xuất hiện ngày nào thì tiến hành ghép đôi ngay ngày đấy và ghép theo tỷ lệ 1:1. Lồng ghép trưởng thành làm bằng lưới thép không gỉ hình trụ có kích thước chiều cao h=15cm và đường kính d=20cm. Số lượng ghép đôi là 10 cặp/lồng là tốt nhất. Phía trên và phía dưới lồng bịt chặt bằng xô màn. Sau khi ghép đôi được 2-3 ngày thì trưởng thành cái bắt đầu đẻ trứng chủ yếu vào xô màn. Hàng ngày thay xô màn để lấy trứng và thay thức ăn cho trưởng thành ăn thêm thì 2 ngày thay một lần. Khi nuôi trưởng thành, nếu thấy có trưởng thành chết thì lấy ra loại bỏ.

d) Bước 4: Giai đoạn ấp trứng

Hàng ngày thu trứng, nếu thấy trên xô màn có cả sâu non mới nở thì phải dùng panh gấp loại bỏ các con sâu non này để tránh sâu non ăn trứng. Các con sâu non này có lẽ do trưởng thành đẻ cả trứng vào lồng sắt và xô màn ở dưới đáy lồng. Xô màn có trứng cho vào bảo quản trong lọ thủy tinh có dung tích 0,5 lít để ở nhiệt độ trong phòng. Sau khoảng 2-4 ngày thì trứng thụ tinh chuyển dần từ màu trắng sữa sang màu vàng chanh, màu vàng sẫm, màu nâu rồi nâu đen, cuối cùng là màu đen; còn trứng không thụ tinh thì bị mất nước, méo mó, dị dạng. Xô màn cùng với trứng được bỏ vào hộp lồng Petri cho đến khi trứng sắp nở sâu thì cho thức ăn vào hộp lồng để sâu ăn.

4.1.1.2 Quy trình công nghệ nuôi nhân hàng loạt sâu khoang (*Spodoptera litura* F.)

Quy trình công nghệ nuôi nhân hàng loạt sâu xanh (*Spodoptera litura* F.) bao gồm các bước sau:

a) Bước 1: Giai đoạn nuôi sâu non

Giai đoạn nuôi sâu non bao gồm các công đoạn sau:

+ Công đoạn I: Nuôi sâu tập thể

+ Công đoạn II: Nuôi sâu cá thể

+ Công đoạn I: Nuôi sâu tập thể

Khi trứng thụ tinh sâu khoang ở giai đoạn đầu đen (sau khi trưởng thành đẻ trứng khoảng 2-4 ngày) thì cắt xô màn, giấy có trứng thành từng miếng nhỏ. Tiếp đến bỏ miếng xô màn, giấy có trứng sâu khoang này vào hộp lồng Petri. Trong mỗi hộp lồng đặt khoảng 1/2 ổ đến 1 ổ trứng thụ tinh. Hộp lồng Petri đặt như sau: đĩa to ở bên dưới, đĩa nhỏ úp lên trên. Bằng cách đặt hộp lồng

như vậy sẽ hạn chế được sâu non bò ra khỏi hộp lồng Petri. Khi sâu non bắt đầu xuất hiện thì dùng xẻng dẹt chuyên dùng phết thức ăn vào cạnh đĩa Petri và để phần đĩa có thức ăn hướng về phía ánh sáng mạnh nhất trong phòng (đây là đặc tính sinh học khác với sâu khoang ở ngoài tự nhiên: trong tự nhiên sâu sống thành ổ khi mới nở và thường phát tán khi sâu sang tuổi 2). Sâu non mới nở hoạt động mạnh, bò lung tung nhưng có tính hướng ánh sáng sẽ bò gần hết vào thức ăn. Khi trứng nở hết sâu (sau khoảng 3-4 ngày kể từ khi trứng bắt đầu nở ra sâu) thì loại bỏ xô màn, giấy ra khỏi hộp lồng Petri để tránh thức ăn khỏi bị mốc do xô màn, giấy và thêm không khí cho sâu phát triển tốt.

+ Công đoạn 2: Nuôi sâu khoang cá thể hay nuôi sâu khoang tập thể

Ở giai đoạn này sâu non được nuôi trong hộp lồng Petri. Mỗi hộp lồng Petri đặt khoảng từ 100 đến 150 quả trứng thụ tinh hay 1 ổ trứng nhỏ. Đặt hộp lồng Petri sao cho đĩa Petri to ở phía dưới còn đĩa Petri nhỏ úp lên trên để hạn chế sâu non bò ra khỏi hộp Petri. Khi trứng nở ra sâu thì mới phết thức ăn vào thành đĩa Petri nhỏ và đặt phần đĩa có thức ăn quay về phía ánh sáng mạnh nhất trong phòng. Nếu trong một hộp lồng Petri có trứng nở ra nhiều sâu thì dùng bút lông chuyển sang hộp Petri khác với lượng 90-100 sâu non trong một hộp lồng Petri

Ở giai đoạn nuôi nhân sâu khoang này, sâu khoang có thể nuôi tập thể hay nuôi nhân cá thể tùy theo mục đích nuôi nhân. Nếu nuôi nhân sâu khoang tập thể thì sâu khoang ít có biểu hiện ăn thịt lẫn nhau trong điều kiện thừa thức ăn. Tuy nhiên việc nuôi sâu khoang tập thể dẫn đến nhộng sâu không có khối lượng nhẹ hơn so với khối lượng sâu khoang nuôi cá thể và khả năng đẻ trứng cũng ít hơn so với sâu khoang nuôi cá thể.

Sâu khoang ở giai đoạn này có thể nuôi tập thể trong khay sắt bằng thép không gỉ có kích thước (25x20x5cm), mỗi khay nuôi 25-30 sâu hoặc dùng xô can thủy tinh có đường kính $d=12\text{cm}$ nuôi với lượng 20-30 sâu. Hàng ngày loại bỏ phân sâu và cho sâu ăn thêm. Khi sâu non đầy sức thì chuyển sang dụng cụ đựng mùn cưa đã được khử trùng ở nhiệt độ 105°C để cho sâu hoá nhộng trong mùn cưa.

Nếu nuôi cá thể thì sâu khoang được nuôi trong khung nhựa chia ô (kích thước mỗi ô là $2.0 \times 1,5 \times 1,5\text{cm}$) hay trong lọ penixillin (để lọ penixillin nằm nghiêng). Hàng ngày kiểm tra loại bỏ sâu chết. Khi sâu non đầy sức chuẩn bị vào nhộng thì để lọ penixillin nằm. Với cách nuôi này sâu vào nhộng ít bị dị dạng.

B) Bước 2: Giai đoạn thu và bảo quản nhộng

Sâu non đầy sức sẽ ngừng ăn và chuyển sang giai đoạn tiền nhộng, sau đó sâu lột xác hoá nhộng. Sâu hoá nhộng ngay trong thức ăn thừa và phân sâu. Sâu hoá nhộng được khoảng 4-5 ngày thì tiến hành thu nhộng. Nhộng khi đó đã có vỏ cứng và màu vàng nâu sẫm. Nhộng thu xong được rửa sạch và xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,5% trong khoảng 5-10 phút, sau đó rửa sạch lại nhiều lần dưới vòi nước máy. Sau khi rửa sạch, nhộng được trải đều nhẹ nhàng một lớp mỏng trên giấy bản và đặt trên khay nhựa để cho khô ráo ở nhiệt độ trong phòng từ $24-32^{\circ}\text{C}$. Tiếp theo thì xác định nhộng đực, nhộng cái và để tách riêng nhộng đực, nhộng cái. Sau đó cho nhộng riêng rẽ nhộng đực và nhộng cái vào lọ thủy tinh miệng rộng hay xô-can thủy tinh với số lượng 40-50 nhộng/lọ. Nắp lọ đựng nhộng đực nên bịt giấy khác màu với nắp lọ đựng nhộng cái. Khoảng 8-10 ngày sau khi thu nhộng thì nhộng chuyển sang màu đen. Khi nhộng sắp vũ hoá thì đặt vào lọ nút nhựa đựng dung dịch mật ong 10% + vitamin tổng hợp tẩm vào bông thấm nước sạch để cho trưởng thành ăn thêm ngay sau khi xuất hiện. Trong lọ thủy tinh hay trong xô-can để những miếng giấy gấp nếp có kích thước $10 \times 20\text{cm}$ làm nơi đậu cho trưởng thành ngay sau khi vũ hoá làm cho trưởng thành có nơi đậu thì trưởng thành ít bị dị dạng. Hàng ngày tiến hành ghép cặp ngay sau khi có trưởng thành xuất hiện.

c) Bước 3: Giai đoạn ghép đôi trưởng thành và thu trứng

Khi có trưởng thành xuất hiện thì chọn ghép đôi các con trưởng thành to, khoẻ, hoạt động mạnh và không bị dị dạng. Trưởng thành xuất hiện ngày nào thì tiến hành ghép đôi ngay ngày đấy và ghép theo tỷ lệ 1:1. Lồng ghép trưởng thành làm bằng lưới thép không gỉ hình trụ có kích thước chiều cao $h=15\text{cm}$ và đường kính $d=20\text{cm}$. Số lượng ghép đôi là 10 cặp/lồng là tốt nhất. Phía trên và phía dưới lồng bịt chặt bằng xô màn; hoặc có thể ghép cặp và nuôi trong túi giấy đặt trong lọ thuỷ tinh có dung tích là 1,0 lít; nắp lọ đáy bằng xô màn với số lượng từ 2-3 cặp/lọ. Trong lọ hoặc trong lồng thường thử giấy đã gấp nếp để làm nơi đẻ trứng cho trưởng thành. Sau khi ghép đôi được 2-3 ngày thì trưởng thành cái bắt đầu đẻ trứng chủ yếu vào xô màn. Hàng ngày thay xô màn để lấy trứng và thay thức ăn cho trưởng thành ăn thêm thì 2 ngày thay một lần. Khi nuôi trưởng thành, nếu thấy có trưởng thành chết thì lấy ra loại bỏ.

e) Bước 4: Giai đoạn ấp trứng

Sâu khoang đẻ trứng thành ổ trên giấy hoặc xô màn. Khi thu trứng thì cất loại bỏ giấy hoặc xô màn thừa, chỉ lấy ổ trứng. Ổ trứng được bảo quản trong hộp Petri đến khi nở thì cho thức ăn vào và một thế hệ sâu non mới lại bắt đầu.

Nhân nuôi hàng loạt sâu xanh (*Heliothis armigera* Hb.) và sâu khoang (*Spodoptera litura* F.) bằng thức ăn nhân tạo theo sơ đồ quy trình công nghệ sau:

4.2 Nghiên cứu sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV dạng dịch thể và dạng bột

4.2.1 Nghiên cứu pha chế chế phẩm hỗn hợp NPV

Thí nghiệm gồm 2 công thức pha chế:

Công thức 1: pha chế NPV dưới dạng dịch thể và sấy khô.

Công thức 2: sấy khô từng loại NPV và hỗn hợp.

Pha chế chế phẩm NPV dạng dịch thể và dạng bột theo quy trình sau:

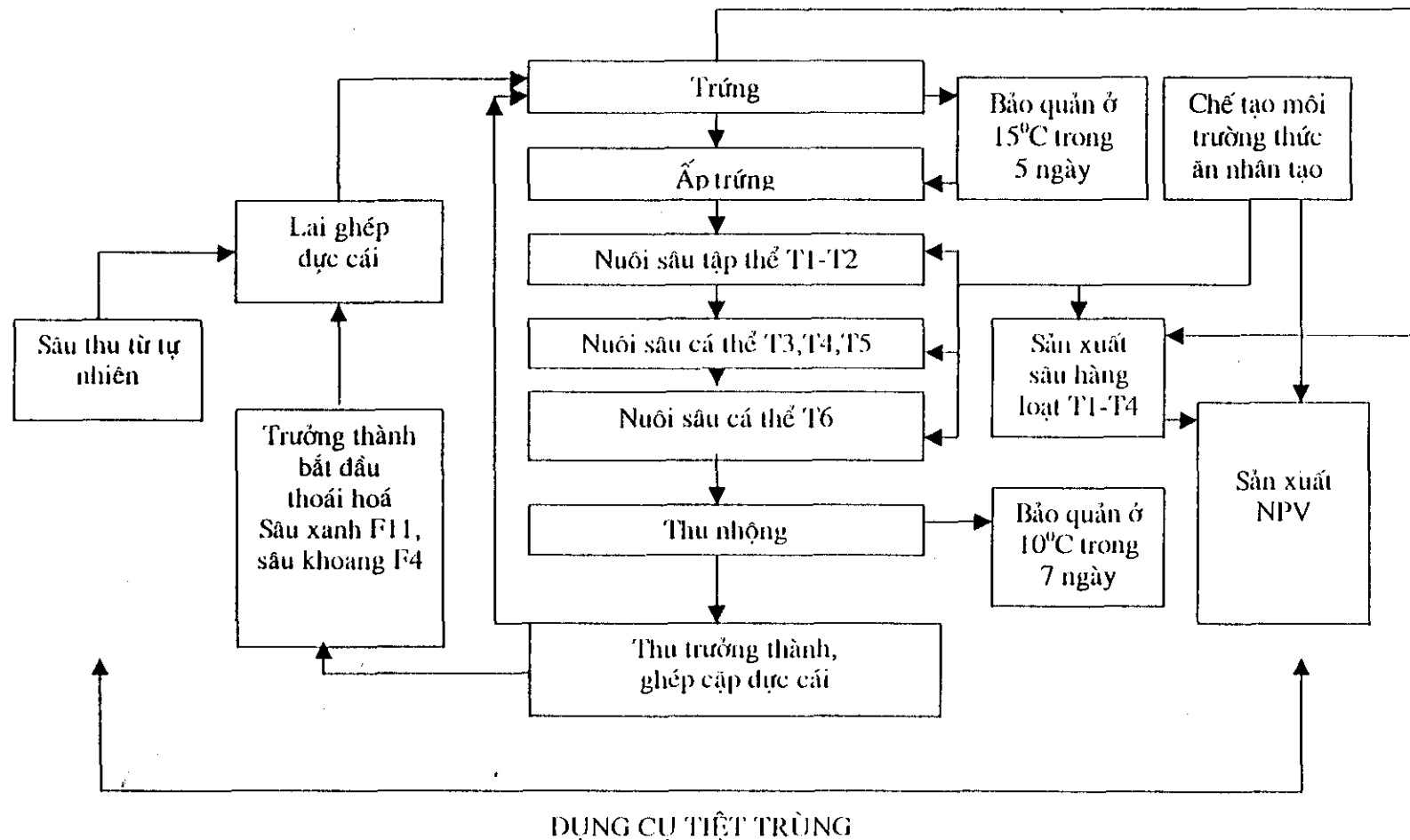
a) Quy trình công nghệ pha chế chế phẩm sinh học trừ sâu hỗn hợp NPV và V-Bt

Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV trừ sâu hại cây trồng bao gồm các công đoạn sau:

- 1- Công đoạn vệ sinh môi trường và dụng cụ nuôi nhân.
- 2- Công đoạn nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu.
- 3- Công đoạn nhân nuôi vi rút trên cơ thể sâu non.
- 4- Công đoạn pha chế chế phẩm vi rút trừ sâu.
- 5- Công đoạn kiểm tra đánh giá chất lượng chế phẩm.
- 6- Công đoạn đóng gói và bảo quản chế phẩm.

1- Công đoạn vệ sinh môi trường và dụng cụ nuôi nhân

Nhằm tránh hiện tượng sâu chết hàng loạt thì trong quá trình nuôi sâu để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu phải tuân thủ nghiêm ngặt các quy định về vệ sinh an toàn lao động cho các môi trường nuôi nhân, dụng cụ và nhân viên kỹ thuật. Phòng nuôi sâu cần phải có trang bị hệ thống thiết bị vô trùng không khí: không khí đi qua thiết bị vô trùng để diệt nấm mốc, vi khuẩn, vi rút... được điều chỉnh nhiệt độ và ẩm độ và dòng không khí chỉ di chuyển theo một chiều nhất định từ phòng nuôi sâu giống đến phòng nuôi sâu hàng loạt để cung cấp cho phòng lây nhiễm chế phẩm vi rút. Phòng nuôi sâu hàng loạt phải bố trí cách ly phòng lây nhiễm vi rút ít nhất là 200m. Trong thời điểm hiện nay chỉ mới áp dụng biện pháp khử trùng bằng đèn cực tím và điều khiển nhiệt độ bằng máy điều hoà nhiệt độ. Sau mỗi lứa sâu, toàn bộ phòng nuôi sâu được khử trùng bằng đèn cực tím và dụng cụ



Sơ đồ quy trình nhân nuôi và sản xuất hàng loạt sâu xanh (*Heliothis armigera* Hb.) và sâu khoang (*Spodoptera litura* F.) thức ăn nhân tạo (Trần Đình Phả, 1999).

nuôi nhân đều được xử lý qua dung dịch hypochloride 1%. Thức ăn sau khi chế biến được khử trùng bằng đèn cực tím.

Trong quá trình nuôi nhân sâu hàng loạt lâu dài trong phòng để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu thường gặp hiện tượng sâu có khuynh hướng bị thoái hoá. Bởi vậy phải định kỳ tiến hành phục tráng giống bằng cách định ký lai tạo giữa các thể nuôi trong phòng với cá thể trong tự nhiên. Để phục tráng giống, sâu nuôi để giống được chăm sóc đặc biệt và cho thức ăn riêng.

2- Công đoạn nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu

(áp dụng quy trình công nghệ nuôi nhân sâu hàng loạt bằng thức ăn nhân tạo). Công đoạn nuôi sâu bao gồm hai bộ phận: bộ phận nuôi sâu duy trì giống và bộ phận nuôi sâu hàng loạt sản xuất để lấy nhiễm vi rút:

+ **Bộ phận nuôi sâu duy trì sâu giống:** sâu nuôi để giống được chăm sóc đặc biệt được ăn thức ăn riêng và định ký phục tráng giống. Phòng nuôi sâu giống bao gồm các giai đoạn sau:

- **Chọn sâu để giống:** Từ những con bướm đẻ nhiều trứng thụ tinh và cho tỷ lệ nở cao và sâu lớn nhanh và đều thì chọn giống khi sâu bước vào tuổi 4. Chọn những con sâu khoẻ, lớn đồng đều và nuôi bằng thức ăn có chất lượng cao để bồi dục.

- **Thu nhộng:** sâu non đầy sức hoá nhộng trong thức ăn thừa và phân sâu. Sau khi vỏ nhộng cứng thì thu nhộng. Nhộng thu được rửa sạch và xử lý bằng thuốc tím 0,5% trong 5- 10 phút, sau đó để cho khô ráo ở nhiệt độ trong phòng. Phân riêng nhộng đực, nhộng cái và bảo quản riêng rẽ chờ vũ hoá.

- **Trưởng thành:** khi nhộng vũ hoá thì tiến hành ghép cặp nuôi trong lồng nuôi bằng thép không gỉ có kích thước chiều cao $h=15\text{cm}$ và đường kính $d=20\text{cm}$. Trong mỗi lồng ghép 10-15 cặp. Trưởng thành được cho ăn thêm bằng dung dịch mật ong 10% có bổ sung vitamin hỗn hợp. Sau khi ghép cặp được 2- 4 ngày thì trưởng thành cái bắt đầu đẻ trứng. Hàng ngày thu trứng và chuyển vào tủ ấp trứng.

- **Ấp trứng:** trứng sau khi xử lý được bảo quản chống kiến và cho ấp ở nhiệt độ $28-30^{\circ}\text{C}$. Sau 2-3 ngày trứng chuyển sang màu đen thì chuyển trứng sang phòng nuôi sâu giống hoặc nuôi sâu sản xuất.

+ **Bộ phận nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu:** phòng nuôi sâu phải được vô trùng và thay đổi không khí thường xuyên. Nhiệt độ tối ưu cho phòng nuôi sâu là $28-30^{\circ}\text{C}$. Sâu nuôi đến tuổi 4 thì xuất sâu cho phòng lấy nhiễm vi rút để sản xuất sinh khối vi rút.

3- Công đoạn nhân nuôi vi rút trên cơ thể sâu non

Dùng nguồn vi rút hoang dã làm nguồn vi rút chuẩn. Nguồn vi rút này được giữ thuần khiết, không tạp nhiễm. Vi rút chuẩn được định kỳ kiểm tra và xác bằng phương pháp thử sinh học. Để cho sản phẩm luôn ổn định về mặt chất lượng thì nên sử dụng nguồn vi rút hoang dã trong tự nhiên để sản xuất. Sâu non đến tuổi 4 thì lấy nhiễm vi rút cho sâu bằng thức ăn có trộn dung dịch vi rút với nồng độ 10^8 PIB/ml thì cho hiệu quả sâu chết tối đa do vi rút.

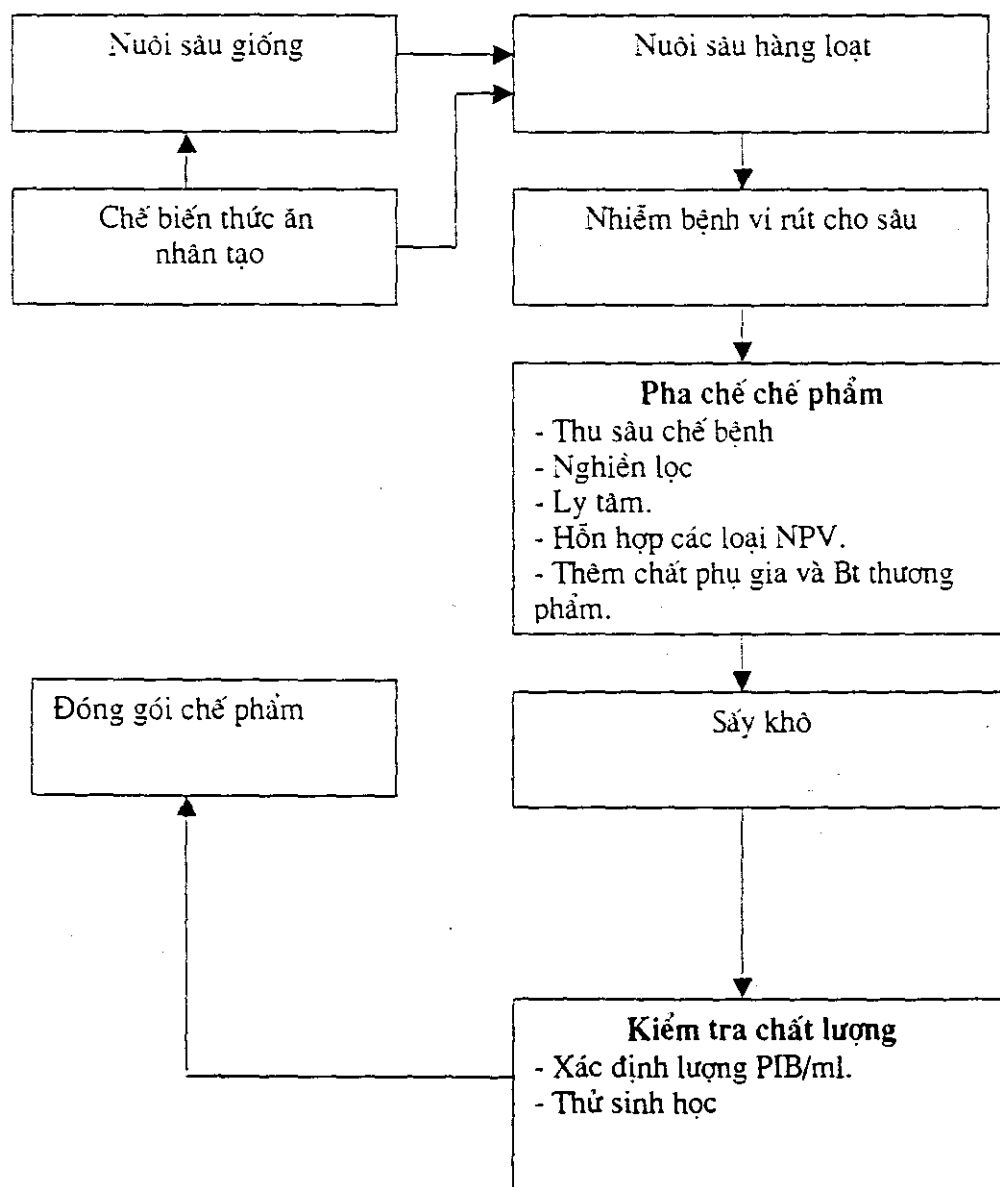
4- Công đoạn kiểm tra đánh giá chất lượng chế phẩm

Sau giai đoạn lấy nhiễm vi rút thì thu toàn bộ sâu chết do vi rút cho vào lọ bảo quản trong tủ lạnh. Sau đó thì nghiền nát sâu bằng máy xay và lọc qua mòng, sau đó ly tâm để lấy tinh thể PIB tinh khiết. Mỗi mẻ lấy nhiễm sâu đều lấy mẫu chuyển sang phòng kiểm tra chất lượng để kiểm tra bằng cách thử sinh học. Qua phương pháp này xác định được LD_{50} của sản phẩm. Từ đó so sánh với LD_{50} của vi rút tiêu chuẩn là tiêu chuẩn bắt buộc của sản phẩm. Bằng phương pháp phân tích PSR kiểm tra độ thuần của vi rút. Sau cùng là xác định lượng PIB/ml dung dịch bằng cách soi dưới kính hiển vi và buồng đếm hồng cầu. Thông thường thì chỉ sử dụng phương pháp thử sinh học sản phẩm trước khi xuất xưởng chế phẩm sinh học trừ sâu.

Phương pháp thử sinh học để kiểm tra chất lượng chế phẩm:

- Nguồn sâu để kiểm tra: sâu nuôi trong phòng khoẻ, không bị lây nhiễm bệnh.
- Dung dịch kiểm tra được pha ở 3 nồng độ: nồng độ 1 thấp hơn LD_{50} của dịch chuẩn 10 lần; nồng độ 2 bằng nồng độ LD_{50} của dung dịch chuẩn; nồng độ 3 cao hơn LD_{50} của dịch chuẩn 10 lần.
- Cách bố trí thí nghiệm: thức ăn được trộn với 3 loại dung dịch để riêng rẽ sau đó cho vào các lọ. Mỗi lọ được thả một sâu non tuổi 2. Nút lọ bằng bông đã tiệt trùng. Thí nghiệm kiểm tra được bố trí 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại 30 cá thể sâu non. Kiểm tra sâu chết do vi rút sau 1,3,5,7,9 ngày. Từ đó tính ra LD_{50} và so sánh với LD_{50} của mẫu tiêu chuẩn.
- Hiệu lực chế phẩm được hiệu đính theo công thức Abbott.

**Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm
NPV và V-Bt dạng bột**



5- Công đoạn pha chế chế phẩm vi rút trừ sâu

Sau khi kiểm tra chất lượng thì dung dịch vi rút được chuyển sang bộ phận pha chế có cho thêm các chất phụ gia, hong khô hoặc sấy khô ở nhiệt độ 30-35°C để trở thành dạng bột mịn. Sau đó trộn với Bt theo tỷ lệ 1: 1 để có chế phẩm hỗn hợp V-Bt.

6- Công đoạn đóng gói và bảo quản chế phẩm

Chế phẩm vi rút được đóng trong túi ni lông sẫm màu và bảo quản trong các hộp các tông dày tránh ánh nắng trực tiếp.

Thời gian bảo quản: chế phẩm vi rút trừ sâu có thể bảo quản được 2 năm ở nhiệt độ bình thường và tránh ánh sáng trực tiếp.

b) Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm NPV: ViHa, ViS₁ dạng dịch thể và dạng bột

Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV: ViHa và ViS₁ trừ sâu hại cây trồng bao gồm các công đoạn sau:

- 1- Công đoạn vệ sinh môi trường và dụng cụ nuôi nhân .
- 2- Công đoạn nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu.
- 3- Công đoạn nhân nuôi vi rút trên cơ thể sâu non.
- 4- Công đoạn pha chế chế phẩm vi rút trừ sâu.
- 5- Công đoạn kiểm tra đánh giá chất lượng chế phẩm.
- 6- Công đoạn đóng gói và bảo quản chế phẩm.

1- Công đoạn vệ sinh môi trường và dụng cụ nuôi nhân

Nhằm tránh hiện tượng sâu chết hàng loạt thì trong quá trình nuôi sâu để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu phải tuân thủ nghiêm ngặt các quy định về vệ sinh an toàn lao động cho các môi trường nuôi nhân, dụng cụ và nhân viên kỹ thuật. Phòng nuôi sâu cần phải có trang bị hệ thống thiết bị vô trùng không khí: không khí đi qua thiết bị vô trùng để diệt nấm mốc, vi khuẩn, vi rút... được điều chỉnh nhiệt độ và ẩm độ và dòng không khí chỉ di chuyển theo một chiều nhất định từ phòng nuôi sâu giống đến phòng nuôi sâu hàng loạt để cung cấp cho phòng lây nhiễm chế phẩm vi rút. Phòng nuôi sâu hàng loạt phải bố trí cách ly phòng lây nhiễm vi rút ít nhất là 200m. Trong thời điểm hiện nay chỉ mới áp dụng biện pháp khử trùng bằng đèn cực tím và điều khiển nhiệt độ bằng máy điều hoà nhiệt độ. Sau mỗi lứa sâu, toàn bộ phòng nuôi sâu được khử trùng bằng đèn cực tím và dụng cụ nuôi nhân đều được xử lý qua dung dịch hypocloride 1%. Thức ăn sau khi chế biến được khử trùng bằng đèn cực tím.

Trong quá trình nuôi nhân sâu hàng loạt lâu dài trong phòng để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu thường gặp hiện tượng sâu có khuynh hướng bị thoái hoá . Bởi vậy phải định kỳ tiến hành phục tráng giống bằng cách định ký lai tạo giữa các thể nuôi trong phòng với cá thể trong tự nhiên. Để phục tráng giống, sâu nuôi để giống được chăm sóc đặc biệt và cho thức ăn riêng.

2- Công đoạn nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu

(áp dụng quy trình công nghệ nuôi nhân sâu hàng loạt bằng thức ăn nhân tạo) . Công đoạn nuôi sâu bao gồm hai bộ phận: bộ phận nuôi sâu duy trì giống và bộ phận nuôi sâu hàng loạt sản xuất để lây nhiễm vi rút:

+ Bộ phận nuôi sâu duy trì sâu giống: sâu nuôi để giống được chăm sóc đặc biệt được ăn thức ăn riêng và định ký phục tráng giống. Phòng nuôi sâu giống bao gồm các giai đoạn sau:

- **Chọn sâu để giống:** Từ những con bướm đẻ nhiều trứng thụ tinh và cho tỷ lệ nở cao và sâu lớn nhanh và đều thì chọn giống khi sâu bước vào tuổi 4. Chọn những con sâu khỏe, lớn đồng đều và nuôi bằng thức ăn có chất lượng cao để bồi dục.

- Thu nhộng: sâu non đầy sức hoá nhộng trong thức ăn thừa và phân sâu. Sau khi vỏ nhộng cứng thì thu nhộng. Nhộng thu được rửa sạch và xử lý bằng thuốc tím 0,5% trong 5- 10 phút, sau đó để cho khô ráo ở nhiệt độ trong phòng. Phân riêng nhộng đực, nhộng cái và bảo quản riêng rẽ chờ vũ hoá.

- *Trưởng thành*: khi nhộng vũ hoá thì tiến hành ghép cặp nuôi trong lồng nuôi bằng thép không gỉ có kích thước chiều cao $h=15\text{cm}$ và đường kính $d=20\text{cm}$. Trong mỗi lồng ghép 10-15 cặp. Trưởng thành được cho ăn thêm bằng dung dịch mật ong 10% có bổ sung vitamin hỗn hợp. Sau khi ghép cặp được 2- 4 ngày thì trưởng thành cái bắt đầu đẻ trứng. Hàng ngày thu trứng và chuyển vào tủ ấp trứng.

- *Ấp trứng*: trứng sau khi xử lý được bảo quản chống kiến và cho ấp ở nhiệt độ $28-30^{\circ}\text{C}$. Sau 2-3 ngày trứng chuyển sang màu đen thì chuyển trứng sang phòng nuôi sâu giống hoặc nuôi sâu sản xuất.

+ *Bộ phận nuôi sâu hàng loạt để sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu*: phòng nuôi sâu phải được vô trùng và thay đổi không khí thường xuyên. Nhiệt độ tối ưu cho phòng nuôi sâu là $28-30^{\circ}\text{C}$. Sâu nuôi đến tuổi 4 thì xuất sâu cho phòng lây nhiễm vi rút để sản xuất sinh khối vi rút.

3- Công đoạn nhân nuôi vi rút trên cơ thể sâu non

Dùng nguồn vi rút hoang dã làm nguồn vi rút chuẩn. Nguồn vi rút này được giữ thuần khiết, không tạp nhiễm. Vi rút chuẩn được định kỳ kiểm tra và xác bằng phương pháp thử sinh học. Để cho sản phẩm luôn ổn định về mặt chất lượng thì nên sử dụng nguồn vi rút hoang dã trong tự nhiên để sản xuất. Sâu non đến tuổi 4 thì lây nhiễm vi rút cho sâu bằng thức ăn có trộn dung dịch vi rút với nồng độ 10^8 PIB/ml thì cho hiệu quả sâu chết tối đa do vi rút.

4- Công đoạn đánh giá chất lượng chế phẩm

Sau giai đoạn lây nhiễm vi rút thì thu toàn bộ sâu chết do vi rút cho vào lọ bảo quản trong tủ lạnh. Sau đó thì nghiền nát sâu bằng máy xay và lọc qua màng, sau đó ly tâm để lấy tinh thể PIB tinh khiết. Mỗi mẻ lây nhiễm sâu đều lấy mẫu chuyển sang phòng kiểm tra chất lượng để kiểm tra bằng cách thử sinh học. Qua phương pháp này xác định được LD_{50} của sản phẩm. Từ đó so sánh với LD_{50} của vi rút tiêu chuẩn là tiêu chuẩn bắt buộc của sản phẩm. Bằng phương pháp phân tích PSR kiểm tra độ thuần của vi rút. Sau cùng là xác định lượng PIB/ml dung dịch bằng cách soi dưới kính hiển vi và buồng đếm hồng cầu. Thông thường thì chỉ sử dụng phương pháp thử sinh học sản phẩm trước khi xuất xưởng chế phẩm sinh học trừ sâu.

Phương pháp thử sinh học để kiểm tra chất lượng chế phẩm:

- Nguồn sâu để kiểm tra: sâu nuôi trong phòng khoẻ, không bị lây nhiễm bệnh.

- Dung dịch kiểm tra được pha ở 3 nồng độ: nồng độ 1 thấp hơn LD_{50} của dịch chuẩn 10 lần; nồng độ 2 bằng nồng độ LD_{50} của dung dịch chuẩn; nồng độ 3 cao hơn LD_{50} của dịch chuẩn 10 lần.

- Cách bố trí thí nghiệm: thức ăn được trộn với 3 loại dung dịch để riêng rẽ sau đó cho vào các lọ. Mỗi lọ được thả một sâu non tuổi 2. Nút lọ bằng bông đã tiệt trùng. Thí nghiệm kiểm tra được bố trí 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại 30 cá thể sâu non. Kiểm tra sâu chết do vi rút sau 1,3,5,7,9 ngày. Từ đó tính ra LD_{50} và so sánh với LD_{50} của mẫu tiêu chuẩn.

- Hiệu lực chế phẩm được hiệu đính theo công thức Abbott.

5- Công đoạn pha chế chế phẩm vi rút trừ sâu

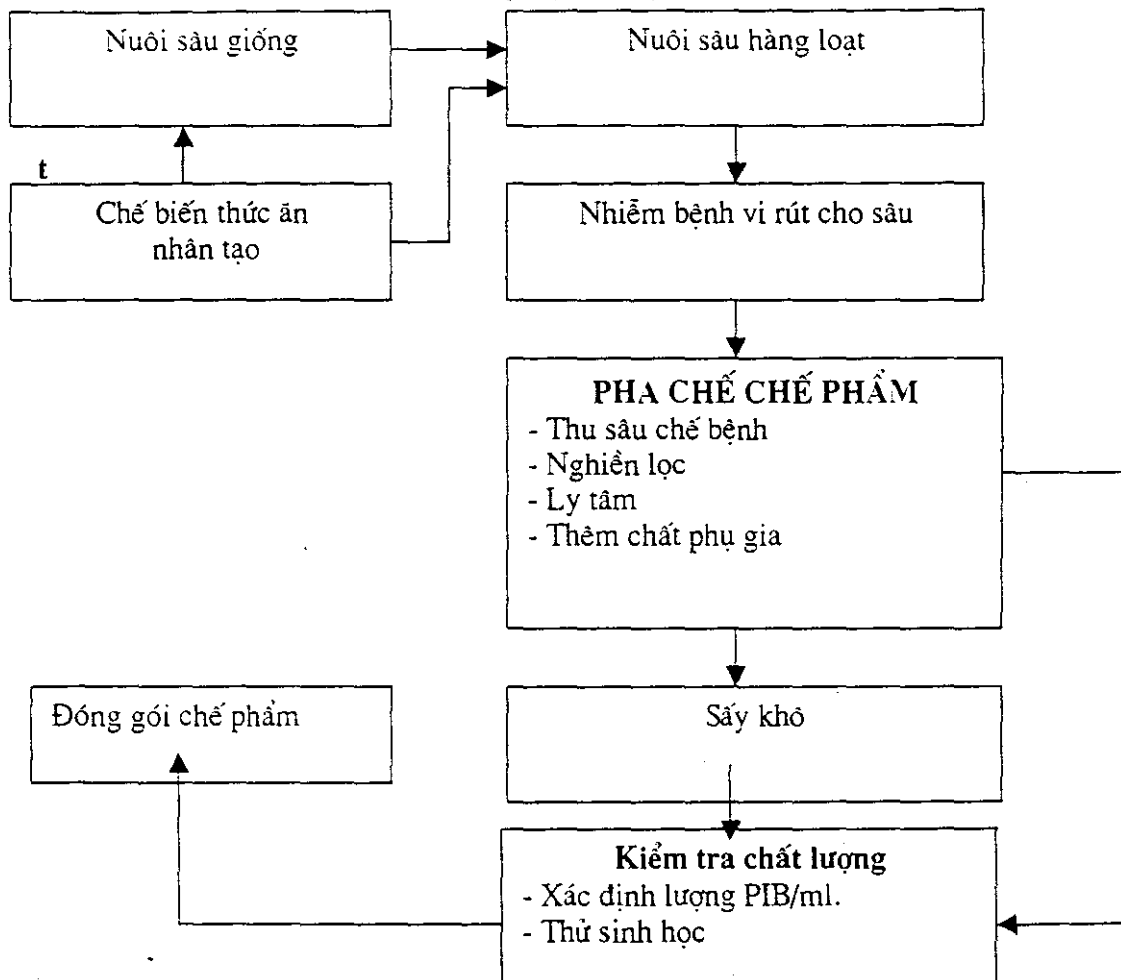
Sau khi kiểm tra chất lượng thì dung dịch vi rút được chuyển sang bộ phận pha chế có cho thêm các chất phụ gia và hỗn hợp các loại vi rút với nhau theo tỷ lệ 1:1.

6- Công đoạn đóng gói và bảo quản chế phẩm

Chế phẩm vi rút được đóng trong chai nhựa sẫm màu và bảo quản trong các hộp các tông dày tránh ánh nắng trực tiếp.

Thời gian bảo quản: chế phẩm vi rút trừ sâu có thể bảo quản được 2 năm ở nhiệt độ bình thường và tránh ánh sáng trực tiếp.

**SƠ ĐỒ QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM
NPV: ViHa VÀ ViS, DẠNG DỊCH THỂ VÀ DẠNG BỘT**



4.2.2 Nghiên cứu chất phụ gia trong pha chế chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt

Nhằm mục đích nâng cao hiệu quả phòng trừ sâu hại, các chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt sau khi sấy khô được pha chế thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,01%; 0,02% và 0,03%. Các chế phẩm sau khi pha chế được thử lại hiệu lực trên sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ tuổi 2.

4.2.3 Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm ngoài đồng ruộng

Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm sinh học NPV, V-Bt trong sản xuất rau an toàn.

- Mô hình xây dựa trên quy trình sản xuất rau an toàn do Viện BVTV công bố.
- Điều tra thành phần và biến động số lượng sâu hại trên các đối tượng cây rau trong mô hình.
- Sử dụng thuốc trừ sâu sinh học là chủ yếu có xen kẽ với việc sử dụng thuốc hoá học có độ độc thấp để phòng chống sâu hại.
- Đánh giá hiệu quả của mô hình ứng dụng chế phẩm sinh học.

Để tài tiến hành xây dựng 2 mô hình ứng dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ hại rau tại 2 HTX : trên diện tích 2ha su hào, súp lơ, cà chua tại Yên

Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc và trên diện tích 3ha bắp cải tại Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây.

- Thời gian tiến hành: tháng 10-tháng 11 năm 2003 và tháng 9- tháng 10 năm 2004.
- Phương pháp: dựa trên các ruộng của các hộ nông dân , khoanh vùng điều tra định kỳ 5-7 ngày một lần để theo dõi mật độ sâu để phun thuốc kịp thời. Phun khi trứng mới nở hoặc sâu tuổi còn nhỏ. Phun thuốc vào lúc chiều mát. Kiểm tra mật độ sâu khi phun thuốc.

4.3 Xử lý số liệu

Kết quả đánh giá hiệu lực của chế phẩm trong phòng thí nghiệm được hiệu chỉnh theo Abbot, ngoài đồng ruộng theo Henderson-Tilton.

5. KẾT QUẢ ĐẠT ĐƯỢC

5.1 Kết quả thu thập thành phần sâu hại vi rút

Để có nguồn vi rút bổ sung cho việc sản xuất chế phẩm vi rút trừ sâu. Đề tài đã tiến hành thu thập được 30 mẫu vi rút sâu khoang và 10 mẫu vi rút sâu cuốn lớn. Các mẫu được tách chiết để tạo nguồn cho sản xuất chế phẩm. Từ nguồn NPV-Ha và NPV-Sl mới thu được đã nhân lên để cung cấp cho việc lây nhiễm sâu sản xuất chế phẩm (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả thu thập thành phần vi rút sâu hại cây trồng

Loại vi rút	Cây trồng	Số lượng mẫu	Địa điểm
GV- sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>)	Su hào, bắp cải	30	Mê Linh, Vĩnh Phúc; Từ Liêm, Hà Nội.
NPV- sâu xanh (<i>Helicoverpa armigera</i>)	Lạc, cà chua	15	Sóc Sơn, Hà Nội; An Hải, Hải Phòng.
NPV- sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>)	Lạc, bắp cải	10	Từ Liêm, Hà Nội; Đan Phượng, Hà Tây.
NPV - sâu cuốn lá lớn	Lúa	10	Từ Liêm, Hà Nội.

5.2 Hiệu lực của nguồn NPV ngoài tự nhiên đối với sâu xanh (*Heliothis armigera*)

Thời gian thí nghiệm	Công thức thí nghiệm	Số sâu thí nghiệm	Tỷ lệ sâu bị nhiễm (%)	Lượng sinh khối vi rút (PIB/ml)	Ghi chú
5-2002	NPV mới	250	92,4	$2,83 \times 10^9$	$t^{0}C = 30^{0}C$
	NPV cũ	250	73,6	$2,80 \times 10^9$	$A(\%) = 85\%$
	Đối chứng (sâu khỏe)	0	0	0	
8-2002	NPV mới	250	88,0	$2,65 \times 10^9$	$t^{0}C = 32^{0}C$
	NPV cũ	250	75,6	$2,67 \times 10^9$	$A(\%) = 87\%$
	Đối chứng (sâu khỏe)	0	0	0	
11-2002	NPV mới	250	94,8	$3,05 \times 10^9$	$t^{0}C = 25^{0}C$
	NPV cũ	250	81,2	$3,00 \times 10^9$	$A(\%) = 80\%$
	Đối chứng (sâu khỏe)	0	0	0	

Kết quả nhiễm sâu xanh bằng nguồn vi rút mới thu ngoài tự nhiên cho tỷ lệ sâu xanh chết vi rút đạt 88,0-94,8% và sâu nhiễm nguồn vi rút đã sử dụng 3 năm cho tỷ lệ sâu xanh chết do vi rút là

73,6-81,2% trong cả đợt nhiễm theo dõi. Lượng sinh khối vi rút/sâu chết bệnh giữa 2 nguồn vi rút không có gì khác biệt.

5.3 Sản xuất chế phẩm NPV và V-Bt

Bảng 3. Kết quả lây nhiễm sâu xanh tuổi 4 để sản xuất chế phẩm NPV

Thời gian	Tổng số sâu nhiễm	Tỷ lệ các yếu tố gây chết cho sâu xanh			Điều kiện	
		Vi rút	Vi khuẩn, nấm, ruồi giấm	Sâu vào nhộng	Nhiệt độ TB (°C)	Âm độ TB (%)
2002	81500	84,02	12,68	3,30		
2003	115300	81,60	15,70	2,70		
2004	74000	84,20	12,40	3,40		
Tổng cộng	270800	83,3	13,59	3,13		

Bảng 4. Diện tích ứng dụng và số lượng chế phẩm NPV và V-Bt sản xuất được

TT	Loại chế phẩm và liều lượng sử dụng	Năm 2002			Năm 2003			Năm 2004		
		Số lượng (kg)	Diện tích sử dụng (ha)	Địa điểm sử dụng	Số lượng (kg)	Diện tích sử dụng (ha)	Địa điểm sử dụng	Số lượng (kg)	Diện tích sử dụng (ha)	Địa điểm sử dụng
1 2	Chế phẩm ViHa: 3x10 ⁹ PIB/ml	200,0	20,0	HN, HT, VP	-	-	-	-	-	-
3	Hỗn hợp NPV: 3,0x10 ⁹ PIB/gam (1,0-1,2 kg/ha)	-	-	-	90,0	50,0	HN, HT, PT, VP, HP, HN, NB.	34,0	15,0	HN, HT, VP.
4	V-Bt: NPV 10 ⁹ + Bt 32000IU/mg (1,0-1,2 kg/ha)	-	-	-	120	-	-	34,0	-	-

Ghi chú: HN- Hà Nội; HT- Hà Tây; PT- Phú Thọ; VP- Vĩnh Phúc; HP- Hải Phòng; HN- Hà Nam; NB- Ninh Bình.

5.4 Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm bằng phương pháp thử sinh học trong phòng thí nghiệm

5.4.1 Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura* F.) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột trong phòng thí nghiệm

Với mục đích nâng cao hiệu quả phòng trừ sâu hại, giảm giá thành sản phẩm thuốc trừ sâu sinh học, nhóm nghiên cứu của đề tài đã nghiên cứu thêm chất phụ gia tạo sản phẩm hỗn hợp và đã tạo được các loại chế phẩm NPV, V-Bt có chất lượng ổn định. Kết quả thử hiệu lực chế phẩm hỗn hợp NPV trên sâu khoang tuổi 2 ở cả hai phương pháp tạo chế phẩm đều cho tỷ lệ sâu chết cao 91,3 - 94,0% sau 5 ngày thí nghiệm và 100% sau 7 ngày thí nghiệm (bảng 5).

Bảng 5: Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột

Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng (g/lít)	Số sâu thí nghiệm	Tỷ lệ sâu chết (%) sau khi xử lý			Điều kiện nhiệt độ, ẩm độ
			3 ngày	5 ngày	7 ngày	
CT I	2.0	50	52,5	91,3	100	29°C; 83,5%
CT II	2.0	50	56,2	91,7	100	
ViS ₁	2.0	50	67,1	94,0	100	
Đối chứng	-	50	0	0	0	

Ghi chú: CTI- Pha chế hỗn hợp dịch thể NPV và sấy khô.

CTII- Sấy khô từng loại NPV sau đó hỗn hợp.

Số liệu trung bình của 2 lần thí nghiệm.

Bảng 6: Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV dạng bột

Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng (g/ lít)	Số sâu thí nghiệm	Tỷ lệ sâu chết sau khi xử lý (%)			Điều kiện nhiệt độ, ẩm độ
			3 ngày	5 ngày	7 ngày	
CT I	2.0	50	69,5	92,2	100	28°C; 82%
CT II	2.0	50	70,0	95,8	100	
ViHa	2.0	50	73,4	100	-	
Đối chứng	-	50	0	0	0	

Ghi chú: CTI- Pha chế hỗn hợp dịch thể NPV và sấy khô.

CTII- Sấy khô từng loại NPV sau đó hỗn hợp.

Đối với sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) thì hiệu quả của chế phẩm hỗn hợp NPV cũng cao ở cả hai công thức: sau 5 ngày xử lý tỷ lệ sâu xanh bị chết đạt 92,2-95,8%. Sử dụng ViHa thì tỷ lệ sâu chết 100% sau 5 ngày xử lý (bảng 6).

5.4.2 Nghiên cứu chất phụ gia trong sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt

5.4.2.1 Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) của chế phẩm hỗn hợp NPV có thêm chất phụ gia

Kết quả đánh giá hiệu lực của chế phẩm trừ sâu khoang của chế phẩm hỗn hợp NPV có thêm chất phụ gia trong phòng thí nghiệm cho thấy ở các công thức có thêm chất phụ gia SD từ 0,02% đến 0,03% cho hiệu quả sâu chết cao hơn so với công thức sử dụng NPV hỗn hợp và sau 5 ngày cho tỷ lệ sâu chết đạt 100%(Bảng 7). Sâu ở các công thức sử lý NPV dạng bột hỗn hợp có thêm chất phụ gia SD không ăn nhiều thức ăn như ở công thức chỉ sử dụng hỗn hợp NPV. Qua kết quả thí nghiệm này chúng tôi thấy để hạ giá thành thì nên cho thêm phụ gia SD vào chế phẩm hỗn hợp NPV với tỷ lệ 0,2% là hợp lý.

Bảng 7: Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV có thêm chất phụ gia trong phòng thí nghiệm

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/lít)	Tỷ lệ sâu chết sau sử lý (%)						
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày	7 ngày
1	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,01%	2	0	0	52,7	81,6	90,5	100	-
2	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,02%	2	0	0	60,8	95,6	100	-	-
3	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,03%	2	0	0	65,6	98,5	100	-	-
4	NPV hỗn hợp	2	0	0	42,6	72,6	80,5	91,2	96,5
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 28,7°C; độ ẩm 81,2%.

5.4.2.2 Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) của chế phẩm NPV có thêm chất phụ gia

Bảng 8: Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp NPV có thêm chất phụ gia (trong phòng thí nghiệm)

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/ lít)	Tỷ lệ sâu chết sau sử lý (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
1	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,01%	2	0	0	60,9	84,7	96,5	100
2	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,02%	2	0	0	67,1	93,6	100	-
3	NPV hỗn hợp + phụ gia SD 0,03%	2	0	0	68,4	95,9	100	-
4	NPV hỗn hợp	2	0	0	56,7	80,5	92,6	100
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 27,7°C; độ ẩm 75,2%.

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm hỗn hợp NPV có thêm chất phụ gia SD trong phòng thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sâu chết đạt từ 67,1 đến 68,4% sau 3 ngày xử lý thuốc, sau 5 ngày tỷ lệ sâu chết đạt 100% ở các công thức NPV hỗn hợp có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02%- 0,03%, sau 6 ngày tỷ lệ sâu chết đạt 100% ở công thức I: NPV hỗn hợp có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,01%(bảng 8).

5.4.2.3 Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu khoang tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp V-Bt có thêm chất phụ gia SD trong phòng thí nghiệm cho thấy ở cả 3 công thức 1, 2,3 sau 2 ngày xử lý đã xuất hiện sâu khoang chết với tỷ lệ 2,3-6,4%. Với công thức 1 thêm chất phụ gia với tỷ lệ 0,01% tỷ lệ sâu chết 100% sau 6 ngày xử lý. Ở công thức 2-3 có chất phụ gia với tỷ lệ 0,02-0,03% sau 5 ngày tỷ lệ sâu khoang chết đã đạt 100% (bảng9).

Bảng 9: Hiệu quả trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) tuổi 2 của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia thí nghiệm trong phòng thí nghiệm

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/lít)	Tỷ lệ sâu chết sau xử lý (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
1	V-Bt+ phụ gia SD 0,01%	2	0	2,3	58,3	85,2	87,7	100
2	V-Bt + phụ gia SD 0,02%	2	0	5,6	65,7	94,6	100	-
3	V-Bt+ phụ gia SD 0,03%	2	0	6,4	68,2	97,6	100	-
4	V-Bt	2	0	0	45,8	77,5	86,8	100
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 28,7⁰C; độ ẩm 81,2%.

5.4.2.4 Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 2 của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu xanh tuổi 2 của chế phẩm hỗn hợp V-Bt có thêm chất phụ gia SD trong phòng thí nghiệm cho thấy sau 2 ngày đã xuất hiện sâu chết ở cả 4 công thức thí nghiệm, với tỷ lệ từ 2,6-8,5%. Ở công thức 1 thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,01% sâu xanh chết

100% sau 6 ngày xử lý và ở công thức 2 và công thức 3 thêm chất phụ gia 0,02-0,03% sau 5 ngày sâu xanh đã chết 100% (bảng 10).

Bảng 10: Hiệu quả trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) tuổi 2 của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia thí nghiệm trong phòng

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/ lít)	Tỷ lệ sâu chết sau xử lý (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
1	V-Bt+ phụ gia SD 0,01%	2	0	5,8	65,3	82,5	86,7	100
2	V-Bt + phụ gia SD 0,02%	2	0	6,7	70,7	95,7	100	-
3	V-Bt + phụ gia SD 0,03%	2	0	8,5	76,6	95,7	100	-
4	V-Bt	2	0	2,6	66,8	81,5	86,8	100
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 28,7°C; độ ẩm 81,2%.

5.4.2.5 Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm hỗn hợp V-Bt có thêm chất phụ gia SD

trong phòng thí nghiệm cho thấy ngay sau 1 ngày thí nghiệm tỷ lệ sâu tơ bị chết đã đạt 20,5% - 32,4% ở cả 4 công thức. Ở 2 công thức có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02-0,03%, sau 3 ngày thí nghiệm tỷ lệ sâu tơ chết đã đạt 88,6-91,2% và 100% sau 4 ngày xử lý. Đối với công thức 1 có thêm chất phụ gia với tỷ lệ 0,01% sau 5 ngày sâu tơ mới chết 100% và công thức sử dụng chỉ có V-Bt sâu tơ chết chậm hơn (bảng 11).

Bảng 11: Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/lít)	Tỷ lệ sâu chết sau xử lý (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
1	V-Bt + phụ gia SD 0,01%	2	24,3	61,7	79,3	87,3	100	-
2	V-Bt + phụ gia SD 0,02%	2	30,6	68,2	88,6	100	-	-
3	V-Bt + phụ gia SD 0,03%	2	32,4	71,5	91,2	100	-	-
4	V-Bt	2	20,5	59,6	70,3	75,6	85,5	100
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 26,7°C; độ ẩm 78,2%.

5.4.2.6 Hiệu quả trừ sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) tuổi 2 của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

Chế phẩm hỗn hợp V-Bt cũng có khả năng trừ sâu xanh bướm trắng hại trên rau, tỷ lệ sâu xanh bướm trắng bị chết đạt 27,3%-40,6% ở tất cả 4 công thức sau 3 ngày xử lý (bảng 12). Với

công thức chế phẩm V-Bt thêm phụ gia SD với tỷ lệ 0,02-0,03% sâu xanh bướm trắng chết đạt 100% sau 7 ngày xử lý. Với công thức 1 chế phẩm V-Bt thêm phụ gia SD với tỷ lệ 0,01% và công thức 4 (chế phẩm V-Bt) sau 8 ngày sâu xanh bướm trắng mới chết 100%.

Bảng 12: Hiệu quả trừ sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) tuổi 2 của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia

TT	Công thức TN	Liều lượng sử dụng (gam/lít)	Tỷ lệ sâu chết sau xử lý (%)							
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày	7 ngày	8 ngày
1	V-Bt+ phụ gia SD 0,01%	2	0	0	29,5	57,2	79,7	85,3	96,6	100
2	V-Bt + phụ gia SD 0,02%	2	0	0	32,3	73,3	81,6	96,5	100	-
3	V-Bt + phụ gia SD 0,03%	2	0	0	40,6	78,6	84,6	97,6	100	-
4	V-Bt	2	0	0	27,3	21,5	76,8	81,6	92,3	100
5	Đối chứng	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: thí nghiệm tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 28,7°C; độ ẩm 81,2%.

5.5 Hiệu quả xây dựng mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trên một số loài sâu hại rau

5.5.1 Mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt trừ sâu hại rau tại HTXNN Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Hợp tác xã nông nghiệp Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc có diện tích trồng rau lớn trên 100 ha, chủ yếu trồng rau vào vụ đông và vụ xuân xen lẫn vụ lúa mùa trong năm. Trong các loại rau họ hoa thập tự, nông dân Yên Nhân chủ yếu trồng su hào, ngoài ra còn trồng cải ngọt, súp lơ, cải xanh... Trong những năm gần đây đề tài đã đưa thường xuyên các chế phẩm sinh học trừ sâu NPV, V-Bt, Bt vào ứng dụng trừ một số loài sâu hại rau do vậy nông dân vùng trồng rau bước đầu đã có thói quen và nhu cầu sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ sâu hại rau. Năm 2003 đề tài đã triển khai ứng dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trên diện tích 7ha rau của hợp tác xã. Năm 2004 đề tài đã triển khai ứng dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trên diện tích 10ha rau của hợp tác xã.

5.5.2 Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu hại rau tại HTXNN Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc.

Để nắm được tình hình sử dụng thuốc BVTV tại HTX đề tài đã tiến hành phỏng vấn 30 hộ nông dân của HTX tại các khu đồng trồng rau khác nhau. Kết quả được thể hiện ở bảng 10. Qua bảng 10 cho thấy: người trồng rau ở Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc sử dụng nhiều loại thuốc sinh học cũng như hoá học để phòng trừ sâu hại trên rau như Tập kỳ, Delfin, Regent, Padan... Khoảng cách giữa các lần phun thuốc ngắn từ 3 đến 5 ngày; số lần phun thuốc trong một vụ rau thường từ 7-10 lần. Đánh giá chung hiệu quả phòng trừ đạt từ 75 đến 85%

Bảng 13: Tình hình sử dụng thuốc BVTV trừ sâu hại rau của HTXNN Yên Nhân, Tiên Phong, Mễ Linh, Vĩnh Phúc (Phòng vấn 30 hộ nông dân)

TT	Nội dung phỏng vấn	Kết quả trả lời
1	Các loại thuốc trừ sâu đã sử dụng	Tập kỳ, Delfin, Mã lực, Satrungsong, Regent, Pegasus, Monster, Padan, Bestox...
2	Chi phí tiền thuốc (đồng/bình)	5.000 – 10.000
3	Thời gian giữa các lần phun thuốc (ngày)	3 – 5
4	Số lần phun thuốc trong một vụ rau	7 – 10
5	Hiệu quả phòng trừ chung (%)	75-85%

5.5.3 Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang hại su hào tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mễ Linh, Vĩnh Phúc

Trong mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt có thêm phụ gia SD 0,02% cho thấy mật độ sâu tơ cao nhất vào cuối vụ tới 14,5 con/cây. Ngoài mô hình mật độ sâu tơ cũng tăng tới 15,2 con/cây. Đối với sâu khoang trong mô hình cao nhất đạt 0,6 con/cây, ở ngoài mô hình mật độ sâu cũng chỉ có 0,5 con/cây (bảng 14)

Bảng 14: Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại su hào tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mễ Linh, Vĩnh Phúc – vụ đông năm 2003

Ngày sau trồng	Thời gian sinh trưởng của su hào	Mật độ sâu hại			
		Sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>) (con/cây)		Sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>) (con/cây)	
		Trong mô hình	Ngoài mô hình	Trong mô hình	Ngoài mô hình
10	Hồi xanh	1,2	1,4	0,1	0,1
17	Có của con	3,2	5,6	0,1	0,3
24	Có củ	5,6	7,6	0,6	0,4
31	Có củ	8,5	15,2	0,4	0,3
38	Có củ	6,7	10,3	0,2	0,5
45	Thu hoạch	11,6	14,6	0,3	0,4
52	Thu hoạch	14,5	15,2	0,4	0,3

Bảng 15: Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại bắp cải tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc – vụ đông năm 2004

TT	Thời gian sinh trưởng của su hào	Mật độ sâu hại			
		Sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>) (con/cây)		Sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>) (con/cây)	
		Trong mô hình	Ngoài mô hình	Trong mô hình	Ngoài mô hình
1	Hồi xanh	0,9	1,2	0,2	0,2
2	Bắt đầu trải lá bàng	1,6	2,6	0,5	0,4
3	Trải lá bàng	3,6	5,6	2,6	2,5
4	Bắt đầu vào cuốn	4,5	10,2	2,3	2,6
5	Vào cuốn	6,7	15,3	1,5	3,5
6	Cuốn chắc	8,6	9,5	2,3	2,4
7	Thu hoạch	12,5	16,7	2,4	2,3

Năm 2004 đề tài tiếp tục thử nghiệm hiệu lực chế phẩm hỗn hợp. Trong mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt cho thấy mật độ sâu tơ cao nhất vào cuối vụ tới 12,5 con/cây. Ngoài mô hình mật độ sâu tơ cũng tăng tới 16,7 con/cây. Đối với sâu khoang trong mô hình cao nhất đạt 2,6 con/cây, ở ngoài mô hình mật độ sâu cũng chỉ có 3,5 con/cây (bảng 15).

5.5.4 Hiệu quả trừ sâu tơ, sâu khoang hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Từ các kết quả đánh giá về hiệu lực của chế phẩm trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đưa chế phẩm hỗn hợp V-Bt có thêm chất phụ gia theo tỷ lệ 0,02% vào ứng dụng trong mô hình để trừ sâu khoang, sâu tơ hại rau. Điều tra sâu khoang trước phun thuốc cho thấy sâu khoang tuổi nhỏ chiếm tỷ lệ cao 92,5%. Kết quả điều tra sau phun thuốc ở công thức 1 sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt cho hiệu quả phòng trừ đạt 80,5% sau 7 ngày phun thuốc và giảm sau 9 ngày phun thuốc còn 65,8%. Ở ruộng phun thuốc hoá học (Regent 800WG) thuốc có hiệu quả ngay từ những ngày đầu phun thuốc đạt 66,5-87,3% nhưng hiệu lực của thuốc giảm nhanh, sau 7 ngày chỉ còn 23,5% (bảng 16a).

Từ các kết quả đánh giá về hiệu lực của chế phẩm trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đưa chế phẩm hỗn hợp V-Bt vào ứng dụng trong mô hình để trừ sâu khoang, sâu tơ hại rau. Điều tra sâu khoang trước phun thuốc cho thấy sâu khoang tuổi nhỏ chiếm tỷ lệ cao 85,7%. Kết quả điều tra sau phun thuốc ở công thức 1 sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt cho hiệu quả phòng trừ đạt 83,8% sau 7 ngày phun thuốc và giảm sau 9 ngày phun thuốc còn 63,8%. Ở ruộng phun thuốc hoá học (Pegasus 500SC) thuốc có hiệu quả ngay từ những ngày đầu phun thuốc đạt 76,5-95,5% nhưng hiệu lực của thuốc giảm nhanh, sau 7 ngày chỉ còn 33,8% (bảng 16b).

Bảng 16a: Hiệu quả trừ sâu khoang (*S.litura*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - vụ đông năm 2003

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt + phụ gia SD 0.02%	20	0	0	35,6	58,2	76,6	65,8
2	Regent 800 WG	1	66,5	87,3	79,1	46,2	23,5	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 16b: Hiệu quả trừ sâu khoang (*S.litura*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - Vụ Đông sớm năm 2004

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt	20	0	0	42,7	72,5	83,8	63,8
2	Pegasus 500SC	1	76,5	88,9	95,5	52,4	32,6	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

Kết quả thử nghiệm ngoài đồng ruộng năm 2003 đối với sâu tơ: điều tra trên ruộng trước khi phun cho thấy sâu tuổi nhỏ chiếm 66,5% tuổi lớn chiếm 23,5%, nhộng chiếm 10%. Kết quả điều tra cho thấy hiệu quả phòng trừ của chế phẩm V-Bt + phụ gia SD 0,02% đối với sâu tơ đạt 73,6%-79,9% sau 5-7 ngày phun thuốc. Ở công thức phun thuốc hoá học hiệu quả đạt cao ngay từ ngày đầu phun thuốc : 70,8% và 73,7%-84,4% sau 2-3 ngày phun thuốc và hiệu lực của thuốc cũng giảm dần sau 5 ngày sử lý (bảng 17a).

Kết quả thử nghiệm ngoài đồng ruộng năm 2004 đối với sâu tơ: điều tra trên ruộng trước khi phun cho thấy sâu tuổi nhỏ chiếm 73,2% tuổi lớn chiếm 13,5%, nhộng chiếm 13,3%. Kết quả điều tra cho thấy hiệu quả phòng trừ của chế phẩm V-Bt đối với sâu tơ đạt 82,5%-85,7% sau 5-7 ngày

phun thuốc. Ở công thức phun thuốc hoá học hiệu quả đạt cao ngay từ ngày đầu phun thuốc : 75.9% và 77.8%-92.4% sau 2-3 ngày phun thuốc và hiệu lực của thuốc cũng giảm dần sau 5 ngày sử lý (bảng 17b).

Bảng 17a: Hiệu quả trừ sâu tơ (*P. xylostella*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - vụ đông năm 2003

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt + phụ gia SD 0.02%	20	0	38.1	51.3	73.6	79.9	52.4
2	Regent 800 WG	1	70.8	84.4	73.7	39.3	27.6	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 17b: Hiệu quả trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc - Vụ Đông sớm năm 2004

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt	20	0	48.5	78.3	83.6	89.6	55.4
2	Pegasus 500SC	1	77.9	88.5	78.6	45.3	36.5	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

5.5.5 Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc

Qua điều tra đánh giá trong 2 vụ rau năm 2003-2004: chúng tôi nhận thấy trong mô hình thí nghiệm nông dân đã giảm được 2-3 lần phun thuốc hoá học, khoảng cách giữa các lần phun thuốc tăng lên, giảm chi phí cho thuốc trừ sâu (bảng 18a và 18b).

Bảng 18a: Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc (tính cho một ha/vụ su hào) năm 2003

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Trong mô hình	Ngoài mô hình	Hiệu quả
1	Số lần phun thuốc	3-4	5-7	Giảm 2-3
2	Thời gian giữa các lần phun (ngày)	10	4-5	Tăng 5-6
3	Chi phí cho 1 bình phun (đồng/bình)	6.000	5.000 – 8.000 (10.000)	Giảm 1.000 đến 2.000
4	Chi phí thuốc trừ sâu (ngàn đồng/ha/vụ)	1350-1620	2430-2700	Giảm 810-1080

Bảng 18b: Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc (tính cho một ha/vụ su hào)

Tt	Chỉ tiêu đánh giá	Trong mô hình	Ngoài mô hình	Hiệu quả
1	Số lần phun thuốc	2-3	5-6	Giảm 2-3
2	Thời gian giữa các lần phun (ngày)	10	5-6	Tăng 6-7
3	Chi phí cho 1 bình phun (đồng/bình)	7000	6000 – 9000 (11000)	Giảm 2 000 đến 2000
4	Chi phí thuốc trừ sâu (ngàn đồng/ha/vụ)	1450-1670	2540-2770	Giảm 910-1100

5.5.5 Kết quả xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trừ sâu hại rau tại HTX NN Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức Hà Tây

Hợp tác xã nông nghiệp Phương Viên có diện tích trồng rau vụ đông là 170 ha trong đó, bắp cải chiếm 65-70% diện tích và su hào là 10%, diện tích còn lại là trồng cà chua, đậu đỗ... Đây là địa phương được thử nghiệm và sử dụng nhiều loại thuốc BVTV của các hãng thuốc trong và ngoài nước, bên cạnh đó đây là vùng chuyên canh rau, trồng gối cùng một loại rau liên tiếp nên mật độ sâu cao.

đặc biệt là sâu tơ có mật độ rất cao, xuất hiện thường xuyên trên ruộng dẫn đến việc sử dụng thuốc rất bừa bãi không chọn lọc, phun hỗn hợp nhiều loại trừ sâu nên đã xuất hiện hiện tượng sâu kháng thuốc (bảng 19). Năm 2003 đề tài đã triển khai ứng dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trên diện tích 5ha rau bắp cải của hợp tác xã.

5.5.5.1 Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu hại rau của HTXNN Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây

Bảng 20: Tình hình sử dụng thuốc trừ sâu trên bắp cải tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức Hà Tây- vụ đông năm 2003 (phỏng vấn 30 hộ nông dân trồng rau)

TT	Nội dung phỏng vấn	Kết quả trả lời
1	Loại thuốc đã sử dụng	Vifel, Match, Padan, Pegasus, Regent, Peran, SecSaigon, Cyclodan, Cyperkill, Tập kỳ, Biocin...
2	Phun hỗn hợp nhiều loại thuốc hay 2-3 loại thuốc	Phun hỗn hợp nhiều loại thuốc
3	Chi phí cho 1 bình phun thuốc (đồng /bình)	8000-10 000đ (12 000đ)
4	Thời gian giữa các lần phun	3-5 ngày
5	Tình hình sâu sau phun thuốc	Có 17 hộ trả lời sâu không chết Có 13 hộ trả lời sâu chết
6	Số lần phun thuốc trong một vụ rau	8-12 lần

3.4.2.2 Diễn biến mật độ sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang hại bắp cải tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây

Điều tra tình hình sâu trên các ruộng bắp cải trong và ngoài mô hình cho thấy đối với sâu tơ có mật độ cao trung bình từ 20-25 con/cây, có điểm mật độ sâu tơ lên đến 55 - 60 con/cây bắp cải. Sâu tơ có nhiều lứa gối nhau liên tiếp trên đồng ruộng luôn có nhiều sâu ở các tuổi khác nhau: sâu tuổi nhỏ chiếm 56,7%, tuổi lớn chiếm 34,1% và nhộng chiếm 9,2%. Đối với sâu khoang có mật độ thấp chỉ có dưới 1 con/cây (Bảng 21)

Bảng 21: Biến động số lượng sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang (*Spodoptera litura*) trên bắp cải tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây – Vụ Đông năm 2003.

TT	Ngày sau khi trồng	Giai đoạn sinh trưởng của bắp cải	Mật độ sâu tơ (<i>Plutella xylostella</i>) (con/cây)		Mật độ sâu khoang (<i>Spodoptera litura</i>) (con/cây)	
			Trong mô hình	Ngoài mô hình	Trong mô hình	Ngoài mô hình
1	12	Hồi xanh	3,2	4,5	0,5	0,8
2	19	Trải lá bàng	5,6	8,6	0,6	0,9
3	26	Trải lá bàng	15,7	11,6	0,7	0,5
4	33	Vào cuộn	12,8	15,8	0,3	0,4
5	40	Vào cuộn	14,8	18,9	0,4	0,5
6	47	Cuộn chắc	15,6	21,6	0,4	0,4
7	54	Cuộn chắc	15,8	18,9	0,5	0,7
8	61	Thu hoạch	27,5	41,2	0,6	0,6
9	68	Thu hoạch	38,9	55,7	0,7	0,9

3.4.2.3 Hiệu quả trừ sâu tơ, sâu khoang hại su hào của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây

Kết quả sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt + phụ gia SD với tỷ lệ 0.02% để trừ sâu tơ, sâu khoang được trình bày ở bảng 16 a và 16b. Qua bảng 22 và 23 cho thấy:

- Đối với sâu khoang hiệu quả phòng trừ của chế phẩm hỗn hợp V-Bt đạt 69,7-76,6% sau 5-7 ngày phun thuốc. Sử dụng thuốc hoá học để phòng trừ sâu khoang có hiệu quả 81,3% sau 2 ngày phun thuốc tuy nhiên hiệu lực của thuốc giảm nhanh sau 5 ngày phun thuốc.
- Đối với sâu tơ thì hiệu quả sử dụng chế phẩm V-Bt cũng cao sau 5 ngày phun thuốc đạt 66,7%. Trong khi sử dụng thuốc hoá học (Regent) cho hiệu quả phòng trừ chỉ đạt 50,6-69,7% sau 1-2 ngày phun thuốc.

Bảng 22: Hiệu quả trừ sâu khoang (*S.litura*) hại bắp cải của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây- vụ đông năm 2003

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun thuốc (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt + phụ gia SD 0,02%	20	0	0	20,6	69,7	76,6	56,8
2	Regent 800 WG	1	59,2	81,3	64,1	35,6	-	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 23: Hiệu quả trừ sâu tơ (*P. xylostella*) hại bắp cải của chế phẩm hỗn hợp V-Bt tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức, Hà Tây - Vụ Đông năm 2003

TT	Chế phẩm sử dụng	Liều lượng dùng (g/bình 10l)	Hiệu quả phòng trừ sau phun (%)					
			1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
1	Hỗn hợp V-Bt + phụ gia SD 0,02%	20	0	23,5	56,7	79,6	68,3	47,1
2	Regent 800 WG	1	50,6	69,7	42,3	21,8	-	-
3	Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0

3.4.2.4 Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức Hà Tây

Trong mô hình sử dụng chế phẩm hỗn hợp V-Bt trừ sâu hại cho rau đalan giảm được 6-7 lần phun thuốc trong một rau, giảm công phun thuốc và giảm chi phí cho thuốc trừ sâu. (bảng 24).

Bảng 24: Đánh giá hiệu quả kinh tế ứng dụng chế phẩm trừ sâu sinh học hỗn hợp V-Bt tại HTX Phương Viên, Song Phương, Hoài Đức Hà Tây - Vụ Đông năm 2003 (tính cho một ha/vụ bắp cải)

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Trong mô hình	Ngoài mô hình	Hiệu quả
1	Số lần phun thuốc	4-5	8-12	Giảm 6-7
2	Thời gian giữa các lần phun (ngày)	7	3-5	Tăng 2-4
3	Chi phí cho 1 bình phun (đồng/bình)	6 000	8000 – 10 000	Giảm 2000 đến 4000
4	Chi phí thuốc trừ sâu (ngàn đồng/ha/vụ)	1389-1667	3610-4167	Giảm 2221-2500

KẾT LUẬN

Trong ba năm thực hiện đề tài, chúng tôi thu được một số kết quả chính sau:

1. Thu thập được 65 mẫu vi rút của 4 loài sâu: sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ và sâu cuốn lá lúa loại lớn.

2. Đề tài đã nhiễm được 270800 sâu xanh tuổi 4 để sản xuất chế phẩm vi-rút. Tỷ lệ sâu nhiễm vi-rút thu được là từ 81,6 đến 84,9 %(trung bình: 83,3%) và sản xuất được 478 kg chế phẩm hỗn hợp NPV và V- Bt để triển khai ứng dụng trên tích 60 ha .

3. Hai phương pháp sản xuất chế phẩm : Pha chế hỗn hợp dịch thể NPV rồi mới sấy khô và phương pháp sấy khô từng loại NPV sau đó mới hỗn hợp đều cho tỷ lệ sâu chết cao 87,7- 89,8% sau 5 ngày xử lý thuốc. Sản xuất chế phẩm bằng phương pháp hỗn hợp dịch thể rồi sấy khô thuận tiện và tiết kiệm hơn.

4. Sử dụng chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02% trong sản xuất chế phẩm hỗn hợp NPV, V-Bt là hợp lý, hiệu quả trừ sâu vẫn đạt 95-100% sau 4-5 ngày xử lý ở trong phòng thí nghiệm.

5. Hiệu lực trừ sâu của chế phẩm V-Bt có thêm chất phụ gia SD với tỷ lệ 0,02% ngoài đồng ruộng đối với sâu tơ ở Yên Nhân đạt 79,9% sau 7 ngày phun thuốc, ở Phương Viên đạt 79,6% sau 5 ngày phun thuốc; đối với sâu khoang ở Yên Nhân đạt 80,5%, ở Phương Viên đạt 76,6% sau 7 ngày phun thuốc.

6. Đề tài đã xây dựng được 2 mô hình sử dụng chế phẩm sinh học NPV, V- Bt ở Yên Nhân và Phương Viên trong phòng trừ một số loài sâu hại chính trên rau trên diện tích 22ha. Kết quả đã giảm được một số lần phun thuốc trừ sâu, giảm tiền chi phí mua thuốc, tăng hiệu quả kinh tế cho người trồng rau.

BÁO CÁO TIẾN ĐỘ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI KC04-12

Đề tài nhánh: Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc Bt có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng.

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Ngô Đình Bính

Cơ quan thực hiện đề tài nhánh: Viện Công nghệ Sinh học.
TTKHTN&CNQG

1. Mục tiêu năm 2002:

- 1.1. Thu nhận được một hai chủng Bt có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng. Đó là những chủng Bt mang gen tái tổ hợp có thể diệt được sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh, sâu cuốn lá lúa nhỏ...
- 1.2. Hoàn thiện quy trình công nghệ theo các thông số sau: môi trường dinh dưỡng, điều kiện lên men, chất phụ gia cho (chất tăng cường hoạt tính, chất chống tia UV, chất bám dính, chất hấp thụ...)
- 1.3. Tiêu chuẩn hoá chế phẩm theo đơn vị hoạt lực quốc tế.
- 1.4. Hoạch toán được giá thành chế phẩm sản xuất.

2. Nội dung:

1. Chọn môi trường thích hợp cho Bt sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể diệt sâu.
2. Thành lập các công thức chế phẩm phù hợp với điều kiện sinh thái của Việt Nam.
3. Tiêu chuẩn hoá chế phẩm: 16 000 IU/mg dạng bột thấm nước; 4 000 IU/ml dạng sữa, theo tiêu chuẩn của quốc tế.
4. Xây dựng công nghệ thích ứng cho triển khai sản xuất BT ở địa bàn cấp tỉnh. (Nếu sản xuất BT theo công nghệ này thành công sẽ là một mô hình nhân lên được ở các địa bàn khác tùy thuộc vào vùng chuyên canh gì và nguyên liệu gì).

3. Kết quả:

- 3.1. Tuyển chọn các chủng Bt có phổ và hoạt tính diệt sâu cao và bằng kỹ thuật SHPT và công nghệ gen:
 - Đã phát hiện được các 137 gen *cryI* bằng kỹ thuật PCR từ 50 chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập ở Việt Nam.
 - Tách được dòng và tổng hợp chuỗi 9 gen từ 3 chủng có hoạt tính diệt sâu cao.
 - Tách dòng gen *CryIC* mã hoá protein diệt sâu khoang của chủng Bt TQ3-3.
 - Biểu hiện gen mã hoá protein *CryIC* trong *E. coli* DH5 α .
- 3.2. Đã chọn được 2 chủng Bt có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng, bằng phương pháp chuyển gen *cryIC* vào chủng sản xuất. Sắp tới sẽ thử nghiệm tại Vĩnh Phúc.
- 3.3. Đã chọn được môi trường lên men cho sản xuất thích hợp cho 2 chủng trên.

3.4. Đã sản xuất được chế phẩm BT1: 20 kg dạng bột thấm nước (có hoạt tính 16.000 IU/mg chế phẩm).

BT2: 100 lít dạng sữa (có hoạt tính là 4.000 IU/ml)

4. Hạch toán giá thành các chế phẩm BT: chỉ tạm tính

BT1: khoảng 200 000 đ/kg

BT2: khoảng 50.000 đ/kg : nguyên liệu: 5 000 đ; giống 2000 đ/kg: Điện, nước và công (chuẩn bị dụng cụ, làm môi trường, theo dõi lên men, thu hồi sản phẩm...): 43 000 đ.

5. Địa bàn sử dụng:

Đang áp dụng tại Hợp tác xã Tiên Phong Mê Linh Vĩnh Phúc.

6. Đề nghị: một máy vô chai chế phẩm BT2: 20 000 0000đ

Hà Nội, ngày 20/8/2002

Người báo cáo



TS. Ngô Đình Bính

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NĂM 2003

1. Tên đề tài nhánh: Nghiên cứu sử dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng và phát triển mô hình ứng dụng phòng trừ tổng hợp cho vùng rau Ván Tảo, Thường Tín, Hà Tây.

2. Cơ quan chủ trì đề tài nhánh: Viện Công nghệ Sinh học

3. Chủ nhiệm đề tài nhánh: PGS.TS Ngô Đình Bính

4. Thời gian thực hiện: 12 tháng từ 01 /01/2003 đến 31/12/2003

Trong đề tài KC04-12: “ Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học ”

Cơ quan chủ trì: Viện Bảo vệ Thực vật

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS Nguyễn Văn Tuất

5. Mục tiêu:

- Thu nhận được một vài chủng *Bacillus thuringiensis* tái tổ hợp, chọn môi trường dinh dưỡng thích hợp cho các chủng tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm BT và phổ trộn với các chế phẩm khác tạo nên chế phẩm trừ sâu đa chức năng.
- Phát triển mô hình ứng dụng phòng trừ bằng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho vùng rau Ván Tảo, Thường Tín, Hà Tây.

6. Nội dung:

1. Thu nhận chủng Bt tái tổ hợp có hoạt phổ rộng cho sản xuất chế phẩm BT.
2. Chọn môi trường dinh dưỡng thích hợp cho chủng Bt tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm BT.
3. Sản xuất chế phẩm dạng bột và dạng sữa
4. Xây dựng mô hình ứng dụng hỗn hợp các chế phẩm sinh học (BioBact WP, BioBact EC và Gen β trừ sâu trên rau tại Ván Tảo, Thường Tín, Hà Tây.

7. Kết quả:

1. Thu nhận chủng Bt tái tổ hợp có hoạt phổ rộng cho sản xuất chế phẩm BT

Chủng *Bacillus thuringiensis* VCM 2 đang sản xuất là chủng thuộc dưới loài *kurstaki*. Tuy có hoạt tính cao so với các chủng khác nhưng hoạt phổ diệt sâu hẹp không diệt được sâu khoang, sâu xanh vì không mang gen mã hoá protein Cry1C, Cry1D. Do đó mục tiêu đề ra cho đề tài là phải thu nhận được chủng tái tổ hợp mang gen *cry1C*. Bằng các phương pháp tách dòng gen, biến nạp gen và biểu hiện gen, chúng tôi đã thu nhận được chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* VCM 2-8 mang gen *cry1C*.

2. Chọn môi trường dinh dưỡng thích hợp cho chủng Bt tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm Bt.

Như chúng ta đều biết, mỗi một chủng Bt đều cần một nhu cầu dinh dưỡng khác nhau, nhất là các chủng tái tổ hợp. Tuy nhiên môi trường cần phải bảo đảm các nguồn cacbon (C), nguồn nitơ (N), photpho (P), vitamin và các chất khoáng. Để làm được việc này chúng tôi chọn môi trường cơ bản để bổ sung các nguồn nguyên liệu giá thấp, sẵn có ở Việt Nam nhằm đảm bảo cho chủng Bt sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể cao. Nguồn nguyên liệu bổ sung gồm: Bột đậu tương, bột cá, bột ngô, cám gạo, bột sắn, bột khô lạc với tỷ lệ 30 gam/lít. Lên men chủng Bt VCM 2-8 trên môi trường cơ bản và các môi trường bổ sung trên máy lắc tròn ở điều kiện thống nhất: tốc độ 250 vòng/phút, pH = 7,0, t° = 30 ± 1, sau 72 giờ lên men, thu được kết quả như sau (Bảng 1):

Bảng 1. Kết quả lên men chủng Bt VCM 2-8 trên một số môi trường

Môi trường	OD sau 18h	pH sau LM	Sự hình thành tinh thể sau 72 h	Nồng độ bào tử (Bào tử/ ml)
Cơ bản	1,85	8,2	+++	$9,16 \cdot 10^7$
Bột đậu tương	1,88	8,5	++++	$8,50 \cdot 10^9$
Khô lạc	1,98	7,2	++	$6,35 \cdot 10^6$
Bột ngô	1,80	8,4	++	$3,66 \cdot 10^7$
Cám gạo	1,76	7,7	++	$1,88 \cdot 10^6$
Bột sắn	1,41	8,0	+	$5,67 \cdot 10^5$
Bột cá	1,84	7,6	++	$8,32 \cdot 10^6$

Từ kết quả trên có thể thấy chủng CVM 2-8 có thể sinh trưởng tốt trên tất cả các môi trường (thể hiện ở đo OD sau 18 h lên men). Tuy nhiên môi trường bổ sung bột đậu tương là thích hợp cho sinh tinh thể và bào tử. Môi trường có thành phần sau đây được chọn cho sản xuất chế phẩm BT trên nồi lên men 80 lít của hệ thống lên men New Brunswick. Kết quả được thống kê ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả sản xuất BT trên hệ thống lên men chìm

Mẻ	Sinh trưởng (OD sau 18h)	pH sau LM	Sự hình thành tinh thể sau 72 h	Nồng độ bào tử (Bào tử/ ml)
1	1,90	8,2	+++	$5,10 \cdot 10^9$
2	1,85	8,5	+++	$6,50 \cdot 10^9$
3	1,98	8,2	+++	$2,55 \cdot 10^9$

Từ bảng 2 có thể thấy môi trường đã chọn là thích hợp cho chủng Bt VCM 2-8 sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể. Sự hình thành bào tử, tinh thể là khá ổn định trong các mẻ lên men. Do đó môi trường có thành phần sau được chọn cho chủng Bt VCM 2-8 dùng cho sản xuất:

Glucose 10 g, Bột đậu tương 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, MgCl_2 0,5 g, KH_2PO_4 1g, K_2HPO_4 0,68 g, NaCl 2 g, Cao nấm men 3 g, vi lượng ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -50 mg, CuSO_4 - 1 mg, FeSO_4 - 1mg, CaCl_2 - 20 mg, MnSO_4 - 30 mg)/1lít.

3. Sản xuất chế phẩm dạng bột thấm ướt và dạng dịch thể

Từ các kết quả về thu nhận chủng Bt tái tổ hợp và chọn môi trường thích hợp cho chủng này chúng tôi tiếp tục sản xuất chế phẩm BT theo phương pháp lên men chìm. Quy trình kỹ thuật, các thông số lên men đã được miêu tả trong báo cáo “Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm BT trên hệ thống lên men chìm” của năm 2001-2002. Tuy nhiên đối với chủng VCM 2-8 đòi hỏi môi trường giàu hơn và thời gian lên men dài hơn 4-5 giờ. (59-60 giờ). Kết quả đã sản xuất được 120 kg bột kỹ thuật và 500 lít dịch lên men để thành lập các công thức chế phẩm. Các chế phẩm sản xuất bằng chủng tái tổ hợp mang tên: BioBact WP28 và BioBact EC28.

4. Xây dựng mô hình ứng dụng hỗn hợp các chế phẩm sinh học (BioBact WP28, BioBact EC28 và GenB trừ sâu trên rau tại Vân Tảo. Thường Tín, Hà Tây. Chế phẩm được áp dụng cho hai hộ trồng rau tại Vân Tảo, huyện Thường Tín, tỉnh Hà Tây, Từ khi cải được 2-3 lá mỗi tuần phun một lần. Kết quả nêu ở bảng 3:

Bảng 3. Thử nghiệm chế phẩm BioBact WP, BioBact EC và GenB trừ sâu bệnh hại rau tại xã Vân Tảo, H. Thường Tín, T. Hà Tây

Chế phẩm	Đối tượng	Diện tích (m^2)	Liều dùng (l/kg)/ha	Hiệu quả diệt sâu (%) sau các ngày thử nghiệm			
				Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 5
BioBact EC28	Bắp cải	1380	5 lít/ha	55,3	68,5	78,2	78,5
BioBact EC28	Cải thảo*	400	5 lít/ha	57,3	66,3	77,8	77,8
BioBact WP28	Bắp cải	1080	2 kg/ha	44,9	70,3	80,2	86,7
Cymerin 5EC	Bắp cải	1080	810 ml/ha	58,7	72,1	77,4	79,3

Từ bảng 3 thấy chế phẩm BioBact EC28 có hiệu diệt sâu tương đương thuốc sâu hoá học Cymerin 5EC (77,8, 78,5 so với 79,3 % của Cymerin 5EC). Chế phẩm BioBact WP28 có hiệu quả diệt sâu cao hơn (86,7 so với 79,3 %).

Riêng đối với đất trồng cải thảo được xử lý bằng chế phẩm kháng sinh thô để chống bệnh thối nhũn thân rễ. Kết quả cho thấy (kết quả không được thống kê cụ thể) cải thảo phát triển rất tốt, hầu như không bị bệnh thối nhũn rễ, một bệnh rất nặng năm ngoái (2002) đã làm thiệt hại lớn cho hộ nông dân này. Hơn nữa ở các công thức phun thuốc trừ sâu bệnh sinh học còn cho thấy cây cải phát triển tốt hơn, xanh mướt hơn so với đối chứng, vì trong chế phẩm

ngoài protein tinh thể diệt côn trùng còn có các chất kích thích tăng trưởng các chất khoáng như là loại phân bón lá cho cây. Một điều đặc biệt nữa là cũng tại những ruộng thí nghiệm tỷ lệ cây do bộ nhầy chích hút giảm hẳn so với đối chứng.

Từ những kết quả về phương pháp áp dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trên vùng trồng rau Vân Tảo, chúng tôi thấy mô hình này cần được hoàn thiện và nhân rộng ra cho nhiều hộ và nhóm hộ nông dân.

Về hoàn thiện chế phẩm trừ sâu sinh học đa chức năng bao gồm:

- Chế phẩm BT như BioBact WP và BioBact WP28 phòng chống các loại sâu tơ, sâu khoang, sâu keo da láng và các loại sâu thuộc Lepidoptera.
- Chế phẩm Genß để phòng chống các bệnh thối nhũn thân, rễ và bệnh héo xanh và kích thích tăng trưởng cho cây trồng.

8. Đào tạo:

- Hai học viên cao học đang làm luận văn thạc sĩ.
- 7 sinh viên đã bảo vệ xuất sắc khoá luận tốt nghiệp đại học, trong đó có một sinh viên nước ngoài,
- 4 sinh viên đang làm khoá luận tốt nghiệp.

9. Hội nghị khoa học và các công trình khoa học đã công bố:

- Cùng với nhóm Bt viện Công nghiệp Thực phẩm và Viện Công nghệ sau thu hoạch đã đồng tổ chức thành công “Hội nghị Công nghệ Sinh học Khu vực Thái Bình Dương lần thứ năm về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường” tại Hà Nội, từ 17-21 tháng 11 năm 2003. Hội nghị đã thu hút 170 đại biểu tham dự, trong đó có hơn 70 đại biểu đến từ 20 nước trên thế giới với 60 báo cáo khoa học hết sức có giá trị đối với sự nghiên cứu và phát triển thuốc trừ sâu sinh học Bt của Việt Nam.
- Đã tham gia hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc lần thứ hai tại Hà Nội 16-17 tháng 12 năm 2003.
- Đã tham gia Hội nghị Khoa học Cơ bản lần thứ ba tại Huế 25-16 tháng 7 năm 2003.
- Đã đăng 5 bài báo bằng tiếng Anh, 2 bài báo bằng tiếng Việt.

- 1 Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Thị ánh Nguyệt, Phạm Minh Hương, Nguyễn Văn Tuất và Ngô Đình Bính. 2003. Một số kết quả nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* trong điều kiện Việt Nam. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần II*. nxb Khoa học và Kỹ thuật.
- 2 Kwang Yong Lee, Hyuk Han Kwon, Eun Young Kang, Min Jung Lee, Eui Na Kim, Dong Wan Chu, Soo Il Park, Dinh Binh Ngo, and Hyung Hoan Lee. 2003. Characteristics of Six New *Bacillus thuringiensis* Serovarieties: *B. thuringiensis* serovar. *coreanensis*, *leesis*, *konkukian*.

seoulensis, *sooncheon*, and *yosoo*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (In press).

- 3 Ngo Dinh Binh. 2003. The research and development of *Bacillus thuringiensis* Biotechnology in Vietnam. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, R. J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
- 4 Nguyen Xuan Canh, Ngo Dinh Binh, Nguyen Thi Anh Nguyet, Nguyen Quynh Chau, Pham Minh Huong. 2003. Insecticide and efficacy of BT preparations in field. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, R. J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
- 5 Ngo Dinh Binh, Nguyen Thi Anh Nguyet, Nguyen Quynh Chau, Nguyen Xuan Canh, Pham Minh Huong, Julien Herrou . 2003. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soil of Vietnam. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, R. J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
- 6 Nguyen Thi Anh Nguyet, Julien Herrou, Nguyen Quynh Chau, Nguyen Xuan Canh, Pham Minh Huong, Ngo Dinh Binh. 2003. Identification and characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated from different areas in Vietnam - Identification of *cryIAa* gene. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, R. J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
- 7 Ngô Đình Bình, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Ánh Nguyệt, Nguyễn Xuân Cảnh, Vi Thị Đoàn Chính, Nguyễn Hoài Trâm, Nguyễn Văn Tuất. 2003. Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein cryIC diệt sâu khoang từ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ 2*. nxb Khoa học và Kỹ thuật .Tr 830-833.

10. Các hoạt động khoa học khác:

- Chế phẩm BioBact WP (hoạt tính 16000 IU/mg) đã tham gia “Hội chợ công nghệ và thiết bị Việt Nam 2003”.

Hà Nội, ngày 24 tháng 12 năm 2003

Người báo cáo

Ngô Đình Bình

BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH KC04-12 NĂM 2004

Đề tài nhánh: Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng.

Chủ nhiệm đề tài nhánh: PGS. TS Ngô Đình Bính

Cơ quan thực hiện đề tài nhánh: Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

- Đã phân lập, phân loại và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của 24 chủng *Bacillus thuringiensis*.
- Đã tách được 311 phân đoạn gen thuộc nhóm gen *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*) từ 102 chủng phân lập.
- Thu nhận được chủng *Bacillus thuringiensis* VCM2-8 tái tổ hợp cho sản xuất với hoạt tính cao và phổ diệt sâu rộng.
- Hoàn thiện quy trình công nghệ theo các thông số sau: môi trường dinh dưỡng, điều kiện lên men, chất phụ gia (chất tăng cường hoạt tính, chất chống tia UV, chất bám dính, chất hấp thụ...).
- Thành lập các công thức chế phẩm phù hợp với điều kiện sinh thái của Việt Nam và tiêu chuẩn hoá chế phẩm: 16 000 IU/mg dạng bột thấm nước; 4 000 IU/ml dạng sữa, theo tiêu chuẩn của quốc tế.
- Đánh giá hoạt lực các công thức chế phẩm trong phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng, các chế phẩm có khả năng trừ sâu tơ và sâu khoang.
- Hoàn thiện mô hình sử dụng thuốc trừ sâu sinh học tại Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây.
- Áp dụng chế phẩm Bt trong triển khai mô hình nông nghiệp sinh thái bền vững cho vùng chuyên canh rau xã Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây và xã Gia Xuyên, Gia Lộc, Hải Dương.

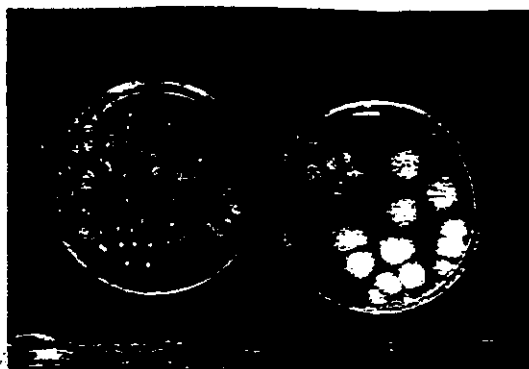
Trong năm 2004 đã sản xuất được:

- Sản xuất chế phẩm BioBact S dạng sữa: 100 lít
- Sản xuất chế phẩm BioBact WP dạng bột thấm ướt: 50 Kg
- 2 sinh viên đã bảo vệ thành công khoá luận tốt nghiệp
- 2 học viên cao học đang làm luận văn
- 3 sinh viên đang làm khoá luận tốt nghiệp
- Đã đăng 2 bài báo

Hà Nội, ngày 10/9/2004
Người báo cáo



TS. Ngô Đình Bính



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc *Bt* trên môi trường MPA sau 72 giờ ở 28°C.



Hình 2. Ảnh hiển vi điện tử hình bào tử và tinh thể của *Bt* phân lập.

Các chủng *Bt* được phân loại theo phương pháp huyết thanh được nêu ở bảng 1.

Bảng 1. Phân loại theo typ huyết thanh các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Số chủng phản ứng dương tính	Typ huyết thanh	Dưới loài	Tỷ lệ phần trăm (%)
11	3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	45,83
6	7	<i>aizawai</i>	25,0
2	3a, 3c	<i>alesti</i>	8,33
1	9	<i>tolwerthy</i>	4,17
2	34	<i>konkukian</i>	8,33
1	25	<i>coreanensis</i>	4,17
1	33	<i>leesis</i>	4,17

Qua bảng 1 cho thấy số lớn các chủng *Bt* phân lập tại Việt Nam đều phản ứng dương tính với kháng thể kháng loài phụ *kurstaki* (3a,3b,3c), chiếm 45,83

%: Đáng chú ý là có 7 chủng phản ứng với kháng thể của loài phụ aizawai (chiếm 25 % các chủng thử nghiệm). Đây là loài phụ có nhiều gen khác nhau trong đó có các gen diệt sâu khoang, sâu keo da lóng, sâu xanh.

Sau khi phân lập, phân loại tiến hành thử hoạt tính sơ bộ của các chủng *Bacillus thuringiensis*, kết quả trên bảng 2.

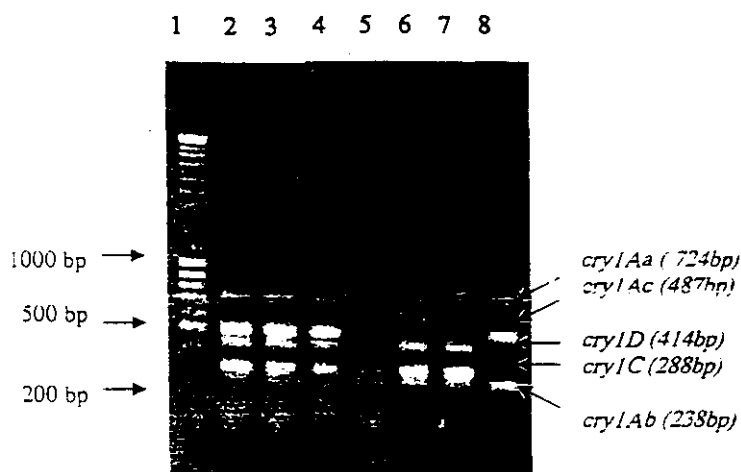
Bảng 2. tỷ lệ diệt sâu tơ của 24 chủng phân lập sau 72 giờ.

Tỷ lệ sâu chết (%)	Mật độ bào tử (bt/ml)	Sau 72 giờ	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)
0 - 20,0	10^6	0	0,0
	10^8	0	0,0
21,1 - 40,0	10^6	2	8,33
	10^8	0	0,0
40,1 - 60,0	10^6	2	8,33
	10^8	0	0,0
60,1 - 80,0	10^6	13	54,17
	10^8	2	8,33
80,1 - 100	10^6	7	29,17
	10^8	22	91,97

Từ 24 chủng phân lập, chọn được 7 chủng có hoạt tính cao nhất có khả năng diệt được 100% số sâu thử nghiệm ở nồng độ 10^6 tế bào/ml.

2.2. Tuyển chọn các chủng Bt có phổ và hoạt tính diệt sâu cao bằng kỹ thuật SHPT và công nghệ gen

2.2.1. Phát hiện gen mã hoá Protein Cry1D, Cry1C từ các chủng phân lập được: Bằng phương pháp PCR với 13 cặp mồi đặc hiệu cho 6 nhóm gen *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*) đã tách gen của 7 chủng Bt có hoạt tính diệt sâu cao từ 115 chủng Bt phân lập. Kết quả tách gen được trình bày trên hình 3 và Bảng 3:



Hình 3. Ảnh điện di trên gel agarose 1,5% các sản phẩm PCR của các chủng Bt. Giếng 1: Marker, các giếng còn lại lần lượt là các chủng: CM5-19, HB7-3, CM2-3, SP14-3, ĐH4-26, BB12-6, CS3-1.

Bảng 3. Kết quả tách gen của các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Nhóm	Gen tách được	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc; cryIC; cryID</i>	8	6,8
2	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc; cryIC;</i>	1	0,9
3	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc; cryIE</i>	3	2,6
4	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc</i>	61	53
5	<i>cryIAa; cryIAb; cryIC; cryID</i>	5	4,3
6	<i>cryIAa; cryIAc</i>	1	0,9
7	<i>cryIAb; cryIAc; cryIC; cryID</i>	3	2,6
8	<i>cryIAb; cryIAc</i>	17	14,8
9	<i>cryIAb</i>	2	1,7
10	<i>cryIC; cryID</i>	1	0,9
11	Không tách được gen nào	13	11,3

Từ bảng 3 cho thấy 102 chủng *Bacillus thuringiensis* trong tổng số 115 chủng (chiếm 88,7%) đã xác định được thành phần gen trong nhóm gen *cryI*. Tổng số phân đoạn gen tách được từ 102 chủng là 311. Thành phần gen trong các chủng này tương đối đa dạng gồm 11 nhóm khác nhau. Trong đó nhóm 4 có 61 chủng với các gen tách được là *cryIAa; cryIAb; cryIAc* chiếm tỷ lệ cao nhất (53%).

2.2.2. Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá protein CryID:

Đoạn gen 3,0 Kb của chủng Bt HT21-1 và Bt TQ3-3 được khuếch đại với cặp mồi vạn năng đã gắn vào vectơ tách dòng pGEM-T Easy (Promega) và biến nạp vào Chủng *E. coli* DH 5α. ADN của thể tái tổ hợp được xác định bằng phương pháp lai và trình tự ADN được đọc. Kết quả trình tự được so sánh với các gen chuẩn trên ngân hàng giữ liệu quốc tế. Kết quả cho thấy phân đoạn gen 500 bp của chủng Bt HT21-1 có độ tương đồng cao (99,0 %) với trình tự gen cryIDal số 54 160 của ngân hàng giữ liệu. Đoạn gen của chủng bt TQ3-3 có độ tương đồng

97% với trình tự của gen cry1Da1 số X54 160 của ngân hàng giữ liệu. Đoạn gen được biểu hiện trong *E. coli* bằng vector biểu hiện pHY1A-1D. Protein tái tổ hợp được xác định hoạt lực diệt sâu bằng phương pháp như đã mô tả trước đây.

2.3. Chọn môi trường và điều kiện lên men thích hợp cho Bt sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể diệt sâu.

Môi trường nuôi cấy cũng là yếu tố rất quan trọng quyết định năng suất, chất lượng và giá thành của sản phẩm. Việc lựa chọn môi trường thích hợp là rất quan trọng để cung cấp dinh dưỡng làm sao cho vi khuẩn vừa sinh trưởng, phát triển và tạo tinh thể nội độc tố tốt vừa tiết kiệm nguyên liệu và thời gian nuôi cấy. Với mỗi chủng giống khác nhau sẽ có môi trường nuôi cấy tối thích khác nhau, tuy nhiên môi trường cần phải đảm bảo các nguồn dinh dưỡng cơ bản là nguồn Cacbon (C), nguồn Nitơ (N), photpho (P), Vitamin và các khoáng chất. Để làm được việc này chúng tôi đã chọn môi trường cơ bản tối ưu về các nguồn dinh dưỡng để cho các chủng vi khuẩn có thể phát triển được. Thành phần của 1 lít môi trường này bao gồm: Gluco (10g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g), MgCl_2 (0,5g), KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (1g), NaCl (2g), vi lượng (1ml) trong đó thành phần 1 lít vi lượng ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -50mg, CuSO_4 -1mg, FeSO_4 -1mg, CaCl_2 -20mg, MnSO_4 -30mg) bổ sung bột đậu tương (30g), bột cá (10g)

Chủng giống được hoạt hoá và nhân giống trên môi trường MPB (thành phần: cao thịt 3g, pepton 10g, NaCl 5g, H_2O 1l) trong bình tam giác và lắc 12-18h với tốc độ 250 vòng/phút. Chuẩn bị 3,5l môi trường (pH=7) đưa vào nồi lên men, thanh trùng ở 121°C trong 1h, để nguội đến 30°C bổ sung thêm 30ml dầu đậu tương làm chất chống bọt. Kiểm tra độ sạch của giống, cấy vào nồi lên men với tỷ lệ 5%.

Dựa vào các đặc điểm sinh lí, sinh hoá của Bt mà trong quá trình lên men ta điều chỉnh các chế độ pH, nhiệt độ, độ sục khí... một cách phù hợp. Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men vi khuẩn đi vào pha lag và pha log của sinh trưởng, quá trình trao đổi chất diễn ra mạnh mẽ. Đường glucose trong môi trường được chuyển hoá thành thành các axit axetic, lactic, piruvic do vậy pH môi trường sẽ giảm mạnh, sau đó các axit này tiếp tục chuyển hoá để sinh năng lượng cho vi khuẩn sinh trưởng nên pH môi trường sẽ tăng dần. Hoạt động trao đổi chất diễn ra mạnh dần tới tăng nhiệt độ môi trường nuôi cấy. Từ pha cân bằng trở đi, nguồn dinh dưỡng đã cạn, trao đổi chất giảm dần, nhiệt độ môi trường ổn định, pH ổn định ở mức cao do tích lũy amoni. Để lên men đạt hiệu quả ta làm lạnh bằng nước nhằm duy trì nhiệt độ môi trường trong khoảng $28-32^\circ$, pH có thể điều chỉnh bằng hệ thống bơm tự động nhờ hai dung dịch NaOH 4M và H_2SO_4 10%. Duy trì tốc độ khuấy ở 200vòng/phút để thông khí và tránh cho môi trường không lắng. Nếu môi trường có nhiều bọt thì bổ sung thêm dầu phá bọt.

Trong quá trình lên men cần lấy mẫu kiểm tra định kỳ các thông số: pH, bào tử, tinh thể, OD (độ hấp thụ quang học), DO (lượng oxi hoà tan). Bào tử và tinh thể được kiểm tra trên kính hiển vi và buồng đếm hồng cầu, sau đó khẳng định lại kết quả bằng đếm số lượng bào tử trên đĩa Petri. Khi bào tử và tinh thể được giải phóng hầu như hết ($>95\%$) thì có thể kết thúc lên men.

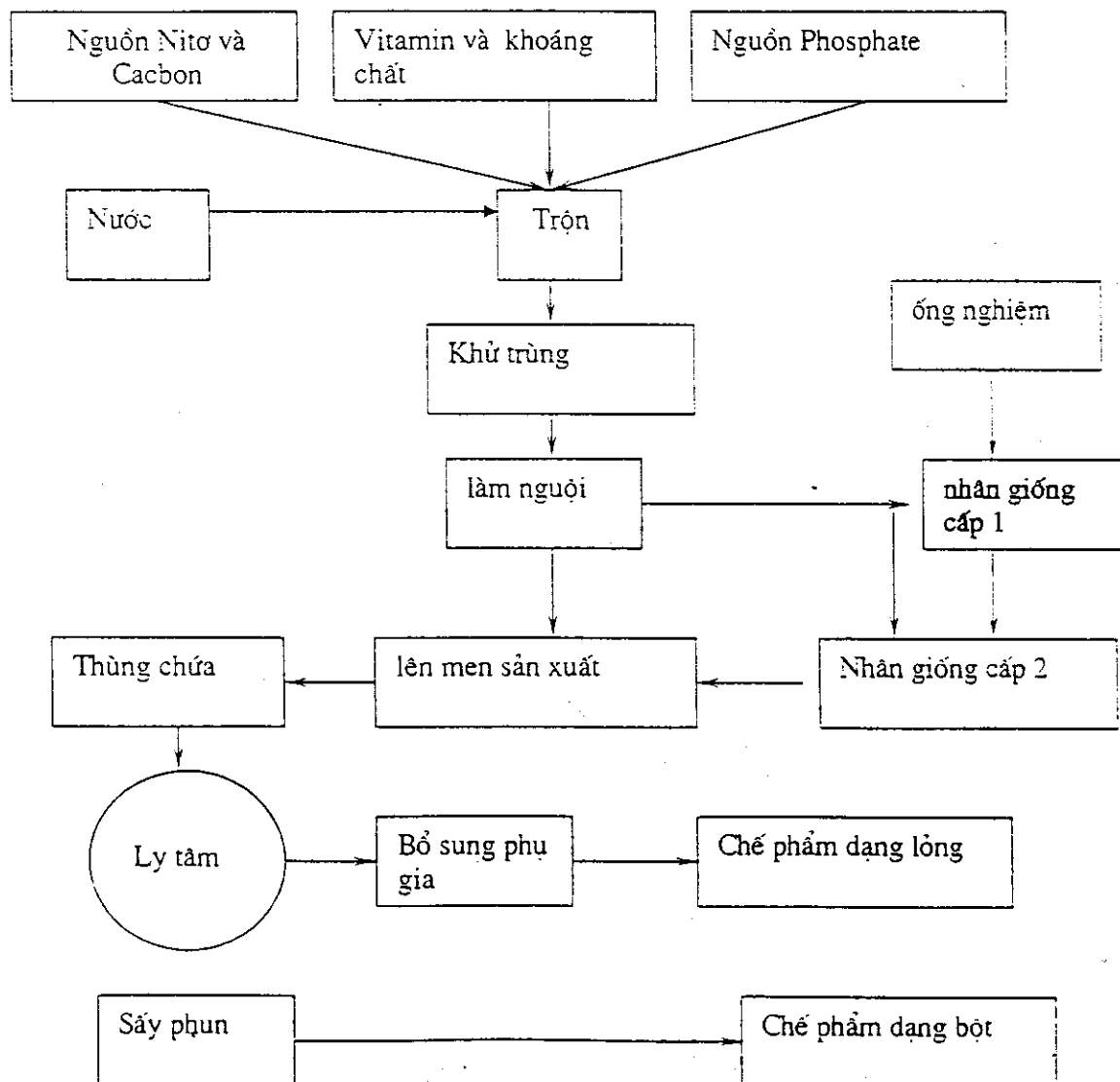
Quy trình lên men và thành phần môi trường trên được áp dụng với các chủng *Bacillus thuringiensis* đã chọn lọc. Sau thí nghiệm chúng tôi nhận thấy rằng các chủng này có khả năng thích nghi với điều kiện lên men đó, chúng sinh trưởng và tổng hợp protein tinh thể độc tốt.

2.4. Hoàn thiện quy trình thu hồi và thành lập công thức chế phẩm BT

Dịch lên men được thu hồi và bảo quản lạnh (4°C) để hạn chế việc mất hoạt tính của chế phẩm dưới tác động của môi trường. Chế phẩm được thiết lập công thức dưới hai dạng: dạng sữa và dạng bột thấm ướt.

Li tâm nhẹ gạn bớt dịch nổi, nhằm tăng mật độ bào tử và tinh thể sao cho hoạt tính của chế phẩm đạt 4000-8000 đơn vị/ml. Sau đó bổ sung thêm các chất phụ gia. Chế phẩm dạng sữa dễ làm, nhưng hoạt tính thấp, khó bảo quản và vận chuyển.

Hạn chế những nhược điểm của chế phẩm dạng sữa, chúng tôi tạo chế phẩm bột thấm ướt. Dịch lên men được li tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch nổi thu cạn. Cặn sau li tâm được đưa vào các sấy phun. Bột khô được bổ sung các chất phụ gia, tạo ra chế phẩm bột thấm ướt có hoạt tính 16000 đơn vị/mg khi kiểm tra LC_{50} so với chế phẩm chuẩn quốc tế.



Hình 5. Quy trình sản xuất chế phẩm BT

2.5. Đánh giá hoạt tính của các chế phẩm trong phòng thí nghiệm

Mục tiêu quan trọng nhất của thuốc trừ sâu đó là khả năng diệt sâu, do vậy các chế phẩm tạo ra luôn luôn được thử nghiệm khả năng diệt sâu. Công việc này nhằm đánh giá mức độ ổn định của chủng giống cũng như các điều kiện lên men để có những điều chỉnh phù hợp. Các chế phẩm được thử nghiệm hoạt tính diệt sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh.



Hình 6. Thử nghiệm khả năng diệt sâu của chế phẩm BT

Bảng 3: kết quả diệt sâu tơ của hai chế phẩm BioBact EC và BioBact WP28

Chế phẩm	Tỷ lệ sâu chết (%) qua thời gian (giờ)					
	10 ⁵ bào tử/1ml dịch thử			10 ⁷ bào tử/1ml dịch thử		
	24	48	72	24	48	72
BioBact EC	41,11	54,81	92,96	63,33	100	
BioBact WP28	37,55	68,9	87,65	48,67	75,8	94,4

Như vậy các chế phẩm này có hoạt tính tương đối cao đối với sâu tơ, đủ khả năng để đưa ra sử dụng trên đồng ruộng. Nhận thấy rằng chủng *Bacillus thuringiensis* tái tổ hợp VCM2-8 có hoạt tính tương đối ổn định. Thích hợp cho việc sử dụng làm chủng sản xuất ở quy mô lớn.

2.6. Hoàn thiện mô hình ứng dụng chế phẩm BT

Các chế phẩm tiếp tục được triển khai tại vùng rau xã Vân Tảo, Thường Tín, Hà Tây. Mô hình được thực hiện tập trung trong 3ha trồng rau, diện tích này hoàn toàn không sử dụng một loại thuốc trừ sâu nào khác. Các chế phẩm được sử dụng liên tục từ khi trồng cây, liều lượng tăng dần khi cây lớn.

Trước khi trồng cây, đất được xử lý bằng chế phẩm kháng sinh thô Genß để chống bệnh thối nhũn thân rễ. Kết quả cho thấy (kết quả không được thống kê cụ

thể) rau phát triển rất tốt, hầu như không bị bệnh thối nhũn rễ, một bệnh diễn ra rất nặng những năm trước đó đã làm thiệt hại lớn cho các hộ nông dân này. Hơn nữa ở các công thức phun thuốc trừ sâu bệnh sinh học còn cho thấy cây cải phát triển tốt hơn, xanh mướt hơn so với đối chứng, vì trong chế phẩm ngoài protein tinh thể diệt côn trùng còn có các chất kích thích tăng trưởng, các chất khoáng như là loại phân bón lá cho cây. Một điều đặc biệt nữa là cũng tại những ruộng thí nghiệm tỷ lệ cây do bọ nhảy chích hút giảm hẳn so với đối chứng.

2.7. Áp dụng chế phẩm Bt trong triển khai mô hình nông nghiệp sinh thái bền vững cho vùng chuyên canh rau xã Gia Xuyên, Gia Lộc, Hải Dương

Từ tháng 4 năm 2004, triển khai sử dụng các chế phẩm trừ sâu sinh học tại vùng chuyên canh rau xã Gia Lộc, Hải Dương. Lượng thuốc đã cung cấp gồm 50kg BioBact WP28 và 160 lít BioBact EC đã được sử dụng để trừ sâu trên dưa hấu, hiện đang thử nghiệm trên bắp cải. Bước đầu sơ bộ đánh giá các loại thuốc có hiệu quả diệt sâu.

2.8. Sản xuất và hoàn thiện chế phẩm trừ sâu sinh học đa chức năng

Chế phẩm trừ sâu sinh học đa chức năng bao gồm:

- Chế phẩm BT như BioBact EC và BioBact WP28 phòng chống các loại sâu tơ, sâu khoang, sâu keo da láng và các loại sâu thuộc Lepidoptera.
- Chế phẩm Gen β để phòng chống các bệnh thối nhũn thân, rễ và bệnh héo xanh và kích thích tăng trưởng cho cây trồng.

Trong năm 2004 đã sản xuất được:

- Sản xuất chế phẩm BioBact S dạng sữa: 100 lít
- Sản xuất chế phẩm BioBact WP dạng bột thấm ướt: 50 Kg
- Chế phẩm Gen β thô: 50kg
- Chế phẩm Gen β dạng dịch 150lít

2.9. Đào tạo và các công trình công bố

- 2 sinh viên đã bảo vệ thành công khoá luận tốt nghiệp
- 2 học viên cao học đang làm luận văn
- 3 sinh viên đang làm khoá luận tốt nghiệp
- Đã đăng 2 bài báo.

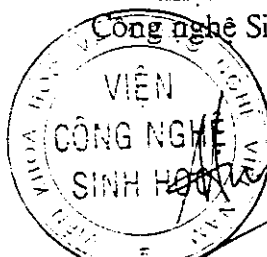
2.10. Kinh phí được cấp: 12 triệu đồng chi cho các mục:

- Khoản 1: thuê khoán chuyên môn: 6,720 tr. đ
- Khoản 2: Nguyên nhiên vật liệu: 5, 280 tr. đ

2.10. Đánh giá chung:

Số TT	Tên tài liệu, vật mẫu	Đăng ký	Thực hiện	Đánh giá
1	Chủng giống mang gen tái tổ hợp	2 chủng	2 chủng	Đạt
2	Xây dựng quy trình sản xuất chế phẩm với chủng Bt tái tổ hợp và mô hình ứng dụng.	1 quy trình	1 qui trình	Đạt
3	Chế phẩm BioBact S dạng sữa Hoạt tính 4000 IU (đơn vị)/ml	80 lít	100 lít	Vượt
	Chế phẩm BioBact WP dạng bột thấm ướt. Hoạt tính 16000 IU/mg	40 kg	50 kg	Vượt
4	Duy trì bộ giống chuẩn quốc tế dùng cho giám định giống	80 chủng	82 chủng	Vượt
5	Duy trì bộ sưu tập giống Bt, phân lập tại Việt Nam. Nguồn gen đa dạng cung cấp cho cải tạo giống sản xuất.	1600 chủng	1630 chủng	Vượt
6	2 sinh viên đã bảo vệ thành công khoá luận tốt nghiệp, 2 học viên cao học đang làm luận văn. 3 sinh viên đang làm khoá luận tốt nghiệp, Đã đăng 2 bài báo			Đạt và Vượt

Xác nhận của Viện
Công nghệ Sinh học



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Trương Năm Hải

Hà Nội, ngày 10/9/2004
Người báo cáo



PGS.TS Ngô Đình Bính

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Phòng Di Truyền Vi sinh vật - Viện Công nghệ Sinh học
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Báo cáo tổng kết khoa học và kỹ thuật:

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG BỘ GIỐNG
GỐC *Bacillus thuringiensis* CÓ HOẠT LỰC CAO TRỪ SÂU
HẠI CÂY TRỒNG

TS Ngô Đình Bính

Hà Nội, 9-2004

Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước, mã số
KC.04.12

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN:

1. PGS. TS Ngô Đình Bính
2. CN. Nguyễn Quỳnh Châu
3. CN. Phạm Minh Hương
4. KS. Nguyễn Ánh Nguyệt
5. CN. Nguyễn Xuân Cảnh
6. KS. Nguyễn Đình Tuấn
7. KS. Phạm Kiều Thuý

Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

BÀI TÓM TẮT

Thuốc trừ sâu sinh học Thuricid từ *Bacillus thuringiensis* được sản xuất lần đầu tiên năm 1927 tại Thụy Sĩ. Ngày nay thuốc sâu sinh học Bt chiếm hơn 90 % thị phần thuốc sâu sinh học trên thế giới với nhiều tên thương phẩm khác nhau do Bt có nhiều ưu thế trong sản xuất công nghiệp và giá thành thấp. Hàng năm thế giới sản xuất hàng ngàn tấn chế phẩm Bt, chủ yếu là ở các nước Hoa Kỳ, Nhật Bản, Trung Quốc...

Ở Việt Nam, thuốc trừ sâu sinh học Bt được sản xuất và ứng dụng từ năm 1973 tại Viện Sinh vật, Viện Khoa học Việt Nam. Từ đó đến nay, thuốc sâu sinh học Bt ngày càng được phát triển, ứng dụng và đã mang lại lợi ích to lớn trong bảo vệ cây trồng và góp phần giảm ô nhiễm môi trường. Tuy nhiên thuốc sâu sinh học Bt sản xuất ở Việt Nam chất lượng chưa ổn định, giá thành còn cao do công nghệ thấp và chủ yếu do giống Bt hoạt lực diệt sâu chưa được nâng cao, hoạt phổ diệt sâu còn hẹp. Vì vậy nhiệm vụ cần đặt ra nhằm khắc phục những hạn chế nêu trên của các chủng giống và công nghệ sản xuất của chúng ta hiện nay. Đề tài "Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực diệt sâu cao trừ sâu hại cây trồng" theo hướng này đã đạt được các kết quả sau:

- Đã phân lập được 594 chủng *Bacillus thuringiensis* từ 429 mẫu đất, lá, còn trùng thu thập từ 24 tỉnh, thành phố ở Việt Nam.
- Bằng phương pháp huyết thanh miễn dịch đã phân loại tới dưới loài cho 479 *Bacillus thuringiensis*.
- Đã phát hiện được 311 gen *cryI* bằng kỹ thuật PCR từ 102 chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập ở Việt Nam.
- Tách được dòng và tổng hợp chuỗi 9 gen từ 3 chủng có hoạt tính diệt sâu cao.
- Tách dòng gen mã hoá protein CryIC diệt sâu khoang của chủng Bt TQ3-3.
- Biểu hiện gen mã hoá protein CryIC trong *E. coli* DH5 α .
- Đã chọn được 2 chủng Bt có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng, bằng phương pháp chuyển gen *cryIC* vào chủng sản xuất trong đó chủng VCM2-8 đã được đưa vào sản xuất.
- Chọn được điều kiện lên men thích hợp cho các chủng sản xuất
- Đã sản xuất được 800lít chế phẩm dạng dịch và 500kg chế phẩm bột.

- Đã thử nghiệm hoạt tính diệt sâu của chế phẩm trong phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng, kết quả cho thấy các chế phẩm có khả năng diệt 60-90% số lượng sâu thử nghiệm.
- Đã xây dựng mô hình trình diễn ứng dụng các chế phẩm BT để trừ sâu trên rau tại Văn Tào, Thường Tín, Hà Tây.
- Đã tham gia đào tạo 1 học viên cao học, 7 sinh viên; đang đào tạo 2 học viên cao học và 3 sinh viên; công bố được 3 bài báo.
- Tổ chức và tham gia "Hội nghị Công nghệ Sinh học Khu vực Thái Bình Dương lần thứ năm về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường".
- Đã tham gia một số Hội nghị và triển lãm có liên quan.

MỤC LỤC

Lời mở đầu	1
Chương 1. Tổng quan tài liệu	3
1.1. Tóm tắt lịch sử nghiên cứu và ứng dụng của <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.2. Nghiên cứu và ứng dụng <i>Bacillus thuringiensis</i> ở Việt Nam	4
1.3. Đại cương về vi khuẩn <i>B. thuringiensis</i>	4
1.3.1. Đặc điểm hình thái của <i>B. thuringiensis</i>	4
1.3.2. δ - endotoxin (nội độc tố δ hay tinh thể độc)	5
1.3.3. Gen mã hoá protein độc tố diệt côn trùng	6
1.3.4. Cơ chế tác động của protein tinh thể độc lên côn trùng.....	7
1.4. Những ưu điểm và hạn chế của chế phẩm Bt	9
1.5. Ứng dụng gen độc tố Bt trong công nghệ gen	9
Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	11
2.1. Vật liệu	11
2.1.1. Sinh phẩm	11
2.1.2. Dụng cụ và hoá chất.....	11
2.2. Phương pháp nghiên cứu	12
Chương 3. Kết quả và thảo luận	13
3.1. Tuyển chọn chủng Bt có hoạt tính diệt sâu cao	13
3.1.1. Phân lập và phân loại <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
3.1.2. Chọn chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> cho sản xuất	14
3.2. Thu nhận chủng Bt tái tổ hợp bằng kỹ thuật sinh học phân tử và công nghệ gen ...	15
3.2.1. Xác định thành phần gen của một số chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> phân lập	15
3.2.2. Tách dòng gen <i>cryIC</i> từ chủng Bt TQ3-3	16
3.2.3. Biểu hiện gen <i>cryIC</i> trong <i>E. coli</i> DH5 α	17
3.2.4. Thu nhận chủng tái tổ hợp.....	18
3.3. Tối ưu điều kiện lên men <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3.3.1. Chọn môi trường lên men thích hợp cho chủng Bt phân lập	18

3.3.2. Chọn môi trường lên men thích hợp cho chủng <i>Bt</i> tái tổ hợp.....	20
3.4. Nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm BT	21
3.4.1. Hoàn thiện quy trình lên men	21
3.4.2. Hoàn thiện quy trình tạo chế phẩm	23
3.5. Đánh giá hiệu quả diệt sâu của chế phẩm BT	24
3.5.1. Đánh giá hiệu quả diệt sâu của chế phẩm trong phòng thí nghiệm.....	24
3.5.2. Thử nghiệm chế phẩm BT trên đồng ruộng.....	25
3.6. Xây dựng mô hình ứng dụng các chế phẩm sinh học trên đồng ruộng	26
3.7. Kết quả sản xuất các dạng chế phẩm BT	27
3.8. Hạch toán giá thành sản phẩm (chỉ tạm tính).....	27
3.9. Đào tạo	28
3.10. Hội nghị khoa học và các bài báo khoa học.....	28
3.11. Các hoạt động khoa học khác	30
3.12. Kinh phí.....	30
Kết luận và kiến nghị	31
Tài liệu tham khảo	32

LỜI MỞ ĐẦU

Sâu bệnh hại cây trồng đã và đang gây ra những thiệt hại to lớn trong nông nghiệp, một mặt chúng làm giảm năng suất, mặt khác làm giảm chất lượng nông sản, thực phẩm. Để diệt trừ sâu hại và bảo vệ mùa màng người ta đã sử dụng thuốc trừ sâu hoá học. Do tác dụng tức thời mà các loại hoá chất diệt sâu ngày càng bị lạm dụng dẫn đến phản tác dụng. Hầu hết các loại thuốc hoá học đang được sử dụng không chỉ tiêu diệt dịch hại mà còn tiêu diệt các loài có ích. Hơn nữa, các chất hóa học ngày càng tích tụ nhiều trong đất, nước, không khí và nông sản gây ô nhiễm môi trường, gây độc cho người, gia súc và các sinh vật có ích khác, từ đó nảy sinh nhiều ảnh hưởng tiêu cực khác. Việc tìm ra thuốc trừ sâu sinh học an toàn hơn để từng bước thay thế thuốc trừ sâu hoá học là một yêu cầu cấp bách và cần thiết. Thuốc trừ sâu BT sản xuất từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) là một loại thuốc có triển vọng cao, đang được nhiều nước trên thế giới nghiên cứu và ứng dụng.

Ở Việt Nam thuốc trừ sâu BT đã được quan tâm nghiên cứu từ những năm 1973 và đã đạt được một số thành tựu đáng kể. Trên thị trường thuốc bảo vệ thực vật cũng đã xuất hiện một số sản phẩm BT có nguồn gốc nhập ngoại. Tuy nhiên việc triển khai ứng dụng còn hạn chế và thường ở quy mô nhỏ. Có nhiều nguyên nhân dẫn đến tình trạng này nhưng chủ yếu là do hiệu quả diệt sâu của sản phẩm còn thấp, giá thành lại cao nên chưa thu hút được người nông dân. Nguyên nhân này bắt nguồn từ việc thuốc trừ sâu BT có phổ diệt sâu hẹp, các chủng sản xuất thường thoái hoá sau một thời gian ngắn, năng suất và chất lượng của thuốc không ổn định. Việc tìm ra chủng *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng và ổn định là công việc hết sức cần thiết. Góp phần giải quyết vấn đề này chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: "Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao trừ sâu hại cây trồng".

Đề tài thực hiện nhằm mục tiêu:

1. Thu nhận được bộ giống gốc vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* cho sản xuất bao gồm:
 - Chọn lựa các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập ở Việt Nam có hoạt tính diệt sâu cao.
 - Thu nhận được chủng *Bacillus thuringiensis* mang gen tái tổ hợp có phổ diệt sâu rộng.
2. Thiết lập điều kiện lên men tối ưu cho các chủng sản xuất.

3. Sản xuất và tạo chế phẩm BT.

4. Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm BT ở một số địa phương

Để đạt được những mục tiêu trên cần thực hiện những nhiệm vụ sau:

1. Phân lập và nghiên cứu một số đặc tính sinh học của các chủng *Bacillus thuringiensis*.
2. Tạo ra chủng *Bacillus thuringiensis* tái tổ hợp bằng phương pháp sinh học phân tử.
3. Tìm điều kiện lên men thích hợp (dinh dưỡng, nhiệt độ, pH, ...) cho các chủng sản xuất.
4. Đánh giá hoạt tính diệt sâu trong phòng thí nghiệm.
5. Xây dựng công thức phù hợp cho sản phẩm lên men.
6. Đánh giá hoạt lực các công thức trên đồng ruộng.
7. Xây dựng mô hình ứng dụng phòng trừ bằng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số vùng rau.
8. Hoạch toán được giá thành chế phẩm sản xuất

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tóm tắt lịch sử nghiên cứu và ứng dụng của *Bacillus thuringiensis*

Năm 1870, khi nghiên cứu về bệnh tằm dâu, nhà bác học người Pháp Louis Pasteur đã phát hiện ra một loài vi khuẩn gây bệnh và đặt tên là *Bacillus bombycos*. Năm 1901, nhà khoa học Nhật Bản là Ishitawa cũng phân lập trên tằm bị bệnh "Sotto" một loài vi khuẩn tương tự và đặt tên là *Bacillus sotto*. Năm 1911 nhà bác học Đức E. Berliner phân lập được loài vi khuẩn này từ xác ấu trùng bướm phấn Địa Trung Hải là *Anagasta kuehniella*. Đến năm 1915, vi khuẩn này chính thức mang tên *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) do phân lập được từ những côn trùng bị bệnh tại vùng Thuringen (Đức).

Ngay từ những năm 1930, *B. thuringiensis* đã được thử nghiệm chống sâu đục thân ngô ở châu Âu. Năm 1938, Pháp là nước đầu tiên sản xuất chế phẩm *Bt* để diệt sâu hại lúa mì. Từ 1951 đến 1956 Steinhaus đã nghiên cứu khả năng diệt côn trùng của *B. thuringiensis* và sản xuất đầu tiên ở Mỹ. Vào những năm 1960-1970 rất nhiều chủng vi khuẩn có hoạt lực cao đã được phân lập. Nhưng chỉ đến những năm 1970-1980 mới diễn ra bước ngoặt lớn trong lĩnh vực này khi người ta phát hiện ra một số chủng *Bt* chỉ có tác dụng đặc hiệu lên một hay một số loài côn trùng. Năm 1981, Scheff và Whiteley đã phân lập và tách dòng gen mã hoá độc tố diệt sâu đầu tiên từ chủng *Bt. subsp. kurstaki* HD-1 gọi là gen *cryI*. Sau đó hai ông đã cho gen này biểu hiện ở *E. coli* và thử hoạt tính diệt ấu trùng *Madula sexta*.

Hiện nay chế phẩm BT chiếm tới 90% thị phần của thuốc trừ sâu sinh học với nhiều dạng chế phẩm: dạng bột thấm nước, dạng sữa, dạng hạt... Đặc biệt hoạt lực của chế phẩm được nâng cao nhờ kỹ thuật sinh học phân tử và công nghệ gen: dạng con nhộng Cellcap diệt sâu, dạng M-TraxTM diệt bọ cánh cứng với các chủng *Bt* mang gen tái tổ hợp, sự kết hợp giữa vật chủ *Pseudomonas fluorescens* có hệ thống điều khiển di truyền với gen độc tố sinh học mới....

Vi khuẩn diệt côn trùng *Bacillus thuringiensis* thu hút sự quan tâm của các nhà vi sinh học và côn trùng học nhờ đặc tính diệt côn trùng chọn lọc mà không làm hại tới sinh vật có ích khác. Càng ngày với những phát hiện mới, phổ tác động của *Bt* ngày càng được mở rộng. Năm 1901 *Bt* có phổ tác động diệt côn trùng thuộc bộ cánh vẩy- Lepidoptera. Năm 1977 - diệt hai cánh- Diptera. 1983 - diệt cánh cứng - Coleoptera. 1988- diệt giun tròn kí sinh thực vật và động vật - Trematoda và diệt be, vết- Acari, diệt kiến - Hymenoptera. Những tóm tắt trên cho thấy có thể phát hiện được các chủng

Bt có tác dụng diệt bất cứ mục tiêu nào từ tế bào nhân chuẩn (eucaryote) đơn giản nhất cho tới những động vật chân khớp (arthropod) phức tạp nhất.

Năm 1962 Barjac và Bonnefoi đã đưa ra một phương pháp phân loại mới cho Bt bằng phản ứng huyết thanh và đã mô tả 27 type huyết thanh chính có hoạt tính diệt côn trùng thuộc bộ cánh vẩy, hai cánh, cánh cứng, nguyên sinh động vật, động vật chân khớp... Cho đến năm 2002 người ta đã phát hiện được 82 dưới loài khác nhau của *Bacillus thuringiensis*.

1.2. Nghiên cứu và ứng dụng *Bacillus thuringiensis* ở Việt Nam

Ở nước ta, năm 1971 chế phẩm BT được khảo nghiệm ở viện Bảo vệ thực vật (Nguyễn Văn Cẩm và cs, 1975). Năm 1973, Nguyễn Công Bình và cộng sự lần đầu tiên nghiên cứu sản xuất chế phẩm BT trong phòng thí nghiệm bằng phương pháp lên men chìm trên máy lắc. Năm 1982 BT được sản xuất ở Việt nam với qui mô công nghiệp. Tuy nhiên, hoạt tính chủng Bt sản xuất không cao, do thiếu thiết bị thu hồi, nên chế phẩm chủ yếu ở dạng dịch thể không bảo quản được lâu, hoạt lực chóng giảm.

Trong chương trình Công nghệ sinh học giai đoạn 1996-2000, đề tài KHCN02-07 sản xuất và ứng dụng thuốc trừ sâu BT đã được nâng lên một bước mới về chất. Chế phẩm BT được sản xuất trên một hệ thống thiết bị lên men dạng pilot hiện đại. Chế phẩm bột thấm nước lần đầu tiên được sản xuất. Hoạt tính của chế phẩm đã được khảo nghiệm trong phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng cho kết quả tương đương với chế phẩm BT ngoại nhập.

Có thể nói rằng *Bacillus thuringiensis* là một trong những loài được nghiên cứu kỹ và chi tiết nhất, với trên 30 năm nghiên cứu trên nhiều khía cạnh khác nhau và đã thu được những thành tựu đáng kể.

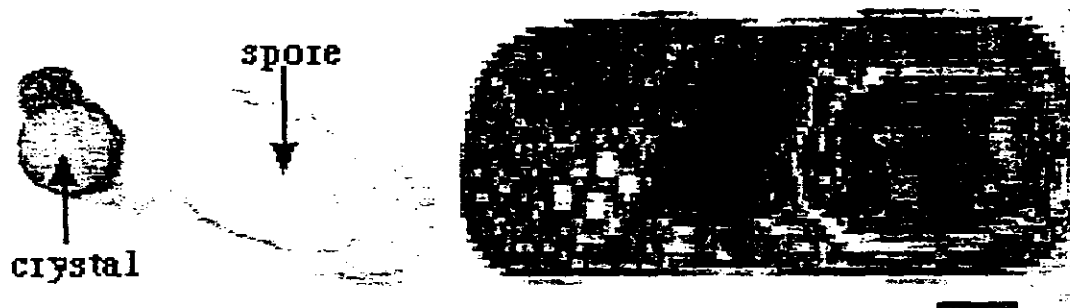
1.3. Đại cương về vi khuẩn *B. thuringiensis*

1.3.1. Đặc điểm hình thái của *B. thuringiensis*

B. thuringiensis là thành viên thuộc nhóm I, chi *Bacillus*. Đây là loài vi khuẩn đất, Gram dương, hô hấp hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc. Tế bào có kích thước 3-6 µm, phủ tiền mao không dày, di động được. tế bào đứng riêng rẽ hoặc xếp thành chuỗi.

Khi gặp điều kiện bất lợi Bt có khả năng tạo bào tử, đồng thời các protein độc tố cũng được tổng hợp, các protein này kết tinh và tạo thành thể vùi. Bào tử vi khuẩn có dạng

hình trứng kích thước 1.5-2 μm . Thể vùi có nhiều hình dạng khác nhau (hình tháp, hình ovan, hình lập phương...) nó có kích thước khoảng 0,6x0,02 μm , có thể chiếm tới 30% trọng lượng khô của tế bào. Khi ở trong tế bào sinh dưỡng, thể vùi thường nằm kề với bào tử, khi tế bào tan thể vùi và bào tử đều thoát ra ngoài. Có thể nhận thấy khi quan sát dưới kính hiển vi đối pha, ở vật kính dầu tinh thể bất màu sẫm còn bào tử không bất màu nhưng có mép sáng.



Hình 1. Tế bào vi khuẩn *B. thuringiensis* với tinh thể và bào tử bên trong

1.3.2. δ -endotoxin (nội độc tố δ hay tinh thể độc)

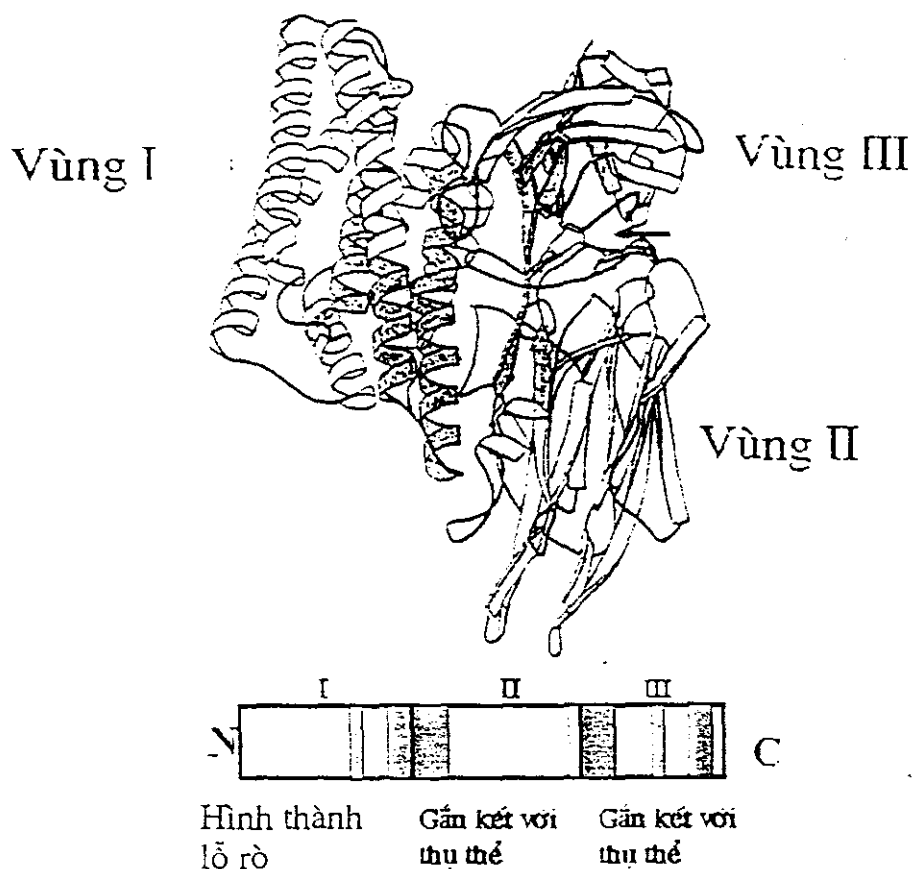
Trong quá trình hình thành bào tử *Bt* có khả năng sinh ra 4 loại độc tố:

- * α -Exotoxin hay ngoại độc tố A
- * β -Exotoxin hay ngoại độc tố B
- * Ψ -exotoxin hay ngoại độc tố Y
- * δ -endotoxin (nội độc tố δ hay tinh thể độc)

Đặc điểm quan trọng nhất của vi khuẩn *Bt* là có khả năng tạo thành trong tế bào một loại tinh thể có bản chất là protein độc tính đối với nhiều loại côn trùng.

Nội độc tố δ là một protein kết tinh gồm 1180 gốc axit amin. Các axit amin chủ yếu gồm axit glutamic, axit asparaginic chiếm trên 20% tổng số axit amin trong phân tử protein, là nguyên nhân gây điểm đẳng điện thấp. Lượng xistin nhỏ (< 2% tổng số axit amin), qui định sự không hoà tan của tinh thể. Ngoài ra còn có các axit amin khác như: acginin, treonin, losin... Các hidrat cacbon chiếm khoảng 5,6%, tuy nhiên cũng có khả năng hidrat cacbon chỉ kết hợp với tinh thể như một sự pha tạp ngẫu nhiên.

Về mặt các thành phần nguyên tố của tinh thể, ngoài C, H, N, O, S còn thấy một số nguyên tố khác là Ca, Mg, Si, Fe... với một lượng nhỏ Ni, Zn, Al... và hầu như không có P.



Hình 2. Mô phỏng cấu trúc của protein tinh thể độc Cry3A

- Vùng I bao gồm một bó có 7 đường xoắn ốc α , trong đó đường xoắn ốc kỵ nước số 5 nằm ở trung tâm, được bao bọc bởi 6 đường xoắn ốc lưỡng tính. Vùng I là một chuỗi polypeptid có 290 axit amin, vùng chứa nitơ - đầu N. Vùng II từ axit amin 291 đến a.a 500, chứa 3 tấm β song song xếp ngược chiều. Mỗi tấm kết thúc bằng 1 cấu trúc móc. Vùng II là vùng không bền vững của độc tố. Vùng III, từ axit amin 501 đến axit amin 644, chứa những tấm β dạng bánh kẹp sandwich. Vùng này có cấu trúc bền vững, vùng chứa nhóm cacboxyl - đầu C.

Sự tổng hợp tinh thể xảy ra khoảng 3 giờ sau pha cân bằng. Mỗi tế bào sinh bào tử có thể có từ 1-3 tinh thể độc (Klulov và Marakov, 1987). Tinh thể độc không tan trong dung môi hữu cơ. Có những tinh thể khi mới tách khỏi bào tử chỉ tan trong pH rất kiềm ($>11,5$), khi có mặt các chất khử thì tính tan sẽ tăng lên (tan ở pH 7,9-9,5).

Tinh thể độc rất bền nhiệt, ủ 1 giờ ở 65°C vẫn không bị mất hoạt tính, tính độc chỉ mất đi nếu ủ ở 100°C (trong 30-40 phút).

1.3.3. Gen mã hoá protein độc tố diệt côn trùng

Như chúng ta đều đã biết, các protein tinh thể được mã hoá bởi các gen khác nhau, mỗi gen quy định một protein riêng biệt và protein này lại có tác dụng đặc hiệu lên một hay một vài loại côn trùng. Ngày nay người ta đã phát hiện được trên 250 gen thuộc 42

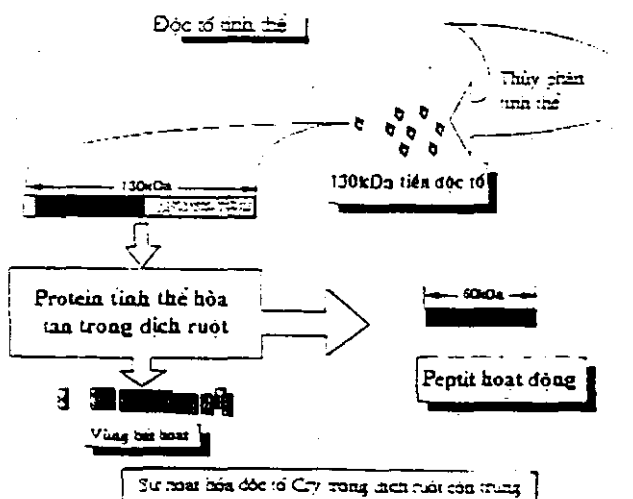
nhóm mã hoá cho độc tố Cry và trên 20 gen thuộc 2 nhóm mã hoá cho độc tố Cyt. Trong số này, nhóm gen *cryI* là phổ biến và được nghiên cứu chi tiết nhất, hầu hết chúng mã hoá cho các protein gây độc đối với côn trùng thuộc bộ cánh vảy.

Bảng 1. Giới thiệu một số protein thường gặp ở *B. thuringiensis*

Tên độc tố	Trọng lượng phân tử (KDa)	Côn trùng đích	Chủng <i>Bacillus thuringiensis</i>	Hình dáng tinh thể
CryIA(a,b,c)	130-133	<i>Lepidoptera</i> <i>Diptera</i>	<i>B. berliner</i>	Lưỡng tháp
CryIB	138		<i>B. kurstaki</i> HD-1, KTO	
CryIC	135		<i>B. entomocidus</i> 6.01	
CryID,E,F	130-134		<i>B. aizawai</i> 7.29	
Cry2A	71	<i>Lepidoptera</i>	<i>B. aizawai</i> IC1	Lập phương
Cry2BC	70-71	<i>Diptera</i>	<i>B. kurstaki</i> HD-1	
Cry3A,B,C,D	66-73	<i>Coleoptera</i>	<i>B. tenebrionis</i> diego	Thoi det
Cry4A, B	125-145	<i>Diptera</i>	<i>B. morrisoni</i> PG14	Cầu Chữ nhật
Cry4C, D	68		<i>B. israelensis</i>	
Cry5A, C	81	<i>Coleoptera</i> <i>Lepidoptera</i>	<i>B. kurstaki</i> JHCC 4835	Lưỡng tháp
Cry5	44-55	<i>Nematoda</i>	<i>B. thompsoni</i>	Lưỡng tháp

1.3.4. Cơ chế tác động của protein tinh thể độc lên côn trùng

Các chủng *Bt* khác nhau có hoạt tính diệt côn trùng khác nhau. Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về cơ chế tác dụng của các tiền độc tố lên côn trùng đích. Cơ chế hoạt động của protein tinh thể của *Bacillus thuringiensis* có liên quan tới sự hoà tan của tinh thể trong ruột giữa của côn trùng. Khi sâu ăn phải tinh thể độc của *Bacillus thuringiensis*, dưới tác động của men proteaza có tính kiềm (pH>10) trong ruột sâu, tinh thể tiền độc tố (Trọng lượng phân tử khoảng 70-75 kDa) bị hoà tan, và một nhân độc tố có khối lượng phân tử 60- 65 KDa được hình thành và hoạt hoá.



Độc tố đã được hoạt hoá bám vào các phân tử cảm thụ đặc biệt nằm trên màng vi thể của tế bào thành ruột sâu. Sự gắn kết này ở ruột sâu làm thay đổi gradien điện hoá tạo thành các lỗ rò (hay tạo thành kênh ion). Do đó phá huỷ cân bằng áp suất thẩm thấu của màng tế bào, làm cho tế bào phồng lên và bị phân huỷ dẫn đến sâu chết.

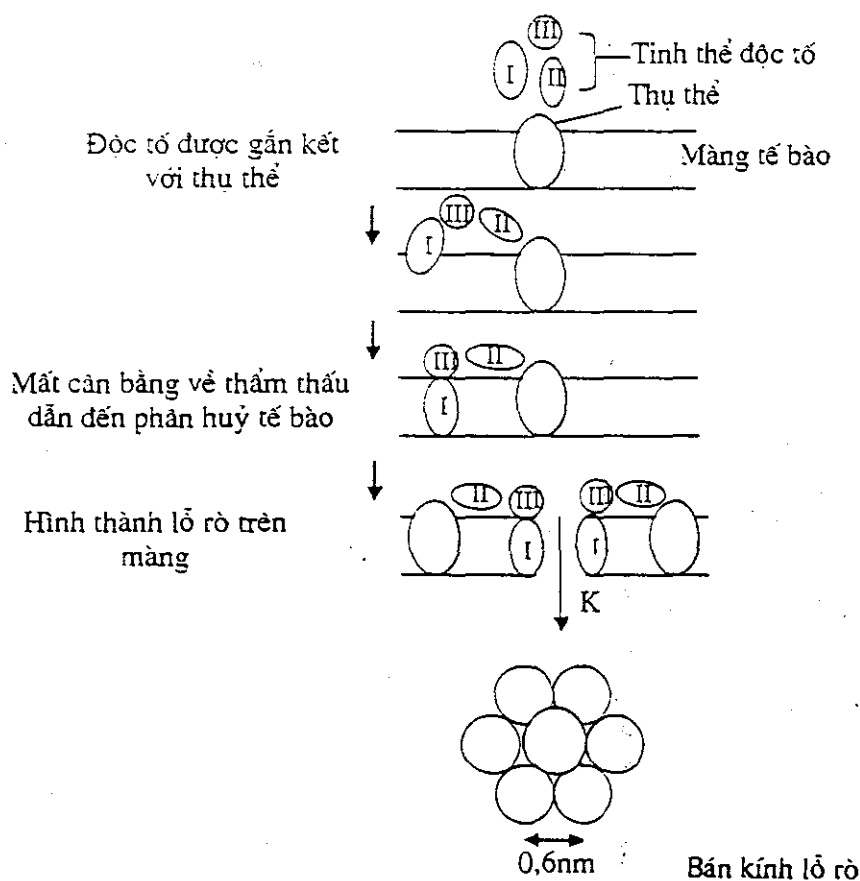
Đặc điểm quan trọng nhất trong cơ chế tác động của độc tố lên côn trùng là sự gắn kết của độc tố với thụ thể và sự hình thành lỗ rò (kênh ion).

1. Sự gắn kết độc tố với thụ thể:

Sự gắn kết độc tố với thụ thể của tế bào ruột sâu là một quá trình phức tạp. Đó là sự gắn kết của độc tố với thụ thể (phân tử cảm thụ) nằm trên màng vi thể của ruột tế bào sâu. Quá trình này gồm 2 giai đoạn - giai đoạn gắn kết bền vững và không bền vững. Các thí nghiệm đã chứng minh được vai trò của vùng I, vùng II và vùng III trong quá trình gắn kết.

2. Chức năng hình thành kênh ion (lỗ rò):

Cấu trúc của độc tố bao gồm vùng I với một bó 7 chuỗi xoắn alpha. Vùng này có chức năng bám vào màng ruột côn trùng và hình thành kênh ion trên đó. Sau khi độc tố bám vào các thụ thể trên bề mặt của các tế bào biểu mô ruột côn trùng, chúng cài vào màng và hình thành các lỗ rò (kênh ion). Hill và cộng sự cho rằng kênh ion giống như lỗ rò đại phân tử, có tính chất như một kênh không chọn lọc, các ion Na^+ và ion K^+ có thể đi qua.



Mô hình tạo thành lỗ rò (kênh ion) xuyên qua màng tế bào côn trùng dưới tác động của độc tố tinh thể

1.4. Những ưu điểm và hạn chế của chế phẩm Bt

- Chế phẩm không độc hại với sinh vật có ích, không gây nguy hiểm cho người và động vật có máu nóng vì pH đường ruột của các động vật này thấp dẫn đến tính thể mất hoạt tính.
- Chế phẩm *Bt* tiêu diệt côn trùng một cách chọn lọc do đặc tính của tính thể độc là chỉ được hoạt hoá khi rơi vào ruột của một nhóm côn trùng có pH trong ruột thích hợp.
- Chế phẩm *Bt* không gây ô nhiễm môi trường, không ảnh hưởng đến chất lượng nông sản thực phẩm.
- Không có khả năng diệt côn trùng bên trong cây hoặc trong rễ cây.
- Mất hoạt tính trong nước do tốc độ lắng đọng nhanh của bào tử và tính thể, chịu sự hấp thụ của các hoạt chất hoá học.
- Mất hoạt tính trong đất do bị các vi sinh vật đất phân huỷ.
- Mất hoạt tính trên lá cây do tác dụng của ánh sáng mặt trời và các nhân tố môi trường khác.
- Có một số loài côn trùng kháng thuốc.

1.5. Ứng dụng gen độc tố Bt trong công nghệ gen

Nhờ sự tiến bộ của kỹ thuật di truyền người ta đã nâng cao được hiệu quả của Bt bằng cách chuyển gen độc tố *Bt* vào vi khuẩn khác, kết hợp với virus, chuyển gen vào thực vật. Điều chỉnh quá trình sinh độc tố mới nhờ cả gen mới chuyển và gen trước đó làm tăng hoạt tính, mở rộng phổ tác động của Bt với côn trùng.

Năm 1981, Schnef và Whiteley nhân dòng và biểu hiện gen nội độc tố δ -endotoxin của Bt vào *E. coli*. Năm 1982, Klier và cộng sự đã nhân dòng gen mã hoá sinh tổng hợp protein diệt côn trùng ở cả *E. coli* và *B. subtilis*, hai loài này đã tổng hợp tính thể giống Bt ban đầu. Năm 1985 Sikar và Carlton nhân dòng gen độc tố từ *Bt. Subsp. israelis* lên một số vật chủ Gram dương. Việc nhân dòng này có hoạt tính đối với ấu trùng của *Aedes aegypti* mặc dù vậy hoạt tính yếu hơn chủng ban đầu.

Một thí nghiệm chuyển gen *Bt* vào virus côn trùng đặc hiệu đó là sử dụng chuyển gen *cryIA(b)* từ Bt vào virus đa diện nhân (Ac NPV) của *Autographica californica*. Biểu hiện thể tái tổ hợp virus trong tế bào này dẫn tới việc sản sinh ra tính thể.

Gen độc tố *Bt* cũng được nghiên cứu chuyển vào thực vật từ đầu thập niên 80. Thuốc lá là loại cây hai lá mầm đầu tiên được biến nạp gen δ -endotoxin thông qua vi khuẩn *agrobacterium*. Fischhoff và cộng sự cũng chuyển gen độc tố vào khoai tây, cà chua, bông thông qua vi khuẩn trên. Cây ngô là loại cây một lá mầm cũng được chuyển gen với đặc tính ổn định.

Trên cơ sở các thông tin đã biết về gen độc tố *Bt* Altosan và cộng sự (1994) đã nghiên cứu và tổng hợp hoá học các đoạn gen *cryIA(b)*, *cryIA(c)* nhân tạo dài 1845 bp, tối ưu hoá về mặt di truyền bằng cách tăng tối đa trình tự GC. Nhờ những kỹ thuật tổng hợp hoá học, người ta đã tiến hành thay thế 21% gốc bazơ của gen ban đầu bằng các gốc bazơ phù hợp mà không làm thay đổi trình tự axit amin trong phân tử protein độc tố. Kết quả là khả năng diệt côn trùng gây hại của gen *cryIA(b)* tăng 10 lần, gen *cryIA(c)* tăng 100 lần. Do đó những cây được chuyển gen *Bt* trở nên độc hơn với côn trùng gây hại. Các gen độc tố *Bt* cải biến đã được chuyển vào hàng loạt cây trồng như thuốc lá, cà chua (1987), ngô (1989), lúa (1990), khoai tây (1992), cải bông (1993), đậu tương (1994), thông rụng lá và cây dương (1995), mía và táo (1996), lạc cỏ linh lăng (1997). Hiện nay vấn đề *Bt* và chuyển gen *Bt* vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Sinh phẩm

- Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập thu nhận từ Phòng Di truyền Vi sinh, Viện CNSH.
- Bộ huyết thanh chuẩn dùng cho phân loại *Bacillus thuringiensis*.
- Sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera littura*) và sâu xanh (*Heliothis amigera*) nhận từ phòng Đấu tranh Sinh học, Viện Bảo vệ Thực vật.
- Các cặp mồi dùng cho tách gen *cryI* và tách dòng gen (Bảng 2)

Bảng 2: Các cặp mồi dùng để tách gen *cryI* và tách dòng gen

Mồi	Trình tự nucleotid	Gene	Kích thước (bp)
Mồi cho phản ứng PCR đặc hiệu đối với gen <i>cryI</i>			
TYIAA	5'-GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC	<i>cryIA(a)</i>	724
TYLAB	5'—TCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTA	<i>cryIA(b)</i>	238
TYLAC	5'—TCACTTCCCATCGACATCTACC	<i>cryIA(c)</i>	487
TYIB	5'—GTCAACCTTATGATGCACCTGGGCTTC	<i>cryIB</i>	830
TYIC	5'—CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTC	<i>cryIC</i>	288
TYID	5'—GGTACATTAGATATTACAGCCAC	<i>cryID</i>	414
TYIE	5'—CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	<i>cryIE</i>	380
TYIF	5'—CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	<i>cryIF</i>	368
TYIUNI	5'— TCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	<i>cryI</i>	
Tách dòng và biểu hiện gen			
K5un2	5'-AGGACCAGGATTTACAGGAGG		
K3un2	5'-GTGGCTATATCCTTCGTGTACAGC		
K5un3	5'—AATGCGTACCTTACAATTGTTTAAGTAAT		
K3un3	5'-CCTCCTGTAAATCCTGGTCCT		
BamK5un3	5'—GGATCCCAATGCGTACCTTACAAT		
K3un2	5'-GTGGCTATATCCTTCGTGTACAGC		

2.1.2. Dụng cụ và hoá chất

Các hoá chất, dụng cụ dùng cho phân lập, phân loại và tách gen *Bacillus thuringiensis* của các hãng Sigma, Pharmacia, Invitrogen...

Các dụng cụ, thiết bị, hoá chất dùng cho nghiên cứu vi sinh và sinh học phân tử.
Các loại hoá chất, dụng cụ và thiết bị phục vụ cho nhân giống, lên men và tạo chế phẩm BT.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Trong suốt quá trình nghiên cứu chúng tôi đã sử dụng các phương pháp dưới đây:

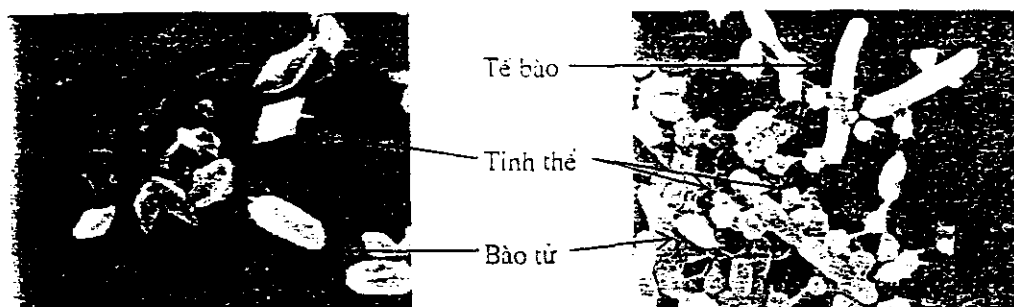
- Phân lập *Bacillus thuringiensis* từ các mẫu đất, lá, côn trùng.
- Thử hoạt tính diệt sâu theo phương pháp của Thiery và Frachon
- Phân loại theo phương pháp huyết thanh miễn dịch
- Tách các gen trong nhóm gen cry I bằng phương pháp PCR.
- Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá protein CryIC diệt sâu khoang.
- Lên men *Bacillus thuringiensis* trên máy lắc và trên nồi lên men chìm Biorflo III.
- Thiết lập công thức tạo chế phẩm BT dạng sữa và dạng bột
- Xây dựng mô hình thử nghiệm chế phẩm BT trên đồng ruộng.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng Bt có hoạt tính diệt sâu cao

3.1.1. Phân lập và phân loại *Bacillus thuringiensis*

Với 429 mẫu đất, lá, còn trùng thu thập từ 24 tỉnh, thành phố ở Việt Nam đã phân lập được 1463 chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus cereus*- *Bacillus thuringiensis* và xác định được 594 chủng *Bacillus thuringiensis* sinh tinh thể.



Hình 4. Hình dạng tinh thể và bào tử của chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Bằng phương pháp huyết thanh học với bộ huyết thanh của 50 kháng nguyên chuẩn chúng tôi đã phân loại tới dưới loài cho 479 chủng. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân loại của các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Dưới loài	Typ huyết thanh	Số chủng ngưng kết	Tỷ lệ (%)
<i>kurstaki</i>	3a, 3b, 3c	132	27,6
<i>aizawai</i>	7	74	15,4
<i>alesti</i>	3a, 3c	35	7,3
<i>tolwothy</i>	9	13	2,7
<i>konkukian</i>	34	11	2,3
<i>coreanensis</i>	25	6	1,2
<i>leesis</i>	33	8	1,7
<i>gallariae</i>	5a, 5b	7	1,5
<i>colmeri</i>	21	12	2,5
<i>indiana</i>	16	13	2,5
<i>morrisoni</i>	8a, 8b	66	13,8
<i>nigeriensis</i>	8b, 8d	16	3,3
<i>isralensis</i>	14	7	1,5
Không ngưng kết		79	16,5

Kết quả phân loại cho thấy có 400 chủng (chiếm 83,5%) phản ứng dương tính với các kháng huyết thanh đã có, còn lại 79 chủng (16,5%) không có phản ứng ngưng kết. Các chủng đã được phân loại thuộc về 13 dưới loài khác nhau, trong đó *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* chiếm ưu thế trong các chủng kiểm tra (27,6%)

3.1.2. Chọn chủng *Bacillus thuringiensis* cho sản xuất

Từ các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập được chúng tôi tiến hành thử hoạt tính trên sâu tơ với nồng độ 10^6 bào tử/ml để đánh giá sơ bộ và lựa chọn các chủng có hoạt tính cao. Năm chủng có hoạt tính diệt sâu cao nhất (H1, H2, X1, X2, D2) được lựa chọn và trình bày trong bảng 4. Sau đó các chủng này được phân loại bằng phương pháp huyết thanh miễn dịch thu được kết quả trong bảng 5.

Bảng 4: Hoạt tính diệt sâu của một số chủng Bt đã tuyển chọn sơ bộ

Chủng thí nghiệm	Tỷ lệ (%) sâu chết sau thời gian (giờ)		
	24	48	72
H1	60	83	100
H2	47	80	100
X1	43	76	97
X2	40	70	94
D2	40	67	90
Đối chứng	0	3	10

Bảng 5: Kết quả xác định typ huyết thanh của một số chủng Bt

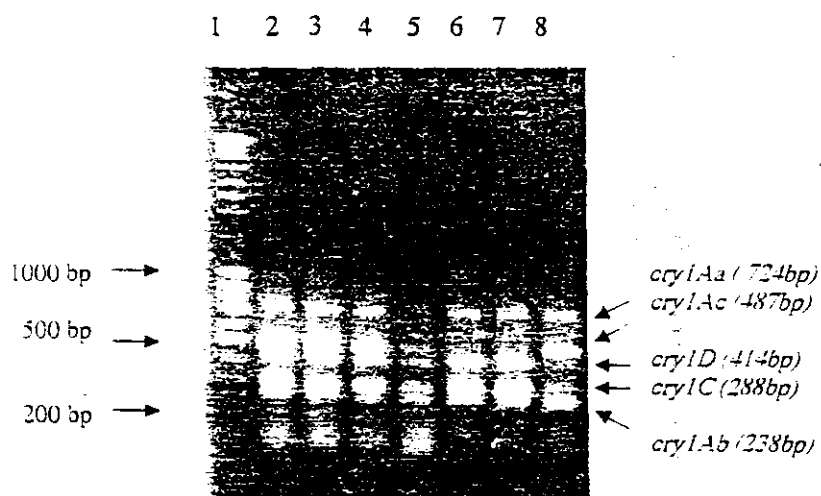
Chủng Bt	Typ huyết thanh	Thủ huyết thanh	Mang độc tố	Hình dáng tinh thể	Côn trùng đích
H1	3	<i>Bt. kurstaki</i>	CryIA. 2B	Lưỡng tháp, Lập phương	L,D
H2	3	<i>Bt. kurstaki</i>	CryIA. 2B	Lưỡng tháp, Lập phương	L,D
D2	6	<i>Bt. entomocidus</i>	CryIA	Lưỡng tháp	L
X1	7	<i>Bt. aizawai</i>	CryIC, CryID	Lập phương	L
X2	7	<i>Bt. aizawai</i>	CryIC, CryID	Lập phương	L

Qua đó chúng tôi đã chọn chủng H1 làm chủng sản xuất

3.2. Thu nhận chủng Bt tái tổ hợp bằng kỹ thuật sinh học phân tử và công nghệ gen

3.2.1. Xác định thành phần gen của một số chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Để xác định thành phần gen trong các chủng *Bacillus thuringiensis* chúng tôi đã sử dụng phương pháp PCR với hỗn hợp mồi (primer) đặc hiệu cho 6 gen thuộc nhóm gen *cryI* (*cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE*). Phản ứng PCR được tiến hành ở điều kiện: 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ khuếch đại (94°C - 1 phút, 52°C - 2 phút, 72°C - 1.5 phút) và kéo dài ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR (3.5μl) được điện di trên gel agarose 1.5%. Bằng phương pháp này chúng tôi đã tách gen của 115 chủng *Bacillus thuringiensis* đã phân lập được. Kết quả được trình bày trong hình 5 và bảng 6.



Hình 5. ảnh điện di trên gel agarose 1,5% các sản phẩm PCR của các chủng Bt
Giếng 1: Marker, các giếng còn lại lần lượt là các chủng: CM5-19, HB7-3, CM2-3,
SP14-3, DH4-26, BB12-6, CS3-1.

Bảng 6. Kết quả tách gen của các chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Nhóm	Gen tách được	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc; cryIC; cryID</i>	8	6,8
2	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc; cryIC;</i>	1	0,9
3	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc;</i> <i>cryIE</i>	3	2,6
4	<i>cryIAa; cryIAb; cryIAc</i>	61	53
5	<i>cryIAa; cryIAb; cryIC; cryID</i>	5	4,3
6	<i>cryIAa; cryIAc</i>	1	0,9
7	<i>cryIAb; cryIAc; cryIC; cryID</i>	3	2,6
8	<i>cryIAb; cryIAc</i>	17	14,8
9	<i>cryIAb</i>	2	1,7
10	<i>cryIC; cryID</i>	1	0,9
11	Không tách được gen nào	13	11,3

Từ bảng 6 đã có thể thấy rằng có 102 chủng *Bacillus thuringiensis* trong tổng số 115 chủng (chiếm 88,7%) đã xác định được thành phần gen trong nhóm gen *cryI*. Tổng số phân đoạn gen tách được từ 102 chủng là 311. Thành phần gen trong các chủng này tương đối đa dạng gồm 11 nhóm khác nhau. Trong đó nhóm 4 có 61 chủng với các gen tách được là *cryIAa; cryIAb; cryIAc* chiếm tỷ lệ cao nhất (53%).

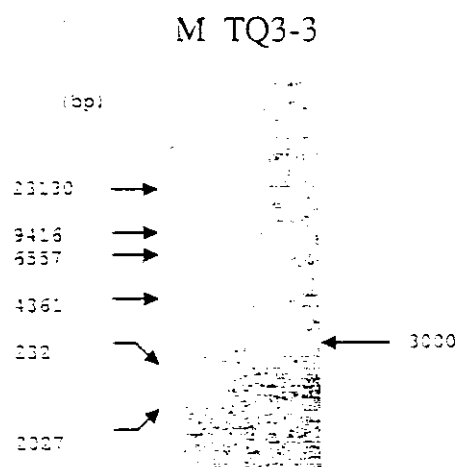
3.2.2. Tách dòng gen *cryIC* từ chủng Bt TQ3-3

Sau khi tách gen, nhận được chủng TQ3-3 mang các gen *cryIAa; cryIAb; cryIC; cryID* dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Cặp mồi vạn năng K5un3 và K3un2 (Bảng 2) được sử dụng để tách đoạn gen 3,0 Kb của chủng TQ3-3 (Hình 6). Sản phẩm PCR tách được của đoạn 3,0 Kb được tinh sạch bằng cách đẩy qua màng thẩm tích Recochip (TaKaRa Co.,) sau khi điện di và được gắn vào vector tách dòng pGEM-T Easy và biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Chủng biến nạp *E. coli* DH5 α được phát hiện bằng cắt với enzym giới hạn với plasmid tái tổ hợp. Một phân trình tự nucleotid (khoảng 500 bp) của dòng số 8 mang đoạn ADN ngoại lai đã được đọc (ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer) và kết quả cho thấy độ tương đồng cao đối với gen *cryICa6* (99%) đã được công bố trong DDPJ Homology Reseach System-Accession No. AF 215647 (Bảng 7).

Bảng 7: Tách dòng và xác định trình tự gen *cryI* của chủng TQ3-3

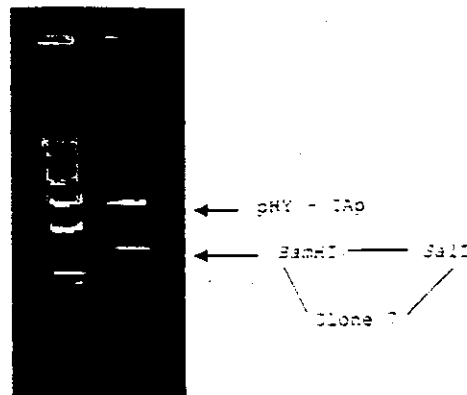
Số dòng gene	Tương đồng gen (%)	Số hiệu của trình tự so sánh
8, 14	<i>cryI</i> Ca6 (99)	AF215647
1, 2	<i>cryI</i> D (97)	X54160.1



Hình 6. Sản phẩm PCR điện di trên gel 0,8%

3.2.3. Biểu hiện gen *cryI* trong *E. coli* DH5α

Cặp mồi *Bam*K5un2 và K3un2 được thiết kế với vùng cắt enzym giới hạn *Bam*HI và *Sa*II để nhân bản *cryI*C từ dòng số 8 của chủng TQ3-3. Đoạn gen (dòng phụ số 7) *cryI*C đã khuếch đại được gắn vào vector pGEM-T Easy và biến nạp vào *E. coli* DH5α. Cặp mồi M4FW (5'-AACAGCATGACCAGT-3') và M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') được dùng để nhân bản đoạn gen *cryI*C với các vùng cắt bằng *Bam*HI và *Sa*II. Đoạn gen *cryI*C được gắn vào vector biểu hiện pHY-Lap với *cryI*Aa promotor và biến nạp vào *E. coli* DH5α. Các chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng cắt với enzym giới hạn *Bam*HI và *Sa*II (Hình 3). Sự biểu hiện protein CryIC trong *E. coli* DH5α được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamid và bằng phản ứng PCR. Hoạt lực diệt sâu khoang (*Spodoptera litura*) của protein tái tổ hợp cao. Tỷ lệ sâu chết là 100% ở nồng độ 10^5 CFU/ml bằng phương pháp nhúng đĩa lá hoặc trên thức ăn nhân tạo.



Hình 7: Biểu hiện gen *cry1C* trong *E. coli* DH5 α

3.2.4. Thu nhận chủng tái tổ hợp

Sau khi đã tách được dòng gen *cry1C* từ chủng TQ3-3 và biểu hiện trong *E. coli* DH5 α ta thu được chủng *E. coli* DH5 α tái tổ hợp có khả năng diệt sâu khoang. Dòng gen này tiếp tục được biến nạp vào chủng VCM2, chủng *Bacillus thuringiensis* VCM 2 là chủng thuộc dưới loài *kurstaki*. Tuy có hoạt tính cao so với các chủng khác nhưng phổ diệt sâu hẹp, không diệt được sâu khoang, sâu xanh vì không mang gen mã hoá độc tố đặc hiệu (protein Cry1C, Cry1D). Bằng các phương pháp tách dòng gen, biến nạp gen và biểu hiện gen, chúng tôi đã thu nhận được chủng *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* VCM 2-8 mang gen *cry1C* có khả năng diệt sâu khoang.

Như vậy chúng tôi đã thu được bộ giống gốc cho sản xuất BT gồm cả chủng *Bacillus thuringiensis* hoang dại và chủng *Bacillus thuringiensis* tái tổ hợp có khả năng diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh

3.3. Tối ưu điều kiện lên men *Bacillus thuringiensis*

3.3.1. Chọn môi trường lên men thích hợp cho chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập

Môi trường nuôi cấy là yếu tố rất quan trọng quyết định năng suất, chất lượng và giá thành của sản phẩm. Trong nỗ lực nâng cao năng suất, chất lượng và hạ giá thành sản phẩm, việc lựa chọn môi trường thích hợp là rất quan trọng để cung cấp dinh dưỡng làm sao cho vi khuẩn vừa sinh trưởng, phát triển và tạo tinh thể nội độc tố tốt vừa tiết kiệm nguyên liệu và thời gian nuôi cấy. Với mỗi chủng giống khác nhau sẽ có môi trường nuôi cấy tối thích khác nhau, tuy nhiên môi trường cần phải đảm bảo các nguồn dinh dưỡng cơ bản là nguồn Cacbon (C), nguồn Nitơ (N), photpho (P), Vitamin và các khoáng chất. Để làm được việc này chúng tôi đã thử nghiệm và đã chọn được môi trường cơ bản tối ưu về các nguồn dinh dưỡng để cho các chủng vi khuẩn có thể phát

triển được. Thành phần của 1 lít môi trường nay bao gồm: Gluco (10g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g), MgCl_2 (0,5g), KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (1g), NaCl (2g), vi lượng (1ml) trong đó thành phần 1 lít vi lượng ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -50mg, CuSO_4 -1mg, FeSO_4 -1mg, CaCl_2 -20mg, MnSO_4 -30mg). Sau đó chúng tôi bổ sung thêm nguồn nguyên liệu rẻ tiền và sẵn có ở Việt Nam nhằm tăng nguồn dinh dưỡng và hạ giá thành môi trường. Nguồn nguyên liệu lựa chọn bổ sung gồm: bột đậu tương, bột cá, bột ngô, cám gạo, bột sắn, khô lạc với tỷ lệ 30 gam cho mỗi lít môi trường cơ bản. Lên men chủng H1 trên môi trường cơ bản và các môi trường bổ sung trên máy lắc ở điều kiện: pH=7, tốc độ lắc 250 vòng/phút, $t^\circ=30^\circ\text{C}$, sau 72 giờ nuôi cấy thu được kết quả sau (bảng 8)

Bảng 8. Kết quả lên men chủng H1 trên một số môi trường

Môi trường	pH	OD (650nm)	Tinh thể	Nồng độ bào tử (bào tử/ml)
Cơ bản	7,2	1,74	++	$9,1 \cdot 10^7$
Khô lạc	6,2	1,98	+	$6,3 \cdot 10^5$
Bột cá	6,6	1,84	+	$8,32 \cdot 10^5$
Bột đậu tương	7,5	1,32	++++	$8,75 \cdot 10^{10}$
Bột ngô	6,4	1,52	++	$7,6 \cdot 10^7$
Cám gạo	6,5	1,76	+	$1,8 \cdot 10^6$
Bột sắn	7,0	1,41	++	$6,5 \cdot 10^8$

Từ kết quả trên chúng ta thấy chủng H1 có thể sinh trưởng được trên tất cả các môi trường. Tuy nhiên chỉ có môi trường bổ sung bột đậu tương là thích hợp cho việc tổng hợp tinh thể độc.

Qua quá trình chọn lựa này chúng tôi đã chọn được môi trường có bổ sung bột đậu tương là thích hợp cho lên men chủng H1 ở quy mô lớn hơn. Môi trường này được chọn cho sản xuất chế phẩm BT trên hệ thống nuôi cấy chìm BIOFLO III dung tích 80 lít (New Brunswick, Mỹ). Kết quả được thống kê ở bảng 9.

Bảng 9. Kết quả sản xuất *Bacillus thuringiensis* H1 trên hệ thống lên men chìm

Mê lên men	Sinh trưởng (OD sau 18h)	pH sau LM	Sự hình thành tinh thể sau 72 h	Nồng độ bào tử (Bào tử/ ml)
1	1,35	7,8	+++	$6,1 \cdot 10^9$
2	1,47	8,0	+++	$6,6 \cdot 10^9$
3	1,30	7,4	+++	$5,9 \cdot 10^9$

3.3.2. Chọn môi trường dinh dưỡng thích hợp cho chủng *Bacillus thuringiensis* tái tổ hợp để sản xuất chế phẩm Bt

Như chúng ta đều biết, mỗi một chủng Bt đều cần một nhu cầu dinh dưỡng khác nhau, nhất là các chủng tái tổ hợp. Môi trường cần phải bảo đảm các nguồn cacbon (C), nguồn nitơ (N), photpho (P), vitamin và các chất khoáng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển. Để làm được việc này chúng tôi chọn môi trường cơ bản với thành phần dinh dưỡng như đã nêu để bổ sung các nguồn nguyên liệu giá thấp, sẵn có ở Việt Nam nhằm đảm bảo cho chủng Bt sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể cao. Nguồn nguyên liệu dùng để bổ sung gồm: Bột đậu tương, bột cá, bột ngô, cám gạo, bột sắn, bột khô lạc với tỷ lệ 30 gam/lít. Lên men chủng Bt VCM 2-8 trên môi trường cơ bản và các môi trường bổ sung trên máy lắc tròn ở điều kiện thống nhất: tốc độ 250 vòng/phút, pH = 7,0, t° = 30 ± 1, sau 72 giờ lên men, thu được kết quả như sau (Bảng 10):

Bảng 10. Kết quả lên men chủng Bt VCM 2-8 trên một số môi trường

Môi trường	OD sau 18h	pH sau LM	Sự hình thành tinh thể sau 72 h	Nồng độ bào tử (Bào tử/ ml)
Cơ bản	1,85	8,2	+++	$9,16 \cdot 10^7$
Bột đậu tương	1,88	8,5	++++	$8,50 \cdot 10^9$
Khô lạc	1,98	7,2	++	$6,35 \cdot 10^6$
Bột ngô	1,80	8,4	++	$3,66 \cdot 10^7$
Cám gạo	1,76	7,7	++	$1,88 \cdot 10^6$
Bột sắn	1,41	8,0	+	$5,67 \cdot 10^5$
Bột cá	1,84	7,6	++	$8,32 \cdot 10^6$

Từ kết quả trên có thể thấy chủng VCM 2-8 có thể sinh trưởng tốt trên tất cả các môi trường (thể hiện ở đo OD sau 18 h lên men). Tuy nhiên môi trường bổ sung bột đậu tương là thích hợp cho sinh tinh thể và bào tử. Môi trường này được chọn cho sản xuất chế phẩm BT trên nổi lên men 80 lít của hệ thống lên men New Brunswick. Kết quả được thống kê ở bảng 11.

Bảng 11. Kết quả sản xuất BT trên hệ thống lên men chìm

Mẻ lên men	Sinh trưởng (OD sau 18h)	pH sau LM	Sự hình thành tinh thể sau 72 h	Nồng độ bào tử (Bào tử/ ml)
1	1.90	8.2	+++	$5.10 \cdot 10^9$
2	1.85	8.5	+++	$6.50 \cdot 10^9$
3	1.98	8.2	+++	$2.55 \cdot 10^9$

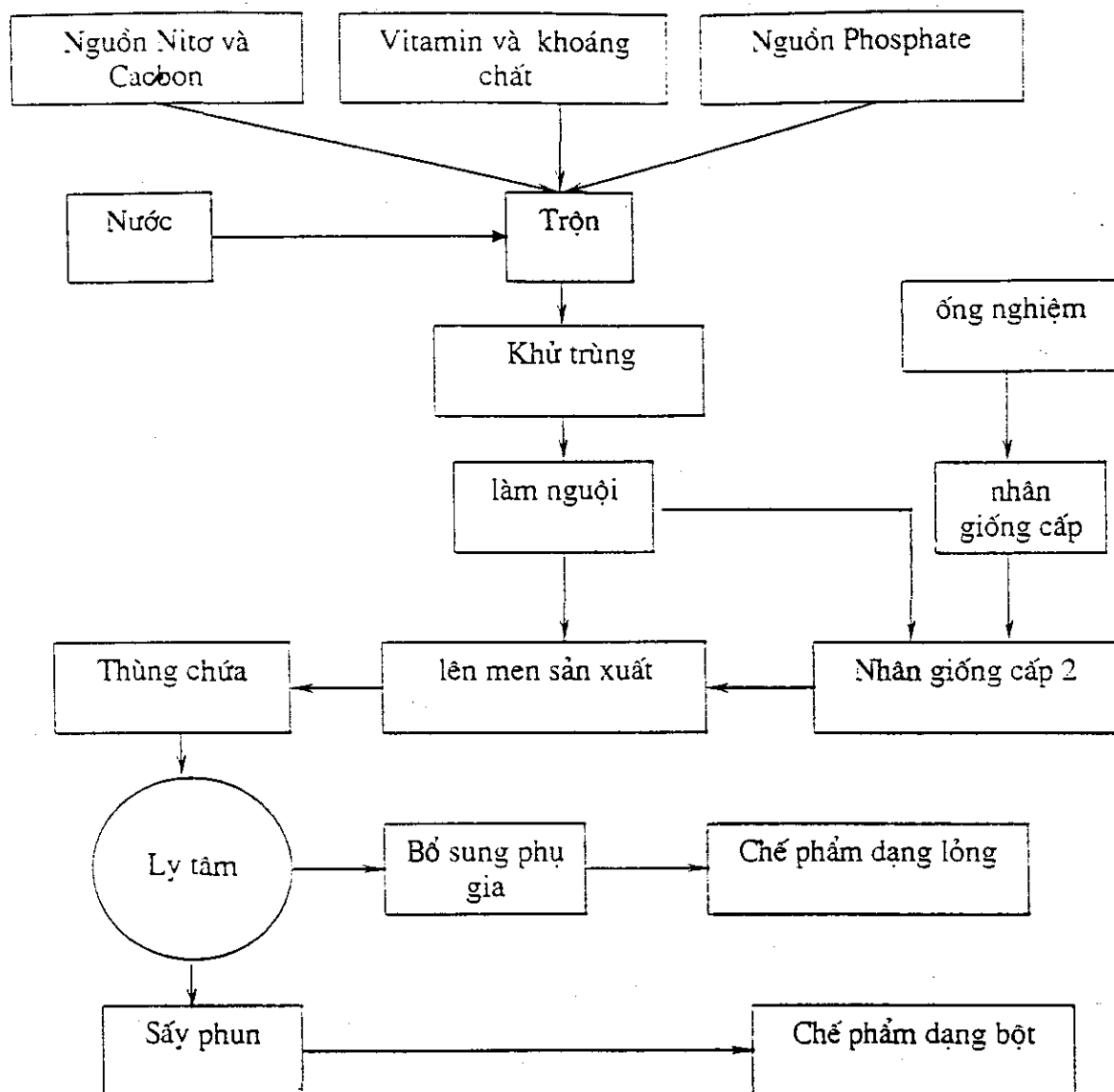
Từ bảng 11 có thể thấy môi trường đã chọn là thích hợp cho chủng *Bacillus thuringiensis* VCM 2-8 sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể. Sự hình thành bào tử, tinh thể là khá ổn định trong các mẻ lên men. Từ kết quả này, môi trường có bổ sung bột đậu tương được chọn cho chủng Bt VCM 2-8 để sản xuất, thành phần cụ thể của môi trường này như sau: Gluco 10 g, Bột đậu tương 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, MgCl_2 0,5 g, KH_2PO_4 1g, K_2HPO_4 0,68 g, NaCl 2 g, Cao nấm men 3 g, vi lượng ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 50 mg, CuSO_4 — 1 mg, FeSO_4 — 1mg, CaCl_2 — 20 mg, MnSO_4 — 30 mg)/1lít.

3.4. Nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm BT

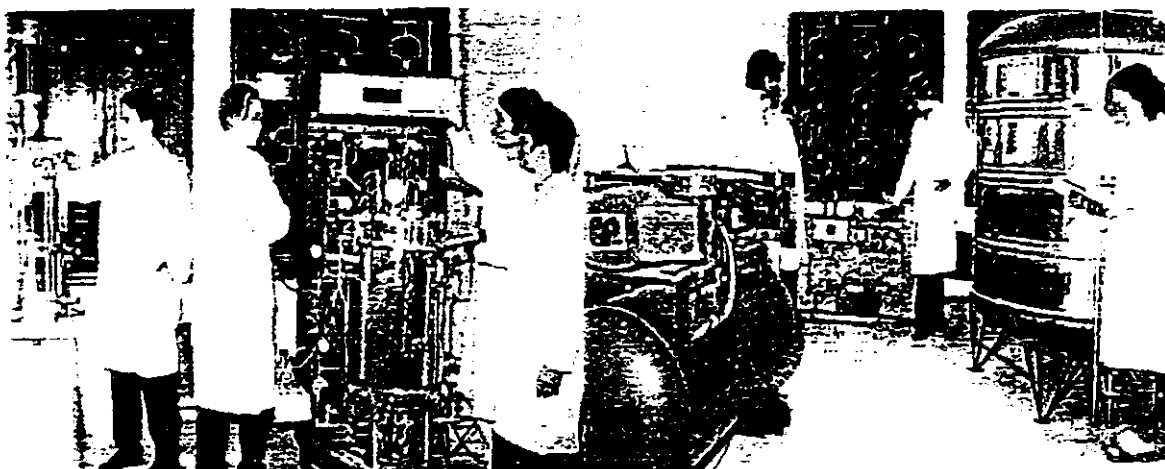
3.4.1. Hoàn thiện quy trình lên men

Quá trình lên men Bt có thể tóm tắt như sau: Môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị, khử trùng, làm nguội. Chủng giống Bt sạch phát triển tốt trên môi trường nhân giống cấp I, cấp II rồi được chuyển sang nổi lên men. Quá trình lên men được thực hiện ở 30°C, pH môi trường được giữ trong khoảng 6,5-7,5 và được điều chỉnh tự động bằng kiềm (NaOH hoặc NH_4OH) hoặc bằng a xít (H_2SO_4). Do môi trường giàu protein và cần thông khí, khuấy trộn nên bột tạo nhiều làm giảm thể tích sử dụng của bình lên men cho nên cần phải sử dụng chất chống bọt, chống bọt được điều chỉnh tự động bằng bổ sung các chất chống bọt hữu cơ như silicon hoặc polypropylen glycol, dầu đậu tương, dầu lạc. Ô xy hoà tan: tùy vào từng giai đoạn phát triển của chủng mà điều chỉnh phối hợp giữa tỷ lệ thông khí, tốc độ khuấy và áp suất. Quá trình lên men được kết thúc khi mật độ bào tử và tinh thể đạt cực đại. Kiểm tra sự sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp protein tinh thể bằng kính hiển vi quang học, bằng các phương pháp sinh học và sinh hoá. Tùy vào bản chất của giống, môi trường thức ăn, các điều kiện phát triển khác, quá trình lên men thường kết thúc từ 54-60 giờ.

Trong quá trình sản xuất chế phẩm Bt, để đảm bảo chất lượng cao của chế phẩm và tránh hiện tượng nhiễm phage chúng tôi thực hiện chế độ luân chuyển và kết hợp chủng giống.



Hình 8. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất thuốc trừ sâu BT



Hình 9. Hệ thống lên men 80 lít của New Brunswick

3.4.2. Hoàn thiện quy trình tạo chế phẩm

Dịch lên men được thu hồi và bảo quản lạnh (4°C) để hạn chế việc mất hoạt tính của chế phẩm dưới tác động của môi trường. Chế phẩm được thiết lập công thức dưới hai dạng: dạng sữa và dạng bột thấm ướt.

Chế phẩm dạng sữa được tạo ra bằng cách li tâm nhẹ gạn bớt dịch nổi, động tác này nhằm mục đích nâng cao mật độ bào tử và tinh thể sao cho hoạt tính của chế phẩm đạt 4000-8000 đơn vị/ml. Sau đó bổ sung thêm các chất phụ gia (bảng 7). Chế phẩm dạng sữa dễ làm, nhưng hoạt tính tương đối thấp, khó bảo quản và vận chuyển.

Hạn chế những nhược điểm của chế phẩm dạng sữa, chúng tôi tạo chế phẩm bột thấm ướt. Dịch lên men được li tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ dịch nổi thu cạn. Cặn sau li tâm được đưa vào các sấy phun. Bột khô được bổ sung các chất phụ gia (bảng 12), tạo ra chế phẩm bột thấm ướt có hoạt tính 16000 đơn vị/mg khi kiểm tra LC_{50} so với chế phẩm chuẩn quốc tế.

Bảng 12. Một số chất phụ gia bổ sung vào chế phẩm

Loại hình	Tên gọi	Tác dụng	Tỷ lệ (g/l)
Chất hấp phụ	Bột tan	Hấp phụ các bào tử và hoạt chất	50
Chất phòng thối	NaCl	Phòng trừ bào tử nảy mầm, nhiễm vi sinh vật và thể thực khuẩn	2
Chất kết dính	Dầu thực vật	Hình thành các giọt sương nhỏ li ti chống sự xói mòn của mưa gió, làm cho thuốc bám trên bề mặt lá dễ hơn	5
Chất dẫn dụ	Đường, mật	Dẫn dụ côn trùng bắt mồi	6
Chất nhũ hoá	Tween 60	Liên kết pha dầu và pha nước trong chế phẩm để chúng phân tán nhũ hoá	3
Chất tăng hiệu ứng	K_2CO_3 , Na_2CO_3	Tăng khả năng hoà tan ion kim loại hoá trị 2 của tinh thể giúp cho hoạt tính của enzym thủy phân protit, làm thúc đẩy tác dụng kích hoạt đối với protein trừ sâu.	0,5
Hoá chất hỗ trợ	Thuốc trừ sâu hoá học Arrivod 10EC	Giảm lượng thuốc dùng, hiệp đồng với thuốc để tăng khả năng trừ sâu hại, giảm sự phát sinh kháng thuốc	0,03 %

Chúng tôi đã tạo được hai công thức chế phẩm BT dạng sữa và dạng bột: BioBact EC28, BioBact WP28

3.5. Đánh giá hiệu quả diệt sâu của chế phẩm BT

3.5.1. Đánh giá hiệu quả diệt sâu của chế phẩm trong phòng thí nghiệm



Hình 10: Hoạt tính diệt sâu trong phòng thí nghiệm của chế phẩm BT

Bảng 13: kết quả diệt sâu tơ của hai chế phẩm BioBact EC28 và BioBact WP28

Chế phẩm	Tỷ lệ sâu chết (%) qua thời gian (giờ)					
	10 ⁵ bào tử/ml dịch thử			10 ⁷ bào tử/ml dịch thử		
	24	48	72	24	48	72
BioBact EC28	41,11	54,81	92,96	63,33	100	
BioBact WP28	37,55	68,9	87,65	48,67	75,8	94,4

Như vậy cả hai chế phẩm đều có khả năng diệt sâu tương đối cao, tuy nhiên chế phẩm BioBact EC28 diệt sâu cao hơn. Để tăng hiệu quả diệt sâu khi sử dụng, có thể tăng nồng độ bào tử lên 10⁸-10⁹/ml.

3.5.2. Thử nghiệm chế phẩm BT trên đồng ruộng

Các chế phẩm chúng tôi sản xuất đã được đem thử nghiệm tại một số địa phương: Tiền Phong-Mê Linh- Vĩnh Phúc, Văn Lâm- Hà Nội. Văn Tảo-Thường Tín- Hà Tây.

Chế phẩm được thử nghiệm và đánh giá hiệu quả theo điểm trên 3 sào rau bắp cải tại xã Văn Tảo- Hà Tây, thử nghiệm chế phẩm ở cả hai dạng (dạng sữa và dạng bột thấm ướt). Tiến hành thử nghiệm chế phẩm BT trong cả vụ rau, khi nào sâu bắt đầu xuất hiện và gây hại thì tiến hành phun thuốc. Liều lượng phun thuốc phụ thuộc vào tuổi của rau, mức độ phá hại của sâu hại. Phun thuốc vào buổi chiều mát, tránh trời mưa. Cần điều tra sâu trước khi phun và điều tra 1, 2, 3, 5 ngày sau khi phun. Điều tra cả 15 m² đối chứng không sử dụng thuốc và 1 sào đối chứng sử dụng thuốc hoá học.

Kiểm tra số lượng sâu sống qua mỗi lần điều tra và tính hiệu quả diệt sâu theo công thức Henderson Tilton (1995):

$$E (\%) = 100 * [1 - (T_s * C_b) / T_b * C_s]$$

Trong đó: E. Hiệu quả

C_s. Sâu sống ở ruộng đối chứng sau khi phun

C_b. Sâu sống ở ruộng đối chứng trước khi phun

T_s. Sâu sống ở ruộng thí nghiệm sau khi phun

T_b. Sâu sống ở ruộng thí nghiệm trước khi phun

Kết quả thử nghiệm thu được như sau (Hình 11, bảng 14)



Hình 11: Thử nghiệm chế phẩm BT trên ruộng bắp cải tại xã Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây

Bảng 14: Hiệu quả diệt sâu trên đồng ruộng của chế phẩm BT

Thời gian sau khi phun thuốc (ngày)	Hiệu quả diệt sâu (%)		
	BioBactEC	BioBactWP28	Arrivod
1	42,2	42,8	58,7
2	68,4	70,2	72,6
3	80,6	82,5	77,4
5	85,5	87,8	79,3

3.6. Xây dựng mô hình ứng dụng các chế phẩm sinh học trên đồng ruộng

Sau khi xác định được hiệu quả diệt sâu của các chế phẩm, chúng tôi đã xây dựng mô hình trình diễn ứng dụng các chế phẩm BT để trừ sâu trên rau tại Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây. Mô hình được thực hiện tập trung trong 3ha trồng rau, diện tích

nay hoàn toàn không sử dụng một loại thuốc trừ sâu nào khác. Các chế phẩm được sử dụng liên tục từ khi trồng cây, liều lượng tăng dần khi cây lớn.

Trước khi trồng cây, đất được xử lý bằng chế phẩm kháng sinh thô Genß để chống bệnh thối nhũn thân rễ. Kết quả cho thấy (kết quả không được thống kê cụ thể) rau phát triển rất tốt, hầu như không bị bệnh thối nhũn rễ, một bệnh diễn ra rất nặng một năm trước đó (năm 2001) đã làm thiệt hại lớn cho các hộ nông dân này. Hơn nữa ở các công thức phun thuốc trừ sâu bệnh sinh học còn cho thấy cây cải phát triển tốt hơn, xanh mượt hơn so với đối chứng, vì trong chế phẩm ngoài protein tinh thể diệt còn trùng còn có các chất kích thích tăng trưởng, các chất khoáng như là loại phân bón lá cho cây. Một điều đặc biệt nữa là cũng tại những ruộng thí nghiệm tỷ lệ cây do bộ nhầy chích hút giảm hẳn so với đối chứng.

Từ những kết quả về phương pháp áp dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng trên vùng trồng rau Vân Tảo, chúng tôi thấy mô hình này cần được hoàn thiện thêm và nhân rộng ra cho nhiều hộ và nhóm hộ nông dân.

Về hoàn thiện chế phẩm trừ sâu sinh học đa chức năng bao gồm:

- Chế phẩm BT như BioBact WP và BioBact WP28 phòng chống các loại sâu tơ, sâu khoang, sâu keo da láng và các loại sâu thuộc Lepidoptera.
- Chế phẩm Genß để phòng chống các bệnh thối nhũn thân, rễ và bệnh héo xanh và kích thích tăng trưởng cho cây trồng.

Trong quá trình thử nghiệm mô hình ứng dụng, kết hợp song song với việc áp dụng chế phẩm tại các hộ nông dân, chúng tôi đã tập huấn cho các gia đình này cách sử dụng các chế phẩm dạng bột thấm ướt, dạng dịch thể, các chế phẩm bón cho đất phòng bệnh từ đất, chế phẩm bón lá, cách phun và thực hiện cách điều tra sâu bệnh cũng như phòng trừ sâu bệnh.

3.7. Kết quả sản xuất các dạng chế phẩm BT

Kể từ khi bắt đầu tiến hành nghiên cứu đề tài cho đến nay đã sản xuất được chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học với sản lượng và chất lượng theo yêu cầu. Chế phẩm trừ sâu sinh học BioBact S dạng sữa đạt 8000 UI/ml (đơn vị hoạt lực) Chế phẩm trừ sâu sinh học BioBact WP dạng bột thấm ướt hoạt lực đạt 16000 UI/mg bột thấm nước, cụ thể như sau:

- Sản xuất chế phẩm BioBact S dạng sữa: 800 lít
- Sản xuất chế phẩm BioBact WP dạng bột thấm ướt: 500 Kg

3.8. Hạch toán giá thành sản phẩm (chỉ tạm tính)

BioBact S dạng sữa: 50000đ/lít

BioBact WP: 200000đ/kg

Genß thô: 15 000đ/kg

Genß dạng dịch 7 500đ/lít

3.9. Đào tạo

- 1 học viên cao học đã bảo vệ luận văn thạc sĩ.
- 2 học viên cao học đang làm luận văn thạc sĩ.
- 7 sinh viên đã bảo vệ xuất sắc khoá luận tốt nghiệp đại học, trong đó có một sinh viên nước ngoài.
- 3 sinh viên đang làm khoá luận tốt nghiệp.

3.10. Hội nghị khoa học và các bài báo khoa học

Cùng với nhóm Bt viện Công nghiệp Thực phẩm và Viện Công nghệ sau thu hoạch đã đồng tổ chức thành công “Hội nghị Công nghệ Sinh học Khu vực Thái Bình Dương lần thứ năm về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường” tại Hà Nội, từ 17-21 tháng 11 năm 2003. Hội nghị đã thu hút 170 đại biểu tham dự, trong đó có hơn 70 đại biểu đến từ 20 nước trên thế giới với 60 báo cáo khoa học hết sức có giá trị đối với sự nghiên cứu và phát triển thuốc trừ sâu sinh học Bt của Việt Nam.

- Đã tham gia hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc lần thứ hai tại Hà Nội 16-17 tháng 12 năm 2003.
- Đã tham gia Hội nghị Khoa học Cơ bản lần thứ ba tại Huế 25-16 tháng 7 năm 2003.
- Đã tham gia hội nghị Công nghệ sinh học của *Bacillus thuringiensis* và tác động của nó với môi trường Khu vực Thái Bình Dương lần thứ tư tại Canberra, Australia.
- Tham gia hội nghị khoa học do trung tâm chuyển giao công nghệ châu á Thái Bình Dương (APCCT) tổ chức tại Hà Nội, năm 2002
- Đã đăng 8 bài báo trong và ngoài nước, trong đó 6 bài báo bằng tiếng Anh, 2 bài bằng tiếng Việt:

1. Ngô Đình Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn ánh Nguyệt, Nguyễn Xuân Cảnh, Vi Thị Đoàn Chính, Nguyễn Hoài Trâm, Nguyễn Văn Tuất. 2003. Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein cryIC diệt sâu khoang từ *Bacillus thuringiensis* subsp.

aizawai. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ 2. nxb Khoa học và Kỹ thuật, Tr. 830-833.

2. Ngo Dinh Binh¹, Shinichiro Asano, Hisanori Bando and Toshihiko Iizuka (2003). Identification of *cryI*-type genes of *B. thuringiensis* isolated from Vietnam. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 4th Pacific Rim Conference. Edited by R. J. Akhurst, C.E. Beard and P.A. Hughes. 142-146.
3. Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Thị ánh Nguyệt, Phạm Minh Hương, Nguyễn Văn Tuất và Ngô Đình Bình. 2003. Một số kết quả nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* trong điều kiện Việt Nam. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc lần II*. nxb Khoa học và Kỹ thuật, Tr. 178 — 183.
4. Kwang Yong Lee, Hyuk Han Kwon, Eun Young Kang, Min Jung Lee, Eui Na Kim, Dong Wan Chu, Soo Il Park, Dinh Binh Ngo, and Hyung Hoan Lee. 2003. Characteristics of Six New *Bacillus thuringiensis* Serovarieties: *B. thuringiensis* serovar. *coreanensis*, *leesis*, *konkukian*, *seoulensis*, *sooncheon*, and *yosoo*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (In press).
5. Ngo Dinh Binh. 2003. The research and development of *Bacillus thuringiensis* Biotechnology in Vietnam. In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, Ray J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
6. Nguyen Xuan Canh, Ngo Dinh Binh, Nguyen Thi Anh Nguyet, Nguyen Quynh Chau, Pham Minh Hương. 2003. Insecticide and efficacy of BT preparations in field. In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, Ray J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
7. Ngo Dinh Binh, Nguyen Thi Anh Nguyet, Nguyen Quynh Chau, Nguyen Xuan Canh, Pham Minh Hương, Julien Herrou. 2003. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soil of Vietnam. In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, Ray J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).
8. Nguyen Thi Anh Nguyet, Julien Herrou, Nguyen Quynh Chau, Nguyen Xuan Canh, Pham Minh Hương, Ngo Dinh Binh. 2003. Identification and characterisation of

Bacillus thuringiensis isolated from different areas in Vietnam - Identification of *cryIAa* gene. In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact*. Proceedings of the 5th Pacific Rim Conference. Edited by Ngo Dinh Binh, Ray J. Akhurst, Donald H. Dean (in press).

3.11. Các hoạt động khoa học khác

- Chế phẩm BioBact WP (hoạt tính 16000 IU/mg) đã tham gia “Hội chợ công nghệ và thiết bị Việt Nam 2003”.
- Chế phẩm BioBact WP (hoạt tính 16 000 IU/mg) đã tham dự triển lãm tại Malaixia
- Chế phẩm BioBact WP (hoạt tính 16 000 IU/mg) đã tham dự triển lãm tại Bảo tàng Hồ Chí Minh.
- Chuyển giao quy trình công nghệ sản xuất BT cho Liên hiệp Khoa học - Sản xuất Công nghệ Hoá học

3.12. Kinh phí

Tổng kinh phí: 177 triệu đồng

- Năm 2001: 35 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2002: 65 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2003: 65 (đã cấp và đã quyết toán)
- Năm 2004: 12 (Chưa cấp)

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong khuôn khổ đề tài chúng tôi đã hoàn thành được các nhiệm vụ sau:

1. Đã phân lập được 594 chủng *Bacillus thuringiensis* từ 429 mẫu đất, lá, còn trùng thu thập từ 24 tỉnh, thành phố ở Việt Nam.
2. Bằng phương pháp huyết thanh miễn dịch đã phân loại tới dưới loài cho 479 *Bacillus thuringiensis*.
3. Đã phát hiện được 311 gen *cryI* bằng kỹ thuật PCR từ 102 chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập ở Việt Nam.
4. Tách được dòng và tổng hợp chuỗi 9 gen từ 3 chủng có hoạt tính diệt sâu cao.
5. Tách dòng gen mã hoá protein Cry1C diệt sâu khoang của chủng Bt TQ3-3.
6. Biểu hiện gen mã hoá protein Cry1C trong *E. coli* DH5 α .
7. Đã chọn được 2 chủng Bt có hoạt tính cao, phổ diệt sâu rộng, bằng phương pháp chuyển gen *cryI* C vào chủng sản xuất trong đó chủng VCM2-8 đã được đưa vào sản xuất.
8. Chọn được điều kiện lên men thích hợp cho các chủng sản xuất
9. Đã sản xuất được 800lít chế phẩm dạng dịch và 500kg:chế phẩm bột.
10. Đã thử nghiệm hoạt tính diệt sâu của chế phẩm trong phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng, kết quả cho thấy các chế phẩm có khả năng diệt 60-90% số lượng sâu thử nghiệm.
11. Đã xây dựng mô hình trình diễn ứng dụng các chế phẩm BT để trừ sâu trên rau tại Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây.
12. Đã tham gia đào tạo 1 học viên cao học, 7 sinh viên; đang đào tạo 2 học viên cao học và 3 sinh viên; công bố được 8 bài báo.
13. Tổ chức và tham gia “Hội nghị Công nghệ Sinh học Khu vực Thái Bình Dương lần thứ năm về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* diệt sâu và tác động của nó tới môi trường”.
14. Đã tham gia hai Hội nghị quốc tế về *Bacillus thuringiensis*, một số Hội nghị và triển lãm có liên quan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Công Bình, Phạm Bá Nha, Ngô Đình Quang Bính, Lê Xuân Thiên, Lê Chiến Phương, Trần Lan Hương. 1987. *Hiệu lực diệt sâu của chế phẩm B. thuringiensis sản xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm*. Báo cáo nghiên cứu khoa học, trang 228 — 236.
2. Ngô Đình Quang Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Văn Thường. 1999. *Sản xuất chế phẩm sinh học diệt sâu B. thuringiensis trên hệ thống lên men chìm*. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Hà Nội 1999.
3. Ngô Đình Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Văn Thường, *et al.*, 2000. Nghiên cứu sự phân bố và đa dạng sinh học của *Bacillus thuringiensis* phân lập từ một số tỉnh ở Việt Nam. Trong “*Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học*”, Báo cáo khoa học hội nghị sinh học quốc gia. 484-488.
4. Ngô Đình Quang Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn ánh Nguyệt. 2002. *Thu nhận huyết thanh miễn dịch cho phân loại B. thuringiensis*. Kỷ yếu 2001-2002, Viện Công nghệ Sinh học, 296-302.
5. Ngô Đình Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn ánh Nguyệt, *et al.*, 2003. Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein cry1C diệt sâu khoang từ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Báo cáo khoa học hội nghị toàn quốc lần thứ 2. 830-833.
6. Nguyễn Công Thuật. 1996. *Phòng trừ tổng hợp sâu bệnh hại cây trồng nghiên cứu và ứng dụng*. Nhà xuất bản nông nghiệp.
7. Amos Navon. 1993. *Control of Lepidopteran Pests with Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide, page 125-146.
8. Asano, S. 1996. Identification of cry gene from *Bacillus thuringiensis* by PCR and isolation of unique insecticidal bacteria. *Memories Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 19: 529-563.
9. Ngô Đình Bính, Shinichiro Asano, Hisanori Bando and Toshihiko Iizuka. 2002. Identification of *cry1* genes of *Bacillus thuringiensis* isolated from Vietnam. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis and Its Environmental Impact, Proceeding of the 4th Pacific Rim Conference*. 142-146.
10. Chilcott C.N. and Wigley P.J. 1993. *Isolation and toxicity of Bacillus thuringiensis from soil and insect habitats in New Zealand* J. Invertebr. Pathol. 61, p 244-247.
11. de Barjac, H. and Frachon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35, 233-240.
12. K. Bernhard and R. Utz. 1993. *Production of Bacillus thuringiensis Insecticides for Experimental and Commercial Uses*. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide, page 255-267.

13. O.N. Morris, P. Karagaratnam, V. Converse. 1997. *Suitability of 30 Agricultural Products and By-Products as Nutrient Sources for laboratory Production of Bacillus thuringiensis subsp. aizawai (HD 133)*. Journal of Invertebrate Pathology 70, page 113-120.
14. Thiery and E. Frachon. 1997. *Identification, isolation, culture and preservation entomopathogenic bacteria*. Biotechniques Manual of Technology in insect Pathology. A academic press 55-57.
15. H.S. Salama, M.S. Foda, H.T. Dulmage, A. El-Sharaby. 1981. *Novel Fermentation Media for Production of δ -Endotoxins from Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 41, page 8-19.
16. Takashi Yamamoto and Gary K. Powell. 1993. *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: Recent Advances in Understanding Its Insecticidal Activity. *Advanced Engineered Pesticides*. Edited by Leo Kim. Marcel Dekker, Inc., NY. 3-42.
17. www.biols.susx.ac.uk/home/Neil-crickmore/bt/toxin

Hà Nội, 27-9-2004

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI NHÁNH



PGS.TS Ngô Đình Bính

PHIẾU BÁO CÁO

Sản phẩm đề tài KC04-12 đã ứng dụng tại địa phương

Tên đề tài nhánh “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng bộ giống gốc *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao trừ sâu hại cây ‘rồng’”

STT	Chủ trì	Số lượng sản phẩm đã triển khai ứng dụng (Kg, Lít)	Địa điểm và thời gian ứng dụng	Có giấy chứng nhận địa phương hay không	Hiệu quả (%)	Sản phẩm đã sản xuất nhưng chưa sử dụng	Số sản phẩm sẽ sản xuất còn thiếu so với hợp đồng	Dự kiến thời gian triển khai (hoặc nộp cho đề tài)	Ghi chú
1	PGS. TS Ngô Đình Bính	20 Kg + 100 L	¹ Văn Đức, Gia Lâm, Hà Nội ² Vân Tảo, Thường Tín, Hà Tây	¹ Không ² Có	Từ 67% đến 90%	0	0	-	
2		175 Kg + 335 L	² Gia Xuyên, Gia Lộc, Hải Dương			0	0	-	
3		150 Kg + 310 L				0	0	-	

Hà Nội, ngày 20 tháng 9 năm 2004

Chủ trì đề tài



Ngô Đình Bính

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

GIẤY CHỨNG NHẬN

Tên tôi là: Bùi Văn Nhị

Trú tại: Thôn Đông Thai, xã Văn Tảo, Thường Tín, Hà Tây.

Trong các năm từ 2002-2004, tôi có nhận của anh Nguyễn Xuân Cảnh, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam các chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học với số lượng như sau:

Năm	Loại chế phẩm		
	BioBact EC28 (lít)	BioBact WP28 (kg)	Gen β (kg)
2002	70	15	5
2003	250	125	20
2004	150	100	25

Số chế phẩm này đã được gia đình tôi cùng một số gia đình khác trong xã thử nghiệm trên đồng ruộng (trồng rau) với tổng diện tích là: sào/vụ.

Liều lượng sử dụng các chế phẩm này như sau:

- BioBact EC28: 300ml/sào/lần phun
- BioBact WP28: 50gam/sào/lần phun

Sau thời gian thử nghiệm chúng tôi nhận thấy rằng các chế phẩm sinh học đã sử dụng có khả năng trừ một số loại sâu hại trên rau màu như sâu xanh, sâu khoang và đặc biệt là sâu tơ. Khả năng diệt sâu của các loại chế phẩm này đạt 70-90%, tương đương với thuốc trừ sâu hoá học Cymerin 5EC.

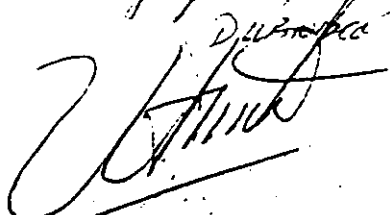
Riêng đối với chế phẩm Gen β có khả năng phòng chống bệnh thối cổ rễ, thân trên các loại cải và bệnh héo xanh trên cà chua.

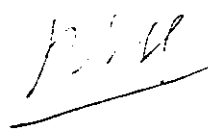
Xác nhận của UBND xã Văn Tảo

Người làm giấy

UBND xã Văn Tảo.
Xác nhận của Ban lãnh đạo xã.
Ký tên:

Ngày 16/2/2004





Bùi Văn Nhị

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



BÁO CÁO SƠ BỘ KẾT QUẢ ỨNG DỤNG
THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC BT - VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC -
TRUNG TÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Mô hình ứng dụng chế phẩm công nghệ vi sinh vật để cải tạo đất và xây dựng mô hình nông nghiệp sinh thái bền vững cho vùng chuyên canh rau được triển khai tại Hải Dương từ tháng 4 năm 2004 đến tháng 12 năm 2006.

Chi cục BVTV Hải Dương là một thành viên tham gia đề tài tại cơ sở. ở mô hình này chúng tôi đã áp dụng chế phẩm sinh học thuốc trừ sâu BT của Viện được vụ 1 (trên cây dưa hấu) và vụ 2 đang thực hiện (trên cây rau bắp cải).

Tổng lượng thuốc dự kiến cho tương trình 110Kg thuốc bột và 460 lít dịch thể. hiện chương trình đã đưa xuống cơ sở là: 50Kg thuốc bột và 160 lít dịch thể.

Sơ bộ đánh giá kết quả ban đầu đạt yêu cầu.

Khi kết thúc chương trình chúng tôi sẽ có báo cáo kết quả cụ thể.

Hải Dương, ngày 15 tháng 9 năm 2004

Cán bộ phụ trách mô hình

Nguyễn Thị Hồng Nhi

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI KC. 04. 12 QUÍ IV - NĂM 2002

Tên đề tài: "*Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng CNSH*"

Cơ quan thực hiện đề tài nhánh: VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

Tên đề tài nhánh: *Sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học Bacillus thuringiensis hoạt lực cao diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp.*

I. Triển khai sản xuất lên men trên thiết bị 500 lít ở Xưởng Thực nghiệm Viện Công nghiệp Thực phẩm

1. Kết quả lên men đợt đầu tiên:

- Đã thu được 250 lít dịch chứa dịch bào tử và tinh thể, thời gian 38 giờ, mật độ: 8.7×10^8 BT/ ml, trong suốt đợt lên men do thời tiết lạnh nên đã khống chế được nhiệt độ 30 - 31°C, đã đảm bảo được nhiệt độ thích hợp cho quá trình sinh trưởng của Bt. Dịch sau lên men được bơm sang thùng chứa inox dung tích chứa 350 lít, bước đầu nghiên cứu phương pháp lắng cặn ở qui mô sản xuất lớn

- Dịch sau lên men đã nghiên cứu áp dụng phương pháp lắng gạn có bổ sung chất đông tụ để thu bào tử tinh thể protein diệt sâu

- + Nhiệt độ lắng cặn: 12 - 14°C (phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường)
- + Chất đông tụ: 6,0 g/l.
- + Chất bảo quản: 1,0 g/l (dùng chất bảo quản thực phẩm).

Bảng 1: Kết quả nghiên cứu các thời gian lắng khác nhau

Thời gian lắng (ngày)	3	6	9	12
Lượng hỗn dịch (*) (%)	55	45	35	30

(*): Lượng hỗn dịch là lượng bào tử, tinh thể thu sau khi lắng cạn so với tổng lượng dịch lên men

- Dịch thải hoàn toàn không chứa tế bào, bào tử tinh thể *Bt* (được xác định bằng soi kính hiển vi).

2. Sản xuất các đợt lên men tiếp theo:

Từ kết quả của đợt lên men đầu tiên, đề tài tiếp tục triển khai sản xuất 7 đợt tiếp theo, tuy nhiên chỉ có 4 mẻ cho hiệu quả tốt, 3 mẻ còn lại kết quả thấp (số lượng bào tử tinh thể ít, kích thước tinh thể bé, tế bào tách không triệt để, thời gian lên men kéo dài 42 - 54 giờ ..), do một số nguyên nhân sau mà chúng tôi chưa thể khắc phục được:

+ Những đợt lên men tiến hành vào thời điểm nhiệt độ môi trường cao ($32 - 35^{\circ}\text{C}$), ở thiết bị lên men không có thiết bị làm lạnh, chúng tôi chỉ khống chế nhiệt độ ở $33 - 34^{\circ}\text{C}$ bằng vòi nước máy, do đó ở nhiệt độ này sẽ có ảnh hưởng rất lớn đối với quá trình sinh trưởng, phát triển của *Bt* đặc biệt là ở giai đoạn hình thành bào tử tinh thể.

+ Dịch sau lên men sử dụng phương pháp cạn lắng, do nhiệt độ môi trường rất nóng ($32 - 35^{\circ}\text{C}$), nên sử dụng phương pháp này hiệu suất thu hồi không cao: cạn lắng thu được ít, thời gian kéo dài (7 - 10 ngày), bảo quản kém.

3. Xử lý dịch cặn sau khi lắng

Dịch cặn để lắng của các đợt lên men khác nhau chúng tôi thu nhận và tạo dạng chế phẩm:

- Dạng chế phẩm bột: Dịch cặn sau lắng → bổ xung phụ gia → sấy khô tạo chế phẩm → Đóng gói, tổng số thu được 50 kg chế phẩm bột
- Dạng chế phẩm dạng cô đặc: Dịch cặn sau lắng → bổ xung phụ gia Tạo chế phẩm → Đóng chai, bảo quản, tổng số thu được 200 lít chế phẩm dạng cô đặc.

II. Đã triển khai thử nghiệm chế phẩm Bt dạng bột “Biotox P” và dạng dịch cô đặc “Biotox C” ngoài thực địa, vùng rau thuộc xã Tiên Phong - Mê Linh - Vĩnh Phúc

1. Đánh giá hiệu lực của chế phẩm Bt dạng nước và dạng bột đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*)

+ Thử nghiệm gồm 5 công thức:

- CT I : Sử dụng Bt dạng bột với liều lượng 20gam/bình 10 lít
- CT II : Sử dụng Bt dạng bột với liều lượng 25gam/bình 10 lít
- CT III : Sử dụng Bt dạng nước với liều lượng 100ml/bình 10 lít
- CT IV : Sử dụng Bt dạng nước với liều lượng 150ml/bình 10 lít
- CT V : Đối chứng (không phun thuốc).

2. Triển khai sử dụng chế phẩm Bt trừ sâu tơ trên diện rộng

- Sử dụng Bt bột với liều lượng 20g/bình.
- Sử dụng chế phẩm Bt dạng nước với liều lượng 200ml/bình.

+ Đối với thí nghiệm đánh giá hiệu lực của 2 dạng chế phẩm

- Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 50 m²
- Điều tra mỗi lần nhắc lại 25 cây theo điểm ngẫu nhiên
- Phun thuốc lúc chiều mát và phun khi sâu tuổi nhỏ
- Điều tra trước và sau 2; 3; 5 ngày phun thuốc
- Kết quả thí nghiệm được hiệu đính theo Henderson Tilton

+ Đối với phun đại trà: 1ha phun Bt dạng bột
1ha phun Bt dạng nước

Phát thuốc cho từng hộ nông dân tự phun ruộng của từng gia đình. Thuốc Bt dạng nước phun với liều lượng 200ml/bình phun và thuốc Bt dạng bột phun với liều lượng 20g/bình.

3. Kết quả nghiên cứu

1- Hiệu quả trừ sâu tơ của chế phẩm Bt ngoài đồng ruộng

Bảng 1: Hiệu quả trừ sâu tơ hại rau su hào của chế phẩm Bt tại HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc tháng 11 năm 2002

TT	Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng (gam hoặc ml/bình)	Hiệu quả phòng trừ (%)			Ghi chú
			2 NSP*	3 NSP	5 NSP	
1	Bt dạng bột	20 gam	83,2	78,1	66,1	Thời tiết lạnh, gió đông bắc, thỉnh thoảng có mưa nhỏ, t°C= 18-20°C.
2	Bt dạng bột	25 gam	90,4	83,6	83,1	
3	Bt dạng nước	100ml	60,6	60,0	49,0	
4	Bt dạng nước	150ml	70,3	68,7	66,1	
5	Đối chứng	0	0	0	0	

*NSP: Ngày sau phun

Trước thí nghiệm chúng tôi tiến hành điều tra tình hình sâu tơ trên ruộng thí nghiệm. Kết quả cho thấy mật độ sâu tơ trung bình: 6,8 con/cây, trong đó

- Sâu tơ tuổi 1-3 chiếm 88,6%.
- Tuổi 4-5 chiếm 7,1.
- Nhộng chiếm 4,3%.

Đây là điều kiện thích hợp cho việc tiến hành thí nghiệm.

Kết quả thí nghiệm theo dõi (Bảng 1) cho thấy với chế phẩm Bt dạng bột được sử dụng với liều lượng 20g/bình phun hiệu quả trừ sâu tơ đạt 78,1-83,2% và sử dụng với liều lượng 25g/bình phun hiệu quả trừ sâu cao đạt 83,6-90,4% sau 2-3 ngày phun thuốc.

Hiệu quả trừ sâu tơ của chế phẩm Bt dạng nước thấp hơn so với chế phẩm Bt dạng bột. Sử dụng Bt dạng nước với lượng 100ml/bình phun, hiệu quả trừ sâu chỉ đạt 60% sau 2-3 ngày phun thuốc và sử dụng với lượng 150ml/bình phun, hiệu quả trừ sâu tơ cũng chỉ đạt 68,7-70,3% sau 2-3 ngày phun thuốc.

Điều tra sau 5 ngày phun thuốc, hiệu quả trừ sâu tơ của cả 4 công thức thí nghiệm đều giảm nhưng không đáng kể. Nguyên nhân có thể là do thời tiết thỉnh thoảng có mưa nhỏ làm giảm hiệu lực của thuốc đồng thời

lúc này sâu non mới nở luôn xuất hiện trên rau thí nghiệm. Chúng ta cần tiếp tục nghiên cứu thêm để nâng cao chất lượng chế phẩm.

2- Triển khai diện rộng

Từ kết quả khảo nghiệm về liều lượng thuốc Bt sử dụng, chúng tôi đã triển khai thêm trên diện tích 2ha rau với 25 hộ nông dân tham gia. Liều lượng sử dụng Bt bột là 20 g/bình phun còn đối với Bt dạng nước là 200ml/bình phun.

Điều tra tình hình sâu tơ trên diện rộng cho thấy:

- Sâu tơ tuổi 1-3 chiếm 53,33%
- Sâu tơ tuổi 4-5 chiếm 28,15%
- Nhộng chiếm 18,52

Bảng 2: Hiệu quả trừ sâu tơ hại rau trên diện rộng của chế phẩm Bt tại HTX Yên Nhân, Tiền Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc (tháng 12 năm 2002)

Ruộng phun thuốc	Liều lượng sử dụng (g hoặc ml/bình phun)	Hiệu quả phòng trừ (%)			Ghi chú
		2 NSP*	4NSP	7NSP	
Bt bột	20gam	71,6	73,8	58,3	Thình thoảng có mưa nhỏ, t°C= 20-25°C
Bt nước	200ml	62,3	61,5	53,4	
Đối chứng		0	0	0	

Kết quả triển khai trên diện rộng cho thấy sử dụng Bt bột với liều lượng 20g/bình phun cho hiệu quả phòng trừ sâu tơ đạt 71,6-73,8% sau 2-4 ngày phun thuốc và sử dụng Bt nước với liều lượng 200ml/bình phun hiệu quả trừ sâu tơ chỉ đạt 61,5-62,3% sau 2-4 ngày phun thuốc. Sau 7 ngày phun thuốc hiệu quả phòng trừ sâu tơ giảm chỉ còn 53,4-58,3% ở ruộng phun Bt nước và Bt bột.

Hà nội, ngày 31 tháng 12 năm 2002

Chủ nhiệm ĐT nhánh

TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

BÁO CÁO TỔNG KẾT THỰC HIỆN ĐỀ TÀI KC.04.12 NĂM 2003 VÀ KẾ HOẠCH NĂM 2004

Tên đề tài: Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng CNSH"

Đề tài nhánh: SẢN XUẤT CHẾ PHẨM THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC BACILLUS THURINGIENSIS DIỆT MỘT SỐ SÂU HẠI CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP

I. MỤC TIÊU

Sản xuất được chế phẩm Bt có hoạt lực cao diệt sâu hại trong nông nghiệp.

II. NỘI DUNG, NHIỆM VỤ

1. Lưu giữ và bảo quản định kỳ các chủng giống Bt có hoạt tính cao dùng cho sản xuất;
2. Cải tiến, hoàn thiện qui trình lên men *Bacillus thuringiensis* trên thiết bị lên men 14 lít và thiết bị lên men 500 lít tại xưởng thực nghiệm;
3. Sản xuất thực nghiệm chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh dạng bột Firibiotox-P trên thiết bị lên men 500 lít;
4. Thử nghiệm mô hình phun chế phẩm trên một số loại sâu hại rau đậu;
5. Theo dõi hoạt lực của chế phẩm trong thời gian bảo quản.

III. KẾT QUẢ

1. Các chủng giống Bt có hoạt tính diệt sâu cao trong Bộ sưu tập giống của Bộ môn CN Enzim và Protein đã được nghiên cứu những đặc tính sinh hoá, nâng cao hoạt tính sinh học, lưu giữ và bảo quản, sử dụng thường xuyên cho sản xuất. Các kết quả nghiên cứu được thống kê ở bảng 1.

Bảng 1. Các chủng Bt được nghiên cứu bảo quản sử dụng cho sản xuất

Stt	Tên giống/ môi trường	Đặc tính sinh hoá				
		BT, TT/ml ($\times 10^9$)	Gen Cry	Protein (KDa)	LC ₅₀ sâu tơ	LC ₅₀ sâu xanh
1	<i>Bt kurstaki</i> CP/HPT	1,12	Cry1A	130 và 67	0.09	2.41
2	<i>Bt kurstaki</i> D/HP	0.85	Cry1A	130 và 67	0.81	1.98
3	<i>Bt morisoni</i> HD-12/HPT	0,92	Cry1A	130 và 67	0.67	3.02
4	<i>Bt kurstaki</i> C/HP	1,08	Cry1A	130	0.92	2.40
5	<i>Bt kurstaki</i> DA ₂ / HP	1,68	Cry1B	130	0.86	2.25

Ghi chú: Môi trường HP: Peptôn, glucoza, muối khoáng

HPT: Bột đậu tương, bột ngô, muối khoáng

Nhận xét:

- Các chủng giống *Bt* sử dụng cho sản xuất đều mang gen cry1, có trọng lượng phân tử 130 và 67 kDa, hoạt tính diệt sâu cao (chỉ số LC₅₀ từ 0.09 – 0.92 đối với sâu tơ và 1.98 – 3.02 đối với sâu xanh;

- Chủng Btk CP đang được lựa chọn dùng cho sản xuất thực nghiệm. Môi trường HPT có thành phần dễ tiền, dễ kiếm ở Việt nam, đã được nghiên cứu và sử dụng cho lên men trên thiết bị 500 lít để thu nhận chế phẩm Firibiotox-P.

2. Đã cải tiến công nghệ nhân giống, lên men trên thiết bị lên men 14 lít và 500 lít:

- Lựa chọn được phương án nhân giống 1 cấp để rút ngắn thời gian nhân giống, giống ổn định, đạt hiệu quả lên men cao như: rút ngắn thời gian lên men và nâng cao số lượng bào tử tinh thể diệt sâu, tiết kiệm được nhân công và diện năng cho khâu nhân giống và lên men. Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Kết quả theo dõi lên men Bt trên thiết bị 14 lít

Stt	Phương thức nhân giống	Thời gian nhân giống (giờ)	Kết quả lên men	
			Lượng bào tử, tình thể ($\times 10^9$ TT, BT/ml)	Thời gian lên men (giờ)
1	Nhân giống 3 cấp (cấp 1, 2, 3)	100-120	0.98-1.04	40-50
2	Nhân giống 1 cấp	68-72	1.42-1.62	30-34

- Lựa chọn được chế độ thông khí và các thiết bị lọc khí thích hợp cho bình lên men 14 lít để đạt hiệu quả lên men cao (sử dụng phương thức nhân giống 1 cấp). Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả theo dõi chế độ thông khí lên men Bt trên thiết bị 14 lít

Stt	Diện tích quả lọc khí vào (cm ²)	Diện tích quả lọc khí ra (cm ²)	Chế độ sục khí (lít/phút/lít môi trường)	Kết quả lên men		Nhận xét
				T.gian (giờ)	$\times 10^9$ BT, TT/ml	
1	Midistart 2000 20 cm ²	Midistart 2000 20 cm ²	5 - 6	40-50	0.90-1.10	Tình thể bé, nhiều bào tử
2	20 cm ²	Sartofluor 300 200 cm ²	5 - 6	40-46	1.10-1.24	Tình thể nhiều, kích thước khá đều
3	20 cm ²	200 cm ²	6 - 7	34-38	1.30 - 1.40	Tình thể nhiều, kích thước khá đều
4	20 cm ²	200 cm ²	7 - 8	30-34	1,50-1,60	Mật độ TT nhiều, tình thể to, đều
5	20 cm ²	200 cm ²	8 - 9	34-36	1.35-1.40	Tình thể nhiều, kích thước nhỏ không đều

Qua bảng 1 và 2, chúng tôi đã lựa chọn được các điều kiện thích hợp cho quá trình nhân giống, lên men trên thiết bị lên men 14 lít:

- Sử dụng phương thức nhân giống 1 cấp, thời gian nhân giống 72 giờ;
- Sử dụng quả lọc khí vào Midistart 2000 (kích thước lỗ 0.2 μm PTFE) diện tích lọc 20 cm^2 , quả lọc khí ra Sartofluor 300 (0.2 μm PTFE) với diện tích lọc hơn gấp 10 lần 200 cm^2 và tốc độ khí đưa vào 7 - 8 lít/phút/lít môi trường.

Từ những kết quả trên đã chúng tôi áp dụng lên men, sản xuất trên thiết bị lên men 500 lít tại xưởng thực nghiệm. Các kết quả lên men đều cho thấy rằng hiệu quả lên men ổn định (tỷ lệ tách bào tử, tinh thể đạt >90%), rút ngắn thời gian lên men (30-32 giờ) so với phương thức nhân giống 3 cấp (100-120 giờ). Tuy nhiên do thiết bị lên men 500 lít chưa có hệ thống đo lưu lượng khí nên sự điều khiển, khống chế hàm lượng không khí vô trùng cho quá trình lên men vẫn chủ yếu dựa trên kinh nghiệm của cán bộ kỹ thuật vận hành.

3. Sản xuất thực nghiệm thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P trên thiết bị lên men 500 lít thu nhận 250 kg chế phẩm bột và 50 lít chế phẩm dịch cô đặc.

- Sản phẩm Firibiotox - P đã được đăng ký vào Danh mục thuốc Bảo vệ thực vật được phép lưu hành và sử dụng ở Việt nam;

- Sản phẩm và quy trình công nghệ đã được gửi đi thử nghiệm, giới thiệu và trưng bày, chào bán tại Chợ Công nghệ -thiết bị (Techmark) tháng 10 năm 2003 tại Hà Nội;

- Nhãn mác của sản phẩm Firibiotox - P đã được đăng ký sở hữu tại Cục Sở hữu Công nghiệp từ tháng 10/2003.

4. Đã triển khai mô hình ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P trên một số loại sâu hại rau với diện tích 2.5 ha, tại xã Thạch Môn- huyện Thạch Hà - tỉnh Hà Tĩnh, phun *Bt* bột với liều lượng 25g/bình phun. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Nhận xét:

- Trên đậu xanh, sau 7 - 10 ngày phun *Bt* hiệu quả diệt sâu cao, đạt 74.5 - 80.2% đối với sâu xanh đục quả; 69.5 - 79.7% đối với sâu đo ăn lá, tuy nhiên đối với sâu khoang ăn lá đậu xanh hiệu quả chỉ đạt 56,8 - 59,7%;

- Trên đậu tương, sau 7 - 10 ngày phun *Bt* cũng có hiệu quả cao đạt 77.2 - 84.7% đối với sâu keo da lũng; và đạt 59.5 - 60.2% đối với sâu khoang ăn lá.

**Bảng 4. Kết quả sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P
diệt một số sâu hại cây họ đậu**

Stt	Tên sâu hại	Hiệu quả phòng trừ (%) sau phun				
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	10 ngày	12 ngày
1	Sâu đục quả (<i>H.a</i>) đậu xanh	57,3	66,7	74,8	80,2	73,7
2	Sâu khoang ăn lá đậu xanh	35,5	48,9	56,8	59,7	60,4
3	Sâu đo ăn lá đậu xanh	48,2	56,7	63,5	78,8	76,2
4	Sâu khoang ăn lá đậu tương	38,8	50,3	59,5	60,2	58,6
5	Sâu keo da láng ăn lá đậu tương	40,9	60,3	77,2	84,7	71,1

5. Đã kiểm tra hoạt tính sinh học của các chế phẩm qua các thời gian bảo quản:

Dịch thu được sau khi lên men trên thiết bị 14 lít (phòng thí nghiệm), và 500 lít (xưởng thực nghiệm) tạo các dạng chế phẩm, giữ mẫu bảo quản ở nhiệt độ thường và kiểm tra:

- Đối với chế phẩm bột được bảo quản trong túi kềm tráng thiếc và đối với chế phẩm dạng dịch cô đặc được đựng trong các chai thủy tinh tối màu.

- Sau các thời gian bảo quản: 3; 6; 12; 18 tháng, các dạng chế phẩm sẽ được kiểm tra hoạt tính trên sâu tơ (*P.xylostela*), sử dụng nồng độ 0,1 và 0,05%, đếm số sâu chết sau 4 ngày. Kết quả thử hoạt tính chế phẩm được trình bày ở bảng 5a, 5b.

Nhận xét:

- Chế phẩm dạng dịch cô đặc lên men trên thiết bị 500 lít sau thời gian bảo quản, qua bảng 5a thấy rằng:

- + Số lượng bào tử tinh thể giảm 6 - 10% sau 6 tháng, 18 - 20% sau 12 tháng, tuy nhiên sau 3 tháng bảo quản số lượng bào tử, tinh thể tăng là do số bào tử có thể nảy chồi thành bào tể bào và sinh bào tử, tinh thể mới.

- + Hoạt tính diệt sâu có giảm từ 8 - 12% sau 6 tháng và 25 - 27% sau 12 tháng bảo quản.

Bảng 5a. Thử hoạt tính chế phẩm dạng dịch cô đặc theo các thời gian bảo quản

Stt	Tên mẫu (mt, ngày sản xuất)	Hoạt tính chế phẩm sau các thời gian bảo quản							
		Dịch chưa qua thời gian BQ (Đ/C)		3 tháng BQ		6 tháng BQ		12 tháng BQ	
		BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)
1	Btk CP/HPT (20/9/2002 TBì 500 lít)	1.88	96	1.90	92	1.68	84	1.54	72
2	Btk CP/HPT (16/12/2002 TBì 500 lít)	2.06	98	2.04	96	1.92	90	1.62	72

Bảng 5b. Sự thay đổi hoạt lực diệt sâu tơ theo thời gian bảo quản của CP dạng bột

Stt	Tên mẫu (mt, ngày sản xuất)	Hoạt tính diệt sâu sau thời gian bảo quản							
		Dịch chưa qua thời gian BQ (Đ/C)		6 tháng BQ		12 tháng BQ		18 tháng BQ	
		BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)
1	Btk DA ₂ /HP (9/2/2002. máy lắc)	3.0	100	3.2	100	3.0	94	3.0	90
2	Btk CP/HPT (9/2/2002. TBì 14 lít)	3.0	100	2.9	100	3.1	94	3.1	92
3	Btk CP/HPT (20/9/2002 TBì 500 lít)	2.1	100	2.2	100	2.0	96	-	-
4	Btk CP/HPT (6/12/2002. TBì 500 lít)	2.0	100	2.2	100	2.2	96	-	-

- Ở bảng 5b thấy rằng, chế phẩm theo các thời gian bảo quản.:
 - + Số lượng bào tử tinh thể gần như không thay đổi.
 - + Hoạt tính diệt sâu không giảm sau 6 tháng bảo nhiệt độ thường, sau một năm giảm 4 - 6% và sau 18 tháng giảm 8 - 10%.

Đánh giá kết quả thực hiện đề tài năm 2003:

Đạt chỉ tiêu kế hoạch

IV. KẾ HOẠCH NĂM 2004

- (1). Tiếp tục lưu giữ, bảo quản định kỳ các chủng *Bt* có hoạt lực cao sử dụng cho nghiên cứu và sản xuất;
- (2). Tiếp tục hoàn thiện quy trình sản xuất *Bt* trên thiết bị lên men 500 lít, để sản phẩm có chất lượng ổn định và hạ giá thành sản phẩm;
- (3). Nghiên cứu, sản xuất chế phẩm *Bt* trên dây chuyền thiết bị lên men 1500 lít tại xưởng thực nghiệm;
- (4). Hoàn thiện hệ thống thiết bị và quy trình sản xuất *Bt* trên dây chuyền thiết bị lên men 1500 lít tại xưởng thực nghiệm;
- (5). Báo cáo nội dung, tiến độ, kết quả thực hiện đề tài, quyết toán tài chính và nghiệm thu tổng kết đề tài.

V. DỰ TOÁN ĐỀ NGHỊ CẤP KINH PHÍ CHO NĂM 2004

Stt	Khoản chi	Nội dung	Thành tiền (triệu đồng)
1	2	3	4
1	Lương, thuê khoán chuyên môn (114)	- Thuê khoán chuyên môn trên phòng thí nghiệm - Thuê công sản xuất thực nghiệm chế phẩm qui mô thực nghiệm 500 và 1500 lít <i>Cộng:</i>	15,0 20,0 35,0
2	Vật tư, hoá chất (119)	- Cồn đốt, bông, vải lọc, bảo hộ lao động - Hoá chất, nguyên vật liệu - Dụng cụ thủy tinh, nhiệt kế, giấy pH... - Dụng cụ, phụ tùng sửa chữa, sản xuất tại xưởng thực nghiệm sản xuất Bt <i>Cộng:</i>	2,0 10,0 5,0 15,0 32,0
3	Điện, nước, than, hơi (109)	- Điện, nước, than, ga, dầu <i>Cộng:</i>	10,0 10,0
4	Hội nghị, hội thảo (112)	Báo cáo, nghiệm thu (in ấn, pho to tài liệu....) <i>Cộng:</i>	3,0 3,0
Tổng cộng:			80,0

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh

Viện trưởng Viện Công nghiệp thực phẩm

Hà nội, ngày 26 / 12 / 2003

Chủ nhiệm đề tài nhánh

PGS. TS. Vũ Thị Đào

TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

BỘ CÔNG NGHIỆP
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
301, Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH
SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC *Bacillus thuringiensis*
CÓ HOẠT LỰC CAO DIỆT SÂU HẠI CÂY TRỒNG NÔNG
NGHIỆP

(Năm 2004)

TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

(Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài nhánh
thuộc Đề tài KHCN cấp Nhà nước, mã số KC-04-12)

BÁO CÁO TÓM TẮT KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH

SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC *Bacillus thuringiensis* CÓ HOẠT LỰC CAO DIỆT SÂU HẠI CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP

(Thời gian : Từ 1/10/2001 đến 30/9/2004)

1. Chọn giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực diệt sâu tơ cao

- Đã khảo sát, lên men qui mô phòng thí nghiệm, lựa chọn giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ công nghiệp.
- 12 chủng Bt trong bộ sưu tập giống đã được nghiên cứu về sự phát triển, tạo và tách bào tử, tinh thể độc tố diệt côn trùng khi nuôi cấy trên các môi trường chứa Glucoza, cao nấm men, pepton và các muối khoáng.
- 8 chủng Bt đã được nghiên cứu chi tiết về sự tiêu thụ đường Glucoza và Protein trong quá trình nuôi cấy.
- 4 loại môi trường lên men bao gồm các môi trường cơ bản và các môi trường sử dụng nguyên liệu thay thế như bột ngô, bột đậu tương, bột cá, bột men bia đã được sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy các chủng Bt tạo bào tử, tinh thể độc tố diệt côn trùng.
- 22 mẫu dịch lên men các chủng Bt nghiên cứu đã được đánh giá hiệu lực sinh học diệt sâu tơ hại rau (*Plutella maculipennis*) tại Bộ môn Côn trùng, Viện Bảo vệ Thực vật. Kết quả cho thấy đã chọn được 8 chủng Bt có hiệu lực diệt sâu tơ cao, trong đó có 7 chủng là *Bt kurstaki* và 1 chủng là *Bt entomocidus*.
- Đã chọn được 3 chủng giống Bt tốt nhất cho lên men và sản xuất.
- Cả 3 chủng Bt trên đều mang gene độc tố *cry*₁, tạo tinh thể độc tố diệt côn trùng hình tháp đôi (hình quả trám) có trọng lượng phân tử 130 và

67 kDa (Kilodalton), có hoạt tính diệt sâu cao (chỉ số LC_{50} từ 0,09 – 0,92 đối với sâu tơ (*Plutella xylostela*) và 1,98 – 3,02 đối với sâu xanh (*Helioverpa armigera*)

- Đã lưu giữ, bảo quản và kiểm tra định kỳ chất lượng, hoạt tính của 3 chủng giống dùng trực tiếp cho sản xuất tạo chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh từ *Bacillus thuringiensis* mang tên Firibiotox.

2. Nghiên cứu lựa chọn môi trường, điều kiện nuôi cấy *Bt* thích hợp quy mô phòng thí nghiệm và xưởng thực nghiệm:

- Đã chọn được môi trường lên men thay thế có thành phần nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam bao gồm bột ngô, bột đậu tương, bột nấm men bia thu hồi và các muối khoáng;
- Đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp:
 1. Nhiệt độ nuôi cấy 28-30°C;
 2. pH môi trường ban đầu là 7,0 và không điều chỉnh trong quá trình lên men;
 3. Nuôi cấy *Bt* trên máy lắc: máy lắc tròn, 200 vòng/phút, 50 ml môi trường/bình tam giác thể tích 500 ml, thời gian nuôi cấy từ 48-72 giờ;
 4. Nuôi cấy *Bt* trên thiết bị 14 lít trong phòng thí nghiệm: thể tích môi trường 9 lít/ thể tích bình lên men 14 lít, khuấy 300 vòng/phút, sục khí 0,7-1,0 lít không khí/ lít môi trường/phút, thời gian nuôi cấy từ 30 – 44 giờ;
 5. Nuôi cấy trên thiết bị lên men dung tích 500 lít tại xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm: Thể tích môi trường 250 lít/ trên thể tích thiết bị lên men 500 lít, khuấy 200 vòng/phút (tốc độ khuấy cố định, không điều chỉnh được), sục khí 0,7-1,0 lít không khí/ lít môi trường/phút, thời gian nuôi cấy từ 30 – 38 giờ.

3. Nghiên cứu tạo chế phẩm *Bt* dạng dịch cô đặc và dạng bột thấm nước.

- Đã nghiên cứu hai phương pháp thu hồi bào tử tinh thể: phương pháp để lắng có bổ sung chất đông tụ và phương pháp ly tâm (ở nhiệt độ phòng, 30-45 phút, 10.000 vòng/phút hoặc ở 4°C, 10 phút, 10.000 vòng/phút).
- Chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng dịch cô đặc được tạo thành khi bổ sung các chất phụ gia như chất bám dính, chất làm tăng độ loang, độ khuếch tán, chất chống tia tử ngoại mặt trời (tia UV), chất bảo quản vào hỗn dịch bào tử tinh thể thu được bằng phương pháp để lắng;
- Chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng bột được tạo thành khi bổ sung chất mang và các chất phụ gia như chất bám dính, chất làm tăng độ loang, độ khuếch tán, chất chống tia tử ngoại mặt trời (tia UV), chất bảo quản vào hỗn dịch bào tử tinh thể thu được bằng phương pháp để lắng hoặc bằng phương pháp ly tâm tạo thành dạng bột nhão (paste). Khối bột nhão sau đó được sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50°C đến khi đạt độ ẩm 6-8%, được nghiền, đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ phòng;

4. Quy trình sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis*

- Đã đưa ra quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng dịch cô đặc và dạng bột
- Đã tiến hành một số các nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất trên các thiết bị lên men như chế độ thông khí, phương pháp nhân giống:
- Đã đăng ký 02 sản phẩm thuốc trừ sâu vi sinh dạng dịch cô đặc Firibiotox – C và dạng bột Firibiotox – P vào Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép lưu hành và sử dụng ở Việt Nam
- Đã sản xuất thực nghiệm trên thiết bị lên men 500 lít (và thử nghiệm 2 mẻ trên thiết bị lên men 1500 lít – chưa có kết quả chính xác do đó là 2 đợt

lên men chạy nghiệm thu thiết bị được chế tạo và lắp đặt tại Việt Nam) số lượng 300 lít thuốc trừ sâu vi sinh dạng dịch cô đặc Firibiotox – C và 600 kg dạng bột Firibiotox – P.

5. Xây dựng mô hình trình diễn thử nghiệm và giới thiệu chế phẩm *Bt* để ứng dụng diệt một số sâu hại cây trồng nông nghiệp

- Đã triển khai 1 mô hình ứng dụng chế phẩm *Bt* trên sâu tơ hại rau với diện tích 2,5 ha, tại xã Tiên Phong - Huyện Mê Linh - Vĩnh Phúc, phun *Bt* bột với liều lượng 20g/bình phun, sâu tơ chết 71,6-73,8% sau 2-4 ngày phun thuốc và sử dụng *Bt* nước với liều lượng 200ml/bình phun hiệu quả trừ sâu tơ đạt 61,5-62,3% sau 2-4 ngày phun thuốc.
- Đã triển khai 1 mô hình ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P trên một số loại sâu hại đậu với diện tích 2,5 ha, tại xã Thạch Môn- Huyện Thạch Hà - Tỉnh Hà Tĩnh, phun *Bt* bột với liều lượng 25g/bình phun. Kết quả cho thấy:
 1. Trên đậu xanh: sau 7 - 10 ngày phun *Bt* hiệu quả diệt sâu cao, đạt 74,5 - 80,2% đối với sâu xanh đục quả; 69,5 - 79,7% đối với sâu đo ăn lá, tuy nhiên đối với sâu khoang ăn lá đậu xanh hiệu quả chỉ đạt 56,8 - 59,7%;
 2. Trên đậu tương: sau 7 - 10 ngày phun *Bt* cũng có hiệu quả cao đạt 77,2 - 84,7% đối với sâu keo da láng; và đạt 59,5 - 60,2% đối với sâu khoang ăn lá.
- Đã giới thiệu và chào bán sản phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng bột Firibiotox – P để ứng dụng diệt một số sâu hại thuốc lá, hại đậu tương, đậu xanh, vải, nhãn, ngô và hoa nhài.

6. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến chất lượng và hoạt tính sinh học của sản phẩm:

- Đối với chế phẩm *Bt* dạng dịch cô đặc: Số lượng bào tử tinh thể giảm 6 - 10% sau 6 tháng, 18 - 20% sau 12 tháng và 24 tháng. Hoạt tính diệt sâu giảm từ 8 - 12% sau 6 tháng, 25 - 27% sau 12 tháng và giảm đến 40% sau thời gian bảo quản 24 tháng ở nhiệt độ phòng trong các chai

nhựa đục. Chế phẩm bị phân thành 2 lớp dịch trong và cặn bào tử tinh thể. Màu sắc, mùi vị và độ pH của chế phẩm không thay đổi.

- Đối với chế phẩm bột: Số lượng bào tử tinh thể gần như không thay đổi. Hoạt tính diệt sâu không giảm sau 6 tháng, sau một năm giảm 4 - 6% và sau 18, 24 tháng giảm 8 - 10%. Sản phẩm được bao gói trong 01 lớp túi polyetylen và 01 lớp bao bì tráng thiếc và bảo quản ở nhiệt độ thường. Một số mẫu bảo quản sau 24 tháng có hiện tượng vón cục, có thể do thời gian nghiền và đóng gói mẫu lâu và chế phẩm bị hút ẩm.

KẾT LUẬN

Đề tài nhánh đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu, sản xuất thực nghiệm và ứng dụng thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox được giao:

1. Đã lựa chọn, nghiên cứu, bảo quản, lưu giữ 3 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* cho sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox;
2. Đã nghiên cứu phát triển và hoàn thiện công nghệ sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox dạng bột;
3. Đã xây dựng 2 mô hình ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox diệt sâu tơ hại rau và một số loại sâu hại đậu tương, đậu xanh
4. Đã sản xuất đủ lượng sản phẩm được giao, sản phẩm được sử dụng trong xây dựng mô hình trình diễn; Nộp cho Ban Chủ nhiệm đề tài sử dụng trong các hoạt động tuyên truyền, giới thiệu, quảng cáo, thử nghiệm; Chào bán, giới thiệu, cung cấp miễn phí hoặc bán để nghiên cứu ứng dụng diệt một số đối tượng sâu hại khác.

Hà Nội, ngày 23 tháng 9 năm 2004
Chủ nhiệm đề tài nhánh



TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

PHIẾU BÁO CÁO

SẢN PHẨM ĐỀ TÀI KC-04-12 ĐÃ ỨNG DỤNG TẠI ĐỊA PHƯƠNG

Đề tài nhánh: Sản xuất chế phẩm sinh học *Bacillus thuringiensis* hoạt lực cao diệt một số sâu hại cây trồng nông nghiệp

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh: Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ Công nghiệp

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Nguyễn Thị Hoài Trám; Chỉ tiêu: 600 kg chế phẩm Bt dạng bột, 2 mô hình ứng dụng.

Sr	Tên đề tài/chế phẩm	Số lượng sản phẩm đã ứng dụng	Địa điểm và thời gian ứng dụng	Có giấy chứng nhận hay không	Hiệu quả	Sản phẩm chưa sử dụng	Số sản phẩm sẽ phải sản xuất tiếp	Dự kiến thời gian sản xuất để hoàn thành kế hoạch	Ghi chú
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Chế phẩm Firibiotox – C dạng dịch cô đặc	50 lít	- Triển khai theo mô hình ứng dụng tại HTX Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc, 2002; - Nộp mẫu cho Ban CN Đề tài, triển lãm, Hội thảo các năm 2002, 2003	Có báo cáo kết quả và xác nhận của Ban CN Đề tài	Sâu tơ: 70,3-72,5 % Sâu xanh: 10,8 %	250 lít	0	0	Lưu mẫu tại Viện CNTP để theo dõi chất lượng sau các thời gian bảo quản
	Cộng	50 lít				250			
1	Chế phẩm Firibiotox – P dạng bột	67 kg	- Triển khai 01 mô hình ứng dụng tại HTX Tiên Phong, Mê Linh, Vĩnh Phúc, 2002; - Nộp mẫu cho Ban CN Đề tài chuyển cho các Chi cục BVTV Hải Phòng, Hà Nam, dùng cho các triển lãm, Hội thảo 2001, 2002, 2003; - Triển khai 01 mô hình ứng dụng tại HTX Thạch Môn, Thạch Hà, Hà Tĩnh 2003.	Có báo cáo kết quả của nhóm làm mô hình và xác nhận của Ban CN đề tài, hoặc có xác nhận của địa phương	Sâu tơ: 75- 90,0 % Sâu xanh hại rau: 21,3 % Sâu xanh đục quả: 74,8-80,2 Sâu khoang: 56,8-59,7 Sâu đo: 63,5-78,8 Sâu keo da láng: 77,2 - 84,7				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Chế phẩm Firibiotox - P dạng bột	90 kg	- Giới thiệu và chào bán cho Viện Kinh tế kỹ thuật thuốc lá triển khai diệt sâu xanh, sâu khoang hại thuốc lá tại Cao Bằng, 2003-2004	Có giấy xác nhận và đề nghị của Viện KTKT Thuốc lá	Chỉ có hiệu quả tốt với sâu tuổi nhỏ (tuổi 1-3), hiệu quả thấp với sâu tuổi lớn				
		50 kg	- Giới thiệu và chào bán tại Thạch Môn, Thạch Hà, Hà Tĩnh, 2003-2004 để ứng dụng diệt sâu hại đậu	Có xác nhận của địa phương					
		10 kg	- Giới thiệu để thử nghiệm diệt sâu hại vải, nhãn cho Viện Kinh tế Sinh thái, Phân viện Sông Hồng, 2004	Chưa lấy được xác nhận					
		5 kg	- Bán cho Viện Ngô thử nghiệm diệt sâu hại ngô, 2004						
		300	- Giới thiệu và chào bán cho HTX Dịch vụ Nông nghiệp và Kinh doanh tổng hợp, Xã Đông Xuân, Sóc Sơn, Hà Nội diệt sâu tơ, sâu xanh bướm trắng hại hoa nhài	Có giấy xác nhận, nhận xét và đề nghị	Sâu tơ: 75-80%; Sâu xanh bướm trắng: 80-85%				
	Cộng	522 kg				28	50	11/2004	

Hà Nội, ngày 23 tháng 9 năm 2004
Chủ nhiệm đề tài nhánh



TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

BỘ CÔNG NGHIỆP
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM
301, Nguyễn Trãi, Thanh xuân, Hà Nội

BÁO CÁO TỔNG KẾT KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI NHÁNH
SẢN XUẤT CHẾ PHẨM THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC *Bacillus thuringiensis* HOẠT
LỰC CAO DIỆT SÂU HẠI MỘT SỐ CÂY TRỒNG NÔNG NGHIỆP

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm

Các cán bộ tham gia:
KS. Đỗ Thị Thanh Huyền
KS. Phạm Đức Toàn
KS. Chu Thắng
KS. Nguyễn Thị Ngân Minh
CN. Nguyễn Thanh Hà

Hà Nội, 12-2004

(Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài nhánh
thuộc Đề tài KHCN cấp Nhà nước, mã số KC-04-12

MỞ ĐẦU

Hàng năm dịch hại cây trồng do sâu bệnh, chuột, cỏ dại... gây tổn thất rất nhiều cho sản xuất nông nghiệp. Khi dịch hại xuất hiện nó không những làm thất thu năng suất mà còn làm giảm chất lượng sản phẩm một cách đáng kể. Nước ta là một nước có hơn 80% dân số sống bằng nghề nông là chính, vì vậy sự ổn định ngành này là một trong những biện pháp quan trọng rất được quan tâm.

Tiêu diệt dịch hại theo phương pháp truyền thống là sử dụng các hoá chất diệt côn trùng. Sự phát minh ra các loại thuốc hoá học dùng để bảo vệ thực vật đã được coi như vị cứu tinh của nền nông nghiệp, nhưng sau một thời gian hưng thịnh đã bộc lộ mặt trái của nó. Một số hoá chất sử dụng rộng rãi để phòng chống các côn trùng phá hoại mùa màng, rừng cây và lương thực như: monocrotophos, parathinolmethil, methyl-bronide, phosphin... không những tiêu diệt dịch hại mà tiêu diệt luôn các loài có ích như ong, bướm... làm nghèo đi tính đa dạng vốn có của thiên nhiên, phá vỡ sự cân bằng sinh thái trong tự nhiên. Đặc biệt hơn, các chất hoá học tích tụ trong đất, nước, không khí và nông sản ngày một nhiều đã ảnh hưởng không ít đến sức khoẻ con người và các loại động vật khác, kéo theo là sự ô nhiễm môi trường sống.

Để khắc phục vấn đề trên, các biện pháp sinh học diệt côn trùng đã được ứng dụng nhằm thay thế dần biện pháp hoá học. Vai trò của những côn trùng có ích như ong, bướm, kiến, bọ rùa... đã được con người ứng dụng từ lâu trong công tác đấu tranh sinh học chống những loại côn trùng có hại. Tuy nhiên từ khi khoa học phát hiện ra các vi sinh vật trong đó có vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có khả năng sinh bào tử, tinh thể độc tố diệt côn trùng trong lĩnh vực đấu tranh sinh học mở ra một triển vọng mới. Các chế phẩm sinh học từ *Bacillus thuringiensis* được nghiên cứu, sản xuất và sử dụng rộng rãi trong công tác bảo vệ thực vật và bảo vệ sức khoẻ cộng đồng ở nhiều nước trên thế giới, với các ưu điểm đặc biệt của nó là không gây độc đối người, động vật có ích, không gây ô nhiễm môi trường sống đồng thời có tác dụng nhanh và mang tính chất có chọn lọc.

Ở Việt Nam việc nghiên cứu, sản xuất và sử dụng các chế phẩm *Bacillus thuringiensis* diệt sâu bảo vệ cây trồng, bảo vệ ngũ cốc đã được tiến hành ở Liên hiệp sản xuất hoá chất thành phố Hồ Chí Minh, Viện công nghiệp Thực phẩm, Viện Công nghệ sau thu hoạch, Viện công nghệ sinh học... đã đạt những kết quả rất đáng quan tâm. Tuy nhiên do quy mô nghiên cứu và sản xuất nhỏ, thường sử dụng các chủng *Bt* nhập ngoại nên chất lượng chưa ổn định, sản lượng không lớn để có thể cung cấp cho các mô hình trình diễn, ứng dụng diện rộng và tuyên truyền rộng rãi cho bà con nông dân, vì vậy các sản phẩm *Bt* nghiên cứu và sản xuất ở Việt Nam vẫn chưa có mặt trên thị trường thuốc bảo vệ thực vật sinh học.

Để góp phần thực hiện đề tài khoa học cấp Nhà nước “ Nghiên cứu sản xuất, sử dụng thuốc trừ sâu sinh học đa chức năng cho một số cây trồng bằng công nghệ sinh học” chúng tôi đã nhận nhiệm vụ thực hiện các nội dung của đề tài nhánh “Sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* hoạt lực cao diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp”

Mục đích của đề tài nhánh: Nghiên cứu, hoàn thiện công nghệ lên men, thu hồi tạo được chế phẩm *Bacillus thuringiensis* hoạt lực cao diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp.

Nội dung đề tài nhánh:

- Chọn một số chủng giống *Bacillus thuringiensis* có khả năng tạo bào tử, protein tinh thể có hoạt lực diệt một số sâu hại cao để sử dụng cho nghiên cứu và sản xuất thực nghiệm;
- Nghiên cứu lựa chọn môi trường, điều kiện nuôi cấy các chủng *Bacillus thuringiensis*, điều kiện thu hồi tạo các chế phẩm sinh học ở quy mô phòng thí nghiệm, xưởng thực nghiệm;
- Sản xuất thực nghiệm chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực cao.
- Ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp tại các mô hình trình diễn.

TỔNG QUAN

1.1 Đại cương về *Bacillus thuringiensis* tổng hợp protein tinh thể diệt côn trùng.

Vào những năm 70 của thế kỷ XIX, Louis Paster đã phát hiện ra một loại vi khuẩn gây bệnh cho tằm, ông đặt tên cho loại vi khuẩn này là *Bacillus bombycos* (tên khoa học của tằm dâu là *Bombyx mori*). Năm 1901, S. Ishiwata cũng phân lập được trên tằm mắc bệnh ở Nhật Bản một loại vi khuẩn gây bệnh, ông đặt tên là *Bacillus sotto* (tiếng Nhật sotto nghĩa là tằm dâu). Nhưng tên giống vi khuẩn do hai nhà bác học Pháp và Nhật đặt ra hầu như rất ít được các nhà vi sinh vật chú ý. Năm 1911, nhà bác học người Đức Berliner phân lập được loại vi khuẩn này từ bướm phán Địa Trung Hải (*Anagasta Kuehniella*) có nguồn gốc từ các cối xay vùng Thuringia và đến năm 1915 thì loài vi khuẩn này chính thức được đặt tên là *Bacillus thuringiensis* (gọi tắt là *Bt*). Chúng vi khuẩn này do Berliner phân lập, về sau thất lạc mãi đến năm 1917 mới được Matter phân lập trở lại từ loài bướm nói trên. Và từ đây *Bacillus thuringiensis* bắt đầu được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng [5, 6,15].

Bacillus thuringiensis là một thành viên thuộc nhóm 1, chi *Bacillus*. Tế bào dinh dưỡng là trực khuẩn sinh bào tử gram dương, hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, kích thước tế bào 2-5 μm x 1 μm có phủ tiên mao không dầy, chuyển động được, tế bào phân cắt bằng cách phân chia tế bào hai lần tạo thành chuỗi hoặc đứng riêng rẽ.

Các loài *Bacillus* có khả năng sinh bào tử, đặc biệt với các loài *Bacillus* diệt côn trùng thì sự hình thành bào tử đồng thời với sự tạo thành tinh thể có bản chất protein mang tính độc đối với côn trùng. *Bacillus thuringiensis* có khả năng tạo ra một bào tử và một hoặc hai tinh thể (thể vùi bào tử). Bào tử *Bt* có dạng hình trụ hay hình trứng, hình ovan, kích thước khoảng 0,7-0,9 μm x 1 μm . Bào tử có thể quan sát bằng kính hiển vi quang học hay kính hiển vi điện tử. Thể vùi là một protein kết tinh thành dạng hình khối lưỡng tháp, hình khối lập phương, hay hình cầu, ngay cả trong cùng một chủng đôi khi cũng xuất hiện thể vùi dưới các dạng khác nhau. Kích thước tinh thể khoảng 0,5 x 0,2 μm chiếm 30% trọng lượng bào tử. Khi ở trong tế bào dinh dưỡng thể vùi thường nằm kề với bào tử nhưng ở một vài chủng chúng nằm trong màng ngoài của bào tử. Trong tất cả các trường hợp khi tế bào bị tan, thể vùi và bào tử đều thoát ra ngoài môi trường nuôi cấy.

Bacillus thuringiensis giống như các loài *Bacillus* khác oxy hoá hydrat cacbon đến axit hữu cơ và dioxit cacbon (CO_2) theo chu trình Embden-Meyerhoff [5, 6, 15].

Có thể phân lập được *Bacillus* diệt côn trùng từ đất, nước, bùn, lá cây, từ ruột côn trùng mắc bệnh hoặc đã chết, cũng có thể tìm thấy chúng ký sinh trên côn trùng và các động vật không xương sống.

1.2. Protein tinh thể diệt côn trùng của *Bacillus thuringiensis*

Các chủng *Bt* khác nhau có hoạt tính diệt côn trùng khác nhau. Hoạt tính và phổ diệt côn trùng được quyết định bởi cấu trúc của protein tinh thể. Cho đến nay, đã xác định được 24 gen độc tố mã hoá tổng hợp trên 40 protein tinh thể có độc tính với các loại côn trùng (Protein Cry) và 3 protein Cyt có độc tính với. Các gen độc tố được phân thành các nhóm như sau (5, 6, 7, 10, 11, 12):

Nhóm gen cry 1: Mã hoá tổng hợp hơn 20 protein Cry1 có trọng lượng phân tử từ 130 đến 138 Kilodalton (kDa), tinh thể protein Cry 1 có hình quả trám. Thực chất protein này là tiền độc tố (protoxin). Tiền độc tố được hoà tan trong môi trường kiềm của ruột côn trùng và bị phân giải thành các nhân độc là các protein có trọng lượng phân tử khoảng 60, 70 kDa nhờ hệ enzym proteaza ruột côn trùng. Các protein này gây độc với côn trùng bộ Cánh vẩy và Hai cánh. Nhiều chủng *Bt* mang gen cry 1 ngoài protein 130 kDa còn tổng hợp thêm protein có trọng lượng phân tử khoảng 68 kDa.

Nhóm gen cry 2: Mã hoá tổng hợp 3 protein Cry 2 là Cry 2A, Cry 2B và Cry 2C có dạng hình khối lập phương có trọng lượng phân tử tương ứng là 70,9; 70,8 và 69,5 kDa. Protein Cry 2A có độc tính với côn trùng bộ Cánh vẩy và Hai cánh, còn protein Cry 2B và Cry 2C chỉ có độc tính với côn trùng bộ Cánh vẩy.

Nhóm gen cry 3: Nhóm gen này mã hoá tổng hợp protein Cry 3A, Cry 3B, Cry 3C và Cry 3D tạo tinh thể hình quả trám có trọng lượng phân tử tương ứng là 73,1; 75; 129 và 73 kDa có độc tính với côn trùng bộ Cánh cứng.

Nhóm gen cry 4: Nhóm này bao gồm 4 gen cry được ký hiệu là cry 4A, cry 4B, cry 4C và cry 4D mã hoá tổng hợp các protein có trọng lượng phân tử 135, 138, 78 và 72 kDa. Những protein này cùng với protein 28 kDa do gen cyt A tổng hợp tạo thành phức hợp tinh thể hình cầu,

hình trứng có độc tính diệt bọ gây muỗi và ruồi (bộ Hai cánh) ở chủng *Bt subsp. israelensis*, *Bt subsp. morrisoni*.

Bảng 1. Protein tinh thể diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Nhóm gen độc tố (<i>cry gene</i>)	Ký hiệu protein	Trọng lượng protein (kDa)	Diệt côn trùng	Hình dạng tinh thể
<i>cry 1</i>	Cry 1A (a,b,c)	131 – 133	Cánh vẩy (L), Hai cánh (D)	Hình quả trám
	Cry 1B	138	L	Nt
	Cry 1C	134	L	Nt
	Cry 1D	132,5	L	Nt
	Cry 1E	133,2	L	Nt
	Cry 1F	133,6	L	Nt
	Cry 1G	130	L	Nt
	Cry 1H	-	L	nt
<i>cry 2</i>	Cry 2A	70,9	L, D	Hình lập phương
	Cry 2 B	70,8	L	Nt
	Cry 2C	69,5	L	Nt
<i>cry 3</i>	Cry 3 A	73,1	Cánh cứng (C)	Hình thoi hẹp, hình quả trám
	Cry 3 B	75	C	Nt
	Cry 3 C	129	C	Nt
	Cry 3 D	73	C	Nt
<i>cry 4</i>	Cry 4A	134,4	D	Hình cầu, hình trứng
	Cry 4B	127,8	D	
	Cry 4C	77,8	D	
	Cry 4D	72,4	D	
<i>cry 5</i>	Cry 5	81,2	L, C	Hình quả trám
<i>cry 6</i>	Cry 6	44-45	L	Hình quả trám
<i>cyt A</i>	Cyt A	28	D	
<i>cyt B</i>	Cyt B		D	

Nhóm gen cry 5: Nhóm gen này mới được phát hiện gần đây. Protein Cry 5 có trọng lượng phân tử 81,2 kDa với hình quả trám và độc với côn trùng bộ Cánh cứng và Cánh vẩy.

Nhóm gen cry 6: Nhóm gen này còn chưa được nghiên cứu nhiều, chúng mã hoá tổng hợp protein Cry 5 có trọng lượng phân tử khoảng 44-45 kDa và tinh thể protein có hình quả trám.

Nhóm gen mã hoá cho protein Cyt: Protein Cyt (cytolytic protein) có tác dụng tiêu huỷ tế bào động vật có xương sống và không có xương sống. Cyt có trọng lượng phân tử khoảng 27 kDa. Tuy nhiên gen mã hoá tổng hợp protein Cyt có trình tự không đồng nhất với bất kỳ gen độc tố nào. Hoạt tính diệt côn trùng của protein này chưa được xác định rõ ràng.

1.3. Cơ chế tác động diệt côn trùng của bào tử, tinh thể *Bt*:

Tác động diệt côn trùng của *Bt* là theo đường độc vị: bào tử, tinh thể độc được sâu tiêu hoá, vào đến ruột giữa, dưới tác động của pH kiềm đường ruột côn trùng và hệ enzym proteaza trong ruột, tinh thể độc hay còn được gọi là tiền độc tố được phân cắt ra thành các phần có trọng lượng phân tử nhỏ hơn có tính độc (Nhân độc). Các phần này bám dính vào các tế bào biểu mô màng ruột tạo nên các lỗ rò ở màng. Các ion và nước đi vào tế bào qua các lỗ rò, làm cho tế bào tích nước, phình to dẫn đến phá huỷ tế bào và toàn bộ lớp lót màng ruột, côn trùng bị liệt ruột, ngừng ăn và chết.

1.4. Các phương pháp nghiên cứu làm tăng hiệu quả của các chế phẩm *Bt* diệt côn trùng:

Có nhiều phương pháp khác nhau để làm tăng hiệu quả của các chế phẩm *Bt* diệt côn trùng. Trước tiên là các phương pháp cổ điển, đó là nghiên cứu phân lập các chủng giống mới, định rõ tính chất của các gen độc tố diệt côn trùng mới và các protein độc tố của chúng; nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy tối ưu về nhiệt độ, pH, nguồn dinh dưỡng carbon, nitơ; nghiên cứu để các dạng sản phẩm *Bt* ngày càng sử dụng thuận tiện và có hiệu quả hơn. Phương pháp thứ hai hiện đang được quan tâm rất lớn, đó là sử dụng kỹ thuật gen và tái tổ hợp DNA. Có thể chuyển gen độc tố diệt côn trùng vào thực vật, vào vi khuẩn hoặc vào virus.

Chuyển gen *Bt* vào thực vật: Với sự phát triển của công nghệ biến nạp thực vật (technology of transformation plant) đã cho phép chuyển các gen lạ vào nhiều loài cây quan trọng để tạo các giống cây có năng suất cao, có khả năng chống chịu với các điều kiện ngoại

cảnh bất lợi, chống được sâu bệnh. Trong lĩnh vực chuyển gen độc tố diệt côn trùng *Bt* vào thực vật đến nay đã có trên 25 loài thực vật đã được chuyển gen để tổng hợp các protein tinh thể độc đặc trưng diệt trừ sâu bộ Cánh vẩy và bộ Cánh cứng. Những thực vật được sử dụng làm cơ chất chuyển gen là bông, ngô, lúa, khoai tây, đậu tương, thuốc lá, cà chua. Các thành công nhất thuộc về sự chuyển và ổn định các protein Cry vào cây bông và cây thuốc lá (11, 12, 15).

Chuyển gen độc tố diệt côn trùng vào các vi sinh vật chủ: Các thí nghiệm chuyển gen độc tố diệt côn trùng *Bt* vào vi khuẩn lam *Pseudomonas fluorescens* ở rễ cây, các loại sâu đục rễ cây sẽ ăn rễ cây, tức là sẽ ăn độc tố của *Bt* đã được công ty Monsanto thực hiện từ cuối những năm 1988. Một số công trình nghiên cứu khác đã tách dòng gen cry3A từ *Bt* subsp. *tenebrionis* và biến nạp vào vi khuẩn cố định đạm *Rhizobium leguminosarum*. Thể cộng sinh này có tác dụng diệt bọ vòi voi hại cỏ ba lá mà không phá huỷ các nốt sần ở cả cây đậu và cỏ ba lá trắng.

Tuy nhiên, những nghiên cứu tách dòng và biến nạp các gen độc tố diệt bọ gây muỗi của *Bt* subsp. *israelensis* và *Bacillus sphaericus* vào các loại vi khuẩn lam như *Cyanobacteria*, *Caulobacteria* mặc dù đã thành công, nhưng mức độ biểu hiện và độc tính còn thấp, vì vậy các sản phẩm tái tổ hợp này chưa đưa ra được dạng thương phẩm (7, 17).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu:

2.1.1 Vi sinh vật:

Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong sưu tập giống vi sinh vật công nghiệp. Viện Công nghiệp thực phẩm.

2.1.2 Côn trùng: Sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh (*Helioverpa armigera*)

Sâu sử dụng cho nghiên cứu ở tuổi 2 đầu tuổi 3. do Trung tâm đấu tranh sinh học, Viện Bảo vệ thực vật cung cấp, lấy về thử ngay.

2.1.3 Hoá chất, vật liệu:

Một số hoá chất quan trọng thường dùng pepton, cao nấm men, glucoza, bột đậu tương, bột ngô, chất mang, chất kết dính, thạch và một số nguyên tố khoáng, vi lượng khác.

2.1.4 Dụng cụ thí nghiệm:

Máy lắc tròn, máy ly tâm siêu tốc, máy ly tâm thường, kính hiển vi quang học Nikon E600, thiết bị chạy điện di, tủ ẩm, tủ sấy, tủ lạnh, một số bình tam giác có dung tích 1000ml, 500ml, 250ml và các dụng cụ thí nghiệm khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

2.2.1 Giữ giống: Sử dụng môi trường dinh dưỡng LB (Luria – Bertani) gồm: LB – agar, cao nấm men, NaCl, Tryptone-bacto; pH=7,5.

Môi trường được phân vào ống nghiệm, khử trùng ở nhiệt độ 121°C- 30 phút, giống được cấy vào ống thạch nghiêng và được nuôi cấy ở tủ ẩm 30°C- 72 giờ, bảo quản ở tủ lạnh và dùng để nhân giống, lên men.

Môi trường cho lên men: Bao gồm các môi trường cơ bản và các môi trường sử dụng các nguyên liệu thay thế như sau (1, 2, 3, 16, 18):

- Môi trường CYS gồm: bacto-pepton, cao nấm men, glucoza, các muối khoáng : $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $FeCl_3$, KH_2PO_4 , pH=7,2.
- Môi trường HP gồm: pepton TQ, glucoza, các muối khoáng : KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, H_2SO_4 , $CaCl_2$, pH=7,5.
- Môi trường HPT: bột đậu tương, bột ngô, các muối khoáng: KH_2PO_4 , $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, pH=7,5.

- Môi trường B2B: là môi trường HPT có bổ sung bột nấm men bia.

Đếm số lượng tế bào dinh dưỡng (TBDD) và bào tử tự do (BTDD) trên kính hiển vi quang học NIKON E600 với độ phóng đại 400 lần bằng buồng đếm Neubauer: Dịch nuôi cấy được pha loãng 10 hoặc 100 lần. Đếm số lượng TBDD và BTDD ở 5 ô lớn của buồng đếm. Mỗi ô lớn chứa 16 ô nhỏ. Số lượng TBDD và BTDD trong 1ml dịch nuôi cấy là số đếm trung bình trong một ô lớn $\times 2,5 \times 10^5$ tế bào/ml (1).

BTDD còn được xác định theo phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch ở hộp petri [1, 16, 18)]. Dịch nuôi cấy pha loãng, xử lý ở nhiệt độ 65°C trong 15 phút để diệt TBDD và các tế bào lạ, nuôi trên hộp petri chứa môi trường thạch nuôi 24-72 giờ nhiệt độ 28-30°C. Số lượng bào tử trong 1ml dịch nuôi cấy ta tính được thông qua đếm số khuẩn lạc trên hộp petri nhân với hệ số pha loãng.

Định lượng protein của bào tử và tinh thể bằng phương pháp Lowry. Phương pháp dựa trên cơ sở: phản ứng tạo màu giữa protein và thuốc thử folin. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Biết được mật độ quang của dung dịch protein nghiên cứu với thuốc thử folin, dựa theo đường chuẩn protein tinh khiết với thuốc thử này, từ đây ta xác định được hàm lượng của protein nghiên cứu [1].

Đồ thị chuẩn được dựng với albumin huyết thanh bò (BSA) với thang chuẩn từ 0-300µg. Các mẫu pha với nồng độ BSA khác nhau, được bổ sung dung dịch mẫu folin, lắc kỹ đo OD ở bước sóng 720nm, trục hoành là nồng độ protein BSA, trục tung là giá trị OD.

Mẫu protein bào tử và tinh thể độc tố tinh chế cũng bổ sung dung dịch mẫu folin đo OD ở bước sóng 720 nm. Từ đồ thị chuẩn và giá trị OD đo được ta tính ra nồng độ protein của mẫu đo và suy ra lượng protein tổng (protein tổng bao gồm protein của bào tử tinh thể, protein của thành phần môi trường được giữ lại cùng bào tử tinh thể khi thu hồi bằng phương pháp li tâm, protein của màng trong tế bào khi tế bào đã tan rã hết) trong dịch lên men.

2.2.5.2 Xác định trọng lượng protein tinh thể.

Protein tinh thể của *Bt* bao gồm cả protein bào tử được xác định trọng lượng phân tử bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit-SDS (PAGE-SDS): Điện di là quá trình dịch chuyển của các phân tử tích điện trong một dung dịch điện trường. Dưới ảnh hưởng của điện trường các protein đều được di chuyển về phía cực dương bởi vì chúng có điện tích âm, tốc độ dịch chuyển

tỷ lệ thuận với diện tích của điện tử và phụ thuộc vào hình dạng kích thước của phân tử cũng như lực ion, pH, thành phần của dung dịch để chạy [4]. Sau khi chạy điện di xong ta xác định:

Định tính phân tử protein: Nhuộm gel để phát hiện protein với Coomassie Brilliant Blue.

Định lượng protein: Dựa trên độ đậm nhạt của băng đã phát hiện khi so sánh với các băng chuẩn đã biết trên cùng một bản gel.

2.2.4 Xác định gen mã hoá tổng hợp tinh thể độc của các chủng Bt

2.2.4.1 Kỹ thuật tách chiết ADN

Việc tách chiết ADN được thực hiện qua các bước sau:

- *Li tâm thu tế bào*: Dịch lên men được li tâm 5770 v/ph ở 5°C trong 10 phút. Phần cặn được giữ lại, phần dịch trong được bỏ đi.

- *Phân huỷ màng tế bào, hoà tan protein*: Phần cặn được hoà trong 5 ml dung dịch TES (100 ml TES 10X: Tris-base: 3,63 g, EDTA: 1,86 g, NaCl: 29,22 g) 20% chứa 20% sucrose, bổ sung lizozym, để yên ở 37°C trong 60 phút sau đó bổ sung 5 ml dung dịch SDS 8% trong dung dịch TES, lắc nhẹ 20 v/ph ở 68°C trong 15 phút.

- *Loại bỏ protein, lipid và ARN*: Bổ sung dung dịch NaCl 5M trong TES, lắc nhẹ 20 v/ph ở 68°C trong 5 phút. Giữ qua đêm trong tủ lạnh ở 4°C sau đó li tâm 10000 v/ph ở 5°C trong 30 phút, giữ lấy dịch trong loại bỏ cặn trắng. Bổ sung tiếp ARNase và Proteaza K giữ ở 37°C trong 15 phút. Bổ sung dung dịch phenol/chloroform/isolamin (25v:24v:1v), lắc mạnh, li tâm 10000 v/ph ở 20°C trong 5 phút. Loại phần phía dưới giữ phần dịch nổi trên cùng. Tiếp tục bổ sung dung dịch chloroform/isolamin (24v:1v), lắc mạnh, ly tâm 10000 v/ph trong 5 phút ở 20°C. Loại bỏ phần dịch dưới, giữ phần dịch nổi trên cùng.

- *Kết tủa ADN*: Bổ sung etanol 100%, giữ ở dưới -20°C trong 20 phút sau đó li tâm 15000 v/ph ở 4°C trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch, giữ phần cặn. Tiếp tục bổ sung etanol 70%, li tâm 15000 v/ph ở 4°C trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch, giữ phần cặn chính là ADN tinh khiết.

- *Bảo quản*: Đưa ADN thu được vào làm khô trong hệ thống hút chân không trong 10 phút. Sau đó hoà tan ADN trong nước cất vô trùng rồi đưa vào bảo quản ở -4°C.

2.2.4.2 Phương pháp PCR

Để tuyển chọn nhanh các chủng *Bacillus thuringiensis* mang gen Cry mã hoá tổng hợp sinh tổng hợp protein tinh thể gây độc cho côn trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera) chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR (1, 2, 9, 16).

Quy trình thực hiện phản ứng PCR được thực hiện như sau:

- *Nuôi cấy vi khuẩn*: Các chủng Bt nghiên cứu được nuôi cấy và tách chiết ADN. Dùng 3 µl ADN tiến hành phản ứng PCR.

- *Chuẩn bị phản ứng*:

STT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Nước	20,2
2	Taq buffer	3,0
3	dNTP	0,3
4	Môi (prime)	3,0
5	Taq polymerase	0,5
6	ADN mẫu	3,0
Tổng thể tích		30,0

Chương trình chạy PCR:

Nhiệt độ	Thời gian (phút)	Tác dụng	Số chu kỳ
95	2	Chu kỳ vào	1
95	1	Biến tính	30
50	1	Gắn môi	
72	1	Tổng hợp	
72	5	Chu kỳ ra	1

Trình tự nucleotit của 2 cặp môi tổng hợp gen cryIA được mô tả trong bảng sau:

STT	Môi	Trình tự	Gen
1	Lep 1A	5' CCG GTG CTG GAT TTG TGT TA 3'	Cry IA
2	Lep 1B	5' AAT CCC GTA TTG TAC CAG CG 3'	Cry IA
3	Lep 2A	5' CCG GAG AAG TCA AAC ATG CG 3'	Cry IA
4	Lep 2B	5' TAC ATG CCC TTT CAC GTT CC 3'	Cry IA

Kết quả tổng hợp ADN bằng kỹ thuật PCR được quan sát trên gel agarose 0,8% sử dụng Marker Lambda DNA/HinIII làm đối chứng.

2.2.4.3 Phương pháp điện di trên gel agarose

Để kiểm tra kết quả của phản ứng PCR chúng tôi sử dụng phương pháp điện di trên gel agarose.

Quá trình được thực hiện như sau:

- *Pha đệm*: Chúng tôi tiến hành pha dung dịch đệm TAE 5X có thành phần cho 100 ml như sau: Kiềm Tris (Tris-base) 4,84 g, Axít axetic 1,14 g, EDTA 0,5M 2 ml, Nước cất 2 lần cho vừa đủ, pH = 8,0. Trong quá trình chạy điện di chúng tôi dùng dung dịch đệm TAE -1X.

- *Đổ gel*: Cân 0,8g agarose cho vào 100 ml dung dịch TAE-1X. Đun sôi cho đến khi agarose tan hết. Để nguội đến 50-60°C. Đổ gel vào giá thể nằm ngang đã cài sẵn lược. Để 30 phút cho tới khi bản gel cứng, rút lược và đặt bản gel vào máy điện di.

- *Tra mẫu*: Dùng pipet hút 15µl sản phẩm PCR. Trộn đều sản phẩm với 2µl xilenxianol (xylencyanol), xanh bromophenol (bromophenol blue). Tra mẫu vào giếng.

- *Chạy điện di*: Chạy điện di ở điện áp 60V trong thời gian 1 giờ cho tới khi vạch mẫu đi được 2/3 bản gel.

- *Đọc kết quả*: Sau khi chạy điện di, bản gel được ngâm vào dung dịch ethidium bromua trong 15 phút, sau đó lấy bản gel ra và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Kết quả được đọc bằng cách soi bản gel trên máy soi UV với bước sóng $\lambda = 300$ nm. Chuỗi ADN mới được nhân lên trong phản ứng PCR sẽ hiện hình dưới dạng những vạch đỏ màu da cam.

2.2.5 Phương pháp tạo chế phẩm Bt

2.2.5.1 Tạo chế phẩm dạng lỏng

Chế phẩm lỏng được tạo khá đơn giản: Sau khi kết thúc quá trình lên men ta chỉ cần bổ sung chất bảo quản (0,4% benzoat natri) và đem đóng chai, sử dụng.

2.2.5.2 Tạo chế phẩm dạng bột

Theo các tài liệu nghiên cứu thì phương pháp tạo chế phẩm bột là tối ưu nhất đối với việc sản xuất tạo chế phẩm Bt diệt côn trùng. Chế phẩm dạng bột không những ưu việt vì thuận tiện trong quá trình bảo quản, vận chuyển mà là các hạt dạng nhỏ này phân tán đều trong dịch phun, không bám cặn trên lá sau khi phun.

Quy trình thu chế phẩm dạng bột được thực hiện như sau:

Dịch lên men → li tâm thường trong 30 phút ở t^0 phòng → thu dịch cặn → bổ sung chất phụ gia → sấy khô có quạt thông gió ở t^0 45-50°C → sản phẩm đạt độ ẩm 10-12%.

Xác định số lượng bào tử trong chế phẩm bột (1)

Kiểm tra số lượng bào tử trong chế phẩm chúng tôi tiến hành pha loãng chế phẩm bột ở các nồng độ khác nhau: 10^{-3} , 10^{-4} , ..., 10^{-9} . Xử lý nhiệt ở $65^{\circ}\text{C}/15$ phút (nhiệt độ này TBSD và các tế bào lỵ chết hết, chỉ còn lại bào tử của *Bt*). Dem cấy vào hộp Petri có chứa môi trường (gồm thạch, cao thịt, pepton, NaCl) đã thanh trùng. Xác định số lượng bào tử thông qua việc đếm số khuẩn lạc mọc trong hộp Petri.

2.2.6 Phương pháp thử hoạt lực sinh học của chế phẩm *B.t* diệt côn trùng (14)

- Loại sâu thử: Sâu tơ, sâu xanh, sâu khoang dùng sâu tuổi 2 đầu tuổi 3, không cho sâu ăn trước 3 giờ
- Mẫu để thử: lá bắp cải, lá đậu tương, lá cải xanh, lá thầu dầu...

Tiến hành: Tuỳ theo từng loại sâu mà ta dùng lá thử cho thích hợp: sâu tơ dùng lá cải xanh, sâu xanh dùng lá đậu tương hoặc lá bắp cải, sâu khoang dùng lá thầu dầu. Những lá này được ngâm 2 giờ, rửa sạch, lấy ra để ráo nước cho khô, cân 2-5 gam lá trên một mẫu thử.

Pha loãng chế phẩm *Bt* ra các nồng độ cần thử bằng nước cất vô trùng, mỗi chế phẩm thử 5-8 nồng độ, mỗi nồng độ tiến hành song song 2-3 lần – nồng độ tương đương.

Nhúng lá ngập vào các nồng độ *B.t* đã pha loãng, thời gian 5 phút lấy ra để lá lên khay sạch, để khô tự nhiên. Sau đó cho lá đã khô nước vào các cốc sạch (có ghi nồng độ thử) và mỗi nồng độ thử 10 sâu (riêng đối với sâu xanh ta phải nuôi riêng một sâu trong một lọ penixilin) đậy nắp.

Nuôi ở nhiệt độ phòng nơi thoáng mát. Theo dõi tỷ lệ sâu chết sau 24, 48, 72 giờ.

Song song với các mẫu thử ta tiến hành mẫu đối chứng: lá rửa sạch để khô nước tự nhiên, cân 2-5g lá cho vào cốc và thả 10 sâu trên 1 cốc. Đậy nắp cốc và theo dõi các thời gian như các mẫu thường

Độ diệt sâu hữu hiệu của chế phẩm *Bt* được đánh giá theo công thức Abbott (4):

$$D_{hh} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

trong đó D_{hh} : độ hữu hiệu

T : tỷ lệ sâu sống ở mẫu đã qua xử lí thuốc

C : tỷ lệ côn trùng sống ở mẫu đối chứng cùng thời điểm đó

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Chọn giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có hoạt lực diệt sâu tơ cao

- Đã khảo sát, lên men qui mô phòng thí nghiệm, lựa chọn 12 chủng giống vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) trong bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm, Bộ công nghiệp với ký hiệu, nguồn gốc được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Các chủng giống *Bacillus thuringiensis* (Bt) lựa chọn sử dụng nghiên cứu

Stt	Ký hiệu chủng giống	Nguồn gốc	Hình dạng tế bào/ bào tử	Hình dạng tinh thể protein
1	<i>Bt aizawai</i>	Phân lập từ đất Hà Nội	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, nhỏ
2	<i>Bt kurstaki</i> CP	Phân lập từ đất Hà Tây	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, nhỏ
3	<i>Bt kurstaki</i> D (94)	Phân lập từ đất Nam Định	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám ngắn, to
4	<i>Bt</i> (w)	Sưu tập giống Vũ Hán, Trung Quốc	Nhỏ, ngắn/trứng	Quả trám, hình khối
5	<i>Bt morrisoni</i> HD-12	Sưu tập giống Vũ Hán, Trung Quốc	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, nhỏ
6	<i>Bt</i> AMS	Phân lập từ đất Vĩnh Phúc	To, ngắn/trụ	Quả chanh yên, quả trám, to
7	<i>Bt</i> BD1	Phân lập từ lá Hà Tây	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám ngắn, to
8	<i>Bt</i> BD3	Phân lập từ đất Hà Nội	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám ngắn, to
9	<i>Bt</i> BD17	Phân lập từ đất Nam Định	Nhỏ, dài/trụ	Quả trám, nhỏ
10	<i>Bt</i> BD22	Phân lập từ đất Nghệ An	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, quả chanh yên
11	<i>Bt</i> LX (Dendrobacillin)	Phân lập từ chế phẩm Liên Xô	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, nhỏ
12	<i>Bt</i> VN 5	Phân lập từ lá cây, Nam Định	Nhỏ, ngắn/trụ	Quả trám, to

- 12 chủng *Bt* trong bộ sưu tập giống đã được nghiên cứu về sự phát triển, tạo và tách bào tử, tinh thể độc tố diệt côn trùng khi nuôi cấy trên môi trường chứa glucoza, cao nấm men, pepton và các muối khoáng (Môi trường CYS) (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng phát triển, tạo và tách bào tử, tinh thể của các chủng *Bt*

Stt	Ký hiệu chủng giống	Môi trường	Số lượng bào tử, tinh thể ($\times 10^9/ml$)	Tỷ lệ tách bào tử tinh thể (%)
1	<i>Bt aizawai</i>	CYS	0,69	97
2	<i>Bt kurstaki</i> CP	CYS	0,52	86
3	<i>Bt kurstaki</i> D (94)	CYS	0,78	94
4	<i>Bt</i> (w)	CYS	0,52	90
5	<i>Bt morrisoni</i> HD-12	CYS	0,76	96
6	<i>Bt</i> AMS	CYS	0,92	96
7	<i>Bt</i> BD1	CYS	0,83	92
8	<i>Bt</i> BD3	CYS	0,80	98
9	<i>Bt</i> BD17	CYS	7,45	93
10	<i>Bt</i> BD22	CYS	0,59	78
11	<i>Bt</i> LX (Dendrobacillin)	CYS	1,42	99
12	<i>Bt</i> VN 5	CYS	0,92	94

Một số chủng *Bt* đã được nghiên cứu chi tiết về sự tiêu thụ đường glucoza và protein trong quá trình nuôi cấy trên môi trường CYS. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn đều tiêu thụ mạnh glucoza. Từ giờ thứ 6 đến giờ thứ 18 lượng glucoza giảm rất nhanh tương ứng với giai đoạn phát triển logarit. Sau đó glucoza được tiêu thụ chậm dần. Từ sau pha cân bằng trở đi hàm lượng glucoza trong môi trường hầu như không đổi. Tuy nhiên khả năng tiêu thụ glucoza không hoàn toàn giống nhau giữa các chủng, đạt từ 80-90 %. Sự biến đổi hàm lượng đạm hoà tan trong môi trường nuôi cấy diễn ra không giống với sự biến đổi glucoza. Từ hàm lượng đạm ban đầu 3,1-3,7g/l, trong quá trình nuôi cấy *Bt*, đạm trong môi trường lại tăng lên cho đến tận khi kết thúc quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên lượng đạm tăng lên trong quá trình nuôi cấy của các chủng khác nhau không giống nhau: lượng đạm của chủng *Bt* BD22 khi kết thúc lên men tăng lên đến

7,9 g/l nghĩa là gấp đôi hàm lượng ban đầu trong khi đó chủng *Btk* CP sau 48 giờ nuôi cấy hàm lượng đậm trong môi trường chỉ tăng lên đến 4,4 g/l. Hiện tượng này cũng đã được một số tác giả công bố nhưng đều chưa có sự giải thích [9, 13].

4 loại môi trường lên men gồm môi trường cơ bản (CYS, HP) và các môi trường sử dụng nguyên liệu thay thế như bột ngô, bột đậu tương (HPT), bột men bia (B2B) đã được sử dụng. Kết quả cho thấy khi sử dụng môi trường có các nguyên liệu thay thế rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam, các chủng *Bt* sinh trưởng, tạo và tách bào tử, tinh thể protein tương đương với các môi trường chuẩn chứa glucoza và pepton trong khi thời gian nuôi cấy được rút ngắn từ 72 giờ xuống khoảng 48 - 54 giờ.

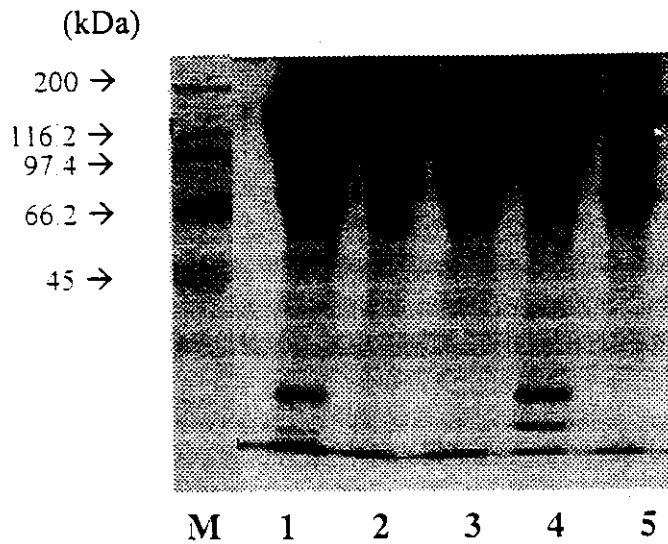
Các mẫu dịch lên men các chủng *Bt* nghiên cứu đã được đánh giá hiệu lực sinh học diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh (*Helioverpa armigera*) hại rau, tại Bộ môn Côn trùng, Viện Bảo vệ Thực vật. Đã chọn được 3 chủng giống *Bt* tốt nhất cho lên men và sản xuất.

- Cả 3 chủng *Bt* trên đều mang gene độc tố *cry* 1, tạo tinh thể độc tố diệt côn trùng hình tháp đôi (hình quả trám) có trọng lượng phân tử 130 và 67 kDa (Kilodalton), có hoạt tính diệt sâu cao (chỉ số LC_{50} từ 0,09 – 0,92 đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*) và 1,98 – 3,02 đối với sâu xanh (*Helioverpa armigera*)).

Bảng 3. Các chủng *Bt* được nghiên cứu bảo quản sử dụng cho sản xuất

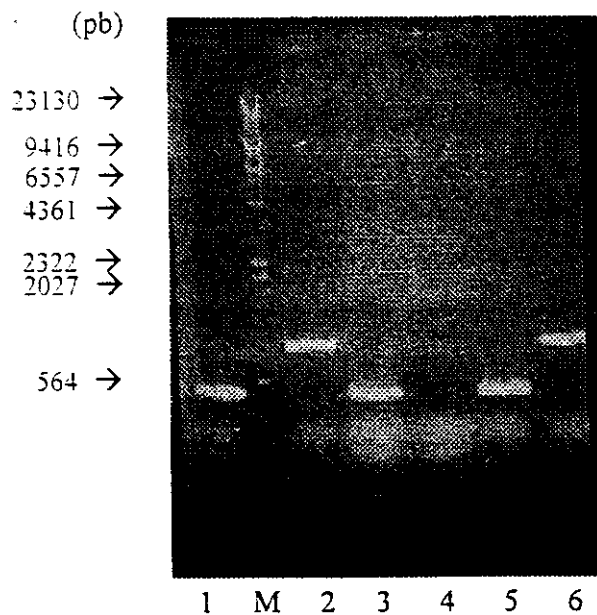
Stt	Tên giống/ môi trường	Đặc tính sinh hoá				
		<i>BT, TT/ml</i> ($\times 10^9$)	<i>Gen Cry</i>	<i>Protein</i> (KDa)	LC_{50} sâu tơ	LC_{50} sâu xanh
1	<i>Bt kurstaki</i> CP/HPT	1,12	Cry1A	130 và 67	0,09	2,41
2	<i>Bt kurstaki</i> D/HP	0,85	Cry1A	130 và 67	0,81	1,98
3	<i>Bt morrisoni</i> HD-12/HPT	0,92	Cry1A	130 và 67	0,67	3,02

- Chủng *Bt kurstaki* CP và *Bt kurstaki* D được lựa chọn, lưu giữ, bảo quản để dùng cho sản xuất thực nghiệm. Môi trường HPT có thành phần rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam, đã được nghiên cứu và sử dụng cho lên men trên thiết bị 500 lít để thu nhận chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh từ *Bacillus thuringiensis* mang tên Firibiotox – P (dạng bột) và Firibiotox – C (dạng dịch có đặc).



Hình 1: Điện di đồ protein tinh thể của các chủng *Bt*

Đường 1: Chủng *Btk* CP, 2: *Btk*, 3: *Bt* HD-12, 4: *Bt* BD22, 5: *Bta*, M: protein chuẩn



Hình 2: Điện di đồ trên gel agarose 0,8%

M: Marker lambda DNA/HinIII, 1: Chủng *Btk*CP, dùng cặp mồi Lep 1, 2: *2Btk*CP, dùng cặp mồi Lep 2, 3: *Bt* BD22, dùng cặp mồi Lep 1, 4: *Bt* BD22, dùng cặp mồi Lep 2, 5: *Bt* HD-12, dùng cặp mồi Lep 1, 6: *Bt* HD-12, dùng cặp mồi Lep 2

2. Nghiên cứu lựa chọn môi trường, điều kiện nuôi cấy *Bt* thích hợp quy mô phòng thí nghiệm và xưởng thực nghiệm:

- Đã chọn được môi trường lên men thay thế có thành phần nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm ở Việt Nam bao gồm bột ngô, bột đậu tương, bột nấm men bia thu hồi và các muối khoáng;
- Đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp:

1. Nhiệt độ nuôi cấy 28-30°C;
2. pH môi trường ban đầu là 7,0 và không điều chỉnh trong quá trình lên men. Sau quá trình lên men, pH dịch nuôi cấy tăng lên 7,5 – 7,7 khi sử dụng các môi trường chuẩn (HP, CYS) hoặc 7,8 – 8,0 khi sử dụng các môi trường có các nguyên liệu thay thế (HPT, B2B);
3. Nuôi cấy *Bt* trên máy lắc: máy lắc tròn, 200 vòng/phút, 50 ml môi trường/bình tam giác thể tích 500 ml, thời gian nuôi cấy từ 68 - 72 giờ khi sử dụng môi trường chuẩn (HP) hoặc từ 50 – 54 giờ khi nuôi cấy trên môi trường sử dụng một số các nguyên liệu thay thế (HPT);
4. Nuôi cấy *Bt* trên thiết bị 14 lít trong phòng thí nghiệm: thể tích môi trường 9 lít/ thể tích bình lên men 14 lít, sử dụng 450 ml giống cấp 1 (5%) nuôi cấy trên máy lắc (200 vòng/phút, 24 giờ, 28 – 30°C); khuấy 300 vòng/phút, sục khí 0,7-1,0 lít không khí/ lít môi trường/phút, thời gian nuôi cấy từ 48 – 50 giờ khi sử dụng môi trường HP và 38 – 44 giờ khi nuôi cấy trên môi trường HPT;
5. Nuôi cấy trên thiết bị lên men dung tích 500 lít tại xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm: Thể tích môi trường (HPT) 250 lít/ trên thể tích thiết bị lên men 500 lít, lượng giống cấp 2 là 1,25 lít (0,5 %), khuấy 200 vòng/phút (tốc độ khuấy cố định, không điều chỉnh được), sục khí 0,7-1,0 lít không khí/ lít môi trường/phút, thời gian nuôi cấy từ 30 – 38 giờ.

Các thông số lên men khi nuôi cấy trên máy lắc, thiết bị 14 lít và thiết bị 500 lít được trình bày trong bảng 4 cho thấy khi lên men ở các thiết bị lớn, mặc dù lượng giống cấp 1, 2 giảm dần nhưng thời gian nuôi cấy cũng giảm trong khi lượng bào tử, tinh thể và tỷ lệ tách bào tử, tinh thể tự do vẫn đạt tương đương khi nuôi cấy trên máy lắc. Điều này được giải thích là điều kiện thông khí ở các thiết bị lên men tốt hơn so với máy lắc nên vi khuẩn phát triển, tạo và tách bào tử, tinh thể tốt hơn.

Bảng 4: Các thông số lên men khi nuôi cấy *Bt* trong Phòng thí nghiệm và Xưởng thực nghiệm

Quy mô lên men	Môi trường nuôi cấy	Thời gian nuôi cấy (giờ)	Số lượng bào tử, tinh thể ($\times 10^9/\text{ml}$)	Tỷ lệ tách bào tử, tinh thể (%)
Máy lắc	HP	68 - 72	0,91-0,98	94 - 95
	HPT	50 - 54	0,78 - 0,82	92 - 94
Thiết bị lên men 14 lít	HP	48 - 50	1,04- 1,10	90 - 92
	HPT	38 - 44	0,98- 1,06	88 - 92
Thiết bị lên men 500 lít	HP	-	-	-
	HPT	30 - 38	1,10 – 1,20	88 - 90

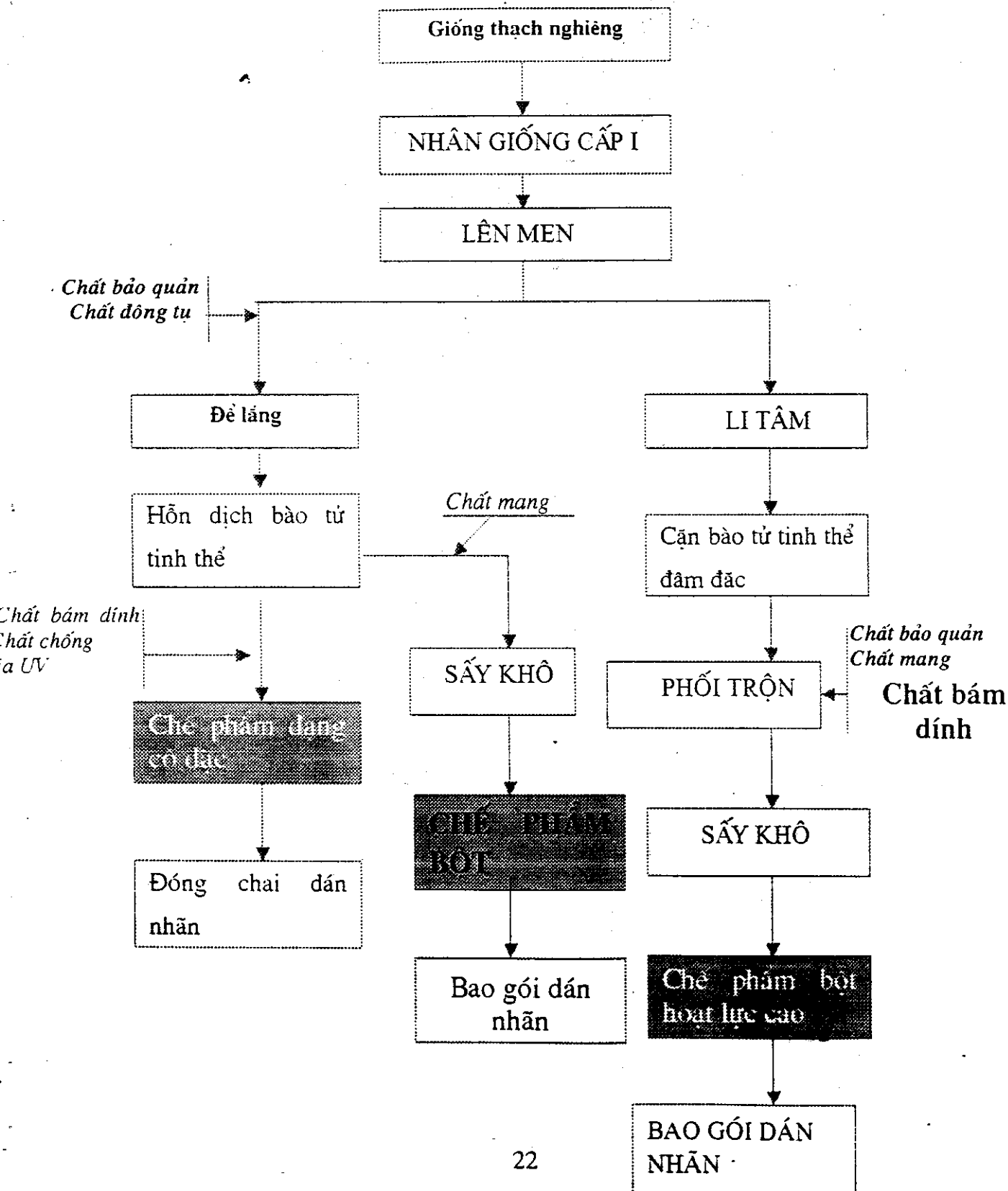
3. Nghiên cứu tạo chế phẩm *Bt* dạng dịch cô đặc và dạng bột thấm nước.

- Đã nghiên cứu hai phương pháp thu hồi bào tử tinh thể: phương pháp để lắng có bổ sung chất đông tụ và phương pháp ly tâm (ở nhiệt độ phòng, 30-45 phút, 10.000 vòng/phút hoặc ở 4°C, 10 phút, 10.000 vòng/phút).
- Chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng dịch cô đặc được tạo thành khi bổ sung các chất phụ gia như chất bám dính, chất làm tăng độ loãng, độ khuếch tán, chất chống tia tử ngoại mặt trời (tia UV), chất bảo quản vào hỗn dịch bào tử tinh thể thu được bằng phương pháp để lắng;
- Chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng bột được tạo thành khi bổ sung chất mang và các chất phụ gia như chất bám dính, chất làm tăng độ loãng, độ khuếch tán, chất chống tia tử ngoại mặt trời (tia UV), chất bảo quản vào hỗn dịch bào tử tinh thể thu được bằng phương pháp để lắng hoặc bằng phương pháp ly tâm tạo thành dạng bột nhão (paste). Khối bột nhão sau đó được sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50°C đến khi đạt độ ẩm 10 -12%, được nghiền, đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ phòng;

4. Quy trình sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis*

- Đã đưa ra quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng dịch cô đặc và dạng bột như sau:

QUY TRÌNH SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC *BACILLUS THURINGIENSIS*



5. Xây dựng mô hình trình diễn thử nghiệm và giới thiệu chế phẩm *Bt* để ứng dụng diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp.

- Đã triển khai 1 mô hình ứng dụng chế phẩm *Bt* trên sâu tơ hại rau su hào với diện tích 2,0 ha, tại xã Tiên Phong - Huyện Mê Linh - Vĩnh Phúc vào tháng 11 - 12 năm 2002, phun *Bt* bột với liều lượng 20g/bình phun, sâu tơ chết 71,6-78,8% sau 2-4 ngày phun thuốc và sử dụng *Bt* nước với liều lượng 100ml/bình phun hiệu quả trừ sâu tơ đạt 70,3 - 72,5% sau 2-4 ngày phun thuốc (Bảng 5)

Bảng 5. Kết quả sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh *Firibiotox - P* diệt sâu tơ hại rau tại mê Linh - Vĩnh Phúc, 2002

Mô hình thử nghiệm	Công thức thí nghiệm	Liều lượng sử dụng	Hiệu quả phòng trừ sau phun (%)			Ghi chú
			2 ngày	3 ngày	5 ngày	
Diện hẹp (50m ² /công thức)	Bt dạng bột	20 gam/bình phun	83,2	78,1	66,1	Thời tiết lạnh, gió đông bắc, thỉnh thoảng có mưa nhỏ, nhiệt độ 18 - 20°C
	Bt dạng bột	25 gam/bình phun	90,4	83,6	83,1	
	Bt dạng dịch	100 ml/bình phun	70,3	68,7	66,1	
	Bt dạng dịch	150 ml/bình phun	75,4	72,3	70,0	
	Đối chứng	Phun nước lã	0	0	0	
Diện rộng (1 ha/công thức)			2 ngày	4 ngày	7 ngày	Thỉnh thoảng có mưa nhỏ, nhiệt độ 20 - 25°C
	Bt dạng bột	20 gam/bình phun	71,6	78,8	68,3	
	Bt dạng dịch	100 ml/bình phun	70,3	72,5	63,4	
	Đối chứng	Phun nước lã	0	0	0	

Ghi chú: 20 - 25 gam/bình phun tương đương 1,6 - 2,0 kg/ha.

100 - 150 ml/bình phun tương đương 8 - 12 lít/ha.

- Đã triển khai 1 mô hình ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Firibiotox - P* trên một số loại sâu hại đậu với diện tích 2,5 ha, tại xã Thạch Môn- Huyện Thạch Hà - Tỉnh Hà Tĩnh vào tháng 7 năm 2003, phun *Bt* bột với liều lượng 25g/bình phun. Kết quả cho thấy (Bảng 6):
1. Trên đậu xanh: sau 7 - 10 ngày phun *Bt* hiệu quả diệt sâu cao, đạt 74,5 - 80,2% đối với sâu xanh đục quả; 69,5 - 79,7% đối với sâu đo ăn lá, tuy nhiên đối với sâu khoang ăn lá đậu xanh hiệu quả chỉ đạt 56,8 - 59,7%;

2. Trên đậu tương: sau 7 - 10 ngày phun Bt cũng có hiệu quả cao đạt 77,2 - 84,7% đối với sâu keo da láng; và đạt 59,5 - 60,2% đối với sâu khoang ăn lá.

Bảng 6. Kết quả sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P diệt một số sâu hại cây họ đậu tại Thạch Hà - Hà Tĩnh, 2003

Stt	Tên sâu hại	Hiệu quả phòng trừ (%) sâu phun				
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	10 ngày	12 ngày
1	Sâu đục quả (H.a) đậu xanh	57,3	66,7	74,8	80,2	73,7
2	Sâu khoang ăn lá đậu xanh	35,5	48,9	56,8	59,7	60,4
3	Sâu đo ăn lá đậu xanh	48,2	56,7	63,5	78,8	76,2
4	Sâu khoang ăn lá đậu tương	38,8	50,3	59,5	60,2	58,6
5	Sâu keo da láng ăn lá đậu tương	40,9	60,3	77,2	84,7	71,1

- Đã nộp sản phẩm để Ban chủ nhiệm đề tài giao cho các Chi cục Bảo vệ thực vật các tỉnh thử nghiệm trong thời gian từ 2002 - 2003. Kết quả được trình bày tại Bảng 7 như sau:

Bảng 7. Kết quả sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh Firibiotox - P diệt sâu hại một số cây trồng nông nghiệp tại Hải Phòng, Hà Nam, 2002 và 2003

Địa điểm, thời gian, diện tích thử nghiệm	Cây trồng	Sâu hại	Lượng thuốc sử dụng	Hiệu quả phòng trừ (%)
Hải phòng, 2002, 10 ha	Bắp cải	Sâu tơ	2 kg/ha	88,6
		Sâu khoang	2 kg/ha	87,0
Hải phòng, 2003, 7 ha	Bắp cải	Sâu tơ	2 kg/ha	75,0
			Bt 2 kg/ha + Trichoderma	74,5
Hà Nam, 2003, 20 ha	Bắp cải	Sâu khoang	2 kg/ha	77,5
	Su hào	Sâu khoang	1,4 kg/ha	86,8
	Bắp cải	Sâu khoang	Bt + NPV	83,4

- Thuốc an toàn cho người sử dụng, không ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng cây trồng, không ảnh hưởng đến thiên địch trên đồng ruộng.
 - Đã giới thiệu và chào bán sản phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bt* dạng bột Firibiotox – P để ứng dụng diệt một số sâu hại thuốc lá, hại đậu tương, đậu xanh, vải, nhãn, ngô và hoa nhài.
6. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến chất lượng và hoạt tính sinh học của sản phẩm:

Dịch thu được sau khi lên men trên thiết bị 14 lít (phòng thí nghiệm), và 500 lít (xưởng thực nghiệm) tạo các dạng chế phẩm, giữ mẫu bảo quản ở nhiệt độ thường và kiểm tra chất lượng:

- Đối với chế phẩm bột được bảo quản trong túi kẽm tráng thiếc và đối với chế phẩm dạng dịch cô đặc được đựng trong các chai nhựa đục.

- Sau các thời gian bảo quản: 3; 6; 12; 18 và 24 tháng, các dạng chế phẩm sẽ được kiểm tra hoạt tính trên sâu tơ (*P.xylostela*), sử dụng nồng độ 0,1 và 0,05%, đếm số sâu chết sau 4 ngày. Kết quả thử hoạt tính chế phẩm được trình bày ở bảng 8a, 8b cho thấy:

- Đối với chế phẩm *Bt* dạng dịch cô đặc: Số lượng bào tử tinh thể giảm 6 - 10% sau 6 tháng, 18 - 20% sau 12 tháng và 24 tháng. Hoạt tính diệt sâu giảm từ 8 - 12% sau 6 tháng, 25 - 27% sau 12 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng trong các chai nhựa đục. Chế phẩm bị phân thành 2 lớp dịch trong và cặn bào tử tinh thể. Màu sắc, mùi vị và độ pH của chế phẩm không thay đổi.

Bảng 8a. Thử hoạt tính chế phẩm dạng dịch cô đặc theo các thời gian bảo quản

Stt	Tên mẫu (mt, ngày sản xuất)	Hoạt tính chế phẩm sau các thời gian bảo quản							
		Dịch chưa qua thời gian BQ (Đ/C)		3 tháng BQ		6 tháng BQ		12 tháng BQ	
		BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)
1	Btk CP/HPT (20/9/2002 TBi 500 lít)	1,88	96	1,90	92	1,68	84	1,54	72
2	Btk CP/HPT (16/12/2002 TBi 500 lít)	2,06	98	2,04	96	1,92	90	1,62	72

Bảng 8b. Sự thay đổi hoạt lực diệt sâu tơ theo thời gian bảo quản của CP dạng bột

Stt	Tên mẫu (mt, ngày sản xuất)	Hoạt tính diệt sâu sau thời gian bảo quản							
		Dịch chưa qua thời gian BQ (Đ/C)		6 tháng BQ		12 tháng BQ		24 tháng BQ	
		BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)	BT, TT/ ml ($\times 10^8$)	Sâu chết (%)
1	Btk DA ₂ /HP (9/2/2002, máy lắc)	3,0	100	3,2	100	3,0	94	2,8	90
2	Btk CP/HPT (9/2/2002, TBì 14 lít)	3,0	100	2,9	100	3,1	94	3,0	92
3	Btk CP/HPT (20/9/2002 TBì 500 lít)	2,1	100	2,2	100	2,0	96	2,0	91
4	Btk CP/HPT (6/12/2002, TBì 500 lít)	2,0	100	2,2	100	2,2	96	2,1	93

- **Đối với chế phẩm bột:** Số lượng bào tử tinh thể gần như không thay đổi. Hoạt tính diệt sâu không giảm sau 6 tháng, sau một năm giảm 4 - 6% và sau 24 tháng giảm 7 - 10%. Sản phẩm được bao gói trong 01 lớp túi polyetylen và 01 lớp bao bì tráng thiếc và bảo quản ở nhiệt độ thường. Một số mẫu bảo quản sau 24 tháng có hiện tượng vón cục, có thể do thời gian nghiền và đóng gói mẫu lâu và chế phẩm bị hút ẩm.

KẾT LUẬN

Đề tài nhánh đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu, sản xuất thực nghiệm và ứng dụng thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis* được giao:

1. Đã lựa chọn, nghiên cứu, bảo quản, lưu giữ 3 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính sinh học cao, ổn định cho sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh;
2. Đã nghiên cứu phát triển, hoàn thiện công nghệ để sản xuất hai dạng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis* dạng bột và dạng dịch cô đặc. Sản phẩm được đăng ký với các tên thương mại Firibiotox – P và Firibiotox – C.

3. Đã xây dựng 2 mô hình và thử nghiệm ứng dụng chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis* Firibiotox diệt sâu tơ, sâu khoang hại rau và một số loại sâu hại đậu tương, đậu xanh. Hiệu quả diệt sâu tơ hại rau của chế phẩm *Bt* dạng bột với liều sử dụng 1,6 - 2,0 kg/ha đạt trung bình 78,5 - 82,4 %, diệt sâu khoang hại rau đạt 83,7%, diệt sâu đục quả đậu xanh đạt 74,8 - 80,2%, diệt sâu đo ăn lá đậu xanh đạt 63,5 - 78,8%, diệt sâu keo da láng ăn lá đậu tương đạt 77,2 - 84,7%.
4. Đã sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh *Bacillus thuringiensis* trên dây chuyền thiết bị lên men 500 lít tại xưởng thực nghiệm. Sản phẩm bột có chất lượng tốt, thời gian bảo quản có thể đạt 24 tháng (Sản phẩm được sử dụng trong xây dựng mô hình trình diễn; Nộp cho Ban-Chủ nhiệm đề tài sử dụng trong các hoạt động tuyên truyền, giới thiệu, quảng cáo, thử nghiệm; Chào bán, giới thiệu, cung cấp miễn phí hoặc bán để nghiên cứu ứng dụng diệt một số đối tượng sâu hại khác)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Hoài Trâm, Phạm Thu Trang (2000). Nghiên cứu phân loại một số chủng *Bacillus thuringiensis* diệt côn trùng. Trong: Tuyển tập các công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học, công nghiệp thực phẩm giai đoạn 1996 - 2000. Viện Công nghiệp thực phẩm. Nhà XB Khoa học kỹ thuật.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Thị Mùi, Lê Thị Hoàng Yến (1998). Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học từ *Bacillus thuringiensis* ở qui mô nhỏ. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Số 36: 49 - 54.
3. Võ Thị Thứ, Trần Văn Sỹ, Ngô đình Quang Bính (1996). Nghiên cứu protein độc tố của các chủng *Bacillus thuringiensis*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Số 2: 11 - 17.
4. Abbott. W. S. (1925). A method of counting the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol 18: 265 - 267.
5. Angus T. A. (1968). The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. World Review of pest control. V7, N1: 11 - 26.
6. Bailey L. (1971). The safety of pest - insect pathogens on beneficial insects. In: Microbial control of Pests and Mites. Eds by H.D. Burges and N.W. Hussay. Academic press: 491 - 506.
7. Bourgouin C., Klier A and Rapoport G. (1986). Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal - delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Mol. Gen. Genet 205: 390 - 397.

8. Carozzi N. B., Kramer V. C., Warren G. W., Evola S. and Koziel M. G. (1981). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Reaction Product Profiles. *Applied and Environmental Microbiology*: 3057 – 3061.
9. Chilcott C. N. and Wigley, P. J. (1992). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect Habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 244 – 247.
10. Crickmore N. D, Zeigler D. R., Feiteison J., Schneps E, Van Rie J., Releclus D., Baum J. and D. H. Dean (1998). Revision of the nomen culture for *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biolol. Rev.* 62: 807 – 813.
11. Hofte H. R. (1989). Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242 – 255.
12. Krieg A., Hurger A., Langenbruch G. and H. Schnetter. (1983). *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of coleoptera. *J. Appl. Entomol.* 96: 500 – 508.
13. Lopez – Meza J. E and J. E. Ibarra (1996). Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*: 1306 –1310.
14. Le Van Trinh, Vu Thi Suu, Nguyen Thi Nguyen. Result of bioassay of efficacy of bioinsecticides (both imported and local products) in controlling to insects pests in some crops. Report of National project on Development and Application of Bioinsecticides in the period 1996 – 1999. National Institute of Plan Protection.
15. Martin P. W. and R. S. Travers (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*: 2437 – 2442.
16. N. D. Binh, N. Q. Chau, N. V. Thuong, V. T. D. Chinh, N. H. Tram, N. V. Tuat, Y. H. Je, J. H. Chang and S. K. Kang. (1999). Isolation, screening and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Vietnam. In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Eds by Yu Ziniu, Sun Ming and Liu Ziduo. Science Press, Beijing – New York, pp. 46.
17. Schnepf H. E. and H. R. Whiteley (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein in *E.coli*. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 78: 2893 – 2897.
18. Thiery and E. Frachon (1997). Identification, isolation, culture and preservation entomopathogenic bacteria – Biological techniques manual of technology. *In: Insect Pathology*. Academic press, pp. 55 –77.

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
CHƯƠNG TRÌNH KHCN CẤP NHÀ NƯỚC KC04
☞ ☞ ☞

ĐỀ TÀI KC 04-12

THÔNG BÁO

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỬ
NGHIỆM CHẾ PHẨM Bt (*Bacillus thuringiensis*)
TRÊN GIÁ THỂ RẮN

CƠ QUAN THỰC HIỆN : TRUNG TÂM PHÒNG TRỪ VÀ
ĐA DẠNG SINH HỌC
VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI NHÁNH : TIẾN SĨ TRẦN QUANG TẤN

HÀ NỘI - 2003

THÔNG BÁO

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỦ NGHIỆM CHẾ PHẨM Bt (*Bacillus thuringiensis*) TRÊN GIÁ THỂ RẮN

Trần Quang Tấn¹, Hoàng Thị Việt¹, Phạm Anh Tuấn¹, Lê Thị Bảo Ngọc¹,
Nguyễn Thị Hoài Trâm², Đỗ Thị Thanh Huyền², Trần Đình Phả¹,
Nguyễn Thị Hoài Bắc¹, Lương Thanh Cù¹.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chế phẩm Bt có nguồn gốc từ vi khuẩn Bt (*Bacillus thuringiensis*) đã được nghiên cứu ứng dụng trong bảo vệ thực vật từ rất sớm và thu được nhiều thành tựu khả quan. Cho tới nay chế phẩm sinh học này đang được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới và vẫn khẳng định vị trí số 1 trong đấu tranh sinh học phòng chống sâu hại cây trồng.

Trên thế giới sản xuất chế phẩm Bt có 2 phương pháp: Phương pháp lên men chìm quy mô công nghiệp và phương pháp lên men hiếu khí trên giá thể rắn.

Phương pháp lên men chìm được xem như 1 giải pháp tối ưu cho sản xuất chế phẩm Bt và được áp dụng hầu hết tại các cơ sở sản xuất lớn, quy mô công nghiệp, với dung tích của 1 nồi lên men tới 50.000 lít. Trong khi đó phương pháp lên men hiếu khí trên giá thể rắn là một phương pháp thủ công sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền, sẵn có làm môi trường cho vi khuẩn Bt phát triển điều kiện hiếu khí tự nhiên.

Phương pháp lên men hiếu khí trên giá thể rắn được xem như 1 giải pháp tình thế song tỏ ra rất phù hợp đối với sản xuất tại các trang trại, các vùng sản xuất nông nghiệp có quy mô vừa và nhỏ, tại những nơi mà sản xuất thiếu vốn đầu tư, thiếu trang thiết bị máy móc, và hạn chế về khoa học công nghệ.

Tại Cuba đến nay đã có 128 xưởng sản xuất nhỏ, sản xuất chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật, trong đó có sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn sử dụng trong nông nghiệp.

Tại Việt Nam các nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt hầu hết tập trung vào phương pháp lên men chìm. Rất nhiều thành tựu thu được đã chứng tỏ tính đúng đắn của phương pháp này trong sự phát triển chung của xã hội. Song thực trạng sản xuất Bt trong nước hiện nay cho thấy 2 vấn đề nổi cộm sau:

1. Hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt chưa cao và chưa ổn định.
2. Chế phẩm Bt sản xuất có giá thành cao,

Thực chất vấn đề chế phẩm Bt nội có chất lượng chưa cao và chưa ổn định là ở công tác giống và quy trình công nghệ sản xuất. Giống Bt chính là các dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được phân lập từ tự nhiên cũng như sự tái tổ hợp nhân tạo. Các dòng vi khuẩn này luôn có hiện tượng thoái hóa, mất độc tính trừ sâu trong quá trình bảo quản, nên sau 1 thời gian giống vi khuẩn Bt không còn khả năng cho ra các chế phẩm Bt có hiệu lực trừ sâu như dạng gốc. Một vấn đề khác cũng không kém phần quan trọng làm giảm hiệu lực của chế phẩm Bt là tính kháng thuốc của sâu hại. Điều này luôn đẩy các

¹ Viện Bảo vệ Thực vật

² Viện Công nghiệp Thực phẩm

nhà khoa học vào thể bị động trong công tác chọn tạo nguồn giống vi khuẩn Bt có hiệu lực trừ sâu cao cho sản xuất.

Vấn đề thứ 2 trong sản xuất chế phẩm Bt hiện nay ở Việt Nam (theo phương pháp lên men chìm) là vốn đầu tư vào trang thiết bị lớn, chi phí sản xuất lớn, khấu hao chậm, tạo ra giá thành sản phẩm cao. Do đó các cơ sở sản xuất làm ăn chưa có lãi, sản phẩm không đứng vững được trên thị trường, và bị sản phẩm Bt nhập ngoại thao túng.

Từ những vấn đề trên và để thiết thực phục vụ nền sản xuất nông nghiệp xanh, sạch, an toàn và bền vững (trong đó có sản xuất rau an toàn). Đề tài đã được hình thành để góp phần đẩy mạnh sản xuất Bt trong nước, trọng tâm là các Chi cục bảo vệ thực vật có thể tự sản xuất được chế phẩm Bt với chi phí đầu tư thấp. Chế phẩm Bt sản xuất ra phải hội nhập 2 yếu tố là: chất lượng tốt, ổn định và giá thành rẻ. Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài nhánh “kết quả nghiên cứu sản xuất thử nghiệm chế phẩm Bt trên giá thể rắn” thuộc đề tài KC 04 -12 do Viện Bảo vệ Thực vật chủ trì.

2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1 Mục tiêu:

- Hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm Bt có chất lượng và giá thành rẻ theo phương pháp lên men hiếu khí trên giá thể rắn của Cuba có cải tiến theo điều kiện của Việt Nam với chất lượng chế phẩm ổn định phục vụ cho công tác BTVT trong nông nghiệp.

2.2 Nội dung:

- Nghiên cứu thu thập, chọn lọc và bảo quản ổn định các dòng vi khuẩn Bt có độc tính trừ sâu hại.
- Nghiên cứu, ứng dụng và cải tiến quy trình sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn có nguồn gốc Cuba cho phù hợp sản xuất Việt Nam.
- Đánh giá hiệu lực của chế phẩm Bt sản xuất trên 1 số đối tượng sâu hại.

3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

3.1 VẬT LIỆU:

3.1.1 Vật liệu cho công tác nuôi sâu và thử sinh học:

- Hóa chất, nguyên liệu sử dụng làm thức ăn nhân tạo
- Tủ sấy, tủ lạnh, nồi khử trùng, dụng cụ nấu môi trường thức ăn nhân tạo
- Vật liệu rẻ tiền, mau hỏng khác, (Bô can, đĩa petri, khay, chậu lòng ...vv)

3.1.2 Vật liệu cho công tác phân lập, tuyển chọn và bảo quản vi khuẩn:

- Buồng cấy, tủ ẩm, kính hiển vi, tủ sấy, máy ly tâm lạnh.
- Tủ lạnh, tủ lạnh sâu
- Hóa chất, môi trường cho nuôi cấy, phân lập vi khuẩn.
- Vật liệu rẻ tiền mau hỏng khác (ống mẫu, đĩa petri, que cấy, ...vv).

3.1.3 Vật liệu cho sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn

- Nguyên vật liệu, hóa chất tạo giá thể rắn cho sản xuất
- Tủ sấy, tủ ẩm, điều hòa.

3.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.2.1 Phương pháp nuôi sâu và thử sinh học:

- Phương pháp nuôi sâu trên cơ sở dây chuyền công nghệ nuôi sâu hàng loạt của phòng nuôi sâu, trung tâm Sinh học bằng thức ăn nhân tạo (TANT).

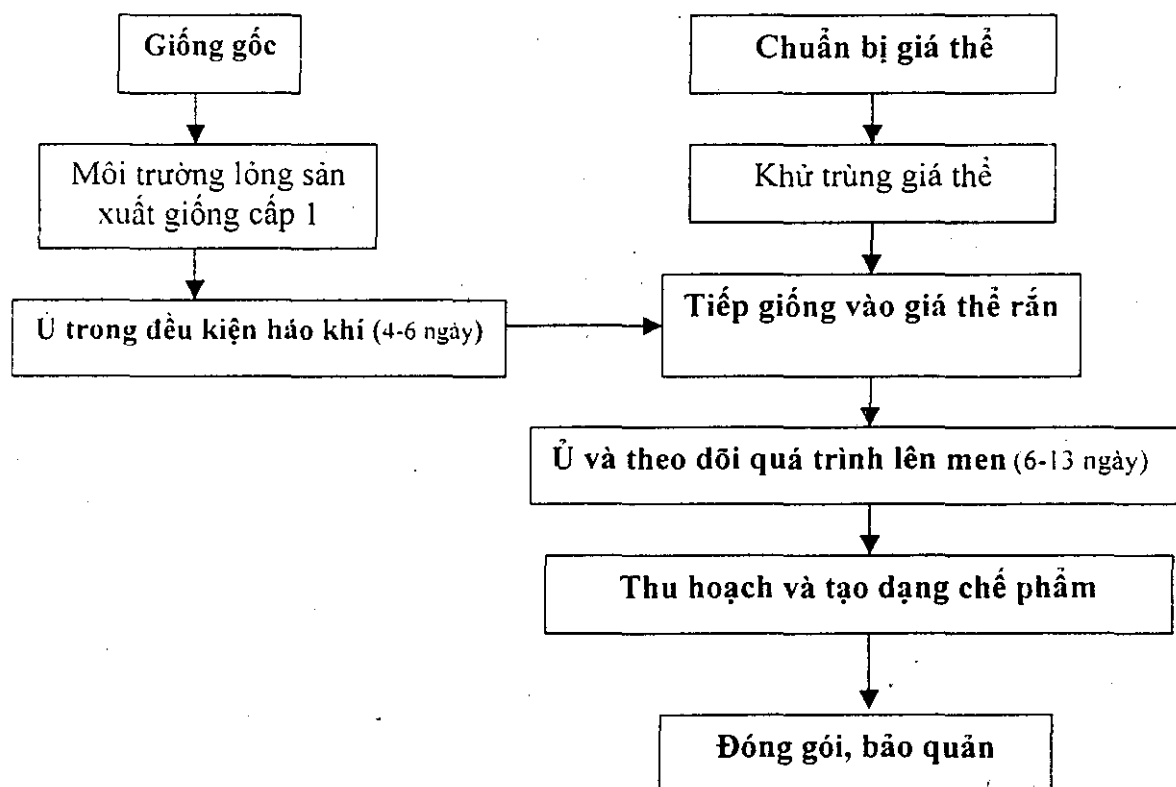
- Phương pháp thử sinh học đánh giá dòng vi khuẩn và chất lượng sản phẩm.
 - Tiến hành trên sâu non tuổi 2, nuôi cá thể với sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), nuôi tập thể với sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*)
 - Sử dụng thức ăn nhân tạo với sâu xanh (*H.armigera*) và sâu khoang (*S.litura*), thức ăn tự nhiên với sâu tơ (*P.xylostella*), sâu xanh bướm trắng (*P.rapae*)
 - Thử sinh học trong điều kiện ôn và ẩm độ được quản lý chặt chẽ, các yếu tố phi thí nghiệm được hạn chế tối đa.
 - Số liệu thí nghiệm được xử lý theo Abbott.

3.1.2 Phương pháp phân lập, tuyển chọn và bảo quản vi khuẩn:

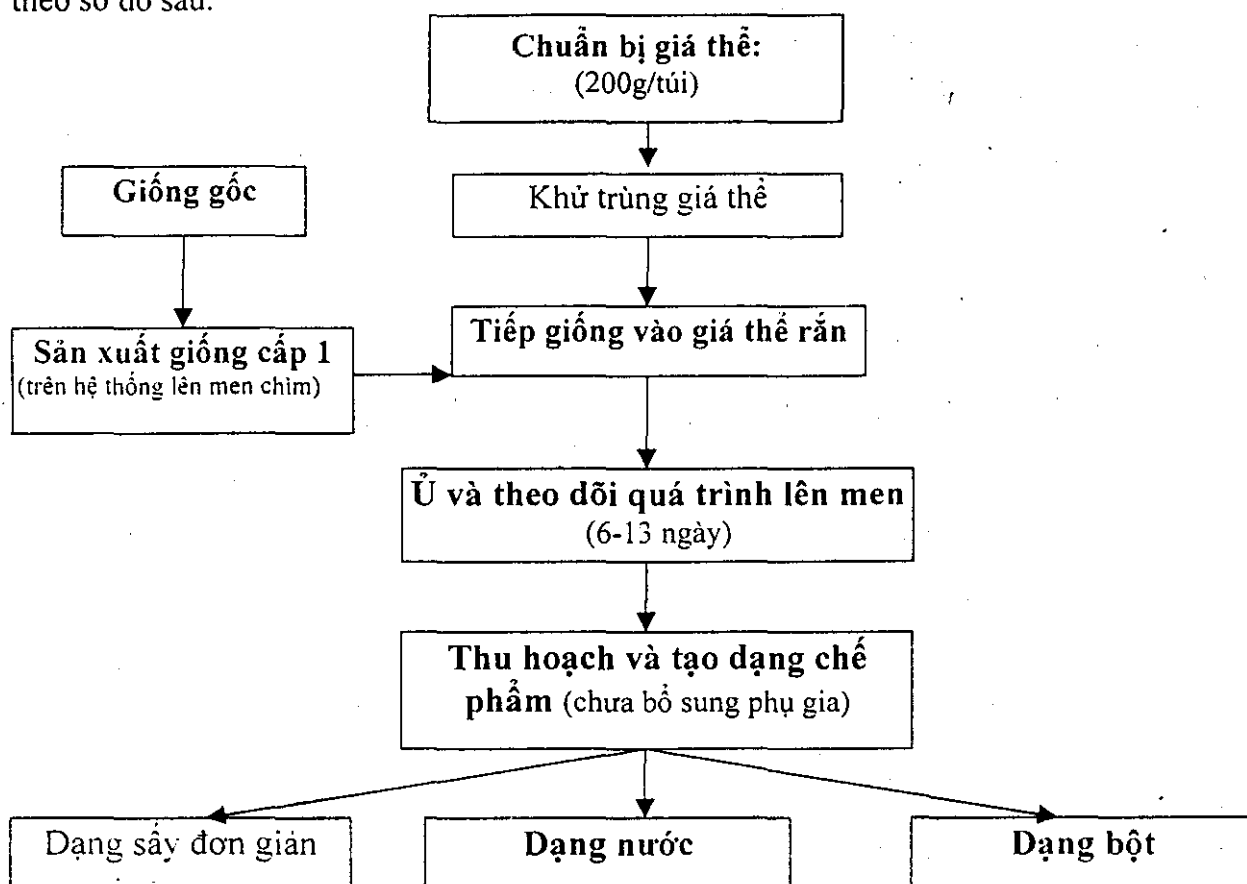
- Sử dụng phương pháp phân lập vi khuẩn (từ đất, từ mẫu sâu chết) của Michael G. Klein 1995.
- Phương pháp tuyển chọn dòng vi khuẩn có độc tính cao trên cơ sở thử sinh học.
- Phương pháp bảo quản và duy trì độc tính vi khuẩn Bt trên cơ sở của L. thiery & E. Frachon 1997.

3.1.3 Phương pháp sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn

- Sử dụng phương pháp sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn theo quy trình công nghệ của Viện Di truyền và Công nghệ Sinh học Cuba.



- Cải tiến quy trình công nghệ này cho phù hợp với điều kiện Việt Nam, cụ thể theo sơ đồ sau.



4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT

4.1 CÔNG TÁC GIỐNG.

Công tác giống là một trong những khâu then chốt trong quá trình sản xuất, do tính chất đặc thù của công tác sản xuất chế phẩm vi sinh nói chung và vi khuẩn Bt nói riêng, công tác giống bao hàm một số nội dung cơ bản sau:

- Chọn lọc các dòng vi khuẩn có độc tính cao với sâu hại
- Duy trì ổn định độc tính của các dòng
- Sản xuất giống cấp 1
- Công tác nuôi sâu và thử sinh học.

4.1.1 Thu thập, phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn có độc tính cao với sâu hại

Đây là công tác thường xuyên, liên tục phân lập vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong tự nhiên nhằm mục đích:

- Nâng cao hiệu lực trừ sâu của các chế phẩm Bt có nguồn gốc vi khuẩn này.
- Quản lý tính kháng thuốc của sâu hại với các chế phẩm Bt

Trong vụ đông năm 2003 đề tài đã tiến hành thu thập được 135 mẫu vi khuẩn từ các mẫu đất (90 mẫu), mẫu sâu chết (45 mẫu) trong tự nhiên. Đây là đỉnh cao sinh trưởng của 1 số loại sâu hại rau quan trọng và là thời điểm thích hợp nhất cho thu thập nguồn vi khuẩn Bt.

Vì khuẩn thu thập được trên 1 số đối tượng sâu hại như: Sâu tơ (*Plutella xylostella*) -28 mẫu; sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) -13 mẫu; sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) – 4 mẫu. Các mẫu đất thu trên 3 địa điểm là hợp tác xã Tiên Phong, Mê Linh (30 mẫu), hợp tác xã Yên Vĩnh, Mê Linh, Vĩnh Phúc (30 mẫu), hợp tác xã Phương Viên, Hoài Đức, Hà tây (30 mẫu). Các mẫu thu được đều tiến hành bảo quản trong điều kiện lạnh 4 °C cho tới khi sử dụng.(Bảng 1,2)

Bảng 1: Thu thập nguồn vi khuẩn từ mẫu đất tự nhiên trên chân ruộng chuyên canh rau (vụ đông 2003)

tt	Địa điểm thu thập mẫu	Số mẫu thu thập trên ruộng chuyên canh				
		sup lơ	cải xanh	bắp cải	su hào	Cải ngọt
1	Yên Vĩnh, Mê Linh, Vĩnh Phúc	6	8	6	4	6
2	Tiên Phong, Mê Linh	8	6	5	5	6
3	Phương Viên, Hoài Đức, Hà tây	7	6	7	4	6

Bảng 2: Thu thập nguồn vi khuẩn từ mẫu sâu chết tự nhiên (vụ đông 2003)

tt	Địa điểm thu thập mẫu	Số mẫu thu thập trên sâu chết		
		Sâu tơ	Sâu xanh bướm trắng	Sâu xanh (<i>H.armigera</i>)
1	Yên Vĩnh, Mê Linh, Vĩnh Phúc	3	3	1
2	Tiên Phong, Mê Linh	9	5	1
3	Phương Viên, Hoài Đức, Hà tây	6	1	-
4	Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội	4	2	1
5	Vân Nội, Đông Anh, Hà nội	6	2	1

Công tác phân lập đã và đang được tiến hành với các mẫu sâu chết thu được. Với 21 mẫu sâu tơ đã được kiểm tra, phân lập, và thử sinh học lại thì 14 mẫu có thể hiện độc tính trừ sâu tơ. Công tác đánh giá, so sánh và chọn lọc đang được tiếp tục triển khai.

4.1.2 Duy trì ổn định độc tính của các dòng

Song song với quá trình tuyển chọn các dòng vi khuẩn, công tác duy trì hoạt lực trừ sâu của các dòng cũng là 1 yếu tố quan trọng. Trong thực tế cho thấy đây là 1 yếu tố quyết định sự ổn định chất lượng sản phẩm. Đề tài đã và đang tiến hành công tác này với 1 số nội dung sau:

- *Bảo quản ngắn hạn:*

- Cây truyền trên môi trường Tryptose photphat agar (TPA)

- Bảo quản vi khuẩn gốc dưới dạng bào tử trong môi trường lạnh 4°C

- *Bảo quản trung hạn:*

- Sử dụng phương pháp giữ giống trên cát, công việc đã được tiến hành từ tháng 11/2003. Qua 6 tháng – 1 năm các mẫu này sẽ được kiểm tra lại.

- Phương pháp giữ giống trên đất đang được triển khai.

4.1.3 Sản xuất giống cấp 1

Giống cấp 1 được sản xuất từ dòng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis sub Kurstaki* trên hệ thống lên men chìm BioFlo 110 Fermentor Bioreactor 14 lít. Giống đảm bảo độ sạch và đạt 1.2×10^9 bào tử/ml. Với khả năng sản xuất của đề tài nguồn giống cho sản xuất hoàn toàn có thể chủ động được.

4.1.4 Công tác nuôi sâu và thử sinh học

Với quy mô và năng lực phòng nuôi sâu của đề tài, công tác nuôi sâu và thử sinh học Bt đã hoàn toàn được chủ động. Sử dụng thức ăn nhân tạo trong nuôi sâu xanh (*H. armigera*) và sâu khoang (*S. litura*) đề tài đã chủ động được nguồn sâu khỏe, đồng đều với số lượng lớn phục vụ công tác tuyển chọn, đánh giá các dòng vi khuẩn Bt đồng thời cũng thử sinh học kiểm tra chất lượng chế phẩm sản xuất ra.

Đối với sâu tơ (*P. xylostella*) và sâu xanh bướm trắng (*P. rapae*) các nghiên cứu sử dụng thức ăn nhân tạo trong nuôi hàng loạt vẫn chưa đem lại kết quả mong muốn, nên đề tài vẫn sử dụng thức ăn tự nhiên.

Kết quả nuôi sâu trong phòng năm 2003 đã đảm bảo cung cấp 3.600 sâu tơ, 1.080 sâu xanh; 1.080 sâu khoang. 720 sâu xanh bướm trắng cho công tác thử sinh học.

Tiếp nối các nghiên cứu trước đề tài đã và đang cải tiến công tác nuôi sâu bằng thức ăn nhân tạo tập trung vào các nội dung sau:

- Bổ sung và phục tráng nguồn giống sâu nuôi trong phòng
- Cải tiến thức ăn nhân tạo cho nuôi sâu theo hướng sử dụng agar để dễ tạo hình trong nuôi sâu quy mô lớn.

Đề tài đang cải tiến phương pháp thử sinh học và đánh giá Bt theo phương pháp của Viện nghiên cứu virus và vi khuẩn Wuhan – Trung Quốc. Các kết quả ban đầu cho thấy nhiều triển vọng ứng dụng.

4.2 KẾT QUẢ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM Bt TRÊN GIÁ THỂ RẮN.

4.2.1 Giá thể cho sản xuất chế phẩm.

Sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có tại địa phương làm giá thể cho sản xuất chế phẩm. Trên quy mô vừa và nhỏ các cơ sở sản xuất hoàn toàn có khả năng chủ động nguồn nguyên liệu. Hiện đề tài tiếp tục nghiên cứu sử dụng thêm 1 số nguồn phế liệu của công nghệ chế biến cho sản xuất nhằm tăng chất lượng sản phẩm.

Bảng 3: Thành phần giá thể rắn cho sản xuất chế phẩm Bt phương pháp thủ công

Tt	Thành phần môi trường	Khối lượng	
		Theo công nghệ Cuba	Theo công nghệ Cuba có cải tiến
1	Tầm	1 kg	1 kg
2	Đậu tương	-	8 g
3	Ngô bột	-	2g
4	Bột nấm men bia	-	10g
5	Trấu	-	100g
6	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g	0,3 g
7	ZnSO ₄	0.02 g	0.02 g
8	FeSO ₄	0.02 g	0.02 g
9	MnSO ₄	0.02 g	0.02 g
10	CaCO ₃	1 g	1 g
11	Nước lọc	1.300 ml	1.300 ml

Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn Bt phát triển tốt trên môi trường có bổ sung đậu tương, bột ngô, bột nấm men bia, trấu. Số lượng bào tử, kích thước tinh thể ở môi trường cải tiến đều tăng hơn so với môi trường sản xuất theo công nghệ Cuba.

Bảng 4: So sánh 1 số chỉ tiêu chất lượng chế phẩm Bt sản xuất trên 2 môi trường rắn

Tt	Chỉ tiêu so sánh	Kết quả đánh giá	
		Sản xuất theo CN Cuba	Sản xuất theo CN Cuba có cải tiến
1	Độ xốp	Tốt	Trung bình
2	Tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn	Chậm	Nhanh
3	Số lượng bào tử	Nhiều	Ít
4	Số lượng tinh thể	Nhiều	Ít
5	Kích thước tinh thể	Lớn	Nhỏ
6	Hiệu lực % sau 3 ngày thử trên sâu tơ tuổi 2	Cao	Trung bình

4.2.2 Kết quả sản xuất.

Qua 5 đợt sản xuất thử nghiệm đề tài đã sản xuất theo phương pháp cải tiến và thu được 50 kg chế phẩm và sản xuất theo phương pháp này mất 20-25 ngày cho 1 chu kỳ sản phẩm.

Bảng 5: Lượng chế phẩm Bt sản xuất theo phương pháp thủ công

Đợt sản xuất	Khối lượng các dạng chế phẩm (kg)		
	Sấy đơn giản	Dạng nước	Dạng bột khô
1 (8/2003)		5	3
2 (9/2003)		5	3
3 (10/2003)		5	5
4 (11/2003)	2	3	7
5 (12/2003)	2	3	7

4.2.3 Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm.

Sử dụng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc trên thạch đánh giá số lượng bào tử trong thành phẩm, kết quả thu được cho thấy:

- Chế phẩm Bt dạng nước : $7,7 \times 10^8$ bào tử/ml.
- Chế phẩm Bt dạng bột : $9,8 \times 10^8$ bào tử/gam.
- Giống cấp 1 : $1,2 \times 10^9$ bào tử/ml.
- Delfin : $4,1 \times 10^9$ bào tử/gam.
- Chế phẩm Bt viên CNTP: $3,8 \times 10^9$ bào tử/ml.

Số lượng bào tử của Bt sản xuất trên giá thể rắn ít hơn so với chế phẩm Bt của viện CNTP 3,8 lần (dạng bột) và 4,9 lần (dạng nước).

pH của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn qua các đợt sản xuất biến động trong phạm vi 7,5 – 8,1.

So sánh kích thước cũng như số lượng tinh thể chúng tôi nhận thấy chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn nhỏ hơn so với chế phẩm Bt sản xuất theo phương pháp lên men chìm của viện CNTP. Nhìn chung qua một số chỉ tiêu chất lượng chúng tôi nhận thấy chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn có chất lượng chưa cao, chưa hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu của người sử dụng.

4.2.4. Hiện tượng tạp nhiễm trong quá trình sản xuất

Trong quá trình sản xuất thủ công hiện tượng tạp nhiễm do các dạng vi sinh vật khác là yếu tố khó kiểm soát. Hai công đoạn xuất hiện tạp nhiễm cao là:

- Hiện tượng nhiễm thực khuẩn thể trong quá trình sản xuất giống cấp 1.
- Hiện tượng nhiễm nấm tạp trong quá trình sản xuất trên giá thể rắn.

Trong khâu sản xuất giống cấp 1, do sản xuất trên hệ thống lên men chìm 14 lit có khả năng thanh trùng cao nên tỷ lệ tạp nhiễm phage chỉ giới hạn < 5%. So sánh với 1 số quy trình sản xuất tại Wuhan chúng tôi nhận thấy tỷ lệ này là chấp nhận được.

Trong quá trình sản xuất trên giá thể rắn, hiện tượng nhiễm nấm tạp tương đối cao trong môi trường hiếu khí tự nhiên. Có 2 dạng nấm có màu sắc khác nhau xuất hiện với tỷ lệ nhiễm chung là 22,45 %. Trong đợt sản xuất thứ 5, do cải tiến phương pháp sản xuất, sử dụng không khí lọc giảm lượng bụi nên đã giảm 54% so với đợt 4.

Bảng 6: Tỷ lệ tạp nhiễm do nấm trong sản xuất thủ công chế phẩm Bt

Đợt sản xuất	Tỷ lệ nhiễm (%)	
	Nấm trắng	Nấm xanh
1 (8/2003)	21,72	
2 (9/2003)		27,75
3 (10/2003)	26,42	
4 (11/2003)	23,61	
5 (12/2003)	12,75	
Trung bình	22,45	

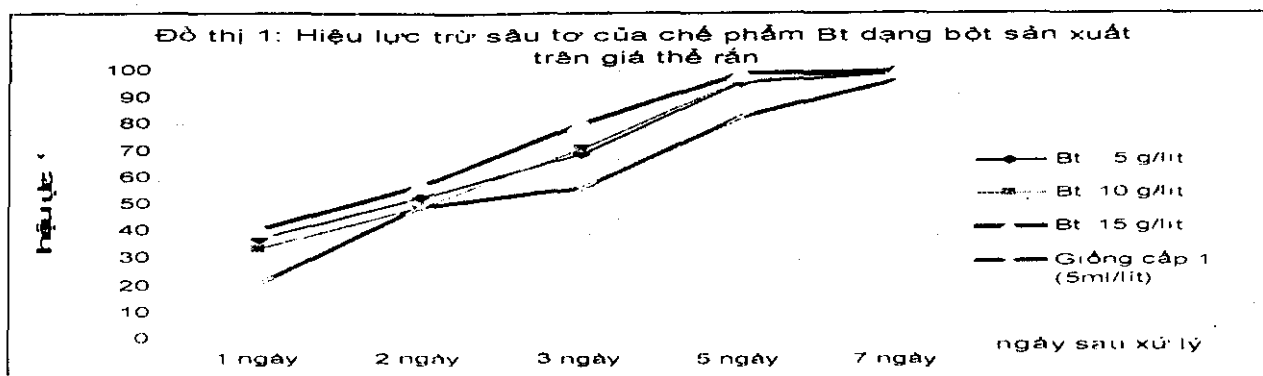
4.3 ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

4.3.1 Hiệu lực trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) của chế phẩm Bt Sản xuất trên giá thể rắn.

Kết quả thí nghiệm trong phòng đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn (bảng 7) cho thấy: Với liều dùng 5-15g/lit sau 3 ngày đạt 68,6-80,32%; sau 5 ngày hiệu lực đạt 95,35-98,84%; và sau 7 ngày đạt 96,51 – 100%. Kết quả thu được cho thấy chế phẩm Bt này (chưa bổ sung phụ gia) có khả năng tiêu diệt sâu tơ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Các thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới và thí nghiệm đánh giá đồng ruộng đang được tiến hành trong vụ đông xuân.

Bảng 7: Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt dạng bột sản xuất trên giá thể rắn
(Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 5 g/lit	37,21	52,33	68,6	95,35	98,84	t°C tb= 22,4 A% tb=86,32
2	Bt 10 g/lit	33,72	48,84	70,93	96,51	100	
3	Bt 15 g/lit	40,7	56,98	80,23	98,84	100	
4	Giống cấp 1 (5ml/lit)	20,93	49,07	55,81	82,56	96,51	

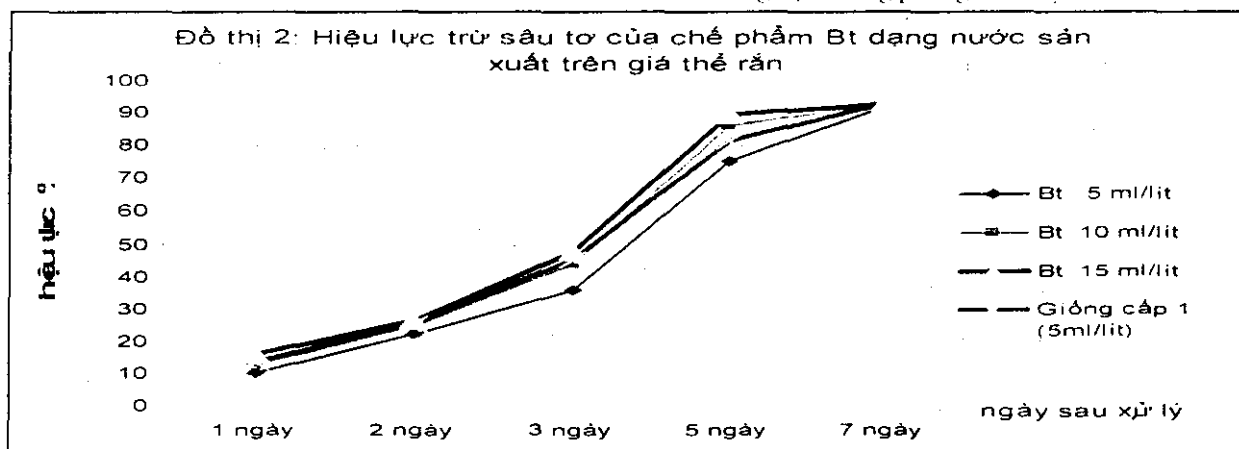


Chế phẩm Bt dạng nước hiệu lực trừ sâu tơ với liều lượng 5 ml/lit-15 ml/lit sau 3 ngày đạt 36.05-47.67%, 5 ngày đạt 75.58-89.53; và sau 7 ngày đạt 91.86 – 93.02% (bảng 8).

Bảng 8: Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn (dạng nước) thí nghiệm trong phòng 11/2003

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 5 ml/lit	10.47	22.09	36.05	75.58	91.86	t°C tb= 23.5 A% tb=88.12
2	Bt 10 ml/lit	12.79	24.42	44.19	86.05	93.02	
3	Bt 15 ml/lit	16.28	26.74	47.67	89.53	93.02	
4	Giống cấp 1 (5ml/lit)	13.95	25.58	45.35	81.40	93.02	

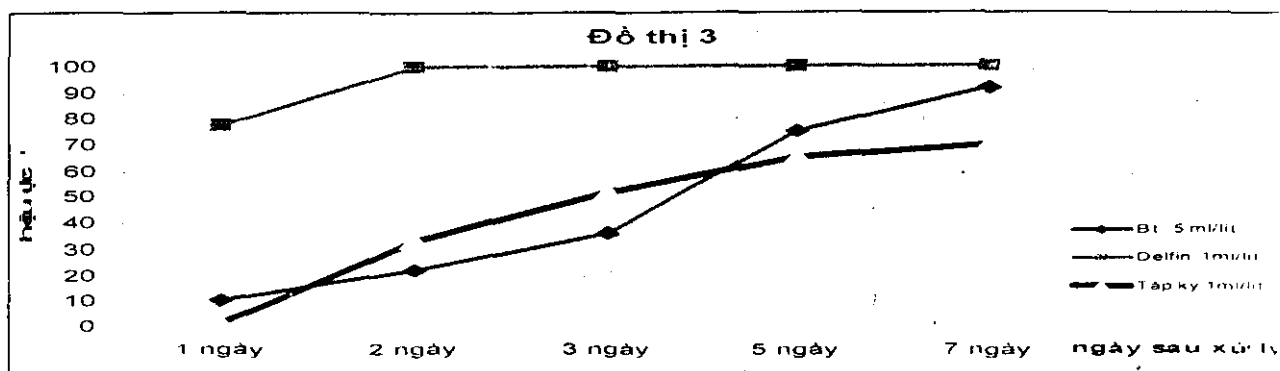
* Thí nghiệm trong phòng và xử lý theo Abbott



So sánh với chế phẩm Bt thương mại (Delfin và tập kỳ) chúng tôi nhận thấy hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn còn một số điểm khác biệt. Delfin cho hiệu lực trừ sâu rất cao ngay từ ngày thứ nhất (77.91%), ngày thứ 2 hiệu lực đã đạt 100%. Trong khi đó chế phẩm Bt sản xuất thủ công lại có thời gian ủ bệnh và chết mạnh sau ngày thứ 3.

Bảng 9: Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn so với 1 số chế phẩm thương mại (thí nghiệm trong phòng 11/2003)

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) với sâu tơ sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 5 ml/lit	10.47	22.09	36.05	75.58	91.86	t°C tb = 23.5 A% tb=88.12
2	Delfin 1 ml/lit	77.91	100	-	-	-	
3	Tập kỳ 1 ml/lit	1.66	33.3	51.7	65.00	70.00	



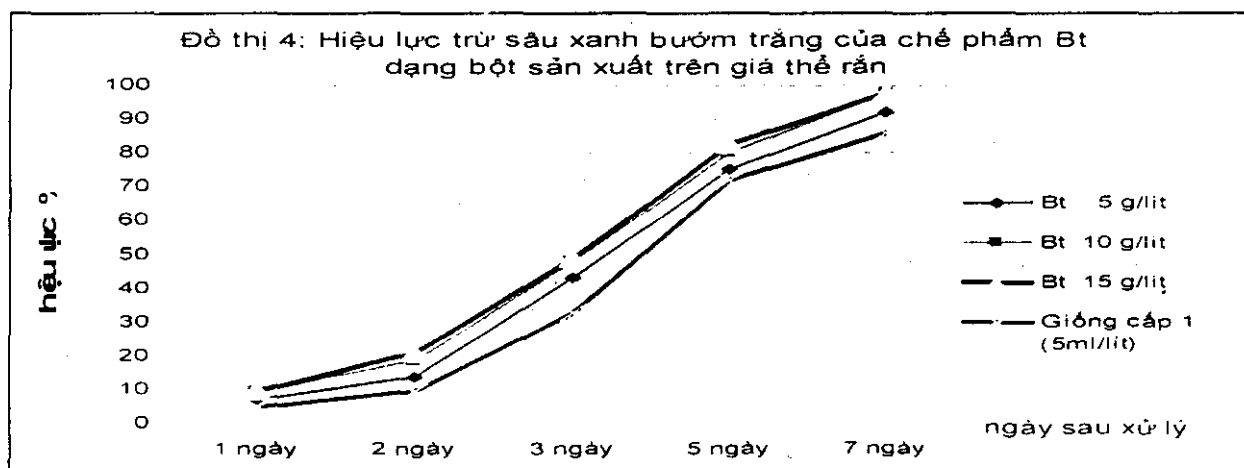
4.3.2 Hiệu lực trừ sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) của chế phẩm Bt

Kết quả đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt trên sâu xanh bướm trắng trong phòng thí nghiệm (với liều xử lý 5-15 g/lít) cho thấy hiệu lực trừ sâu tăng mạnh từ ngày thứ 3 (43,02-48,84%); tới 75,58-82,56% ở ngày thứ 5 và đạt 91,86 – 97,67% sau 7 ngày. (Bảng 10)

Sai khác giữa các nồng độ xử lý không ảnh hưởng lớn tới hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt cho thấy sâu xanh bướm trắng mẫn cảm với chế phẩm Bt này. Các thí nghiệm đánh giá trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng đang được triển khai trong vụ xuân 2004.

Bảng 10: Hiệu lực trừ sâu xanh bướm trắng của chế phẩm Bt dạng bột.
(Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

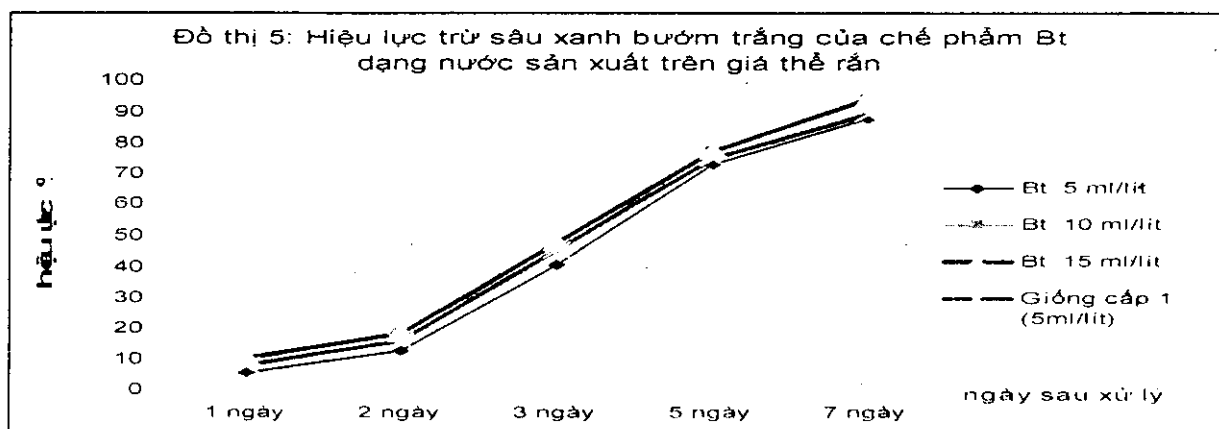
tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
3	Bt 5 g/lit	6,98	13,95	43,02	75,58	91,86	t°C tb= 21,3 A% tb=84,54
4	Bt 10 g/lit	9,30	18,60	47,67	80,23	97,67	
5	Bt 15 g/lit	9,30	20,93	48,84	82,56	97,67	
6	Giống cấp 1 (5ml/lit)	4,65	9,3	32,56	71,98	85,93	



Kết quả thử sinh học với chế phẩm dạng nước cũng cho hiệu lực tương tự dạng bột, và đạt 88,37– 94,19% sau 7 ngày với liều dùng 5-15 ml/lit (bảng 11).

Bảng 11: Hiệu lực trừ sâu xanh bướm trắng của chế phẩm Bt dạng nước sản xuất trên giá thể rắn. (Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
3	Bt 5 ml/lít	5,81	12,79	40,70	73,26	88,37	t ⁰ C tb= 21,3 A% tb=84,5
4	Bt 10 ml/lít	9,30	18,60	45,35	77,91	94,19	
5	Bt 15 ml/lít	10,47	18,60	47,67	77,91	94,19	
6	Giống cấp 1 (5ml/lít)	8,14	16,28	45,35	75,58	89,53	

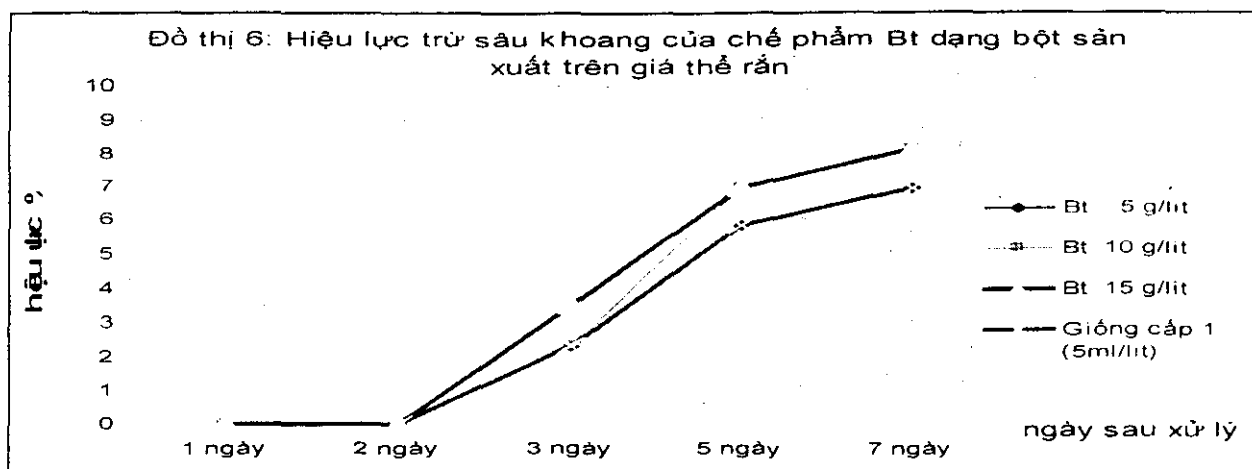


4.3.3 Hiệu lực trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) của chế phẩm Bt Sản xuất trên giá thể rắn.

Chế phẩm Bt cho hiệu lực trừ sâu khoang rất thấp, kết quả thí nghiệm trong phòng cho thấy sau 7 ngày hiệu lực trừ sâu 6,9-8,05%. Ngay thử nghiệm trên giống cấp 1, hiệu lực trừ sâu cũng chỉ đạt 6,98% sau 7 ngày. Điều này cho thấy chủng Bt này không có khả năng tiêu diệt sâu khoang trong phòng thí nghiệm và trên đồng ruộng

Bảng 12: Hiệu lực trừ sâu khoang của chế phẩm Bt dạng bột. (Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

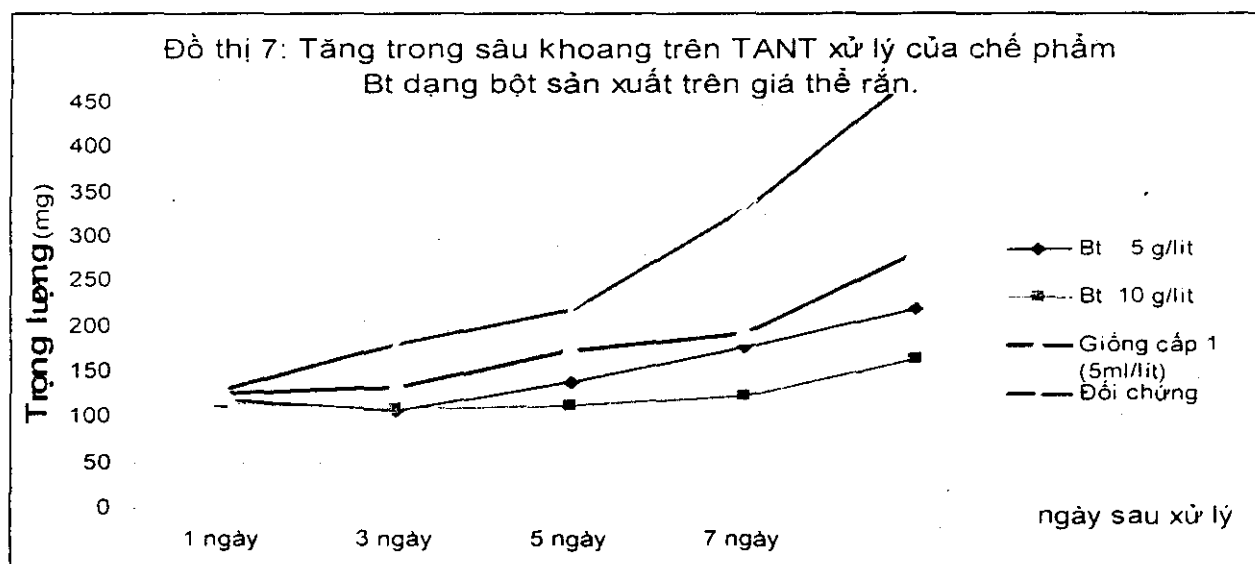
tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
3	Bt 5 g/lít	0,00	0,00	2,33	5,81	6,98	t ⁰ C tb= 24,2 A% tb=89,8
4	Bt 10 g/lít	0,00	0,00	2,33	6,98	8,14	
5	Bt 15 g/lít	0,00	0,00	3,49	6,98	8,14	
6	Giống cấp 1 (5ml/lít)	0,00	0,00	2,33	5,81	6,98	



Tuy nhiên chế phẩm Bt vẫn có tác động làm giảm sức phá hoại của sâu khoang trên cơ sở ức chế khả năng tiêu hóa của chúng. Để tìm hiểu vấn đề này chúng tôi tiến hành thí nghiệm xử lý chế phẩm Bt trên sâu khoang tuổi 2 nuôi cá thể trên thức ăn nhân tạo và theo dõi tăng trọng làm chỉ tiêu so sánh. Kết quả cụ thể trình bày trong bảng 13.

Bảng 13: Ảnh hưởng của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn tới trọng lượng sâu khoang (*Spodoptera litura*) (Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

tt	Chế phẩm xử lý	Trọng lượng sâu (mg) trước xử lý	Trọng lượng sâu (mg) sau xử lý				Ghi chú
			1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 5 g/lit	119,24	106,93	138,52	178,64	221,34	t°C tb = 24,2 A% tb = 89,8 (thí nghiệm trên sâu non tuổi 2)
2	Bt 10 g/lit	115,38	108,75	113,54	124,30	164,42	
3	Giống cấp 1 (5ml/lit)	125,85	132,72	173,61	192,52	282,39	
4	Đối chứng	131,23	179,59	218,42	331,99	481,37	

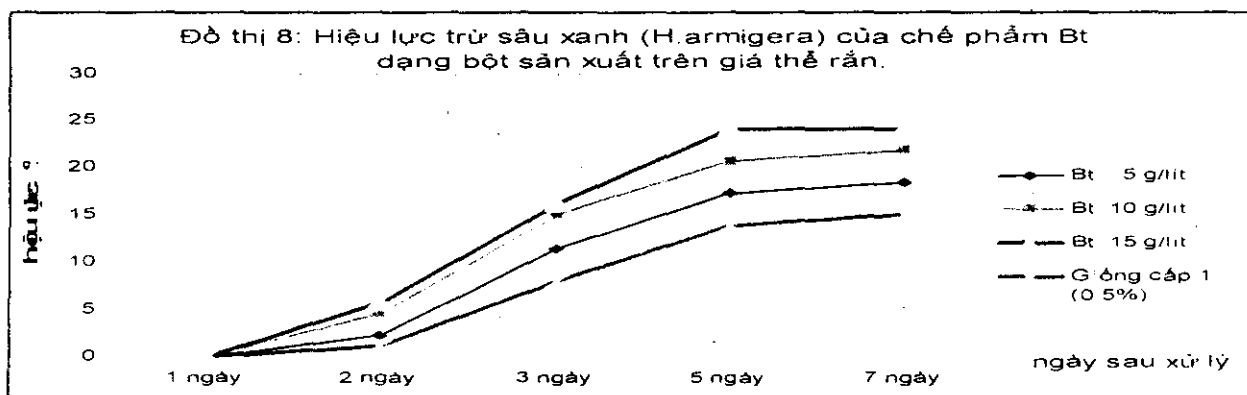


4.3.3 Hiệu lực trừ sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) của chế phẩm Bt Sản xuất trên môi trường giá thể rắn.

Kết quả thử sinh học trên sâu xanh *H.armigera* cho thấy chế phẩm Bt thủ công chưa đạt hiệu quả chưa cao, sau 7 ngày đạt 18,39-24,14%. Thực tế này cho thấy nguồn giống đang sản xuất có độc tính thấp với sâu xanh. Tuy nhiên sâu xanh ở các công thức xử lý Bt đều có hiện tượng ngán ăn, trọng lượng và kích thước đều không tăng so với đối chứng (bảng 15).

Bảng 14: Hiệu lực trừ sâu xanh (*H.armigera*) của chế phẩm Bt bột (Thí nghiệm trong phòng 11/2003)

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
3	Bt 5 g/lit	0,00	2,30	11,49	17,24	18,39	t ^o C tb = 26,8 A% tb = 88,6
4	Bt 10 g/lit	0,00	4,60	14,94	20,69	21,84	
5	Bt 15 g/lit	0,00	5,75	16,09	24,14	24,14	
6	Giống cấp 1 (0,5%)	0,00	1,15	8,05	13,79	14,94	

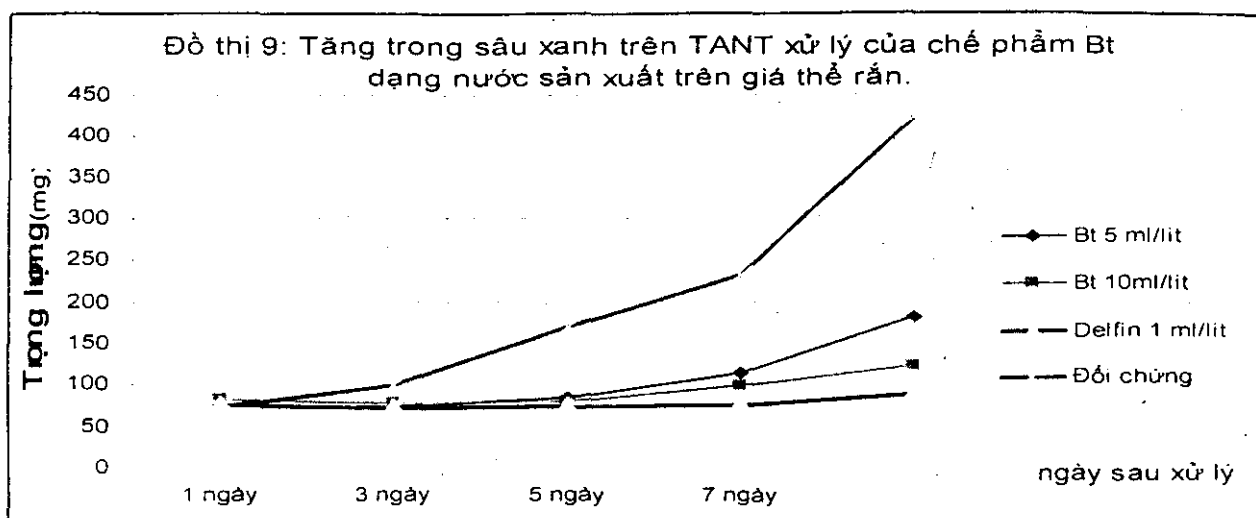


Cũng giống như sâu khoang, chế phẩm Bt này không có khả năng tiêu diệt sâu xanh song nó cũng gây hiện tượng ngán ăn, ức chế tiêu hóa và giảm sinh trưởng cũng như sự phá hại của chúng trên đồng, từ đó tạo điều kiện cho các loại kẻ thù tự nhiên khác dễ dàng tấn công tiêu diệt. Đây cũng là một vấn đề có ý nghĩa không nhỏ trong phòng chống sâu xanh hại cây trồng.

Bảng 15: Tác động của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn tới trọng lượng của sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) (11/2003)

tt	Chế phẩm xử lý	Trọng lượng sâu (mg) trước xử lý	Trọng lượng sâu (mg) sau xử lý				Ghi chú
			1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 5 ml/lit	75,42	72,73	83,61	112,54	182,39	t ^o C tb = 26,8 A% tb = 88,6
2	Bt 10ml/lit	81,25	76,36	78,54	98,60	121,35	
3	Delfin 1 ml/lit	75,36	70,77	73,55	74,33	88,44	
4	Đối chứng	72,21	99,54	168,47	231,92	421,33	

* Thí nghiệm trong phòng, tiến hành trên sâu non tuổi 2, nuôi trên thức ăn nhân tạo



5, KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

KẾT LUẬN

Năm 2003 đề tài đã hình thành quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm Bt theo phương pháp lên men hiếu khí trên môi trường giá thể rắn. Quy trình này có vốn đầu tư cho trang thiết bị thấp, công nghệ đơn giản, tận dụng được nguồn nguyên liệu rẻ tiền, sẵn có tại địa phương.

Cải tiến bước đầu giá thể sản xuất Bt cho thấy việc bổ sung bột nấm men bia, bột đậu tương, bột ngô, trấu đã đẩy nhanh đáng kể quá trình lên men. Số lượng cũng như kích thước tinh thể cũng được cải thiện rõ rệt. Kết quả sản xuất 5 đợt thu được 50 kg chế phẩm Bt các loại

Công tác giống cho sản xuất chế phẩm đã và đang được tập trung nghiên cứu và triển khai trên cơ sở mô hình trung tâm nghiên cứu và phát triển Bt Wuhan. Kết quả ban đầu thu thập được 135 mẫu vi khuẩn, công tác thu thập mẫu vẫn đang được tiến hành trong vụ đông xuân tới. Công tác phân lập đánh giá đã tiến hành bước đầu trên 21 mẫu vi khuẩn trên sâu tơ. Công việc đang được tiến hành cho thấy có triển vọng ứng dụng trong thực tế sản xuất của Việt Nam,

Kết quả sản xuất 5 đợt cho thấy tỷ lệ tạp nhiễm khá cao, 22,45%, thời gian phát triển của vi khuẩn khá dài (trung bình 7-11 ngày) theo chúng tôi đây là một trong những vấn đề cần phải tiếp tục cải tiến trong quá trình sản xuất

Đề tài đã tiến hành thí nghiệm trong phòng đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt trên 4 đối tượng sâu hại. Kết quả bước đầu cho thấy chế phẩm Bt sản xuất ra theo quy trình này có hiệu lực trừ sâu đối với sâu tơ, sâu xanh bướm trắng trong điều kiện phòng thí nghiệm, tuy nhiên hiệu lực chưa cao so với chế phẩm Bt nhập ngoại. Công tác đánh giá vẫn đang tiếp tục mở rộng trong phạm vi nhà lưới và đồng ruộng.

ĐỀ NGHỊ

1. Tiếp tục đầu tư tập trung vào công tác giống nhằm đạt được mục tiêu đề ra:
2. Đầu tư vào công tác phụ gia, tăng hiệu lực của chế phẩm.

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
ĐỀ TÀI KC-04-12

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH NĂM 2004

*Đề tài nhánh: “Nghiên cứu sản xuất chế phẩm Bt (*Bacillus thuringiensis*) bằng phương pháp thủ công và ứng dụng trong phòng trừ sâu hại chính cây trồng nông - lâm nghiệp”*

Đơn vị thực hiện: Trung tâm Nghiên cứu các biện pháp Sinh học
Chủ trì thực hiện: Thạc sỹ Phạm Anh Tuấn
Thời gian thực hiện: 1/2004-10/2004
Kinh phí thực hiện: 10.000.000 đồng

HÀ NỘI 10/2004

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH NĂM 2004

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẾ PHẨM BT (*Bacillus thuringiensis*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦ CÔNG VÀ ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ SÂU HẠI CHÍNH CÂY TRỒNG NÔNG LÂM NGHIỆP

ThS. Phạm Anh Tuấn, TS. Trần Quang Tấn, ThS. Hoàng Thị Việt, TS. Trần Đình Phà,
KS. Lê Thị Bảo Ngọc, KS. Nguyễn Thị Hoài Bắc, KS. Lương Thanh Cù.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong năm 2003 đề tài đã hình thành và đưa vào sản xuất quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm Bt theo phương pháp thủ công. Đây là phương pháp sản xuất chế phẩm Bt trên cơ sở quá trình lên men hiếu khí của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trên giá thể rắn và sử dụng thông gió tự nhiên. Phương pháp này bước đầu đã sản xuất được chế phẩm Bt, song chất lượng chế phẩm chưa cao, hiệu lực trừ sâu chưa ổn định.

Tiếp nối các tồn tại của năm 2003, năm 2004 đề tài đã tiếp tục cải tiến quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm nhằm nâng cao chất lượng của sản phẩm. Trong đó đặc biệt chú trọng nâng cao chất lượng của công tác giống.

2. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu:

Sản xuất được chế phẩm trừ sâu sinh học Bt bằng phương pháp thủ công có hiệu quả phòng trừ một số loại sâu hại chính trên cây trồng nông - lâm nghiệp để tiến tới chuyển giao quy trình sản xuất cho các địa phương.

• Năm 2003:

Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn theo phương pháp lên men hiếu khí từ Viện di truyền và công nghệ sinh học Cuba.

• Năm 2004:

- Cải tiến công nghệ sản xuất chế phẩm.
- Nâng cao chất lượng chế phẩm Bt sản xuất theo phương pháp lên men hiếu khí thông qua công tác chọn lọc chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có độc tính cao với sâu hại.
- Cải tiến phương pháp thử sinh học đánh giá độc tính trừ sâu của các chủng Bt và chất lượng sản phẩm.

2.2. Nội dung thực thi

Năm 2004

- Thu thập, phân lập đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa. Tìm kiếm các chủng vi khuẩn có độc tính trừ sâu cao hơn.
- Chọn lọc và bảo quản ổn định các chủng vi khuẩn Bt có độc tính trừ sâu hại.
- Cải tiến công tác thử sinh học đánh giá độc tính trừ sâu của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*.
- Sản xuất chế phẩm Bt trên cơ sở chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có độc tính trừ sâu cao nhất hiện có tại viện BVTV.

3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

3.1 VẬT LIỆU:

3.1.1 Nuôi sâu và thử sinh học:

- Hóa chất, nguyên liệu thô sử dụng làm thức ăn nhân tạo (TANT).
- Tủ sấy, tủ lạnh, nồi khử trùng, dụng cụ nấu môi trường TANT.
- Vật liệu rẻ tiền, mau hỏng khác, (Bô can, đĩa petri, khay, chậu lồng ...vv)

3.1.2 Phân lập, tuyển chọn và bảo quản vi khuẩn:

- Buồng cấy, tủ ẩm, kính hiển vi, tủ sấy, máy ly tâm thường, máy ly tâm lạnh.
- Tủ lạnh, tủ lạnh sâu, máy đo pH, micropipet các cỡ (20µl, 100 µl, 500 µl)
- Hóa chất, môi trường cho nuôi cấy, phân lập vi khuẩn.
- Vật liệu rẻ tiền mau hỏng khác (ống mẫu, đĩa petri, que cấy, ...vv).

3.1.3 Sản xuất chế phẩm Bt

- Máy lắc, nguyên vật liệu, hoá chất cho môi trường lên men sản xuất giống cấp 1.
- Nguyên vật liệu, hóa chất tạo giá thể rắn cho sản xuất chế phẩm Bt.
- Khay, giá, công cụ chuyên dụng cho công tác sản xuất chế phẩm Bt.

3.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.2.1 Nuôi sâu hàng loạt và thử sinh học:

3.2.1.1. Nuôi sâu nhân tạo:

- Với sâu xanh (*Helicoverpa armigera*), sâu khoang (*Spodoptera litura*): Theo phương pháp nuôi sâu hàng loạt bằng thức ăn nhân tạo (TANT) của phòng nuôi sâu, trung tâm Sinh học, Viện Bảo vệ thực vật. Sử dụng hai loại môi trường TANT cho nhân nuôi và thử sinh học.
 1. Có agar cho nuôi sâu tuổi 1-2 và thử sinh học.
 2. Không agar cho sâu non tuổi 3 đến nhộng.
- Sử dụng thức ăn tự nhiên và đang bán tổng hợp với sâu tơ (*Plutella xylostella*). Điều kiện nhiệt độ, ẩm độ, và ánh sáng tối thích với sinh trưởng và phát triển của từng pha phát dục.

3.2.1.2. Thử sinh học đánh giá chủng vi khuẩn và chất lượng sản phẩm:

- Tiến hành trên sâu non mới lột xác vào tuổi 2, nuôi cá thể với sâu xanh (*H. armigera*), sâu khoang (*S. litura*), nuôi tập thể với sâu tơ (*P. xylostella*).
- Sử dụng thức ăn nhân tạo với sâu xanh (*H. armigera*) và sâu khoang (*S. litura*), thức ăn tự nhiên với sâu tơ (*P. xylostella*), theo phương pháp của Jinhong Wang [5], Mari'a M. Iracheta, [7],
- Thử sinh học trong điều kiện nhiệt và ẩm độ được quản lý chặt chẽ, các yếu tố thí nghiệm được hạn chế tối đa. Một công thức bố trí 5 nhắc lại với 50 cá thể/1 nhắc lại. Sử dụng đối chứng nước cất.
- Số liệu thí nghiệm được xử lý theo Abbott.

3.1.2 Thu thập, phân lập, tuyển chọn và bảo quản các chủng vi khuẩn Bt:

- Thu thập, phân lập và phát hiện vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* theo AO Ejiofor và T Johnson [1]
- Sử dụng môi trường dinh dưỡng LB, HCO và 2xSG [6] cho phân lập, nhân sinh khối và tạo tinh thể vi khuẩn.

Môi trường 2xSG :

Difco Nutrient broth
KCl
MgSO₄.7H₂O
Agar

Chỉnh pH tới 7.0 bằng cách bổ sung 1 M NaOH. Khử trùng, làm lạnh tới 55°C và bổ sung:

1 M Ca(NO₃)₂
0.1 M MnCl₂.H₂O
1 mM FeSO₄

50% (w/v) glucose.

Môi trường: HCO

Casamino acids

KH_2PO_4

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Agar

Điều chỉnh pH tới 7.2. Khử trùng tới 55°C và bổ sung vào môi trường cho tới nồng độ:

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$

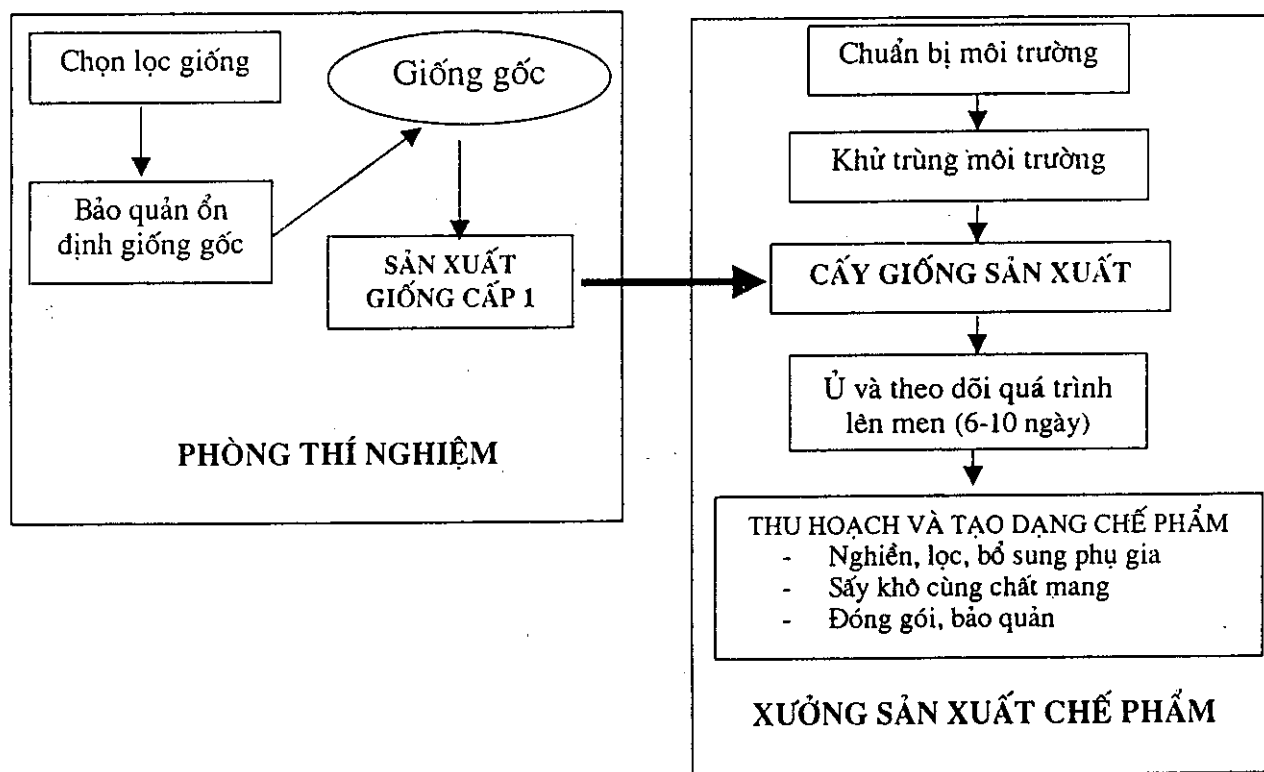
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Glucose

- Nhuộm tinh thể theo phương pháp của David Ammons, et al [3].
- Tách tinh thể nội độc tố của Debro, L., [4] để thu nhận tinh thể cho các thử nghiệm sinh học trên sâu hại.
- Tuyển chọn chủng vi khuẩn trên cơ sở tài liệu của trung tâm lưu trữ nguồn gen *Bacillus* Bang Ohio, Mỹ. [2]

3.1.3 Sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn

Quy trình sản xuất chế phẩm trừ sâu sinh học Bt được viện BVTV cải tiến trên cơ sở công nghệ của viện Di truyền và công nghệ sinh học Cu Ba, cụ thể theo sơ đồ sau:



3.1.2 Đánh giá chất lượng chế phẩm Bt sản xuất ra:

- **Bước 1:**
 - Đếm số lượng tế bào dinh dưỡng (TBDD) và bào tử tự do (BTDD) có trong dịch trên buồng đếm hồng cầu, (độ phóng đại 400 lần)
 - Đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường thạch trong đĩa Petri
- **Bước 2:** Thử sinh học đánh giá độc tính trừ sâu của chế phẩm (như phương pháp đánh giá độc tính các chủng vi khuẩn)

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

4.1. CÔNG TÁC CHỌN LỌC NGUỒN GIỐNG CHO SẢN XUẤT.

Xác định được vai trò của công tác giống trong sản xuất, trong năm 2004 đề tài đã tập trung nghiên cứu chọn tạo nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có độc tính cao và ổn định với sâu hại. Kết quả đạt được chủ yếu trong một số nội dung sau:

- Thu thập, phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* từ tự nhiên.
- Đánh giá độc tính trừ sâu của các chủng vi khuẩn thu nhận và phân lập được.
- Bảo quản, duy trì ổn định độc tính trừ sâu của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*.
- Xác định môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sinh trưởng và hình thành bào tử của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong sản xuất giống cấp 1.
- Cải tiến công tác thử sinh học trong đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và đánh giá chất lượng chế phẩm

4.1.1 Thu thập, phân lập nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* từ tự nhiên.

- Thu thập nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*:

Trong năm 2004 đề tài đã thu thập được 42 mẫu vi sinh vật từ tự nhiên. Số mẫu này được thu thập từ 2 nguồn chính là từ đất và sâu hại chết:

- Thu từ đất cây trồng cạn: 30 mẫu.

Thông qua quá trình điều tra tình hình phát sinh và phát triển cũng như diễn biến của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong những năm trước (2000-2003). Đề tài đã tiến hành thu thập mẫu đất ở các khu vực có tần xuất xuất hiện vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* nhiều nhất, vào thời điểm thích hợp nhất. Số mẫu thu được cụ thể như sau:

Bảng 1: Kết quả thu thập nguồn vi khuẩn từ mẫu đất cây trồng cạn.

T t	Địa điểm thu thập mẫu	Số mẫu thu thập được trên đất trồng					Ghi chú
		Súp lơ	Cải xanh	Bắp cải	Su hào	Cải ngọt	
1	Thủy Nguyên, Hải Phòng	3	2	3	4	1	
2	Thành phố Thái Bình	-	2	2	2	-	
3	Duy Tiên, Hà Nam	2	-	3	3	3	
Tổng số mẫu thu năm 2004		5	4	8	9	4	30



Hình 1: Thu thập nguồn vi khuẩn từ sâu hại chết

- Thu từ côn trùng chết tự nhiên: 12 mẫu (Hình 1).

Nguồn vi khuẩn thu thập từ côn trùng chủ yếu trên sâu tơ (*Plutella xylostella*) chiếm tỷ lệ 58,33%; Sâu xanh bướm trắng (*Pieris rapae*) chiếm tỷ lệ 16,66 %; còn lại trên sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) và một số sâu hại khác. Các mẫu thu được xử lý sơ bộ và bảo quản trong điều kiện trong tủ lạnh thường chờ phân lập.

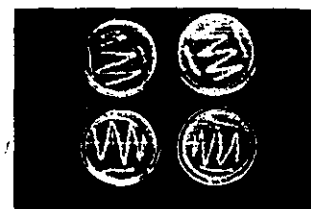
Bảng 2: Kết quả thu thập nguồn vi khuẩn từ mẫu sâu chết tự nhiên năm 2004.

tt	Địa điểm thu thập mẫu	Số lượng mẫu thu thập trên sâu chết				Ghi chú
		Sâu tơ (<i>P.xylostella</i>)	Sâu xanh bướm trắng (<i>P.rapae</i>)	Sâu xanh (<i>H.armigera</i>)	Sâu khác	
1	Thủy Nguyên, Hải Phòng	3	1	-	1	
2	Thành phố Thái Bình	2	-	-	-	
3	Duy Tiên, Hà Nam	2	1	1	1	
Tổng số mẫu thu năm 2004		7	2	1	2	12

- *Phân lập nguồn vi khuẩn Bacillus thuringiensis*

Trong năm 2004 đề tài đã phân lập đầy đủ các mẫu thu thập của cả năm 2003 và mới thu năm 2004. Riêng với các mẫu thu năm 2004, Đề tài đã cấy phân lập nguồn vi khuẩn thu được trên môi trường dinh dưỡng và xác định được 18 mẫu xuất hiện tinh thể (trên tổng số 42 mẫu thu thập).

Chỉ 11 mẫu trong tổng số 30 mẫu thu thập từ đất trồng có xuất hiện bào tử và tinh thể và sau khi nhuộm Gram được xác định là vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Kết quả cụ thể tại bảng 3:



Hình 2: Phân lập nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Bảng 3: Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* thu thập từ mẫu đất cây trồng cạn.

Tt	Địa điểm thu thập vi khuẩn Bt	Số lượng chủng vi khuẩn Bt thu từ đất trồng					Ghi chú
		Súp lơ	Cải xanh	Bắp cải	Su hào	Cải ngọt	
1	Thủy Nguyên, Hải Phòng	2	-	1	-	1	
2	Thành phố Thái Bình	-	1	2	2	-	
3	Duy Tiên, Hà Nam	1	-	1	-	-	
Tổng chủng Bt thu được năm 2004		3	1	4	2	1	11

Với 12 nguồn sâu chết thu thập trong năm 2004, sau khi phân lập thu được 7 nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, đạt 58,33 %. Trong số các loài sâu hại chết thu được thì tỷ lệ mẫu có vi khuẩn Bt cao nhất vẫn là sâu tơ chiếm 71,42 %.

Bảng 4: Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* thu thập được từ sâu chết tự nhiên

tt	Địa điểm thu thập vi khuẩn Bt	Số lượng chủng vi khuẩn Bt thu được từ sâu chết				Ghi chú
		Sâu tơ	Sâu xanh bướm trắng	Sâu xanh (<i>H. armigera</i>)	Sâu khác	
1	Thủy Nguyên, Hải Phòng	1	1	-	1	
2	Thành phố Thái Bình	2	-	-	-	
3	Duy Tiên, Hà Nam	2	-	-	-	
Tổng chủng Bt thu được năm 2004		5	1	-	1	7

4.1.2. Đánh giá độc tính trừ sâu của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập được.

Từ các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập được, đề tài đã nhân sinh khối trên hệ thống máy lắc và thu dịch vi khuẩn sau đó tiến hành thử sinh học trên sâu tơ (*P. xylostella*), sâu xanh (*H. armigera*), nuôi trong phòng thí nghiệm.

Để chọn lọc bước 1 nguồn vi khuẩn chúng tôi kiểm tra khả năng gây chết sâu hại sau 2 ngày

- Trên sâu tơ
 - Nếu tỷ lệ chết của sâu tơ > 50 %. Tiếp tục chọn lọc bước 2.
 - Nếu tỷ lệ chết của sâu tơ < 50 %. Loại bỏ.
- Trên sâu xanh:
 - Nếu tỷ lệ chết của sâu xanh > 25 %. Tiếp tục chọn lọc bước 2
 - Nếu tỷ lệ chết của sâu xanh < 25 %. Loại bỏ

Bảng 5: Số chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có tiềm năng độc tính trừ sâu hại.

tt	Nguồn thu thập vi khuẩn Bt	Số chủng vi khuẩn Bt	Số lượng chủng vi khuẩn Bt có tiềm năng		Ghi chú
			Trên sâu tơ	Trên sâu xanh	
1	Từ đất trồng trọt	11	2	-	
2	Từ sâu chết tự nhiên	7	2	1	
Tổng số		18	4	1	

Kết quả thu được 4 chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có tiềm năng ứng dụng trên sâu tơ, 1 chủng có tiềm năng ứng dụng trên sâu xanh. Các chủng vi khuẩn này đã và đang được tiếp tục phân lập thuần, bảo quản, đánh giá và chọn lọc tiếp.

4.1.3. Duy trì ổn định độc tính của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

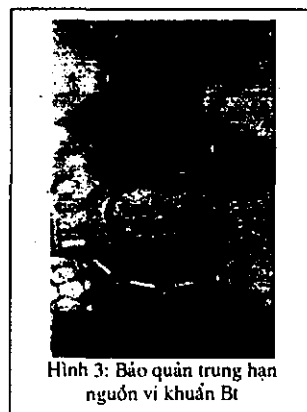
Song song với quá trình tuyển chọn các chủng vi khuẩn, Đề tài rất chú trọng công tác duy trì hoạt lực trừ sâu của các chủng thu thập được. Trong năm 2004 đề tài đã bảo quản tốt 24 nguồn vi khuẩn (cho cả 2 năm thu thập và tuyển chọn) và nguồn giống gốc cho sản xuất chế phẩm. Trong đó:

- **Bảo quản ngắn hạn:**

- Cây truyền trên môi trường Tryptose photphat agar (TPA), LB, HCO, 2xSG.
- Bảo quản vi khuẩn gốc dưới dạng bào tử.
- Đảm bảo trong môi trường lạnh 4°C.
- Kiểm tra định kỳ 26 nguồn vi khuẩn Bt trong quá trình bảo quản.

- **Bảo quản trung hạn:** (Hình 3)

- Sử dụng phương pháp giữ giống trên môi trường đặc biệt, phương pháp này được cung cấp bởi chuyên gia Trung Quốc.
- Đã tiến hành thử nghiệm phương pháp này trên 2 chủng Bt. Kết quả sẽ được kiểm tra 1 năm/lần



Hình 3: Bảo quản trung hạn nguồn vi khuẩn Bt

Kết quả công tác bảo quản đã và đang được theo dõi và đánh giá định kỳ.

4.1.4. Xác định môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sinh trưởng và hình thành bào tử của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong sản xuất giống cấp 1.

Năm 2004 được sự giúp đỡ của chuyên gia Trung Quốc, Đề tài đã tiến hành kiểm tra đánh giá sinh trưởng, phát triển cũng như khả năng tạo bào tử của chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trên một số môi trường dinh dưỡng như TPA, LB, HCO, 2xSG. Kết quả thu được cho thấy: Đa số các môi trường dinh dưỡng tiêu chuẩn sử dụng đều có khả năng tương tự cho vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phát triển và tạo bào tử.

Kết quả sản xuất cho thấy có thể sử dụng một số môi trường đơn giản cũng có thể cho ra nguồn giống tốt. Do đó có thể mở ra hướng nghiên cứu sử dụng một số nguyên liệu rẻ tiền, sẵn có thay thế một số hoá chất đắt tiền trong môi trường sản xuất giống hiện tại.

4.1.5. Cải tiến phương pháp thử sinh học trong đánh giá độc tính của các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và đánh giá chất lượng chế phẩm

Từ phương pháp thử sinh học đã và đang được tiến hành tại viện Bảo vệ thực vật và trên cơ sở phương pháp đang sử dụng tại viện Nghiên cứu vi rút học Vũ Hán cũng như tại Trung tâm nghiên cứu và phát triển Bt Vũ Hán. Các cán bộ của đề tài đã cùng làm việc trực tiếp với chuyên gia Yuan Zhiming thử 3 mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* trên sâu xanh (*Helicoverpa armigera*). Các nội dung thực hành cũng như các bước thử sinh học đã được các cán bộ của đề tài tiếp thu và tiến hành trên các mẫu khác.

Nội dung cơ bản của phương pháp thử sinh học mới là đưa trực tiếp vi khuẩn *B. thuringiensis* vào sâu hại, trong khi đó phương pháp đang sử dụng hiện nay tại viện BVTV là đưa vi khuẩn vào môi trường dinh dưỡng. Phương pháp mới sẽ đảm bảo được sự loại trừ các vi sinh vật tạp khác trong môi trường dinh dưỡng sử dụng để làm thức ăn cho sâu trong quá trình thử sinh học. Kết quả thử cho thấy

độ chính xác của 2 phương pháp là như nhau song phương pháp thử mới không nhất thiết làm sạch mẫu trước thử nghiệm. Giảm đáng kể chi phí và công lao động.

Một vấn đề thuộc bí quyết trong toàn bộ phương pháp mới đó là chất chỉ thị mẫu sử dụng pha cùng với dịch vi khuẩn *B. thuringiensis* khi đưa vào côn trùng cần kiểm tra. Chất chỉ thị mẫu này cần đảm bảo 2 yếu tố:

1. An toàn với đối tượng sâu thử sinh học
2. Không làm ảnh hưởng tới hoạt lực của vi khuẩn *B. thuringiensis*.

Chuyên gia *Yuan Zhiming* đã đề cập tới một số hoạt chất và cũng đã sử dụng một số hoạt chất mang theo để tiến hành thử sinh học. Kết quả thu được đạt yêu cầu đặt ra. Hiện nay đề tài đã và đang tiến hành nghiên cứu thử nghiệm một số chất chỉ thị theo ý kiến của chuyên gia.

4.2. CÔNG TÁC SẢN XUẤT CHẾ PHẨM TRỪ SÂU SINH HỌC Bt.

4.2.1 SẢN XUẤT GIỐNG CẤP 1:

Đề tài đã hoàn toàn chủ động nguồn giống vi khuẩn chất lượng cao cho sản xuất chế phẩm. Giống Bt được sản xuất trên hệ thống máy lắc vòng sau đó ly tâm loại bỏ tạp chất và lấy sản phẩm là nguồn vi khuẩn Bt ở dạng bào tử.

- Giống sản xuất ra ở dạng dịch thể, bảo quản trong điều kiện tủ lạnh thường.
- Giống cấp 1 sản xuất ra đạt chỉ tiêu chất lượng: $2,0 \times 10^9$ bào tử/ml.
- Giống đảm bảo sạch nguồn phage.

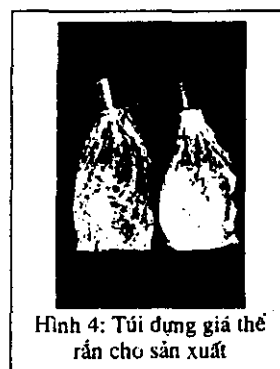
4.2.2 SẢN XUẤT CHẾ PHẨM BT:

4.2.1 Giá thể cho sản xuất chế phẩm.

Sử dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có tại địa phương làm giá thể cho sản xuất chế phẩm. Cuối năm 2003 đầu năm 2004, đề tài đã cải tiến thành phần môi trường của giá thể nhằm tăng nguồn dinh dưỡng và độ xốp. Kết quả thu được thành phần giá thể cho sản xuất đạt yêu cầu (bảng 6). Với thành phần này trên quy mô vừa và nhỏ các cơ sở sản xuất hoàn toàn có khả năng chủ động nguồn nguyên liệu.

Bảng 6: Thành phần giá thể rắn cho sản xuất chế phẩm Bt phương pháp lên men hiếu khí

Tt	Thành phần môi trường	Khối lượng/1 kg
1	Tấm	1 kg
2	Đậu tương	8 g
3	Ngô bột	2g
4	Bột nấm men bia	10g
5	Trấu	100g
6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
7	$ZnSO_4$	0,02 g
8	$FeSO_4$	0,02 g
9	$MnSO_4$	0,02 g
10	$CaCO_3$	1 g
11	Vi lượng khác	0,05 g
12	Nước sạch	1.300 ml



Hình 4: Túi đựng giá thể rắn cho sản xuất

4.2.2 Kết quả sản xuất.

Qua 2 năm nghiên cứu và cải tiến quy trình, năm 2004 đề tài đã sản xuất đầy đủ lượng chế phẩm theo yêu cầu đặt ra. Với quy trình chưa cải tiến (năm 2003) để hoàn thiện 1 đợt sản xuất phải mất 20-25 ngày. Hiện nay sản xuất theo phương pháp này cần 10-15 ngày cho 1 chu kỳ sản phẩm.

Bảng 7: Khối lượng chế phẩm Bt sản xuất theo phương pháp thủ công năm 2004

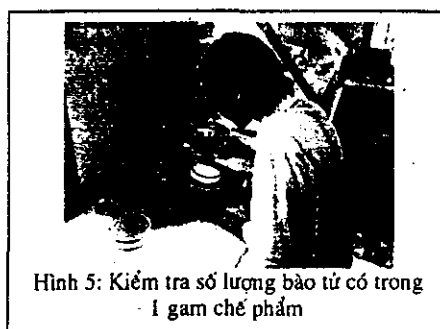
tt	Đợt sản xuất	Khối lượng các dạng chế phẩm		Địa chỉ ứng dụng	Ghi chú
		Dạng nước (lít)	Dạng bột thấm nước (kg)		
1	1	1	5	- 2 kg: Thí nghiệm trong phòng, Viện BVTV - 4 kg: Triển lãm, giới thiệu SP	12
2	2	1	5		
Tổng số		2	10		

4.2.3 Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm.

Sử dụng phương pháp đếm trực tiếp số lượng TBDD và BTDD bằng buồng đếm hồng cầu cũng như phương pháp đếm khuẩn lạc trên thạch (Hình 5) đánh giá số lượng bào tử trong thành phần, kết quả thu được cho thấy:

- Chế phẩm Bt dạng nước : $1,0 \times 10^9$ bào tử/ml.
- Chế phẩm Bt dạng bột : $1,0 \times 10^9$ bào tử/gam.
- Giống cấp 1 : $2,0 \times 10^9$ bào tử/ml.

So sánh kích thước cũng như số lượng tinh thể chúng tôi nhận thấy chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn nhỏ hơn và không đồng đều so với chế phẩm Bt sản xuất theo phương pháp lên men chìm.



Hình 5: Kiểm tra số lượng bào tử có trong 1 gam chế phẩm

4.2.4. Hiện tượng tạp nhiễm trong quá trình sản xuất

Trong quá trình sản xuất thủ công hiện tượng tạp nhiễm do các dạng vi sinh vật khác là yếu tố khó kiểm soát. Hai công đoạn xuất hiện tạp nhiễm cao là:

- Hiện tượng nhiễm thực khuẩn thể trong quá trình sản xuất giống cấp 1.
- Hiện tượng nhiễm nấm tạp trong quá trình sản xuất trên giá thể rắn.

Cho tới nay, quá trình sản xuất giống cấp 1 trên máy lắc vòng có khả năng thanh trùng cao nên tỷ lệ tạp nhiễm phage chỉ giới hạn < 10%. Theo ý kiến của nhiều chuyên gia về sản xuất chế phẩm Bt thì tỷ lệ này là chấp nhận được.

Trong công đoạn 2, do sử dụng hệ thống thoáng khí tự nhiên nên tỷ lệ nhiễm nấm vào môi trường sản xuất khá cao. Tỷ lệ nhiễm này hoàn toàn phụ thuộc vào độ sạch của không khí cấp cho quá trình lên men. Đầu năm 2003 do quy trình sản xuất chưa hoàn thiện, hiện tượng nhiễm nấm tạp tương đối cao. Các đợt sản xuất năm 2004 do nguồn không khí sạch được quản lý chặt nên tỷ lệ nhiễm tạp giảm nhiều, tỷ lệ trung bình chỉ còn 5,55.

Bảng 8: Tỷ lệ tạp nhiễm do nấm trong sản xuất chế phẩm Bt trên giá thể rắn

tt	Đợt sản xuất	Tỷ lệ nhiễm (%)		Ghi chú
		Nấm trắng	Nấm xanh	
1	1	6,46	-	Tỷ lệ nhiễm trung bình nấm trắng và nấm xanh năm 2003: 14,97 %
2	2	4,65	-	
Trung bình năm 2004		5,55	-	

4.3 ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

4.3.1 Hiệu lực trừ sâu tơ (*Plutella xylostella*) của chế phẩm Bt Sản xuất trên giá thể rắn.

Kết quả thí nghiệm trong phòng đánh giá hiệu lực trừ sâu của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn (bảng 9) cho thấy: Với liều 2-8g/lít sau 3 ngày tỷ lệ chết đạt 88,65% - 98,39 %, sau 5 ngày đạt 98,47- 100%. Kết quả thu được cho thấy chế phẩm Bt này có hiệu lực diệt sâu tơ, song thời gian phát huy tác dụng khá dài.

Bảng 9: Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt bột (Thí nghiệm trong phòng 5/2004)

tt	Công thức Thí nghiệm	Hiệu lực (%) trừ sâu tơ sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	
1	Bt 2 g/lit	38,18	58,54	88,65	92,51	98,47	t°C tb= 27,5 A% tb= 89,68
2	Bt 5 g/lit	43,71	68,49	95,37	96,71	100	
3	Bt 8 g/lit	49,25	76,98	98,39	100	100	

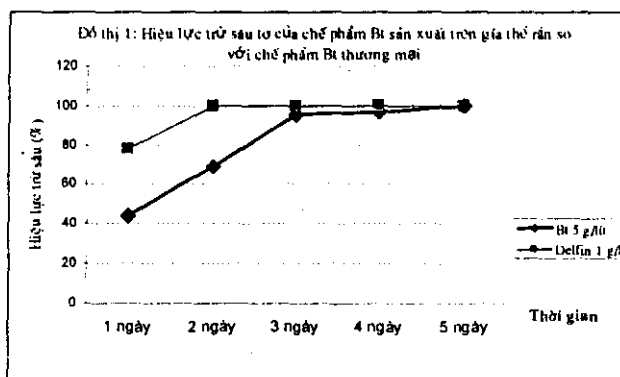
Trong năm 2004 do công nghệ sản xuất được cải tiến và nguồn giống đạt tiêu chuẩn nên Bt do đề tài sản xuất có chất lượng cao hơn nhiều so với chế phẩm sản xuất năm 2003. Tuy nhiên khi so sánh với chế phẩm thương mại (Delfin) thì hiệu lực trừ sâu và thời gian gây chết của chế phẩm này vẫn thấp hơn. (Bảng 10).

Bảng 10: Hiệu lực trừ sâu tơ của chế phẩm Bt sản xuất trên giá thể rắn so với chế phẩm Bt thương mại (thí nghiệm trong phòng 5/2004)

T t	Công thức Thí nghiệm	Hiệu lực (%) trừ sâu tơ sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	
1	Bt 5 g/lit	43,71	68,49	95,37	96,71	100	t°C tb = 27,5 A% tb=89,68
2	Delfin 1 g/lit	77,91	100	-	-	-	

4.3.2 Hiệu lực trừ sâu khoang (*Spodoptera litura*) của chế phẩm Bt

Chế phẩm Bt cho tỷ lệ chết trên sâu khoang rất thấp, kết quả thí nghiệm trong phòng cho thấy sau 3 ngày thì sâu bắt đầu chết và sau 7 ngày hiệu lực đạt 9,54-14,43%. Kết quả này cho thấy chủng Bt đang sử dụng không có hiệu lực trừ sâu khoang.

**Bảng 11: Hiệu lực trừ sâu khoang của chế phẩm Bt (thí nghiệm trong phòng 6/2004)**

tt	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 3 g/lit	0,00	0,00	5,66	5,66	9,54	t°C tb= 28,2 A% tb=91,24
2	Bt 5 g/lit	0,00	0,00	5,66	8,97	11,41	
3	Bt 8 g/lit	0,00	0,00	8,92	10,83	14,43	

Tuy nhiên sâu khoang sau khi ăn phải chế phẩm Bt này có hiện tượng ngán ăn, sâu không tăng về trọng lượng và kích thước => giảm sức phá hoại của sâu trên đồng. Để xác định vấn đề này chúng tôi tiến hành thí nghiệm trên sâu khoang tuổi 2 nuôi trên môi trường TANT có xử lý chế phẩm Bt và theo dõi. Với chỉ tiêu là khả năng tăng trọng, kết quả thu được trong bảng sau:

Bảng 12: Tác động của chế phẩm Bt tới tăng trọng của sâu khoang (TN trong phòng 6/2004)

T t	Chế phẩm Xử lý	Trọng lượng sâu (mg) trước xử lý	Trọng lượng sâu (mg) sau xử lý				Ghi chú
			1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 3 g/lit	103,41	109,31	114,37	152,64	241,34	t°C tb = 28,2 A% tb= 91,24 (TN trên sâu non tuổi 2)
2	Bt 5 g/lit	102,82	108,52	113,42	146,87	184,48	
4	Đối chứng (nước cất)	110,53	132,46	249,28	371,64	445,62	

4.3.3 Hiệu lực trừ sâu xanh (*H.armigera*) của chế phẩm Bt.

Kết quả thử sinh học trên sâu xanh *H.armigera* cho thấy chế phẩm Bt chưa có hiệu quả cao. Sau 7 ngày thí nghiệm tỷ lệ chết đạt 14,33-21,75%. Điều này cho thấy nguồn giống đang sản xuất có độc tính thấp với sâu xanh.

Bảng 13: Hiệu lực trừ sâu xanh (*H.armigera*) của chế phẩm Bt (Thí nghiệm trong phòng 7/2004)

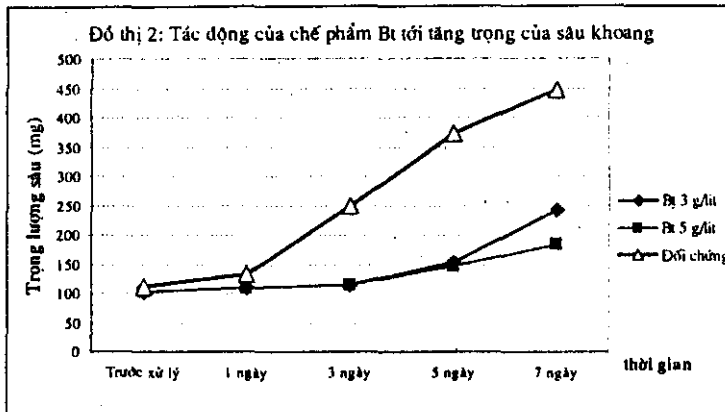
T t	Công thức thí nghiệm	Hiệu lực trừ sâu (%) sau xử lý					Ghi chú
		1 ngày	2 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 3 g/lit	0,00	2,24	4,54	11,42	14,33	t°C tb = 29,8 A% tb = 88,6
2	Bt 5 g/lit	0,00	3,48	6,21	15,57	15,73	
3	Bt 8 g/lit	0,00	3,93	6,91	19,32	21,75	

Tuy nhiên cũng giống như sâu khoang, sâu xanh ở các công thức xử lý đều có hiện tượng ngán ăn, trong lượng, kích thước đều không tăng so với đối chứng. Chính hiện tượng ngán ăn, đã làm giảm sự phá hoại của chúng trên đồng, và từ đó thời gian phát dục sẽ bị đình trệ và kéo dài, các loài kẻ thù tự nhiên khác có cơ hội tiêu diệt sâu hại.

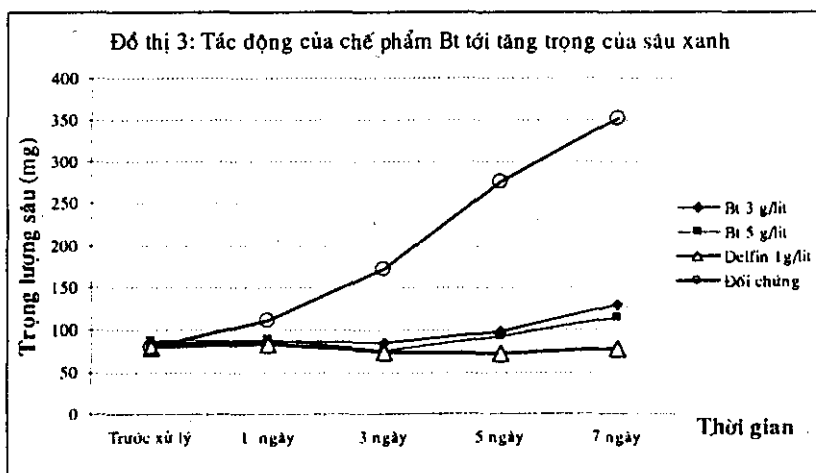
Bảng 14: Tác động của chế phẩm Bt tới tăng trọng của sâu xanh (*H.armigera*) (Tháng 7/2004)

T t	Chế phẩm Xử lý	Trọng lượng sâu (mg) trước xử lý	Trọng lượng sâu (mg) sau xử lý				Ghi chú
			1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	Bt 3 g/lit	83,35	87,31	84,59	98,46	129,76	t°C tb = 29,8 A% tb = 88,6
2	Bt 5 g/lit	86,52	89,35	75,64	91,51	113,66	
3	Delfin 1 g/lit	79,47	82,36	72,88	71,39	78,22	
4	Đối chứng	79,03	110,38	171,34	276,77	352,84	

* Thí nghiệm trong phòng, tiến hành trên sâu non tuổi 2, trên thức ăn nhân tạo



Hình 6: Đối chứng TN trên sâu xanh



5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

KẾT LUẬN

Năm 2004 đề tài đã cải tiến cơ bản quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm Bt tại viện BVTV, Từ phương pháp sản xuất hoàn toàn mang tính chất thủ công nay đề tài đã cải tiến thành phương pháp sản xuất tối ưu trong điều kiện sản xuất quy mô vừa và nhỏ tại Việt Nam.

Năm 2004 đề tài đã sản xuất được nguồn giống cấp 1 với chất lượng cao và sạch. Số lượng đủ cung cấp cho các cơ sở sản xuất chế phẩm quy mô nhỏ hơn 10 tấn/ năm

Song song với quá trình sản xuất giống cấp 1 cho sản xuất, đề tài đã thu thập được 42 mẫu vi sinh vật, qua phân lập và giám định được 18 nguồn vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Trong qua trình tuyển chọn dòng, 4 chủng có độc tính với sâu tơ nổi trội hơn so với chủng đang sử dụng tại viện BVTV, 1 chủng có độc tính với sâu xanh. Đề tài đã và đang bảo quản ổn định và tìm hiểu tiếp các chủng vi khuẩn có triển vọng này và đây sẽ là nguyên liệu quý báu cho công tác chọn lọc giống vi khuẩn Bt có độc tính cao sau này.

Năm 2004 đề tài đã có cải tiến bước đầu công tác thử sinh học đánh giá độc tính của các dòng và chất lượng sản phẩm, Kết quả cho thấy phương pháp này giảm đáng kể chi phí và công lao động trong quá trình thử sinh học mà độ chính xác tương tự. Các thí nghiệm nghiên cứu vẫn đang được tiến hành.

Kết quả sản xuất chế phẩm trong năm 2004 đạt 12 kg. Trong đó chủ yếu sử dụng để đánh giá, hoàn thiện công nghệ và kiểm tra chất lượng sản phẩm.

Chế phẩm Bt sản xuất ra đã được tiến hành thử nghiệm trong phòng, kết quả cho thấy chất lượng chế phẩm đã được cải tiến nhiều so với năm 2003 tuy nhiên hiệu lực trừ sâu vẫn thấp hơn so với chế phẩm ngoại nhập.

ĐỀ NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu các nội dung còn tồn tại của đề tài.
- Ứng dụng triển khai các kết quả nghiên cứu cho sản xuất chế phẩm quy mô vừa và nhỏ tại các địa phương thông qua công tác chuyển giao công nghệ.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. AO Ejiofor and T Johnson, 2002. "Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States" *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 28, 284 – 290.
2. Daniel R. Zeigler "Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition, Part 2: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*". 58 pp.
3. David Ammons , Joanne Rampersad and Ayub Khan, 2002. "Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*" *Journal of Invertebrate Pathology* 79 (2002) 203–204
4. Debro, L., P. C. Fitz-James, and A. Aronson. 1986. "Two different parasporal inclusions are produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Finitimus*". *J. Bacteriol.* 58:507-512.
5. Jinhong Wang, Annemie Boets Jeroen Van Rie and Gaixin Rena , 2003. "Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China" *Journal of Invertebrate Pathology* 82 (2003) 63–71
6. Leighton, T. J. and R. H. Doi. 1971. *J. Biol. Chem.* 246:3189-3195.
7. Mari'a M. Iracheta, Benito Pereyra-Alfe'rez, Luis Gala'n-Wong, and Juan Ferre', 2000. "Screening for *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins Active against the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*" *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 70–75 (2000).

CHƯƠNG TRÌNH CNSH CẤP NHÀ NƯỚC
ĐỀ TÀI KC 04 -12

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU
THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH

“NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU
SINH HỌC NẤM *METARHIZIUM* VÀ *BEAUVERIA*
TRỪ MỘT SỐ SÂU HẠI CÂY TRỒNG”
(GIAI ĐOẠN 2001-2004)

Cơ quan thực hiện đề tài : *Trung tâm sinh học
Viện Bảo vệ thực vật*

Chủ nhiệm đề tài nhánh : *PGS.TS Phạm Thị Thuỳ*

Cơ quan phối hợp : - *Chi cục BVTV Tỉnh Yên Bái*
- *Chi cục BVTV Tỉnh Bình Định*
- *Chi cục BVTV Tỉnh Hà Tĩnh*
- *Một số chi cục BVTV khác*

HÀ NỘI THÁNG 9-2004

LỜI CẢM ƠN

Nhánh đề tài: “Nghiên cứu công nghệ sản xuất thuốc trừ sâu sinh học nấm *Metarhizium* và *Beauveria* trừ một số sâu hại cây trồng” giai đoạn 2001-2004 đã thực hiện một cách nghiêm túc và hoàn thành tốt những nội dung công việc đề ra mà đã ký với ông chủ nhiệm đề tài KC04-12.

Đạt được những kết quả in trong báo cáo với những nhận xét tốt đẹp của các địa phương triển khai ứng dụng, trước hết chúng tôi xin trân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm chương trình công nghệ sinh học cấp Nhà nước, Ban chủ nhiệm đề tài KC04-12 đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để chúng tôi thực hiện tốt đề tài nghiên cứu.

Xin cảm ơn Trung tâm sinh học, các bộ môn và phòng khoa học tổng hợp, phòng tài vụ Viện BTVT đã giúp đỡ để đề tài thực hiện tốt tiến độ các công việc chuyên môn đặt ra.

Chúng tôi cảm ơn các địa phương cùng phối hợp cộng tác và thực hiện tốt việc triển khai ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* và *Beauveria* trừ sâu xanh ăn lá bọ đề, các loại sâu hại đậu đỗ và họ hại dừa ... đạt kết quả tốt.

Cuối cùng xin cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa công nghệ sinh học Trường Đại học Bách khoa, Viện Đại học mở, Trường Đại học khoa học tự nhiên và khoa BTVT Trường Đại học Nông nghiệp I Hà nội đã phối hợp trong công tác đào tạo các sinh viên và học viên cao học đạt kết quả cao.

Một lần nữa xin trân thành cảm ơn tất cả những đóng góp quý báu nội trên

Hà Nội ngày 20 tháng 9 năm 2004
Chủ nhiệm nhánh đề tài nấm côn trùng

PGS.TS. Phạm Thị Thuý

1- NHỮNG THÀNH TỰU ĐỀ TÀI ĐẠT ĐƯỢC TỪ 2001-2004

1. **Đã đăng ký 2 chế phẩm nấm trong danh mục thuốc BVTV được sử dụng ở Việt Nam từ năm 2001:**

- Thuốc Nấm *Beauveria bassiana* với tên Boverit.
- Thuốc Nấm *Metarhizium anisopliae* với tên Mat.

2. **Đã được cấp 2 Bằng Độc quyền Sáng chế :**

2.1- Phương pháp sản xuất thuốc nấm *Metarhizium anisopliae* số 3451 ngày 7/4/2003.

2.2- Phương pháp sản xuất thuốc nấm *Beauveria bassiana* số 0141 ngày 18/2/2004.

3. **Đã ứng dụng thuốc nấm Mat để phòng trừ bọ hại dừa trên diện tích rộng** tại Bình Định, Khánh Hoà, Phú Yên, Tiền Giang, Bến Tre, Đồng Tháp, Bạc Liêu, Kiên Giang, Thành phố Hồ Chí Minh và Nghệ An. Hải Phòng ... năm 2001-2004 đạt kết quả tốt được nhiều địa phương đánh giá cao.

Ứng dụng thuốc nấm Boverit để phòng trừ sâu róm thông ở Hà Tĩnh, Thanh Hoá, Nghệ An năm 2003- 2004.

Ứng dụng thuốc nấm Mat để phòng trừ châu chấu hại lúa, ngô ở Hà Tĩnh, Thanh Hoá, Nghệ An năm 2003.

Ứng dụng thuốc nấm Mat để phòng trừ sùng hại mía ở Thạch Thành, Thanh Hoá năm 2001- 2002.

Ứng dụng thuốc nấm Boverit và Mat để phòng trừ sâu xanh ăn lá bồ đề ở Yên Bái năm 2002, sâu hại đậu xanh và đậu tương ở Hà Tĩnh năm 2003-2004.

4. **Đã được Bộ khoa học và công nghệ & Liên hiệp các Hội khoa học Việt Nam tặng Cờ thi đua và Biểu trưng vàng** về “thành tích áp dụng xuất sắc các công trình đoạt Giải thưởng Sáng tạo Khoa học công nghệ Việt Nam vào sản xuất năm 2002-2003”

5. **Đã tham dự 3 Hội Nghị khoa học toàn quốc** và có báo cáo khoa học tại Hội trường ở cả 3 Hội nghị:

5.1. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc tháng 12/03

5.2. Hội nghị khoa học của các Tỉnh miền Trung và Tây nguyên ngày 22-23 tháng 12/2003 tại Bình Định.

5.3. Hội nghị những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống định hướng nông lâm nghiệp miền núi năm 2004 tại Thái Nguyên 23/9/04.

6. **Đã hướng dẫn 18 sinh viên, 1 học viên cao học và 2 nghiên cứu sinh** của 5 Trường Đại học thực hiện đề tài nghiên cứu làm khoá luận tốt nghiệp và Luận án đạt kết quả tốt.

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

GIAI ĐOẠN 2001-2004

I- SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI :

Năm 2001:

- Nghiên cứu công nghệ sản xuất đạt chỉ tiêu :
Nấm *Beauveria* đạt chất lượng 5×10^8 bt/gr
Nấm *Metarhizium* đạt chất lượng $5,5 \times 10^8$ bt/gr..
- Sản xuất được 100 kg nấm B, 100 kg nấm M,
- Đã ứng dụng 2 loại nấm B và M để phòng trừ bọ hại dừa tại một số Tỉnh thuộc ĐBSCL đạt kết quả tốt .
- Đã đào tạo được 5 sinh viên và 1 cao học cho 4 Trường Đại học.

Năm 2002:

- Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ SX nấm nấm *Beauveria* và nấm *Metarhizium* trên túi nilon đảm bảo chất lượng 5×10^8 bt/gr và $5,5 \times 10^8$ bt/gr.
- Sản xuất được 500 kg nấm *Beauveria bassiana* và 500 kg nấm *Metarhizium anisopliae*
- Có mô hình ứng dụng nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* để phòng trừ sâu xanh (*Fentonia sp*) ăn lá bồ đề trên diện tích 1 ha đạt kết quả tốt (Có báo cáo KH) .
- Đã đi Trung Quốc đến Trường đại học An huy để hợp tác trao đổi công nghệ và thăm quan 2 nhà máy sản xuất Bt, 1 nhà máy SX nấm *Beauveria bassiana* , thăm rừng thông đang phun nấm *Beauveria bassiana* trừ sâu róm thông và đã nắm được công nghệ cũng như khả năng ứng dụng.
- Đã đào tạo được 2 sinh viên khoa CNSH, Viện Đại học mở và 1 Nghiên cứu sinh Trường Đại học Cần Thơ.

Năm 2003:

- Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* đạt chất lượng cao 10^9 bt/gr không có hiện tượng tạp nhiễm quy mô đạt 20kg/ ngày.
- Sản xuất 550 kg nấm B đảm bảo chất lượng cao 5×10^9 bt/gr và 550 kg nấm Ma đảm bảo chất lượng cao $5,2 \times 10^9$ bt/gr.
- Có mô hình ứng dụng nấm B và Ma trừ sâu hại đậu xanh và đậu tương ở xã Thạch Môn, Thạch Hà, Hà Tĩnh trên diện tích 1 ha và nấm Ma trừ bọ hại dừa ở 3 Huyện Phù Mỹ, Phù Cát và Hoài Nhơn, Tỉnh Bình Định trên diện tích rộng hàng trăm ha đạt kết quả tốt (Có b/c khoa học và báo cáo tại Hội nghị khoa học ở các Tỉnh miền Trung và Tây nguyên tháng 12/2003).
- Đã đào tạo được 5 sinh.viên cho 4 Trường Đại học và 1 NCS Trường Đại học Thái Nguyên.

Năm 2004:

- Bảo quản 2 bộ giống nấm B & M
- Sản xuất 100 kg nấm (50 kg B, 50 kg M) đạt chất lượng cao.
- Ứng dụng nấm B và M trừ sâu hại đậu ở Hà Nội , Hà Tĩnh, nấm M trừ bọ hại dừa ở Hải Phòng
- Đào tạo 6 sinh viên làm khoá luận tốt nghiệp đạt loại giỏi.

II- QUYẾT TOÁN TÀI CHÍNH:

Năm 2001: Nhận 35 triệu

Năm 2002: Nhận 90 triệu

Năm 2003: Nhận 90 triệu

Năm 2004: Nhận triệu

Tổng đã nhận : 215 triệu

Đến cuối năm 2003 chúng tôi đã quyết toán đầy đủ số tiền theo như hợp đồng thực hiện qua các năm đã ký với Chủ nhiệm đề tài KC04-12.

Số tiền nhận được đã thực hiện một cách nghiêm túc vì vậy đã hoàn thành xuất sắc các nội dung mà đề tài đặt ra, có năm vượt chỉ tiêu về số lượng sản phẩm và mô hình ứng dụng như năm 2002, 2003.

III- KẾT LUẬN :

Căn cứ vào mục tiêu và nội dung đề ra theo kế hoạch đã ký với chủ nhiệm đề tài, căn cứ vào kinh phí được cấp hàng năm . Xét về mặt nghiên cứu khoa học và khả năng thực hiện đề tài, mặc dù nguồn kinh phí được cấp có hạn, địa bàn ứng dụng xa xôi, song với sự nỗ lực và tinh thần trách nhiệm rất cao, cả nhóm đề tài đã hoàn thành xuất sắc nhiệm vụ được giao với kết quả rất khả quan.

Đạt được kết quả như vậy là do có sự phối hợp tốt với rất nhiều địa phương, cả 2 bên cùng thực hiện ví dụ như năm 2002 cùng với Chi cục BVTV Yên Bái để phòng trừ sâu xanh ăn lá bắp đẻ trên ổ dịch 1 ha , sau phun nấm 2 tháng đã dập tắt được nạn dịch sâu xanh gây ra. Năm 2003 cùng với Chi cục BVTV Tỉnh Bình Định, được sự ủng hộ của Sở KH &CN , Sở NN &PTNT, chúng tôi đã ứng dụng trên diện rộng tất cả diện tích trồng dừa ở cả 3 Huyện Phù Cát, Phù Mỹ và Hoài Nhơn đạt kết quả tốt được Địa phương và nông dân đánh giá rất cao.

Đề nghị:

Trong giai đoạn tới Ban chủ nhiệm Chương trình CNSH cấp Nhà nước tiếp tục cấp kinh phí để Đề tài thực hiện trên quy mô lớn hơn nhằm góp phần làm sạch môi trường và tạo ra những nông sản thực phẩm an toàn , bền vững.

Hy vọng những đề nghị chính đáng của chúng tôi được đáp ứng.
Xin trân thành cảm ơn.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ BỌ HẠI DỪA
(*Brontispa spp*) VÀ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NẤM
***Metarhizium anisopliae* ĐỂ PHÒNG TRỪ BỌ HẠI DỪA**
TẠI CÁC TỈNH PHÍA NAM NĂM 2001
(BÁO CÁO TÓM TẮT)

Phạm Thị Thuỳ và CTV
Viện Bảo vệ thực vật

Từ năm 1999 trở lại đây, bọ cánh cứng hại dừa đã phát sinh và gây hại cây dừa đáng kể ở Bến Tre và hầu khắp các tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long. Theo thống kê của Cục Bảo vệ thực vật tháng 7/2001 thì 30 tỉnh trồng dừa ở nước ta đều có sự hiện diện của bọ dừa, tuy nhiên ở mức độ thiệt hại khác nhau. Riêng tỉnh Bến Tre tính đến tháng 7/2001 đã có khoảng trên 25.000 ha dừa bị hại chiếm 65% tổng diện tích dừa trong toàn tỉnh. Tại Khánh Hoà, Phú Yên, Bình Định và các tỉnh Miền Trung dịch bọ hại dừa cũng gây hại và làm giảm năng suất dừa cũng như làm mất vẻ đẹp của nông thôn Miền Nam.

Với nạn dịch bọ hại dừa gây hại nghiêm trọng, nhiều tỉnh đã thành lập ban chỉ đạo phòng trừ bọ hại dừa bằng thuốc trừ sâu hoá học. Việc phòng trừ bước đầu tuy thu được kết quả, nhưng đã gây ô nhiễm môi trường, điều đó đòi hỏi các nhà khoa học cần thiết phải tìm ra biện pháp mới thay thế nhằm hạn chế được sự ô nhiễm môi trường, giảm khả năng quen thuốc của bọ dừa trên diện tích rộng.

Trước yêu cầu bức xúc của sản xuất dừa, xuất phát từ thực tiễn sản xuất, ở nước ta từ năm 2000 đến nay được Bộ NN&PTNT đầu tư, Viện Bảo vệ thực vật đã phối hợp với các Chi cục Bảo vệ thực vật Bến Tre, Khánh Hoà, ... bước đầu nghiên cứu về sinh thái bọ hại dừa và khả năng sử dụng chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* trên diện rộng, mục đích tập huấn để phòng trừ bọ hại dừa ở các tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long cũng như một số tỉnh miền Trung.

Chế phẩm nấm M.a do Viện Bảo vệ thực vật sản xuất đã được đăng ký trong danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng ở Việt Nam. Chế phẩm này đã được Bộ KH&CN&MT cấp bằng độc quyền sáng chế về phương pháp sản xuất.

Kết quả nghiên cứu và ứng dụng trong mấy năm qua trên diện tích hàng trăm hecta dừa đã khẳng định nấm Ma có hiệu quả cao với bọ hại dừa:

1. Bước đầu điều tra được 13 ký chủ của bọ hại dừa, tập trung chính là dừa, cau và thiên tuế.

2. Vòng đời của bọ hại dừa tại Khánh Hoà từ tháng 11 - 12 trong điều kiện nhiệt độ trung bình 25,6°C và ẩm độ 80,3% vòng đời kéo dài đến trưởng thành ở

trứng là 49 - 71 ngày. Tại Hà Nội vòng đời 51 - 80 ngày. Sâu non có 5 tuổi, pha sâu non kéo dài trung bình 30 - 34 ngày. Khả năng tiêu thụ thức ăn rất lớn, trung bình với mật độ 200 con/lá chỉ sau 3 - 5 ngày là lá bị hại hoàn toàn.

3. Kết quả phòng trừ bọ hại dừa bằng nấm M.a của Viện Bảo vệ thực vật đã được khẳng định ở một số tỉnh trồng dừa của đồng bằng sông Cửu Long trên diện rộng hàng trăm hecta trong năm 2000 và 2001 hiệu quả đạt từ 55,5 - 97,0% sau 7 - 30 ngày thử nghiệm, số liệu ở các tỉnh đều tương tự. Riêng Khánh hoà theo dõi đến 48 ngày vẫn thấy hiệu quả từ 60 - 80%.

4. Nấm M.a có hiệu quả với pha sâu non của bọ hại dừa cao hơn pha trưởng thành và hiệu quả phòng trừ kéo dài đến 30 - 40 ngày.

5. Chế phẩm nấm M.a không ảnh hưởng xấu đến các gia cầm, cá và các sinh vật khác.

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NẤM *BEAUVERIA* VÀ *METARHIZIUM* ĐỂ ỨNG DỤNG PHÒNG TRỪ SÂU XANH (*FENTONIA* SP) HẠI BỒ ĐỀ

Ở YÊN BÁI NĂM 2002.

Phạm Thị Thuý và CTV

Viện Bảo vệ thực vật

MỞ ĐẦU:

Những năm qua việc sử dụng thuốc hoá học trong BVTV đã bộc lộ những hạn chế và tiêu cực đối với hệ sinh thái nông nghiệp nói chung và sản xuất nông sản thực phẩm nói riêng vì vậy chế phẩm sinh học nấm *Beauveria bassiana* và nấm *Metarhizium anisopliae* đã khắc phục được nhược điểm của thuốc trừ sâu hoá học gây ra. Đến nay các chế phẩm nấm đã được nông dân nhiều Tỉnh hưởng ứng để phòng trừ trên nhiều đối tượng sâu hại, đặc biệt là sâu róm thông, châu chấu và bọ hại dừa...

Nhằm phát triển qui mô sản xuất để đạt năng suất cao hơn một ngày khoảng 20 kg chế phẩm trong điều kiện phòng thí nghiệm nhưng chất lượng vẫn đảm bảo và hiệu quả phòng trừ sâu hại đạt hiệu lực cao, năm 2002 Viện BVTV đã triển khai nghiên cứu cải tiến công nghệ sản xuất các chế phẩm nấm đại trà bằng túi nilon PP, trên cơ sở đó nghiên cứu sử dụng 2 chế phẩm nấm trên để phòng trừ sâu xanh *Fentonia* sp hại bồ đề ở Tân hưng, Yên Bái.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU:

1. Nguyên liệu:

- Chủng nấm *Beauveria bassiana* chuẩn được phân lập trên sâu róm thông thu thập tại Thanh Hoá.
- Chủng nấm *Metarhizium anisopliae* chuẩn được phân lập trên bọ hại dừa thu thập ở Bến Tre.
- Chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* được sản xuất tại Viện BVTV trên một số môi trường đã công bố 1996(3).
- Một số dụng cụ và trang thiết bị chuyên dùng như túi nilon PP và cổ nút bông và nhiều loại hoá chất cần thiết khác.

2. Phương pháp nghiên cứu:

- Phân lập và sản xuất nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* theo phương pháp nghiên cứu vi sinh vật nói chung.

Thử nghiệm 2 chế phẩm nấm trên một số sâu hại tại Yên Bái theo quy trình chung về BVTV, mỗi công thức thí nghiệm làm 3 lần nhắc lại. Điều tra trước và sau phun 3,5,7,10,20, 30,50 ngày. Pha và phun chế phẩm theo phương pháp chung của BVTV và BVR.

Kết quả trong phòng được hiệu chỉnh theo công thức của Abbott (1925), ngoài đồng ruộng được hiệu chỉnh theo công thức của Henderson Tilton (1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN :

1. Phát triển qui trình nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong túi nilon PP có nút bông:

Trong công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học, vấn đề quan trọng nhất và cũng là yếu tố quyết định nhất đến chất lượng của vi nấm nói riêng và VSV nói chung đó là chủng gốc có độc tính cao. Trên cơ sở điều tra thu thập các chủng nấm *Beauveria bassiana* và nấm *Metarhizium anisopliae* ký sinh một số sâu hại cây trồng. Kết quả phân lập chúng tôi đã thu được một số nguồn nấm trên một số sâu hại (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả tuyển chọn các nguồn nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* có độc tính cao năm 2002

STT	Tên vi nấm	Số lượng (Bt x 10 ⁹ /ml)	Nguồn gốc thu thập	Trên cây trồng	Địa điểm thu thập
1	<i>Beauveria bassiana</i>	5,00	Sâu róm thông	Thông	Thanh hoá
2	<i>Beauveria bassiana</i>	4,90	Bọ xít xanh	Lúa	Hà nội
3	<i>Beauveria bassiana</i>	4,85	Sâu xanh bướm trắng	Rau	Hà nội
4	<i>Metarhizium anisopliae</i>	5,50	Bọ hại dừa	Dừa	Bến tre
5	<i>Metarhizium anisopliae</i>	5,25	Sùng mía	Mía	Thanh hoá
6	<i>Metarhizium anisopliae</i>	5,15	Bọ xít nhãn	Nhãn	Hà nội

Năm 2002 chúng tôi đã thu thập và tuyển chọn được 3 nguồn nấm *Beauveria bassiana* trên sâu róm thông Thanh Hoá, sâu xanh bướm trắng, bọ xít xanh ở Hà Nội và 3 nguồn nấm *Metarhizium anisopliae* trên bọ hại dừa ở Bến Tre, sùng mía ở Thanh Hoá và bọ xít nhện ở Hà Nội. Số liệu về số lượng bào tử đã chỉ ra rất cao, cao hơn cả là nguồn nấm *Beauveria bassiana* trên sâu róm thông đạt chất lượng 5×10^9 Bt/ml và nấm *Metarhizium anisopliae* trên bọ hại dừa đạt $5,5 \times 10^9$ Bt/ml. vì vậy chúng tôi đã lựa chọn 2 nguồn nấm trên để sản xuất chế phẩm để phòng trừ các sâu hại cây trồng.

Chất lượng chế phẩm được đánh giá bằng 2 tiêu chí số lượng bào tử sinh độ to và hoạt tính sinh học trừ sâu nên sau khi có chủng nấm Bb và Ma thuần chúng tôi đã sử dụng môi trường sản xuất theo tỷ lệ 60% cám, 30% ngô và 10% trấu, hàm lượng nước trên môi trường là 1/3 đặt trong túi nilon và cấy nấm thuần vào môi trường đã khử trùng. Theo dõi khả năng phát triển hình thành bào tử của nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong túi nilon hàng ngày (Bảng 2).

Bảng 2: Chất lượng của chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* phát triển trong túi nilon sau 10 ngày nuôi cấy

Đợt thí nghiệm	Nấm <i>Beauveria bassiana</i> ($\times 10^8$ Bt/g)	Nấm <i>Metarhizium anisopliae</i> ($\times 10^8$ Bt/g)
I	4,35	4,90
II	4,50	5,00
III	4,60	4,85
Trung bình	4,48	4,92

Qua số liệu cho thấy sản xuất trong túi nilon cả nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* đều phát triển tốt. Nấm *Beauveria* đạt TB $4,48 \times 10^8$ Bt/ 1 gram, nấm *Metarhizium* đạt TB là $4,92 \times 10^8$ bào tử/ 1 gram. so sánh chất lượng sản xuất trong bình tam giác hoặc lọ thì số liệu gần như tương đương. vì bình quân số bào tử sản xuất trong lọ công bố từ những năm trước nấm *Metarhizium anisopliae* đạt được $5,5 \times 10^8$ Bt/gr và nấm *Beauveria bassiana* đạt $5,0 \times 10^8$ Bt/gr.

Như vậy việc sản xuất nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong túi nilon đã mở ra hướng phát triển công nghệ sản xuất theo qui mô lớn, ngoài cấy giống trực tiếp ra, chúng tôi còn cải tiến cấy bằng giống dịch thể hoặc sử dụng giống gốc cấp II sản xuất trong bình tam giác hoặc lọ thủy tinh để cấy

trực tiếp vào túi nylon theo tỷ lệ 10-20 % giống. Ưu điểm của sản xuất bằng túi nylon là có thể khử trùng được nhiều, số lượng lớn, không tốn công rửa lọ và bình.

Một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng của các chế phẩm đó là việc thử nghiệm lại trên một số đối tượng sâu hại trong phòng. Kết quả thí nghiệm trên sâu xanh hại lá bồ đề với chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* được trình bày qua bảng 3.

Bảng 3: Đánh giá hiệu lực của chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* trên sâu xanh (*Fentonia sp*) hại bồ đề trong phòng thí nghiệm

Nồng độ TN ($\times 10^8$ Bt/ml)	Hiệu lực phòng trừ sau TN (% chết)					ĐKTN
	2 ngày	4	6	7	10	
1	0	0	13,3	24,5	33,3	T ^o C TB : 26,1 H(%) TB: 79,8
2	0	13,3	27,0	36,6	45,7	
3	1	16,6	36,6	48,8	68,5	

Số liệu bước đầu cho thấy nấm *Beauveria bassiana* có hiệu quả với sâu xanh ăn lá bồ đề ở công thức có nồng độ cao nhất 3×10^8 Bt/ml đạt 68,5% sau 10 ngày trong ĐKTN có nhiệt độ trung bình là 26,1^oC và ẩm độ TB là 79,8%, nồng độ thấp hơn không có hiệu quả.

Đánh giá hoạt lực sinh học của nấm *Metarhizium anisopliae* lên bọ xít hại nhãn vải ở bảng 4.

Bảng 4: Hiệu lực của chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* trên bọ xít hại nhãn vải (*Tessaratomia papillosa*) trong phòng TN

Nồng độ ($\times 10^8$ Bt/ml)	Hiệu lực phòng trừ (%) sau TN					T (^o C) TB	H (%) TB
	3 ngày	5	7	10	12		
4	7,5	25,7	40,5	46,5	50,5	28,1	81,7
8	9,4	33,6	51,7	58,8	66,2		
12	12,4	50,3	63,4	70,3	76,0		

Kết quả cho thấy chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu lực tương đối cao với bọ xít hại nhãn vải. Trong điều kiện nhiệt độ trung bình 28,1^oC và ẩm độ là 81,7%, ở nồng độ cao 12×10^8 Bt/ml sau 12 ngày TN hiệu lực của nấm đạt 76%, còn ở nồng độ thấp 4×10^8 Bt/ml tỷ lệ chết của bọ xít chỉ đạt 50,5% và sự hiện diện của nấm mọc lại trên bọ xít là 60%. Như vậy có thể sản xuất chế phẩm

nấm *Beauveria* và *Metarhizium* trong túi nilon để nâng cao số lượng quy mô phòng thí nghiệm 20-30kg/ ngày. Trong tương lai nếu được Nhà nước đầu tư để xây dựng xưởng, chúng tôi có thể đảm bảo sản xuất trên quy mô lớn hơn vài tạ /ngày kết hợp giữa lên men chìm và lên men xốp để hạ giá thành sản phẩm cho người nông dân .

Năm 2002 tại Yên Bái dịch sâu xanh hại bồ đề *Fentonia sp.* thuộc họ Notodontidae, bộ cánh vẩy Lepidoptera đã phát sinh rất mạnh và gây hại đáng kể. Viện BVTV đã phối hợp chi cục BVTV Tỉnh Yên Bái nghiên cứu triển khai ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* để phòng trừ sâu xanh trên mô hình 2 ha (bảng 5).

Bảng 5: Hiệu lực của chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* phòng trừ sâu xanh (*Fentonia sp*) hại bồ đề tại thôn Đồi Hối, Xã Tân Hưng, Huyện Yên Bình, Tỉnh Yên Bái

Chế phẩm	Nồng độ phun	Hiệu lực phòng trừ (%)sau				T (°C)TB	H (%) TB
	(x 10 ¹² Bt/ha)	5 ngày	7	10	20		
<i>Beauveria bassiana</i>	2,5	30,3	58,5	88,0	75,7	27,6	85,4
<i>Metarhizium anisopliae</i>	3,0	46,7	63,2	89,7	78,5		Có mưa trong đợt TN

Qua bảng 5 cho thấy chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* có hiệu lực cao với sâu xanh ăn lá bồ đề tại Yên Bái, sau 10 ngày nấm *Beauveria bassiana* ở nồng độ 2,5x 10¹²Bt/ha có hiệu lực đạt 88,0%, và ở nồng độ 3x10¹² Bt/ha nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu lực là 89,7% và hiệu lực kéo dài đến 20 ngày sau phun đạt 75,7% (nấm *Beauveria bassiana*) và 78,5% (nấm *Metarhizium anisopliae*).

Như vậy lần đầu tiên tại Yên Bái đã sử dụng chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* để phòng trừ sâu xanh hại bồ đề đạt kết quả cao. Điều này đã mở ra hướng mới để phòng trừ sâu hại cây lâm nghiệp ở các Tỉnh miền núi phía Bắc của các chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong những năm tới.

KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 6 nguồn nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trên một số sâu hại, trong đó tuyển chọn được chủng nấm *Beauveria bassiana* trên sâu róm thông và *Metarhizium anisopliae* trên bọ hại dừa làm chủng gốc chuẩn để sản xuất chế phẩm.

2. Nghiên cứu phát triển sản xuất chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong túi nilon đã nâng cao được năng suất và chất lượng chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* đạt trung bình $4,48 \times 10^8$ bào tử/g và hiệu quả diệt sâu xanh hại bồ đề là 68,5% sau 10 ngày TN, số lượng bào tử nấm *Metarhizium anisopliae* đạt $4,92 \times 10^8$ Bt/g và hiệu lực diệt bọ xít hại nhãn đạt 70,3 - 76% sau 10 - 12 ngày thí nghiệm.

3. Tạo mô hình phòng trừ sâu xanh hại bồ đề tại HTX Tân Hưng, Huyện Yên Bình, Tỉnh Yên Bái trên diện tích 1 ha sử dụng nấm *Beauveria bassiana*, hiệu lực phòng trừ đạt 88% sau 10 ngày thí nghiệm và hiệu lực kéo dài đến 20 ngày sau phun là 75,5%. Chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* trừ sâu xanh trên mô hình 1 ha, hiệu quả phòng trừ đạt 89,7% sau 10 ngày phun và kéo dài đến 20 ngày đạt 78,5%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Thuý, 1993. Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm nấm *Beauveria* và *Metarhizium* để phòng trừ rầy nâu hại lúa và sâu đo xanh hại đay. *Tạp chí NN&PTNT* số 3, trang 137-139
2. Phạm Thị Thuý, 1996. Tạo chế phẩm nấm *Beauveria bassiana*. *Tuyển tập công trình nghiên cứu Biện pháp sinh học*, NXBNN, trang 73-82.
3. Phạm Thị Thuý, 1996. Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm nấm *Metarhizium flavoviride* để phòng trừ sâu hại cây trồng. *Tuyển tập công trình nghiên cứu Biện pháp sinh học*, NXBNN, trang 83- 92.
4. Phạm Thị Thuý, 1999. Kết quả thử nghiệm chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* để phòng trừ sâu róm thông ở Lâm trường Phù Bắc Yên Sơn la năm 1998. *Tạp chí NN&PTNT* số 5, trang 202-205
5. Lawrence A. Lacey, 2000. Manual of techniques in insect pathology *Yakuma Agricultura Reseach Laboratory*. USDA - ARS. 5230 Komowac Pass Road, Wapato WA 98051, USA

NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU SINH HỌC NẤM *METARHIZIUM* VÀ *BEAUVERIA* TRỪ MỘT SỐ SÂU HẠI CÂY TRỒNG NĂM 2003

Phạm Thị Thuỳ¹
Trần Văn Huy¹, Nguyễn Duy Mạnh¹
Thân Thời An², Nguyễn Văn Sơn³

Trong khuôn khổ đề tài nhánh mạng mã số công nghệ sinh học cấp nhà nước KC 04-12, chế phẩm nấm côn trùng *Beauveria* và *Metarhizium* những năm qua đã đạt được những kết quả đáng khích lệ, thực tế đã khẳng định được sự hiện diện của nấm trong tự nhiên trên cơ sở ứng dụng chúng để phòng trừ một số loại dịch hại nguy hiểm như châu chấu, sâu róm thông, bọ hại dừa, mối đất, và các loại sâu hại rau, lúa... và bước đầu đã đóng góp một phần quan trọng vào việc bảo vệ môi trường sinh thái đồng ruộng.

Kế thừa những kết quả của các năm trước, đề tài nghiên cứu nấm *Beauveria* và *Metarhizium* năm 2003 đã bám sát mục tiêu, tiếp tục hoàn thiện công nghệ SX nhằm đạt chất lượng cao, đồng thời triển khai ứng dụng các chế phẩm nấm trong phòng trừ bọ hại dừa ở Bình Định và sâu hại đậu ở Hà Tĩnh đạt hiệu quả góp phần bảo vệ môi trường sinh thái đồng ruộng.

I- VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU :

1) Vật liệu nghiên cứu :

- Nguồn nấm thu thập trên bọ hại dừa ở Bình Định, Kiên Giang
- Các vườn dừa ở Phù Cát, Phù Mỹ và Hoài Nhơn Tỉnh Bình Định và vườn Đậu ở xã Thạch Môn huyện Thạch Hà Tỉnh Hà Tĩnh.
- Các nguyên liệu và hoá chất để phân lập và sản xuất thường sử dụng

2) Nội dung và phương pháp nghiên cứu :

a. Nội dung nghiên cứu:

- 1- Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất quy mô 20 kg/ ngày đảm bảo chất lượng 5×10^9 bt/g.
- 2- Sản xuất 525 kg nấm *Beauveria* và 525 kg nấm *Metarhizium*
- 3- Tập huấn cho 200 hộ nông dân sử dụng nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa và 200 hộ nông dân ở xã Thạch Môn, Huyện Thạch Hà, Tỉnh Hà Tĩnh sử dụng các chế phẩm nấm *Beauveria*, nấm *Metarhizium* và Bt trừ sâu hại đậu xanh và đậu tương.
- 4- Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa trên diện tích 15 ha tại Tỉnh Bình Định.

5- Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria* và nấm *Metarhizium* trừ sâu keo da lán, sâu khoang ăn lá và sâu xanh đục quả đậu xanh, đậu tương ... trên diện tích 1 ha ở Thạch Môn, Thạch Hà, Hà Tĩnh.

6- Đào tạo NCS, Cao học & sinh viên.

b. Phương pháp nghiên cứu:

1- Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất quy mô 20 kg/ ngày đảm bảo chất lượng 5×10^9 bt/g.

- Phân lập theo phương pháp chung về vi sinh vật của Quốc tế và trong nước

- Sản xuất nấm theo phương pháp của P.T.Thủy(1996).

Bằng phương pháp lên men xốp, với thiết bị hiện có trong phòng thí nghiệm, điều tra thu thập tuyển chọn chủng nấm mới có độc tố cao thích hợp với điều kiện tự nhiên, cải tiến môi trường nhân giống cấp 1 (Giảm 1/2 tỷ lệ thành phần môi trường SK) và môi trường sản xuất thêm phụ gia trấu theo tỷ lệ thích hợp để đảm bảo độ tơi xốp để chế phẩm nấm đạt chất lượng cao 5×10^9 bt/gram .

2. Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa trên diện tích 15 ha tại Bình Định. Thí nghiệm được tiến hành trên 3 địa điểm Phù Cát, Phù Mỹ và Hoài Nhơn (Mỗi địa điểm 5 ha) trong 2 mùa khô và mưa 2003:

* Điều tra trước và sau phun 1,2,3...8 tuần theo phương pháp chung. Mỗi công thức thí nghiệm và đối chứng điều tra 5 điểm , mỗi điểm điều tra 3 cây. Đếm mật số sâu, nhộng và trưởng thành có trên cây và sự hiện diện của nấm trên sâu non và bọ hại dừa có trên cây.

* Lượng phun mỗi cây 50 gr nấm Mat pha trong 2 lít nước có hỗn hợp với 30 cc dầu mè làm chất bám dính. Trung bình $2,5 \times 10^{12}$ Bt/ha.

3. Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria* và nấm *Metarhizium* trừ sâu keo da lán, sâu khoang ăn lá đậu tương và sâu xanh đục quả đậu xanh... trên diện tích 1 ha ở Thạch Môn , Thạch Hà , Hà Tĩnh. Thí nghiệm tiến hành trong vụ hè thu 2003:

* Phun diện tích thí nghiệm 0,5 ha đậu tương và 0,5 ha đậu xanh

* Điều tra trước và sau phun 3,5,7,10,15 ngày.

* Pha & phun nấm theo phương pháp chung.

* Kết quả thí nghiệm cả trừ bọ hại dừa và sâu hại đậu tương được tính theo công thức của Henderson Tilton (1955)

II- KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

II.1- Nghiên cứu phát triển công nghệ sản xuất nấm :

Điều tra thu thập và tuyển chọn những chủng nấm có hoạt lực cao ngoài tự nhiên là một vấn đề rất quan trọng trong việc sản xuất tạo ra những chế phẩm nấm có độc tố cao có khả năng phòng trừ được sâu hại.

Năm 2003 chúng tôi đã kết hợp điều tra thí nghiệm và đã thu thập được một số chủng nấm có hoạt lực cao, kết quả tuyển chọn được chúng tôi trình bày lên bảng 1.

Bảng 1. Danh sách những chủng nấm *Metarhizium* & *Beauveria* đã thu thập được trong năm 2003

STT	Số ký hiệu	Trên sâu hại	Thời gian thu thập
1	M1	Bọ hại dừa Kiên Giang	Tháng 4/03
2	M2	Sâu đo hại quế Quảng Nam	Tháng 4/03
3	M3	Sâu xanh bướm trắng hại rau HNội	Tháng 5/03
4	M4	Sâu xanh(Ha) đục quả đậu xanh HTĩnh	Tháng 8/03
5	M5	Châu chấu hại lúa Nghệ An	Tháng 8/03
6	M6	Mọt đục quả cà phê Sơn La	Tháng 9/03
7	M7	Bọ hại dừa Phú Quốc	Tháng 11/03
8	M8	Bọ hại dừa Bình Định	Tháng 11/03
9	M9	Bọ xít xanh hại đậu tương Hà Nội	Tháng 11/03
10	B1	Mọt đục quả cà phê Sơn La	Tháng 9/03
11	B2	Bọ hại dừa Phú Quốc	Tháng 11/03

Qua bảng 1 cho thấy trong năm 2003 chúng tôi đã thu thập được 9 chủng nấm *Metarhizium anisopliae* trên 7 loại sâu hại khác nhau : bọ hại dừa, sâu xanh bướm trắng, sâu đo hại quế, sâu xanh (Ha) đục quả đậu tương, mọt đục quả cà phê, châu chấu hại lúa và bọ xít xanh hại đậu tương , trong đó có 3 chủng nấm thu được trên bọ hại dừa ở 3 địa điểm Kiên Giang, Phú Quốc , Bình Định và 2 chủng nấm *Beauveria* trên mọt đục quả cà phê Sơn La và bọ hại dừa Phú Quốc.

Từ kết quả trên chúng tôi đã sử dụng tùy chủng nấm mà sản xuất ra chế phẩm cho từng đối tượng sâu hại trên mỗi địa phương khi có dịch hại. Kế thừa kết quả của những năm trước về nghiên cứu sử dụng môi trường SKG giảm 1/2 nguyên liệu làm môi trường cấp 1, chúng tôi đã sử dụng chủng nấm chuẩn thu được trong năm 2003 để sản xuất ra chế phẩm.

Môi trường sản xuất sử dụng các nguyên liệu như những năm trước với mục đích làm tăng độ thoáng khí cho nấm phát triển, chúng tôi đã cải tiến theo tỷ lệ nguyên liệu ổn định là 6 phần cám gạo , 3 phần bột ngô và 1 phần trấu với 30% nước (tính bằng ml) trong 100% thành phần môi trường (Tính bằng gram). Kết quả cho thấy chất lượng nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* ổn định (bảng 2).

Bảng 2 : Chất lượng bào tử của chế phẩm nấm *Beauveria bassiana* và Nấm *Metarhizium* sau 7 ngày nuôi cấy

Đợt thí nghiệm	Nấm <i>Beauveria bassiana</i> (x10 ⁹ Bt/g)	Nấm <i>Metarhizium anisopliae</i> (x10 ⁹ Bt/g)
I	5,10	5,20
II	4,98	5,10
III	5,00	5,18
Trung bình	5,027	5,16

Qua bảng 2 cho thấy nếu sản xuất bằng chủng nấm mới thì nấm phát triển tốt cả trên môi trường nhân giống và môi trường sản xuất cụ thể nấm *Beauveria bassiana* đạt TB 5,027 x10⁹ Bt/ 1 gram chế phẩm và nấm *Metarhizium anisopliae* đạt TB là 5,16 x 10⁹ bào tử/ 1gram, so sánh chất lượng với những năm trước thì cao hơn vì bình quân số lượng bào tử chỉ đạt 5x10⁸ bt/gr.

Kết quả trên khẳng định chất lượng của chế phẩm nấm phụ thuộc chủ yếu vào chủng giống chuẩn mới, đồng thời với môi trường sản xuất ổn định thực hiện theo một quy trình nghiêm túc thì chắc chắn sẽ đạt kết quả cao.

Trên cơ sở chất lượng nấm ổn định chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* phòng trừ bọ hại dừa ở Bình Định trong mùa khô (Bảng 3)

**Bảng 3 . Hiệu lực phòng trừ của chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ sâu non & trưởng thành bọ hại dừa ở Bình Định.
(Thí nghiệm trong mùa khô)**

Thời gian sau phun	Cát lâm- Phù Cát		Mỹ Châu- Phù Mỹ		Hoài Hảo-Hoài Nhơn	
	Sâu non	Trưởng thành	Sâu non	Trưởng thành	Sâu non	Trưởng thành
1 tuần	23,48	20,94	25,19	23,68	29,71	26,49
2 -	35,90	35,69	36,84	31,73	34,84	36,12
3 -	44,60	39,84	47,09	40,54	46,70	41,17
4 -	39,18	39,60	43,90	35,01	46,22	42,27
5 -	36,88	30,25	32,84	31,18	34,39	36,37
6 -	32,08	22,36	26,92	24,69	25,56	30,58
7 -	24,76	20,73	25,83	19,49	23,23	25,96
8 -	21,52	17,27	24,31	20,41	23,81	22,08

Qua bảng 3 cho thấy trong mùa khô chế phẩm nấm *Metarhizium* có hiệu quả thấp với cả 2 pha sâu non và trưởng thành của bọ hại dừa, số liệu ở cả 3 địa điểm phun đều khẳng định hiệu quả chỉ đạt cao nhất vào tuần thứ 3 sau phun là trên dưới 40%, các tuần sau hiệu quả cũng giảm chỉ có trên 20%, điều này thể hiện rằng mùa khô nấm không phát triển thích hợp, kết quả này cho thấy chế

phẩm nấm phụ thuộc vào ẩm độ, nhiệt độ... Để xác định hiệu quả của nấm *Metarhizium* với bọ hại dừa ở trước và sau mùa mưa, kết quả phòng trừ sâu non bọ hại dừa thể hiện qua bảng 4

Bảng 4. Hiệu lực phòng trừ của chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ sâu non bọ hại dừa ở Bình Định trong mùa mưa năm 2003

Thời gian sau phun	Cát Lâm- Phù Cát		Mỹ Châu- Phù Mỹ		Hoài Hảo- Hoài Nhơn	
	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa
1 tuần	50,42	48,36	55,57	49,52	59,50	52,69
2 -	64,71	64,18	72,80	63,63	81,42	69,95
3 -	<u>77,82</u>	<u>76,34</u>	<u>79,37</u>	<u>75,30</u>	<u>85,08</u>	<u>78,06</u>
4 -	85,31	85,98	85,30	85,39	84,66	84,40
5 -	83,69	84,29	85,05	84,99	84,23	83,86
6 -	84,35	83,26	82,20	83,26	84,49	83,76
7 -	84,05	83,32	82,47	83,32	84,71	85,13
8 -	<u>83,79</u>	<u>82,20</u>	<u>83,02</u>	<u>83,29</u>	<u>85,58</u>	<u>84,77</u>

Qua bảng 4 cho thấy chế phẩm nấm *Metarhizium* có hiệu quả cao với bọ hại dừa, hiệu quả sau phun 2 tuần đạt ở trước & sau mùa mưa đạt 64,71% - 81,42%. Hiệu quả này được kéo dài cho đến 8 tuần sau phun, chúng biến động từ 77,82-84,77%. Thực tế cho đến nay tại Bình Định bọ hại dừa đã giảm hẳn biểu hiện các đợt dừa non mới đã nhú lên, cây dừa vươn sức sống ra trái mới, kết quả này rõ rệt có thể nhìn thấy được trên quốc lộ 1A.

Hiệu quả của nấm với trưởng thành bọ hại dừa trình bày lên bảng 5

Qua bảng 5 cho thấy hiệu quả của chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ trưởng thành thường thấp hơn so với sâu non ở cả các kỳ điều tra kể cả phun trước mùa mưa và sau mùa mưa. Sau 2 tuần phun hiệu quả phòng trừ trưởng thành bọ hại dừa đạt 66,33% tại điểm Cát Lâm -Phù Cát, 68,72% tại Phù Mỹ & ở Hoài Nhơn đạt 76,49%, hiệu quả cũng kéo dài cho đến 8 tuần sau phun đạt 78,79-79,67%(Trước mùa mưa) và 77,30- 81,00%(Sau mùa mưa).

Việc phòng trừ bọ hại dừa trong mùa mưa 2003 ở Bình Định đã chứng minh được hiệu quả rõ rệt của chế phẩm nấm *Metarhizium*, nó không chỉ có ý nghĩa về hiệu quả kỹ thuật mà còn hiệu quả kinh tế vì phun chế phẩm nấm *Metarhizium* chỉ cần phun 2 lần, trong khi đó phun thuốc hoá học phải 7-10 lần, thuốc hoá học không đắt nhưng tốn nhiều công, nên giá thành cao hơn.

Bảng 5 . Hiệu lực phòng trừ của chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ trưởng thành bọ hại dừa ở Bình Định năm 2003

Thời gian sau phun	Cát lâm- Phù Cát		Mỹ Châu- Phù Mỹ		Hoài Hảo- Hoài Nhơn	
	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa	Trước mùa mưa	Sau mùa mưa
1 tuần	50,23	42,75	53,93	51,11	52,28	52,08
2 -	66,33	59,14	68,72	65,80	76,49	68,07
3 -	<u>77,48</u>	<u>76,71</u>	<u>79,21</u>	<u>75,49</u>	<u>82,00</u>	<u>77,27</u>
4 -	80,06	81,72	81,06	81,99	81,95	82,66
5 -	79,53	80,63	79,48	80,09	81,01	80,22
6 -	79,82	80,64	79,92	79,71	80,21	80,59
7 -	77,95	78,83	79,52	78,36	80,65	79,98
8 -	<u>78,79</u>	<u>77,30</u>	<u>79,67</u>	<u>79,69</u>	<u>79,12</u>	<u>81,00</u>

Phun nấm trừ bọ hại dừa còn có ý nghĩa về mặt xã hội là nâng cao được nhận thức cho nông dân đồng thời tránh được nguy cơ ô nhiễm môi trường. Những hiệu quả trên đã được Sở Khoa học và Công nghệ ghi nhận trong Hội nghị đánh giá hiệu quả của nấm *Metarhizium* ngày 6/11/03.

Hà Tĩnh là 1 tỉnh miền Trung rất nghèo cho đến nay hầu như cả Tỉnh nông dân vẫn chưa biết sử dụng chế phẩm sinh học để phòng trừ sâu hại. Năm 2003 trên cơ sở giúp Xã Thạch Môn, huyện Thạch Hà trồng giống đậu xanh V123 (Viện KHNNVN) & 2 giống đậu tương DT84, DT2001 (Viện Di truyền NN), chúng tôi đã tập huấn, hướng dẫn nông dân các biện pháp kỹ thuật thâm canh và sử dụng các chế phẩm sinh học phòng trừ sâu hại, kết quả thử nghiệm trừ sâu đục quả đậu xanh năm 2003 được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6 . Hiệu lực của chế phẩm nấm *Beauveria* và *Metarhizium* phòng trừ sâu xanh (*Ha*) đục quả đậu xanh V123 ở Hà Tĩnh vụ hè thu năm 2003 (Nồng độ 5×10^8 bt/ml)

Tên chế phẩm	Hiệu lực (%) sau phun					
	3 ngày	5	7	10	12	15 ngày
<i>Beauveria bassiana</i>	39,5	50,7	62,8	72,3	68,5	69,8
<i>Metarhizium anisopliae</i>	44,3	53,5	69,2	75,1	73,4	71,7

Qua bảng 6 cho thấy nấm *Beauveria* và *Metarhizium* ở nồng độ 5×10^8 bt/ml có hiệu quả với sâu xanh đục quả đậu, mặc dù vụ hè thu ở Hà Tĩnh là khô, nóng, trong suốt thời gian gieo không có mưa nhưng do đây là mô hình trình diễn cho nông dân học tập nên UBND Xã đã tập trung cho bơm nước thường xuyên nên độ ẩm trên ruộng đậu vẫn duy trì, vì vậy hiệu quả của nấm với sâu xanh tương đối cao sau 7-10 ngày phun tỷ lệ sâu chết đạt 62,8- 72,3% (Nấm *Beauveria*), còn nấm *Metarhizium* đạt cao hơn từ 69,2- 75,1% và hiệu quả kéo dài đến 15 ngày phun, đã thu được sâu chết mọc nấm. Thí nghiệm trừ sâu đục quả đậu tương (bảng 7)

Bảng 7 . Hiệu lực phòng trừ của chế phẩm nấm *Beauveria* và *Metarhizium* trừ sâu khoang & sâu keo da láng ăn lá đậu tương DT84 tại Hà Tĩnh trong vụ hè thu năm 2003 (nồng độ 5×10^8 bt/ml)

Tên chế phẩm	Hiệu lực(%) phòng trừ sau phun					
	3 ngày	5	7	10	12	15 ngày
<i>Beauveria basiana</i>	33,7	58,3	60,3	67,1	65,7	61,1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	45,4	61,2	65,4	69,8	70,2	68,0

Kết quả cho thấy nấm *Beauveria* và *Metarhizium* cũng có hiệu quả với sâu ăn lá đậu tương nhưng không cao, sau 7-10 ngày phun với nấm *Beauveria* tỷ lệ sâu chết đạt 60,3- 67,1%, còn nấm *Metarhizium* đạt 65,4-69,8 %, hiệu quả kéo dài đến 15 ngày sau phun.

Vụ đậu hè thu ở Thạch Môn không phải sử dụng hoá học , đây là vấn đề mới ở Hà Tĩnh, việc giúp cho nông dân phun chế phẩm sinh học đã nâng cao dân trí & kiến thức mới trong việc áp dụng các biện pháp sinh học bảo vệ cây trồng theo hướng tạo ra các sản phẩm an toàn và bền vững cho nông dân.

III. KẾT LUẬN:

Năm 2003 để tài nghiên cứu đã tập trung và bám sát mục tiêu để thực hiện tốt các nội dung đặt ra, chúng tôi rút ra những kết luận sau đây:

1. Thu thập, phân lập và tuyển chọn được 9 chủng nấm *Metarhizium* trên 7 loại sâu hại : Bọ hại dừa , sâu đo hại quế , sâu xanh bướm trắng hại rau, sâu xanh đục quả đậu xanh, châu chấu hại lúa , một đục quả cà phê, bọ xít xanh hại đậu tương và 2 chủng nấm *Beauveria* trên một đục quả cà phê và bọ hại dừa Phú Quốc.

2. Hoàn thiện quy trình sản xuất chế phẩm nấm ổn định đạt chất lượng cao, cụ thể chế phẩm với nấm *Beauveria* đạt $5,027 \times 10^9$ bt/gr, với nấm với nấm *Metarhizium* đạt $5,16 \times 10^9$ bt/gr .

3. Đã tập huấn cho 400 hộ nông dân ở 2 Tỉnh Bình Định và Hà Tĩnh biết cách sử dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa và nấm *Beauveria* và *Metarhizium* trừ sâu hại đậu xanh và đậu tương.

4. Có mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium* trừ bọ hại dừa trên diện tích 15 ha ở 3 huyện Phù Cát, Phù Mỹ và Hoài Nhơn Bình Định đạt kết quả cao trong mùa mưa sau 2 tuần phun nấm hiệu quả với sâu non là 63,63 %- 81,42% & hiệu quả kéo dài đến 8 tuần sau phun đạt 82,20-85,58%. Với trưởng thành hiệu quả thấp hơn sâu non 1 chút, sau 2 tuần phun nấm hiệu quả trước mùa mưa là 66,33-79,49%, sau mùa mưa đạt 59,14-68,07% & hiệu quả kéo dài đến 8 tuần sau phun đạt 77,3-81,0%.

5. Có mô hình ứng dụng chế phẩm nấm *Beauveria* và *Metarhizium* trừ sâu xanh(Ha) đục quả đậu xanh ở nồng độ 5×10^8 bt/ml sau 7-10 ngày phun, hiệu quả của nấm B đạt 62,8-72,3%, nấm M đạt 69,2-75,11%.

Hiệu quả của nấm *Beauveria* và *Metarhizium* với sâu khoang và sâu keo da láng ăn lá đậu tương sau 7-10 ngày phun với nấm B đạt 60,3-67,1%, nấm M đạt 65,4-69,8%.

6. Đào tạo 2 NCS, 1 Th.S và 2 sinh viên khoa CNSH đã bảo vệ.

**NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ĐỂ ỨNG DỤNG NẤM
BEAUVERIA BASSIANA VÀ *METARHIZIUM ANISOPLIAE* TRỪ SÂU
HẠI Ở HẢI PHÒNG, HÀ TĨNH, HÀ NỘI VÀ RỆP SÁP *PSEUDOCOCCUS*
CITRI RISSO HẠI RỄ CÂY CÀ PHÊ Ở ĐAKLAK NĂM 2004**

*Phạm Thị Thùy, Đào Thị Huệ
Trần Văn Huy, Nguyễn Duy Mạnh
Nguyễn Xuân Thanh¹, Nguyễn Hồng Thuỷ²
Trần Thanh Long³*

Kinh phí phân : 17 triệu

Thực nhận : 14 triệu

Thuê công : 10 triệu

1. Đặt vấn đề :

Kế thừa những năm trước, năm 2004 mặc dù không có tiền nghiên cứu nhưng đề tài nấm côn trùng *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong chương trình công nghệ sinh học cấp nhà nước KC 04-12 vẫn tiếp tục thu thập nguồn mẫu và cải tiến công nghệ để nâng cao chất lượng của chế phẩm nhằm ứng dụng để phòng trừ bộ hại dừa ở Hải Phòng và rệp sáp hại cà phê ở Daklak.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu :

2.1. Vật liệu nghiên cứu :

- Thu nguồn nấm trên các loại côn trùng hại cây trồng
- Giống nấm *M. anisopliae* thuần nguồn trên sâu non bộ hại dừa Phú Quốc, nấm *B. bassiana* thuần trên sâu róm thông.
- Các nguyên liệu hoá chất vẫn sử dụng sản xuất, thêm bột đậu tương
- Các thử nghiệm triển khai ngoài thực địa nấm Ma trừ bộ hại dừa tại Hải Phòng, trừ rệp sáp hại rễ cây cà phê tại Đaklak, Nấm Bb trừ sâu róm thông tại Hà Tĩnh, nấm Bb , Ma trừ sâu rau bắp cải ở Hà Nội

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn nguồn nấm trên một số sâu hại:

.....
1. Trường Đại học Tây Nguyên , 2- Chi cục BVTV Hải Phòng,

3- Công ty Thông Hà Tĩnh

Thu thập mẫu sâu, bọ dừa có nấm , phân lập và xác định nấm theo Barnett và Hunter 1972

2.2.2. Nghiên cứu sản xuất nâng cao chất lượng của 2 chế phẩm nấm

Bố trí 4 công thức (Tính theo%, giữ nguyên tỷ lệ nước) thí nghiệm 4-5/2004.

CT 1: Sử dụng môi trường cơ bản 60 cám, 30 ngô, 10 trấu

CT 2: 50 cám , 30 ngô, 10 đậu , 10 trấu

CT 3: 40 cám , 30 ngô, 20 đậu, 10 trấu

CT 4: 30 cám, 30 ngô, 30 đậu, 10 trấu

Chỉ tiêu theo dõi:

Quá trình hình thành và kết dính nấm, màu sắc

Đếm số lượng bào tử tươi và khô sau thí nghiệm và rút ra kết luận .

2.2.3. Thí nghiệm ứng dụng nấm *Metarrhizium anisopliae* để phòng trừ bọ cánh cứng hại dừa ở Hải Phòng.

a. Vật liệu:

- Cây dừa có bọ dừa trên các tại các địa điểm Nhà khách Hải quân, làng trẻ em SOS, xã Nhân Hoà và văn phòng UBND huyện Vĩnh Bảo.

- Chế phẩm nấm *Metarrhizium anisopliae* do Viện BVTV sản xuất.

- Dầu thực vật và Padan

b. Phương pháp:

Chọn điểm để phun có đối chứng , mỗi địa điểm điều tra 3 cây.

Điều tra trước và sau phun 10,20,30 ngày

Pha chế phẩm 100 gr trong 2000 ml nước, lọc lấy dịch bào tử rồi thêm 20 ml dầu thực vật thêm 0.5 ml Padan, sau đó lắc đều và phun lên nõn dừa, phun đều cho 1 cây.

Phun thí nghiệm 2 lần , lần 2 sau lần 1 là 20 ngày.

Mỗi địa điểm thí nghiệm 75 cây, tổng số 4 điểm phun 300 cây.

Kết quả thí nghiệm được tính theo Henderson Tilton (1955).

2.2.4. Nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm nấm *M.anisopliae* để phòng trừ rệp sáp hại rễ cà phê trong điều kiện đĩa petri và chậu vại .

Phương pháp: Phun dịch bào tử nấm ở nồng độ 10^8 bào tử/ 1ml lên rệp sáp nuôi trên các hộp petri và trên các gốc cây cà phê có rệp sáp hại được trồng trong chậu. Bố trí 3 công thức thí nghiệm, mỗi công thức nhắc lại 3 lần trong cùng điều kiện. cùng số lượng rệp :

- Trên đĩa petri

- Châu vại
- Đối chứng

Chỉ tiêu đánh giá là tỷ lệ rệp sáp đã chết do nấm ký sinh qua các kỳ kiểm tra. Kết quả được tính theo Abbott (1925).

* Thí nghiệm nấm *Metarhizium anisopliae* trừ rệp sáp hại rễ cà phê ở Đaklak: Chọn ruộng cà phê 5 tuổi đã bị rệp sáp hại nặng gây vàng lá, rụng quả tại nông trường cà phê Chư Quỳnh thuộc huyện Krông Ana.

Thí nghiệm tiến hành vào 15/04/ 2004 khi dịch rệp sáp rễ bắt đầu phát sinh. Bố trí 3 công thức, mỗi công thức 30 cây:

- Công thức 1: Pha, lọc lấy dịch bào từ 10^8 /ml phun vào dưới tán cây từ gốc ra, mỗi cây 1 lít dịch, sau phun lấp sơ đất để giữ ẩm.

- Công thức 2: Đào quanh gốc hình phễu bán kính là 15 cm, sâu 10 cm, phun dịch bào từ nồng độ trên vào phần hình phễu, xong lấp nhẹ đất để giữ ẩm.

- Công thức 3: Trộn đều 30 kg phân bò hoai + 15 kg vỏ cà phê khô, bón vào phần hình phễu đã đào như ở thí nghiệm 2 cho 30 cây cà phê, phun dịch bào từ vào hỗn hợp phân bò + vỏ cà phê ở phần hình phễu, xong lấp đất sơ để giữ ẩm.

Điều tra và đánh giá vào 3 lần: Lần 1 vào ngày 30/ 04/2004, lần 2 vào ngày 30/05/2004, lần 3 vào ngày 30/10/2004

- *Chỉ tiêu đánh giá*

* Triệu chứng bị hại thể hiện trên tán lá.

* Số rệp sống và số rệp đã bị nấm ký sinh (đã chết trên phần rễ cọc từ mặt đất xuống 20 cm và trên phần rễ ngang đào ngẫu nhiên 4 hướng cách gốc 60 cm).

- *Chỉ tiêu đánh giá mức độ rệp hại là sự kết hợp giữa ở tán và ở rễ:*

* Mức độ rệp hại thể hiện trên tán căn cứ vào mức độ lá vàng, quả rụng, cành khô theo 3 mức nhẹ, trung bình và nặng.

Mức độ rệp hại trên rễ:

Số rệp ký sinh dưới 50 con/gốc : Mức độ nhẹ.

Từ 51-100 con/gốc: Mức độ trung bình.

Từ 101 - 200 con/gốc: Mức độ nặng.

* Đánh giá hiệu quả của nấm dựa vào chỉ tiêu số cây có rệp bị nấm ký sinh $\geq 70\%$ so với tổng số rệp hiện có : đạt hiệu quả

2.2.5. Sử dụng nấm *Beauveria bassiana* để trừ sâu róm thông ở Hà Tĩnh

Bố trí 2 công thức phun 5 kg/ ha, 7 kg/ ha có hỗn hợp chất bám dính dầu thực vật. Kết quả được tính theo Henderson Tilton (1955)

2.2.5. Thí nghiệm nấm *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* trừ sâu xanh bướm trắng và sâu khoang hại rau bắp cải vụ đông năm 2004 ở Viện BVTV:

Bố trí 3 công thức : CT 1: Nấm Bb, CT 2 : Nấm Ma (cả 2 loại nấm ở cùng một nồng độ 8×10^8 bt/ml) và CT 3 : Đối chứng

Phun dịch bào tử nấm Bb và Ma có thêm chất bám dính Tween 80.

Điều tra trước và sau phun 3,5,7,10 ngày.

Hiệu quả phòng trừ được tính theo Henderson Tilton (1955)

III- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU:

3.1. Thu thập nuôi nấm trên các loại sâu hại

Đây là công việc thường xuyên nhằm mục đích tìm ra những chủng nấm có độc tố cao để phục vụ cho sản xuất 2 loại chế phẩm. kết quả thu thập, phân lập và giám định chúng tôi trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Thành phần nguồn nấm *Metarrhizium* và *Beauveria* thu thập và giám định năm 2004

STT	Số kí hiệu chủng	Nguồn gốc thu thập	Thời gian phân lập
1	Ma 45	Trứng bọ dừa Phú Quốc	5/2004
2	Ma 46	Sâu non bọ dừa Phú Quốc	5/2004
3	Ma 47	Nhộng bọ dừa Phú Quốc	5/2004
4	Ma 48	Trưởng thành bọ dừa Phú Quốc	5/2004
5	Ma 49	Trưởng thành bọ dừa Tân Hiệp, Kiên Giang	5/2004
6	Bb 21	Sâu non bọ dừa Phú Quốc	5/2004
7	Bb 22	Bọ xít xanh hại đậu xanh Hà Tĩnh	8/2004

Qua bảng 1 chúng tôi đã thu thập, phân lập và giám định được 5 nguồn nấm *Metarrhizium* ký sinh trên cả 4 pha phát dục của bọ hại dừa ở Phú Quốc, Tân Hiệp tỉnh Kiên Giang và 2 nguồn nấm *Beauveria bassiana* trên sâu non bọ hại dừa Phú Quốc và bọ xít xanh hại đậu ở Hà Tĩnh. Trên cơ sở có được chủng nấm *Metarrhizium anisopliae* có độc tố cao, chúng tôi đã sử dụng chủng nấm mới trên sâu non bọ dừa Phú Quốc để sản xuất chế phẩm .

3.2. Nghiên cứu công nghệ sản xuất nâng cao chất lượng chế phẩm nấm trên cơ sở cải tiến nguyên liệu sản xuất

Do đậu tương có giá trị dinh dưỡng cao với hàm lượng protein, chất béo và nhiều vitamin, qua tham khảo tài liệu trên thế giới thấy nhiều nước đã sử dụng đậu tương để sản xuất các chế phẩm sinh học để phòng trừ sâu hại cây trồng như Bt. Vì vậy năm 2004 chúng tôi tiếp tục nghiên cứu đưa đậu tương vào môi trường sản xuất chế phẩm, kết quả nghiên cứu thu được về tỷ lệ đậu thích hợp với nấm *Beauveria bassiana* được trình bày ở bảng 2

Bảng 2. Sự hình thành bào tử của nấm *Beauveria bassiana* trên môi trường đậu tương

Công thức	tỷ lệ đậu / Mtrường	Số Bt/g tươi ($\times 10^9$)	Số Bt/g khô ($\times 10^9$)	T° C TB	H % TB
CT1	0	5,8	5,0	25,1	83,5
CT2	10	6,7	5,3		
CT4	<u>20</u>	<u>8,5</u>	<u>6,8</u>		
CT3	30	6,9	6,1		

Qua bảng 2 cho thấy khi thêm bột đậu tương vào môi trường sản xuất nấm *Beauveria bassiana*, nếu đảm bảo tỷ lệ nước thích hợp, trong điều kiện ôn ẩm độ phù hợp thì chất lượng của nấm được nâng cao cụ thể ở công thức thêm tỷ lệ 20% đậu tương vào môi trường thì đã nâng cao chất lượng nấm, cụ thể chất lượng nấm tươi đạt $8,5 \times 10^9$ bt/gr, nấm khô đạt $6,8 \times 10^9$ bt/gr. Sự hình thành bào tử của nấm *Metarhizium anisopliae* được thể hiện ở bảng 3

Bảng 3. Sự hình thành bào tử của nấm *Metarhizium anisopliae* trên môi trường đậu tương

Công thức	tỷ lệ đậu / Mtrường	Số Bt/g tươi ($\times 10^9$)	Số Bt/g khô ($\times 10^9$)	T° C TB	H % TB
CT1	0	6,2	5,3	27,4	80,5
CT2	10	7,4	5,9		
CT4	<u>20</u>	<u>10,1</u>	<u>8,9</u>		
CT3	30	8,7	6,5		

Bảng 3 khẳng định là nấm *Metarhizium anisopliae* đạt chất lượng rất cao với nấm tươi đạt $10,1 \times 10^9$ bt/gr, chất lượng nấm khô đạt $8,9 \times 10^9$ bt/gr. Đây là kết quả rất khả quan trong việc nâng cao chất lượng của chế phẩm nấm nhằm giảm giá thành sản phẩm cho nông dân.

3.3. Ứng dụng chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* để phòng bọ cánh cứng hại dừa ở Hải Phòng :

Thành phố Cảng Hải Phòng có diện tích gần 220 ha dừa, trồng rải rác ở các huyện ngoại thành, tập trung chủ yếu ở Vĩnh Bảo, Tiên Lãng, An Lão, các quận nội thành và Đảo Bạch Long Vĩ. Dừa là một trong những cây cảnh quan du lịch của Hải Phòng, nhưng đầu năm 2004 bọ cánh cứng hại dừa đã xuất hiện đến tháng 5 năm 2004 chúng đã gây hại với mức độ cao như ở Nhà máy nước An Dương, nhà khách Hải quân, làng trẻ em SOS, huyện Vĩnh Bảo, Tiên Lãng, tại các điểm điều tra đã xác định được mật độ bọ dừa trung bình 550- 600 con trên 1

cây đa số là trưởng thành, có chỗ mật độ cao đến hàng nghìn con trên cây tập trung ở cây bị chết. Do vậy chúng tôi phòng trừ bọ dừa bằng nấm tại những nơi đông dân. Như phần phương pháp đã trình bày, kết quả phun nấm trừ bọ cánh cứng hại dừa ở pha sâu non chúng tôi thể hiện lên bảng 4

Bảng 4: Hiệu lực của nấm *Metarhizium anisopliae* đối với sâu non bọ cánh cứng hại dừa ở Hải Phòng năm 2004

Địa điểm phun	Tỷ lệ (%) sâu chết sau phun		T° C TB H(%) TB
	10 ngày	30 ngày	
Nhà khách Hải quân	89,6	94,0	30,1 82,1 Có mưa
Làng trẻ em SOS	80,8	95,4	
Xã Nhân Hoà, Vĩnh Bảo	86,5	89,3	
UBND huyện Vĩnh Bảo	78,5	85,4	

Qua bảng 4 cho thấy chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* do Viện BVTV sản xuất có hiệu quả cao với pha sâu non bọ hại dừa ở Hải Phòng chỉ sau phun 10 ngày (lần 1), hiệu lực của nấm ở cả 4 địa điểm phun đều cao từ 78,5 (UBND huyện Vĩnh Bảo), đến 89,6% tại Nhà khách Hải quân, sau phun lần hai 10 ngày, nghĩa là sau phun lần một 30 ngày thì hiệu lực của nấm tại UBND huyện Vĩnh Bảo tăng lên 85,4% và tại Nhà khách Hải quân tăng lên tới 94,0% . Riêng làng trẻ em SOS đạt 95,4%. Đây là kết quả rất khả quan của chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* trong việc phòng trừ bọ hại dừa ở miền Bắc trong điều kiện nhiệt độ trung bình 30,1° C, ẩm độ là 82,1%, có mưa và vùng biển, điều tra đã thấy có nấm mọc trên sâu chết.

Đối với trưởng thành bọ cánh cứng hại dừa , kết quả về hiệu lực của chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Hiệu lực của nấm *Metarhizium anisopliae* đối với trưởng thành bọ cánh cứng hại dừa ở Hải Phòng năm 2004

Địa điểm phun	Tỷ lệ (%) sâu chết sau phun		T° C TB H(%) TB
	10 ngày	30 ngày	
Nhà khách Hải quân	75,0	85,8	30,1 82,1 Có mưa
Làng trẻ em SOS	60,5	82,3	
Xã Nhân Hoà, Vĩnh Bảo	63,5	89,3	
UBND huyện Vĩnh Bảo	61,3	76,5	

Số liệu ở bảng 5 cho thấy chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu quả với trưởng thành bọ hại dừa, tuy nhiên so sánh với pha sâu non thì hiệu quả không cao bằng, cụ thể sau 10 ngày phun hiệu quả thí nghiệm tại nhà khách Hải quân là cao nhất đạt 75,0% , sau 30 ngày phun hiệu quả đạt 85,8% , những địa điểm khác thì hiệu quả thấp hơn và điều tra cũng thấy sự hiện diện của nấm xanh trên trưởng thành bọ hại dừa.

Từ kết quả phun trên vào tháng 6/2004, chi cục BVTV Tỉnh Hải Phòng đã tiến hành phun đại trà vào tháng 8-9/2004. Đến nay bọ hại dừa ở Hải Phòng đã giảm hẳn và các cây dừa đã xanh trở lại. Việc phòng trừ bọ hại dừa bằng chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* đã khẳng định nấm có hiệu quả cao, đồng thời phun nấm tránh được nguy cơ ô nhiễm môi trường cũng như tránh được sự

độc hại đối với người sản xuất và gia súc, quan trọng hơn cả là chế phẩm nấm không ảnh hưởng đến chất lượng quả dừa.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả phòng trừ bọ dừa ở Bến Tre, Tiền Giang, Kiên Giang, □ và Bình Định những năm 2000-2003.

3.3. Nghiên cứu khả năng diệt rệp sáp của nấm *M.anisopliae*

a. Tìm hiểu một vài đặc điểm của loài rệp sáp hại rễ cà phê

Kết quả điều tra cho thấy loài rệp sáp *Pseudococcus citr* Risso thường định cư theo tập đoàn, ban đầu chúng gây hại ở phần cổ rễ dưới đất cách lớp mặt 5-7cm để chích hút nhựa.

Trưởng thành thường đẻ con ngay trong xoang. Rệp dùng vòi chích hút nhựa làm cây suy yếu, mật độ trên 150 con/gốc thì cây bị hại nặng, lá vàng, quả rụng. Khi hút nhựa thì chúng cũng tiết ra các giọt bài tiết dạng sương ngọt, đây là điều kiện hấp dẫn kiến đến cộng sinh, đặc biệt đây còn là môi trường thích hợp cho các loài nấm gây thối rễ phát triển. Điều tra thấy nơi nào có rệp sáp rễ hại nặng với mật độ dày đặc thì kèm theo các loại nấm thối rễ xuất hiện gây hiện tượng vàng lá, cây chết. Kiến, mối, dòng nước...đã giúp rệp con và nấm bệnh lây lan.

Rệp sáp thường phát sinh phá hoại mạnh vào đầu và cuối mùa mưa. Trong điều kiện đất quá ẩm ướt hoặc quá khô hạn thì chúng thường tạo thành các bọc dạng “màng măng xông”, sống và sinh sản ở trong đó để cách ly với môi trường ngoài. Trường hợp rễ cây có nhiều rệp sáp nghĩa là toàn bộ rễ chính, rễ phụ được bọc bởi một dây măng xông của rệp.

Vòng đời của rệp sáp ở Đaklak năm 2004 biến động từ 26-35 ngày.

Ngoài cây cà phê, loài rệp sáp còn gây hại rễ của nhiều cây trồng khác như hồ tiêu, chuối, dứa, lạc, một số loài cây gỗ, cây bụi, cây thân thảo khác.

b. Tìm hiểu khả năng diệt rệp sáp rễ của nấm *M.anisopliae* trong phòng

Phun dịch bào tử nấm ở nồng độ 10^8 bào tử/ 1ml lên rệp sáp nuôi trong các hộp Petri và trên các gốc cây có rệp sáp ký sinh trồng trong chậu. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện. Chỉ tiêu đánh giá là tỷ lệ rệp sáp chết do nấm ký sinh so với đối chứng qua các kỳ kiểm tra.

Kết quả thí nghiệm sử dụng nấm *M.anisopliae* để phòng trừ rệp sáp trong phòng và chậu vai được thể hiện ở bảng 6

Bảng 6 .Hiệu lực của nấm *M.anisopliae* với rệp sáp hại cà phê
(TN trong phòng và chậu vại ở nồng độ 10^8 bào tử trên 1 ml)

Công thức Thí nghiệm	Hiệu lực(%) sau phun			T ^o C TB
	3 ngày	7	14	H % TB
Trên đĩa petri	70,0	100		26,2
Trong chậu vại	30,0	75,0	100	80,2

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, ở nồng độ dịch 10^8 bào tử/ml, sau 3 ngày trên các hộp Petri có 70,0% số rệp bị chết do nấm ký sinh, sau 7 ngày có 100% rệp chết và chỉ còn vỏ xác. Trên xác rệp được phủ một lớp bào tử màu lục xanh. Trên các gốc cây cà phê có rệp ký sinh trồng trong chậu và các gốc cà phê có rệp nằm trong các màng măng xông để trong các chậu thủy tinh có lót giấy thấm, sau 3 ngày chỉ có 30,0% số rệp bị chết do nấm ký sinh, sau 7 ngày có 75,0% số rệp bị chết do nấm ký sinh và 14 ngày có 100% rệp bị chết do nấm ký sinh.

Rệp sáp chết chỉ còn vỏ xác và trên các xác rệp được phủ kín một lớp bột màu lục xanh. Kết quả thử nghiệm với các cây cà phê trồng ngoài tự nhiên cũng tương tự.

*c. Thử nghiệm nấm *M.anisopliae* để phòng trừ rệp sáp hại rễ cà phê ngoài đồng ruộng.*

Như phần phương pháp đã trình bày, kết quả điều tra đánh giá tại các lô thí nghiệm lần 1 và lần 2 được trình bày ở bảng 7

Bảng 7: Hiệu quả phòng trừ rệp sáp của nấm *M.anisopliae*

Công thức thí nghiệm	Tổng số cây	Số cây bị hại các cấp									Số cây và tỷ lệ % cây có nấm ký sinh	
		Trước thí nghiệm			Điều tra lần 1			Điều tra lần 2			Số cây %	
		nhẹ	Tb	Nặng	nhẹ	Tb	Nặng	nhẹ	Tb	Nặng		
1	30	2	12	16	5	17	8	4	18	8	3	10,0
2	30	4	14	12	16	14	0	20	10	0	20	66,7
3	30	3	10	17	6	16	8	30	0	0	27	90

Số liệu bảng 7 cho thấy:

Công thức 1 phun bào tử nấm trực tiếp lên mặt đất dưới tán cây thì đạt hiệu quả diệt rệp sáp rất thấp (10,0%),

Công thức 2 do được đào đất hình phễu quanh gốc nên khi phun bào tử tiếp xúc trực tiếp với cơ thể rệp ở phần rễ cọc đều bị nấm ký sinh. Điều tra ở phần rễ ngang quanh gốc không thấy có hiện tượng rệp bị nấm ký sinh, tỉ lệ cây có nấm ký sinh đạt 66,7%.

Công thức 3, lần điều tra sau phun 15 ngày cho thấy bào tử nấm bám nhiều trên phần rễ cây dưới đất, tỉ lệ nấm ký sinh trên cơ thể rệp (phần rễ cọc) đạt trung bình trên 50%, phần rễ ngang chưa thấy rệp bị nấm ký sinh. Điều tra sau 45 ngày phun thì tỉ lệ cây có nấm ký sinh đạt hiệu quả 90%.

Điều tra hiệu lực phòng trừ rệp của nấm *M.anisopliae* sau 6 tháng, kết quả được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8 : Hiệu lực của nấm *M.anisopliae* tại các lô thí nghiệm
(sau 6 tháng phun)

Công thức thí nghiệm	Số cây điều tra	Số cây bị hại ở các mức độ			Số cây và tỷ lệ % nấm ký sinh	
		Nhẹ	T.bình	Nặng	Số cây	%
1	30	3	15	12	0	0
2	30	12	16	2	0	0
3	30	25	5	0	22	73,3

Qua bảng 8 cho thấy ở công thức 1 và 2, nấm *M.anisopliae* không có hiệu lực lâu dài. Công thức 3 do phun bào tử nấm vào hỗn hợp phân chuồng hoai trộn với vỏ cà phê quanh gốc cây thì hiệu quả đạt rất cao sau phun 45 ngày và có tác dụng kéo dài sau 6 tháng điều tra, hiệu quả vẫn đạt 73,3%. Giải thích điều này theo chúng tôi thì số lượng lớn bào tử nấm phát triển trên hỗn hợp hữu cơ quanh gốc cà phê được phát tán sâu xuống phần rễ cọc và phát tán ra ngoài nhờ dòng nước, nhờ rệp con và một số mối, kiến mang theo các bào tử nấm khi đi qua lớp phân có bào tử nấm quanh gốc, số rệp quanh gốc bị nấm tiêu diệt triệt để nên hiệu quả phòng trừ cao và kéo dài.

d. Thử nghiệm nấm *Beauveria bassiana* để phòng sâu róm thông hại rừng thông ở Hà Tĩnh: Năm 2003 Hà Tĩnh và các Tỉnh miền Trung có dịch sâu róm hại rừng thông, mức độ hại rất nguy hiểm với mật độ hàng nghìn con/ cây. Tháng 2/ 2004, công ty thông Hà Tĩnh đã sử dụng nấm *Beauveria bassiana* của Viện BVTV để phòng trừ với 2 công thức thí nghiệm trên 1 cánh rừng. Kết quả phòng trừ được trình bày ở bảng 9

**Bảng 9. Hiệu lực của nấm *Beauveria bassiana* trừ
sâu róm thông tại Hương Khê, Hà Tĩnh**

Công thức thí nghiệm	Hiệu lực (%) sau phun			T° C TB H % TB
	15 ngày	30 ngày	6 tháng	
Phun 5 kg/ha	70,0	85,0	90,0	24,6
Phun 7 kg/ha	75,0	90,0	95,0	84,7

Kết quả ở bảng 9 cho thấy nấm *Beauveria bassiana* có hiệu quả cao với sâu róm thông và hiệu quả kéo dài và ổn định từ 70 - 95,0%, năm 2004 sâu róm thông đã giảm chung trong cả nước và hầu như ở khắp các vùng trồng thông đều không có sâu róm thông.

e. Thử nghiệm nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* để phòng sâu hại rau đậu đỗ ở Viện BVTV Hà Nội.

Trên vườn đậu tại Viện BVTV, chúng tôi đã tiến hành phun 2 loại thuốc nấm *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* để phòng trừ sâu xanh bướm trắng và sâu khoang, kết quả thu được trình bày ở bảng 10.

**Bảng 10. Hiệu lực của nấm *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*
để phòng sâu hại rau bắp cải vụ đông ở Viện BVTV Hà Nội**

Loại nấm phun	Hiệu quả (%) phòng trừ sau phun				T° C TB
	3 ngày	5	7	10	H % TB
Nồng độ 8×10^8 bt/ml					
<i>Beauveria bassiana</i>	23,7	44,5	60,1	68,4	28,3
<i>Metarhizium anisopliae</i>	25,6	40,7	58,9	70,2	79,8

Số liệu cho thấy nấm *Beauveria bassiana* và nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu quả với sâu xanh bướm trắng và sâu khoang, sau 7-10 ngày hiệu quả của nấm *Beauveria bassiana* đạt 60,1- 68,4%, hiệu quả của nấm *Metarhizium anisopliae* đạt 58,9- 70,2 % ở nồng độ 8×10^8 bt/ gr.

IV- KẾT LUẬN:

1- Thu thập, phân lập và giám định được 5 nguồn nấm *Metarhizium anisopliae* trên cả 4 pha trứng, sâu non, nhộng, trưởng thành của bọ hại dừa ở Phú Quốc, 2 nguồn nấm *Beauveria bassiana* trên sâu non bọ hại dừa Phú Quốc và trên bọ xít xanh hại đậu xanh ở Hà Tĩnh.

2- Thêm 20% tỷ lệ bột đậu tương vào môi trường sản xuất chế phẩm nấm trong điều kiện ôn, ẩm độ và lượng nước thích hợp thì sẽ đạt chất lượng cao, nấm *Beauveria bassiana* tươi đạt $8,5 \times 10^9$ và $6,8 \times 10^9$ bt/gr chế phẩm khô, nấm *Metarhizium anisopliae* đạt $10,1 \times 10^9$ bt/gr chế phẩm tươi và $8,9 \times 10^9$ bt/gr chế phẩm khô.

3- Trong điều kiện ở Hải Phòng với nhiệt độ trung bình là $30,1^\circ\text{C}$, ẩm độ trung bình 82,1% và có mưa, Chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* có hiệu quả cao với pha sâu non bọ cánh cứng hại dừa, hiệu quả sau 10 ngày phun ở tất cả các địa điểm đều đạt từ 78,5- 89,6%, sau 30 ngày phun đạt 85,4-95,4%, phần lớn sâu non bọ dừa chết đều có sự hiện diện của nấm.

- Chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* cũng có hiệu quả cao với pha trưởng thành bọ cánh cứng hại dừa, song hiệu quả thấp hơn so với pha sâu non, sau 10 ngày phun ở các địa điểm phun đều đạt từ 78,5- 89,6%, sau 30 ngày phun đạt 85,4-95,4%, trên bọ dừa chết cũng có sự hiện diện của nấm.

4- Rệp sáp *Pseudococcus citris* Riso là loài hại rễ quan trọng trên cây cà phê ở Đaklak: Rệp sáp thường định cư theo tập đoàn, ban đầu chúng gây hại ở phần cổ rễ dưới đất cách lớp mặt 5-7 cm để chích hút nhựa. Trưởng thành thường đẻ con ngay trong xoang. Rệp dùng vòi chích hút nhựa làm cây suy yếu, mật độ trên 150 con/gốc thì cây bị hại nặng, lá cây chuyển màu vàng, quả rụng. Khi hút nhựa thì chúng cũng tiết ra các giọt bài tiết dạng sương ngọt, đây là điều kiện để hấp dẫn kiến đến cộng sinh, đặc biệt đây còn là môi trường thích hợp cho các loài nấm gây thối rễ phát triển. Nơi nào có rệp sáp rễ hại nặng với mật độ dày đặc thì kèm theo các loại nấm gây thối rễ xuất hiện gây hiện tượng vàng lá, nặng hơn cây chết. Kiến, mối, dòng nước... đã giúp rệp con và nấm bệnh lây lan.

Rệp sáp thường phát sinh phá hoại mạnh vào đầu và cuối mùa mưa. Trong điều kiện đất quá ẩm hoặc quá khô thì chúng thường tạo thành các bọc dạng “màng măng xông”, sống và sinh sản ở trong đó để cách ly với môi trường ngoài. Ngoài cây cà phê, loài rệp sáp còn gây hại rễ của nhiều cây trồng khác như hồ tiêu, chuối, dứa, lạc, một số loài cây gỗ, cây bụi, cây thân thảo khác. Vòng đời của rệp sáp ở Đaklak biến động năm 2004 từ 26-35 ngày.

b. Sử dụng nấm *M.anisopliae* với nồng độ 10^8 bào tử /ml để phòng trừ rệp sáp hại rễ cà phê trong đĩa petri sau 3-7 ngày đạt 70-100% và chậu vại đạt kết quả 75-100% sau 7-10 ngày trong điều kiện nhiệt độ thích hợp 26°C và ẩm độ 82%. Phun bào tử nấm *M.anisopliae* với nồng độ 10^8 bào tử /ml lên hỗn hợp phân cơ hữu xới bón quanh gốc và giữ ẩm. Hiệu quả trừ rệp sau phun 45 ngày đạt 90%, sau 6 tháng đạt trên 70%.

5- Phun nấm *Beauveria bassiana* để phòng trừ sâu róm thông ở Hà Tĩnh sau 15-30 ngày hiệu quả đạt 70- 90% và hiệu quả kéo dài đến 6 tháng.

6- Nấm *Beauveria bassiana* có hiệu quả với sâu xanh bướm trắng và sâu khoang hại rau bắp cải vụ đông 2004, hiệu quả phòng trừ đạt 60,1-68,4% và nấm *M.anisopliae* đạt 58,9 — 70,2% sau 7-10 ngày phun.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chi cục BVTV Bến Tre (2000). Báo cáo sơ kết công tác phòng trừ bọ hại dừa ở Bến Tre năm 2000.
2. Lomer - FAO (1997). Bọ hại dừa ở Malaysia
3. Phạm Thị Thuỳ (2001). Kết quả nghiên cứu cải tiến sản xuất chế phẩm nấm *Metarhizium* để phòng trừ bọ hại dừa ở Bến Tre năm 2000. Báo cáo tại hội nghị Sinh học Quốc tế tại Hà Nội 5- 6/ 7/2001, tr. 405-414.
4. Phạm Thị Thuỳ (2002). Kết quả nghiên cứu về bọ hại dừa (*Brontispa sp*) và khả năng sử dụng nấm *Metarhizium anisopliae* trừ bọ hại dừa ở một số tỉnh thuộc Đồng bằng Sông Cửu Long năm 2000- 2002. Báo cáo khoa học tại Hội nghị Khoa học của Bộ NN&PTNT ngày 9/9/2002.

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG
BỘ MÔN STCT VÀ PHÒNG TRỪ SINH HỌC
 ÔMÔN, CẦN THƠ, VIỆT NAM
 ĐT: (84-71)-861256; Fax: (84-71)-861457

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NĂM 2002

Đề tài nhánh: "Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ, Tiền Giang và một vài nơi khác tại Đồng Bằng Sông Cửu Long"

Thuộc đề tài KC.04.12 "Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học"

I. TÊN NỘI DUNG THỰC HIỆN TRONG NĂM 2002:

"Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ, Tiền Giang và một vài nơi khác tại Đồng Bằng Sông Cửu Long"

II. MỤC TIÊU:

Nhằm góp phần hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học trong nông nghiệp ở Đồng Bằng Sông Cửu Long.

III. KẾ HOẠCH VÀ TIẾN ĐỘ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI TRONG NĂM 2002:

S T T	Các nội dung công việc thực hiện.	Sản phẩm phải đạt	Thời gian	Người, cơ quan thực hiện
1	Thu thập, phân lập, tuyển chọn bổ sung, xây dựng qui trình bảo quản và nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của <i>B. bassiana</i> và <i>M. anisopliae</i> .	Các chủng <i>B. bassiana</i> và <i>M. anisopliae</i> có khả năng diệt côn trùng cao (khoảng 4-5 chủng)	1/2002-9/2002	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL.
2	Cải tiến quy trình sản xuất và nâng cao chất lượng chế phẩm vi nấm <i>B.a</i> và <i>M.a</i> diệt sâu hại cây trồng tại Đồng Bằng Sông Cửu Long.	Quy trình sản xuất chế phẩm <i>M.a</i> và <i>B.b</i> ở qui mô lớn. Chế phẩm đạt $1,6-2,0 \times 10^9$ bào tử/gr (500 kg)	1/2002-12/2002	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL.
3	Thử nghiệm tác dụng diệt trừ rầy hại lúa và bọ cánh cứng hại đũa của các chế phẩm này	Có qui trình thử nghiệm.	1/2002-12/2002	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện

2. Cải tiến quy trình sản xuất và nâng cao chất lượng chế phẩm vi nấm *B.a* và *M.a* diệt sâu hại cây trồng tại Đồng Bằng Sông Cửu Long.

3. Thử nghiệm tác dụng diệt trừ rầy hại lúa, bọ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm này trong phòng thí nghiệm và trong nhà lưới của bộ môn.

4. Tìm hiểu ảnh hưởng của 2 chế phẩm sinh học này đối với 1 số thiên địch của sâu hại lúa (TN trong nhà lưới).

5. Thử nghiệm tác dụng diệt trừ các loài sâu hại trên lúa, cây ăn trái và cây dừa của các chế phẩm này tại ruộng vườn ở Viện Lúa ĐBSCL.

6. Tìm hiểu ảnh hưởng của 2 chế phẩm sinh học này đối với 1 số thiên địch của sâu hại lúa (TN ngoài đồng).

7. Xây dựng mô hình trình diễn sử dụng thuốc trừ sâu sinh học *Beauveria* và *Metarhizium* trong hệ thống IPM trên cây ăn trái, cây dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang.

8. Tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân về việc sử dụng thuốc trừ sâu sinh học *Beauveria* và *Metarhizium* trong phòng trừ sâu hại cây ăn trái, cây dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang.

9. Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai

V. KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN :

1. Đã thu thập thêm các mẫu côn trùng bị bệnh nấm từ các địa phương của các tỉnh như: Cần Thơ, Sóc Trăng, Vĩnh Long, Trà Vinh và Tiền Giang.

2. Đã phân lập và tuyển chọn bổ xung thêm 11 chủng nấm mới (6 chủng nấm xanh và 5 chủng nấm trắng) và đã chọn thêm được 3 chủng có hoạt lực diệt côn trùng rất cao và hiện đang dùng để sản xuất chế phẩm.

3. Từng bước cải tiến qui trình bảo quản các chủng nấm đã thu thập, phân lập và tuyển chọn được.

4. Nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm đã có từ trước đây bằng cách truyền qua côn trùng rồi phân lập và thuần hóa lại để nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm *Beauveria* và *Metarhizium* cũ. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng nếu nấm trắng hoặc nấm xanh được nuôi cấy và truyền qua 4-5 lần trên môi trường nhân tạo thì khả năng sinh trưởng, phát triển, sự sinh bào tử và độ độc của chúng đối với côn trùng sẽ giảm đi một cách có ý nghĩa so với nấm mới ly trích từ côn trùng. Nhưng sau khi lây nhiễm nấm trở lại ký chủ của nó, rồi phân lập và tạo thuần trở lại thì những đặc tính sinh học này của chúng đã được phục hồi trở lại.

5. Chúng tôi đã thử nghiệm các môi trường thử cấp khác nhau để nhân nuôi nấm xanh và nấm trắng. Đã nghiên cứu và chọn lọc được hai công thức môi trường thử cấp lý tưởng nhất để nhân nhanh nấm trắng, *B.b*(OM₁-R) và nấm xanh, *M.a*(OM₂-B).

6. Cải tiến quy trình công nghệ để sản xuất chế phẩm nấm trắng và nấm xanh. Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm nấm trắng, *B.b*(OM₁-R) và nấm xanh, *M.a*(OM₂-B) đã được cải tiến và đã đạt công suất rất cao và chất lượng chế phẩm tốt, với số lượng bào tử là: $1,6 - 2,5 \times 10^9$ BT/1gram). Cả hai chế phẩm có hiệu lực ổn định đối với rầy nâu hại lúa, sau khi bảo quản 6 tháng ở nhiệt độ bình thường kể từ ngày sản xuất.

dùng *B.b*(OM₁-R) và *M.a*(OM₂-B) để trừ sâu hại trong 2 nhà lưới với số lượng cây giống là trên 10.000 cây.

13. Chúng tôi đã cung cấp 2 chế phẩm trừ sâu sinh học này cho anh Nguyễn Chí Văn ở Lâm Đồng xây dựng được mô hình trà (chè) sạch với diện tích là 19 ha. Hai chế phẩm này có tác dụng rất tốt khi dùng để diệt các loài rầy, bọ xít và các loài sâu ăn lá chè.

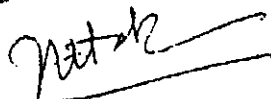
14. Trong chiến dịch diệt bọ cánh cứng hại dưa tại Cần Thơ năm 2002, thì chúng tôi cung cấp hàng trăm kg chế phẩm *M.a*(OM₂-B) cho Chi cục BVTV Cần Thơ để trừ bọ cánh cứng hại dưa.

VI. DỰ KIẾN KẾ HOẠCH THỰC HIỆN TRONG NĂM 2003:

1. Tiếp tục thu thập, phân lập và tuyển chọn ổ xung các chủng nấm mới từ các tỉnh khác tại ĐBSCL...(1-12/2003)
2. Tiếp tục cải tiến quy trình sản xuất để không ngừng nâng cao chất lượng của chế phẩm cũng như công suất của quy trình SX (1-12/2003).
3. Thử nghiệm tác dụng diệt trừ các loài sâu hại khác nhau của các mẻ chế phẩm này trong phòng thí nghiệm và trong nhà lưới của bộ môn (1-12/2003).
4. Thử nghiệm tác dụng diệt trừ các loài sâu hại trên rau, cây ăn trái, dưa và cây cảnh của các chế phẩm này tại ruộng vườn ở viện lúa ĐBSCL (1-12/2003).
5. Thực hiện thí nghiệm để tìm hiểu ảnh hưởng của 2 chế phẩm vi nấm này đối với một số thiên địch của sâu hại cây ăn trái tại vườn CAT ở viện lúa ĐBSCL (1-12/2003)
6. Phối hợp với Trung Tâm Khuyến Nông Tiền Giang và Chi Cục BVTV tỉnh Cần Thơ để mở các lớp tập huấn cho cán bộ kỹ thuật và nông dân về quy trình kỹ thuật sử dụng thuốc trừ sâu sinh học *B.b* và *M.a* trong phòng trừ sâu hại rau, cây ăn trái, cây dưa và cây cảnh tại Tiền Giang và Cần Thơ (2/2003, 4/2003, 7/2003, 10/2003)
7. Tiếp tục phối hợp với Trung tâm Khuyến Nông Tiền Giang và Chi Cục BVTV tỉnh Cần Thơ để xây dựng mô hình trình diễn sử dụng thuốc trừ sâu sinh học *B. bassiana* và *M. anisopliae* trong hệ thống IPM trên cây rau, Cam, Quýt, Nhãn, Xoài và Dưa tại Tiền Giang và Cần Thơ (1-12/2003)
8. Tiếp tục sản xuất chế phẩm *M.a* từ vi nấm *Metarhizium anisopliae* phân lập từ bọ cánh cứng hại dưa để phục vụ cho chiến dịch trừ bọ cánh cứng hại dưa tại Đồng Bằng Sông Cửu Long (1-12/2003)
9. Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai (6/2003, 12/2003)

Ô Môn ngày 6/1/2003.

Người viết báo cáo



TS. Nguyễn Thị Lộc

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

BỘ MÔN PHÒNG TRỪ SINH HỌC

ÔMÔN, CẦN THƠ, VIỆT NAM

ĐT: (84-71)-861256; Fax: (84-71)-861457

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NĂM 2003

Đề tài nhánh: “*Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học Beauveria bassiana và Metarhizium anisopliae trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ, Tiền Giang và một vài nơi khác tại Đồng Bằng Sông Cửu Long*”

Thuộc đề tài KC.04.12 “*Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học*”

I. TÊN ĐỀ TÀI THỰC HIỆN TRONG NĂM 2003:

“*Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất và mở rộng ứng dụng chế phẩm Metarhizium anisopliae và Beauveria bassiana trong việc quản lý sâu hại cây ăn quả và bộ cánh cứng hại dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang*”.

II. MỤC TIÊU:

Nhằm góp phần hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học bảo vệ thực vật để bảo vệ môi trường tại Đồng bằng sông Cửu long.

III. KẾ HOẠCH VÀ TIẾN ĐỘ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI TRONG NĂM 2003:

S T T	Các nội dung công việc thực hiện.	Thời gian	Sản phẩm phải đạt	Nơi áp dụng	Người, cơ quan thực hiện
1	Hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học <i>B. b</i> và <i>M. a</i> với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.	1/2003-12/2003	338kg <i>M.a</i> và 338 kg <i>B.b</i> ($1,2 \times 10^9$ BT/gram)	Viện lúa ĐBSCL	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL.
2	Thử nghiệm ở phòng thí nghiệm và nhà lưới của bộ môn về tác dụng diệt trừ một số sâu hại cây ăn trái và bộ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm đã sản xuất ra.	1/2003-12/2003	Có số liệu về hiệu lực diệt sâu của 2 chế phẩm này.	Viện lúa ĐBSCL	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL.

3	Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học <i>B.b</i> và <i>M. a</i> trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang	1/2003-12/2003	20ha cam, quýt; 15ha bưởi; 10ha nhãn và 600 cây dừa.	TP. Mỹ Tho; huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang; huyện Ô Môn, tỉnh Cần Thơ	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL. Chi cục BVTV tỉnh Cần Thơ, Trung Tâm Khuyến Nông tỉnh Tiền Giang.
4	Mở thêm các lớp tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân ứng dụng 2 chế phẩm sinh học <i>B.b</i> và <i>M. a</i> trong phòng trừ sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang	1/2003-12/2003	Huấn luyện thêm được 120 nông dân về quy trình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học trừ sâu hại cây trồng.	TP. Mỹ Tho; huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang; huyện Ô Môn, tỉnh Cần Thơ	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL. Chi cục BVTV tỉnh Cần Thơ, Trung Tâm Khuyến Nông tỉnh Tiền Giang.
5	Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai.	6/2003; 12/2003	Báo cáo định kỳ 6 tháng/lần	TP. Mỹ Tho; huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang; huyện Ô Môn, tỉnh Cần Thơ	Bộ môn Sinh Thái Côn Trùng và Phòng Trừ Sinh Học, Viện Lúa ĐBSCL. Chi cục BVTV tỉnh Cần Thơ, Trung Tâm Khuyến Nông tỉnh Tiền Giang.

IV. NỘI DUNG THỰC HIỆN TRONG NĂM 2003

i) Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học *B. b* và *M. a* với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.

ii) Thử nghiệm ở phòng thí nghiệm và nhà lưới của bộ môn về tác dụng diệt trừ một số sâu hại cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm đã sản xuất ra.

iii) Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *B.b* và *M.a* trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang

iv) Mở thêm các lớp tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *B.b* và *M. a* trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang.

v) Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai.

V. KẾT QUẢ ĐÃ THỰC HIỆN :

1. Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học *B. b* và *M. a* với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.

- Trong năm qua chúng tôi đã nghiên cứu và cải tiến quy trình kỹ thuật trong quá trình nhân nuôi 2 loài nấm xanh, *M.a* và nấm trắng, *B.b*, đồng thời cải tiến các khâu kỹ thuật khác để hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất 2 chế phẩm vi nấm này. Cụ thể là sau khi nuôi cấy

nấm trong túi nylon chịu nhiệt được 7-10 ngày thì chúng tôi đổ nấm ra khay nhựa và hong ở phòng lạnh vô trùng để nấm tiếp tục sinh bào tử đồng thời giúp cho môi trường khô ráo nên rút ngắn được thời gian sấy. Để công suất sản xuất của quy trình đạt tối ưu, chúng tôi đã phối hợp trường dạy nghề nông nghiệp và PTNT của viện tự tạo ra loại máy sấy thông gió để sấy nấm, kết quả thử nghiệm trong năm qua cho thấy loại máy sấy này vừa tiết kiệm được điện mà lại rút ngắn thời gian sấy so với các tủ sấy kín. Hiện chúng tôi đã thiết kế và sử dụng 6 máy sấy thông gió tự tạo, do đó quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi nấm của chúng tôi đã khá hoàn thiện và đạt công suất cao, chất lượng chế phẩm tốt (với số lượng bào tử là: $1,2 - 2,5 \times 10^9$ BT/1gram). Cả hai chế phẩm có hiệu lực ổn định đối với rầy nâu hại lúa, sau khi bảo quản 8 tháng ở nhiệt độ bình thường kể từ ngày sản xuất.

- Chúng tôi đã sản xuất 855 kg chế phẩm M.a và B.b (470 kg M.a và 385 kg B.b) với mật số bào tử là $1,2-2,5 \times 10^9$ BT/1gram, phục vụ cho các mô hình của đề tài, cũng như cung cấp cho các hộ nông dân để quản lý sâu hại cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang. Số chế phẩm sản xuất ra đã vượt kế hoạch gần 200 kg so với đề cương đặt ra cho năm 2003.

2. Thử nghiệm ở phòng thí nghiệm và nhà lưới của bộ môn về tác dụng diệt trừ một số sâu hại cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm đã sản xuất ra :

- Đánh giá hiệu lực của các chế phẩm sinh học M.a và B.b đối với các loài sâu hại cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa thông qua các thử nghiệm trong phòng và nhà lưới. Kết quả cho thấy rằng, khi phun trực tiếp lên cơ thể côn trùng dung dịch nấm với nồng độ $1,5 \times 10^7$ BT/ml, thì sau 3 ngày đã có một số rầy chổng cánh bị chết (khoảng 30-40%) và 7 ngày sau khi phun (NSP) thì hiệu lực của M.a đối với rầy chổng cánh đạt từ 80,1 tới 88,3% và hiệu lực của B.b đối với rầy chổng cánh đạt từ 68,4 – 72,5%. Nấm trắng còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm, với nồng độ của B.b là $1,5 \times 10^7$ BT/ml thì vào 7 NSP đạt hiệu lực từ 76,1 – 84,7%. M.a có hiệu lực rất cao đối với bọ cánh cứng hại dừa, bắt đầu có hiệu lực vào 3NSP và đạt hiệu lực từ 85,56 – 91,6% vào 10 NSP.

3. Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang

- Đã phối hợp với Trung Tâm Khuyến Nông tỉnh Tiền Giang (thông qua câu lạc bộ khuyến nông) xây dựng được những mô hình trình diễn ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, Nhãn và dừa tại xã Trung An, TP Mỹ Tho, Tiền Giang với diện tích là gần 20 ha cam, quýt, 15 ha bưởi, 8,5 ha nhãn và trên 1000 cây dừa.

- Phối hợp với Sở Nông Nghiệp & PT NT tỉnh Cần Thơ, chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Cần Thơ xây dựng được mô hình trình diễn về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây nhãn và cây dừa tại huyện Ô Môn với diện tích là 26 ha nhãn và gần 900 cây dừa.

Như vậy so chúng tôi đã mở rộng số diện tích mô hình trình diễn về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây nhãn và cây dừa nhiều hơn rất nhiều so với kế hoạch đã đặt ra cho năm 2003.

4. Mở thêm các lớp tập huấn:

Trong năm 2003 chúng tôi đã phối hợp với Trung Tâm Khuyến Nông tỉnh Tiền Giang thực hiện được 1 lớp tập huấn cho cán bộ kỹ thuật của tỉnh về tiềm năng phòng trừ sinh học của 2 chế phẩm B.b và M.a đối với sâu hại cây trồng và quy trình kỹ thuật sử dụng 2 chế phẩm sinh học này trong phòng trừ tổng hợp sâu hại cây ăn trái. bọ cánh cứng hại dừa: sâu hại cam quýt và quy trình IPM trên cây cam, quýt; Sâu hại cây dừa và biện pháp phòng trừ chế phẩm M.a.

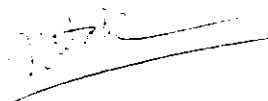
- Đã thực hiện được 4 lớp tập huấn cho nông dân ở tỉnh Tiền Giang (2 lớp tại TP.Mỹ Tho và 2 lớp tại huyện Cai Lậy) về: IPM trên cam, quýt, chanh, bưởi; ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng M.a để quản lý bọ cánh cứng hại dừa.

- Thực hiện thêm 4 lớp tập huấn cho nông dân ở huyện Ô Môn, tỉnh Cần Thơ về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng M.a để quản lý bọ cánh cứng hại dừa.

- Tổng số nông dân đã tham gia trong 8 lớp tập huấn ở 2 tỉnh là 345 người và đã vượt chỉ tiêu rất nhiều so với kế hoạch trong đề cương cho năm 2003.

Ô Môn ngày 20/12/2003.

Người viết báo cáo



TS. Nguyễn Thị Lộc

Xác nhận của Cơ quan:
Chức vụ để tại nhúng:



VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
HÀ NỘI

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG
SÔNG CỬU LONG



BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ

TÊN ĐỀ TÀI NHÁNH NĂM 2004

**“Hoàn thiện quy trình sản xuất và mở rộng ứng dụng chế phẩm
Metarhizium anisopliae và *Beauveria bassiana* trong việc quản lý
sâu hại cây ăn quả và bọ cánh cứng hại dừa tại Tiền Giang”.**

THUỘC ĐỀ TÀI: KC – 04 - 12

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI NHÁNH: TS. NGUYỄN THỊ LỘC
CƠ QUAN: VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Cần Thơ, Tháng 1 năm 2005

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG
BỘ MÔN PHÒNG TRỪ SINH HỌC
ÔMÔN, CẦN THƠ, VIỆT NAM
ĐT: (84-71)-861256; Fax: (84-71)-861457

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NĂM 2004

Đề tài nhánh: “*Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học Beauveria bassiana và Metarhizium anisopliae trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ, Tiền Giang và một vài nơi khác tại Đồng Bằng Sông Cửu Long*”

Thuộc đề tài KC.04.12 “Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học”

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Nguyễn Thị Lộc.

I. TÊN ĐỀ TÀI THỰC HIỆN VÀ KINH PHÍ TRONG NĂM 2004:

“Hoàn thiện quy trình sản xuất và mở rộng ứng dụng chế phẩm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* trong việc quản lý sâu hại cây ăn quả và bộ cánh cứng hại dừa tại Tiền Giang”.

- Tổng kinh phí cho năm 2004: 10.000.000 đồng (mười triệu đồng)

II. MỤC TIÊU:

Hoàn thiện quy trình sản xuất và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *Metarhizium anisopliae* (M.a) và *Beauveria bassiana* (B.b) trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái (Cam, Quýt, bưởi) tại Tiền Giang nhằm góp phần hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học bảo vệ thực vật và bảo vệ môi trường.

III. NỘI DUNG:

i) Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học Biovip (B. b) và Ometar (M. a) với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.

ii) Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Biovip và Ometar trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái tại Tiền Giang

iii) Mở thêm các lớp tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Biovip và Ometar trong phòng trừ sâu hại trên cây ăn trái tại Tiền Giang

v) Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai.

IV. PHƯƠNG PHÁP:

1. Tiếp thu các phương pháp nhân nhanh nấm ký sinh côn trùng từ Ấn Độ và Philippines, bộ môn nghiên cứu, cải tiến trong gần 9 năm qua và đã xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi nấm B.b và M.a với năng suất cao, chất lượng tốt và

cả 2 loại chế phẩm của bộ môn đều có hiệu lực cao, ổn định sau 8 tháng kể từ ngày sản xuất.

Phương pháp của các khâu trong dây truyền công nghệ sản xuất như: lựa chọn môi trường dinh dưỡng, thành lập các công thức chế phẩm... (đã được trình bày trong các báo cáo trước).

2. Để đánh giá chất lượng của chế phẩm vi nấm thì ngoài việc lấy nhiều mẫu ngẫu nhiên của các mẻ chế phẩm sản xuất ra để đếm số lượng bào tử và tính ra số bào tử/gram chế phẩm. Thì đồng thời phải lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm tra hiệu lực sinh học của các mẻ chế phẩm này đối với một số sâu hại cây ăn trái tại phòng thí nghiệm và nhà lưới của bộ môn (theo phương pháp của Ramamohan Rao, 1989; Lộc, 1995)

3. Có cải tiến trong việc phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *B.b* và *M. a* trong việc phòng trừ sâu hại trên cây ăn trái tại Tiền Giang, bằng cách điều tra khảo sát nhanh để xác định yếu tố hạn chế và yếu tố thành công chủ yếu (theo phương pháp NOA của Viện Lúa Quốc tế, IRRI).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU :

1. Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học Ometar (*M. a*) và Biovip (*B. b*) với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.

- Trong năm qua chúng tôi đã nghiên cứu và cải tiến quy trình kỹ thuật trong quá trình nhân nuôi 2 loài nấm xanh, Ometar và nấm trắng, Biovip, đồng thời cải tiến các khâu kỹ thuật khác để hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất 2 chế phẩm vi nấm Ometar (*M. a*) và Biovip (*B. b*). Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm vi nấm của chúng tôi đã khá hoàn thiện và đạt công suất cao, chất lượng chế phẩm tốt (với số lượng bào tử là: $1,2 - 2,5 \times 10^9$ BT/1gram). Cả hai chế phẩm có hiệu lực ổn định đối với rầy nâu hại lúa, sau khi bảo quản 8 tháng ở nhiệt độ bình thường kể từ ngày sản xuất. Chế phẩm mới sản xuất trong năm nay thì đã có độ thô vừa phải, dễ lọc và đã khắc phục được hiện tượng nghẹt vôi phun.

- Trong 12 tháng qua, chúng tôi đã sản xuất 1215 kg chế phẩm Ometar và Biovip (825 kg Ometar và 390 kg Biovip) với số lượng bào tử là: $1,2 - 2,5 \times 10^9$ BT/1gram, phục vụ cho các mô hình của đề tài, cũng như cung cấp cho các hộ nông dân để quản lý sâu hại cây ăn trái và bộ cánh cứng hại dừa tại Tiền Giang.

2. Thử nghiệm ở phòng thí nghiệm và nhà lưới của bộ môn về tác dụng diệt trừ một số sâu hại cây ăn trái và bộ cánh cứng hại dừa của các mẻ chế phẩm đã sản xuất ra :

Để đánh giá chất lượng của chế phẩm vi nấm qua mỗi đợt (mẻ) sản xuất thì ngoài việc lấy nhiều mẫu ngẫu nhiên của các mẻ chế phẩm sản xuất ra để đếm số lượng bào tử và tính ra số bào tử/gram chế phẩm. Chúng tôi đã lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm tra hiệu lực sinh học của các mẻ chế phẩm này đối với một số sâu hại cây ăn trái tại phòng thí nghiệm của bộ môn. Trong năm 2004, chúng tôi đã sản xuất ra nhiều mẻ chế phẩm Biovip và cũng đã thử hiệu lực của chúng đối với một số sâu hại cây ăn trái, kết quả cho thấy là khi phun trực tiếp lên cơ thể côn trùng dung dịch chế phẩm Biovip với nồng độ $1,5 \times 10^7$ BT/ml, thì

sau 3 ngày đã có một số rầy chống cánh bị chết (19-30%) và 7 ngày sau khi phun (NSP) thì hiệu lực Biovip đối với rầy chống cánh đạt từ 69,7 – 72,8%. Nấm trắng còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại cam quýt, với nồng độ của Biovip là $1,5 \times 10^7$ BT/ml thì vào 7 NSP đạt hiệu lực từ 75,5 – 84,7%. Biovip còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại xoài, 3 NSP hiệu lực đạt từ 32,3 tới 47,6% và 7 NSP hiệu lực đạt từ 75,3 tới 82,8% (bảng 1)

Bảng 1: Hiệu lực của các mẻ chế phẩm Biovip (B.b) đối với một số sâu hại cây ăn trái (Phòng thí nghiệm Viện Lúa ĐBSCL, 2004)

Loài sâu hại	Hiệu lực (%)					
	Mẻ Chế phẩm 1		Mẻ Chế phẩm 2		Mẻ Chế phẩm 3	
	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP
Rầy chống cánh CQ	19,36	68,72	25,61	72,85	30,07	71,26
Rầy mềm Cam Quýt	26,45	75,57	39,48	84,69	26,53	80,56
Rầy mềm hại Xoài	35,57	82,44	32,31	75,28	47,62	82,79

Trong năm qua, chúng tôi cũng đã sản xuất ra rất nhiều mẻ chế phẩm nấm xanh, Ometar và cũng đã thử hiệu lực của chúng đối với một số sâu hại cây ăn trái, kết quả cho thấy là khi phun trực tiếp lên cơ thể côn trùng dung dịch chế phẩm Ometar với nồng độ $1,5 \times 10^7$ BT/ml, thì sau 3 ngày đã có một số rầy chống cánh bị chết (32,8 – 40,3%) và 7 ngày sau khi phun (NSP) thì hiệu lực của Ometar đối với rầy chống cánh đạt từ 78,5 – 88,7%, điều này chứng tỏ rằng Ometar có hiệu lực diệt rầy chống cánh cao hơn so với Biovip. Chế phẩm nấm xanh Ometar còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại cam quýt, với nồng độ của Ometar là $1,5 \times 10^7$ BT/ml thì vào 7 NSP đạt hiệu lực đạt từ 72,4 – 80,1%. Đặc biệt, Ometar còn có hiệu lực rất cao đối với bọ cánh cứng hại dừa, bắt đầu có hiệu lực vào 3NSP và đạt hiệu lực cao vào 7 NSP, đạt từ 81,5 – 92,25% (bảng 2).

Bảng 2: Hiệu lực của các mẻ chế phẩm M.a đối với một số sâu hại cây ăn trái (Phòng thí nghiệm Viện Lúa ĐBSCL, 2004)

Loài sâu hại	Hiệu lực (%)					
	Mẻ Chế phẩm 1		Mẻ Chế phẩm 2		Mẻ Chế phẩm 3	
	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP
Rầy chống cánh CQ	32,79	79,50	40,28	88,72	35,66	78,45
Rầy mềm Cam Quýt	28,56	72,44	23,45	80,13	26,48	78,51
Ấu trùng Bọ cánh cứng hại dừa	37,45	85,56	42,15	81,49	38,69	92,25

Sau khi đã có kết quả thử nghiệm về hiệu lực sinh học của các mẻ chế phẩm trong phòng thí nghiệm thì chúng tôi cũng đã thực hiện các thí nghiệm tại nhà lưới của bộ môn để kiểm tra đánh giá chất lượng của các mẻ chế phẩm Biovip và Ometar đã sản xuất ra trong năm 2004.

Các mẻ chế phẩm nấm trắng, Biovip đã được khảo sát về hiệu lực sinh học tại nhà lưới. Kết quả thí nghiệm trong nhà lưới cũng phù hợp với kết quả đã khảo sát trong phòng. Cụ thể là khi phun trực tiếp lên cơ thể côn trùng dung dịch chế phẩm Biovip với nồng độ $1,5 \times 10^7$ BT/ml, thì 7 ngày sau khi phun (NSP) hiệu lực Biovip đối với rầy chống cánh đạt từ 65,4 – 73,4%. Biovip còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại cam quýt, với nồng độ là $1,5 \times 10^7$ BT/ml thì vào 7 NSP đạt hiệu lực từ 79,56 – 85,15%. Biovip còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại xoài, 3 NSP hiệu lực đạt từ 28,6 tới 34,11% và 7 NSP hiệu lực đạt từ 75,30 tới 84,68% (bảng 3)

Bảng 3: Hiệu lực của các mẻ chế phẩm *B.b* đối với một số sâu hại cây ăn trái (Nhà lưới Viện Lúa ĐBSCL, 2004)

Loài sâu hại	Hiệu lực (%)					
	Mẻ Chế phẩm 1		Mẻ Chế phẩm 2		Mẻ Chế phẩm 3	
	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP
Rầy chống cánh CQ	21,76	65,43	28,01	70,25	29,55	73,09
Rầy mềm Cam Quýt	22,53	81,84	27,39	79,56	32,60	85,15
Rầy mềm hại Xoài	28,63	75,30	30,57	84,68	34,11	79,65

Các mẻ chế phẩm nấm xanh, Ometar đã sản xuất trong năm qua cũng có hiệu lực cao đối với các loài sâu hại cây ăn trái đã được thử nghiệm trong nhà lưới, kết quả thí nghiệm cho thấy rằng khi phun dung dịch chế phẩm Ometar với nồng độ $1,5 \times 10^7$ BT/ml lên cơ thể côn trùng, thì 7 ngày sau khi phun (NSP) hiệu lực của Ometar đối với rầy chống cánh hại cam quýt đạt rất cao, cụ thể là 72,4 – 85,1%, điều này cũng phù hợp với kết quả trong phòng thí nghiệm là Ometar có hiệu lực diệt rầy chống cánh cao hơn so với Biovip. Chế phẩm nấm xanh Ometar còn có hiệu lực khá cao đối với rầy mềm hại cam quýt, khi thử nghiệm với nồng độ bào tử như trên thì vào 7 NSP đạt hiệu lực từ 75,32 – 87,68%. Đặc biệt, Ometar còn có hiệu lực rất cao đối với bọ cánh cứng hại dừa và đã đạt hiệu lực cao vào 7 NSP là từ 79,65 – 89,5% (bảng 4)

Bảng 4: Hiệu lực của các mẻ chế phẩm *M.a* đối với một số sâu hại cây ăn trái (Nhà lưới Viện Lúa ĐBSCL, 2004)

Loài sâu hại	Hiệu lực (%)					
	Mẻ Chế phẩm 1		Mẻ Chế phẩm 2		Mẻ Chế phẩm 3	
	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP	3NSP	7NSP
Rầy chống cánh CQ	25,57	75,43	37,19	85,14	30,11	72,40
Rầy mềm Cam Quýt	19,72	76,38	23,62	87,68	27,14	75,32
Ấu trùng Bọ cánh cứng hại dừa	34,56	82,60	39,27	79,65	35,91	89,45

3. Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái tại Tiền Giang

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài, cán bộ kỹ thuật của Bộ môn Phòng trừ sinh học, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long đã phối hợp với Trung tâm Khuyến nông tỉnh Tiền Giang xây dựng được những mô hình trình diễn ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Ometar và Biovip trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, Quýt, Bưởi, Nhãn và dứa tại Trung An - TP Mỹ Tho; Thới Sơn - huyện Châu Thành - tỉnh Tiền Giang. Bà con tham gia mô hình đã được tập huấn IPM trên cam, quýt, chanh, bưởi; quy trình kỹ thuật ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Ometar và Biovip trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng Ometar để quản lý bọ cánh cứng hại dứa. Các nông dân tiến bộ này đã tuân thủ các quy trình kỹ thuật một cách nghiêm túc, họ sử dụng Ometar và Biovip để phòng trừ các loài rầy, bọ xít, sâu ăn lá trên, cam, quýt, bưởi, nhãn; phòng trừ rầy bông, rầy mềm hại xoài, rất nhiều hộ tham gia mô hình đã thực hiện quy trình là chỉ sử dụng Ometar và Biovip để trừ các loài sâu, rầy, bọ xít gây hại trên, cam, quýt, bưởi, nếu cần thiết thì có thể sử dụng dầu khoáng để bổ xung trong quy trình trừ sâu hại, chứ không sử dụng thuốc hóa học và chỉ sử dụng thuốc hóa học khi cần phòng trừ bệnh hại trên các loại cây trồng này. Ometar cũng đã được ứng dụng để trừ bọ cánh cứng hại dứa tại nhiều hộ trồng dứa có tham gia mô hình ở Trung An. Các mô hình trình diễn của nông dân đã có kết quả rất tốt kể từ sau khi thực hiện đề tài được 6 tháng tới nay. Vì mô hình trình diễn có kết quả tốt cho nên đã có nhiều bà con nông dân xin được đăng ký tham gia thực hiện mô hình trình diễn, cho nên tới cuối năm 2004 diện tích mô hình đã được phát triển và mở rộng ra nhiều hộ ở Trung An - TP Mỹ Tho; Thới Sơn - huyện Châu Thành và đặc biệt là chúng tôi đã phát triển và nhân rộng mô hình tới xã Mỹ Long - huyện Cai Lậy, cho tới nay diện tích mô hình trình diễn tại Tiền Giang là gần 24 ha cam, quýt, 16 ha bưởi, 25 ha nhãn, 5 ha xoài và trên 1150 cây dứa.

Như vậy trong năm 2004, chúng tôi cũng đã mở rộng số diện tích mô hình trình diễn về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Ometar và Biovip trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây dứa tại Tiền Giang.

4. Mở thêm các lớp tập huấn:

Chỉ riêng trong năm 2004, đã thực hiện được 6 lớp tập huấn cho nông dân ở tỉnh Tiền Giang (4 lớp tại TP.Mỹ Tho và 2 lớp tại huyện Cai Lậy) về: IPM trên cam, quýt, chanh, bưởi; ứng dụng 2 chế phẩm sinh học Ometar và Biovip trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng Ometar để quản lý bọ cánh cứng hại dứa.

5. Kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả triển khai:

- Cứ 3 tháng 1 lần Viện Lúa ĐBSCL cùng Trung tâm Khuyến nông tỉnh Tiền Giang thực hiện các đợt kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả triển khai của đề tài

- Ngày 15 tháng 10 năm 2004, PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất (chủ nhiệm đề tài, Viện trưởng Viện BVTV) cùng TS. Lê Văn Trịnh (Giám đốc Trung tâm nghiên cứu các biện

pháp sinh học, Viện BVTV) và TS. Nguyễn Thị Lộc (chủ nhiệm đề tài nhánh) đã kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả của đề tài.

Qua các đợt kiểm tra, đánh giá thì đề tài luôn được nhận xét là đã thực hiện đúng với mục tiêu, nội dung, phương pháp nghiên cứu và tiến độ kế hoạch đã đặt ra trong đề cương của đề tài, kết quả của đề tài đã có giá trị khoa học và ứng dụng vào sản xuất rất tốt. Đặc biệt Chủ nhiệm đề tài (PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất) rất hài lòng với kết quả đã đạt được của đề tài trong năm 2004 nói riêng và trong các năm qua nói chung.

Người viết báo cáo

(Chủ nhiệm đề tài nhánh)



TS. Nguyễn Thị Lộc

VIỆN BẢO VỆ THỰC VẬT
HÀ NỘI

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG
SÔNG CỬU LONG



BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ

TÊN ĐỀ TÀI NHÁNH

“Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ và Tiền Giang”.

THUỘC ĐỀ TÀI: KC . 04 . 12

Thời gian thực hiện: 10/2001 – 10/2004

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI NHÁNH: TS. NGUYỄN THỊ LỘC
CƠ QUAN: VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Cần thơ Tháng 1 năm 2005

VIỆN LÚA ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

BỘ MÔN PHÒNG TRỪ SINH HỌC

ÔMÔN, CẦN THƠ, VIỆT NAM

ĐT: (84-71)-861256; Fax: (84-71)-861457

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI TỪ THÁNG 10 NĂM 2001 TỚI THÁNG 10 NĂM 2004

Tên đề tài nhánh: “*Nghiên cứu sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học *Beauveria bassiana* và *Metarhizium anisopliae* trong việc quản lý một số sâu hại cây trồng tại Cần Thơ và Tiền Giang*”

Thuộc đề tài KC.04.12 “Nghiên cứu sản xuất và sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học”

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Nguyễn Thị Lộc.

Tổng kinh phí của đề tài nhánh trong 4 năm qua: 118,2 triệu đồng.

I. MỤC TIÊU:

Nghiên cứu, hoàn thiện quy trình sản xuất và xây dựng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *Beauveria bassiana* (*B.b*) và *Metarhizium anisopliae* (*M.a*) trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái (Cam, Quýt, Nhãn, xoài) và bộ Cánh Cứng hại Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang nhằm góp phần hạn chế việc sử dụng thuốc hóa học bảo vệ thực vật và bảo vệ môi trường.

II. NỘI DUNG:

- i) Tiếp tục thu thập, phân lập, tuyển chọn bổ sung, xây dựng qui trình bảo quản và nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của *B. bassiana* và *M. anisopliae*.
- ii) Nghiên cứu cải tiến quy trình sản xuất, nâng cao chất lượng chế phẩm vi nấm *B.b* và *M.a*, hoàn thiện quy trình công nghệ và sản xuất một khối lượng lớn 2 chế phẩm trừ sâu sinh học *B. b* và *M. a* với chất lượng cao để phục vụ cho các mô hình ứng dụng.
- iii) Thử nghiệm ở nhà lưới của bộ môn về tác dụng diệt trừ một số sâu hại lúa, cây ăn trái và bộ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm đã sản xuất ra .
- iv) Thử nghiệm tác dụng diệt trừ một số sâu hại cây ăn trái và bộ cánh cứng hại dừa của các chế phẩm này tại ruộng vườn ở Đồng bằng SCL.
- v) Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *B.b* và *M.a* trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang
- vi) Tập huấn, hướng dẫn cán bộ kỹ thuật, nông dân ứng dụng 2 chế phẩm sinh học *B.b* và *M. a* trong phòng trừ sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang
- vii) Kiểm tra đánh giá tiến độ thực hiện và hiệu quả triển khai.

III. PHƯƠNG PHÁP:

1. Thu thập, phân lập và tạo thuần:

Những con sâu, rầy bị bệnh nấm chết ở ngoài ruộng, vườn đã được thu thập về phòng thí nghiệm để phân lập nấm. Nấm được tạo thuần bằng phương pháp nuôi cấy bào tử đơn trên môi trường PDA (Khoai tây + Dextrose + Agar) và sau đó nấm này đã được nhân ra, thử nghiệm lại trên rầy nâu hoặc rầy mềm hại cam quýt. Nấm lại được phân lập lại từ con rầy bị bệnh và tạo thuần bằng phương pháp cấy bào tử đơn, rồi so sánh với nấm đã phân lập từ con rầy chết bệnh ngoài đồng (phương pháp kock's postulates). Nấm thuần đã được định danh.

2. Nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm đã có từ trước đây bằng cách truyền qua côn trùng rồi phân lập và thuần hóa lại để nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm *Beauveria* và *Metarhizium* đã có trong bộ giống gốc (Lộc, 1995)

3. Chọn lọc môi trường thích hợp nhất để nhân nuôi nấm trắng và nấm xanh:

Khả năng thích hợp của những môi trường khác nhau đối với nấm trắng và nấm xanh đã được thử nghiệm với mục đích là để tìm ra những môi trường thích hợp và rẻ tiền để sản xuất chế phẩm nấm trắng, *B. bassiana* và nấm xanh, *M. anisopliae*, tuân theo những phương pháp vi sinh vật tiêu chuẩn (Booth, 1971 và Sundrababu, 1980).

Những kết quả trước đã chứng tỏ rằng cám gạo là môi trường lý tưởng nhất cho việc nhân nuôi nấm trắng, *B. bassiana*. Tuy nhiên nấm cần có một độ thoáng xốp nhất định để sinh bào tử khi ta nhân nuôi một sinh khối nấm lớn, vì vậy cám gạo đã được trộn với trấu ở những tỷ lệ khác nhau để nhân nuôi nấm trắng nhằm tìm ra tỷ lệ cám/trấu thích hợp nhất cho môi trường nhân nuôi nấm trắng.

Các kết quả trước cũng cho thấy rằng bột ngô và cám gạo là 2 môi trường lý tưởng nhất cho việc nhân nuôi nấm xanh, *M. anisopliae*, vì vậy bột ngô đã được bổ sung với những tỷ lệ khác nhau vào công thức trên để cải tiến môi trường nhân nuôi nấm xanh.

Số lượng bào tử/1 gram chế phẩm và độ hữu hiệu của nó đối với rầy nâu sau 3 tuần nhân nuôi nấm là thước đo để tìm ra môi trường thích hợp nhất cho việc nhân nuôi 2 loài nấm này.

4. Tìm hiểu sự ảnh hưởng của thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đối với chất lượng của chế phẩm.

Sau khi chế phẩm sản xuất ra thì cần có sự ổn định dưới nhiệt độ bình thường trong khoảng thời gian nhất định thì mới phục vụ được công tác bảo vệ thực vật của bà con nông dân. Với các công thức môi trường chọn lọc và bằng dây truyền công nghệ đã cải tiến của bộ môn, chúng tôi đã sản xuất ra 2 chế phẩm vi nấm ở dạng bột thấm nước, đó là *B.b*(OM₁-R) và *M.a*(OM₂- B). Sau khi có chế phẩm, chúng tôi đã bảo quản một số lượng nhất định của cả 2 chế phẩm này trong điều kiện của phòng thí nghiệm và hàng tháng có lấy mẫu để theo dõi sự nảy mầm của bào tử và hiệu lực của 2 chế phẩm này đối với rầy nâu (Lộc, 1995).

2. Đánh giá khả năng gây bệnh của các chế phẩm sản xuất ra đối với một số côn trùng hại lúa, cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa trong nhà lưới:

Khả năng gây bệnh (hiệu lực trong nhà lưới) của các chủng nấm xanh và nấm trắng đã được thực hiện trong nhà lưới của bộ môn, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 lần lặp lại. Đối với rầy nâu, thả 20 con rầy nâu vào lồng nhựa trên chậu có một bụi lúa tại nguyên 30-45 ngày tuổi, lồng nhựa có đường kính 15 cm và cao 70 cm. Đối với bọ xít: thả 20 con bọ xít vào lồng lưới trên chậu có 3 bụi lúa ở giai đoạn ngâm sữa, lồng lưới có đường kính 40 cm và cao 130 cm. Đối với rầy mềm hại xoài, thả 50 con rầy mềm trên cành xoài có lá non trong lồng lưới, đối với rầy mềm và rầy chổng cánh hại cam quýt thì phương pháp cũng tương tự. Đối với bọ cánh cứng hại dừa, thả 100 con bọ dừa (cả ấu trùng và thành trùng) vào tàu lá dừa non trong lồng lưới. Dung dịch bào tử nấm có chứa 0,02% Tween 80(R) (chất bám dính), với nồng độ bào tử là $1,5 \times 10^7$ bào tử/ml đã được phun trực tiếp lên cơ thể côn trùng. Tỷ lệ chết của rầy, bọ xít và bọ cánh cứng hại dừa được ghi nhận 3, 5, 7 ngày sau khi xử lý nấm. Dùng công thức Abbott để hiệu chỉnh hiệu lực và xử lý thống kê theo chương trình Sas.

4. Các thí nghiệm ngoài đồng:

Các thí nghiệm trên ruộng, vườn đã được thực hiện để đánh giá hiệu lực của hai loài nấm này, cũng như chế phẩm của chúng đối với một số côn trùng hại lúa, cây ăn trái và bọ cánh cứng hại dừa tại Đồng bằng sông Cửu Long.

Đối với sâu hại lúa, thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại. Diện tích ô là 50 m^2 ở vụ Đông xuân 2001-2002, các ô thí nghiệm được đắp bờ cao 20 cm. Liều lượng nấm là 6×10^{12} bào tử/1 ha, thêm 0,05% dầu ăn để tăng tính bám dính của bào tử nấm. Chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận 1 ngày trước khi phun (1NTP) và 5, 10 và 14 ngày sau khi phun (NSP). Mỗi nghiệm thức điều tra cố định 5 điểm theo 2 đường chéo góc của ô thí nghiệm, mỗi điểm điều tra trên 4 bụi lúa, sau đó số liệu được tính trung bình rồi quy ra mật số côn trùng trên m^2 .

Đối với sâu hại cây ăn trái như các loại rầy, bọ xít: thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại, kích thước ô: 7-8 cây. Liều lượng nấm là $7,5 \times 10^{12}$ bào tử/1 ha, thêm 0,05% dầu ăn để tăng tính bám dính của bào tử nấm. Chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận 1 ngày trước khi phun (1NTP) và 5, 10 và 14 ngày sau khi phun (NSP). Mỗi ô theo dõi 4 cây, mỗi cây theo dõi 4 chồi (hoặc cành) cố định theo các hướng khác nhau. Tính mật số rầy/bọ xít còn sống/chồi.

Đối với bọ cánh cứng hại dừa: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 lần nhắc lại và mỗi lần nhắc lại là 1 cây dừa dưới 4 tuổi để tiện cho việc lấy chỉ tiêu. Dung dịch bào tử nấm có chứa 0,1% U-Tron (chất bám dính), với nồng độ là $1,5 \times 10^7$ bào tử/ml đã được phun trực tiếp lên ngọn của cây dừa với liều lượng là 0,5 lít/ một cây. Đếm số bọ dừa sống trước khi phun và sau khi phun 5, 10 và 14 ngày.

Hiệu lực được tính theo công thức Henderson Tilton và xử lý thống kê theo chương trình Sas.

IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU :

1. Đã thu thập các mẫu côn trùng bị bệnh nấm từ các địa phương của các tỉnh như: Cần Thơ, An Giang, Sóc Trăng, Vĩnh Long, Trà Vinh và Tiền Giang.
2. Đã phân lập và tuyển chọn bổ xung thêm 11 chủng nấm mới (6 chủng nấm xanh và 5 chủng nấm trắng) và đã chọn được 3 chủng có hoạt lực diệt côn trùng rất cao và hiện đang dùng để sản xuất chế phẩm.
3. Đã cải tiến qui trình bảo quản bộ giống gốc và các chủng nấm đã thu thập, phân lập và tuyển chọn được.
4. Nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm đã có từ trước đây bằng cách truyền qua côn trùng rồi phân lập và thuần hóa lại để nâng cao hoạt tính diệt côn trùng của các chủng nấm *Beauveria* và *Metarhizium*. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng nếu nấm trắng hoặc nấm xanh được nuôi cấy và truyền qua 4-5 lần trên môi trường nhân tạo thì khả năng sinh trưởng, phát triển, sự sinh bào tử và độ độc của chúng đối với côn trùng sẽ giảm đi một cách có ý nghĩa so với nấm mới ly trích từ côn trùng. Nhưng sau khi lây nhiễm nấm trở lại ký chủ của nó, rồi phân lập và tạo thuần trở lại thì những đặc tính sinh học này của chúng đã được phục hồi trở lại, đặc biệt là hiệu lực của các chủng nấm này đối với sâu hại được cải thiện rõ rệt.
5. Chúng tôi đã thử nghiệm các môi trường thứ cấp khác nhau để nhân nuôi nấm xanh và nấm trắng. Đã nghiên cứu và chọn lọc được hai công thức môi trường thứ cấp lý tưởng nhất, với các tỷ lệ cám, bột ngô, trấu và nước nhất định để nhân nhanh nấm trắng, *B.b* và nấm xanh, *M.a*.
6. Cải tiến quy trình công nghệ để sản xuất chế phẩm nấm trắng và nấm xanh. Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm nấm trắng, *B.b*(OM₁-R) và nấm xanh, *M.a*(OM₂- B) đã được cải tiến và đã đạt công suất rất cao và chất lượng chế phẩm tốt, với số lượng bào tử là: 1,2 - 2,5 X 10⁹ BT/1gram. Cả hai chế phẩm có hiệu lực ổn định đối với rầy nâu hại lúa, sau khi bảo quản 8 tháng ở nhiệt độ bình thường kể từ ngày sản xuất. Đây là một trong những nội dung chính của đề tài này, nên chúng tôi tóm tắt nội dung đã đạt được như sau:

a) Cải tiến các khâu kỹ thuật trong qui trình nhân nuôi nấm:

Trong quá trình nghiên cứu và sản xuất chế phẩm vi nấm chúng tôi đã phát hiện được một số kỹ thuật để nhân nhanh sinh khối nấm là dùng túi nilon chịu nhiệt để nuôi nấm thay cho bình thủy tinh trước đây với nhiều ưu điểm như dễ đảo nấm, rẻ tiền và ít tốn công lao động. Bên cạnh đó, để sấy nấm đạt hiệu quả cao chúng tôi đã hong nấm trong phòng lạnh vô trùng sau khi nuôi cấy 14 ngày để nấm tiếp tục sinh bào tử đồng thời giúp môi trường khô ráo nên rút ngắn được thời gian sấy.

b) Cải tiến kỹ thuật nghiên nấm:

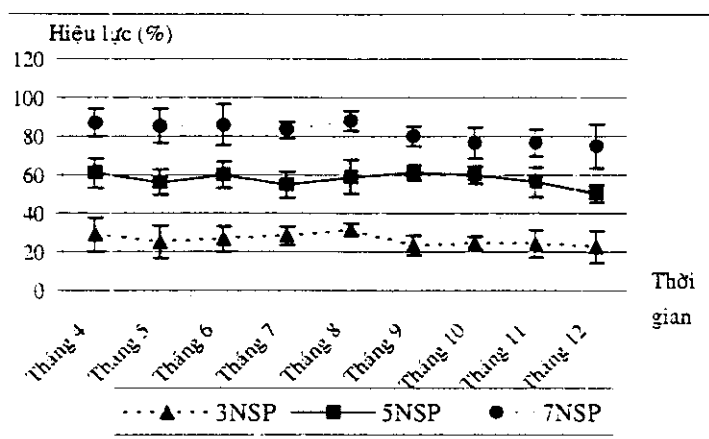
Qua kinh nghiệm rút ra từ ý kiến của nông dân chúng tôi đã hoàn thiện được máy xay chế phẩm có độ mịn tương đối cho dễ lọc không bị nghẹt vòi bình phun.

c) Tìm hiểu sự ảnh hưởng của thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đối với chất lượng của chế phẩm.

Sau khi chế phẩm sản xuất ra thì cần có sự ổn định dưới nhiệt độ bình thường trong khoảng thời gian nhất định thì mới phục vụ được công tác bảo vệ thực vật của bà con nông

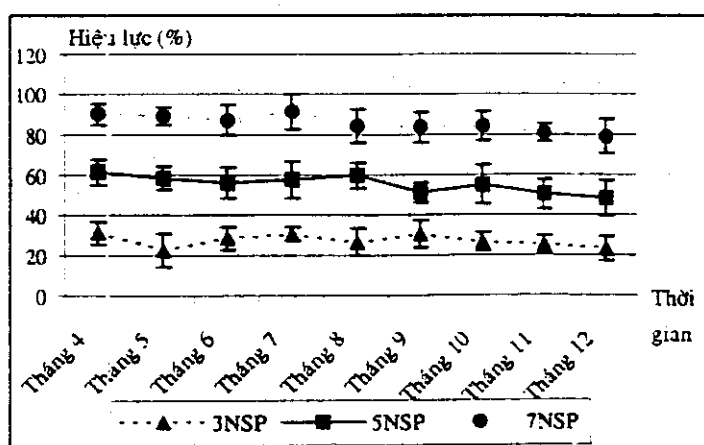
dân. Với các công thức môi trường như trên và bằng dây truyền công nghệ đã cải tiến của bộ môn, chúng tôi đã sản xuất ra 2 chế phẩm vi nấm ở dạng bột thấm nước, đó là *B.b*(OM₁-R) và *M.a*(OM₂- B). Sau khi có chế phẩm, chúng tôi đã bảo quản một số lượng nhất định của cả 2 chế phẩm này trong điều kiện của phòng thí nghiệm và hàng tháng có lấy mẫu để theo dõi sự nảy mầm của bào tử và hiệu lực của 2 chế phẩm này đối với rầy nâu.

Mề chế phẩm nấm trắng, *B.b*(OM₁-R) đã được sản xuất từ 12/04/2002. Qua kết quả thử nghiệm hàng tháng cho thấy rằng chất lượng của chế phẩm thể hiện qua số lượng bào tử còn sống và hiệu lực của chế phẩm đối với rầy nâu là khá ổn định. Ngay cả kết quả thu nhận được vào tháng 12/2002 cũng chứng tỏ rằng sau 8 tháng bảo quản ở nhiệt, ẩm độ bình thường trong phòng thí nghiệm, chất lượng của chế phẩm *B.b*(OM₁-R) vẫn chưa thay đổi (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1 : ảnh hưởng của thời gian tồn trữ đối với hiệu lực của chế phẩm nấm trắng, *B.b*(OM₁-R) .

Mề chế phẩm nấm xanh, *M.a*(OM₂- B) đã được sản xuất từ 4/2002. Qua kết quả khảo sát hàng tháng về chất lượng của chế phẩm nấm xanh thì cho thấy rằng số lượng bào tử còn sống và hiệu lực của chế phẩm đối với rầy nâu là khá ổn định sau 8 tháng kể từ ngày sản xuất. Sau 8 tháng bảo quản ở nhiệt, ẩm độ bình thường trong phòng thí nghiệm mà hiệu lực của chế phẩm nấm xanh đối với rầy nâu không khác biệt về mặt thống kê so với hiệu lực của chế phẩm nấm xanh mới sản xuất và hiệu lực vẫn khá cao đối với rầy nâu vào 7 NSP (biểu đồ 2).



Biểu đồ 2 : ảnh hưởng của thời gian tồn trữ đối với hiệu lực của chế phẩm nấm xanh

7. Đánh giá hiệu lực của các chế phẩm *B.b* và *M.a* đối với các loài sâu hại, thông qua các thử nghiệm trong nhà lưới. Qua kết quả thí nghiệm của 3 năm cho thấy rằng hiệu lực của chế phẩm nấm trắng đối với rầy nâu trong nhà lưới rất cao và đạt 75,3-87,4 % ở 7 ngày sau phun (NSP), hiệu lực của chế phẩm này đối với bọ xít là 68,2-79% vào 7NSP, đối với rầy mềm hại xoài là từ 76,1 – 84,7% và rầy mềm hại cam quýt là 75,2 – 85,2%; hiệu lực của *B.b* đối với rầy chổng cánh hại cây có múi đạt từ 68,4 – 73,1% (bảng 1). Kết quả thí nghiệm ở bảng 1 chứng tỏ rằng hiệu lực của các chế phẩm nấm trắng, *B.b* đã sản xuất qua các năm có hiệu lực khá cao và ổn định đối với một số loài rầy hại cây ăn trái. Đặc biệt là hiệu lực của các chế phẩm nấm trắng, *B.b* sản xuất ra trong năm 2004 có hiệu lực đối với sâu hại cây ăn trái là cao hơn so với các chế phẩm sản xuất ra trong các năm trước, điều này cũng phù hợp với sự cải tiến quy trình công nghệ sản xuất và gia tăng hoạt tính diệt côn trùng của chế phẩm vi nấm qua các năm, thể hiện qua kết quả ở bảng 1.

Bảng 1: Hiệu lực của chế phẩm *B.b* đối với một số côn trùng gây hại cây lúa và cây ăn trái (Viện Lúa ĐBSCL, Cần Thơ).

Loại sâu hại	Hiệu lực (%) ở 7 ngày sau phun			
	Năm 2001	Năm 2002	Năm 2003	Năm 2004
Rầy nâu hại lúa	76.5	75.3	87.4	-
Bọ xít hại lúa	68.2	73.6	79,0	-
Rầy mềm hại Xoài	76.1	82.5	79.5	84.7
Rầy mềm Cam Quýt	75.2	82.3	77.8	85.2
Rầy chổng cánh CQ	68.4	72.5	70.6	73.1

Kết quả thí nghiệm qua 4 năm thể hiện ở bảng 2 cho thấy là hiệu lực của chế phẩm nấm xanh đối với các loài sâu hại này là rất cao, đối với rầy nâu là 77,8-92,4% ở 7NSP; đối với bọ xít hại lúa là 76,3-90,2% ở 7NSP; vào 7 NSP thì hiệu lực của *M.a* đối với rầy chổng cánh hại cam quýt đạt từ 80,1 tới 88,3%; đối với rầy mềm hại xoài là từ 75,3 – 86,9%; đối với bọ xít hại nhãn đạt từ 72,5 tới 85,7%; đối với bọ cánh cứng hại dừa đạt từ 85,6 – 91,4% vào 7 NSP.

Bảng 2: Hiệu lực của chế phẩm *M.a* đối với một số côn trùng gây hại cây lúa và cây ăn trái (Viện Lúa ĐBSCL, Cần Thơ).

Loại sâu hại	Hiệu lực (%) ở 7 ngày sau phun			
	Năm 2001	Năm 2002	Năm 2003	Năm 2004
Rầy nâu hại lúa	77.8	79.2	92.4	-
Bọ xít hại lúa	82.5	90.2	76.3	-
Rầy chổng cánh CQ	80.1	85.4	88.3	87.7
Rầy mềm hại xoài	79.6	75.3	86.9	83.8
Bọ xít hại nhãn	72.5	81.3	79.4	85.7
Bọ cánh cứng hại dừa	87.2	91.4	85.6	89.4

8. Đánh giá hiệu lực diệt côn trùng của 2 chế phẩm *B.b* và *M.a* thông qua các thí nghiệm trên ruộng, vườn cây ăn trái ở Ô Môn – Cần Thơ và Mỹ Tho – Tiền Giang. Kết quả cho thấy rằng:

chế phẩm nấm trắng có hiệu lực cao đối với rầy nâu hại lúa và đạt từ 72,5 -86,7% ở 10 NSP, hiệu lực ngoài đồng của chế phẩm này đối với bọ xít hôi hại lúa là 65,5-72,7% , đối với rầy mềm hại xoài là từ 64,8 – 77,6% và rầy mềm hại cam quýt là 65,8 – 72,8%; hiệu lực của B.b đối với rầy chống cánh hại cam quýt đạt từ 65,5 – 68,4% vào 10 NSP (bảng 3).

Bảng 3: Hiệu lực của chế phẩm B.b đối với một số côn trùng gây hại cây lúa và rau màu (Tại ruộng, vườn ở Cần Thơ/Tiền Giang).

Loại sâu hại	Hiệu lực (%) ở 10 ngày sau phun		
	Năm 2001	Năm 2002	Năm 2003
Rầy nâu hại lúa	72,5	79.2	86.7
Bọ xít hại lúa	65.5	68.3	72.7
Rầy mềm hại Xoài	64.8	77.6	70.5
Rầy mềm Cam Quýt	72.8	70.62	65.8
Rầy chống cánh CQ	67.5	65.5	68.4

Kết quả thí nghiệm thực hiện tại ruộng vườn qua 4 năm còn cho thấy là hiệu lực của chế phẩm nấm xanh đối với các loài sâu hại này là rất cao, đối với rầy nâu là 78,6 – 90,8% ở 10 NSP; đối với bọ xít hôi hại lúa là 69,3 – 75,3% ở 10 NSP; vào 10 NSP thì hiệu lực của M.a đối với rầy chống cánh hại cam quýt đạt từ 68,7 – 73,1%; đối với rầy mềm hại xoài là từ 71,6 – 81,7%; đối với bọ xít hại nhãn đạt từ 72,1 tới 80,6%; đối với bọ cánh cứng hại dừa đạt từ 89,7 – 90,7% (bảng 4).

Bảng 4: Hiệu lực của chế phẩm M.a đối với một số côn trùng gây hại cây lúa và cây ăn trái (Tại ruộng, vườn ở Cần Thơ/Tiền Giang)..

Loại sâu hại	Hiệu lực (%) ở 10 ngày sau phun		
	Năm 2001	Năm 2002	Năm 2003
Rầy nâu hại lúa	78.6	86.4	90.8
Bọ xít hại lúa	69.3	75.3	72.5
Rầy chống cánh CQ	71.1	68.7	73.1
Rầy mềm hại xoài	77.4	71.6	81.7
Bọ xít hại nhãn	72.1	80.6	75.2
Bọ cánh cứng hại dừa	85.4	80.7	90.7

9. Trong 3 năm qua chúng tôi đã sản xuất được 3440 kg chế phẩm vi nấm (2175 kg chế phẩm nấm xanh, M.a và 1265 kg chế phẩm nấm trắng, B.b) với mật số bào tử là $1,2 - 2,5 \times 10^9$ BT/1gram, phục vụ cho các thí nghiệm ngoài đồng và ứng dụng trong sản xuất như: 58 ha cam, quýt, 43 ha bưởi, 35,5 ha nhãn, 11 ha xoài tại tỉnh Tiền Giang; 2 ha cam quýt, 9 ha bưởi, 37 ha nhãn, 4 ha xoài và trên 6000 cây dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang. Ngoài ra chúng tôi còn cung cấp hàng ngàn kg chế phẩm cho các chương trình lúa sạch, nho sạch, trà sạch ở một số nơi khác. Số lượng sản phẩm của 2 chế phẩm đã đạt được cao hơn nhiều so với số lượng đã đặt ra trong kế hoạch của 3 năm.

10. Phát triển và nhân rộng mô hình ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây Dừa tại Cần Thơ và Tiền Giang

- Đã phối hợp với Trung Tâm Khuyến Nông và Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Tiền Giang xây dựng được những mô hình trình diễn ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, Nhãn và dừa tại Trung An, Tân Mỹ Chánh - TP Mỹ Tho; Thới Sơn - huyện Châu Thành, Mỹ Long - huyện Cai Lậy và An Thái Đông - huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang với diện tích là 58 ha cam, quýt, 43 ha bưởi, 35,5 ha nhãn, 11 ha xoài và trên 2.200 cây dừa (bảng 5).

- Phối hợp với Chi cục Bảo vệ thực vật tỉnh Cần Thơ xây dựng được mô hình trình diễn về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây ăn trái và cây dừa tại huyện Ô Môn với diện tích là 2 ha cam quýt, 9 ha bưởi, 37 ha nhãn, 4 ha xoài và gần 3.900 cây dừa (bảng 5).

Bảng 5: Diện tích cây ăn trái và cây dừa đã được ứng dụng chế phẩm sinh học M.a và B.b ở Cần Thơ và Tiền Giang

Cây ăn trái	Diện tích (ha)				
	2001+2002		2003		2004
	Cần thơ	Tiền giang	Cần thơ	Tiền giang	Tiền giang
Cam, quýt	2	14	0	20	24
Bưởi	9	12	0	15	16
Nhãn	11	2	26	8,5	25
Xoài	4	6	0	0	5
Dừa	3.000	0	900	1050	1150

11. Các lớp tập huấn:

Trong 3 năm qua, chúng tôi đã phối hợp với Trung Tâm Khuyến Nông và Chi cục BVTV tỉnh Tiền Giang thực hiện được 1 lớp tập huấn cho cán bộ kỹ thuật của tỉnh về tiềm năng phòng trừ sinh học của 2 chế phẩm B.b và M.a đối với sâu hại cây trồng và quy trình kỹ thuật sử dụng 2 chế phẩm sinh học này trong phòng trừ tổng hợp sâu hại cây ăn trái, bộ cánh cứng hại dừa; sâu hại cam quýt và quy trình IPM trên cây cam, quýt; Sâu hại cây dừa và biện pháp phòng trừ bằng chế phẩm sinh học M.a.

Đã thực hiện được 11 lớp tập huấn cho nông dân ở tỉnh Tiền Giang về: IPM trên cam, quýt, chanh, bưởi; ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên Cam, quýt, bưởi, nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng M.a để quản lý bọ cánh cứng hại dừa.

Thực hiện thêm 4 lớp tập huấn cho nông dân ở huyện Ô Môn, tỉnh Cần Thơ về ứng dụng 2 chế phẩm sinh học B.b và M.a trong hệ thống phòng trừ tổng hợp sâu hại trên cây nhãn; quy trình kỹ thuật ứng dụng M.a để quản lý bọ cánh cứng hại dừa.

Tổng số nông dân đã tham gia trong 15 lớp tập huấn ở 2 tỉnh là 785 người và đã vượt chỉ tiêu rất nhiều so với kế hoạch trong đề cương.

12. Kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả triển khai:

Cứ 3 tháng 1 lần Viện Lúa ĐBSCL cùng Trung tâm Khuyến nông và Chi cục BVTV tỉnh Tiền Giang thực hiện các đợt kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả triển khai của đề tài.

Ngày 15 tháng 10 năm 2004, PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất (chủ nhiệm đề tài, Viện trưởng Viện BVTV) cùng TS. Lê Văn Trịnh (Giám đốc Trung tâm nghiên cứu các biện pháp sinh học, Viện BVTV) và TS. Nguyễn Thị Lộc (chủ nhiệm đề tài nhánh) đã kiểm tra, đánh giá tiến độ và hiệu quả của đề tài.

Qua các đợt kiểm tra, đánh giá thì đề tài luôn được nhận xét là đã thực hiện đúng với mục tiêu, nội dung, phương pháp nghiên cứu và tiến độ kế hoạch đã đặt ra trong đề cương của đề tài; kết quả của đề tài đã có giá trị khoa học và ứng dụng vào sản xuất rất tốt. Đặc biệt Chủ nhiệm đề tài (PGS. TS. Nguyễn Văn Tuất) rất hài lòng với kết quả đã đạt được của đề tài trong các năm qua.

13. Công tác đào tạo: đào tạo 1 thạc sỹ.

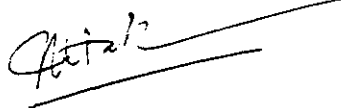
14. Báo cáo tại hội nghị, hội thảo: Hội nghị khoa học của Bộ Nông nghiệp & PTNT tại TP Hồ Chí Minh; Hội nghị khoa học của Viện Lúa và hội thảo “Phát triển kinh tế VAC”, do Trung ương hội làm vườn Việt Nam tổ chức tại TP Cần Thơ.

15. Các bài báo khoa học đã được xuất bản trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước: 1 bài trên tạp chí khoa học-công nghệ của Bộ Nông nghiệp và PTNT và 1 bài trên tạp chí OmonRice của Viện Lúa ĐBSCL.

16. Giải thưởng khoa học công nghệ: 3 giải thưởng: 2 giải thưởng bông lúa vàng Việt Nam năm 2002 và 1 giải thưởng hội thi sáng tạo kỹ thuật tỉnh Cần Thơ năm 2003.

Ô Môn ngày 26/01/2005.

Người viết báo cáo



TS. Nguyễn Thị Lộc

QUY TRÌNH SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC B.b PHÒNG TRỪ SÂU HẠI CÂY ĂN TRÁI.

- + Chế phẩm nấm trắng (*B.b*) là thuốc trừ sâu sinh học dạng bột phân tán trong nước.
- + Thành phần: gồm bào tử nấm trắng và các cơ chất khác (bột ngô, cám...).
- + Chủ yếu sử dụng chế phẩm *B.b* để quản lý các loài rầy, bọ xít, sâu ăn lá trên cam, quýt, chanh, bưởi, nhãn và xoài.
- + Pha 1 gói chế phẩm 150 gram và có mật số bào tử là $1,5 \times 10^9$ bào tử /gram vào 1 bình 15 lít nước, thêm 4-5ml chất bám dính nông được hoặc dầu ăn, trộn đều, sau đó lọc qua 2 lớp vải màn, rồi phun trực tiếp lên cây bị sâu phá hại.
- + Chú ý phun dung dịch chế phẩm vi nấm đều cả mặt trên và mặt dưới của lá để dung dịch nấm tiếp xúc được sâu hại.
- + Đặc biệt chú ý là phải phun dung dịch chế phẩm vi nấm vào chiều mát (khoảng 4-6 giờ chiều) để nấm có đủ điều kiện nhiệt, ẩm độ để tấn công côn trùng (vì ban đêm trời mát và có sương)
- + Tuyệt đối không pha trộn chế phẩm *M.a* và *B.b* với các loại thuốc hóa học trừ sâu, bệnh khác.
- + Phun chế phẩm vi nấm vào những ngày trời tạnh ráo. Nếu sau khi phun dung dịch chế phẩm nấm trắng, *B.b* dưới 10 giờ đồng hồ mà trời mưa thì phải phun lại (vì nấm trắng cần ít nhất là 10 tiếng sau khi tiếp xúc với côn trùng mới nảy mầm tấn công côn trùng được)
- + Trước khi phun rải thì các gói chế phẩm cần được bảo quản ở những nơi thoáng mát.
- + Chế phẩm nấm trắng (*B.b*) an toàn cho người, vật nuôi, thiên địch và môi trường.

QUY TRÌNH SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC *M.a* PHÒNG TRỪ SÂU HẠI CÂY ĂN TRÁI VÀ BỌ CÁNH CỨNG HẠI DỪA.

- + Chế phẩm nấm xanh (*M.a*) là thuốc trừ sâu sinh học dạng bột phân tán trong nước.
- + Thành phần: gồm bào tử nấm xanh (*M.a*) và các cơ chất khác (bột ngô, cám...).
- + Chủ yếu sử dụng chế phẩm *M.a* để quản lý các loài rầy, bọ xít, sâu ăn lá trên cam, quýt, chanh, bưởi, nhãn, xoài và bọ cánh cứng hại dứa.
- + Pha 1 gói chế phẩm 150 gram và có mật số bào tử là $1,5 \times 10^9$ bào tử /gram vào 1 bình 15 lít nước, thêm 4-5ml chất bám dính nông được hoặc dầu ăn, trộn đều, sau đó lọc qua 2 lớp vải màn, rồi phun trực tiếp lên cây bị sâu phá hại.
- + Chú ý phun dung dịch chế phẩm vi nấm đều cả mặt trên và mặt dưới của lá để dung dịch nấm tiếp xúc được sâu hại.
- + Nếu dùng *M.a* để trừ bọ cánh cứng hại dứa thì phải phun trực tiếp vào ngọn của cây dứa và phun ướt đều mặt trên của các lá dứa non.
- + Đặc biệt chú ý là phải phun dung dịch chế phẩm vi nấm vào chiều mát (khoảng 4-6 giờ chiều) để nấm có đủ điều kiện nhiệt, ẩm độ để tấn công côn trùng (vì ban đêm trời mát và có sương)
- + Tuyệt đối không pha trộn chế phẩm *M.a* và *B.b* với các loại thuốc hóa học trừ sâu, bệnh khác.
- + Phun chế phẩm vi nấm vào những ngày trời tạnh ráo. Nếu sau khi phun dung dịch chế phẩm nấm xanh, *M.a* dưới 24 giờ đồng hồ mà trời mưa thì phải phun lại (vì nấm xanh cần 24 tiếng sau khi tiếp xúc với côn trùng mới nảy mầm tấn công côn trùng).
- + Trước khi phun rải thì các gói chế phẩm cần được bảo quản ở những nơi thoáng mát.
- + Chế phẩm nấm xanh (*M.a*) an toàn cho người, vật nuôi, thiên địch và môi trường.