

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

DƯƠNG KIM HÀ

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG VÀ ĐỘC TÍNH CỦA
VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*
TRÊN SÂU ĂN LÁ HẠI RAU Ở VIỆT NAM

Chuyên ngành: Bảo vệ thực vật

Mã số: 9.62.01.12

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

TP. HCM – Năm 2022

Công trình được hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Lê Đình Đôn

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
hợp tại: Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Trong tự nhiên có hơn 90 loại vi khuẩn có khả năng diệt sâu đã được phân lập từ cơ thể sâu, trong cây và trong đất, nhưng chỉ có một vài loại đã được nghiên cứu cho đến nay. Nhiều nghiên cứu của các nước trên thế giới và Việt Nam tập trung vào vi khuẩn tự nhiên để sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, trong đó vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được nghiên cứu và sử dụng chủ yếu vào sản xuất thuốc trừ sâu sinh học.

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* là vi khuẩn gây độc đường tiêu hóa của sâu, không giết sâu hại nhanh, phổ ký chủ hẹp, thời gian hiệu lực ngắn, dễ bị phân hủy không gây ô nhiễm môi trường, sức khỏe con người và đòi hỏi công nghệ sản xuất cao cũng như nghiên cứu cơ bản cần thời gian dài. *B. thuringiensis* có nhiều trong môi trường đất, số lượng trong đất không đủ để diệt côn trùng vì *B. thuringiensis* tồn tại ở dạng bào tử, không thể nhân lên. Trong đó, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* là chủng vi khuẩn được sử dụng làm hoạt chất thuốc BVTV nhiều nhất trong danh mục sản phẩm thuốc BVTV năm 2021 (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2021).

Các nghiên cứu ở Việt Nam đã cung cấp nhiều kết quả minh chứng nguồn gen *B. thuringiensis* trong nước là đa dạng, nhiều loài, cũng như chưa có chủng *B. thuringiensis* thuần (Phạm Thị Thùy, 2013). Bên cạnh đó, những nghiên cứu trong nước về *B. thuringiensis* chưa được nhiều và chưa có công nghệ sản xuất *B. thuringiensis* thương mại cho các công ty sản xuất. Thiếu nghiên cứu cơ bản về gen, sự phân bố loài, dưới loài của *B. thuringiensis*.

Do đó, việc tập trung nghiên cứu các nguồn gen độc tính (*cry*, *cyt*, *vip*) và tồn trữ nguồn giống lâu dài cho việc sản xuất các chế phẩm *B. thuringiensis* var. *kurstaki* là cần thiết; xây dựng bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có độc tính cao trong việc sản xuất chế phẩm phòng trừ sâu ăn lá bộ cánh vảy, hai cánh và cánh cứng; sử dụng bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cho nghiên cứu sản xuất thuốc bảo vệ thực vật ở Việt Nam nhằm xây dựng quy trình công nghệ sản xuất có hệ thống và quy mô lớn. Bên cạnh đó, việc đẩy mạnh công tác khuyến nông, tập huấn sử dụng thuốc *B. thuringiensis* một cách thường xuyên và hệ thống sẽ góp phần giảm thiểu sâu hại, bảo vệ môi trường, giảm sử dụng thuốc trừ sâu hóa học nhằm sản xuất rau an toàn, có chất lượng cao.

Để góp phần vào việc sử dụng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong phòng trừ sâu hại và từ đó sử dụng thuốc bảo vệ thực vật sinh học trên rau, luận án “**Nghiên cứu sự đa dạng và độc tính của vi khuẩn *Bacillus***

***thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá hại rau ở Việt Nam”** được thực hiện từ năm 2015 đến 2021.

Mục tiêu nghiên cứu

Xác định sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* và đa dạng di truyền vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở một số tỉnh, thành tại Việt Nam. Lập bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có độc tính cao là nguồn vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học an toàn cho sức khỏe cộng đồng, thân thiện với môi trường, phù hợp với nông nghiệp hữu cơ. Xác định môi trường dinh dưỡng và tối ưu hóa điều kiện lên men tự động vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình lên men qui mô lớn tạo chế phẩm sinh học phục vụ cho sản xuất.

Đóng góp mới của nghiên cứu

Cung cấp những thông tin về sự phân bố và tính đa dạng di truyền của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở các vùng sinh thái của Việt Nam. Đã xác định được các gen độc tính *cry*, *vip3a* hiện diện ở các chủng vi khuẩn gây chết trên sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) từ các chủng phân lập. Xác định được khả năng chịu đựng UV, mật số, thời gian gây chết sâu trung bình (LC₅₀, LT₅₀) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Đã xây dựng được quy trình kỹ thuật lên men tự động cho việc gia tăng mật số vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Ý nghĩa khoa học

Kết quả về sự phân bố loài vi khuẩn *B. thuringiensis* ở các vùng sinh thái Việt Nam là nguồn cơ sở dữ liệu cho các nhà khoa học để nghiên cứu về nguồn gốc phát sinh, sự đa dạng và phong phú của loài vi khuẩn *B. thuringiensis* ở Việt Nam. Bộ mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có sự hiện diện của các gen *cry*, *vip* trong kết quả của luận án đã cung cấp những thông tin cần thiết để thiết lập cơ sở dữ liệu sinh học, giúp cho lĩnh vực nghiên cứu chuyên sâu về tính độc của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân bố ở các vùng sinh thái của Việt Nam, đóng góp phần cơ sở khoa học để bổ sung thêm vào danh sách các chủng vi khuẩn có độc tính trừ sâu cao hơn đang có ở Việt Nam.

Bố cục của luận án

Luận án chính thức gồm có 3 chương, 108 trang. Các phần: Mở đầu (4 trang), tổng quan (25 trang), vật liệu và phương pháp nghiên cứu (20 trang), kết quả và thảo luận (57 trang), kết luận và đề nghị (2 trang); 37 bảng số liệu và 17 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 187 tài liệu trong đó 15 tài liệu tiếng Việt và 172 tài liệu tiếng Anh.

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1 Sự phân bố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong đất

Đã có hơn 27.000 mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* được phân lập trên toàn thế giới và phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* ở nhiều môi trường khác nhau như trong đất, ở một số cây hạt trần, trên thuốc lá khô và bụi sản phẩm tồn trữ, hạt giống, đất nông nghiệp, môi trường thủy sản và thậm chí là những vùng có điều kiện khắc nghiệt như sa mạc, trầm tích biển ở nhiều quốc gia trên thế giới. Trong đất, *B. thuringiensis* tồn tại ở dạng bào tử, không nảy mầm hoặc nhân lên qua nhiều năm. Mật số của *B. thuringiensis* trong các loại đất rất thấp, khoảng 0,005 – 0,5% loài *Bacillus* spp. (DeLucca và ctv, 1981; Travers và ctv, 1987; Martin và Travers, 1989; Kealin và ctv, 1994; Smith và Couche, 1997; Ben Dov và ctv, 1997; Iriarte và ctv, 1998; Rampersad và Ammons, 2005; Baig và Mehnaz, 2010, Hassan và ctv, 2010; Oves và ctv, 2013; Mohammad và ctv, 2013; Joelma và ctv, 2014; Diego và Graciela, 2017; Nair và ctv, 2018)

Kết quả nghiên cứu sự đa dạng sinh học của chủng *B. thuringiensis* ở Việt Nam đã phát hiện 6 chủng vi khuẩn trong đất rừng ngập mặn có khả năng diệt ấu trùng các loại muỗi sốt rét *Anopheles minimus*, muỗi gây sốt xuất huyết *Aedes aegypti* và *Culex quinquefasciatus*. Ở một số tỉnh thuộc vùng Đông Bắc Bộ đã phân loại được 22 dưới loài trên tổng số 82 dưới loài đã được phát hiện trên thế giới (Nguyễn Thanh Cảnh, 2004; Mai Thị Hằng và Mai Thị Mỹ Hạnh, 2004; Lê Thị Minh Thành và ctv, 2005; Nguyễn Thiện Phú và Trần Thanh Thủy, 2013)

1.2 Gen gây độc côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

1.2.1 Gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* gây bệnh cho côn trùng qua đường tiêu hóa. Bào tử nảy mầm dẫn đến sự sinh sản của vi khuẩn trong cơ thể vật chủ làm côn trùng chết, song yếu tố chính làm cho côn trùng chết nhanh là độc tố do vi khuẩn sinh ra. Các gen *cry* thường nằm trên các plasmid có hệ số sao chép thấp. (Carlton và Gonzalez, 1985). Các tinh thể diệt côn trùng được mã hóa bởi rất nhiều gen *cry* khác nhau. Hiện nay, hơn 200 gen *cry* đã được mô tả và phân loại thành các nhóm dựa vào hoạt tính diệt côn trùng và trình tự amino acid. Tuy nhiên, hầu hết mỗi quan tâm đều tập trung vào nhóm gen *cry1*, *cry3*, *cry4* (Li và ctv, 1991; Hernandez và Ferre, 2005).

1.2.2 Gen mã hóa protein vip của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Protein vip mã hóa cho nhóm độc tố vip có khả năng diệt côn trùng phổ rộng, độc tố cao và chưa phát hiện được loại côn trùng có khả năng kháng độc tố này. Hai loại độc tố vip được phát hiện lần đầu tiên là vip3a và vip3b do Estruch và ctv (1996). Đến nay, người ta đã phát hiện được 85 gen vip thuộc bốn nhóm khác nhau, trong đó đáng chú ý nhất là gen vip3a mã hóa protein 88 kDa có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vảy, độc tố này cũng chính là nguyên nhân gây phân giải tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. Những đặc tính của vip3a mở ra khả năng ứng dụng rất cao trong việc sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh có nguồn gốc từ *B. thuringiensis* dựa trên một số lượng lớn các loài gây hại hiện nay trên cây trồng (Palma, 2014).

1.3. Một số kết quả nghiên cứu về *B. thuringiensis*

Nghiên cứu về sự đa dạng di truyền: các chủng *Bacillus thuringiensis* rất đa dạng về cấu trúc tinh thể độc tố (hình thoi chiếm 63,1%, hình cầu 11,2%, hình khối lập phương 4,8%...), đa dạng về tuýp huyết thanh, và đặc biệt đa dạng về gen mã hóa protein: diệt côn trùng bộ cánh vảy, cánh cứng, hai cánh, diệt tuyến trùng hại cây nông lâm công nghiệp. Gen cry1 (cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry1C, cry1E, cry1F, cry1Aa, cry1Ac, cry1Ca), cry2 (cry2Aa, cry2Ab), cry3Aa7 cry4 (cry4Aa, cry4Bb), cry8 (cry8ca2), cry10Aa, cry11Aa và cry11Ba. Gen vip đang được nghiên cứu ngày càng nhiều trong việc tạo ra chế phẩm sinh học, trong đó vip3 (67,4%), vip2 (14,6%), vip1 (8,1%) đã mô tả đặc điểm, đa dạng của vi khuẩn *B. thuringiensis* và tìm gen cry mới gây độc cho côn trùng (Glen và Ana, 2005; Phạm Thị Thùy và ctv, 2005; Ramalakshmi và Udayasuriyan, 2009; Pardo, 2009; Sun và Park, 2010; Yu và ctv, 2010; Liu và ctv, 2010; Swamy và ctv, 2011; Joelma và ctv, 2014; Diego và Graciela, 2017).

Nghiên cứu về tác động ký sinh côn trùng của vi khuẩn *B. thuringiensis* diệt côn trùng bộ cánh vảy, cánh cứng, hai cánh, diệt tuyến trùng hại cây nông lâm công nghiệp (Chilcott và ctv, 1998; Naimov và ctv, 2001; Tighe và ctv, 2001; Wellman-Desbiens và Cote, 2005; Dubovskii và ctv, 2005; Jiménez-Juárez và ctv, 2007; Ruii và ctv, 2007; Rouis và ctv, 2007; Kati và ctv 2007; Chandi và ctv, 2007; Cohen và ctv, 2008; Porcar và ctv 2009; Wojciechowska, 2009; Erban và ctv, 2009; Joelma và ctv 2014; Soares-da-Silva và ctv, 2014; Doolotkeldieva và ctv, 2018).

Theo Xue và ctv (1996) đã chứng minh rằng các bào tử của *B. subtilis* dễ bị ảnh hưởng bởi bức xạ mặt trời và với tia cực tím ở bước sóng 254 nm (UV-C). Vi khuẩn *B. thuringiensis* hoạt động chậm, rất nhạy cảm đối với bức xạ UV và có thể chết khi tiếp xúc với tia tử ngoại và ion hóa, với các

protein liên kết chéo bởi các gốc hydroxyl và bức xạ ion hóa, đặc biệt là tia cực tím UV-B (280 – 315 nm). Do đó, bảo vệ bào tử của vi khuẩn *B. thuringiensis* khỏi tác động bức xạ mặt trời sẽ giữ độc tính của vi khuẩn bền vững (Jones và ctv, 1991; Pusztai và ctv, 1991; Xue và ctv, 1996).

Chế phẩm sinh học *B. thuringiensis* xuất hiện vào giữa những năm 1970 là loại thuốc cho hiệu lực khả quan trong phòng trị sâu, ít ảnh hưởng nhất đối với môi trường, bảo vệ thiên địch và các loài động vật có ích, ngoài ra còn mang lại hiệu quả kinh tế cao nhất cho người dân (Tasbashnik, 1990). Đến nay khoảng hơn 130 giống côn trùng thuộc 3 bộ cánh vảy, hai cánh và cánh cứng đã được kiểm soát. Có nhiều chủng *B. thuringiensis* khác nhau, mỗi loại tạo ra một loại protein độc tố cho từng nhóm sâu hại (Dean, 1984).

Chương 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

2.1.1 Sự phân bố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và đa dạng quần thể vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* từ các tỉnh, thành ở Việt Nam.

2.1.2 Đánh giá độc tính của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá

- Đánh giá khả năng gây chết của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu ăn lá bộ cánh vảy.

- Chọn lọc chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kháng tia UV và tối ưu điều kiện sản xuất chế phẩm VBt.

- Đánh giá hiệu quả trừ sâu ăn lá của chế phẩm VBt điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng.

2.2 Vật liệu nghiên cứu

Hóa chất dùng phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis*: Dịch chiết nấm men, NaCl, Tryptone, Agar, $MnCl_2$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 ; Bộ nhuộm Gram (Nam Khoa, Việt Nam) gồm: Crystal violet, lugol, cồn, safranin; dầu soi kính, dung dịch lục malachite ($C_{23}H_{25}N_2Cl$), dung dịch Fuchsin, dung dịch acid carbollic, NaOH.

Sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng được nuôi trong nhà lưới kín và trong phòng. Sâu được nuôi bằng thức ăn tự nhiên (cải ngọt, cải xanh), có kèm mật ong và cây có hoa tạo tiểu sinh thái phù hợp với tự nhiên, chọn sâu khỏe mạnh lớn đều và nuôi cho tới khi hóa nhộng. Sâu được nhân nuôi ở phòng thí nghiệm (nhiệt độ phòng 28 – 30°C, ẩm độ 75%) ít nhất 3 vòng đời, đồng đều về tuổi (đang ở giai đoạn tuổi 2). Loại bỏ sâu non có hiện tượng bị virus hay bị các bệnh khác.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất từ các tỉnh, thành

2.3.1.1 Phương pháp thu thập mẫu đất

Mẫu đất được lấy ở 5 điểm theo đường chéo góc (điểm giữa và 4 góc của khu đất). Dùng dụng cụ lấy mẫu gạt bỏ lớp đất mặt, đào sâu và lấy phần đất cách lớp mặt 5 – 10 cm. Trộn đất ở 5 điểm lại với nhau thành mẫu chung và cho vào hộp nhựa đậy kín nắp, ghi nhận thông tin chi tiết về mẫu đất (địa điểm, loại đất, tọa độ).

Số mẫu thu thập: 616 mẫu đất được thu thập ở 22 tỉnh, thành vùng Đồng bằng sông Hồng, vùng Duyên Hải miền Trung, vùng Đông Nam Bộ, vùng Đồng bằng sông Cửu Long tập trung ở các khu vực đất canh tác (đất trồng rau màu, lúa, cây ăn quả và cây công nghiệp – 476 mẫu), đất không canh tác (trầm tích sông, hồ, cát ven biển, vùng hải đảo (Phú Quý, Phú Quốc, Lý Sơn), rừng bảo tồn, ven đường – 140 mẫu) vị trí lấy mẫu được địa phương hóa và xác định tọa độ theo GPS.

2.3.1.2 Phương pháp chuẩn bị môi trường phân lập mẫu đất

Môi trường T3 agar (môi trường phân lập). Môi trường T3 lỏng (môi trường tăng sinh, môi trường lắc mẫu). Môi trường Clark - lubs. Môi trường phản ứng thủy phân tinh bột. Tất cả các môi trường đều được điều chỉnh pH 7,0 sau đó hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

2.3.1.3 Phân lập mẫu vi khuẩn

Phân lập vi khuẩn theo phương pháp của Traves, 1987.

Sau 2 ngày, chọn khuẩn lạc với đặc điểm: màu trắng, thô, lan nhanh trên đĩa, đem cấy ria trên đĩa petri có chứa môi trường T3 đặc. Tiếp tục cấy các khuẩn lạc đến khi vi khuẩn xuất hiện trên đĩa có cùng hình dạng và kích thước. Các chủng phân lập được giữ trong ống nghiệm chứa môi trường LB.

2.3.1.4 Định danh vi khuẩn *B. thuringiensis* bằng thử nghiệm sinh hóa

Nhuộm Gram, nhuộm bào tử và tinh thể, thử hoạt tính catalase, Phản ứng VP (Voges-Proskauer), Phản ứng thủy phân tinh bột, Thử nghiệm khả năng di động và đo kích thước tế bào vi khuẩn.

2.3.1.5 Phương pháp tăng sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis*

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn nghi ngờ là *B. thuringiensis* đã phân lập được trên môi trường T3 lỏng ở 30°C, lắc 180 vòng/phút trong 48 giờ, đem xử lý mẫu ở 70°C trong 10 phút rồi pha loãng mẫu đến 10^{-7} . Lấy 0,1 mL ở mỗi nồng độ pha loãng từ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} trang vào đĩa thạch vô trùng chứa

môi trường T3. Để vào tủ âm ở 28°C trong 24 giờ rồi đếm số lượng khuẩn lạc hiện diện trên mỗi đĩa. Môi trường nhân nuôi vi khuẩn (Môi trường dịch chiết nấm men).

2.3.1.6 Phương pháp bảo quản giống vi khuẩn *B. thuringiensis*

Bảo quản giống bằng dầu khoáng: tạo môi trường yếm khí bằng dầu khoáng để ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn. Cho một ít dầu khoáng vào ống Eppendorf được khử trùng 121°C, 1 atm trong 20 phút. Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn cho vào ống Eppendorf, đậy nắp và dùng paraffin quấn quanh miệng ống, nuôi trong khoảng 24 giờ đem bảo quản ở - 20°C.

2.3.2 Khuếch đại trình tự 16S-rDNA và gen *cry* của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

2.3.2.1 Ly trích DNA

Các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* phân lập được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng ở 30°C, lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. DNA tổng số được tách bằng bộ kit Wizar Genomic DNA Purification (Promega) và GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) theo hướng dẫn sử dụng. DNA sau khi ly trích được hòa và trữ ở tủ âm 20°C.

2.3.2.2 PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với 5 cặp primer để khuếch đại trình tự 16S-rDNA (cặp primer 63F, 1489R) và 4 gen *cry1* (cặp primer Un1(F), Un1(R)) *cry2* (cặp primer Un2(F), Un2(R)), *cry4* (cặp primer Un4(F), Un4(R)), và *cry9* (cặp primer Un9(F), Un9(R)) ở các chủng vi khuẩn phân lập theo Ben-Dov và ctv (1997). Chu trình phản ứng PCR theo Khojan và ctv (2013).

2.3.2.3 Điện di trên gel agarose và đọc kết quả sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,0%, nhuộm với SYBGreen. Chạy điện di ở hiệu điện thế 100V trong 35 phút. Quan sát kết quả dưới tia UV. Đọc kết quả, chụp ảnh gel bằng máy chụp ảnh gel (UVP MultiDoc – It Digital Imaging System).

Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự ở First Base, Malaysia. Kết quả giải trình tự được kiểm tra có trùng khớp với vùng gen *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry9* và đối chứng dương (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) trên ngân hàng gene.

2.3.3 Xác định sự hiện diện protein vip3a của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Phản ứng PCR khuếch đại gen *vip3a* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* được thực hiện với cặp primer Vip3a – Fw và Vip3a – Rv theo Abdelkefi và ctv, 2005. Thành phần phản ứng bao gồm Taq DNA polymerase (5 units/ μ L) 6,5 μ L, primer xuôi (10 nM) 26 μ L, primer ngược

(10 nM) 26 μ L, dNTP mixture (2 mM) 26 μ L, 10X PCR buffer + 25 mM $MgCl_2$ 26 μ L, nước tinh khiết 139,5 μ L. Tổng thể tích phản ứng là 250 μ L. Chu trình phản ứng khuếch đại gồm 1 chu kỳ ở 95°C, 90 giây và 24 chu kỳ (30 giây tại 94°C, 30 giây tại 45°C, và 90 giây ở 72°C) và 420 giây ở 72°C.

2.3.4 Đánh giá độc tính của các mẫu phân lập *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trên sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện phòng thí nghiệm

Sâu được nhân nuôi ở phòng thí nghiệm (nhiệt độ phòng 28 – 30°C, ẩm độ 75%) ít nhất 3 vòng đời, đồng đều về tuổi (đang ở giai đoạn tuổi 2).

Cây cải được 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải thả 10 con sâu tuổi 2. Chậu được đặt trên đĩa nhựa có chứa nước để đảm bảo cho sâu không bò ra khỏi cây cải. Mỗi chậu cải được đặt trong lồng lưới bằng vải màn thưa để đảm bảo môi trường bên trong luôn được thoáng khí. Bố trí các lồng thí nghiệm ở nơi thoáng mát.

Dịch các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập được pha loãng 1% và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn. Hiệu lực diệt sâu được tính theo công thức Abbott (1925): $A (\%) = (1 - T/C) \times 100$. Trong đó A (%) là chỉ số hiệu lực diệt sâu; C là số sâu sống sót ở nghiệm thức đối chứng; T là số sâu sống sót ở các nghiệm thức thí nghiệm.

2.3.5 Xác định giá trị LC_{50} , LT_{50} của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* tuyển chọn

2.3.5.1 Xác định giá trị LC_{50}

Sau khi chọn được các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có khả năng diệt sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng, giá trị LC_{50} , LT_{50} của các chủng này được xác định đối với sâu ở hai giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4.

Thí nghiệm được tiến hành khi sâu ở giai đoạn tuổi 2 và tuổi 4. Sâu được cân trọng lượng nhằm đảm bảo sự đồng đều. Thí nghiệm với 50 sâu/mật độ/độ tuổi, các sâu sẽ được cho vào 10 hộp (5 sâu/hộp) nhằm tạo môi trường thông thoáng. Chuẩn bị dịch vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* thành 4 mật độ 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 CFU/mL và đối chứng (sử dụng nước cất). Tiến hành lây nhiễm bằng cách phun dung dịch chứa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* lên lá cải để ráo và cho vào hộp để sâu ăn, bổ sung thức ăn cho sâu bằng lá cải (không phun dung dịch có chứa *B.*

thuringiensis var. *kusrtaki*) ở những lần cho ăn tiếp theo nhằm duy trì nguồn thức ăn cho sâu. Ghi nhận số liệu và triệu chứng sâu chết hàng ngày.

2.3.5.2 Xác định giá trị LT_{50}

Dựa vào kết quả thí nghiệm LC_{50} và tham khảo kết quả phòng trừ sâu xanh da láng, sâu xanh của Zang và ctv (2009), chọn ra được một nồng độ phù hợp cho từng giai đoạn tuổi sâu để xác định LT_{50} . Ghi nhận số liệu sâu chết hàng ngày, ước lượng thời gian sâu chết bằng ước lượng Kaplan Meier.

2.3.6 Chọn lọc chủng *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* kháng tia UV

2.3.6.1 Khảo sát khả năng chống chịu tia UV của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm

Chuẩn bị 10 mL dịch các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* phân lập có chứa gen *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry9* và *vip3a*. ở mật số 10^8 CFU/mL trong đệm 0,5 M phosphate ở pH 6,8 được rót vào các đĩa petri thủy tinh. Vi khuẩn được chiếu UV (BII, Illuminator, 1 A-7 SBS Korea) ở bước sóng 254 nm (UV-C) và 365 nm (UV-A) từ khoảng cách 30 cm (Deepak và ctv, 2001, Saxena và ctv, 2002).

Thí nghiệm gồm 12 chủng vi khuẩn, được bố trí 4 lần lặp lại với 1 đĩa petri/lần lặp lại ở 5 mức thời gian 0, 30, 60, 90, 120 phút ở từng bước sóng và đối chứng không chiếu tia UV.

Chỉ tiêu theo dõi: sự xuất hiện bào tử của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* ở các mức thời gian chiếu UV và hiệu quả diệt sâu của các chủng vi khuẩn sau xử lý UV.

2.3.6.2 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm

Dựa vào thí nghiệm ở nội dung 2.3.6.1, chọn ra các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm và thử nghiệm hiệu quả diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng (sâu ở giai đoạn tuổi 2). Cây cải 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải thả 10 con sâu tuổi 2. Bố trí các lồng thí nghiệm ở nơi thoáng mát.

Dịch các chủng vi khuẩn pha loãng 1% và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn.

2.3.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki*

2.4.7.1 Xác định môi trường dinh dưỡng phù hợp nhân sinh khối vi khuẩn

Tiến hành khảo sát 4 loại môi trường gồm: Môi trường tinh bột + khoáng. Môi trường khoáng. Môi trường dịch chiết nấm men. Môi trường Glucose (Navon và ctv, 1990).

Nhân sinh khối các chủng vi khuẩn ở bốn loại môi trường ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH ban đầu là 7 và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10⁵ CFU/mL). Sau 48 giờ nuôi cấy đếm và tính mật độ vi khuẩn. Chọn môi trường tối ưu trong quá trình khảo sát.

2.3.7.2 Khảo sát các điều kiện nuôi cấy trong quá trình nhân sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Sau khi chọn được môi trường thích hợp từ nội dung 2.3.7.1, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian, độ pH và nhiệt độ đến tăng sinh khối của các chủng vi khuẩn. Nghiên cứu gồm 4 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm có 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 4 lần.

- Thí nghiệm về thời gian tăng sinh: tăng sinh vi khuẩn trong 24, 36, 48, 60, 72 giờ, với điều kiện nhiệt độ 30°C, pH 7 và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10⁵ CFU/mL), đếm và tính mật độ vi khuẩn.

- Thí nghiệm về pH: các mức pH là 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0, ở nhiệt độ 30°C, 48 giờ tăng sinh và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10⁵ CFU/mL), đếm và tính mật độ vi khuẩn.

- Thí nghiệm về nhiệt độ: các mức nhiệt độ gồm 27°C, 30°C, 33°C, 36°C, 39°C với pH 7, trong 48 giờ và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10⁵ CFU/mL), đếm và tính mật độ vi khuẩn.

2.3.7.3 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh khối vi khuẩn bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm

Xác định điều kiện tối ưu của ba yếu tố thời gian, nhiệt độ và pH từ kết quả sàng lọc thu được và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0, +1). Với ma trận thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm, trong đó có 5 thí nghiệm ở tâm được thiết kế bởi phần mềm Design - Expert® (Del Castillo, 2007).

Hàm đáp ứng được chọn là mật độ vi khuẩn *B.thuringiensis* var. *kurstaki* (CFU/mL), mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc hai: $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$.

2.3.7.4 Đánh giá hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Dựa vào thí nghiệm ở nội dung 2.3.5 và 2.3.6, chọn ra hai chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm và khả năng lên men tối ưu, phối trộn hai

chúng với tỷ lệ 1: 1. Tiến hành thử nghiệm hiệu quả diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng (sâu ở giai đoạn tuổi 2).

Dịch vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập được pha loãng 1% với nồng độ 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL và phun lên các cây cải vào buổi chiều. Nghiệm thức đối chứng phun nước lã. Cây cải được 15 ngày tuổi, có từ 8 – 12 lá được trồng trong chậu đường kính 25 cm. Trên mỗi cây cải thả 10 con sâu tuổi 2. Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 1 yếu tố, 4 lần lặp lại. Theo dõi và đếm số sâu còn sống sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 5 ngày và 7 ngày sau phun dịch vi khuẩn.

2.3.7.5 Khảo sát mức nhiệt độ bảo quản chế phẩm VBt

Nhân sinh khối chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có hiệu lực diệt sâu cao trên môi trường dịch chiết nấm men tạo chế phẩm VBt ở điều kiện nhiệt độ 33°C, pH 7, thời gian lên men là 48 giờ và 1% dịch tăng sinh (với mật độ 10^5 CFU/mL). Chế phẩm VBt được bảo quản ở các mức nhiệt độ 4°C, 25°C và 35°C trong thời gian 12 tháng. Định kỳ hàng tháng tiến hành đếm bào tử để xác định sự hiện diện của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở các điều kiện nhiệt độ.

2.3.8 Khảo sát khả năng tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng hệ thống lên men tự động 2 Lít BioFlo 120

Phương pháp thực hiện: sử dụng 1 lít môi trường dịch chiết nấm men cho vào bình nuôi cấy và hấp tiệt trùng (121°C/20 phút). Lên men ở điều kiện nhiệt độ 33°C, pH 7, tốc độ khuấy 170 vòng/phút, DO 30, không khí 100%, dịch tăng sinh (với mật độ 10^3 CFU/mL). Thí nghiệm được bố trí đơn yếu tố với 3 lần lặp lại và 4 nghiệm thức: Lên men tự động BioFlo 120 với dịch tăng sinh 0,1%, 0,5%, 1,0% và đối chứng Lên men thông thường với dịch tăng sinh 1,0%. Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở 12, 24 và 48 giờ sau lên men.

2.3.9 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện nhà lưới

Tiến hành thử nghiệm chế phẩm vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* lên men bằng hệ thống lên men tự động (gọi tắt là chế phẩm VBt) với đối tượng thử nghiệm: sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng.

Phương pháp bố trí: Mỗi nghiệm thức là một chậu cải với đường kính 20 – 25 cm và thả 10 con sâu/nghiệm thức, chế phẩm được phun 1 lần, lúc sâu tuổi 2. Thí nghiệm được bố trí với 4 lần lặp lại, 4 nghiệm thức: Chế phẩm VBt lên men tự động với liều lượng 1.000 mL/ha, Chế phẩm VBt lên men

thông thường với liều lượng 1.000 mL/ha, Vi-Bt® 32000 WP với liều lượng 1.000 mL/ha và đối chứng phun nước cất.

Chỉ tiêu theo dõi: Số sâu sống, chết trước phun, 1, 2, 3, 5 và 7 ngày sau phun chế phẩm VBt ở tất cả nghiệm thức.

2.3.10 Đánh giá độc tính của chế phẩm VBt trên sâu tơ (*Plutella xylostella*) ngoài đồng ruộng

Qua kết quả thử nghiệm hiệu lực diệt sâu trong điều kiện nhà lưới ở nội dung 2.3.9 tiến hành thử nghiệm ngoài đồng ruộng chế phẩm VBt với đối tượng thử nghiệm là sâu tơ Trung tâm Giống cây trồng, vật nuôi và thủy sản Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên, 4 lần lặp lại, mỗi ô thí nghiệm có diện tích 30 m². Ruộng bố trí thí nghiệm: không phun thuốc BVTV trong 2 vụ. Cây trồng: giống cải bẹ xanh. Thuốc được phun 1 lần, lúc sâu tuổi 2 và mật độ sâu tơ 1 – 3 con/cây (cây cải ở giai đoạn 20 ngày sau trồng) . Phun thuốc vào buổi chiều mát. Lượng nước thuốc: 400 L/ha. Dụng cụ xử lý: phun bằng bình bơm tay đeo vai.

Chỉ tiêu và phương pháp điều tra: Mật số sâu tơ vào các thời điểm: trước khi xử lý thuốc và 1, 3, 5, 7, 14 ngày sau phun thuốc. Mỗi ô thí nghiệm chọn 05 điểm trên đường chéo góc, mỗi điểm điều tra 04 cây.

2.5 Xử lý và phân tích số liệu

Kết quả giải trình tự sẽ được xử lý bằng phần mềm Bioedit (ver 5.20), và so sánh với trình tự gen trên cơ sở dữ liệu Genbank (NCBI). Số liệu thí nghiệm được thu thập tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), kết quả phân hạng theo Duncan bằng chương trình SPSS và phần mềm quy hoạch thực nghiệm Design - Expert 11.0. phần mềm PoloPlus© để thực hiện các phép tính được mô tả trong phân tích probit của Finney (Finney, 1971).

Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân bố vi khuẩn *B. thuringiensis* và chọn lọc vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong đất ở các tỉnh, thành của Việt Nam

3.1.1 Phân bố vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Bảng 3.1 Số mẫu đất có khuẩn lạc theo các nguồn mẫu thu thập

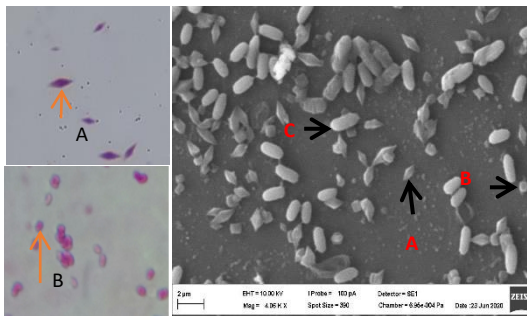
Chỉ tiêu	Đất canh tác	Đất không canh tác				
		Trầm tích	Cát ven biển	Hải đảo	Rừng	Ven đường
Số mẫu có khuẩn lạc nghi ngờ là <i>B. thuringiensis</i>	220	10	5	10	20	20
Số mẫu thu thập	476	20	20	20	40	40
% (*) / Số mẫu thu thập	46,2	50,0	25,0	50,0	50,0	50,0
% (*) / Tổng số mẫu	35,7	1,6	0,8	1,6	3,2	3,2

Số mẫu có khuẩn lạc nghi ngờ là *B. thuringiensis* (*)

Theo Martin và Travers (1989) mẫu đất ở châu Á có chỉ số Bt là 0,85. Ở Việt Nam, Bùi Thị Hương và ctv (2005) cho thấy mẫu đất ở các tỉnh Miền Bắc có chỉ số Bt là 0,35 với các chủng vi khuẩn thuộc loài *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *aizawai*, và var. *morrisoni*. Trong nghiên cứu này, *B. thuringiensis* hiện diện ở các vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam với chỉ số Bt từ 0,2 đến 0,41.

3.1.2 Xác định chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* bằng thử nghiệm sinh hóa

Từ 1.337 khuẩn lạc có đặc điểm hình thái khác nhau đã thu được 285 chủng vi khuẩn có các đặc điểm như hình que, Gram dương, sinh bào tử, catalase dương tính, có khả năng thủy phân tinh bột, phản ứng V.P dương tính. Sau khi nhuộm 261/285 chủng vi khuẩn có tinh thể bất màu đỏ, bào tử có viền màu đỏ. Đa số các chủng vi khuẩn sinh tinh thể hình thoi tập trung ở các mẫu đất canh tác (Bảng 3.2).



Hình 3.1 Tinh thể độc của mẫu vi khuẩn quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) với độ phóng đại 4,06 KX. (A) Tinh thể hình thoi; (B) Tinh thể hình cầu; (C) Tế bào vi khuẩn

Bảng 3.2 Các dạng tinh thể độc của *B. thuringiensis* từ các mẫu phân lập

Địa điểm	Số chủng vi khuẩn sinh tinh thể	Hình dạng tinh thể độc			
		Hình thoi	Hình ovan	Hình cầu	Hình quả trám
Hà Nội	10	-	4	5	1
Vĩnh Phúc	8	5	3	-	-
Thái Bình	7	4	1	1	1
Hải Phòng	3	1	1	-	1
Hải Dương	2	-	1	1	-
Hưng Yên	3	-	1	1	1
Bắc Ninh	3	1	-	2	-
Hà Nam	2	1	1	-	-
Nam Định	3	2	-	1	-
Đà Nẵng	3	3	-	-	-
Quảng Nam	6	2	1	2	1
Bình Thuận	5	3	1	1	
Lâm Đồng	70	29	14	15	12
Đồng Nai	16	10	1	1	4
Bà Rịa – Vũng Tàu	10	5	1	2	2
TP.Hồ Chí Minh	62	34	11	12	5
Tây Ninh	5	3	-	2	-
Tiền Giang	9	5	2	1	1
Bến Tre	30	15	6	5	4
An Giang	1	1	-	-	-
Đồng Tháp	1	1	-	-	-
Kiên Giang	2	1	1	-	-
Tổng số tinh thể	261	126	50	52	33
%/tổng số tinh thể	100	48,3	19,2	19,9	12,6

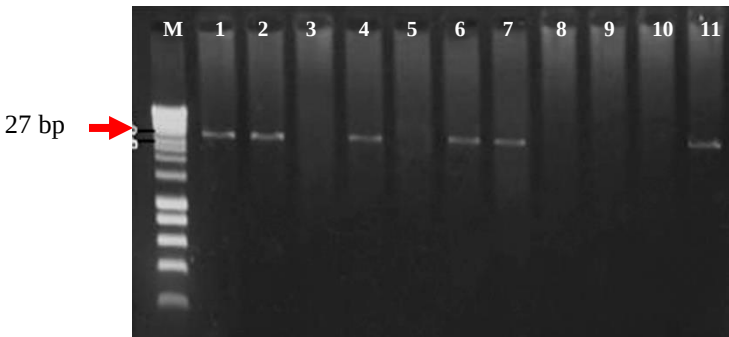
3.2 Xác định sự hiện diện gen *cry* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Kết quả phân tích trình tự các gen thuộc nhóm *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry2Ac*, *cry4* và *cry9* của các mẫu phân lập cho thấy sự tương đồng cao giữa các trình tự này với trình tự DNA mục tiêu. Sự xuất hiện của nhóm gen *cry1* là nhiều nhất (63,3%), kế tiếp là *cry2* (28,7%), *cry4* (6,9%) và ít nhất là *cry9*

(0,1%). Có những chủng vi khuẩn hiện diện cả 4 gen (*cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry9*), 2 đến 3 gen (*cry1* và *cry2*, *cry1* và *cry4*, *cry2* và *cry4*, *cry1* và *cry9*, *cry1*, *cry2* và *cry4*) trong cùng một mẫu.

So với các công bố trong và ngoài nước, nghiên cứu của luận án cho thấy tần suất xuất hiện của gen *cry1*, *cry2* và *cry4* tương đối cao và thường xuất hiện cùng nhau. Gen *cry9* có tần suất xuất hiện tương đối thấp từ 2,6% – 15,5% (Ben Dov và ctv, 1997; Bravo và ctv, 1998; Zhang và ctv, 2000; Wang và ctv, 2003;) và ít xuất hiện cùng gen *cry1* và *cry2*. Ben Dov và ctv (1999) đã phát hiện rằng trong số các mẫu có gen *cry9* thì cũng hiện diện một hoặc cả hai gen *cry1* và gen *cry2*.

3.3 Xác định sự hiện diện gen *vip3a* của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*



Hình 3.2 Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng gen *vip3a*

M thang protein chuẩn 10 – 200 kDa.(Promega); (1) dòng VBt2119.1; (2) dòng VBt21110.1; (3) dòng VBt2751.3; (4) dòng VBt27510.2; (5) dòng VBt2736.2; (6) dòng VBt2735.1; (7) dòng VBt2751.2; (8) dòng VBt26313.2; (9) dòng VBt26311.1; (10) dòng VBt26323.1; (11) đối chứng dương.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy có 5 mẫu (VBt2119.1, VBt21110.1, VBt2735.1, VBt2736.2 và VBt27510.2) có sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 3,4 kb và chỉ xuất hiện 1 băng duy nhất và không có sản phẩm phụ (Hình 3.2). So với các gen gây độc khác như *cry* hay *cyt*, *vip3a* có phổ kháng sâu bệnh và côn trùng rộng hơn. Bên cạnh đó, *vip3a* còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng sâu bệnh và côn trùng ít nhạy cảm với các gen *cry1* hoặc *cry2* (Estruch và ctv, 1996; Lee và ctv, 2003).

3.4 Khả năng gây chết sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập

Từ 261 mẫu vi khuẩn sinh tinh thể đã xác định được 20 chủng vi khuẩn mang gen *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry9* và *vip3a* phân lập ở các tỉnh Vĩnh

Phúc, Lâm Đồng, Thành phố Hồ Chí Minh, Tây Ninh, Tiền Giang và Bến Tre. Một ngày sau xử lý, ghi nhận có sâu chết và tăng dần đến ngày thứ 7 sau xử lý.

Hiệu lực diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu đạt từ 72 – 80%. Một số mẫu vi khuẩn *B. thuringiensis* gen *cry1* và *cry2* có khả năng diệt sâu tơ, sâu khoang và sâu xanh da láng như VBt2119.1 (mẫu phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc mang *cry1*), VBt26317.2 (Lâm Đồng, *cry2*), VBt2735.1 (Tiền Giang, *cry1*), VBt2767.6 (Tây Ninh, *cry1* và *cry2*) là các chủng có hiệu lực gây chết sâu cao.

3.5 Giá trị LC₅₀, LT₅₀ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả thử hoạt tính LC₅₀ trên sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng trong điều kiện phòng thí nghiệm của các chủng vi khuẩn cho thấy hiệu lực diệt sâu ở mật độ bào tử từ 10⁷ CFU/mL cho hiệu lực diệt sâu rất tốt, còn ở mật độ thấp hơn là 10⁵ CFU/mL và 10³ CFU/mL cho hiệu lực thấp nhất. Qua thí nghiệm cho thấy giá trị LC₅₀ của các chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng 2,5 x 10⁵ – 4,5 x 10⁷ CFU/mL và LT₅₀ từ 4 – 5 ngày sau xử lý ở giai đoạn sâu tuổi 2. Ở giai đoạn sâu tuổi 4 LC₅₀ của 4 chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng 1,5 x 10⁶ – 2,5 x 10⁸ CFU/mL và LT₅₀ từ 4 – 5 ngày sau xử lý.

Trong quá trình theo dõi, số sâu còn sống ở các nghiệm thức xử lý vi khuẩn có triệu chứng biếng ăn, giảm khả năng gây hại và chết ở 7 – 14 ngày sau xử lý. Do đó mật độ bào tử tốt nhất gây chết sâu hại là từ 10⁷ CFU/mL trở lên, thuận lợi cho việc sản xuất và sử dụng. Bên cạnh đó, hiệu lực diệt sâu thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi sâu, hiệu quả nhất khi sâu ở tuổi 2.

3.6 Chọn tạo chủng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* kháng tia UV

3.6.1 Khả năng chống chịu tia UV của các chủng vi *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở bước sóng 254 nm và 365 nm

Ở bước sóng 254 nm, sau 30 phút, mật độ bào tử các chủng vi khuẩn giảm, trong đó chủng VBt2119.1 (3,0 x 10² CFU/mL) và VBt2735.1 (2,8 x 10⁵ CFU/mL) giảm mạnh so với các chủng vi khuẩn khác. Khi tăng thời gian chiếu 60 phút, 90 phút và 120 phút, mật độ tất cả các chủng vi khuẩn càng giảm rõ rệt. Ở mức thời gian 60 phút, mật độ bào tử cao nhất ở chủng VBt2762.1 (2,7 x 10⁶ CFU/mL) và thấp nhất ở chủng VBt2119.1 (0,0

CFU/mL). Ở 90 phút có 4 chủng vi khuẩn không có khả năng chống chịu tia UV. Ở 120 phút chỉ còn 3 chủng VBt21110.1 ($5,4 \times 10^3$ CFU/mL), VBt26310.1 ($2,8 \times 10^2$ CFU/mL) và VBt2751 ($4,0 \times 10^3$ CFU/mL) tồn tại. Khi tăng thời gian chiếu tia UV lên 150 phút thì tất cả các chủng vi khuẩn đều chết

Khi chiếu tia UV trong 120 phút ở bước sóng 365 nm, hai chủng VBt2736.2 và VBt2767.6 (0,0 CFU/mL) không có khả năng chống chịu. Các chủng vi khuẩn còn lại có khả năng chống chịu được tia UV, trong đó chủng VBt21110.1 ($6,23 \times 10^4$ CFU/mL), VBt26310.1 ($3,1 \times 10^5$ CFU/mL), VBt2762.1 ($3,8 \times 10^5$ CFU/mL) và chủng vi khuẩn VBt2751 ($6,2 \times 10^4$ CFU/mL) có mật độ cao hơn các chủng còn lại.

Từ kết quả thực nghiệm ba chủng VBt21110.1, VBt26310.1, VBt2751 có khả năng chống chịu tia UV cao được đánh giá hiệu quả gây chết sâu tơ (*Plutella xylostella*).

3.6.2 Hiệu quả gây chết sâu tơ của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kusrtaki* có khả năng chống chịu UV điều kiện phòng thí nghiệm

Bảng 3.3 Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ (*Plutella xylostella*) của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu tơ				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	15,0 bcd	40,0 b	52,5 ab	60,0 b	65,0 b
VBt26310.1ΔUV	7,5 cde	15,0 c	17,5 c	35,0 b	45,0 c
VBt2751ΔUV	10,0 de	17,5 c	30,0 d	45,0 d	50,0 c
VBt21110.1	30,0 a	50,0 a	62,5 a	72,5 a	80,0 a
VBt26310.1	20,0 ab	35,0 b	45,0 b	55,0 b	70,0 b
VBt2751	22,5 abc	32,5 b	47,5 b	62,5 b	77,5 a
ĐC	0,0 e	0,0 d	0,0 e	0,0 e	0,0 d
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	5,4	4,7	8,0	7,8	8,2

Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa;

**: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 mL.

Bảng 3.4 Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang (*Spodoptera litura*) của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu khoang				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	12,5 c	20,0 b	30,0 cd	42,5 d	57,5 c
VBt26310.1ΔUV	10,0 c	17,5 b	22,5 d	35,0 d	50,0 c
VBt2751ΔUV	7,5 cd	15,0 b	20,0 d	25,0 e	32,5 d
VBt21110.1	32,5 a	45,0 a	57,5 a	70,0 a	77,5 a
VBt26310.1	15,0 bc	22,5 b	40,0 bc	52,5 c	67,5 b
VBt2751	22,5 b	42,5 a	50,0 a	62,5 b	72,5 a
ĐC	0,0 d	0,0 c	0,0 e	0,0 f	0,0 e
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	6,3	10,9	10,1	6,3	3,9

Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 mL.

Bảng 3.5 Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV trong điều kiện phòng thí nghiệm

Chủng vi khuẩn	Hiệu quả gây chết (%) sâu xanh da láng				
	1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	5 NSXL	7 NSXL
VBt21110.1ΔUV	12,5 cd	27,5 bc	32,5 bc	37,5 b	52,5 c
VBt26310.1ΔUV	5,0 de	17,5 cd	25,0 bc	35,0 b	47,5 c
VBt2751ΔUV	0,0 e	15,0 d	22,5 c	30,0 b	37,5 d
VBt21110.1	35,0 a	47,5 a	55,0 a	65,0 a	77,5 a
VBt26310.1	20,0 bc	27,5 bc	35,0 b	50,0 b	67,5 b
VBt2751	27,5 ab	37,5 ab	47,5 a	60,0 ab	70,0 ab
ĐC	0,0 e	0,0 e	0,0 d	0,0 d	0,0 e
Mức ý nghĩa	**	**	**	**	**
CV (%)	7,6	3,6	7,1	8,9	7,4

Trong cùng 1 cột, các giá trị có chữ cái theo sau giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSXL: Ngày sau xử lý; Mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL, Đối chứng phun nước cất với liều lượng là 100 mL.

Kết quả cho thấy hiệu quả gây chết sâu khoang và sâu xanh da láng của các chủng vi khuẩn đã được chiếu tia UV ở 7 NSXL khá thấp, chủng vi

khuẩn VBt21110.1ΔUV đạt 57,5% đối với sâu khoang, 52,5% đối với sâu xanh da láng, và 65,0% đối với sâu tơ trong khi chủng VBt2751ΔUV chỉ đạt lần lượt là 32,5% và 37,5% đối với sâu khoang và sâu xanh da láng. Khả năng phát triển và độc tính của vi khuẩn giảm đáng kể, ảnh hưởng đến khả năng diệt sâu sau khi chiếu xạ tia UV ở bước sóng từ 250 đến 380 nm (Setlow, 1994; Mark và ctv, 2000).

3.7 Tối ưu điều kiện lên men của vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

3.7.1 Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh khối vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn VBt21110.1 (mẫu phân lập từ tỉnh Vĩnh Phúc), VBt26310.1 (Lâm Đồng), VBt2751 (Bến Tre) mang gen *cry1*, *cry2*, *cry9* và là những gen độc gây chết cho bộ cánh vảy được thử nghiệm nhân sinh khối với bốn loại môi trường ở điều kiện nhiệt độ 30°C, pH 7 và 1% dịch tăng sinh (10^5 CFU/mL).

Bảng 3.6 Mật số vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở 4 loại môi trường

Thí nghiệm	Mật số vi khuẩn (CFU/mL)		
	VBt21110.1	VBt26310.1	VBt2751
MT 1	$5,4 \times 10^8$ a	$3,3 \times 10^8$ b	$2,1 \times 10^8$ b
MT 2	$5,2 \times 10^7$ c	$7,1 \times 10^7$ d	$3,6 \times 10^7$ d
MT 3	$6,7 \times 10^8$ a	$5,2 \times 10^8$ a	$3,7 \times 10^8$ a
MT 4	$3,1 \times 10^8$ b	$1,6 \times 10^8$ c	$1,5 \times 10^8$ c
Mức ý nghĩa	**	**	**
CV (%)	0,59	0,56	0,64

Sau 48 giờ, mật độ trung bình của ba chủng vi khuẩn trong môi trường 3 (dịch chiết nấm men và các khoáng) đạt khoảng 10^8 CFU/mL, cao hơn so với 3 loại môi trường còn lại (Bảng 3.20). Môi trường 3 được chọn để tăng sinh ba chủng vi khuẩn.

3.7.1.1 Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sinh khối của vi khuẩn

Mật độ của ba chủng vi khuẩn đạt cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy và khác biệt đối với các mốc thời gian còn lại, trong đó chủng VBt21110.1 đạt $6,8 \times 10^8$ CFU/mL, chủng VBt26310.1 đạt $5,3 \times 10^8$ CFU/mL, chủng VBt2751 đạt $5,8 \times 10^8$ CFU/mL. Theo Nguyễn Thị Hoài Hà và Ngô Giang Liên (2003), thời gian sinh trưởng của vi khuẩn *B. thuringiensis* rất ngắn, thời gian càng dài thì sinh khối vi khuẩn nhân lên càng giảm. Kết quả thí nghiệm cho thấy, các chủng vi khuẩn đều sinh trưởng, phát triển tốt và đạt mật độ tối ưu ở thời gian 48 giờ, sau 48 giờ sinh khối bắt đầu giảm nhanh.

Thời gian tối ưu nhân sinh khối các chủng *B. thuringiensis* là 48 giờ, được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.7.1.2 Ảnh hưởng của pH đến sinh khối vi khuẩn

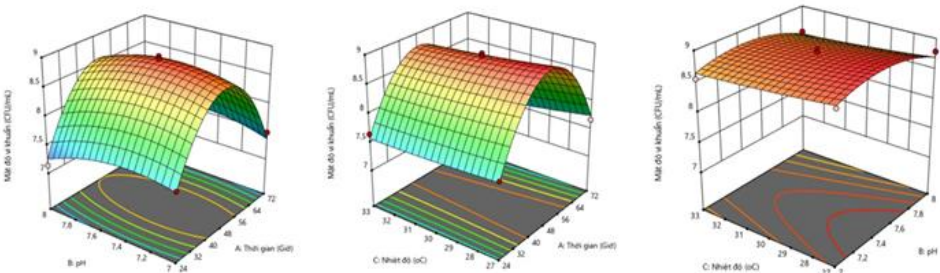
Mật độ vi khuẩn chủng VBt21110.1 đạt giá trị cao nhất là $5,07 \times 10^8$ CFU/mL ở pH 8, nhưng không khác biệt ở pH 7 và 7,5. Mật độ vi khuẩn chủng VBt26310.1 và VBt2735.1 ở pH 7,5 đạt cao nhất lần lượt là $6,1 \times 10^8$ CFU/mL và $4,5 \times 10^8$ CFU/mL, tuy nhiên cũng không khác biệt so với pH 7. Chủng vi khuẩn VBt2751 đạt mật độ cao nhất là $4,4 \times 10^8$ CFU/mL khi nuôi cấy trong môi trường có pH 7. Do đó, pH 7 là điều kiện tối ưu để nhân sinh khối đối với các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

3.7.1.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối của vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn của chủng VBt21110.1 đạt mật độ cao nhất ở 33°C là $6,15 \times 10^8$ CFU/mL. Chủng vi khuẩn VBt2751 ở 36°C có mật độ đạt cao nhất là $6,0 \times 10^8$ CFU/mL, khác biệt với mức 27°C và 33°C. Chủng VBt26310.1 đạt cao nhất $5,5 \times 10^8$ CFU/mL ở nhiệt độ 33°C (Bảng 3.23). Qua đó cho thấy ở nhiệt độ 30 – 36°C là nhiệt độ thích hợp nhân sinh khối các chủng vi khuẩn.

Vi khuẩn *B. thuringiensis* sinh trưởng ở nhiệt độ từ 15°C đến 45°C, nhiệt độ tối ưu 30 – 35°C, nhiệt độ thấp sinh trưởng chậm, nhiệt độ cao từ 35°C đến 40°C sinh trưởng nhanh nhưng chóng lão hóa. Từ đó có thể thấy, nhiệt độ khác nhau thì khả năng nhân sinh khối của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. khác nhau (Ngô Đình Bình và ctv, 2010; Stanford và ctv, 2015).

3.7.2 Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm



a. pH – Thời gian

b. Nhiệt độ – Thời gian

c. Nhiệt độ – pH

Hình 3.3 Bề mặt đáp ứng của từng cặp yếu tố ảnh hưởng đến lên men vi khuẩn.

Các thí nghiệm tăng sinh khối được thực hiện với chủng VBT21110.1 với ba yếu tố thời gian (X_1), pH (X_2), nhiệt độ (X_3) ở ba mức gồm 17 nghiệm thức.

Giá trị F của mô hình là 70,84 tương ứng với $p < 0.0001$ (99,99%), chuẩn F cho sự không tương thích của mô hình là 4,31 ($p=0,0959$), hệ số hồi quy $R^2 = 0,9891 > 0,75$ chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm.

Từ các giá trị thực nghiệm, phương trình hồi quy nhận được như sau:

$$Y = 8,85 - 0,0062X_1 - 0,0662X_2 - 0,0925X_3 + 0,0725X_1X_2 - 0,0550X_1X_3 + X_2X_3 - 1,26X_1^2 - 0,1988X_2^2 + 0,0188X_3^2.$$

3.7.3 Hiệu quả gây chết sâu khi kết hợp hai chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Từ kết quả khảo sát khả năng gây chết đối với sâu hại, kháng tia UV, các yếu tố về môi trường, nhiệt độ, pH, độ ẩm, thời gian nuôi cấy, hai chủng vi khuẩn VBT21110.1, VBT26310.1 được phối hợp thử nghiệm gây chết sâu hại. Tiến hành nhân sinh khối hai chủng vi khuẩn trên trong môi trường dịch chiết nấm men ở các nồng độ 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL, 10^9 CFU/mL thể hiện qua hiệu lực gây chết của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Kết quả thí nghiệm cho thấy hiệu lực diệt sâu ở 10^9 CFU/mL là cao nhất đạt 97,5%.

Hai chủng vi khuẩn VBT21110.1, VBT26310.1 mang gen *vip3a* (VBT21110.1), gen *cry1* (VBT21110.1, VBT26310.1) và gen *cry9* (VBT26310.1) có thể bổ trợ với nhau để phòng trừ sâu hại. Qua kết quả nghiên cứu của các tác giả ngoài nước đã minh chứng *vip3a* còn có khả năng kiểm soát một số đối tượng côn trùng ít mẫn cảm với các gen *cry* như *cry1* hoặc *cry2*, *cry9*, có khả năng hỗ trợ cho việc gây chết các sâu hại có tính kháng các dòng *cry1* (Tabashnik và ctv, 2000; Jain, 2012; Shu và ctv, 2013).

3.7.4 Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ bảo quản đến chế phẩm VBT

Hai chủng vi khuẩn VBT21110.1, VBT26310.1 được tăng sinh trong môi trường lỏng để tạo chế phẩm VBT có khả năng diệt được sâu tơ, sâu khoang, sâu xanh da láng. Mật độ vi khuẩn của chế phẩm VBT khi vừa sản xuất là $7,65 \times 10^8$ CFU/mL. Mật độ vi khuẩn được kiểm tra theo từng tháng bảo quản ở 3 mức nhiệt độ 4°C , 25°C và 35°C trong thời gian một năm.

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nhiệt độ 4°C , 25°C trong thời gian 1 – 6 tháng, và 3 tháng ở nhiệt độ 35°C mật số vi khuẩn giảm không đáng kể. Sau 6 tháng thì vi khuẩn giảm nhiều và mất khả năng diệt sâu. Kết quả nghiên cứu của Moustafa1 và ctv (2018) cho thấy sự giảm 60% độc tính của thuốc Dipel $2 \times 6.4\%$ WP sau khi bảo quản ở $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 12 tuần và khoảng 70% sau

khi lưu trữ dưới ánh sáng mặt trời trong 2 ngày. Do đó vi khuẩn bị ảnh hưởng nhiều vào điều kiện và độ ổn định của nhiệt độ bảo quản, thời gian lưu trữ, cách thức bảo quản khi được lưu trữ trong kho nóng, kệ và lưu trữ ngoài trời.

3.8 Tăng sinh vi khuẩn bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

Khi tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120 (Eppendorf – Đức) mật độ vi khuẩn đạt từ $1,8 \times 10^{14}$ CFU/mL đến $6,2 \times 10^{14}$ CFU/mL vào thời điểm 48 giờ sau lên men, cao hơn nhiều lần so với lên men thông thường trong cùng thời gian. Lượng dung dịch vi khuẩn thu được với khối lượng lớn, thuận lợi cho nghiên cứu và tạo chế phẩm phòng trừ sâu hại.

Bảng 3.7 Mật số vi khuẩn (CFU/mL) sau khi lên men bằng hệ thống lên men tự động 2 lít BioFlo 120

Nghiệm thức	Mật số vi khuẩn (CFU/mL)	
	24 giờ	48 giờ
<i>Lên men tự động, dịch tăng sinh 0,1%</i>	$3,5 \times 10^{12}$ a	$1,8 \times 10^{14}$ a
<i>Lên men tự động, dịch tăng sinh 0,5%</i>	$1,8 \times 10^{13}$ a	$4,7 \times 10^{14}$ a
<i>Lên men tự động, dịch tăng sinh 1,0%</i>	$1,6 \times 10^{13}$ a	$6,2 \times 10^{14}$ a
<i>Lên men thông thường, dịch tăng sinh 1,0%</i>	$2,0 \times 10^8$ b	$4,3 \times 10^8$ b
Mức ý nghĩa	**	**
CV (%)	0,24	0,26

3.9 Hiệu quả của chế phẩm VBt trên sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*) và sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*) trong điều kiện nhà lưới

Hiệu quả phòng trị của các chế phẩm VBt bắt đầu có hiệu lực từ 3 ngày sau phun và tăng cao nhất vào lúc 7 ngày sau phun (hiệu lực dao động khoảng 70,0 – 87,5%). Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cũng cho thấy vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* làm cho sâu bộ cánh vảy thường chết trong vòng 12 giờ đến 120 giờ tùy thuộc vào lượng *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sâu ăn vào (Chilcott và ctv, 1993; Liliana, 2013; Leopoldo Palma, 2014). Do đó, trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 72 giờ là khoảng thời gian vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* có sự tích lũy dần mật số và từ 120 giờ sau khi xử lý thì bắt đầu phát huy hiệu quả gây chết sâu.

Kết quả đánh giá chế phẩm VBt gây chết đối với sâu hại trong điều kiện nhà lưới với hiệu quả tương đối cao (từ 70 – 87,5%), luận án tiến hành

thử nghiệm ngoài đồng đối với sâu tơ gây hại cây trồng tại Thành phố Hồ Chí Minh.

3.10 Hiệu quả của chế phẩm VBt đối với sâu tơ (*Plutella xylostella*) ngoài đồng ruộng

Mật số trung bình sâu tơ tại các nghiệm thức từ 12 đến 15 con/m² và sâu đang số ở giai đoạn tuổi 2 vào thời điểm trước khi phun thuốc. Tại thời điểm 3 và 7 ngày sau phun, mật số sâu ở đối chứng giảm xuống 3 – 5 con/m², mật số sâu ở nghiệm thức chế phẩm VBt và Vi-Bt[®] 32000WP tiếp tục giảm nhanh và khác biệt ở mức rất có ý nghĩa so với đối chứng. Giữa các nghiệm thức phun chế phẩm VBt không có sự khác biệt trong đó mật số sâu tơ thấp nhất là VBt lên men tự động BioFlo 120 (3,3 con/cây), chế phẩm Vi-Bt[®] 32000WP (4,3 con/cây) và cao nhất là VBt lên men thông thường (5,0 con/cây).

Bảng 3.8 Mật số sâu tơ ở các nghiệm thức thí nghiệm

Nghiệm thức	Liều lượng (mL, g/ha)	Mật số sâu tơ (con/cây)				
		TP	1 NSP	3 NSP	5 NSP	7 NSP
NT 1	1.000	14,3	6,0 a	4,0 a	3,3 a	3,3 a
NT 2	1.000	13,5	7,5 a	6,0 b	5,0 b	5,0 b
NT 3	1.000	14,8	7,0 a	5,3 ab	4,8 b	4,3 ab
NT 4	1.000	12,5	13,8 b	15,0 c	16,3 c	14,0 c
Mức ý nghĩa		ns	**	**	**	**
CV (%)			2,1	5,6	8,9	7,9

Trắc nghiệm phân hạng theo phép thử DUNCAN ở mức 5 %; **: khác biệt ở mức rất có ý nghĩa; NSP: Ngày sau phun; NT 1 (Lên men tự động BioFlo 120), NT 2 (Lên men thông thường), NT3 (Vi-Bt[®] 32000 WP) NT 4 (Phun nước cất).

Khi so sánh giữa các nghiệm thức phun chế phẩm (VBt và Vi-Bt[®] 32000WP) với nghiệm thức đối chứng không phun thuốc (NT4) ta nhận thấy sự khác biệt rõ rệt về mật số sâu hại. Các nghiệm thức phun chế phẩm VBt có mật số sâu hại thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng không phun thuốc. Qua đó có thể kết luận được rằng chế phẩm VBt có hiệu lực trong việc phòng trừ sâu tơ gây hại cây cải.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Thông qua kết quả phân tích 616 mẫu đất ở 22 tỉnh, thành đã xác định sự phân bố của vi khuẩn *B. thuringiensis* có 261 chủng sinh tinh thể với các hình dạng tinh thể protein độc như: hình thoi (48,3%), hình ovan (19,2%), hình cầu (19,9%) và hình quả trám (12,6%). Đồng thời cũng đã xác định sự hiện diện gen độc tính của các dòng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* như: gen *cry1* nhiều nhất (63,4%), gen *cry2* (28,7%), *cry4* (6,9%) và ít nhất là *cry9* (1,0%) và có 5 dòng xuất hiện *vip3a*.

Đã xác định 20 chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở 8 tỉnh, thành có độc tính cao là nguồn vật liệu sản xuất chế phẩm sinh học an toàn, thân thiện với môi trường, phù hợp với nông nghiệp hữu cơ. Với giá trị LC_{50} trên 3 đối tượng sâu thí nghiệm của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* trong khoảng $2,5 \times 10^5 - 4,5 \times 10^7$ CFU/mL và LT_{50} từ 4 đến 5 ngày sau xử lý ở giai đoạn sâu tuổi 2. Ở giai đoạn sâu tuổi 4 LC_{50} trong khoảng $1,5 \times 10^6 - 2,5 \times 10^8$ CFU/mL và LT_{50} từ 4 đến 5 ngày sau xử lý.

Bên cạnh đó, đã xác định được ba chủng vi khuẩn VBt2110.1ΔUV, VBt26310.1ΔUV và VBt2751ΔUV có khả năng chống chịu tia UV tốt nhất ở bước sóng 254 nm và 365 nm với thời gian ở mức 120 phút. Hiệu quả phòng trừ sâu hại của ba chủng vi khuẩn đạt từ 52,0% đến 65,0%, có tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ sinh học sâu hại lá trên cây rau.

Điều kiện tối ưu để tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* là trong môi trường dịch chiết nấm men và khoáng với điều kiện nhiệt độ 28°C, pH 7,5, sau 48 giờ nuôi cấy. Hiệu quả diệt sâu tơ ngoài đồng ruộng trên cây cải tại Thành phố Hồ Chí Minh của chế phẩm VBt đạt 79,6% vào thời điểm 7 ngày sau phun.

2. Đề nghị

Có thể áp dụng điều kiện tăng sinh vi khuẩn *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ở quy mô lớn hơn để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ cho phòng trừ sâu hại.

Tiếp tục đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trên các loài sâu bộ cánh vảy và hai cánh gây hại rau ở các vùng trồng rau của Thành phố Hồ Chí Minh và các tỉnh. Mở rộng đối tượng đánh giá hiệu quả của chế phẩm VBt trên các đối tượng sâu hại và các loại cây trồng khác.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

Các bài báo khoa học

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Châu Thanh Phong, Trần Thị Mộng Xinh, Trần Thị Anh Thương, Phạm Nhật Quỳnh, Trần Thị Hồng Nhung, Đoàn Thị Thùy Linh và Lê Đình Đôn, 2017. Phân lập và đánh giá độc tính đối với côn trùng gây hại của *Bacillus thuringiensis* phân lập từ mẫu đất. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*. 6: 23 – 27, (ISSN 2354 – 0710).

Trương Phước Thiên Hoàng, **Dương Kim Hà**, Tôn Bảo Linh, Lê Đình Đôn Trần Thị Hồng Nhung, Đặng Thị Thủy và Huỳnh Nguyễn Chí Linh, 2019. Xác định gen cry2 trong mẫu vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phân lập tại các tỉnh thành khu vực miền nam Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 18(1): 106 – 116. (pISSN 2615 – 9503, eISSN 2615 – 949X)

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Trần Thị Kim Oanh, Trần Thị Hồng Nhung và Lê Đình Đôn, 2019. Xác định gen Vip3A trong vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* bằng kỹ thuật sinh học phân tử và độc tính gây bệnh đối với côn trùng gây hại. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 4 : 33 – 38. (ISSN 2354 – 0710)

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Lê Hoàng Phúc, Nguyễn Khoa Thảo, Nguyễn Vũ Phong và Lê Đình Đôn, 2021. Chọn chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* kháng UV có khả năng diệt sâu tơ. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, (ISSN 2354 – 0710).

Dương Kim Hà, Trương Phước Thiên Hoàng, Đồng Hắc Thanh Thi, Nguyễn Thị Lệ Thương, Võ Thị Thúy Huệ, Nguyễn Vũ Phong, Lê Đình Đôn. 2021. Tối ưu hóa điều kiện lên men tăng sinh vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* phân lập ở Việt Nam bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*.

Bài Hội thảo

Dương Kim Hà, Ton Bao Linh, Trương Phước Thiên Hoàng, Trần Thị Kim Oanh, Nguyễn Bảo Quốc và Lê Đình Đôn, 2018. Generation gene toxic of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by PCR and SDS-PAGE method (Poster). 1st INDO – ASEAN Conference on Innovative Approaches in Applied Sciences and Technologies. **The Journal of Agriculture and Development**.

Dương Kim Hà, Trần Thị Kim Oanh, Trần Thị Hồng Nhung, Trương Phước Thiên Hoàng, Nguyễn Bảo Quốc và Lê Đình Đôn, 2019. Xác định mẫu *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* có hoạt tính sinh học dựa vào VIP3A. Hội thảo Quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam. *Nhà Xuất bản Nông nghiệp*, 43 – 48. ISBN 978-604-60-2664-8.