Phần C.
KẺ THÙ TỰ NHIÊN CỦA DỊCH HẠI: VAI TRÒ VÀ ĐẶC ĐIỂM ỨNG DỤNG

Chương VI
CÁC TÁC NHÂN GÂY BỆNH CÔN TRÙNG

Côn trùng thường bị chết bởi các loại bệnh khác nhau do nhiều loài vi sinh vật gây nên như vi khuẩn, nấm, virus, nguyên sinh động vật, tuyến trùng,...Trong đó thì bệnh do các vi sinh vật gây ra là chủ yếu, chiếm khoảng 80 – 90%. Vì thế khi nói về bệnh côn trùng thì người ta thường hiểu ngay là do các vi khuẩn, nấm và virus. Bệnh côn trùng thường thể hiện hàng loại những đặc tính khác nhau, đặc điểm chung nhất của bệnh côn trùng là nó làm chết rất nhiều cá thể trong một đợt, làm chấm dứt sự sinh sản hàng loạt, điều đó đã hạn chế được sự lây lan của các lứa sâu hại tiếp theo trong tự nhiên. Khoa học nghiên cứu bệnh côn trùng gọi là bệnh lý học côn trùng. Bệnh lý học côn trùng không chỉ đơn thuần miêu tả những biến đổi bệnh lý bên trong cơ thể côn trùng mà còn nghiên cứu tác nhân gây dịch bệnh, cũng như nghiên cứu các đặc điểm cơ bản và những diễn biến của vi sinh vật gây bệnh ở bên trong và cả phía ngoài cơ thể ký chủ.

Triệu chứng bệnh côn trùng:

Cá thể côn trùng bị bệnh thường khác với cá thể khoẻ bởi hàng loạt triệu chứng bên ngoài là do côn trùng có những thay đổi về mặt sinh lý và bệnh lý của các mô. Những thay đổi bên ngoài có thể nhận thấy được gọi là triệu chứng bệnh. Triệu chứng đặc trưng nhất là thay đổi về sự vận động của côn trùng. Sự vận động của chúng còn tuỳ theo mức độ phát triển của bệnh. Khi côn trùng bị bệnh do các vi sinh vật gây ra thì trong cơ thể của nó dần dần bị phá huỷ từng phần, lúc đầu chúng vận động chậm chạp, về sau ngừng hẳn và nằm im một chỗ cho đến khi chết.

Quá trình lây nhiễm và nguyên nhân gây bệnh của vi sinh vật trên côn trùng:

Thông thường với các loại bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn thì chúng lan truyền bằng đường ruột thông qua con đường thức ăn. Nhưng đối với nguồn bệnh do nấm thì chủ yếu lại là do sự tiếp xúc trực tiếp với nhau hay qua trung gian truyền bệnh. Trung gian có thể là những loài ký sinh hay côn trùng ăn thịt hoặc không khí.

Nguyên nhân gây bệnh vi sinh vật trên côn trùng:

- Vi sinh vật phải có mặt trong mọi trường hợp của bệnh ở côn trùng và có thể phân lập dòng thuần chủng các vi sinh vật đó trên môi trường nhân tạo.
- Khi dùng dạng vi sinh vật thuần khiết để gây bệnh nhân tạo thì có thể gây được loại bệnh tương tự.
- Phải chứng minh được sự có mặt của vi sinh vật trong cơ thể côn trùng thí nghiệm nghĩa là khi thử lại hoạt lực sinh học của vi sinh vật đó trên côn trùng trong điều kiện thích hợp thì vi sinh vật đó tái xuất hiện trở lại.

- Muốn cho vi sinh vật xâm nhập vào cơ thể ký chủ trở thành vi sinh vật gây bệnh thì chúng phải có tác động về mặt hoá học hay cơ học lên ký chủ và gây bệnh cho ký chủ. Trong các tác động hoá học có hoạt tính thấp nhất là những quá trình mà ở đó vi sinh vật chỉ lấy một phần thức ăn của ký chủ (cơ thể côn trùng) và chúng tiết ra các sản phẩm trao đổi chất với một lượng nhất định đối với côn trùng. Ảnh hưởng của các sản phẩm trao đổi chất thường được thể hiện rất rõ đối với nấm ở cuối giai đoạn hình thành bào tử.

I. NHÓM VIRÚT CÔN TRÙNG

1. Khái quát chung về virút côn trùng

Virút gây bệnh côn trùng là một nhóm tác nhân sinh học có nhiều triển vọng trong phòng chống côn trùng hại cây trồng. Bệnh virút hại côn trùng được mô tả sớm hơn bệnh virút hại thực vật. Bệnh virút hại côn trùng đầu tiên do Cornalia và Maestri mô tả vào năm 1856 chính là bệnh tằm nghệ (mặc dù bệnh này được biết từ trước đó rất lâu). Các tác giả này là những người đầu tiên phát hiện thấy các thể đa diện trong cơ thể tằm bị bệnh, còn Bolle vào năm 1898 là người đầu tiên phát hiện thấy khi hoà tan thể vùi trong ruột tằm sẽ giải phóng ra các thể nhỏ. Komarek & Breindl vào năm 1923 đã khẳng định bản chất virút của bệnh tằm nghệ và bệnh thối nhũn ở sâu róm *Lymantria monacha*. Tuy nhiên, người đầu tiên nhìn thấy các virút gây bệnh côn trùng lại là Bergold với các nghiên cứu công bố từ năm 1943 đến năm 1947. Sau đó trên thế giới xuất hiện hàng loạt các công trình nghiên cứu về virút gây bệnh cho côn trùng, đặc biệt sau khi có kính hiển vi điện tử (dẫn theo P.V. Lầm 1995).

Virút gây bệnh cho côn trùng (hay virút côn trùng) chỉ có khả năng sống, sinh sản ở trong các mô, tế bào sống, không thể nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng nhân tạo. Virút côn trùng có đặc điểm nổi bật là tính chuyên hóa hẹp, chỉ gây bệnh cho côn trùng và chỉ xâm nhiễm ở những mô nhất định của vật chủ. Virút côn trùng có thể tạo thành thể vùi như NPV, CPV, GV, EPV hoặc không tạo thành thể vùi như Iridovirus, Densovirus, Baculovirus trần (Jayaraj,1985; Ramakrishnan,1985).

Cho tới giữa thập kỷ 1980, người ta đã phân lập và mô tả được hơn 700 bệnh virút từ hơn 800 loài côn trùng thuộc nhiều bộ khác nhau. Hiện nay các virút côn trùng được xếp thành 7 họ sau: Baculoviridae, Reoviridae, Iridoviridae, Poxviridae, Parvoviridae, Picaviridae và Rhabdoviridae (Chukhrij 1988; Jayaraj 1985). Hai họ Baculoviridae và Reoviridae có nhiều loài là những tác nhân rất triển vọng của BPSH. Tuy nhiên, các virút côn trùng đã được nghiên cứu ứng dụng chủ yếu thuộc các nhóm Nuclear Polyheadrosis Virus/NPV, Grannulosis Virus/GV, Cytoplasmis Polyheadrosis Virus/CPV.

+ Nhóm NPV: nhóm virút côn trùng này thuộc họ Baculoviridae, có thể vùi là khối đa diện và chúng ký sinh trong nhân tế bào vật chủ. Vì vậy nên gọi nhóm NPV là virút đa diện ở nhân. Thể vùi của virút là vỏ protein bao bọc các phần thể virút gọi là virion. Các virion của NPV có hình que. Trong thể vùi đa diện chứa nhiều virion hình que (dẫn theo P.V. Lầm, 1995).

Sâu bị bệnh do NPV trở nên ít hoạt động, ngừng ăn. Cơ thể có màu sắc sáng hơn sâu khoẻ. Cơ thể sâu bị bệnh trở nên căng phồng, trương phù, chứa toàn nước. Khi có tác động cơ giới lên bề mặt cơ thể thì chúng dễ bị vỡ, giải phóng dịch virút. Các sâu bị bệnh do NPV khi chết đều treo ngược trên cây (trừ khi bị chết do NPV xâm nhiễm ở tế bào thành ruột).

Nhóm NPV ký sinh trong tế bào hạ bì, thể mỡ, khí quản, huyết tương và biểu mô ruột giữa. Nhóm NPV có tính chuyên hóa cao, sau nhóm GV. Thường NPV của loài côn trùng nào thì chỉ gây bệnh cho loài đó. Riêng loài *Baculovirus heliothis* có thể gây bệnh cho 7 loài sâu xanh thuộc giống *Helicoverpa* (Ignoffo et al., 1981- dẫn theo P.V. Lầm, 1995).

Đến cuối thế kỷ 20 đã ghi nhận được bệnh do NPV ở côn trùng thuộc 7 bộ như bộ cánh cứng Coleoptera, hai cánh Diptera, cánh màng Hymenoptera, cánh vảy Lepidoptera, cánh mạch Neuroptera, cánh thẳng Orthoptera và cánh nửa Hemiptera (Chukhrij, 1988).

+ Nhóm GV: gồm các virút côn trùng thuộc họ Baculoviridae, có thể vùi là dạng hạt. Vì vậy nên gọi nhóm NPV là virút hạt. Mỗi thể vùi chỉ chứa một virion hình que (ít khi chứa 2 virion).

Sâu bị bệnh do GV thường biểu hiện còi, chậm lớn, cơ thể phân đốt rõ ràng, tầng biểu bì cơ thể trở nên sáng màu, đôi khi có phớt màu hồng, huyết tương màu trắng sữa.

Virút hạt thường xâm nhiễm mô mỡ, tế bào lớp hạ bì và huyết tương. Virút hạt có tính chuyên hóa cao nhất trong các virút côn trùng. Virút hạt phân lập từ sâu hại nào chỉ gây bệnh cho loài sâu hại đó. Đến cuối thế kỷ 20, mới ghi nhận được virút hạt chỉ gây bệnh cho côn trùng bộ cánh vảy Lepidoptera, chưa thấy côn trùng thuộc các bộ khác bị bệnh do GV.

+ Nhóm CPV: virút côn trùng nhóm này thuộc họ Reoviridae, có thể vùi là khối đa diện và chúng ký sinh trong chất dịch tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. Vì vậy nên gọi nhóm CPV là virút đa diện ở dịch tế bào. Trong thể vùi của CPV chứa các virion hình cầu (Bergold, 1947- dẫn theo P.V. Lầm, 1995).

Sâu bị bệnh do CPV thường biểu hiện chậm lớn, đôi khi đầu quá to so với cơ thể. Màu sắc cơ thể sâu bị bệnh vào giai đoạn cuối của sự phát triển bệnh lý trở nên có màu sáng giống như phấn trắng, đặc biệt ở mặt bụng cơ thể. Sâu bị bệnh thường tạo thành khối u trên cơ thể.

Nhóm CPV ký sinh trong chất dịch tế bào ở các tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. Virút đa diện ở dịch tế bào có phổ ký chủ rộng. Sự lây lan của bệnh tăng lên do sự lây truyền qua ký chủ khác loài. Đã ghi nhận được bệnh do CPV ở các loài côn trùng thuộc các bộ cánh cứng Coleoptera, hai cánh Diptera, cánh màng Hymenoptera, cánh vảy Lepidoptera và cánh mạch Neuroptera.

2. Danh lục virút côn trùng được sử dụng

Cho tới giữa thập niên 1980, trên thế giới đã phân lập và mô tả được hơn 1270 bệnh virút từ các loài côn trùng thuộc nhiều bộ khác nhau. Hầu hết (70%) các côn trùng bị bệnh virút đã ghi nhận được là thuộc bộ cánh vảy. Tại Việt Nam đã mô tả, chụp ảnh để phân biệt được 4 loài virus nhân đa diện và một loài virus hạt (N.V. Cảm và CTV, 1996; Chukhrij,1988; Coppel et al., 1977; Faulkner et al., 1985; Jayaraj,1985; Van Driesche et al., 1996). Dưới đây là một số virút côn trùng đã được nghiên cứu sử dụng ở nhiều nước trên thế giới (bảng 6.1).

Bảng 6.1. Những virút côn trùng đã được nghiên cứu sử dụng để trừ sâu hại

TT	Tên virút	Tên sâu hại là vật chủ	Loại cây trồng
1	NPV-Ha	*Helicoverpa armigera* (7 loài sâu xanh)	Bông, rau, đậu đỗ
2	CPV-Ha	*Helicoverpa armigera*	Bông, rau, đậu đỗ
3	NPV-As	*Agrotis* (=*Scotia*) *segetum*	Bông, rau, đậu đỗ
4	GV-As	*Agrotis* (=*Scotia*) *segetum*	Bông, rau, đậu đỗ
5	NPV-Od	*Ocneria dispar*	Cây ăn quả
6	GV-Pr	*Pieris rapae*	Rau họ hoa thập tự
7	NPV-Op	*Orgyia pseudosugata*	Cây ăn quả
8	NPV-Tn	*Trichoplusia ni*	Rau, đậu đỗ
9	NPV-Hc	*Hyphantria cunea*	Cây ăn quả
10	NPV-Ms	*Mythimna separata*	Lúa, ngô
11	NPV-Sl	*Spodoptera litura*	Rau, đậu đỗ
12	NPV-Se	*Spodoptera exigua*	Bông, rau, đậu đỗ
13	NPV- Sf	*Spodoptera frugiperda*	Bông, rau, đậu đỗ

14	NPV-Ac	*Autographa californica*	Rau, đậu đỗ
15	GV-Lp	*Laspeyresia pomonella*	Cây táo
16	GV-Po	*Phthorimea operculella*	Khoai tây
17	CPV-Dp	*Dendrolimus punctatus*	Cây thông
18	GV-Of	*Ostrinia furnacalis*	Ngô
19	GV-Ab	*Andraca bipunctata*	Chè
20	NPV-Ns	*Neodiprion sertifer*	Thông
21	NPV-Gh	*Gilpinia* (=*Diprion*) *hercyniae*	Thông

3. Vai trò của virút côn trùng

Kết quả nghiên cứu ở Thái Lan cho thấy NPV là nguyên nhân gây chết tự nhiên chủ yếu của sâu đo xanh *Trichoplusia ni* trên cải bắp. Tại Ấn Độ, sâu xanh *H. armigera* trên bông thường bị chết bệnh do NPV với tỷ lệ 6,9-24,5%. NPV được đánh giá là tác nhân sinh học quan trọng trong kìm hãm số lượng sâu xanh *H. armigera* ở Trung Quốc, Hoa Kỳ, Philippine (Bilapate, 1988; Coppel et al., 1977; Navasero và nnk, 1993; Tipvadee, 1983).

Kết quả điều tra cho thấy các virút nêu trên có mặt thường xuyên trong quần thể các loài sâu hại. Ở điều kiện miền Bắc Việt Nam chúng phát sinh gây bệnh cho côn trùng từ tháng 4 - 9 hàng năm. Sâu đo xanh *Anomis flava* hại đay thường bị nhiễm bệnh do NPV khá cao vào tháng 6 - 7 hàng năm. Tỷ lệ chết do NPV của sâu đo xanh đạt khoảng 11-54% và 8-68% tương ứng tại Thọ An (Hà Tây) và Châu Giang (Hưng Yên). Sâu khoang *Spodoptera litura* trên lạc bị chết bệnh do NPV khá cao, có khi tới 50-60%. Trên bông ở phía Nam (Ninh Thuận, Đồng Nai) virút NPV là yếu tố gây chết tự nhiên trên sâu xanh khá quan trọng. Tỉ lệ sâu xanh bị chết bệnh tự nhiên do NPV đạt 9-10%. Tại Đắc Lắc, nhiều khi sâu xanh bị chết ở tự nhiên do NPV đạt tới 16%. Sâu keo da láng *Spodoptera exigua* trên hành tây ở Ninh Thuận bị bệnh do NPV, chết với tỷ lệ không cao thường chỉ khoảng 0,4-16,6% (N. V. Cảm và CTV,1991; N. T. Hai, 1996; N. T. Hồng,1995; P.H. Nhượng, 1996; N. T. Sơn,1998).

4. Đặc điểm ứng dụng

Đặc điểm sử dụng chế phẩm sinh học phụ thuộc vào cơ chế tác động của chế phẩm và ảnh hưởng của điều kiện ngoại cảnh đến hoạt tính của các sinh vật trong chế phẩm. Chế phẩm sinh học từ virút côn trùng nói chung và từ NPV, CPV, GV nói riêng đều có cơ chế tác động đường ruột. Các thể virút trần hoặc thể vùi của virút cùng thức ăn xâm nhập qua miệng vào ruột côn trùng. Tại ruột, dưới tác động của dịch tiêu hoá, thể vùi bị hoà tan và giải phóng các virion. Qua biểu mô ruột giữa virion xâm nhập vào dịch máu, đi tới các tế bào. Khi tiếp xúc với các tế bào, chúng xâm nhập vào bên trong các tế bào để sinh sản và gây bệnh cho sâu hại. Phần lớn các virút nhóm NPV, GV có tính chuyên hóa cao, do đó chế phẩm sinh học từ các virút này thường có phổ tác động hẹp đến rất hẹp. Mặt khác, các chế phẩm virút côn trùng nói chung, chế phẩm NPV bị mất hoạt tính dưới tác động của sóng ngắn và tia cực tím. Như vậy, để sử dụng chế phẩm sinh học từ virút có hiệu quả cao trong phòng chống côn trùng hại cần lưu ý một số điểm sau đây:

- Phun đều chế phẩm virút côn trùng lên bộ phận cây là thức ăn ưa thích của loài côn trùng hại cần phòng trừ, tạo điều kiện cho chúng có thể ăn được thức ăn nhiễm virút càng nhiều càng tốt. Khi côn trùng hại ăn được nhiều thức ăn nhiễm virút vào trong ruột thì khả năng bị nhiễm bệnh sẽ càng cao.

- Để hạn chế đến mức tối thiểu tác động không tốt do bước sóng ngắn và tia cực tím của mặt trời gây ra thì cần phun các chế phẩm sinh học từ virút côn trùng vào

buổi chiều mát. Ngay chiều tối hôm phun hoặc sáng hôm sau, sâu hại ăn thức ăn đã được phun chế phẩm virút côn trùng chưa bị tác động của mặt trời.

- Đồng thời, khi sử dụng chế phẩm virút côn trùng có thể trộn thêm một số phụ gia như sữa bột, sữa lọc béo, nước rỉ đường, dầu thực vật sau và than hoạt tính nhằm làm giảm tác động xấu của ánh nắng mặt trời đối với chế phẩm virút côn trùng.

- Nên sử dụng những chủng virút địa phương để sản xuất chế phẩm sinh học để trừ sâu hại. Trong trường hợp như vậy sẽ làm tăng khả năng thích ứng của virút với điều kiện ngoại cảnh nơi ứng dụng.

- Để khắc phục phổ tác động hẹp của chế phẩm từ NPV và GV, có thể hỗn hợp vài loại virút với nhau hoặc hỗn hợp với Bt nhằm làm tăng phổ tác động của chế phẩm (cùng lúc trừ được nhiều loài sâu hại).

- Có thể sử dụng chế phẩm virút côn trùng để trừ côn trùng hại theo hai cách:

+ Phun chế phẩm virút côn trùng nhằm cung cấp nguồn bệnh ban đầu để tự tích luỹ trên đồng ruộng. Theo cách này, vào đầu vụ gieo trồng, chế phẩm virút côn trùng được phun vài lần với lượng không nhiều khi mật độ loài côn trùng hại cần phòng trừ đạt mức thấp đủ để chúng có thể tự lây nhiễm được bệnh. Theo thời gian trong vụ, nguồn virút côn trùng sẽ tăng lên và tỷ lệ sâu hại bị nhiễm bệnh virút cũng gia tăng theo sự gia tăng số lượng của loài hại.

+ Phun tràn ngập chế phẩm virút côn trùng như dùng thuốc hóa học trừ sâu. Theo cách này, khi loài côn trùng hại đạt mật độ quần thể cao, có khả năng gây hại lớn thì tiến hành phun chế phẩm virút côn trùng. Khi đó phun với liều lượng lớn hơn lượng cần thiết nhằm cung cấp nguồn bệnh tối đa, tạo điều kiện cho sâu hại bị nhiễm bệnh nhanh nhất với tỷ lệ cao nhất để áp đảo sâu hại. Do đó, sau khi phun chế phẩm vài ngày sẽ đạt được hiệu quả nhất định trong tiêu diệt loài sâu hại cần phòng trừ.

Tuỳ theo đối tượng sâu hại và ý nghĩa kinh tế của chúng mà chọn một trong hai cách sử dụng chế phẩm nêu trên sao cho hợp lý mà vẫn cho hiệu quả cao.

- Không sử dụng chế phẩm virút côn trùng trong điều kiện nhiệt độ thấp. Khi ở nhiệt độ thấp thời gian ủ bệnh của sâu hại sẽ kéo dài, sâu hại vẫn có thể tiếp tục gây hại được.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Anh chị hiểu gì về vi rút côn trùng ?

2. Nêu vai trò và đặc điểm ứng dụng virút côn trùng để phòng chống sâu hại cây trồng ?

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Nguyễn Văn Cảm, Hoàng Thị Việt. Bệnh thối nhũn của sâu đo xanh và hiệu quả sử dụng chúng trong phòng trừ sinh học sâu đo xanh hại đay. Tạp chí BVTV, 5:31-37. 1991.
2. Nguyễn Văn Cảm, Hoàng Thị Việt. Huger A.M. Một số Baculovirus gây bệnh trên sâu hại thuộc bộ Lepidoptera ở Việt Nam. Sach: Tuyển tập công trình nghiên cứu biện pháp sinh học phòng trừ dịch hại cây trồng, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 17-23. 1996.

3. Chukhrij M.G. Biologia Baculovirusov i vius txitoplazmatichexkovo poliedroza. Kishinhev. 1988.
4. Coppel H.C., J.W. Mertins. Biological Insect Pest Suppression. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 1977.
5. Faulkner P., Boucias D.G. Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of Baculoviruses. In: Biological control in agricultural IPM systems (ed. by Hoy et al.). Academic Press, Inc. pp.263-281. 1985.
6. Nguyễn Thị Hai. Nghiên cứu đặc điểm sinh học, sinh thái của một số loài sâu hại chính và thiên địch trên cây bông ở Đồng Nai và Ninh Thuận. Tóm tắt luận án Tiến sĩ nông nghiệp, Hà Nội , 24 tr. 1996.
7. Nguyễn Thị Hồng . Sâu keo da láng và bệnh thối nhũn của chúng ở vùng Ninh Thuận. Tạp chí BVTV, 4: 36-38.1995.
8. Jayaraj S. History and development of microbial control. In: Microbial control and pest management. TNAU, p. 16-21. 1985.
9. Phạm Văn Lầm. Biện Pháp sinh học phòng chống dịch hại Nông nghiệp. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội. 1995.
10. Phạm Hữu Nhượng. Nghiên cứu sử dụng biện pháp sinh học trong phòng trừ sâu hại bông. Sách: Kết quả nghiên cứu khoa học (1976-1996). Nxb Nông nghiệp, Tp HCM, tr.88-107. 1996.
11. Ramakrishnan N. The use of Baculoviruses and cytoplasmic viruses for pest suppression. In: Microbial control and pest management. TNAU, p. 60-75. 1985.
12. Ngô Trung Sơn. Nghiên cứu sử dụng HaNPV trong phòng trừ tổng hợp sâu xanh hại bông tại Ninh Thuận. Tóm tắt luận án Tiến sĩ nông nghiệp, Hà Nội , 24 tr. 1998.
13. Van Driesche R.G. and Bellows T.S.J. Biological control. Chapman & Hall. New York. 1996.

II/ NHÓM VI KHUẨN

1. Vi khuẩn gây bệnh côn trùng

Giữa thế kỷ XIX, Louis Pasteur (1822-1895) nghiên cứu thực nghiệm thành công trong phòng chống bệnh tằm gai. Trong quá trình nghiên cứu bệnh gai trên tằm L. Pasteur (1870) đã phát hiện ra vi khuẩn được đặt tên là *Bacillus bombyces* có „nhân sáng“ trong tế bào. Đây chính là các tinh thể độc có bản chất protein của loài vi khuẩn này với tên gọi chính xác là *Bacillus thuringiensis.* Sau này các nhà khoa học đã xác định được vi khuẩn gây bệnh thối ấu trùng ong châu Âu là *Bacillus alvei (*năm 1885), trên tằm ở Nhật Bản *Bacillus sotto* (năm 1901)...

1. Đặc điểm chung vi khuẩn gây bệnh côn trùng

Là các giống hình thành bào tử (sporeformers) như *Bacillus, Clostridium* và các giống không thành bào tử (nonsporeformers) như *Pseudomonas, Streptococcus*, *Serratia, Xenorhabdus* và *Photorhabdus.*

Kích thước 1-2 µm (micromet hay 1 phần nghìn milimet), nặng khoảng 1-2 pg (picogam hay 1 phần triệu gam), chỉ có thể nhìn thấy bằng kính hiển vi.

Hình dạng:

Bacillus: Trực khuẩn hình que sinh bào tử, hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, sản sinh catalaza

Clostridium: Trực khuẩn hình que sinh bào tử, phần lớn kỵ khí, không sản sinh catalaza

Pseudomonas: Vi khuẩn hình que với 1 hay 1 chùm lông roi ở 1 đầu, có khả năng sinh oxidaza, không lên men ở môi trường Hugh và Leifson

Serratia: Vi khuẩn hình que ngắn, tạo sắc tố màu tỏ tía sẫm không tan trong nước nhưng tan trong cồn

2. *Bacillus thuringiensis*

Trong các loài vi khuẩn thì loài *Bacillus thuringiensis* (Bt) được sử dụng nhiều nhất.

Hình thái bào tử: hình que, 3-6 X 0,8-0,9 µm, gram dương (không mất màu nhuộm khi tẩy bằng i ốt hay cồn), đứng riêng rẽ hay thành chuỗi, xung quanh cơ thể có tiêm mao dài 6-8 µm. Trưởng thành mỗi tế bào có 1 bào tử hình trứng và 1 tinh thể độc hình quả trám. Căn cứ vào khả năng hình thành loxitinaza, cấu trúc tinh thể, khả năng gây bệnh cho các loài côn trùng và đặc tính huyết thanh học người ta chia Bt thành các chủng (varieties) khác nhau.

Các chủng quan trọng: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) sử dụng phòng chống (*Culex* and *Aedes*). *Loài Bacillus sphaericus* được sử dụng trong phòng chống muỗi sống trong nước ô nhiễm (*Culex*, *Anopheles*, *Aedes)*

Bacillus thuringiensis subsp. *tenebrionis* phòng chống (Bọ cánh cứng khoai tây)

3. Độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*:

Dựa vào cơ chế tác động diệt côn trùng người ta xác định được 4 loại độc tố của Bt:

a/ Nội độc tố δ endotoxin, còn gọi là tinh thể độc/Crystal - cry I, cry II, cry III, cry IV. Các loại tinh thể này chuyên tính cho các bộ côn trùng khác nhau:

cryI – Chuyên tính bộ Cánh vẩy Lepidoptera

cryII - Chuyên tính bộ Lepidoptera và bộ Hai cánh Diptera

cryIII - Chuyên tính bộ Cánh cứng Coleoptera

cryIV - Chuyên tính bộ Hai cánh Diptera

Năm 1955, C.L. Hannay và P. C. Fitz James xác định được bản chất protein có liên quan đến độc tính của vi khuẩn. Tinh thể độc có kích thước lớn 1 µm x 0,5 µm chiếm 30% khối lượng khô của vi khuẩn. Tinh thể dễ thấy khi nhuộm bằng

dung dịch Fuchsin cacbonic đặc, xanh Victoria, khi đó có màu sẫm còn bào tử không có màu nhưng có mép sáng. Quan sát tốt hơn nếu sử dụng kinh hiển vi đối pha (Phase-contrast microscope).

Tinh thể có hình quả trám như 2 kim tự tháp úp vào nhau, trên bề mặt có các luống nổi lên cách nhau 29 nm.

Bản chất hóa học của tinh thể: Trong tinh thể độc có trên 1 180 loại axit amin, trong đó có 2 loại chiếm tỷ lệ cao nhất là axits glutamic, và axit asparaginic. Trong tinh thể có chứa lượng khá lớn 5 nguyên tố như C, N, H, O, S. Ngoài ra còn chưa lượng nhỏ 19 nguyên tố khác nhưng không có P. Các phân tử có khối lượng lớn (>800.000) có độc tính còn loại có khối lượng nhỏ (10.000<) thì không có độc tính.

Tinh thể độc được coi là 1 loại tiền độc tố (Protoxin), được hoạt hóa trong ruột côn trùng hình thành nên các phân tử độc tố với khối lượng 50.000.

Tinh thể bền vững với nhiệt độ cao so với độc tố ở dạng hòa tan. Chẳng hạn tinh thể *B. thuringiensis* var. *Sotto* ở 65^0C sau 1 giờ vẫn còn hoạt tính trong khi ở dạng khác sẽ mất hòan toàn độc tính. Không tan trong dung môi hữu cơ. Gần đây các nhà khoa học Mỹ đã phân lập được 72 chủng Bt trừ sâu non bộ cánh vẩy, trong đó có những chủng có độc lực cao hơn 20 lần thuốc trừ sâu (dẫn theo Phạm Thị Thùy, 2004).

Trong sản xuất, để thu được nhiều tinh thể người ta đã sử dụng các nguyên liệu chứa protein như khô đậu tương, bột cá ... đưa vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn.

Vi khuẩn hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ 30^0C với lượng thông khí lớn. Nhiệt độ 15^0C trở xuống không hình thành bào tử. Khi bào tử và tinh thể hình thành thì thành tế bào sẽ bị phân giải.

Tác động của tinh thể lên côn trùng là rất phức tạp. Tác động điển hình là làm liệt đường ruột và xoang miệng. Sau khi ăn tinh thể 1-7 giờ tằm dâu (*Bombyx mori*) bị liệt toàn thân. Các tế bào thượng bì biến đổi. Sau ăn 1 phút, tinh thể đã xuất hiện tại thượng bì ruột giữa sâu xanh bướm cải (*P. brassicae*). Một số tế bào bị tách rời, biến hình, các chất bên trong chảy ra ngoài màng (như trên sâu đục thân ngô, *Ostrinia nubinalis* và nhiều loài khác). Làm tăng tính thẩm thấu Kali và đã chứng minh tăng K^+ trong máu và bạch huyết là nguyên nhân tê liệt đường ruột và toàn thân tằm dâu. Liều gây chết 50% (LD 50) đối với tằm dâu và bướm cải từ 0,60 – 5 µg/g sâu.

Sự thay đổi tác động của tinh thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Chẳng hạn, bình thường, khi vào ruột trước và ruột giữa, nếu pH cao (>7.0) và cơ thể không có cơ chế giải độc, tinh thể sẽ vỡ ra làm nhiễm độc máu. Hiện tượng thấy phổ biến trên tằm, sâu róm, bướm cải.... Tuy vậy trong nhiều trường hợp khi tinh thể độc vỡ ra, một số loài sâu có cơ chế tự giải độc, ngừng ăn, pH đường ruột giảm xuống, sau một thời gian nhất định đường tiêu hóa được hồi phục. Trong khi đó, nhiều loài côn trùng sản sinh ra men chuyển Protoxin của tinh thể thành độc tố.

Đã ghi nhận trên 200 loài cánh vẩy bị tinh thể độc tấn công mạnh.

Cách đặt tên gene tinh thể của *Bacillus thuringiensis* (Bt) và phổ tác động trên côn trùng của chúng như sau:

Gene + Protein của chủng Bt như:

cryI CryI kurstaki (HD-1) aizawai sotto Lepidoptera

cryII CryII kurstaki (HD-1) kurstaki (HD-263) Lepidoptera and Diptera (muỗi)

cry IIIA CryIIIA tenebrionis Coleoptera (chrysomelids) cryIIIB CryIIIB japonensis Coleoptera (scarabaeids)

cry IV CryIV israelensis Diptera (muỗi và ruồi đen)

Phổ tác động lên ký chủ chính được ghi thêm bằng chữ La mã. Chẳng hạn, CryI và CryII chỉ protein chuyên cho Lepidoptera và Diptera/Lepidoptera. Còn gene hoặc protein có thể phân biệt bởi chữ cái (cryIA hoặc CryIA) để chỉ sự khác biệt trình tự của amino acid. Sự khác biệt nhỏ được ghi theo các chữ thường, như cryIA(a) hoặc CryIA(a).
Các động vật có vú không bị ngộ độc khi ăn phải tinh thể là do chất Pepsin trong ruột động vật (hoạt động thích hợp khi pH = 2) đã làm mất tính độc của tinh thể vi khuẩn. Đã ghi nhận độc lực của Bt đối với kiến và tuyến trùng.

b/ Ngoại độc tố α exotoxin, còn được gọi là *phospholipaza*. Thực chất đây là 1 loại men liên quan đến sự phân hủy phospholipit dẫn đến côn trùng chết. Cho đến nay, tác động của độc tố này là ít ỏi, ngoài nhóm ong Tenthredinidae do có độ pH của ruột phù hợp.

c/ Ngoại độc tố β exotoxin, còn gọi là ngoại độc tố bền nhiệt. Chúng có khối lượng phân tử thấp (707-850). Sau 15 phút ở nhiệt độ 120^0C vẫn còn hoạt tính. Chúng tác động lên côn trùng làm cản trở việc tổng hợp ARN thông tin. Chúng còn có tác động cộng hưởng với nội độc tố, sau khi nội độc tố phá hủy biểu bì ruột giữa, chúng nhanh chóng xâm nhiễm vào huyết tương và máu đi đến các cơ quan làm thay đổi quá trình trao đổi chất và làm cho côn trùng chóng chết. Pu Zhelong (1994) ghi nhận khả năng mẫn cảm của 34 loài côn trùng đối với β exotoxin.

d/ Ngoại độc tố γ exotoxin, còn gọi là độc tố tan trong nước. Chúng có khối lượng phân tử thấp từ 200-2000, có một số axit amin tự do, tan trong nước, mẫn cảm với ánh sáng và đặc biệt mất hoạt lực trong 15 phút ở nhiệt độ 60^0C trở lên.
Cho tới nay Bt được sử dụng rất rộng rãi để phòng chóng sâu hại do những ưu điểm như hoạt tính trừ sâu cao, dễ sử dụng và đặc biệt là an toàn nông sản. Tuy vậy, Bt cũng bộ lộ một số điểm yếu như:
- Kém bền vững so với thuộc trừ sâu hóa học dưới tác động của môi trường
- Giảm hoạt tính trong nước và trong môi trường hữu cơ do bị hấp phụ
- Sự gia tăng đáng kể tính kháng Bt của côn trùng hại. Từ năm 1983 đã chứng minh nhiều loài côn trùng kháng được Bt. Khả năng kháng tăng nhanh nếu sử dụng Bt liên tục.

4. Sản xuất chế phẩm Bt

Có 2 phương pháp sản xuất chế phẩm Bt là lên men xốp và lên men chìm (Phạm Thị Thùy, 2004).

a/ Lên men xốp

Đây là công nghệ ít được sử dụng hiện nay do hiệu quả thấp và trong quá trình sản xuất hay gặp sự nhiễm tạp.

Trong công nghệ cần sử dụng các hạt rắn với yêu cầu không hấp thụ dinh dưỡng. Người ta cũng có thể sử dụng các loại hạt làm nguồn dinh dưỡng cho vi khuẩn như cám lúa mì, bột ngô…

b/ Lên men chìm

Hiệu quả cao và có thể sản xuất lượng sinh khối lớn theo yêu cầu.
Các yếu tố quan trong trong công nghệ bao gồm:
- Chọn lọc chủng Bt chuẩn có các protein độc tố đặc chủng có hoạt tính cao để nhân, căn cứ vào týp huyết thanh
- Chọn môi trường phù hợp để tạo ra nhiều bào từ và tinh thể độc nhất. Để giảm giá thành, người ta thường sử dụng các phụ phẩm nông nghiệp, công nghiệp chế biến. Việc nghiên cứu sự phù hợp của từng môi trường lên men với từng chủng

vi khuẩn được tiến hành chặt chẽ. Thành phần các môi trường lên men của một số nước được trình bày tại bảng 6.2.

Bảng 6.2. Thành phần môi trường lên men được sử dụng để sản xuất Bt của một số nước ((dẫn theo Phạm Thị Thùy, 2004)

Tên nước	Thành phần môi trường	Tác giả
Mêhicô	Rỉ đường, bột đậu tương, bộ ngô, CaC03 + H20	Roldan và CS, 1988
Hàn Quốc	Bột cá, bột đậu tương, cám đỏ, bã vừng, gạo, cám	Yoon và CS, 1987
Trung Quốc	Cám lúa mì, trấu, bột chanh, bánh đậu tươngloại dầu hoặc bánh hạt bông loại dầu, cám lúa mì hoặt bột ngô	Husey và Tínley, 1981; Ưangta0, 1988
Nigiêria	Bột sắn lên men, ngô, đậu đũa	Ejiofa và Okager, 1989
Brazin	Phụ phẩm của công nghiệp giấy và gỗ thêm tinh bột tan	Moscardi, 1988
Ấn Độ	Bột chanh hoặc bột đậu tương thêm tinh bột tan hoặc rỉ đường	Mumgatti va Raghunathan, 1990

Ở Việt Nam sản xuất Bt đã được thực hiện tại một số cơ sở như Viện Công nghiệp thực phẩm, Công ty Vi sinh tp Hồ chí Minh… từ những năm 1989-1996 theo phương pháp lên men chìm, phần lớn các chủng sản xuất là từ nước ngoài (Phạm Thị Thùy, 2004).

Trong quá trình sản xuất, ngoài việc chọn các chúng có độc tính cao, khả năng tạo sinh khối lớn, các yếu tố sau đây cần có sự quan tâm thích đáng:

- Chế độ thông gió: 0,5-0,6 m^3 môi trường/1 m^3 không khí
- Nhiệt độ: 29-30^{0}C
- Tránh thóa hóa giống: Sau khi lên men 10-15 lần cần thay chủng Bt mới đảm bảo chất lượng
- Chú ý tránh nhiễm thực khuẩn thể
- Đánh giá kết quả thông qua:

+ Mật độ bào tử, số lượng tinh thể độc δ endotoxin biểu thị bằng đơn vị quốc tế (IU) theo tiêu chuẩn E-61 của Viện Pastuer (Pháp), đạt 16000 IU hoặc 32000 IU, hoặc Tiêu chuân Việt Nam 3-10 tỷ bào tử/1 gam chế phẩm;

+ Chất khô 7-10%

+ pH 7-7,5

+ Hiệu lực diệt sâu 70-90% sau 7 ngày

+ Bảo quản được trong 12 tháng

Đối với dạng lỏng: khi kết thúc quá trình lên men, đem hỗn hợp với các chất phụ gia, chất bám dính, chất chống thối để tạo chế phẩm. Chế phẩm sau khi tách có độ ẩm 85% và hiệu suất 100 kg/m^3 dịch nuôi cấy với lượng bào tử 20.10^9/g.

Đối với dạng khô: sản phẩm được tách nhờ máy ly tâm, làm khô bằng đông lạnh hoặc xây khô trong máy sấy phun hoặc lý tâm vắt sau đó trộn với các phụ gia như bột, lactoza, thạch tín, cao lanh… Khi đóng gói, hàm lượng chất khô tiêu chuẩn đạt 7-10%.