

LIÊN HIỆP CÁC HỘI KHOA HỌC & KỸ THUẬT VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC

BÁO CÁO TỔNG HỢP
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHCN NĂM 2003 – 2005

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG
MỘT SỐ CHỦNG VI NẤM *METARHIZIUM* & *BEAUVERIA*
ĐỂ PHÒNG TRỪ CÔN TRÙNG TRONG ĐẤT HẠI CÂY TRỒNG

Chủ nhiệm đề tài: TS.Tạ Kim Chinh

Hà Nội, tháng 6 năm 2006

THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

Tính pháp lý của đề tài:

- Hợp đồng giao nhiệm vụ cho Trung tâm Nghiên sản xuất các chế phẩm sinh học, thực hiện đề tài số 206/HĐ-LHH, tháng 4 năm 2003 của Liên hiệp Hội

- Quyết định số 200/QĐ-LHH, ngày 10 tháng 4 năm 2003 của LHH V/V giao chỉ tiêu kế hoạch Nhà nước năm 2003: Phê duyệt thuyết minh nội dung và tổng dự toán đề cương đề tài nghiên cứu.

- Đề tài được duyệt tổng dự toán là: 300.000.000đ (ba trăm triệu đồng).

- Thời gian thực hiện: Hai năm đầu, từ tháng 1/2003 đến tháng 12/2004. Năm thứ ba từ tháng 2 đến tháng 12 năm 2005.

- Kinh phí: Đề tài đã chi tiêu theo đúng các khoản mục như đã được duyệt trong các “Dự toán khối lượng, theo chỉ tiêu vốn cấp” hàng năm của Liên HH và đã thanh, quyết toán xong của từng năm, theo đúng chế độ kế toán, tài chính của Bộ TC đã ban hành. Kinh phí được cấp: Tổng cộng là 220.000.000đ (hai trăm hai mươi triệu đồng), trong đó:

+Năm 2003 là 60.000.000đ (sáu mươi triệu đồng)

+Năm 2004 là 80.000.000đ (tám mươi triệu đồng)

+Năm 2005 là 80.000.000đ (tám mươi triệu đồng)

Đội ngũ cán bộ thực hiện đề tài:

TT	Họ và tên	Nội dung chính tham gia, (ĐT)	Cơ quan công tác	Số tháng làm việc cho ĐT
A	Tạ Kim Chính.TS. Sinh học	Chủ nhiệm	TT NC SX các chế phẩm SH	12
B	Cán bộ tham gia, thực hiện ĐT			
1	Nguyễn Đức Khảm.PGS. TS.	0Quản lý	GĐ.TT NC SX các chế phẩm SH	3
2	Hoàng Như Thục. Ks	Kế toán.	TT NC SX các chế phẩm SH	6
3	Hồ thị Loan.Cử nhân CNSH	Thực hiện	TT NC SX các chế phẩm SH	12
4	Nguyễn Hà Chi .CN.CNSH	Thực hiện	TT NC SX các chế phẩm SH	12
5	Nguyễn Thuý Hằng.CN.CNSH	Thực hiện.	TT NC SX các chế phẩm SH	12
6	Hoa Thị Minh Tú. Ths. SH	Cộng tác	Viện CNSH. Viện KH&CNVN	12

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

TT	Chữ viết tắt	
1	TT NC SX	Trung tâm nghiên cứu sản xuất
2	SH	Sinh học
3	Ma	<i>Metarhizium anisopilae</i>
4	Bb	<i>Baeverria bassiana</i>
5	KHCN	khoa học công nghệ
6	BT	bào tử
7	TBVTVHH	thuốc, bảo vệ thực vật hoá học
8	ĐK	đường kính
9	ĐKKL	đường kính khuẩn lạc
10	RĐ, D ĐT, BBK, BXP	rỉ đường, dầu đậu tương, bột bồ kết, bột xà phòng
11	S	Sabouraud
12	CD	chuyên đề
13	ĐK	điều kiện
14	ST, PT	Sinh trưởng, phát triển

MỞ ĐẦU

I. SỰ CẦN THIẾT PHẢI NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI:

Việt Nam là một nước đới có khí hậu nóng và ẩm, thích hợp cho nhiều loài côn trùng phát triển. Hàng năm, thiệt hại về mùa màng do côn trùng gây ra là rất lớn (chiếm khoảng 1/3 tổng sản lượng lương thực mỗi năm). Trong mùa màng, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hoá học để khống chế các nạn dịch bệnh và sâu hại đã tỏ ra có hiệu quả. Nhưng mặt trái của thuốc hoá học đã gây ra những hậu quả khôn lường cho sức khoẻ con người và môi trường sinh thái. Các nhà khoa học đã thấy rằng trong tự nhiên, các loài côn trùng cũng thường mắc các bệnh dịch do vi rút, vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm mốc gây ra. Trong đó nhiều chủng thuộc nhóm nấm Hyphomycetes (*Metarhizium anisopliae*, *Paecylomyces farinosus*, *Baeuveria bassians*, *Verticillium leccani*, vv....) có khả năng diệt các loại côn trùng nhất là côn trùng cánh cứng [8]. Từ đó, người ta đã biết lợi dụng những hiện tượng này và những đặc tính sinh học có lợi (các chủng vi nấm này có khả năng ký sinh trên cơ thể côn trùng và hoại sinh trong đất)[4] của của vi nấm để tạo ra những chế phẩm sinh học như một loại thuốc hoá học bảo vệ thực vật và như những nhân tố trong môi trường sinh thái để khống chế những tác hại do các loài côn trùng gây ra cho mùa màng [14].

Từ thực trạng trên, đã mở ra hướng hoạt động KHCN giai đoạn 2001-2005 cho Trung tâm TTNC SX các chế phẩm Sinh học. Năm 2003 - 2004 tập thể cán bộ nghiên cứu khoa học của TT đã thực hiện đề tài KHCN: “*Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chủng vi nấm Metarhizium anisopliae và Beauveria bassian để phòng trừ côn trùng trong đất hại cây trồng*”.

II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Vi nấm là vi sinh vật có vai trò quan trọng đối với thực tiễn đời sống và sản xuất. Nhiều loài vi nấm có hại là các đối tượng nghiên cứu trong lĩnh vực

gây bệnh cho người, động vật và cây trồng (một số chủng trong hai chi *Penicillium* và *Aspergillus*)[4]. Nhưng không thể không kể đến các loài vi nấm có ích trong lĩnh vực phòng trừ côn trùng gây hại bảo vệ mùa màng (Các chủng nấm trong các chi *Metarhizium*, *Baeuveria*, *Peacilomyces*, *Verticillium*vv...)[1].

Trên thế giới, từ năm 1815, nhà nấm học Agstino Bassi đã phát hiện thấy một số côn trùng bị bệnh do nấm trắng *Muscardin* gây ra. Ông đã mô tả, tìm ra điều kiện lây bệnh bằng lan truyền và cũng giới thiệu biện pháp phòng trừ. Sau Bassi ngày càng có nhiều công trình sử dụng nấm để phòng trừ sâu hại. Oduen (1837) cho rằng nấm trắng *Muscardin* không chỉ có trên tằm mà còn có thể dùng để phòng trừ các côn trùng khác[8]. Luis Pasteur là[1] Người đã thành công trong công nghệ “lên men rượu”, đồng thời cũng là người tìm ra hiện tượng tằm bị chết hàng loạt do nấm trắng *Beauveria bassiana* gây ra, theo Trung quốc gọi là bệnh tằm voi hay còn gọi là “Bạch cương tằm”. Cùng trong thời gian đó, nhà nấm học người Nga Metschnhikov cũng phát hiện thấy bọ cánh cứng hại lúa mì (*Anisophia austriaca*) chết hàng loạt do một loài nấm xanh (*Entomophthora*, hiện nay chính là nấm xanh *Metarhizium anissopliae*) gây ra. Ông đã cùng học trò của mình, nghiên cứu sản xuất bào tử thuần khiết của chủng nấm này và thử nghiệm diệt sâu non bọ đầu dài (*Boxthrinoderes punctiventris*) hại củ cải đường. Từ những năm 80 và 90 của thế kỷ 20 trên thế giới đã có một số chế phẩm sinh học sản xuất từ chủng nấm xanh *Metarhizium anissopliae* & *Baeuveria* mang các tên thương phẩm như Metaquino, Biolusta và Boverin, để phòng trừ côn trùng hại cây trồng[14].

Cho đến những năm cuối thế kỷ 20 và vài năm đầu thế kỷ 21 này, chủng nấm xanh *Metarhizium anissopliae* và nấm trắng *Beauveria bassian* vẫn được các nhà khoa học thế giới tập trung nghiên cứu theo các hướng: Phân lập tuyển chọn chủng [1;11], khả năng sinh bào tử trần [1], khả năng sinh các enzym ngoại bào [10], khả năng sinh độc tố [1], ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật hoá học [7], ảnh hưởng của tia tử ngoại [6;3], ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy[1] vv đến sinh trưởng, phát triển

của các chủng *Metarhizium anisopliae* & *Beauveria bassiana* và hiệu lực diệt côn trùng [1;8;9;12]. Những nghiên cứu đã cho thấy đây là hai chủng nấm có hiệu lực diệt côn trùng mạnh nhất, với phổ tác dụng rộng nhất [12]. Ngày nay các chủng vi nấm diệt côn trùng còn được nghiên cứu ở mức độ phân tử, nhằm tạo ra những chủng giống có hoạt tính sinh học cao nhất và ổn định trong sản xuất chế phẩm[2].

Ở Việt nam, từ những năm 70 của thế kỷ 20, các nghiên cứu được thực hiện ở các trường Đại học, các Viện và trung tâm như: Viện Lâm nghiệp, Viện Bảo vệ thực vật Viện Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia và Trung tâm NC mới- Viện KH Thủy lợi. Các nghiên cứu mang tính chất cơ bản về sinh học của các chủng nấm *Metarhizium* & *Baeoveria* đã tiến hành tại Viện CNSH- Viện KH & CN Việt nam, trong chương trình cấp Nhà nước “*Những vấn đề cơ bản trong sinh học, giai đoạn 1996- 2000 và 2001 – 2005*” Những kết quả NC ứng dụng chủ yếu sử dụng các chủng nấm mang từ nước ngoài về. Chỉ từ sau những năm 90 của thế kỷ 20, các nghiên cứu mới đi sâu theo hướng phân lập, tuyển chọn, tạo chế phẩm và ứng dụng phòng trừ một số côn trùng gây hại [1.]. Sang những năm đầu của thế kỷ này (200 -2005), đã có một vài công trình về tuyển chọn và nâng cao hoạt tính sinh học các chủng vi nấm diệt côn trùng theo phương pháp kết hợp giữa vi sinh truyền thống và sinh học phân tử [2]. Các nghiên cứu ứng dụng gần đây nhất cũng chỉ tập trung trên đối tượng côn trùng ăn hại lá [12]. Tuy nhiên trong thế giới côn trùng còn có cả hệ côn trùng trong đất như ấu trùng bọ hung đen (*Allisonotum impressicolle*), ấu trùng xén tóc và loài mối hại mía (*Odontotermes formosanus*), sâu xám hại rau, bọ hà hại cây có củ.v. v... Từ tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước và từ thực trạng ô nhiễm môi trường sinh thái ở nước ta, chúng tôi đã thực hiện đề tài trên. Nhằm đưa ra một giải pháp hữu hiệu cho việc sử dụng chế phẩm sinh học để phòng trừ sâu hại. Trọng tâm là phòng trừ côn trùng trong đất hại cây trồng cạn.

III. MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU:

1. Nhằm đưa ra bộ sưu tập các chủng nấm Ma và Bb, có đặc tính sinh học chuyên về hiệu lực phòng trừ mối và côn trùng trong đất hại cây trồng cạn
2. Tạo chế phẩm dạng bột và dạng phân bón từ các chủng nấm có hiệu lực diệt côn trùng cao nhất.
3. Đưa ra qui trình kỹ thuật sử dụng chế phẩm MATP và BBTP, phòng trừ mối và côn trùng trong đất hại cây trồng, đạt hiệu quả cao.

IV. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Nguyên liệu, Hoá chất và dụng cụ:

+ Cơ chất chitin là vỏ mai cua, da châu chấu và cơ chất protein là casein. Cách điều chế mai cua và da châu chấu theo Tạ Kim Chính, 1996[1].

+ Các hoá chất chuyên dụng là thành phần trong môi trường nuôi cấy giống nấm ban đầu, mua từ các hãng Merck và Sigma.

+ Các nguyên liệu có nguồn gốc tinh bột (gạo, cám ngô, trấu v.v...) và các nguyên liệu làm chất bám dính (rỉ đường, bột đậu tằm, bột xà phòng, bột bồ kết...), mua ngoài thị trường.

+ Một số dụng cụ và thiết bị cơ bản: Máy đo pH; Kính hiển vi quang học Olympus

Máy lắc New Brunsch N.I.USA (4000 vòng/phút); Tủ cấy vô trùng (VN); Nồi khử trùng - Trung quốc

+ Các chủng nấm:

*Chủng chuẩn để so sánh do Phòng thí nghiệm CHLBB Đức (Viện Đấu tranh Sinh học) cung cấp: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok DSM 63547; *Baeuveria bassiana* (Bals.) Vuill IMB 7389

*Chủng phân lập từ mẫu côn trùng chết tự nhiên, từ đất và từ các nguồn mmẫu khác nhau, được ký hiệu: Chủng nấm xanh: Ma1; Ma2; Ma3; Ma5; Ma0M5; MaRN; MaLC; Ma96KC; Ma93C; Ma94C; Chủng nấm trắng: Bb1; Bb2; Bb82KC; Bb23C

* Côn trùng kiểm định Ấu trùng tằm(*Bombyx mori L.*); Ấu trùng bọ hung đen(*Allisonotum impressicolle*); Rệp sáp hại cà phê; Sâu xám hại rau cải, Châu chấu hại lúa(*Locusta migratoria maniensis*); Rầy nâu hại lúa; Sâu róm thông(*Dendrolimus punctatus Walker*), do phòng côn trùng Viện BVTV cung cấp; Mối(*Odontotermes hinanesis Ligh*), do Nguyễn Đức Khảm định tên

- Phương pháp nghiên cứu:

*Phân lập và thuần khiết vi nấm diệt côn trùng, theo Tạ Kim Chính, 1996[1]

* Phân loại các chủng nấm *Metarhizium* và *Baeuveria* thuộc nhóm nấm Hyphomycets, theo Bùi Xuân Đông 1982[4]

*Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới chất lượng chủng giống ban đầu(thành phần MT nuôi cấy, ảnh hưởng của chiếu tia UV, của thuốc BVTVHH, của sau thời gian bảo quản, của chất bán dính), theo tạ Kim Chính, 1996[1].

* Nghiên cứu hiệu lực diệt côn trùng của bào tử nấm *Metarhizium* & *Baeuveria*, theo Zimmerman, 1992[14] và chế phẩm nấm MATP&BBTP, theo Tạ Kim Chính, 1996[1]

V. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU:

1 - Tuyển chọn và nghiên cứu tạo chủng vi nấm *Metarhizium* & *Beauveria* có hoạt tính sinh học ổn định với hiệu lực diệt côn trùng cao.

2 - Nghiên cứu ảnh hưởng của một số nhân tố trong môi trường nuôi cấy.

+ Ảnh hưởng của nguồn chitin thô (vỏ tôm, cua) bổ sung trong môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh bào tử của nấm

+ Ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật hoá học đến khả năng nảy mầm và khả năng phân giải chitin, protein của nấm

+ Ảnh hưởng của việc chiếu tia tử ngoại đến khả năng sống sót của nấm

3- Lựa chọn nguyên liệu phù hợp cho lên men bề mặt và nguyên liệu làm chất bám dính để tạo các công thức chế phẩm.

+ Ảnh hưởng của thành phần môi trường lên men xộp đến chất lượng chế phẩm

+ Ảnh hưởng của chất bám dính là dầu thực vật đến một số đặc tính sinh học

4- Xây dựng các công thức chế phẩm

5 - Khảo sát hiệu lực diệt côn trùng của chế phẩm MATP và BBTP

+ Những thí nghiệm trong phòng

+ Những khảo nghiệm chế phẩm ngoài đồng ruộng.

VI. NHỮNG KẾT QUẢ ĐÃ ĐẠT ĐƯỢC:

VI.1. Phân lập và tuyển chọn chủng

Từ các nguồn mẫu khác nhau (mẫu đất, mẫu bệnh côn trùng chết ngoài tự nhiên) và từ bộ sưu tập vi nấm diệt côn trùng của Phòng thí nghiệm Trung tâm, đã tuyển chọn được 18 chủng nấm thuộc hai chi *Metarhizium* (11 chủng), *Beauveria* (7 chủng) có hiệu lực diệt được nhiều loài côn trùng. Có nhiều phương pháp khác nhau để tạo ra chủng có các hoạt tính sinh học ổn định và hiệu lực diệt côn trùng cao, phục vụ cho mục đích sản xuất chế phẩm sinh học. Đó là nuôi cấy nấm trên môi trường có nguồn dinh dưỡng đặc biệt hoặc đột biến chọn lọc chủng bằng hoá chất [5;7], bằng chiếu tia tử ngoại UV [6] và bằng phương pháp sinh học phân tử [2]. Nhưng phương pháp đơn giản

nhất mà nhiều tác giả trên thế giới đã áp dụng là thử trực tiếp trên hàng loạt đối tượng côn trùng để tìm phổ tác dụng của nấm [8;9]. Trên cơ sở này người ta đã tìm ra các chủng nấm (*M. anisopliae* và *B. bassiana*) có tác dụng phòng trừ đối với nhiều loài côn trùng nhất mà cho tới nay chưa có chủng nấm nào bằng [1].

Trong số 18 chủng nấm đã phân lập và tuyển chọn, chúng tôi cũng sử dụng phương pháp đơn giản và đã chọn được các chủng (Ma5, MaRN, Ma0M5, MaLC, Ma3C, Ma4C, Bb1 và Bb2) có phổ tác dụng rộng đối với một số côn trùng gây hại (bảng 1).

VI. 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số nhân tố tới chất lượng các chủng nấm

Các chủng nấm sau khi đã tuyển chọn và xác định là có hiệu lực diệt côn trùng, được tiếp tục nghiên cứu đặc điểm sinh học, nhằm tạo ra những chủng sản tốt nhất cho mục đích sản xuất chế phẩm. Vi nấm diệt côn trùng thường truyền bệnh bằng sự lây bệnh từ con ốm sang con khoẻ, qua va chạm, tiếp xúc trực tiếp với nhau. Hay bệnh truyền cùng với thức ăn nhiễm bệnh [1]. Tác nhân truyền bệnh là những bào tử nấm của các chủng nấm, hay có thể là những bào tử nấm trên thân côn trùng này, nhờ gió bay đi và rơi vào cơ thể côn trùng khác. Từ đó bào tử nấm nảy mầm, hệ sợi nấm phát triển tới mức phủ kín các lỗ thông hơi trên cơ thể côn trùng [1].

Đã có nhiều công trình nghiên cứu về hiệu lực phòng trừ côn trùng bằng bào tử nấm [8]. Các chế phẩm sản xuất từ các chủng nấm *Metarhizium* & *Baeuveria* chứa tới 90% bào tử trong thành phần chế phẩm. Do đó trong quá trình nhân nuôi các chủng nấm để tạo chế phẩm, có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh bào tử (nhiệt độ nuôi cấy, pH môi trường, thành phần dinh dưỡng, độ ẩm và độ thoáng khí vv..).