



HIỆU QUẢ TRỪ MỘT SỐ SÂU HẠI RAU CỦA CÁC HỖN HỢP VI SINH VẬT DIỆT CÔN TRÙNG

Lê Tất Đạt¹, Nguyễn Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Hữu Hoàn¹, Phạm Thị Dệt²,
Trần Thị Anh Đào³, Văn Mỹ Tiên³, Phạm Thế Hải^{1,*}, Nguyễn Trường Giang²

¹ GREEN LAB, Trung tâm Nghiên cứu Khoa học sự sống (CELIFE) và Bộ môn Vi sinh vật học,
Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

² Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học Công nghệ cao (HIBIOTEK),
314 Minh Khai, Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

³ Công ty TNHH Bảo Minh Châu, 43/1 Bùi Quang Là, Gò Vấp, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Phạm Thế Hải <phamthehai@vnu.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 1-2-2021; Ngày chấp nhận đăng: 11-5-2021)

Tóm tắt. Hiện nay nhu cầu sản xuất rau an toàn đòi hỏi việc sử dụng các chế phẩm sinh học thay thế các chất hóa học trong phòng trừ sâu hại. Các chế phẩm sinh học (đa số bản chất vi sinh vật) để trừ sâu đã được phát triển chủ yếu đều dựa trên hoạt tính của các đơn chủng nên phổ tác dụng còn hẹp. Do đó, chúng tôi thử nghiệm tạo một số hỗn hợp chứa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* PAM32 (Bt), nấm *Metarhizium anisopliae* PAM23 và nấm *Beauveria bassiana* PAM21 và đánh giá khả năng diệt một số loại sâu hại rau khác nhau của các hỗn hợp này cũng như tìm hiểu tác dụng cộng gộp của các chủng. Các hỗn hợp vi sinh vật đã có hiệu quả cao diệt sâu xanh (*Helicoverpa armigera*, tuổi 3) (diệt 85% số sâu sau ba ngày) và giòi đục lá (*Liriomyza sativae*) (giảm 70% số lá cây cà chua bị giòi hại ngoài thực tế). Sự có mặt của Bt trong các hỗn hợp làm tăng hiệu quả diệt sâu (thêm tới 50%), kể cả đối với rầy xanh (*Empoasca flavescens*, tuổi 4) khi thử nghiệm thực tế; còn khi không có Bt thì hiệu quả diệt nấm vẫn thể hiện, dù chậm hơn. Như vậy, việc sử dụng các vi sinh vật trong cùng một hỗn hợp sẽ tận dụng được tác dụng cộng gộp cũng như hiệp trợ của chúng và qua đó làm tăng hiệu quả trừ sâu tổng thể.

Từ khóa: chế phẩm sinh học diệt côn trùng, hỗn hợp vi sinh vật, sâu hại rau, sâu xanh, giòi đục lá, rầy xanh

Effects of mixed microorganisms cultures in controlling harmful insects on vegetables

Le Tat Dat¹, Nguyen Thi Thu Thuy¹, Nguyen Huu Hoan¹, Pham Thi Det², Tran Thi Anh Dao³,
Van My Tien³, Pham The Hai^{1,*}, Nguyen Trung Giang²

¹ GREEN LAB – Center for Life Science Research (CELIFE) and Department of Microbiology, Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, 334 Nguyen Trai St., Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

² Institute of Research and Application of Advanced Biotechnology (HIBIOTEK), 314 Minh Khai St., Hai Ba Trung, Hanoi, Vietnam

³ Bao Minh Chau Co. Ltd., 43/1 Bui Quang La St., Go Vap, Ho Chi Minh City, Vietnam

* Correspondence to Pham The Hai <phamthehai@vnu.edu.vn>

(Submitted: February 1, 2021; Accepted: May 11, 2021)

Abstract. In Vietnam, the safe production of vegetables is now a high demand and requires the use of biological agents to replace chemicals, especially for insect control. Microbial products for insect control, which have therefore far been developed, are mainly single-culture-based; hence, their efficacious spectrums are narrow. In this study, we created several mixed cultures of *Bacillus thuringiensis* strain PAM32 (Bt), *Metarhizium anisopliae* strain PAM23, and *Beauveria bassiana* strain PAM21 and investigated their potential in controlling some harmful insects on vegetables and their possible interactions in such activities. The 0.9% NaCl suspensions of the mixed cultures displayed high insecticidal efficacies and synergistic effects against *Helicoverpa armigera* (in the laboratory, causing an 85% death rate after three days) and *Liriomyza sativae* (in the field, reducing 70% of affected tomato leaves). The presence of Bt in the mixtures could enhance the insecticidal efficiency (up to 50%), even to *Empoasca flavescens* in the field test. The results indicate that using mixed microbial cultures can exploit synergistic interactions and complementary interactions among their individuals, thus improving the overall insecticidal effect.

Keywords: harmful insects, microbial products for insect control, *Helicoverpa armigera*, *Liriomyza sativae*, *Empoasca flavescens*, mixed culture

1 Đặt vấn đề

Hiện nay, ở các mô hình sản xuất rau thương phẩm, nếu không sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật thì không thể chống lại sự tấn công của sâu hại. Thói quen lạm dụng các hóa chất trong sản xuất và chế biến rau thương phẩm đã dẫn đến những vấn đề thời sự nhức nhối: (i) ô nhiễm môi trường nước và đất do hóa chất tồn dư, (ii) sản phẩm rau không an toàn tràn lan, đe dọa nghiêm trọng sức khỏe của người tiêu dùng; (iii) giá trị nông sản giảm, ảnh hưởng đến thu nhập và đời sống của người nông dân. Tình hình thực tế này dẫn đến một yêu cầu bắt buộc hiện nay là phải chuyển dịch hoàn toàn cách thức sản xuất rau thương phẩm theo hướng an

toàn, trong đó đặc biệt chú trọng sử dụng các chế phẩm sinh học thay thế các chất hóa học, v.v.

Các chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật, bao gồm các chế phẩm trừ sâu sinh học, chủ yếu có bản chất vi sinh vật (VSV) do hoạt tính đối kháng đa dạng và tính an toàn của vi sinh vật. Nghiên cứu sản xuất các chế phẩm vi sinh vật trừ sâu hại cây trồng theo quy trình lên men ở Việt Nam được tiến hành từ những năm 90 của thế kỷ XX [1]. Một số chế phẩm đã được phát triển, thử nghiệm và đã đạt những kết quả đáng ghi nhận như chế phẩm Bt, chế phẩm virus NPV.Ha và NPV.SI trừ các loại sâu hại rau [2]; các chế phẩm nấm *Metarhizium anisopliae* trừ châu chấu hại ngô, mía và trừ bọ cánh cứng hại dưa ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, Hà Nội, Hải Phòng, v.v., hay nấm *Beauveria bassiana* trừ sâu róm hại rừng thông ở Sơn La, Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, v.v. [1]. Tuy nhiên, các chế phẩm nói trên đa số đều dựa trên hoạt tính của các đơn chủng vi sinh vật nên phổ tác dụng còn hẹp [3]. Vì vậy, để hướng tới hiệu quả cao và phổ diệt sâu rộng, các chế phẩm đa chủng cần được quan tâm nghiên cứu và phát triển.

Dựa trên những cơ sở thực tiễn ở trên, trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm tạo một số công thức hỗn hợp đa chủng nấm và vi khuẩn (được sản xuất theo cách thức đơn giản và chi phí không cao) và đánh giá khả năng diệt một số loại sâu hại rau khác nhau của các hỗn hợp này cũng như tìm hiểu tác dụng trừ sâu cộng gộp của các chủng. Mục tiêu của nghiên cứu là thăm dò và tìm ra được công thức hỗn hợp vi sinh đa chủng phòng chống hiệu quả nhiều loài sâu hại rau, làm tiền đề cho các nghiên cứu xa hơn, phát triển chế phẩm vi sinh dạng hỗn hợp có hiệu quả cao và phổ tác dụng rộng để phục vụ sản xuất rau an toàn.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Các chủng vi sinh vật (VSV) được sử dụng bao gồm chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* PAM32 (Bt), chủng nấm *Metarhizium anisopliae* PAM23 (Ma) và chủng nấm *Beauveria bassiana* PAM21 (Bb). Các chủng này thuộc bộ chủng của phòng thí nghiệm GREEN LAB, Trung tâm Nghiên cứu Khoa học sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Sâu xanh *Helicoverpa armigera*, thuộc họ Ngài đêm (Noctuidae), bộ Cánh vảy (Lepidoptera). Ngài và trứng sâu do Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Rầy xanh *Empoasca flavescens*, thuộc họ Ve sâu nhày (Jassidae), bộ Cánh đều (Homoptera). Nguồn rầy ban đầu được thu trên cây cà chua tại vườn rau hữu cơ thuộc Công ty TNHH Sharefarm, xã Ngọc Tảo, huyện Phúc Thọ, Hà Nội.

Ruồi đục lá *Liriomyza sativae*, thuộc họ Ruồi đục lá (Agromyzidae), bộ Hai cánh (Diptera).

Mật độ ấu trùng ruồi (giòi) và tỷ lệ hại trên lá cây cà chua được theo dõi tại vườn rau hữu cơ thuộc Hệ thống trang trại sinh thái Sharefarm, xã Ngọc Tảo, huyện Phúc Thọ, Hà Nội.

Các môi trường được sử dụng để nuôi cấy VSV ba gồm môi trường LB để nuôi vi khuẩn (thành phần trong một lít: 5 g NaCl, 10 g peptone, 5 g cao nấm men; bổ sung 15–20 g agar nếu làm môi trường rắn); môi trường NYSM để lên men thu sinh khối vi khuẩn (thành phần trong một lít: 10 g glucose, 5 g peptone, 3 g cao nấm men, 5 g NaCl, 10 g K_2HPO_4); môi trường PDA/PDB để nuôi nấm (thành phần trong một lít: dịch chiết từ 20 g khoai tây tươi, 10 g saccharose, bổ sung 16 g agar nếu làm PDA). Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ các nhà sản xuất đáng tin cậy như Xilong (Trung Quốc) và Bio Basic Inc. (Mỹ).

2.2 Phương pháp

Lên men tạo nguyên liệu phối trộn hỗn hợp vi sinh vật

Lên men lỏng Bacillus thuringiensis

Chủng Bt PAM32 thuần khiết được cấy trên đĩa thạch với môi trường LB. Sau 24 giờ, thu khuẩn lạc, tinh sạch và đưa vào lên men lỏng trong môi trường dịch NYSM ở 30 °C, pH 7, trong 48–72 giờ, có sục khí. Sau đó, sinh khối được thu bằng ly tâm ở 5000 × g, 4 °C trong 20 phút và được hòa vào thể tích tương đương của dung dịch NaCl 0,9% (thu được dịch huyền phù Bt trong muối sinh lý).

Lên men rắn các chủng nấm Metarhizium anisopliae và Beauveria bassiana

Chủng nấm thuần khiết được nuôi trong ống thạch nghiêng PDA từ hai đến ba ngày, sau đó được đưa vào lên men nhân sinh khối. Trong nghiên cứu này, nhằm giảm chi phí sản xuất, nấm được lên men trên môi trường rắn với cơ chất (đồng thời là giá thể) là gạo. Gạo được ngâm trong dịch PDB; chia nhỏ vào các túi có miệng nút bông rồi đem khử trùng ở 110 °C trong 10 phút; sau đó, mỗi túi như vậy được bổ sung toàn bộ cục thạch chứa sinh khối từ một ống nghiệm thạch nghiêng PDA nuôi cấy nấm trước đó. Túi được để ở nơi thoáng khí, nhiệt độ phòng và theo dõi đến khi sợi nấm lan kín khối giá thể thì thu bào tử nấm bằng cách trộn khối giá thể sau lên men với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1:1 (w/v) (có nghĩa là cứ 100 g khối giá thể thì được trộn với 100 mL dung dịch muối sinh lý). Phần dịch sau khi trộn được lọc qua vải màn, sau đó được ly tâm ở 5000 × g, 4 °C trong 20 phút. Phần cặn ly tâm được hòa vào thể tích tương đương của dung dịch NaCl 0,9% (thu được dịch huyền phù nấm trong muối sinh lý).

Tạo hỗn hợp vi sinh vật

Các dịch huyền phù đơn chủng đã chuẩn bị được xác định mật độ tế bào; sau đó được pha loãng bằng muối sinh lý sao cho mật độ cuối cùng của mỗi nguyên liệu đơn chủng đạt

10^9 CFU·mL⁻¹. Sau đó, các dịch nguyên liệu đơn chủng được phối trộn để tạo các dịch hỗn hợp VSV theo công thức. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi thử nghiệm các công thức hỗn hợp theo tỉ lệ (Bt/Ma/Bb) (1:0:0), (0:1:0), (0:0:1), (1:1:0), (1:0:1), (0:1:1), (1:1:1) và (10:1:1). Các dịch hỗn hợp đã phối trộn được đựng trong bình xịt, bảo quản lạnh, tránh sáng và được thử nghiệm ngay (vói sâu). Thời gian từ lúc phối trộn đến lúc thử nghiệm không quá một tuần.

Thử nghiệm trong phòng thí nghiệm

Sâu xanh được nuôi theo phương pháp nuôi cá thể trong hộp mica (3 × 5 × 5 cm); thức ăn là hạt ngô tươi. Rầy xanh nở ra từ cùng một lứa trứng được nuôi bằng lồng nuôi sâu hình trụ, chứa sẵn cành lá chè tươi cắm trong xô nước giữ ẩm. Hàng ngày tiến hành kiểm tra và thay thức ăn cho sâu xanh và cành chè mới cho rầy xanh. Thử nghiệm hiệu lực trừ sâu được tiến hành trên sâu xanh tuổi 3 và rầy xanh tuổi 4. Thử nghiệm được thực hiện với tám công thức hỗn hợp VSV theo tỉ lệ (Bt/Ma/Bb) (1:0:0), (0:1:0), (0:0:1), (1:1:0), (1:0:1), (0:1:1), (1:1:1) và (10:1:1). Mỗi công thức được thử trên 20 cá thể, bố trí trong hai hộp mica nuôi sâu (7 × 10 × 10 cm) (hai lần lặp lại); công thức đối chứng bố trí tương tự và chỉ được phun nước muối sinh lý. Việc phun dịch hỗn hợp vi sinh và dịch đối chứng được thực hiện với tần suất 1 lần/ngày vào lúc chiều tối (17–18 giờ) ngay sau khi cho ăn. Chúng tôi sử dụng bình xịt cầm tay và phun trực tiếp dịch hỗn hợp VSV (0,7 mL dịch/hộp) lên sâu xanh và lên thức ăn. Hàng ngày (trước 17 giờ, tức là trước khi phun lần tiếp theo), số sâu đã chết và số sâu còn sống trong từng trường hợp thí nghiệm được thống kê.

Nguyên nhân gây chết sâu trong thử nghiệm được xác định dựa trên việc quan sát triệu chứng bên ngoài cơ thể sâu bị chết. Cụ thể như sau: Nếu trên cơ thể sâu (một phần hoặc toàn bộ) có một lớp bột màu xanh và thân sâu khô quắt thì có thể dự đoán sâu chết do nấm *M. anisopliae*. Nếu cơ thể sâu phủ kín hoặc một phần bởi lớp sợi tơ màu trắng và trở nên khô quắt thì có thể dự đoán sâu chết do nấm *B. bassiana* [4]. Nếu cơ thể sâu trở nên mềm nhũn, chuyển màu đen thì rửa bằng cồn 70% để loại bỏ phần lớn các VSV lạ bám bên ngoài. Tiếp đó, mẫu được nghiền nát; sau đó, dịch nghiền được nhuộm tối với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue trong ba phút [5] và bản nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi. Nếu quan sát thấy có tinh thể protein bắt màu xanh thì có thể dự đoán sâu chết do vi khuẩn Bt; nếu không thì có thể xác định cá thể sâu đó chết tự nhiên. Trong một số trường hợp, sâu chết có thể biểu hiện các triệu chứng hỗn hợp thì có thể nghi ngờ là sâu chết do nhiều hơn một tác nhân nêu trên.

Thử nghiệm thăm dò hiệu quả trừ sâu của các hỗn hợp vi sinh vật trong thực tế

Do hạn chế về diện tích và kinh phí, các thử nghiệm được thực hiện với ba công thức hỗn hợp VSV theo tỉ lệ (Bt/Ma/Bb) (1:1:0), (1:0:1) và (0:1:1) trên cây cà chua đang trồng tại vườn rau hữu cơ Sharefarm. Mỗi công thức này thiếu một loại VSV và, vì vậy, thử nghiệm sẽ giúp đánh giá vai trò của từng loại VSV trong các hỗn hợp khi được dùng thực tế. Thử nghiệm được thực

hiện với bốn luống (18 m²/luống): ba luống thử nghiệm (ba lần lặp lại) và một luống đối chứng (chỉ phun nước muối sinh lý). Cụ thể như sau: 0,4 L dịch hỗn hợp ở mỗi công thức được pha (bằng cách bổ sung nước) vào bình phun thuốc trừ sâu đeo vai 18 L và được phun lên cây với tần suất 1 lần/tuần vào lúc chiều tối (17–18 giờ). Cứ ba ngày/lần, số lượng cá thể côn trùng gây hại (hoặc số lá cây bị hại – trong trường hợp giòi đục lá) trên mỗi luống được đếm. Kết quả được tính trung bình trên 1 m², do cán bộ kỹ thuật của Sharefarm cung cấp.

Tính toán hiệu lực trừ sâu và phân tích thống kê

Hiệu lực trừ sâu trong PTN của các hỗn hợp VSV được tính theo công thức Abbott

$$\text{Hiệu lực (\%)} = (1 - Ta/Ca) \times 100$$

Hiệu lực trừ sâu khi thử nghiệm thực tế được tính theo công thức Henderson – Tilton

$$\text{Hiệu lực (\%)} = (1 - Ta/Ca \times Cb/Tb) \times 100$$

trong đó Cb là số sâu sống ở công thức đối chứng trước khi xử lý; Ca là số sâu sống ở công thức đối chứng sau khi xử lý; Tb là số sâu sống ở công thức phun thuốc trước khi xử lý; Ta là số sâu sống ở công thức phun thuốc sau khi xử lý.

Các phân tích thống kê cơ bản được thực hiện trên phần mềm Microsoft Excel.

2.3 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 6 năm 2018 đến tháng 11 năm 2020 tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, và Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

3 Kết quả và thảo luận

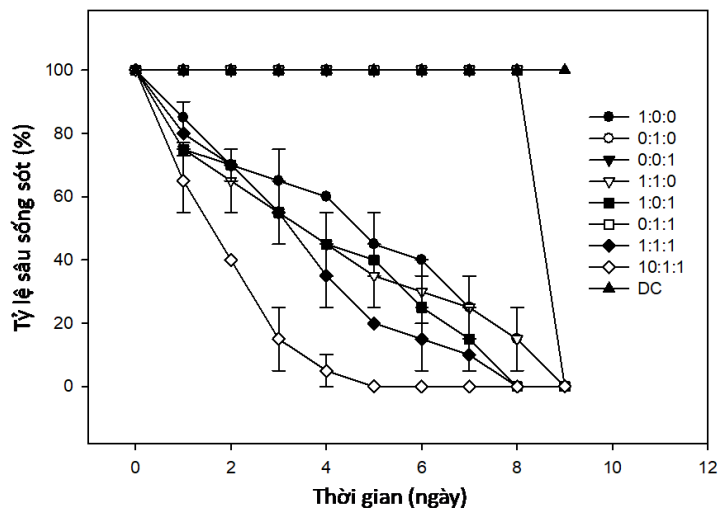
3.1 Kết quả thử nghiệm các công thức hỗn hợp vi sinh vật trong phòng thí nghiệm

Thử nghiệm trên sâu xanh

Tám công thức hỗn hợp vi sinh vật (theo tỉ lệ Bt/Ma/Bb (1:0:0), (0:1:0), (0:0:1), (1:1:0), (1:0:1), (0:1:1), (1:1:1) và (10:1:1)) được thử nghiệm diệt sâu xanh đều cho kết quả gây chết sâu với hiệu quả cao (Hình 1). Trong đó, công thức (10:1:1) chứa chủ yếu vi khuẩn Bt có hiệu quả nhanh và rõ ràng nhất ($p < 0,05$), gây chết sâu ngay trong vòng 2–3 ngày đầu (tới 85%) và gây chết 100% số sâu sau năm ngày (Bảng 1). Các công thức (1:0:0), (1:1:0), (1:0:1) và (1:1:1) (đều có 1/3 thể tích chứa Bt với mật độ đầu vào là 10⁹ CFU·mL⁻¹) có tác dụng diệt sâu như nhau ($p > 0,05$) nhưng chậm hơn: diệt được trên 50% số sâu sau năm ngày và cần 7–8 ngày để diệt 85% số sâu. Các công thức (0:1:0), (0:0:1) và (0:1:1) (chỉ chứa các nấm) có tác dụng chậm nhất và gây chết đồng loạt cho sâu (100%) chủ yếu từ ngày thứ chín của thử nghiệm.

Ấu trùng sâu xanh có tính phàm ăn và ăn tạp và có thể do vậy mà các hỗn hợp có thành phần Bt tác động vào đường tiêu hóa có thời gian gây chết sâu nhanh hơn so với các hỗn hợp còn lại. Các kết quả trước đây cũng ghi nhận vi khuẩn Bt có hiệu lực gây chết cấp tính đối với nhóm côn trùng cánh vảy [6, 7]. Tác dụng của Bt theo đường tiêu hóa thường nhanh hơn so với tác dụng của nấm, vốn cần thời gian để bào tử nảy mầm, xâm nhập và phát triển [4, 6, 8]. Do đó, có thể thấy nguyên nhân gây chết cấp tính cho sâu xanh chủ yếu là do hoạt tính của Bt có mặt trong hỗn hợp; còn hiệu quả gây chết sâu trong thời gian sau chín ngày thử nghiệm chủ yếu là do tác động xâm nhập của nấm. Chúng tôi đã quan sát thấy các mẫu sâu chết sớm không mang triệu chứng điển hình của nấm hại. Kết quả kiểm tra cho thấy sự xuất hiện của những cấu trúc dạng tinh thể bắt màu Coomassie Brilliant Blue, khẳng định hoạt tính của Bt trong cơ thể sâu. Các mẫu sâu chết ở thời gian muộn hơn (từ ngày thứ chín) có những dấu hiệu điển hình của nhiễm nấm Ma và Bb.

Như vậy, có thể kết luận sơ bộ về hiệu quả trừ sâu cộng gộp theo thời gian của các hỗn hợp chứa Bt, Ma và Bb; theo đó, Bt có tác dụng trừ sâu ngay từ pha đầu (2–4 ngày đầu), trong khi các nấm thể hiện hiệu quả trừ sâu ở pha sau (từ ngày thứ chín) của thí nghiệm. Như vậy, khi sử dụng hỗn hợp, các VSV có thể hỗ trợ tác dụng cho nhau để diệt sâu, tạo nên hiệu ứng trừ sâu liên tục kéo dài, làm tăng hiệu quả diệt sâu tổng thể so với khi sử dụng các đơn chủng.



Hình 1. Hiệu quả diệt sâu xanh của các hỗn hợp vi sinh vật với công thức khác nhau

Ghi chú: Các hỗn hợp có tỷ lệ Bt/Ma/Bb (1:0:0), (0:1:0), (0:0:1), (1:1:0), (1:0:1), (0:1:1), (1:1:1) và (10:1:1).

DC: đối chứng (xử lý bằng muối sinh lý).

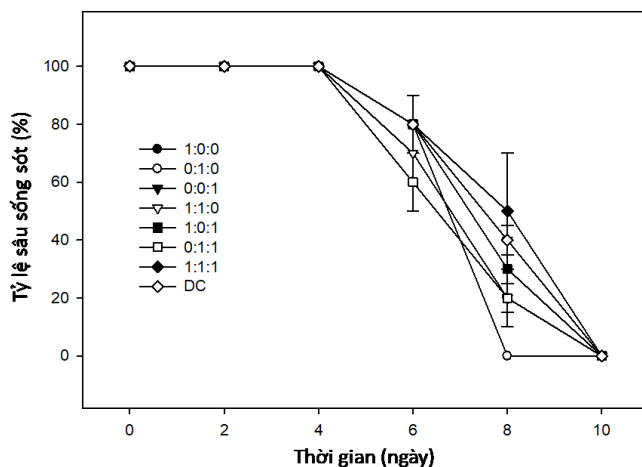
Bảng 1. Hiệu lực của một số hỗn hợp VSV đối với sâu xanh *Helicoverpa armigera* (Thí nghiệm trong phòng)

STT	Hỗn hợp VSV (Bt/Ma/Bb)	Hiệu lực diệt sâu (%) sau khi phun (ngày)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1:0:0	15	30	35	40	55	60	75	85	100
2	0:1:0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
3	0:0:1	0	0	0	0	0	0	0	0	100
4	1:1:0	25	35	45	55	65	70	75	85	100
5	1:0:1	25	30	45	55	60	75	85	100	100
6	0:1:1	0	0	0	0	0	0	0	0	100
7	1:1:1	20	30	45	65	80	85	90	100	100
8	10:1:1	35	60	85	95	100	100	100	100	100

Ghi chú: Hiệu đính theo công thức Abbott. Các số trong bảng là giá trị trung bình của các lần lặp lại.

Thử nghiệm trên rầy xanh

Tám công thức hỗn hợp VSV tiếp tục được thử nghiệm khả năng kháng rầy xanh. Kết quả cho thấy các hỗn hợp có thể diệt rầy xanh nhưng hiệu quả không cao, không khác biệt lớn so với đối chứng ($p > 0,05$) (Hình 2, Bảng 2). Các hỗn hợp với thành phần khác nhau cũng không có sự khác biệt về hiệu quả diệt rầy.



Hình 2. Hiệu quả diệt rầy xanh của các hỗn hợp vi sinh vật với công thức khác nhau

Ghi chú: Các hỗn hợp có tỷ lệ Bt/Ma/Bb (1:0:0), (0:1:0), (0:0:1), (1:1:0), (1:0:1), (0:1:1), (1:1:1) và (10:1:1). DC: đối chứng (xử lý bằng muối sinh lý).

Bảng 2. Hiệu lực của một số hỗn hợp VSV đối với rầy xanh *Empoasca flavescens* (Thí nghiệm trong phòng)

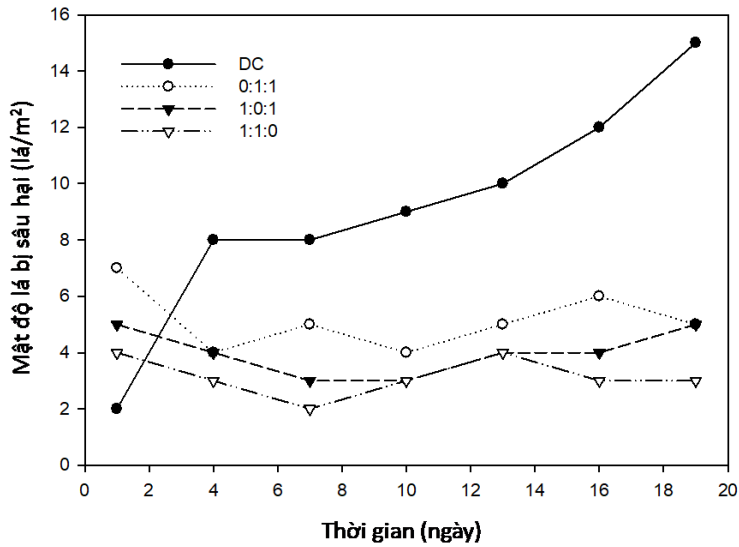
STT	Hỗn hợp VSV (Bt/Ma/Bb)	Hiệu lực diệt sâu (%) sau khi phun (ngày)				
		2	4	6	8	10
1	1:0:0	0	0	25	50	–
2	0:1:0	0	0	0	100	–
3	0:0:1	0	0	0	0	–
4	1:1:0	0	0	12,5	50	–
5	1:0:1	0	0	0	25	–
6	0:1:1	0	0	25	50	–
7	1:1:1	0	0	0	0	–

Ghi chú: Hiệu đính theo công thức Abbott. Các số trong bảng là giá trị trung bình của các lần lặp lại. –: không xác định được do tất cả rầy đều chết (cả ở đối chứng).

Rầy xanh thuộc nhóm côn trùng gây hại kiểu chích hút dịch sáp của cây, không có tập tính ăn lá rau nên có lẽ Bt không kháng được rầy (hiện chưa có công bố nào cho thấy Bt có tác dụng đối với côn trùng thuộc nhóm chích hút). Vì vậy, trong nghiên cứu này, các nấm *B. bassiana* và *M. anisopliae* được kỳ vọng kháng rầy, dựa trên một số bằng chứng về khả năng của các nấm này kháng một số *Empoasca* spp. [9–11]. Tuy nhiên, chúng tôi không ghi nhận được mối tương quan rõ ràng giữa các công thức hỗn hợp VSV thử nghiệm đối với thời gian và tỷ lệ rầy xanh chết, một phần có thể do điều kiện thử nghiệm không thuận lợi đã ảnh hưởng trực tiếp lên sức sống của rầy xanh (rầy trong đối chứng cũng chết) (Hình 2).

3.2 Thử nghiệm thăm dò hiệu quả trừ sâu của các hỗn hợp vi sinh vật trong thực tế

Ba hỗn hợp VSV với các công thức theo tỉ lệ (Bt/Ma/Bb) (1:1:0), (1:0:1) và (0:1:1) được thử nghiệm trên cây cà chua tại vườn rau hữu cơ Sharefarm (xã Ngọc Tào, huyện Phúc Thọ, Hà Nội) để đánh giá tác dụng cộng gộp của các VSV diệt sâu hại trong thực tế. Một trong số các sâu hại trên cà chua là giòi đục lá. Thông thường hằng năm, giòi đục lá cà chua mạnh vào khoảng cuối Tháng Ba (đối chứng trong Hình 3: mật độ lá bị hại có thể lên tới 15 lá/m²), nhưng khi cây được xử lý (phun) với các hỗn hợp VSV, tỷ lệ gây hại của chúng được khống chế đều ở mức thấp (<6 lá/m², tương đương chỉ khoảng 30% so với đối chứng, Hình 3, Bảng 3). Tác dụng kiểm soát giòi đục lá tỏ ra hiệu quả hơn với các hỗn hợp chứa Bt ($p < 0,05$) mặc dù hỗn hợp theo công thức 0:1:1 không chứa Bt vẫn có hiệu quả tốt. Các kết quả này khẳng định lại hiệu quả diệt sâu của cả ba tác nhân VSV trong nghiên cứu và tác dụng cộng gộp hiệu quả của chúng.



Hình 3. Kết quả theo dõi mức độ giòi đục lá hại cây cà chua khi thử nghiệm thực tế ba hỗn hợp vi sinh vật

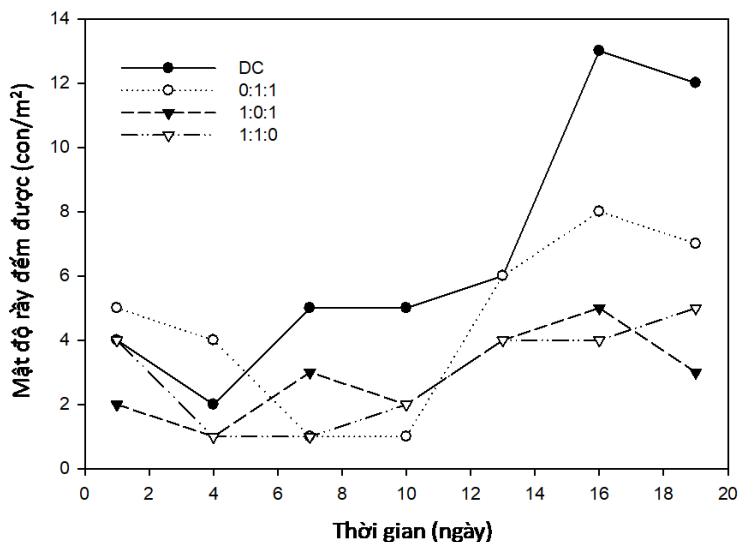
Ghi chú: Các hỗn hợp thử nghiệm có tỷ lệ Bt/Ma/Bb (0:1:1), (1:0:1) và (1:1:0).

DC: đối chứng (xử lý bằng muối sinh lý).

Bảng 3. Kết quả theo dõi mật độ lá (số lá/m²) bị hại do giòi đục lá trên cây cà chua khi thử nghiệm thực tế ba hỗn hợp vi sinh vật (Thí nghiệm tại Sharefarm, Phúc Thọ, Hà Nội)

STT	Hỗn hợp VSV (Bt/Ma/Bb)	Mật độ lá bị hại (số lá trung bình/m²) do giòi đục lá trên cây cà chua sau phun (ngày)						
		1	4	7	10	13	16	19
1	1:1:0	4,3	2,7	2	2,7	4	3	3
2	1:0:1	5	4	3	3	4,3	4	4,7
3	0:1:1	6,7	4	4,7	4	5,3	5,7	5
4	ĐC	2	8,3	7,7	9	10,3	11,7	15,3

Bên cạnh giòi đục lá, rầy xanh cũng là đối tượng được theo dõi trong thời gian thử nghiệm các hỗn hợp VSV trên cây cà chua. Kết quả thu được cho thấy các hỗn hợp VSV có tác dụng kiểm chế số lượng rầy xanh tương đối tốt (Hình 4, Bảng 4); theo đó, cây được xử lý bằng các dịch hỗn hợp thử nghiệm có mật độ rầy xanh trung bình bằng khoảng 50% so với đối chứng. Hơn nữa, các hỗn hợp có Bt cũng làm giảm số lượng rầy mạnh hơn (~50%) so với hỗn hợp 0:1:1, không chứa Bt. Kết quả này là đáng ngạc nhiên bởi vì thử nghiệm trong phòng thí nghiệm (ở trên) không cho thấy tác dụng diệt rầy rõ ràng của các hỗn hợp VSV. Trong thực tế, đã có một số minh chứng thực nghiệm về khả năng kháng rầy thuộc giống *Empoasca* của nấm *M. anisopliae* và *B. bassiana* [9–11]. Bt mặc dù chưa được công bố kháng rầy nhưng đã có bằng



Hình 4. Kết quả theo dõi mật độ rầy xanh hại cây cà chua khi thử nghiệm thực tế ba hỗn hợp vi sinh vật

Ghi chú: Các hỗn hợp thử nghiệm có tỷ lệ Bt:Ma:Bb (0:1:1), (1:0:1) và (1:1:0).

DC: đối chứng (xử lý bằng muối sinh lý).

Bảng 4. Hiệu lực của một số hỗn hợp VSV đối với rầy xanh *Empoasca flavescens* (Thí nghiệm thăm dò trong điều kiện thực tế tại Sharefarm, Phúc Thọ, Hà Nội)

STT	Hỗn hợp VSV (Bt/Ma/Bb)	Hiệu lực (%) sau phun (ngày)					
		4	7	10	13	16	19
1	1:1:0	50	80	60	33,3	69,2	58,3
2	1:0:1	50	40	60	33,3	61,5	75
3	0:1:1	-60	84	84	20	50,8	53,3

Ghi chú: Hiệu đính theo công thức Henderson – Tilton.

chúng cho thấy tác dụng hỗ trợ của Bt làm tăng hiệu quả kháng côn trùng của nấm. Rất có thể điều kiện trong phòng thí nghiệm không mô phỏng đúng điều kiện tự nhiên và tập tính tự nhiên của rầy nên rầy dễ chết khi thử nghiệm trong phòng thí nghiệm và do đó không thể thấy rõ được tác dụng của các hỗn hợp VSV trong điều kiện này.

Tất cả các kết quả trên đều cho thấy Bt có tác dụng tăng cường hiệu quả diệt sâu khi có mặt cùng với các nấm *M. anisopliae* và *B. bassiana*, kể cả với đối tượng mà Bt có thể không có độc lực trực tiếp như rầy xanh. Điều này có thể là do tương tác hỗ trợ (hoặc hiệp trợ) (synergistic interaction) của Bt với hai loại nấm kia, vốn đã được minh chứng trong một số nghiên cứu trước đây. Thật vậy, một số tác giả đã ghi nhận rằng, khi được sử dụng trong hỗn

hợp với *M. anisopliae*, Bt có thể làm tăng tỷ lệ chết của sâu xanh *H. armigera* [12]. Một số nghiên cứu sâu hơn cho thấy tác dụng hiệp trợ của Bt và *M. robertsii* (một loài gần gũi với *M. anisopliae*), gây ức chế hệ miễn dịch và khả năng khử độc của côn trùng [13]. Bt cũng có tác dụng hiệp trợ tương tự với *B. bassiana*, làm tăng đáng kể tỷ lệ sâu hại chết khi hai tác nhân này được kết hợp với nhau khi xử lý. Ví dụ, việc xử lý kết hợp Bt và *B. bassiana* có thể làm tăng 6–35% tỷ lệ chết của ấu trùng bọ cánh cứng *Leptinotarsa decemlineata* hại khoai tây [14] hoặc khoảng 10% tỷ lệ chết của ruồi nhà *Musca domestica* [15], so với việc xử lý bằng từng loại VSV đơn lẻ. Như vậy, việc sử dụng kết hợp các tác nhân VSV vừa kết hợp được tác dụng diệt sâu theo các cơ chế khác nhau của các tác nhân vừa tận dụng được tương tác hiệp trợ của các tác nhân, làm tăng hiệu quả diệt sâu tổng thể.

4 Kết luận

Trong nghiên cứu này, các hỗn hợp vi sinh vật bao gồm vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, nấm *Metarhizium anisopliae* và nấm *Beauveria bassiana* đã thể hiện hiệu quả diệt sâu cao (~100%) và tác dụng cộng gộp đối với các sâu hại rau phổ biến như sâu xanh (*Helicoverpa armigera*) và giòi đục lá (*Liriomyza sativae*). Tác dụng của vi khuẩn thể hiện nhanh (chỉ cần 2–4 ngày diệt 80–90% số sâu) và được bổ trợ bởi tác dụng chậm hơn của nấm (cần 8–10 ngày để diệt 100%). Việc sử dụng các vi sinh vật trong cùng một hỗn hợp cũng tận dụng được tác dụng hiệp trợ của chúng và qua đó làm tăng hiệu quả kháng sâu. Để diệt hiệu quả các loại sâu nêu trên, hỗn hợp có tỷ lệ mật độ *Bacillus thuringiensis*/*Metarhizium anisopliae*/*Beauveria bassiana* 10:1:1 được khuyến cáo sử dụng. Ngoài ra, các hỗn hợp cũng thể hiện khả năng kiểm chế sự phát triển của rầy xanh trong thực tế, nhưng hoạt tính kháng rầy của các vi sinh vật cần được kiểm chứng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự tài trợ của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học Công nghệ cao trong đề tài mã số HB.20.01. Đồng thời, nghiên cứu cũng nhận được sự hỗ trợ tài chính và hợp tác từ công ty TNHH Bảo Minh Châu.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn ThS. Nguyễn Đức Khánh, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, vì những giúp đỡ trong quá trình nghiên cứu. Nhóm nghiên cứu cũng xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo và đội ngũ cán bộ kỹ thuật của Hệ thống trang trại sinh thái Sharefarm vì đã phối hợp thử nghiệm các hỗn hợp vi sinh trong quá trình thực hiện đề tài.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Thị Thùy (2011), *Thực trạng về sản xuất và ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật để phòng trừ dịch hại cây trồng ở Việt Nam trong 20 năm qua*, Trang web chính thức của Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam (iasvn.org).
2. Nguyễn Văn Tuất (2006), *Nghiên cứu sản xuất sử dụng thuốc sâu sinh học đa chức năng cho một số loại cây trồng bằng kỹ thuật công nghệ sinh học*, Báo cáo kết quả đề tài nghiên cứu khoa học cấp Nhà nước KC.04.12, Viện Bảo vệ thực vật.
3. Phạm Văn Ty và Vũ Nguyên Thành (2007), *Công nghệ sinh học (Tập 5–Công nghệ vi sinh và môi trường)*, Nxb. Giáo dục, trang 107.
4. Rajasekhar P. and P. Kalidas (2010), Mechanisms involved in the entomopathogenesis of *Beauveria bassiana*, *Asian Journal of Environmental Science*, 5(1), 65–74.
5. Soccol C. R. et al. (2009), Development of a low cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPE), 121–130.
6. Baxter S. W., Badenes-Pérez F. R., Morrison A., Vogel H., Crickmore N., Kain W. et al. (2011), Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera, *Genetics*, 189(2), 675–679.
7. Peacock J. W., Schweitzer D. F., Carter J. L. and Dubois N. R. (1998), Laboratory assessment of the effects of *Bacillus thuringiensis* on native Lepidoptera, *Environmental Entomology*, 27(2), 450–457.
8. Kim H. M., Jeong S. G., Choi I. S., Yang J. E., Lee K. H. and Kim J. et al. (2020), Mechanisms of Insecticidal Action of *Metarhizium anisopliae* on Adult Japanese Pine Sawyer Beetles (*Monochamus alternatus*), *ACS Omega*, 5(39), 25312–25318.
9. Li W.-L., Bao Y.-X. and Tong Y.-H. (2014), Screening for virulent strains of *Metarhizium anisopliae* against *Empoasca vitis*, *Journal of Fujian College of Forestry*, 4, 8.
10. Pu X.-Y., Feng M.-G. and Shi C.-H. (2005), Impact of three application methods on the field efficacy of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide against the false-eye leafhopper, *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) in the tea canopy, *Crop Protection*, 24(2), 167–175.
11. Yuanbi W. C. T. (1989), INVESTIGATION ON THE CONTROL OF *Empoasca flavescens* WITH *Beauveria bassiana* AND *Erynia radicans* (Eres), *Journal of Southwest Agricultural University*, (1), 14.
12. Wakil W., Ghazanfar M. U., Riasat T., Qayyum M. A., Ahmed S. and Yasin M. (2013), Effects of interactions among *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis* and chlorantraniliprole on the mortality and pupation of six geographically distinct *Helicoverpa armigera* field populations, *Phytoparasitica*, 41(2), 221–234.

13. Yaroslavtseva O. N., Dubovskiy I. M., Khodyrev V. P., Duisembekov B. A., Kryukov V. Y. and Glupov V. V. (2017), Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae, *Journal of Insect Physiology*, 96, 14–20.
14. Wraight S. and Ramos M. (2005), Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*-and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae, *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(3), 139–150.
15. Mwamburi L., Laing M., and Miller R. (2009), Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of house fly larvae and adults in poultry houses, *Poultry Science*, 88(11), 2307–2314.