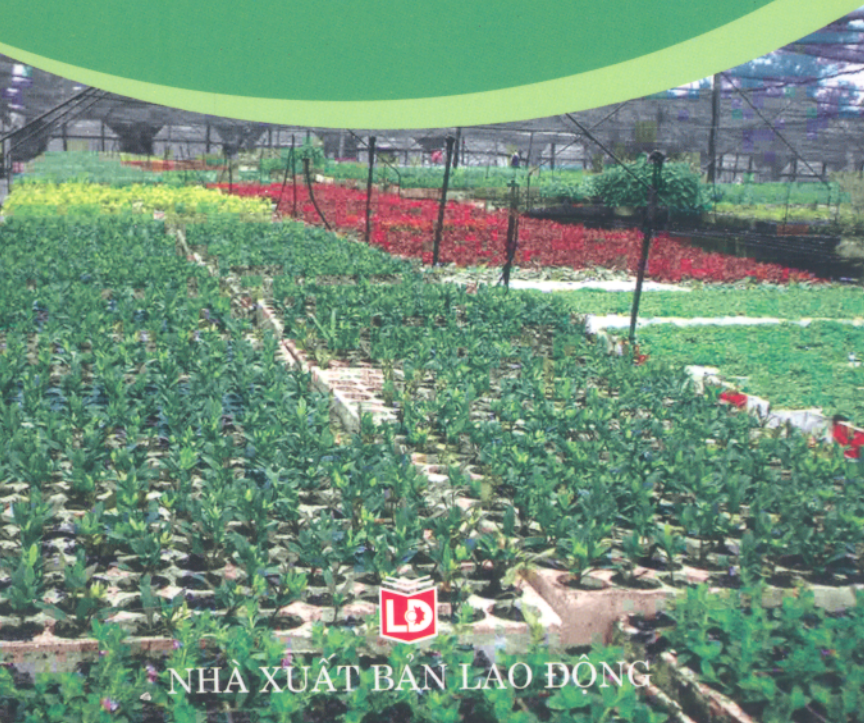


Ứng dụng công nghệ sinh học TRONG SẢN XUẤT VÀ ĐỜI SỐNG



NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG

TỦ SÁCH KHUYẾN NÔNG PHỤC VỤ NGƯỜI LAO ĐỘNG

CHU THỊ THƠM, PHAN THỊ LÀI, NGUYỄN VĂN TÓ

(Biên soạn)

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT VÀ ĐỜI SỐNG

NHÀ XUẤT BẢN LAO ĐỘNG

HÀ NỘI - 2006

LỜI NÓI ĐẦU

Trên thế giới trong mấy thập niên gần đây, cách mạng khoa học kỹ thuật phát triển như vũ bão. Trong đó phải kể đến việc ứng dụng công nghệ vào đời sống và sản xuất đã tạo được những bước đột phá.

Trong nông nghiệp, áp dụng công nghệ vi sinh thông qua kỹ thuật di truyền đã tạo được những giống cây trồng mang tính ưu việt, cho năng suất cao. Ngoài ra người ta còn sử dụng công nghệ vi sinh để sản xuất thức ăn chăn nuôi, phân hữu cơ sinh học, các chất kích thích sinh trưởng.

Trong công nghiệp, người ta đã dùng công nghệ vi sinh để sản xuất khí sinh học, cồn thay xăng dầu...

Trong lĩnh vực y tế và bảo vệ môi trường, áp dụng công nghệ vi sinh, người ta đã tìm ra được nhiều loại dược phẩm quan trọng, chẩn đoán và điều trị nhiều bệnh hiểm nghèo, xử lý rác và nước thải bảo vệ môi trường.

Cuốn "Ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất và đời sống" trình bày rõ các vấn đề nêu trên. Hy vọng cuốn sách sẽ gợi mở, giúp ích cho nhà nông trong lao động, sản xuất.

CÁC TÁC GIẢ

I. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VI SINH

1. Khái niệm

Công nghệ sinh học là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của các tác nhân sinh học (ở mức độ cơ thể, tế bào hoặc dưới tế bào) dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều bộ môn khoa học, phục vụ cho việc gia tăng của cải vật chất của xã hội và bảo vệ lợi ích của con người.

Công nghệ sinh học là một lĩnh vực khoa học công nghệ rất rộng, có thể chia công nghệ sinh học thành các ngành khác sau:

+ Công nghệ vi sinh: Là ngành công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kì diệu của cơ thể vi sinh vật. Nhiệm vụ của công nghệ vi sinh là tạo ra được điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất, phục vụ cho việc làm tăng của cải vật chất của xã hội, đáp ứng nhu cầu vật chất của con người và cân bằng sinh thái môi trường.

+ Công nghệ tế bào: Các tế bào động, thực vật

với bộ máy di truyền đặc trưng cho từng loài giống được tạo điều kiện phát triển trong các môi trường xác định và an toàn. Kỹ thuật nuôi cấy mô được coi là kỹ thuật chủ yếu của công nghệ tế bào.

+ Công nghệ gen: Là ngành công nghệ sử dụng các phương pháp thực nghiệm ứng dụng các thành tựu của sinh học phân tử, di truyền học phân tử để tạo nên các tổ hợp tính trạng di truyền mong muốn ở một loài sinh vật. Từ đó giúp điều khiển theo định hướng tính di truyền của sinh vật. Công nghệ gen được coi là mũi nhọn của công nghệ sinh học, là chìa khoá để giúp mở ra những ứng dụng mới trong công nghệ vi sinh.

2. Lịch sử

Thập niên 1980-1990 và các năm sau chứng kiến một sự kiện: đó là sự ra đời và bùng nổ của công nghệ sinh học hay còn gọi là "Cuộc cách mạng xanh lần thứ hai".

Công nghệ sinh học không phải là môn khoa học như toán, lý, hoá, sinh học phân tử... mà là một phạm trù sản xuất. Bản thân *công nghệ gen* không phải là công nghệ sinh học mà chỉ là một thành phần chủ chốt và là cơ sở để giúp cho sự tiến bộ nhanh chóng của công nghệ sinh học.

Các tác nhân dưới tế bào như enzym cũng có thể

tham gia vào quá trình công nghệ sinh học, nó là một nhánh quan trọng của công nghệ sinh học. Nông nghiệp và công nghiệp truyền thống không phải là công nghệ sinh học, vì không sử dụng tổng hợp các thành tựu hiện đại của nhiều bộ môn khoa học, nhưng công nghệ sinh học có thể đóng góp rất lớn vào nông nghiệp và công nghiệp chế biến để đưa hai ngành sản xuất truyền thống này vào vị trí mới.

Công nghệ sinh học không chỉ tạo ra thêm của cải vật chất, mà còn hướng vào việc bảo vệ và tăng chất lượng cuộc sống con người.

Từ xa xưa, năm 372 - 287 trước Công nguyên nhà triết học cổ Hy Lạp Phrastes trong tập "Những quan sát về cây cối" đã coi cây họ đậu như một nguồn bồi bổ lại sức lực cho đất. Nhận xét này đã được những người cổ La Mã quan tâm vào những năm 30 trước Công nguyên. Họ đã đề nghị luân canh những cây hoà thảo với cây họ đậu.

Trước thế kỉ XV, tất cả những sự kiện xảy ra trong tự nhiên và trong cuộc sống con người đều được cho là do Chúa Trời định sẵn. Nhưng con người khi đó cũng đã biết áp dụng một số quy luật tất yếu của thiên nhiên vào trong cuộc sống, như: ủ men nấu rượu, xen canh hoặc luân canh giữa cây

hoà thảo với cây họ đậu... Họ không có khái niệm về bản chất của các công nghệ, mà hoàn toàn làm theo kinh nghiệm và cảm tính. Tuy nhiên, tổ tiên của chúng ta đã rất thành thạo trong việc sử dụng các phương pháp vi sinh vật để chế biến thực phẩm.

Thế kỷ XVII, nhà bác học nổi tiếng người Hà Lan - Antôn van Lovenhúc (1632 - 1723) đã chế tạo được nhiều dụng cụ bằng nhiều lớp kính ghép lại với nhau có độ phóng đại 160 lần, đó là kính hiển vi nguyên thủy. Bằng loại dụng cụ này, Antôn van Lovenhúc đã phát hiện ra một thế giới mới là thế giới huyền ảo của các loài vi sinh vật.

Đầu thế kỷ XIX, nhiều công trình khoa học ra đời trong đó phải kể đến các công trình nghiên cứu của nhà khoa học nổi tiếng người Pháp - Pasteur (1822 - 1895) tiếp đó là Ivanôpki (1864) Helrigell và Uyn Fac (1886), Vinagratxki, BeyJerinh, Kôk... Những công trình nghiên cứu của họ là cơ sở cho sự phát triển của công nghệ vi sinh, nhờ đó một loại chế phẩm vi sinh vật ra đời... Pasteur đã chỉ ra rằng vi sinh vật đóng vai trò quyết định trong quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu của Pasteur là cơ sở cho sự phát triển của công nghiệp lên men và sản xuất dung môi hữu cơ như: axeton, ethanol, butanol, izopropanol...

Cuối thế kỉ XIX đầu thế kỉ XX Pasteur đã chế thành công vaccin phòng bệnh dại (1885). Năm 1886 Helrigell và Uyn Fac đã tìm ra cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử. Năm 1895 - 1900 tại Anh, Mỹ, Ba Lan và Nga bắt đầu sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ phân tử; năm 1907 ở Mỹ người ta gọi chế phẩm vi sinh này là *những chỉ nitơ*; Năm 1900 - 1914 nhiều nước trên thế giới triển khai sản xuất chế phẩm vi sinh vật: Canada, Tân Tây Lan, Áo. Trong thời gian này có 10 nhà máy xí nghiệp sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ phân tử, trong đó có 9 xí nghiệp ở châu Âu và một xí nghiệp ở Tân Tây Lan. Từ đó nhiều công trình nghiên cứu được công bố. Từ năm 1964 vấn đề cố định nitơ phân tử được coi là một trong hai vấn đề quan trọng nhất của Chương trình sinh học quốc tế. Nhiều nhà khoa học đã ví "Mỗi nốt sần ở rễ cây họ đậu là một nhà máy sản xuất phân đạm tí hon".

Nhờ có chương trình trên, nhiều loại chế phẩm vi sinh vật được ra đời, áp dụng trong nhiều lĩnh vực nông nghiệp như: chế phẩm vi sinh vật đồng hoá nitơ phân tử, chế phẩm vi sinh vật đa chức năng, chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật, vaccin phòng chống các loại bệnh cho người, gia súc gia cầm, chế phẩm vi sinh vật xử lý ô nhiễm môi trường...

Ở Việt Nam, nghiên cứu về chế phẩm vi sinh vật được tiến hành từ những năm đầu của thập kỷ 60 đến sau những năm 80 mới được đưa vào các Chương trình khoa học cấp nhà nước như: "Sinh học phục vụ nông nghiệp" giai đoạn 1982 - 1990, Chương trình "Công nghệ sinh học" KC.08 giai đoạn 1991 - 1995, Chương trình "Công nghệ sinh học phục vụ phát triển nông, lâm nghiệp bền vững, bảo vệ môi trường và sức khỏe con người" KHCN. 02 giai đoạn 1996 - 2000 và chương trình "Nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ sinh học" giai đoạn sau 2001. Ngoài các chương trình Quốc gia nhiều Bộ, ngành cũng triển khai nhiều đề tài, dự án về vấn đề này.

3. Ứng dụng

a) Y tế

Tình hình sức khỏe của nhân loại hiện đang ở trong tình trạng đáng lo ngại. Hầu như lúc nào cũng có khoảng 1/3 dân số toàn cầu ở trạng thái bất ổn. Công nghệ vi sinh đã đóng góp trong việc tìm kiếm nhiều loại dược phẩm quan trọng, chẩn đoán và điều trị nhiều loại bệnh hiểm nghèo cho con người, gia súc gia cầm.

- **Vacxin:** Trong quá trình tìm kiếm các biện pháp, thuốc phòng và trị các loại bệnh truyền

nhiễm, công nghệ vi sinh đã tạo ra vaccin, nhất là vaccin thế hệ mới. Vaccin thế hệ mới có những ưu điểm là: Rất an toàn cho người sử dụng vì không chế từ các vi sinh vật gây bệnh, giá thành hạ vì không nuôi cấy virus trên phôi thai gà hay các tổ chức mô động vật vốn rất phức tạp và tốn kém.

- Vaccin ribosome: Cấu tạo từ ribosome của từng loại vi khuẩn gây bệnh (thương hàn, tả, dịch hạch...), ưu điểm của loại vaccin này là ít độc có tính miễn dịch cao.

- Vaccin các mảnh của virus: Là vaccin chế tạo từ glycoprotein của vỏ virus gây bệnh như virus cúm...

- Vaccin kỹ thuật gen: Là vaccin chế tạo từ vi khuẩn hay nấm men tái tổ hợp có mang gen mã hoá việc tổng hợp protein kháng nguyên của một virus hay vi khuẩn gây bệnh nào đó.

- Insulin: Việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp ngày càng là một thành công rực rỡ của công nghệ gen. Insulin là một protein được tuyến tụy tiết ra nhằm điều hoà lượng đường trong máu. Thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết quá trình trao đổi chất ở cơ thể dẫn đến tích nhiều đường trong nước tiểu. Để điều trị bệnh này người bệnh phải tiêm insulin. Loại insulin chế từ tuyến tụy của gia súc hay được tổng hợp insulin

bằng con đường hoá học. Quá trình tổng hợp rất phức tạp, rất tốn kém.

Năm 1978, H. Boger đã chế insulin thông qua kỹ thuật di truyền trên vi khuẩn *Escherichia coli*, cụ thể người ta đã chuyển gen chỉ phối tính trạng tạo insulin của người sang cho *Escherichia coli*. Với *Escherichia coli* người ta đã tái tổ hợp gen này, qua nuôi cấy trong nồi lên men có dung tích 1000 lít, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 gam insulin tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8.000 - 10.000 con bò.

- Interferon: Interferon có bản chất protein, là chất giúp cho cơ thể chống lại được nhiều loại bệnh. Để có được interferon, người ta phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém. Cũng như insulin, người ta chế interferon thông qua con đường vi sinh vật. Năm 1980, Gilbert đã thành công trong việc chế interferon từ *Escherichia Coli*. Năm 1981, họ thu nhận interferon từ nấm men *Saccaromyces cerevisiae* cho lượng tăng gấp 10.000 lần so với ở tế bào *Escherichia coli*.

- Kích tố sinh trưởng HGH (Human growth hormone)

HGH được tuyến yên tạo nên, thông thường muốn chế được HGH người ta phải trích từ tuyến

yên tử thi, mỗi tử thi cho 4-6mg HGH. Theo tính toán muốn chữa khỏi cho người lùn phải cần 100-150 tử thi.

Năm 1983, sự thành công của công nghệ vi sinh đã giúp con người chế được HGH từ vi sinh vật. Cứ một lít dịch lên men *Escherichia coli* thu được lượng tương ứng với 60 tử thi.

- Chất kháng sinh: Kháng sinh chế từ vi sinh vật được con người đầu tư sản xuất từ lâu. Đến nay người ta đã tìm thấy có tới 2500 loại thuốc kháng sinh có cấu trúc phân tử đa dạng trong số đó chủ yếu có nguồn gốc từ vi sinh vật.

b) Sản xuất nông nghiệp

- Cải tạo giống cây trồng: Thông qua kỹ thuật di truyền với sự hỗ trợ của vi sinh vật, con người đã tạo ra giống cây trồng có nhiều tính ưu việt đó là cho năng suất cao, chất lượng nông sản tốt, sức đề kháng sâu bệnh cao...

- Sản xuất phân bón vi sinh: Phân bón vi sinh là một sản phẩm chứa một hay nhiều loại vi sinh vật sống đã được tuyển chọn có mật độ đảm bảo các tiêu chuẩn đã ban hành có tác dụng tạo ra các chất dinh dưỡng hoặc các hoạt chất sinh học có tác dụng nâng cao năng suất, chất lượng nông sản hoặc cải tạo đất. Các loại phân bón vi sinh có thể kể đến là

phân vi sinh vật cố định nitơ - đạm sinh học (Nitragin, Azotobacterin, Azospirillum), phân vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan - phân lân vi sinh (Photphobacterin), chế phẩm nấm rễ, chế phẩm tảo lam...

- Sản phẩm phân hữu cơ sinh học, một loại sản phẩm được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học của chúng được chuyển hoá thành mùn.

- Sản phẩm thức ăn chăn nuôi: Một loại vi sinh vật có khả năng chuyển hoá các hợp chất cacbon hữu cơ thành protein và các axit amin, vitamin. Có thể lợi dụng khả năng này của vi sinh vật để sản xuất các loại protein đậm đặc làm thức ăn chăn nuôi. Một số vi sinh vật khác có khả năng sản sinh các probiotic có tác dụng điều hoà hệ thống vi sinh vật trong đường tiêu hoá và người ta đã lợi dụng đặc tính này của vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm probiotic làm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi.

- Sản xuất chất kích thích tăng trưởng gibberellin, aucin từ vi sinh vật.

- Sản xuất chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật: Bt., biospor, enterobacterin, bathurin,...

c. Sản xuất công nghiệp

- Công nghệ vi sinh lên men nguyên liệu rẻ tiền như rỉ đường để sản xuất cồn chạy xe động cơ thay xăng dầu. Năm 1985 ở Brazil đã sản xuất 1 tỷ lít cồn/ năm dùng để chạy xe hơi.

- Tạo khí sinh học (biogas): Thường biogas chứa khoảng 60-80% khí metan (CH_4) được sinh ra trong quá trình lên men các phế thải hữu cơ. Nguyên lý của quá trình này là lên men yếm khí của nhóm vi sinh vật yếm khí chịu nhiệt. Trong quá trình phân huỷ chuyển hoá các hợp chất hữu cơ người ta thu được biogas, phần cặn bã còn lại làm phân bón cho cây trồng.

- Bảo vệ môi trường: Công nghệ vi sinh đã tham gia tích cực trong vấn đề xử lý phế thải công nông nghiệp, rác thải sinh hoạt, nước thải, làm sạch môi trường bằng công nghệ vi sinh vật hảo khí, bán hảo khí và yếm khí. Đây là vấn đề mang tính cấp thiết trên toàn cầu hiện nay.

3. Triển vọng

Trong khoảng 50 năm sau đại chiến lần thứ 2, song song với việc hoàn thiện các quy trình công nghệ sinh học truyền thống đã có từ trước, một số

hướng nghiên cứu công nghệ sinh học đã hình thành và phát triển mạnh mẽ nhờ một loạt những phát minh quan trọng trong ngành sinh học nói chung và sinh học phân tử nói riêng, đó là lần đầu tiên người ta xác định được cấu trúc của protein, xây dựng mô hình cấu trúc đường xoắn kép của phân tử AND.

Một số hướng phát triển công nghệ sinh học:

- Trong lĩnh vực nông nghiệp: Tạo chủng vi sinh vật mới để làm giống sản xuất chế phẩm vi sinh vật, áp dụng trong lĩnh vực nông nghiệp (trồng trọt, chăn nuôi, thủy hải sản, thủy nông cải tạo đất, phân bón, bảo vệ thực vật...)

- Trong lĩnh vực sản xuất hàng hoá: Sản xuất axit hữu cơ (axit citric, itaconic, axit acetic...) sử dụng enzym làm chất tẩy rửa...

- Trong lĩnh vực năng lượng: Gia tăng phạm vi sử dụng biogas, xây dựng các dự án sản xuất ethanol dùng làm nhiên liệu.

- Trong lĩnh vực kiểm soát môi trường: Hoàn thiện các phương pháp chế biến và bảo quản lương thực, thực phẩm mới. Sản xuất chất bổ sung vào thực phẩm, sử dụng protein đơn bào và enzym trong công nghệ chế biến thực phẩm.

- Trong sản xuất vật liệu: Hoàn thiện quy trình tuyển khoáng, tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả

năng khai thác kim loại, đá quý hiếm và hoàn thiện các phương pháp kiểm soát quá trình phá huỷ sinh học.

- Trong y tế: Dùng enzym tạo các bộ cảm biến sinh học trong các thiết bị phân tích y tế. Sử dụng enzym và tế bào vi sinh vật trong sản xuất các loại thuốc. Sử dụng enzym và một số chủng vi sinh vật để chẩn đoán và chữa trị bệnh.

Triển vọng của công nghệ sinh học và công nghệ vi sinh vật trong thế kỷ XXI.

Hàng năm thế giới sản xuất khoảng 150.000 tấn glutamate-Na làm bột ngọt và 15.000 tấn lysine làm chất bổ sung vào thực phẩm và thức ăn gia súc với tổng giá trị chừng 1.5 tỷ USD chủ yếu được sản xuất tại Nhật Bản.

Người ta sử dụng khả năng biến đổi sinh khối thực vật có hàm lượng protein cao của vi sinh vật để sản xuất SPC (Single Protein Cell) - Protein đơn. Ở Đức đã có quy trình công nghệ nuôi nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea* và *Candida utilis* để sản xuất công nghệ thực phẩm giàu protein cho người. Nhiều công ty dầu khí và hoá chất đã tiến hành áp dụng quy trình công nghệ sản xuất SPC từ dầu mỏ, khí metan, rượu metan và tinh bột. Ở Anh, hãng ICI sử dụng

Methyophilus methylotrophus trên môi trường metan sản xuất được khoảng 70.000 tấn/ năm. SPC có tên thương phẩm là Pruteen. Ở Liên Xô (cũ), hàng năm từ nguồn nguyên liệu carbohydrate và phế liệu nông nghiệp người ta đã sản xuất hơn 1 tỷ tấn SPC dùng trong chăn nuôi. Trong tương lai, hướng nghiên cứu sử dụng AND tái tổ hợp làm gia tăng khả năng đồng hoá đạm của vi sinh vật, sản xuất SPC sẽ có nhiều hứa hẹn.

Chỉ tính riêng ngành sản xuất bia rượu của Anh hàng năm có doanh thu khoảng 15 tỷ đô la Mỹ (USD), hoặc trên thế giới hàng năm sản xuất thuốc kháng sinh đạt khoảng 3 tỷ USD, acid amino 1,5 tỷ USD, các chế phẩm hơn 500 triệu USD. Theo đánh giá chưa đủ, thì năm 2000 tổng doanh thu từ công nghệ sinh học là trên 100 tỷ USD.

Ở Việt Nam công nghệ sinh học đã mang lại hàng trăm tỷ đồng / năm.

Vai trò của chế phẩm vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp.

- Chế phẩm vi sinh vật không gây hại đến sức khỏe của con người, vật nuôi và cây trồng. Không gây ô nhiễm môi trường sinh thái.

- Chế phẩm vi sinh vật có tác dụng cân bằng hệ vi sinh vật trong môi trường sinh thái.

- Chế phẩm vi sinh vật không làm chai đất, mà làm tăng độ phì nhiêu của đất.

- Chế phẩm vi sinh vật đồng hóa các chất dinh dưỡng cho cây trồng, góp phần làm tăng năng suất và chất lượng nông sản.

- Chế phẩm vi sinh vật có tác dụng tiêu diệt sâu hại và côn trùng gây hại.

- Chế phẩm vi sinh vật phân huỷ, chuyển hoá các chất hữu cơ bền vững, các phế thải sinh hoạt, phế thải nông công nghiệp làm sạch môi trường.

II. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ VI SINH TRONG NÔNG NGHIỆP

A. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ GEN

1. Công nghệ gen

Áp dụng công nghệ gen và công nghệ sinh học vào đổi mới thu hoạch mùa màng là một trong những cuộc cách mạng kỹ thuật lớn hiện nay trong nông nghiệp thế giới. Việc cải thiện mùa màng có thể dựa vào nhiều biện pháp trong đó có biện pháp tạo ra những đặc tính mới mong muốn qua việc đưa các nguyên liệu di truyền vào tế bào cây trồng bằng kỹ thuật tái tổ hợp AND.

Trước đây muốn lai tạo được một giống cây mới, người nông dân phải mất nhiều năm. Đầu tiên họ phải tìm ra giống cây dại có mang những đặc tính mong muốn, rồi lấy phấn hoa của cây dại này phết lên bông của cây họ đang trồng. Nếu thụ phấn thành công thì cây trồng từ hạt của cây này sẽ chứa những gen hữu ích. Nhưng bằng cách này, đồng thời cây cũng mang nhiều gen bất lợi khác.

Người ta có thể loại bỏ dần những gen xấu, và phải 20, 30 năm sau mới có được một giống cây như ý muốn.

Ngay từ năm 1973, các nhà khoa học Mỹ đã sáng lập ra kỹ thuật tái tổ hợp gen, nhờ đó mà có thể cải tạo tính đặc thù của sinh vật. Các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu công nghệ sinh học để chuyển đổi gen nhằm tạo ra những cây trồng cho năng suất cao.

Công nghệ gen cho phép các nhà sinh học lấy gen từ một tế bào này cấy vào một tế bào khác, thậm chí có thể trao đổi giữa gen cây cỏ và thú vật với nhau. Khi cấy được vào trong một tế bào mới, gen có thể làm biến đổi chức năng của tế bào, thay đổi cách làm việc của tế bào, hoặc thay đổi bản chất của bất cứ các chất hoá học nào mà tế bào tiết ra.

Ngày nay công nghệ gen đã giúp cho việc chuyển gen ưu việt vào việc lai tạo giống mới trong nông nghiệp được thực hiện một cách dễ dàng và nhanh chóng hơn. Người ta không phải đi tìm gen trên cùng một loại cây mà có thể lấy gen đó từ động vật cũng được. Chẳng hạn lấy gen từ một loại cá đẹt giúp cho cây chịu được khí hậu lạnh. Đó là chưa kể bằng kỹ thuật gen, người ta có thể ghép nhiều gen

mong muốn một lúc, tiết kiệm rất nhiều thời gian mà năng suất lại được nâng lên rất nhiều.

Hàng năm, nền nông nghiệp thế giới thất thoát tới 40% hoa màu vì sâu bọ và cỏ dại. Vì vậy, người ta đang nghiên cứu đưa gen chống sâu bệnh và cỏ dại vào cây trồng. Người ta cũng đã nghiên cứu thành công việc ghép các gen tăng sức đề kháng của cây như tạo ra nhiều chất ức chế sự tiêu hoá của sâu bọ.

Với việc chuyển gen protein capsid (những kháng thể của cây), người ta có thể tạo ra được những cây chuyển gen có thể chống được các virus. Bây giờ người ta có thể thực hiện được việc ghép hệ thống miễn dịch cho cây. Việc miễn dịch hoá cây trồng bằng cách phát động sớm cơ chế phòng của cây đã được thử nghiệm trong trồng trọt. Ba công ty thế giới cạnh tranh nhau trong lĩnh vực này. Hãng Du pont de Nemous đã thực hiện việc tạo giống thuốc lá chuyển gen, hãng công nghệ sinh học Morgen - Hà Lan chuyển gen chống virus vào khoai tây và hãng Cibagiagy - thì triển khai các dẫn xuất của axit dichloro - isonicotinic.

Một trong những vũ khí lợi hại nhất đã được sử dụng, đó là súng bắn gen. Người ta có thể tiến hành công nghệ gen bằng chuyển gen gián tiếp

thông qua vector, nhưng cũng có thể chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen (gene gun). Súng này bắn ra những viên đạn nhỏ được phết những gen kháng bệnh hay kháng ký sinh, hay những gen mang những đặc tính mong muốn.

Những gen này được cố định bằng những phương pháp hoá học trên những viên đạn nhỏ xíu bằng vàng. Dưới lực chạm, đạn sẽ xuyên vào cây, càng vào sâu tốc độ càng lớn. Đó là phương pháp chuyển gen nhanh vào cây để tạo cây chứa gen có sức đề kháng. Khi dùng phương pháp chuyển gen để kháng cho cây trồng, người ta lưu ý là cây trồng không thể kéo dài sự đề kháng tổng lực vì tổn quá nhiều năng lượng làm cây kiệt sức mà phải nghiên cứu đến các tác động hữu ích từng đợt cho cây trồng dưới dạng phun vào thời điểm thích hợp.

2. Tạo giống cây trồng bằng công nghệ gen

a. Đưa gen vào thực vật

Việc cải tiến bộ gen tế bào thực vật qua cách đưa nguyên liệu di truyền ngoại lai vào bằng con đường tái tổ hợp AND hiện nay đang mở ra nhiều triển vọng tốt đẹp.

- Cách 1: Chuyển gen trực tiếp, như dùng:

+ Phương pháp hoá học polyethylene glycol

+ Phương pháp ngâm hạt phấn vào dung dịch AND.

+ Phương pháp vi tiêm gen

+ Phương pháp bắn gen v.v...

- Cách 2: Chuyển gen gián tiếp qua sử dụng các vector - đặc biệt là vector plasmid pBI 121 - được dùng nhiều nhất trong kỹ thuật gen thực vật hiện nay bởi vì plasmid này được kết cấu gọn nhẹ chứa sẵn một gen khởi đầu promoter mạnh nhất. Cho đến nay đó là CaMV 35S - gen kết thúc NOS và gen đánh dấu tốt GUSA.

Plasmid này được gắn thêm các gen lạ có đặc tính mong muốn rồi đưa vào vi khuẩn thông dụng hay dùng trong thực vật là *Agrobacterium tumefaciens* để đưa vào thực vật.

b. Đưa gen ngoại lai vào

Đầu tiên người ta đưa vào AND ngoại lai vào tế bào thực vật: AND được đánh dấu phóng xạ rồi đưa vào hạt phấn, chồi non, các tế bào nuôi cấy protoplast hay nhân tế bào được tách ra. Các kết quả thu được rất khó giải thích bởi vì AND ngoại lai dễ nhạy cảm với sự tiêu hoá của enzym nuclease vật chủ. Phải đưa AND vào lysosom, sau đó dung hợp vào protoplast để làm giảm tác dụng tấn công của nuclease tế bào chủ. Những plasmid đó có thể

là một hệ thống duy nhất của sự chuyển gen. Chúng sao chép một cách tự quản trong ty lạp thể. Plasmid cũng được tìm thấy trong nhiều vi khuẩn. Những plasmid đó thường được liên kết với vi khuẩn bệnh lý và được dùng để kiểm tra sự sinh bệnh của một số tác nhân gây bệnh cây trồng.

c. Chuyển gen thực vật

Agrobacterium gồm các loại *A.tumefaciens* và *A.Rhizogenes*. *Agrobacterium tumefaciens* là vi khuẩn đất gram âm, hình que. Vi khuẩn này có họ *Rhizobiaceae* có khả năng gây u ở thực vật. Nó là một plasmid dài vào khoảng 120-150 Kb, có tính chất gây u nên được gọi là plasmid Ti.

Vai trò của plasmid Ti của *Agrobacterium tumefaciens* trong sự hình thành khối u ngày nay được sử dụng phổ biến để chuyển gen thực vật.

Còn lại vi khuẩn *Agrobacterium Rhizogenes* lại có plasmid có khả năng gây bệnh rễ tóc (hairy root) và gọi là plasmid Ri.

Đối với các cây trồng, người ta có thể tạo ra giống mới có những đặc tính mong muốn qua việc chuyển gen. Các gen đó có thể từ một cây không có quan hệ họ hàng hoặc từ động vật, côn trùng, nấm men, hoặc từ các vi sinh vật. Các cây được nhận gen bằng nhiều cách khác nhau nhưng gần đây

nhờ hệ thống vi khuẩn *Agrobacterium* bởi hệ thống vi khuẩn này có một đặc tính sẵn có trong tự nhiên là chuyển được gen từ chúng vào cây cối thông qua một phần AND gọi là AND-T của plasmid Ti hoặc Ri. Chính AND-T của vi khuẩn được gắn vào một bộ gen của thực vật sẽ làm xuất hiện khối u hoặc rễ tóc vì chúng chứa oncogen. Nhưng nếu phần AND-T bị cắt thì plasmid Ti này vẫn giữ nguyên khả năng chuyển gen lạ vào thực vật. Do đó plasmid Ti hiện nay trở thành một công cụ sắc bén được sử dụng rộng rãi trong việc chuyển gen lạ không kéo theo đặc tính gây u vào các cây trồng.

Việc chuyển gen lạ được tiến hành tuần tự theo những bước sau:

1. Tách plasmid Ti từ vi khuẩn *A. Turmer - faciens*.

2. Cắt bỏ phần AND-T của plasmid đi.

3. Chuẩn bị gen lạ chứa tính di truyền mong muốn, ví dụ chuẩn bị gen độc tố của *Bacillus thuringiensis* để tiêu diệt sâu bọ hại cây trồng.

4. Chuẩn bị gen đánh dấu để theo dõi việc chuyển gen lạ vào thực vật có thành công hay không. Chẳng hạn:

- Gen mã hoá cho một enzym có phản ứng màu mà ở thực vật ít có như gen mã hoá enzym beta

glucuronidase gọi tắt là GUS.A - tạo ra màu xanh da trời đặc trưng với cơ chất 5-bromo-4-Choloro-3-indolyl, β -D galac-topyranoside được ký hiệu là X-gluc.

- Đôi khi người ta sử dụng khả năng đánh dấu của gen mã hoá luciferase - một enzym của đom đóm phát sáng trong tối ở các mô được chuyển gen.

- Cũng có khi sử dụng gen kháng sinh Kana-mycin - một chất ức chế sự sinh trưởng thực vật.

5. Gắn gen lạ và gen đánh dấu vào plasmid Ti thay thế vào chỗ AND-T đã bị cắt bỏ và đưa vào vi khuẩn *Agrobacterium*.

6. Chuẩn bị tế bào vật chủ tiếp nhận vi khuẩn *Agrobacterium* chứa plasmid ci gen lạ - như chuẩn bị các protoplast từ các thể mô, các đĩa lá.

7. Nuôi cấy chung vật chủ với vi khuẩn *A.tumefaciens* chứa plasmid Ti gắn gen lạ một thời gian vài ngày ở nhiệt độ, ánh sáng thích hợp.

8. Loại bỏ vi khuẩn bằng dùng các kháng sinh đặc hiệu như carbenicillin.

9. Chuyển nguyên liệu thực vật vào môi trường dinh dưỡng nuôi cấy tế bào và mô để tái sinh có thêm những chất kích thích sinh trưởng như 2,4D; auxin...

10. Cây tái sinh được nuôi trong vườn ươm và cuối cùng trồng ra đất.

11. Theo dõi các đặc tính của gen lạ biểu hiện ở cây trồng.

Bên cạnh những tiến bộ vừa qua trong việc sử dụng plasmid Ti để làm biến đổi di truyền thực vật bậc cao, có một vài vấn đề cần phải đặt ra trước khi sự biến đổi có thể được áp dụng rộng rãi để cải thiện giống cây trồng, đó là:

* Khả năng để sinh ra những cây từ những tế bào được biến đổi di truyền cần phải mở rộng một vài mùa.

* * Cây chủ của vi khuẩn *Agrobacterium* có thể làm hạn chế sự biến đổi trong nhiều vụ thu hoạch.

* Muốn chuyển gen thành công cần phải phân tích mở rộng bộ gen thực vật, biết rõ tổ chức phân tử của gen đưa vào và mối liên quan giữa nó với tổ chức cấu trúc di truyền và điều hoà di truyền.

Đối với sự chuyển gen thực vật, virus thực vật chứa AND cũng được coi như là vector. Loại virus khảm thực vật của hoa xúp lơ là một ví dụ. Đó là một vector có thể dùng để chuyển gen vì: AND ngoại lai có thể chuyển vào thực vật qua sự lây nhiễm lá bởi virus. Thêm vào đó, CaMV có thể nhân lên trong bào tương một cách không phụ

thuộc và như vậy loại trừ khả năng gây trở ngại cho các chức phận của tế bào chủ.

Tuy có sử dụng cả virus khảm hoa xúp lơ vào làm vector chuyển gen, song phổ biến hơn cả vẫn là dùng hệ vi khuẩn *Agrobacterium*. Hệ này đã được hàng trăm cơ sở công nghiệp và phòng thí nghiệm trên thế giới sử dụng. Chỉ ở Monsanto đã có hơn 45 nghìn dòng thực hiện việc chuyển gen tự do đã được sản xuất theo kiểu này.

Mặc dù phương pháp đó đơn giản và chính xác song nhiều loại thực vật quan trọng đối với mùa màng như lúa, ngô, lúa mì vẫn không phải là cây chủ tự nhiên đối với *Agrobacterium* và như vậy hoàn toàn không biến dạng theo kiểu này được. Do đó người ta tính đến sự phát triển theo một hệ thống khác - chẳng hạn như AND ngoại lai và protoplast thực vật. Song hệ thống protoplast cũng có những điểm thường yếu ớt và tạo ra cây cần cỗi do đưa AND được ít nên khả năng lai tạo rất thấp và mặt khác lại không được nguyên vẹn, phải phá màng và thành tế bào để lại ghép.

Biện pháp đơn giản hơn là tiêm AND ngoại lai trực tiếp vào tế bào. Song tiêm trực tiếp như vậy không có hiệu quả vì:

* Kim nhỏ dễ gãy và tắc.

* Tỷ lệ AND ngoại lai tổng hợp vào bộ gen tế bào chủ rất thấp.

Tiêm khoảng 10.000 tế bào mới hy vọng được một tế bào có gen mới.

Để nâng cao hiệu quả tổ hợp gen, Joh Sanford ở trường Đại học Tổng hợp Cornell - đã đề nghị dùng biện pháp bắn phá liên tục các nguyên liệu gen vào các tế bào thực vật. Tác giả đã dùng viên đạn khối lượng có đường kính $1-2\mu\text{m}$ và phủ AND ngoại lai. Làm tăng nhanh dần tốc độ (gia tốc), những viên đạn kim loại này xuyên vào thành tế bào nguyên liệu và phân tán AND trong bào tương.

Năm 1987, người ta cải tiến bằng viên đạn bạch kim để đánh phá tế bào thực vật. Về sau, các nhà nghiên cứu đã dùng súng bắn với những viên đạn bằng vàng và được đẩy đi bởi sự bốc hơi của giọt nước. Tất cả các loại súng bắn gen đó được dùng để tạo ra những cây trồng có những đặc tính mới mong muốn. Hiện nay, người ta đang dùng súng bắn gen để cải tạo cây lúa mì.

Công nghệ gen cũng có khả năng tạo ra những thức ăn khỏe mạnh. Các gen đối với những protein có phẩm chất dinh dưỡng siêu đẳng được tách ra, rồi có khả năng gài những gen đó vào cây trồng. Cây này có thể sản xuất ra những chất hoá học đặc

biệt như tinh bột, các enzym. Tuy nhiên việc làm này vẫn có một vài hạn chế, đó là:

- Công nghệ gen chỉ cải tiến một số điểm liên quan tới sự biểu hiện không quá 3-5 gen.

- Một vài cây trồng không thích ứng với những phương pháp chuyển gen hiện hành và đôi khi sự tách rời gen có ích để chuyển cũng gặp những khó khăn.

Tóm lại, áp dụng công nghệ gen trong trồng trọt, con người trên thế giới đã đạt được một số thành tựu sau:

- + G.Glili đã dùng vi khuẩn E.Coli để chiết xuất lấy enzym làm nhiệm vụ tổng hợp lysin, sau đó đưa vào khoai tây và thuốc lá. Kết quả mức lysin trong khoai tây tăng ở củ 5 lần, ở lá 4 lần và ở thân 3 lần. Bằng cách này người ta đang lần lượt thao tác gen tới cả 9 axit amin khác - loại axit amin cần thiết phải cung cấp đủ thức ăn. Do đó loại khoai tây này trở nên hết sức quý giá.

- + Ở Mỹ cũng thành công khi tạo ra những quả cà chua chín mọng mọng trên các cành nho. Cà chua loại này ít bị thối hỏng, quả to và chất lượng không thua kém loại cà chua thường.

- + Ngày nay, người ta dùng kỹ thuật sinh học để tạo bông có màu sắc tự nhiên.

red Version - <http://www.simpopdf.com>
+ Ở Pháp người ta cũng tạo được cây ngô to cao hơn người bằng thao tác di truyền.

Trong 20 - 30 năm lại đây, kỹ thuật gen và công nghệ sinh học đang làm đổi mới nền nông nghiệp trên toàn thế giới. Với kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào, phương pháp chọn lọc dòng xoma, kỹ thuật dung hợp protoplast và đặc biệt sử dụng công nghệ gen trong tái tổ hợp AND, người ta đã đưa vào cây trồng những nguyên liệu di truyền mới, những gen có ích để làm thay đổi cơ bản những loài cây trồng, tạo ra một loạt các giống mới có năng suất cao hứa hẹn những vụ mùa bội thu.

3. Bảo vệ cây trồng bằng công nghệ gen

a. Tạo giống để chống các bệnh về virus

Tạo giống để chống các bệnh về virus tức là tăng sức đối kháng của cây trồng với virus.

Cây trồng khi bị nhiễm virus hầu hết là giảm thu hoạch, sinh ra thất thoát hoặc tai hoạ. Trước kia người ta chỉ cách vệ sinh trang trại tốt, trồng trọt luân canh, diệt cỏ dại và dùng thuốc trừ sâu để giảm bớt tác nhân trung gian truyền virus.

Gần đây, trên cơ sở hiểu biết về di truyền trong kháng virus cây trồng, người ta thấy rằng: sự lây nhiễm cho thực vật với dòng ôn hoà của virus đã bảo vệ nó khỏi sự nhiễm trùng tiếp theo bởi dòng

độc. Rõ ràng sự nhân lên của dòng virus ôn hoà ngăn cản dòng độc lây nhiễm. Các nhà nghiên cứu đã áp dụng sự "bảo vệ chéo" đó để che chở cho cà chua trồng trong vườn chống lại sự lây nhiễm một số loại virus.

Hai nhà nghiên cứu người Mỹ, Roger Beachy ở trường Đại học Tổng hợp Washington và Stephen Roger ở Monsanto áp dụng gen cấu trúc lên một vector để đưa vào cây thuốc lá và cây cà chua một protein phủ mặt ngoài của virus khảm thuốc lá. Cây trồng biến đổi như thế đã được tiêm một lượng lớn virus. Những cây đó đã được đối kháng rất mạnh mẽ với nhiễm trùng và như vậy xác định giả thuyết ban đầu của Beachy là đúng - đó là do một thành phần đơn giản của virus có thể sử dụng để bảo vệ được sự tấn công của virus.

Sau đó người ta nhận thấy, sự biểu hiện của protein phủ mặt ngoài virus khảm thuốc lá chỉ có tác dụng đối kháng được với những dòng virus khảm thuốc lá và một vài dòng khác liên quan chặt chẽ đến virus đó mà thôi.

Ngày nay, sự biểu hiện một protein phủ mặt ngoài của virus nào đó có thể sử dụng được chống virus đó ở thực vật đã trở thành một cơ chế chung để bảo vệ cây trồng khỏi bệnh virus.

Trên cơ sở đó, cho đến bây giờ các nhà nghiên cứu đã tạo ra được hàng tá vector gen bằng công nghệ gen để phòng chống các bệnh virus khác nhau của cây.

Ngoài các phương pháp trên, người ta còn có phương pháp tạo giống cây trồng sạch bệnh bằng nuôi cấy mô tế bào từ mô phân sinh ở đỉnh chồi vì mô này không bao giờ nhiễm virus.

b. Tạo giống để chống côn trùng, sâu bọ

Sự đề kháng chống côn trùng phá hoại cây trồng cũng là một trong những mục tiêu quan trọng đối với công nghệ gen, đặc biệt là những cây trồng như bông, khoai tây, ngô.

Người ta đã dùng vi khuẩn *Baccillus thuringiensis* sản xuất ra protein chống côn trùng. Vi khuẩn này đã làm chết hàng loạt sâu tơ, sâu róm.

Các chế phẩm *Baccillus thuringiensis* đặc hiệu cao với các côn trùng thuộc loài bướm - những loài cây gây thiệt hại mùa màng lớn cho nhà nông.

Cơ chế hoạt động phân tử của protein *Baccillus thuringiensis* như sau:

Protein *Baccillus thuringiensis* liên kết với những receptor đặc hiệu được khu trú trên màng ruột của những côn trùng gây hại. Sự liên kết đó gây cản trở cho dòng vận chuyển ion vào trong tế

bào biểu mô ruột và như vậy làm mất khả năng ăn uống dinh dưỡng của côn trùng. Những thuốc trừ sâu thiên nhiên này không gây độc hại cho người và động vật thậm chí ngay với cả các loài côn trùng khác. Mặt khác tính chất có ích của thuốc trừ sâu *Baccillus thurin-giensis* thường bị hạn chế vì dễ dàng bị rửa sạch khỏi cây, nhưng hiệu quả của chúng trên đồng ruộng lại thường được kéo dài.

Giữa năm 1980, công nghệ gen của một vài hãng lớn như hãng Hệ thống gen thực vật ở Bỉ, hãng Di truyền nông nghiệp ở Middleton... đã thành công trong việc tách rời các gen vi khuẩn mã hoá các protein thuốc trừ sâu. Họ đã dùng súng có *Agrobacterium tumefaciens* được gắn những gen tách rời trên để bắn vào khoai tây, cà chua và bông. Lúc đầu những gen này biểu hiện nghèo nàn. Những protein *Bacillus thuringiensis* được cây trồng sản xuất ra chỉ giết những côn trùng phóng thí nghiệm nhạy cảm.

Các nhà khoa học Monsanto như David Fichhoff và Frederick Perlak đã cải tiến. Họ xem xét kỹ lại gen vi khuẩn nguyên thủy để bắt chước chặt chẽ hơn đoạn AND thực vật. Một sự cải tiến nhỏ đó đã làm tăng lên sự kiểm tra côn trùng một cách mạnh mẽ. Hai năm thử nghiệm trên đồng ruộng đã xác định rằng sự có mặt của các gen *Baccillus thurin-*

giensis đó trong cây bông đã kiểm tra một cách có hiệu quả tất cả những hư hại của đại bộ phận các loài bướm, sâu bao gồm cả các nang trứng của chúng. Những cây bông được thực hiện công nghệ gen đó đã làm giảm hẳn việc sử dụng thuốc trừ sâu từ 40 đến 60%.

Các nhà khoa học đã sàng lọc một cách mở rộng đối với những dòng *Bacillus thuringiensis* tự nhiên. Những dòng đó có hiệu quả trên các côn trùng khác hơn là loài bướm. Họ đã chọn được một dòng dẫn ra một gen - gen đó có hiệu quả chống lại loài gián cánh cứng khoai tây Colorado. Mùa xuân năm 1991, Russet Burbank đã ghép gen kiểm tra loài bướm cánh cứng này trên khoai tây và đã thử ở 1 vài nơi của Maine và Oregon. Họ đã tìm thấy khoai tây có thể miễn dịch đặc biệt với loài gián cánh cứng này.

Bacillus thuringiensis có thể còn cho một số gen khác kiểm tra sự hư hại của thực vật. Các nhà khoa học ở tổ hợp Mycogen San Diego đã phát hiện một gen *Bacillus thuringiensis* chống giun tròn ký sinh thực vật và một gen chống muỗi. Hiện nay các nhà khoa học đang cố gắng sản xuất protein trừ muỗi (mosquitocidal protein) ở tảo để sử dụng vào biện pháp chống sốt rét.

Tính đặc hiệu của protein *Bacillus thuringiensis* và sự khu trú của nó trong các mô nói trên khiến các protein này chỉ chống lại côn trùng tấn công. Protein khu trú nội bào này chắc chắn không bị rửa sạch và thuộc loại thuốc trừ sâu an toàn nhất.

c. Tạo giống cây thích hợp với các loại thuốc trừ cỏ dại

Bên cạnh đề kháng virus, côn trùng, sâu hại cây trồng còn phải chống đối với cả các loài cỏ dại. Cỏ dại cạnh tranh độ ẩm, thức ăn, ánh sáng với cây trồng và làm giảm năng suất cây trồng có khi tới 70%.

Trước đây người ta phối hợp thuốc diệt cỏ với trồng tỉa cẩn thận để hạn chế cỏ dại. Một vài chất hoá học khác cũng thường được dùng trong trồng trọt.

Công nghệ gen có thể kiểm soát một cách hữu hiệu cỏ dại. Người ta đã tạo ra những cây trồng có thể làm nguyên liệu sản xuất ra thuốc trừ cỏ dại với phổ rộng đơn giản và an toàn cho môi trường. Sử dụng được công nghệ này vào cây trồng sẽ làm cho nông nghiệp giảm được một lượng lớn thuốc hoá học trừ cỏ dại.

Có 3 hướng công nghệ để tạo ra thuốc trừ cỏ dại:

* Các nhà nghiên cứu ở Monsanto và Calgene

thuộc David California đã tiến hành công việc trên nhữn_g cây để tổng hợp glyphosate - một thành phần hoạt động của thuốc trừ cỏ đại tên là Roundup. Roundup là thành phần của phổ rộng có thể kiểm tra cỏ dại to lá và cỏ dại mọc dày.

Cơ chế phân tử của Roundup diệt cỏ dại chính là ở chỗ nó ức chế hoạt động của enzym tổng hợp EPSP-enzim này tham gia trong việc sản xuất axit amin thơm cần cho sự lớn lên của cỏ dại.

Các nhà khoa học đặc biệt thích Roundup bởi vì nó là một trong những thuốc trừ cỏ dại hấp dẫn. Nó không làm ảnh hưởng tới động vật, bởi vì động vật không có cơ chế tổng hợp axit amin thơm. Hơn nữa Roundup lại thoái hoá nhanh chóng trong môi trường để trở thành thành phần tự nhiên, vô hại.

Năm 1983, các nhóm đứng đầu là Luca Comai và David Stallker của Calgene cũng như Rogers và Ganesh Kishore của Monsanto đã tách được gen của enzym tổng hợp EPSP từ vi khuẩn và cây trồng. Họ cũng đã so sánh các gen đó trong việc sản xuất ra các protein - những protein khử được tính nhạy với Roundup.

Sau đó các nhà nghiên cứu đã cấu trúc được những gen đã sản xuất ra lượng các protein đó lớn hơn trong cây trồng, rồi đưa vào cà chua, đậu,

bông, cây cải dầu và một số cây khác. Những thử nghiệm đã được tiến hành trong 3 năm ở Mỹ, Canada và châu Âu cho thấy cây trồng đã có thể chấp nhận Roundup ở mức kiểm soát được cỏ dại một cách có hiệu quả.

* Các nhà nghiên cứu ở Du pont đã dùng kỹ thuật nghiên cứu tương tự để tiến hành công nghệ gen hoá những cây trồng có thể dung hòa loại thuốc diệt cỏ Sunfonylurea.

Các nhà khoa học ở Hệ thống di truyền thực vật và Hãng Hoechst - Đức đã có một hướng tìm kiếm khác về dung thứ - thuốc diệt cỏ. Từ vi khuẩn *Streptomyces hygrosopicus* họ đã tách ra một gen để enzym đó ức chế thuốc diệt cỏ được gọi là Basta. Basta làm ảnh hưởng tới con đường của enzym tổng hợp glutamin trong cỏ dại và can thiệp vào sự lớn lên của chúng. Những cây trồng trong đó có gen làm ức chế Basta trước khi gây hại có thể xảy ra. Những thử nghiệm trên đồng ruộng được tiến hành trên những cây trồng dung thứ Basta chứng tỏ hiệu quả của công nghệ này.

d. Tạo giống cây có quả ít bị hư hại

Trong lĩnh vực bảo vệ quả ít bị hư hại, công nghệ gen cũng đang phát huy tác dụng.

Chẳng hạn các nhà nghiên cứu đã xác định và

tách được một số gen đóng vai trò trong sinh tổng hợp ethylen - một phân tử liên quan đến sự chín của hoa quả.

Sự hỏng được kéo chậm lại cho phép có thể thu hái muộn đi, có khi cải thiện được mùi vị tốt hơn và thậm chí cải thiện được cả phẩm chất dinh dưỡng của hoa quả.

Để tăng nguồn thu hoạch quả, các nhà nghiên cứu đã phát triển hai phương pháp di truyền sau:

- Một là, gài đoạn dịch mã antisen của gen chín. Phân tử antisen liên kết ARN thông tin (mesenger) để tắt gen. Athanasios thoelosis ở California và Don Grierson - Trường đại học tổng hợp Nottingham đã chứng minh rằng, sự làm nhũn quả của cây cà chua với những gen antisen chống lại sự làm nhũn.

- Thứ hai, một nghiên cứu khác của nhà khoa học Monsanto là Kishore và Harry Klee, đưa một gen vào cây cà chua. Gen này làm cho cà chua sản xuất ra một loại enzym làm thoái hoá thành phần tiền chất hình thành ethylen và như vậy sẽ làm cà chua chậm chín và không bị hư hại.

Gần đây, các nhà khoa học Mỹ đã nghiên cứu kỹ thuật gen để bảo quản hoa quả khỏi bị thối. Theo kỹ thuật này, người ta cấy vào cây một gen vi

khuẩn. Nó sẽ sản sinh ra một chất gọi là Chitinase tiêu diệt các tế bào nấm. Họ đã thu được kết quả quan trọng trong việc đưa gen Chitinase vào cây cà chua, khoai tây, rau diếp và các giống cây tương tự. Song chưa làm được đối với lúa, lúa mì, ngô và các cây có hạt khác.

B. SỬ DỤNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH CÔN TRÙNG

1. Khái niệm

Vi sinh vật gây bệnh côn trùng bao gồm nấm, vi khuẩn, virus, rickettsia, động vật nguyên sinh, tuyến trùng, động vật đa bào.

Nấm là một loại vi sinh vật gây bệnh có thể làm cho côn trùng chết, thuộc các chi trong bộ mốc sâu, ngành phụ nấm tiếp hợp vào các chi trong các bộ của ngành phụ nấm bất toàn. Trong đó nhiều loài thuộc các chi *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Entomophthora*, *Coelomyces* có thể gây dịch bệnh cho sâu hại và có tác dụng khống chế tự nhiên.

Vi khuẩn gây bệnh côn trùng bao gồm các loài trong họ vi khuẩn que bào mằm (*Bacillaceae*), nấm que ruột (*Enterobacteriaceae*), vi khuẩn đơn bào giả (*Pseudomonadaceae*). Trong các loài đó có loài chuyên ký sinh, có loài kiêm ký sinh. Chúng được sử dụng nhiều nhất là các loài thuộc chi vi khuẩn

que bào tử mầm (Bacillus). Vi khuẩn này sản sinh ra chất độc dạng tinh thể có khả năng tiêu diệt côn trùng rất nhanh, hiệu quả phòng trừ có thể lên tới trên 90%.

Virus gây bệnh côn trùng đã được phát hiện và nghiên cứu khá lâu. Vào những năm cuối thế kỷ XX người ta đã lợi dụng virus khống chế sâu hại. Năm 1975, người ta phát hiện chúng ký sinh trên 700 loài côn trùng và nhện u. Chúng tập trung vào các loài thuộc bộ cánh vẩy. Trong lâm nghiệp thường sử dụng virus dạng que, virus đa diện tế bào chất (CPV), gần đây người ta đã sử dụng các loài virus đa diện nhân (NPV) và virus dạng cầu (GV). Virus dạng que là virus không đẳng trục. Virus dạng đa diện có thể có nhiều mặt đối xứng nhau, có loại 12 mặt có loại 4 mặt có loại 3 mặt hoặc hình lập phương hoặc hình không có qui tắc. Hình dạng của chúng khác nhau tùy theo các loài côn trùng. Độ lớn của virus cũng khác nhau tùy theo loài côn trùng, nói chung biến đổi từ 0,5-1,5 μ m, phần lớn chỉ có 3 μ m.

Tuyến trùng thuộc lớp tuyến trùng (Nematoda) ngành động vật hình sợi (Nematelminthes) động vật không xương sống. Tuyến hình trùng sợi, bề mặt có lớp kitin không chia các đốt. Trong vòng đời có hiện tượng lột xác, có xoang và hậu môn, đường

tiêu hoá được chia ra ruột trước, ruột giữa và ruột sau. Tuyến trùng ký sinh sau khi xâm nhập vào thể xoang của sâu non, nhộng và sâu trưởng thành giết chết nhiều loài sâu hại. Tuyến trùng gây bệnh cho côn trùng có 3142 loài thuộc 27 họ. Trong phòng trừ người ta chú ý đến các họ Mermithidae, Neotylenchidae, Steinernematidae.

2. Những biểu hiện bệnh côn trùng

Sau khi ủ bệnh là giai đoạn biểu hiện bệnh. Triệu chứng và bệnh trạng đều là hình thức biểu hiện của bệnh. Triệu chứng là hiện tượng không bình thường biểu hiện ra do sự tồn tại của vật gây bệnh và thay đổi kết cấu vật chủ; bệnh trạng là những phản ứng khác thường về hành vi và chức năng của vật chủ đối với vật gây bệnh. Quan sát và hiểu biết về triệu chứng và bệnh trạng là rất quan trọng để chuẩn đoán và nghiên cứu chức năng bệnh lý. Nhiều người hợp nhất triệu chứng và bệnh trạng với một tên chung triệu chứng tổng hợp (Syndrome). Cũng có những người tách ra. Nhưng điều quan trọng là ghi chép được các hiện tượng bệnh.

Triệu chứng bệnh bao gồm các hiện tượng sau:

Phát dục không bình thường

Biểu hiện ở chỗ phát dục kéo dài, thân sâu gây yếu, đầu to, thân nhỏ. Một bộ phận trong quần thể

côn trùng bị bệnh, do phát dục không như nhau mà biểu hiện tuổi sâu không đồng đều.

Hành vi không bình thường

Khi bị bệnh côn trùng thường bị kích động. Sau khi bị bệnh côn trùng bước vào ngủ nghỉ sớm, thiếu phản ứng với môi trường ngoài hoặc có thể côn trùng bị bệnh di chuyển từ nơi nghỉ đến một nơi khác, như bò lên trên cao để chết.

Tiêu hoá không bình thường

Côn trùng bị bệnh thường ăn ít, hoặc ngán ăn, có lúc biểu hiện nôn ra hoặc tiết dịch thể từ hậu môn, cũng có khi phân khô, thành các viên nhỏ dính vào hậu môn, màu phân khác thường.

Màu sắc khác thường

Sự biến màu thân sâu thường do nhiều nguyên nhân: (1) Do tồn tại các vật gây bệnh trên thân côn trùng, như nấm vi khuẩn chứa đầy bào tử trên cơ thể vi khuẩn có màu trắng sữa, nấm bạch cương có màu trắng, nấm lục cương có màu xanh, nấm hồng cương có màu đỏ...; (2) Do vi sinh vật tạo ra các sắc tố làm cho côn trùng biến màu, như nấm *Serratia marcescens* sinh ra sắc tố màu đỏ làm cho xác sâu biến màu đỏ; (3) Do phản ứng phòng ngự của côn trùng tạo ra sắc tố đen, thường trên thân sâu bị bệnh có các đốm đen.

Biến đổi bệnh trong mô và tế bào

Do vật gây bệnh khác nhau, các cơ quan mô côn trùng và bộ phận tế bào biểu hiện không bình thường. Cho nên khi chẩn đoán bệnh, giải phẫu thân côn trùng cần giải phẫu các bộ phận khác nhau để xác định nguyên nhân; ví dụ nấm mốc sâu (*Entomophthora aulicae*) khi xâm nhiễm ban đầu phá hoại thể lipit của côn trùng, làm cho thể lipit trong tế bào bị khô và bị phân giải, nhưng khi chúng bị virus NPV xâm nhiễm các mô nhạy cảm là mô mỡ, tế bào da và tế bào gốc khí quản, nhân tế bào phình lên trong đó chứa nhiều NPV. CPV xâm nhiễm vào ruột giữa cơ thể côn trùng làm cho ruột giữa phình lên, virus hình thành trong tế bào chất. Những biến đổi trong tế bào côn trùng có lúc không phải do ảnh hưởng trực tiếp, có lúc do tế bào thể mỡ bị biến đổi ảnh hưởng đến đường tiêu hoá làm cho sâu ngừng ăn và quá trình biến đổi đó càng nhanh, lúc này chúng chỉ dựa vào năng lượng tự có.

Những triệu chứng khác

Ngoài những triệu chứng trên, côn trùng có biểu hiện một số triệu chứng khác như hệ thống sinh dục bị ảnh hưởng làm cho lượng trứng giảm, biến đổi màu sắc làm cứng thân (như nấm bạch cương)

hoặc mềm nhũn (như vi khuẩn và virus), có mùi thối thối...

Đường xâm nhập

Vật gây bệnh từ ngoài vào cơ thể côn trùng bằng một số con đường, ta có thể chia ra ba loại:

- Xâm nhập qua đường tiêu hoá

Trong ruột côn trùng, ruột giữa là hệ thống yếu nhất của cơ thể, nhiều vật gây bệnh đều thông qua ruột giữa để xâm nhập vào trong cơ thể, vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh, rickettsia và một số tuyến trùng thường xâm nhập qua con đường này. Sự hình thành đường tiêu hoá là do tầng phôi ngoài của hai đoạn đầu và sau của phôi lồm vào trong dạng hình ống mà thành về sau mới phát dục thành ruột trước, ruột giữa và ruột sau. Vì vậy đoạn trước và sau của ruột có tầng biểu bì kitin hoá, khả năng phòng ngự mạnh, còn đoạn ruột giữa bắt nguồn từ tầng phôi trong thiếu mất tầng biểu bì kitin, vật gây bệnh thường xâm nhập qua màng này để vào cơ thể.

- Xâm nhập qua da

Bào tử nấm sau khi nảy mầm thành ống mầm nhờ tác dụng của enzym và áp lực cơ giới xuyên qua da côn trùng. Các loài có da mỏng mềm như ruồi, muỗi, nhện nấm có thể xâm nhập trực tiếp. Một số

loài có da dày, nhưng giữa các đốt lại rất mỏng nên chúng chỉ có thể thông qua các nơi này để xâm nhập. Các lỗ thở của côn trùng cũng là nơi sợi nấm có thể xâm nhập vào cơ thể.

- Thông qua trứng côn trùng

Trước đây, người ta đã từng tranh luận về cách virus gây bệnh. Ngày nay, hầu hết đã chứng minh được virus xâm nhập và lây lan thông qua trứng côn trùng rồi truyền cho các lứa sau gọi là lây truyền thẳng đứng. Phương thức lây lan thường có 2 loại: virus thông qua bên trong trứng để truyền cho thế hệ sau gọi là lây truyền trong phôi; virus dính vào trứng côn trùng khi trứng nở sâu non ăn vỏ trứng nuốt phải virus rồi bị nhiễm bệnh gọi là lây nhiễm bề mặt trứng. Virus lây qua trứng có tính tiềm ẩn trong cơ thể côn trùng cho đến khi sâu trưởng thành đẻ trứng, rồi xâm nhập các tuyến phụ của bộ máy sinh dục, cho nên thông qua giao phối côn trùng cũng lây bệnh.

Cơ chế gây bệnh:

Không phải như thuốc hoá học, vi sinh vật gây bệnh phải trải qua một số quá trình sinh lý phức tạp, trong vật chủ chúng tiến hành trao đổi chất theo hướng nhất định, bao gồm sự hấp thu vật gây bệnh đồng hoá trong dịch thể vật chủ, phân giải và

phá hoại các mô cơ quan, sản sinh chất độc gây ảnh hưởng cơ quan sinh lý, phần lớn các vật gây bệnh bịt chặt các cơ quan và ảnh hưởng đến tác dụng hô hấp của côn trùng.

Ảnh hưởng đến tác dụng hô hấp:

Hầu hết vật gây bệnh sinh sản dựa vào năng lượng của tế bào vật chủ. Những côn trùng bị bệnh lượng ôxy tiêu hao mất nhiều làm cho hô hấp vật chủ tăng nhanh, sự sinh sản của vật gây bệnh cũng tăng lên. Sự tiêu hao ôxy là dấu hiệu của sự trao đổi chất, là nhu cầu tổng hợp của tế bào vật gây bệnh.

Ảnh hưởng của tác dụng trao đổi chất của vật gây bệnh:

Hoạt động trao đổi chất của vật gây bệnh trong vật chủ đương nhiên ảnh hưởng rõ rệt đến sự trao đổi chất của vật chủ. Vi khuẩn que trong bộ hung không thể hiện sinh ra chất độc mà tác dụng gây chết của chúng là làm cho côn trùng đói và bịt các mô cơ quan côn trùng.

3. Nấm gây bệnh côn trùng

Nấm gây bệnh côn trùng tạo ra sự thay đổi bệnh và sự rối loạn chức năng trong cơ thể côn trùng.

Sự sinh sản trong cơ thể côn trùng làm cho hoạt

động trao đổi chất, các cơ quan mô bị phá hoại, mất chức năng sinh lý và phát sinh sự rối loạn.

Trước hết là sợi nấm trong xoang sinh trưởng phát triển. Khác với virus và động vật nguyên sinh, nấm phải tiết các chất độc và enzym để giết chết vật chủ rồi sinh trưởng phát triển trên xác côn trùng, hình thành các hạch nấm làm cho côn trùng cứng lại; một số loại nấm không tiết ra chất độc mà sinh sản hàng loạt trong cơ thể côn trùng và không xâm nhiễm vào các cơ quan của côn trùng mà sau khi sâu chết mới làm vỡ và biến dạng các cơ quan. Hầu hết chúng có tính xu mỡ, tập trung quanh cơ quan thể mỡ, sau khi sâu chết chúng mới làm biến đổi thể mỡ.

Nấm xâm nhập vào cơ thể côn trùng luôn luôn xuất hiện phản ứng biến màu đen, hình thành các đốm đen. Sự hình thành các đốm đen là do enzym phenoloxydaza trong dịch thể côn trùng.

Sự sinh sản của nấm trước hết là sự biến đổi thành phân dịch thể làm giảm tác dụng ôxy hoá khử limfa trong máu. Do sinh sản nhiều nấm sẽ làm tắc hệ tuần hoàn côn trùng; gây rối sinh lý tế bào vật chủ; chất độc sinh ra làm thay đổi sinh hoá cơ thể và làm tê liệt thần kinh, từ đó làm mất đi và rối loạn cơ năng sinh lý. Chúng sẽ biểu hiện hô hấp

thất thường, giảm sức sinh sản, ức chế sự lột xác. Nhộng ngài, tằm trời sau khi bệnh nấm mốc sâu tiêu hao lượng oxy xuống 7 lần; sâu non bọ lá khoai tây sau khi bị bệnh nấm bạch cương độ hô hấp tăng lên nhiều lần. Phần lớn các nhà khoa học đều cho rằng sự hô hấp này là do tác dụng phản ứng của vật chủ đối với vật gây bệnh.

Sau khi tiêm chất độc của nấm cho sâu non chúng thường biểu hiện thay đổi biến thái của sâu và ức chế quá trình lột xác, cuối cùng làm cho sâu chết.

Sử dụng nấm bạch cương nhiễm vào nhiều loại sâu hại, sâu đều giảm sức sinh sản rõ rệt. Ngài đục táo, mọt cà phê sau khi phun chế phẩm nấm bạch cương tỷ lệ đẻ trứng của con cái giảm xuống 45-60%.

Sản xuất chế phẩm nấm gây bệnh côn trùng

Muốn sản xuất một chế phẩm nấm diệt sâu trước hết cần chọn hiệu quả của chúng, khả năng cất trữ, sử dụng an toàn, sau đó thông qua nghiên cứu thực nghiệm, sản xuất thử rồi đến sản xuất trong nhà máy.

Tính an toàn của chế phẩm nấm

Ngày nay, việc sản xuất chế phẩm nấm đã đến quy mô lớn, cho nên việc nghiên cứu tính an toàn

của nó là điều rất quan trọng. Một loài nấm trước khi đầu tư sản xuất cần phải có các số liệu về tính an toàn, thông qua một bộ phận có trách nhiệm phê chuẩn.

Nhìn chung, nấm thường phát triển trong điều kiện nhiệt độ thấp và không ảnh hưởng đến động vật máu nóng. Pian đã nêu rõ, nấm bạch cương trong cơ thể sống ở nhiệt độ 35°C , dù ở điều kiện độ ẩm nào đều ngừng phát triển và sau 28 ngày là mất khả năng sống, cho nên chúng rất an toàn đối với con người. Nhiệt độ thích hợp cho nấm mốc sâu khá cao, $27-36^{\circ}\text{C}$, cho đến nay chúng là bộ nấm duy nhất gây bệnh cho động vật máu nóng (người và ngựa). Nấm mốc xám gây bệnh cho ong mật (*Afumigalus*) sinh trưởng được ở nhiệt độ 45°C . Cho nên cũng là nấm gây bệnh cho người, chim và động vật có xương sống khác, dễ gây ra bệnh kết hạch phổi. Ngoài ra nấm mốc khức vàng (*Aspergillus flavus*) tiết ra chất độc aspergillin có thể gây ra bệnh ung thư, cho nên cần lưu ý khi sử dụng.

Nhiều thí nghiệm chứng tỏ nấm bạch cương là loại an toàn. Tuy nhiên người sản xuất chế phẩm nấm bạch cương thường có phản ứng nhạy cảm thể hiện mệt mỏi, nhức đầu, chóng mặt, ho, nhưng chỉ xảy ra trong thời gian rất ngắn. Mặc áo blouse và mang găng tay, khẩu trang đều có thể đề phòng

được. Cơ chế tác dụng của nó là protein của bào tử phân sinh kích thích cơ thể sinh ra sức đề kháng hình thành chất miễn dịch. Protein này có tác hại đối với cơ thể có thể gây viêm phổi, nhưng rời khỏi hiện trường trong thời gian ngắn có thể khôi phục sức khỏe. Ngoài ra trong không khí chỉ nên giữ nồng độ bào tử dưới $1\text{mg}/\text{m}^3$ không khí là có thể tránh được hiện tượng dị ứng.

Các loài nấm khác như *Nomurada*, *Hirsutella*, *Cephalosporium* cũng đều rất an toàn đối với động vật máu nóng.

Phần lớn các loài nấm trong môi trường không gây ô nhiễm bởi vì bản thân các sinh vật đó đã tồn tại trong tự nhiên, nếu lâu dài chúng sẽ tự phân giải và không ảnh hưởng đến cân bằng sinh thái.

Số loài nấm gây bệnh côn trùng không nhiều, đối với sâu có ích có tính an toàn ở mức độ nhất định. Một số loài nếu gặp nấm bạch cương khả năng bắt mồi có thể tăng lên. Nhiều loài côn trùng có ích không bị ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng phát triển.

Chuẩn bị giống nấm

Chế phẩm nấm phải được bắt nguồn từ giống tốt, giống tốt phải là độ độc cao, hiệu quả diệt sâu cao, dễ sản xuất và có thể bảo quản trong thời gian

lâu dài. Giống nấm không nên cấy truyền nhiều lứa. Nhiều thí nghiệm cho biết trong cùng một điều kiện giống nấm khác nhau hàm lượng bột nấm và độ độc khác nhau rất lớn, vì vậy cần tiến hành chọn ngoài tự nhiên và kịp thời làm khoẻ giống nấm áp dụng đột biến bằng kích thích ánh sáng, chọn ra một loạt các giống nấm tốt, lấy giống gần nơi sản xuất làm giống tin cậy để nâng cao chất lượng của giống nấm bảo đảm hiệu quả diệt sâu cao.

Theo nhiều nghiên cứu cho biết, dùng máy kích thích ánh sáng CO_2 chiếu sáng hiệu quả sẽ rất cao. Thông qua kích thích, có thể chọn được rất nhiều đặc tính tốt của giống nấm, tốc độ mọc cũng nhanh hơn số lượng bào tử cũng tăng gấp 2-4 lần, tính ưu việt có thể giữ được 3-4 thế hệ; hiệu quả diệt sâu tăng lên 20-40%, sâu cũng chết sớm hơn 2-3 ngày. Thực tiễn chứng minh đột biến ánh sáng chọn giống nấm là một biện pháp có thể làm tăng nhanh hiệu suất sản xuất chế phẩm, đảm bảo chất lượng và hiệu quả phòng trừ cao.

Thu hái nấm có hình thái thích hợp

Khác với thuốc hoá học, chế phẩm vi sinh vật là một vi sinh vật sống, trải qua cất trữ vẫn không mất hoạt tính. Nấm bất toàn nói chung rất thích

hợp với điều kiện cất trữ. Do sự lên men tầng sâu dịch thể trên cơ sở sản xuất bằng công nghệ hiện đại, nếu nuôi cấy tầng sâu thu được bào tử phân sinh, việc sản xuất khối lượng lớn chế phẩm nấm sẽ có ý nghĩa lớn. Nhưng trong nuôi cấy tầng sâu, nhiều loài nấm không hình thành bào tử thật mà hình thành nhiều bào tử mọc mầm (sợi nấm ngắn) và bào tử này rất khó bảo quản, dễ mất hoạt tính. Trong thùng lên men có thể thu được 2×10^9 bào tử trong 1ml chế phẩm dinh dưỡng và kỹ thuật lên men, nhưng chế phẩm này khi bảo quản còn một số vấn đề. Một số loài nấm có thể sử dụng loài bào tử nảy mầm để phòng trừ.

Khi sản xuất nấm mốc sâu có thể dùng sợi nấm, bào tử phân sinh và bào tử ngủ. Bào tử ngủ có thể tồn tại lâu trong tự nhiên dễ bảo quản và sản xuất được khối lượng lớn. Nhưng do bào tử ngủ nảy mầm không đều, kéo dài quá lâu nên không thể đáp ứng được nhu cầu sản xuất. Dùng bào tử phân sinh để sản xuất thì tuổi thọ quá ngắn, khả năng chịu đựng thấp. Nói chung dùng bào tử phân sinh để sản xuất không mấy giá trị. Cho nên không thể không dùng sợi nấm để sản xuất chế phẩm nấm. Điều mấu chốt của sản xuất chế phẩm bằng sợi nấm là mức độ làm khô chế phẩm rất chậm, phức tạp, nếu không cẩn thận sẽ làm cho nấm chết hàng loạt.

Khống chế nhiệt độ là khâu quan trọng của quá trình sản xuất. Nhiệt độ sản xuất cấp I và II là 24-28°C, môi trường cấp III phải thấp hơn, một mặt phải tránh nấm tạp, một mặt phải có ích cho sự hình thành bào tử. Khi sấy cần dùng tủ sấy quạt gió và ở nhiệt độ 30-35°C, nhiệt độ quá cao sẽ làm cho bào tử chết, môi trường dịch thể cấp II phải thông khí, nếu dùng máy lắc phải có tốc độ 100 lần phút, nếu dùng máy lắc vòng thì 180-200 vòng phút. Trong kỳ nuôi ở môi trường cấp III cần chú ý vi khuẩn que mầm, các loại nấm mốc gây ô nhiễm. Nếu nhiệt độ lên cao quá 30°C cần tìm biện pháp quạt thông gió và đảo nấm.

Yêu cầu dinh dưỡng của nấm bạch cương không nghiêm khắc lắm, nên chọn các nông sản phụ có giá thành rẻ để sản xuất. Cám là môi trường tốt để sản xuất chế phẩm. Trong khi sản xuất, trên môi trường các cấp đều có thể dùng cám làm nguồn nguyên liệu chính, có thể thêm một ít dinh dưỡng khác. Cấp I, II có thể thêm một ít đường mía, pepton và cao thịt bò, khi nuôi ở môi trường cấp III cần thêm nhiều trấu để thông thoáng hơn, càng thông thoáng càng hình thành nhiều tế bào.

Sản xuất bột chế phẩm nấm, nên dùng bột giấy rải trên mặt đất nhưng không nên phun mù và phun bột bằng máy. Cho nên muốn sản xuất chế

phẩm thành bột, lúc nghiền bột cần tránh làm máy nóng lên gây ảnh hưởng đến sức sống của bào tử, cũng cần tránh để bào tử nấm bay lung tung làm mất nhiều lượng bào tử. Lượng bào tử trong mỗi gam nên là 5.10^9 bào tử, hàm lượng nước không quá 10%.

Có thể dùng vại 500 lít sản xuất sau đó dùng máy lác tạo hạt có đường kính 1-1,4mm. Những hạt đó có thể dùng để phòng trừ sâu đục thân ngô. Có thể sản xuất theo hai bước: bước 1 lấy bào tử nuôi trong dịch thể cấy lên mặt cắm vào hạt gạo, để thu được sợi nấm và hình thành bào tử nhanh hơn. Chế phẩm sản xuất ra có thể biến thành thương phẩm Boverin.

Một cách làm khác: dùng phương pháp lên men trong thể rắn cho cả 3 cấp, sau đó sấy khô dùng nguyên lý phân lập gió xoáy tiến hành phân lập cơ giới, bỏ bớt chất tạp. Phương pháp này có thể thu được 15.10^{10} bào tử/g. Hàng năm có thể sản xuất được 4-5 tấn chế phẩm có chất lượng 12.10^{10} bào tử/g.

Ứng dụng nấm phòng trừ sâu hại

Nấm gây bệnh là một loại thiên địch của sâu, trong điều kiện thích hợp nấm có thể tồn tại, để cải thiện điều kiện môi trường xúc tiến sinh sản và

phát triển. Do nấm được sản xuất bằng phương pháp nhân tạo nên cần nấm vững thời cơ, trong một thời gian ngắn làm thế nào tăng nhanh số lượng trong tự nhiên. Phòng trừ sâu bệnh bằng nấm gây bệnh thông thường có 3 phương pháp:

- *Dẫn giống nấm*

Trong các điều kiện môi trường địa lý sinh thái bình thường, có thể dẫn giống nấm vào, để chúng tồn tại lâu dài trong quần thể loài sâu hại, làm cho sâu hại luôn luôn bị khống chế. Nấm thường có bào tử ngủ nghỉ để qua những điều kiện bất lợi. Trong điều kiện thiếu vật chủ, nấm có thể sống hoại sinh hoặc ký sinh vào vật chủ trung gian, trong điều kiện thích hợp cho nấm gây bệnh nhập nội sẽ dễ thu được thành công.

Nấm mốc sâu thường rất ổn định trong quần thể sâu hại trở thành một bệnh địa phương đối với côn trùng. Thông qua thả nấm cục bộ tạo ra một trung tâm gây dịch nấm cho côn trùng là biện pháp rất quan trọng trong phòng trừ sâu hại.

Khi nhập một giống nấm có thể sử dụng phương pháp nuôi côn trùng đã bị bệnh hoặc dùng một vật nuôi nấm để lây nhiễm nhân tạo. Nhưng khi sử dụng cần chú ý xác sâu bị bệnh mốc sâu thường lây lan bào tử vào ban đêm hoặc sáng sớm, những xác

sâu đã bay hết bào tử thì không thể có bào tử nữa nên không thể dùng để thả vào tự nhiên. Những xác sâu có bào tử ngủ nghỉ cũng không có khả năng hình thành bào tử phân sinh nữa. Cho nên cần tiêm chúng vào sâu mới sau 5 ngày sâu chết mới thả ra, như vậy sẽ thu được hiệu quả cao.

+ Cải thiện điều kiện môi trường, làm khoẻ hoá nấm địa phương.

Bệnh địa phương là bệnh truyền nhiễm phát sinh lâu dài, liên tục trên một loài quần thể vật chủ. Bệnh địa phương mang ý nghĩa khống chế sâu hại không chỉ có tính bền vững mà lúc có thời cơ thuận lợi thông qua lây lan để chuyển hoá thành bệnh dịch, từ đó kết thúc được dịch sâu hại. Thông qua cải thiện điều kiện môi trường có thể xúc tiến sự chuyển hoá này, làm tăng độ ẩm và nước là biện pháp có thể làm khoẻ hoá nấm địa phương như việc dẫn nước vào đồng ruộng làm cho bệnh tăng lên so với đối chứng.

Nếu có một số lượng vật chủ nhất định trong rừng sẽ có ý nghĩa quan trọng trong việc kéo dài bệnh địa phương, vật chủ là một trong những điều kiện quan trọng nhất để lây bệnh. Những khu vực phát sinh sâu róm thông đầu tiên, những vùng núi vòng quanh rừng thông thuần loài hoặc vùng khe

suối núi yên ngựa quanh hồ nước... là nơi phát sinh sâu róm thông, nơi tồn tại sâu róm thông liên tục, là điều kiện vật chủ cung cấp không ngừng cho thiên địch, nó không những là nơi làm khoẻ hoá bệnh mà còn là nơi dẫn nhập vật gây bệnh từ đó hình thành nơi cho bệnh địa phương phát triển.

Trong những vùng không có cây trồng duy trì vật chủ trung gian, cấy nấm mốc sâu cũng là một phương pháp làm khoẻ hoá bệnh côn trùng. Ví dụ trong vườn ươm trồng thêm các loài cây hấp dẫn rệp, những con rệp đó có thể có trước khi rệp hại vườn ươm đạt đến đỉnh cao, kết quả thiên địch của rệp hại cây trồng thêm sẽ chuyển dịch sang diệt rệp hại vườn ươm.

- *Sử dụng chế phẩm nấm diệt sâu:*

+ Thời cơ và điều kiện

Độ ẩm là yếu tố quan trọng cho nấm xâm nhiễm, phải nấm vững mùa có độ ẩm cao và môi trường có độ ẩm cao để thả nấm. Ở nước ta sử dụng máy phun thuốc hoặc dùng máy bay phun nấm Boverin phòng trừ sâu róm thông phải được tiến hành vào tháng 1 đến tháng 3, lúc này độ ẩm và nhiệt độ rất thích hợp, sức đề kháng của sâu cũng thấp. Một số vùng có hai mùa mưa rất ngắn, chỉ sinh sản trong điều kiện tự nhiên thường, số lượng nấm gây bệnh

côn trùng không đủ, mùa mưa qua đi không thể hình thành dịch bệnh. Cho nên cần phải nắm vững thời cơ, bổ sung nguồn nấm để tạo cho bệnh phát sinh gây dịch.

Một số vùng khô hạn việc phòng trừ sâu hại bằng chế phẩm nấm thường gặp khó khăn, song chỉ cần điều kiện đất đai thích hợp cho cây sinh trưởng, tổng hàm lượng nước thoả mãn nhu cầu của nấm, vì vậy trong vùng khô hạn công tác phòng trừ sâu hại trong đất cũng có những triển vọng. Côn trùng và đất thường có mối liên hệ chặt chẽ, một số loài côn trùng ngủ nghỉ trong đất cũng có, một số hoá nhộng trong đất, hầu hết chúng có quan hệ trực tiếp với điều kiện đất đai. Đó là thời cơ phòng trừ có hiệu quả. Ngoài ra một số loài mọt hại vỏ cây không ăn lá, khó nhiễm vi khuẩn và có thể dùng nấm để phòng trừ. Những nấm đó mọc tốt trong các lỗ mọt. Do đó nghiên cứu tiểu khí hậu để phát triển sử dụng nấm phòng trừ sâu là việc làm cần thiết.

+ Phương pháp thả nấm thường dùng:

Phương pháp sử dụng nấm là phun bột và phun mù. Phun mù nấm xâm nhiễm nhanh, phát bệnh sớm, tỷ lệ côn trùng chết cao, thích nghi với nơi có nguồn nước, những nơi có cây thấp. Phun bột

thường cho khả năng khuếch tán lớn, thời gian giữ lại trong rừng lâu, tiết kiệm nhân lực, giá thành thấp hơn phun nước. Phun nấm bằng thả pháo. Mỗi túi pháo chứa 0,5kg bột nấm, có thể khống chế 700m². Cách đặt pháo có nhiều cách, treo, ném. Những vùng thích nghi với hướng gió có thể đào hố nổ mìn mỗi hố đặt 10-15kg bột, có thể phòng trừ được sâu hại trên 1-1,5ha rừng.

Ở nước ta việc sản xuất chế phẩm Boverin đã được thực hiện ở nhiều tỉnh như Nghệ An, Thanh hoá, Viện Bảo vệ thực vật đã áp dụng phương pháp phòng trừ sâu róm thông cho hàng ngàn hecta bằng nổ pháo, nổ mìn, treo lên cây, phun mù, phun bột tại các tỉnh Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Ninh, Ninh Bình, Bắc Giang từ năm 1980; hiệu quả diệt sâu đều đạt trên 80%. Ngày nay chế phẩm này vẫn còn được sản xuất và có tác dụng phòng trừ rõ rệt.

Ngoài ra có thể thả sâu bị bệnh nấm (dùng dịch nấm tẩm sâu rồi thả vào cây rừng) chúng có thể lây bệnh. Cũng có người dùng rơm buộc cây lại rồi phun nấm Boverin, khi sâu non ngủ nghỉ qua đông nhiễm nấm sẽ bị nhiễm bệnh. Một số vùng dùng chế phẩm Boverin phòng trừ sâu đục quả đậu bằng cách phun vào đất làm cho sâu non khi chui vào đất bị bào tử nấm xâm nhiễm, tỷ lệ sâu chết lên tới

50-70%. Hầu hết các loài sâu ngủ nghỉ qua đông sử dụng chế phẩm Boverin phòng trừ hiệu quả sẽ rất cao.

Đối với sâu dưới đất ta thường dùng chế phẩm rắc lên mặt đất. Sau 4 năm số lượng quần thể sâu hại giảm xuống rõ rệt.

+ Phun chế phẩm nấm bằng máy bay

Việc phòng trừ sâu róm thông bằng máy bay cần một số yêu cầu sau:

. Hàm lượng bào tử phải cao: mỗi gam chế phẩm phải đạt 10.10^9 bào tử sau khi phun phải có độ bám tốt, độ ẩm của chế phẩm phải dưới 15%.

. Kỹ thuật phun phải cao; thời cơ phun chế phẩm phải ở độ ẩm trên 80%, nhiệt độ phải trên 20°C , nói chung vào tháng 1-3 là thích hợp.

. Phun mù bằng thuốc dầu sữa cao hơn phun bột. Lượng bào tử liên quan chặt chẽ với tỷ lệ chết của sâu róm thông.

4. Sử dụng vi khuẩn gây bệnh côn trùng

Côn trùng chết trong tự nhiên chiếm 80-99%, trong đó hầu hết chết do vi sinh vật, mà vi khuẩn là loại vi sinh vật chiếm đa số. Do đó, trong điều kiện tự nhiên, vi khuẩn có tác dụng không nhỏ trong việc điều chỉnh số lượng quần thể sâu hại. Trong

đó một số quần thể vi khuẩn đã được sản xuất thành chế phẩm dùng để phòng trừ sâu hại rừng.

Người ta đã phát hiện hàng trăm loài vi khuẩn có quan hệ với côn trùng, trong đó có khoảng 90 loài gây bệnh. Hầu hết chúng thuộc họ nấm que (Bacillaceae) có phản ứng gram dương, họ vi khuẩn que ruột (Enterobacteriaceae) có phản ứng gram âm, trong bộ vi khuẩn thật (Eubacteriales) và họ vi khuẩn đơn bào giả (Pseudomonadales). Trong phân loại còn loại vi khuẩn tựa hình que phản ứng gram âm, gây bệnh cho côn trùng chưa được xác định và tạm xếp vào họ vi khuẩn tựa hình que (Bacillaceae).

Dựa vào mức độ ký sinh của vi khuẩn trên vật chủ người ta chia ra vi khuẩn chuyên ký sinh, vi khuẩn kiêm ký sinh, vi khuẩn tiềm ẩn.

- *Vi khuẩn chuyên ký sinh.*

Trong tự nhiên chúng sinh sản trong cơ thể côn trùng. Muốn sinh sản cần có điều kiện đặc biệt. Do đó chúng rất khó phát triển trong môi trường nhân tạo. Những loại này có phạm vi vật chủ hẹp, lây lan qua đường miệng. Ví dụ vi khuẩn bào tử mầm bọt hung *Bacillus popiliac*, *B.lentimorbus*.

- *Vi khuẩn kiêm ký sinh.*

Chúng sinh sản ngoài cơ thể côn trùng, không

đòi hỏi những điều kiện đặc biệt, cho nên có thể nuôi cấy trong môi trường nhân tạo, sinh sản trong ống tiêu hoá, làm tổn thương các mô vật chủ, đồng thời hình thành chất độc trong xoang máu côn trùng. Nếu chất độc đó vào trong ống tiêu hoá, dù vi khuẩn không sinh sản cũng có thể làm cho côn trùng chết. Ví dụ vi khuẩn que hình thành mầm và tinh thể (*Bacillus thuringiensis*).

- *Vi khuẩn tiềm ẩn.*

Trong tự nhiên vi khuẩn sinh sản ngoài cơ thể côn trùng, có thể phát triển trong môi trường nhân tạo giống như loại vi khuẩn trên. Tuy nhiên do chất độc và enzym rất ít nên chúng không thể xâm nhập vào xoang máu để gây hại. Nếu thông qua một phương pháp tác động nào đó làm cho vi khuẩn vào được xoang máu là có thể sinh sản gây ra bệnh bại huyết. Số loài côn trùng chết theo kiểu này rất nhiều.

Trong 3 loại vi khuẩn trên 2 loại đầu đã được ứng dụng để phòng trừ sâu hại ngoài đồng ruộng. Những loài không có mầm trong tự nhiên khi bị bệnh bùng phát, chúng có thể tiêu diệt hàng loạt sâu hại, nhưng trong điều kiện khô hạn ánh sáng nhạy cảm, sự thay đổi độ độc lớn, loại vi khuẩn này làm thế nào để sử dụng có hiệu quả là vấn đề cần

được nghiên cứu giải quyết. Nếu dùng cùng với thuốc trừ sâu, hiệu quả vẫn không được ổn định.

Trong tự nhiên những loài vi khuẩn gây bệnh không phải đều có thể tạo thành chế phẩm trừ sâu mà cần có một số tính chất cơ bản về độ độc, tính ổn định, khả năng lây lan, tác dụng nhanh, chọn lọc tốt, có thể sản xuất hàng loạt, hiệu quả kinh tế và an toàn khi sử dụng.

Vi khuẩn gây bệnh chuyên ký sinh

- Vi khuẩn sữa

Có một loài vi khuẩn hình que nẩy mầm gây bệnh cho sâu non bọ hung. Căn cứ vào nhiều tài liệu trên thế giới, các vùng khác nhau phân lập ra nhiều loài vi khuẩn gây bệnh dạng sữa, trong đó có vi khuẩn que Nhật Bản (*Bacillus popilliae* Dutky và *Bacillus lentimorbus* Dutky) là quan trọng nhất. Có khoảng 53 loài bọ hung bị bệnh này.

Vi khuẩn B.p sinh trưởng tốt trong môi trường dịch thể hoặc môi trường rắn có cao men và glucoza. Sinh trưởng 16-20 giờ là hình thành hàng loạt bào tử với số lượng 2×10^9 . Sau khi đạt đến đỉnh cao của sự sinh trưởng, số lượng vi khuẩn sống giảm xuống, nhưng không xuất hiện tác dụng vi khuẩn hoà tan tế bào, dù có ôxy hoặc không có ôxy đều không hình thành bào mầm.

Nguyên nhân bào mầm bị chết đến giờ khoa học vẫn chưa tìm ra.

Vi khuẩn B.p có tính ký sinh mạnh có thể sinh sản trong cơ thể bọ hung non. Bào mầm có thể sống lâu năm. Một sâu non bọ hung chết khô bảo quản bào mầm sau 42 tháng vẫn gây bệnh cho sâu non bọ hung mới.

Trong tự nhiên vi khuẩn này thông qua đường tiêu hoá của bọ hung để xâm nhiễm. Sau khi bọ hung ăn rế, vật hoại sinh trong đất, bào mầm nảy mầm thành thể dinh dưỡng xuyên qua vách ruột vào trong xoang cơ thể. Vi khuẩn sinh sản hàng loạt bào mầm trong xoang máu. Do sâu bị bệnh và chết trong cơ thể bào mầm làm cho limfa máu đục nên sâu non bọ hung thành màu trắng sữa, hoạt động của chúng giảm dần, phản ứng rất chậm, nếu bẻ chân ra vết thương sẽ chảy ra dịch màu trắng sữa, qua kính hiển vi thấy nhiều bào mầm của vi khuẩn.

Nhiệt độ thích hợp cho B.p phát triển là 16-36°C. Khi sâu non ăn phải bào mầm, nhiệt độ thấp hơn 16°C sẽ không gây bệnh, có lúc sâu non bị bệnh sau khi ngủ nghỉ qua đông mới bị chết. Trong điều kiện bình thường, phần lớn sâu non bị chết ở giai đoạn 2 và 3, đến giai đoạn 4 chỉ sống sót 30%.

+ Sản xuất vi khuẩn sữa.

Vi khuẩn sữa đã được sản xuất thành thương phẩm, tên gọi của thương phẩm là "Doom". Chúng có hiệu quả phòng trừ đối với bọ hung. Trong quá trình nuôi cấy rất khó thu được bào mầm. Cho nên phương pháp có hiệu quả gây bệnh nhân tạo cho sâu non bọ hung, phương pháp đó như sau:

Trước hết dùng limfa máu sâu non đã nhiễm bệnh bảo quản làm giống, nung nóng ở nhiệt độ $50-60^{\circ}\text{C}$ sau 15-20 phút, dùng ống tiêm tiêm vào cơ thể sâu non bọ hung nuôi hoặc thu nhập ngoài đồng ruộng một lượng rất ít mỗi con khoảng 10^3 bào mầm là cơ thể gây bệnh. Giống nấm bảo quản đó tiêm vào khoảng 10^4 bào mầm là có thể nhiễm bệnh. Khi tiêm chỉ cần tiêm vào giữa đốt bụng để dịch vi khuẩn vào xoang cơ thể sâu non. Tiêm xong nuôi trong hòm nuôi riêng, mỗi hòm chia ra 5 lớp, mỗi lớp có 100 buồng nhỏ. Mỗi hòm nuôi khoảng 500 con. Bỏ thêm đất vào hạt giống nảy mầm để cung cấp thức ăn cho bọ hung non. Giữ ẩm và nhiệt độ 30°C , thời gian nuôi là 12 ngày. Mỗi con sâu non chứa khoảng $2-5 \times 10^9$ bào mầm. Sau đó chọn những con bọ hung bị bệnh trong đất, rửa hết đất bám, bỏ vào chảo nước đóng băng, để giảm bớt sự cản nhau của các con bọ hung non và tổn thất đến bào mầm. Sau đó bảo quản ở trong tủ lạnh nhiệt độ $0-2^{\circ}\text{C}$.

Khi có số bọ hung bị bệnh nhiều đạt đến số lượng nhất định, dùng dịch bào mầm, rồi thêm vào CaCO_3 thông qua xử lý khô chế tạo thành bột chế phẩm.

+ Hiệu quả trừ sâu của vi khuẩn sữa.

Lợi dụng vi khuẩn phòng trừ bọ hung non là biện pháp phòng trừ sinh học có hiệu quả. Ở Mỹ và Columbia đã dùng để phòng trừ bọ hung trên diện tích hàng trăm ngàn hecta hiệu quả đều đạt 60-80%. Sau khi bọ hung non chết làm tăng số lượng bào mầm trong đất đạt được hiệu quả khống chế bọ hung non rõ rệt, từ 20-60 con/m² giảm xuống còn 1-3 con và giữ mức như vậy trong 10 năm.

- Vi khuẩn hình thoi (*Clostridium brevifacieums*)

Vi khuẩn hình thoi là loài chuyên ký sinh trên sâu róm (*Malacosoma pluviale*). Vi khuẩn này có phản ứng gram âm, kích thước 3-13x0,9-1,3 μm , có thể vận động, bào tử hình thành là 1,6x3-3,3 μm . Tế bào dinh dưỡng nếu dùng dịch ép lá táo sẽ có số lượng cao, nếu dùng K/Na nuôi có thể được nhưng không hình thành bào tử. Sâu non ăn phải vi khuẩn sau một ngày bào tử có thể nảy mầm thành tế bào dinh dưỡng. Do chúng là vi khuẩn yếm khí nên không xâm nhập vào xoang máu mà chỉ sinh

sản trong ruột sâu non. Sau ba ngày thể hiện triệu chứng: ngừng ăn, tiết dịch, trao đổi nước không bình thường. Vì vậy pH giảm xuống, cơ các đốt co thắt lại, các chất bài tiết ra ngoài, trong đó chứa nhiều bào tử và trở thành nguồn lây bệnh. Sau một tuần sâu chết, thân cứng khô. Vi khuẩn hình thoi này có thể phát hiện trên một số loài sâu bộ cánh vẩy.

Hiện nay không thể nuôi cấy trên môi trường nhân tạo loài vi khuẩn này, nên sản xuất chế phẩm vẫn phải áp dụng phương pháp nuôi trên sâu sống.

Vi khuẩn kiêm ký sinh - vi khuẩn que Bacillus thuringiensis

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (B.t) được nhà côn trùng học người Đức phát hiện năm 1911 tại Thuringi vùng Địa Trung Hải sau khi phân lập trên loài sâu xám. Năm 1915 được gọi là *Bacillus thuringiensis*. B.t là loài vi khuẩn sản sinh tinh thể có tác dụng phòng trừ đối với nhiều loài sâu, là loài vi khuẩn kiêm ký sinh.

Vi khuẩn B.t yêu cầu dinh dưỡng không cao, chất dinh dưỡng chủ yếu là protein động thực vật, có thể phát triển bình thường trong nhiều nguồn nitơ, nguồn cacbon và muối vô cơ. Thông thường

dùng nguồn cacbon là tinh bột, maltoza, glucoza. Nguồn nitơ là nitơ hữu cơ như cao thịt bò, pepton, bột men, bột bánh lạc, bột bánh đậu, bột cá, bột ngô. Muối vô cơ thường dùng là K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCO_3$.

Vi khuẩn B.t có thể sinh trưởng trong điều kiện nhiệt độ 12-40°C, nhiệt độ thích hợp là 27-32°C, 35-40°C sinh trưởng nhanh nhanh chóng lão hoá, nhiệt độ thấp chúng sinh trưởng rất chậm.

Vi khuẩn thích hợp với điều kiện kiềm, pH thích hợp là 7.5, ở pH = 8.5 vẫn có thể hình thành bào mầm, nếu pH = 5 thì không hình thành bào mầm. Vi khuẩn là loại hiếu khí phải có đủ oxy mới sinh trưởng tốt, nhất là khi hình thành bào mầm. Nếu không đủ không khí sẽ không hình thành bào mầm hoặc hình thành chậm.

Phản ứng sinh lý sinh hoá của vi khuẩn B.t là: làm ngưng kết sữa, trong đường glucoza, fructoza, glycerin, tinh bột, maltoza, trehaloza sẽ hình thành axit; không hình thành indol; có phản ứng dương với methyl red; phản ứng VP dương (ethyl methyl metan); có tác dụng hoà tan trong môi trường huyết ngựa agar; có thể mọc trên môi trường muối cyanat, khử muối nitrat thành muối nitrit, không lợi dụng axit citric, không khử muối

sunphat, sản sinh enzym phospholypase, không xuất hiện hạt màu đỏ.

Tác dụng gây bệnh chủ yếu của vi khuẩn B.t với côn trùng là qua thức ăn vào cơ thể. Chế phẩm vi khuẩn bao gồm bào mầm và chất độc do vi khuẩn gây ra. Sự sinh sản của vi khuẩn có thể làm cho côn trùng chết, nhưng chất độc do vi khuẩn sinh ra làm cho chúng chết nhanh hơn. Tác dụng diệt sâu của vi khuẩn có quan hệ mật thiết với cơ chế gây bệnh và vật chủ.

- *Chất độc của vi khuẩn B.t*

Chất độc của vi khuẩn B.t được chia ra 2 loại: chất độc trong (endotoxin) chính là tinh thể và chất độc ngoài (exotoxin) là sản phẩm trao đổi chất tiết ra ngoài cơ thể vi khuẩn trong quá trình sinh trưởng

+ Sự hình thành chất độc β . Chất độc này được Meconne phát hiện đầu tiên vào năm 1959. Chúng có tính ổn định ở nhiệt độ cao 120°C trong 15 phút vẫn không bị mất hoạt tính, có thể tan trong nước, có thể chiết xạ không phải là protein mà là chất axit adenilic. Trong quá trình sinh trưởng của vi khuẩn chúng sinh ra trước khi hình thành bào mầm và tinh thể, sau 24 giờ chúng đạt đến đỉnh cao nhất. Trong thời kỳ nuôi cấy không lác cũng

hình thành chất độc này. Với liều lượng thích hợp B.t tiêm vào cơ thể côn trùng hoặc côn trùng ăn phải đều có hiệu quả gây độc. Kết quả xác định sinh học cho biết sản sinh chất độc này bao gồm nhiều biến loài như B.t var. keniae, B.t var.morrison, B.t.var tolworthi và B.t.var thuringiensis. Sự hình thành chất độc β không phụ thuộc vào kiểu huyết thanh và đặc tính tế bào học. Cho nên không thể căn cứ vào kiểu huyết thanh để xác định sự hình thành chất độc này. Ngoài ra chúng còn phụ thuộc vào phương pháp nuôi cấy, thành phần chất dinh dưỡng của môi trường, thời gian nuôi cấy và trị số pH.

+ Phạm vi và hiệu quả diệt sâu của chất độc ngoài β . Cho đến nay người ta nghiên cứu thấy rằng phạm vi diệt sâu của chất độc ngoài β rất rộng. Chúng có thể diệt được các loài thuộc bộ cánh vẩy, bộ hai cánh, bộ cánh cứng, bộ cánh màng, rệp và nhện. Theo nghiên cứu của Hêimpel (1967) chúng đã diệt được 24 loài trong các bộ trên.

Hiệu quả của chất độc phụ thuộc vào lượng tiêm vào hay sâu ăn phải. Độ độc của nó biểu hiện ở chỗ lúc lột xác hoặc biến thái, không hoá nhộng bình thường, biến dạng... Độ độc của nó gấp 160 lần so với DDT. Tuy nhiên khi sâu ăn phải độ độc của chất độc ngoài β bị giảm xuống.

+ Chất độc ngoài B.t.γ. là một loại enzim chưa xác định.

+ Chất độc ngoài B.t.δ, còn gọi là chất độc tinh thể, tinh thể protein.

Độ độc của tinh thể khác nhau theo các biến loài. Tinh thể có hình dạng khác nhau độ độc cũng khác nhau. Những tinh thể gần tròn có hiệu quả đối với các loài sâu bộ cánh vẩy, những tinh thể nhiều cạnh ngắn độ độc không bằng loại tròn nhưng vẫn mạnh, còn những tinh thể nhiều cạnh độ dài độ độc rất kém đối với nhiều loài sâu.

+ Cơ chế gây bệnh của chất độc tinh thể.

Khi vi khuẩn vào ruột giữa côn trùng không hình thành các enzim mà gây độc chủ yếu là do chất độc tinh thể. Sau khi tinh thể hoà tan trong ruột côn trùng chỉ mấy phút là côn trùng tê liệt, chỉ 55 phút là vách ruột bị vỡ, làm cho các tế bào thượng bì ruột giữa rụng, để lộ màng đáy mỏng tạo điều kiện cho tế bào dinh dưỡng của vi khuẩn xâm nhập. Nghĩa là sau khi sâu ăn vi khuẩn, bào mầm nảy mầm, tế bào dinh dưỡng chui vào màng thực quản xâm nhập vào thượng bì ruột giữa bị phá hoại, cuối cùng tế bào dinh dưỡng chui vào màng đáy các chất trong ruột lẫn với máu, sâu non sẽ chết.

Ruột trước của sâu non có chứa proteaza có thể phân giải protein tinh thể. Cho nên tinh thể chính là tiền độc tố, mà chất độc chính phải là protein phụ. Tinh thể tuy có thể bị hoà tan trong ruột các loài sâu xám nhưng không thể hình thành độc tố từ tiền độc tố. Tinh thể không hoà tan trong ruột ngài đêm rau cải nên không hình thành chất độc, cho nên loài sâu này không nhạy cảm đối với vi khuẩn B.t. Có người phân tích trong ruột sâu xanh rau cải có nhiều loại enzym, cho nên người ta cho rằng proteaza làm cho tinh thể bị phân giải là phân tử có tác dụng gây độc.

Sau khi sâu non bộ cánh vẩy ăn chất độc tinh thể, căn cứ vào các phản ứng khác nhau mà chia sâu ra 4 loại:

- Sau khi sâu non ăn chất độc chỉ mấy phút là ruột giữa tê liệt, 1-7 giờ màng ruột vỡ, các chất kiềm lẫn vào xoang làm pH tăng lên, làm cho toàn thân bại liệt. Những loài này bao gồm tầm nhà, tầm sồi, ngài trời thuốc lá.

- Sau khi sâu non ăn chất độc sau mấy phút làm tê liệt ruột giữa, nhưng thức ăn không vào xoang, pH máu không đổi, thân không bị bại liệt, sau 2-4 ngày mới chết. Hầu hết sâu non bộ cánh vẩy thuộc loại này.

- Sau khi ăn chất độc 2-4 ngày mới chết, không có hiện tượng bại liệt nhưng phải ăn cùng với bào tử và tinh thể mới có thể chết. Sâu non xám đốm phấn, ngài độc thuộc loại này.

- Sâu non không nhạy cảm với chất độc tinh thể như ngài đêm rau cải, nhưng nếu tăng thêm số bào tử và tinh thể tỷ lệ chết có thể ở mức thấp 22-39%.

Cơ chế gây bệnh của chất độc ngoài β khá phức tạp và chậm chạp, chỉ khi lột xác và biến thái mới nhìn thấy. Khi một lượng nhỏ vi khuẩn vào cơ thể sâu non phát dục hoá nhộng tuy không vũ hoá nhưng vẫn có một số biến thành sâu trưởng thành có cánh không đầy đủ. Nếu lượng vi khuẩn cao, sâu hoá nhộng không bình thường, nếu cao nữa thì sâu non vừa lột xác đã bị chết.

- Các dạng chế phẩm vi khuẩn B.t

Hiệu quả phòng trừ bằng chế phẩm B.t không hoàn toàn quyết định bởi thành phần hoạt tính của chế phẩm mà dạng chế phẩm cũng là một nhân tố quan trọng. Dạng chế phẩm B.t bao gồm dạng nước, dạng bột, dạng bột thấm nước, dạng nang keo.

+ Chế phẩm dạng nước.

Sau khi lên men ta thu được bào mầm và tinh thể được bảo quản trong dung dịch thêm vào đó

một số chất bám dính và phòng thối. Thông thường dùng xà phòng, bột bánh sủ, keo...bột mỳ, bột dong, nhựa cây, pyroproein và một số tổng hợp thành chất dính như aminolipoit, keo sữa tổng hợp có thể dùng làm chất bám dính. Chế phẩm dạng lỏng ngoài nước ra còn có chế phẩm dạng sữa, dạng dầu. Chế phẩm dạng sữa là bào mầm tinh thể qua nén li tâm thêm vào chất hóa sữa, trộn đều mà thành. Chế phẩm dạng dầu là trộn chất hoá sữa vào nước rồi thấm nước chế phẩm vi khuẩn khô, sau đó thêm dầu luyn pha loãng. Nhưng chế phẩm dầu thường gây hại cho cây cần hạn chế sử dụng.

+ Chế phẩm dạng bột.

Trong chế phẩm có thể thêm các chất bổ sung dạng bột như bột đất sét, đất cao lanh.

+ Chế phẩm bột thấm nước

Thêm vào chế phẩm một ít chất thấm nước, một số chất bám dính có thể làm chất thấm ướt tác dụng thấm ướt bao gồm các hạt có tính thấm nước.

+ Chế phẩm dạng nang keo

Có thể chế thành viên con nhộng để đề phòng ánh sáng trực xạ, nhiệt độ cao và khô nóng của môi trường. Như vậy tác dụng gây độc của chế phẩm sẽ được lâu hơn. Trong chế phẩm có thể thêm vào một số chất bảo vệ như natri huỳnh quang để đề phòng

tác dụng bức xạ tia tử ngoại. Hiện nay một số nước mới chỉ sản xuất dạng nước, dạng bột và dạng sữa. Trong nghiên cứu cần phát triển dạng nang keo.

Ứng dụng chế phẩm vi khuẩn B.t trong phòng trừ sâu hại.

Trong nhiều năm nay chế phẩm vi khuẩn B.t phát triển rất nhanh. Nhiều nước đã có thuốc trừ sâu vi sinh vật. Phạm vi sử dụng chế phẩm B.t cũng rộng rãi hơn, bởi vì chúng làm cho sâu chết nhanh hơn, an toàn đối với người và gia súc, tác dụng đề kháng của sâu chậm, lây lan rộng phát huy lâu dài hiệu quả phòng trừ.

- Phạm vi diệt sâu

Nói chung phạm vi diệt sâu của vi khuẩn B.t hẹp hơn thuốc trừ sâu. Theo thống kê các biến loài B.t có thể diệt được 182 loài 32 họ trong bộ cánh vẩy, bộ cánh màng, bộ cánh thẳng, bộ hai cánh, bộ cánh cứng. Tác dụng diệt dụng diệt sâu ở mức độ khác nhau, nhiều loại trong bộ cánh vẩy là nhạy cảm nhất. Đối với một số loài thuộc họ ngài độc, họ ngài đêm B.t đều có khả năng gây bệnh nhanh, đối với một số loài ruồi muỗi cũng đã được sử dụng để phòng trừ, hiệu quả rất tốt.

- Hiệu quả phòng trừ

Ta rất ít gặp ít vi khuẩn gây bệnh cho sâu hại

ngoài tự nhiên, nguyên nhân chủ yếu là do trong cơ thể côn trùng còn rất nhiều dinh dưỡng nhưng bào mầm và tinh thể lại rất ít. Nói chung vi khuẩn B.t ít gây dịch cho sâu là do khả năng khuếch tán của chúng thấp. Vì vậy cần tìm cách phát huy tác dụng hiệu quả lâu dài sau khi dùng chế phẩm là vấn đề sinh thái học rừng cần được nghiên cứu. Tại Trung Quốc từ năm 1976 đã phòng trừ cho 21 loài sâu hại rừng trên 14 tỉnh với diệt tích hàng chục ngàn hecta, hiệu quả đều đạt 90-100% trong đó có sâu róm thông, ngài độc, ngài thuyên, ngài trời, bọ nẹt, sâu đo, sâu cuốn lá, ong ăn lá, kim hoa trùng... Nước ta năm 1993 đã sử dụng chế phẩm B.t phòng trừ sâu róm thông ở Đô Lương Nghệ An, hiệu quả cũng đạt trên 90%.

- Phương pháp sử dụng chế phẩm vi khuẩn B.t

Về cơ bản cũng giống như phương pháp sử dụng thuốc trừ sâu, có thể phun mù, phun bột, tưới, rắc bột, phun bằng máy bay... Dùng phương pháp nào cũng theo một nguyên tắc cơ bản là phải đều khắp, lượng dùng ít. Nếu dùng phương pháp phun hoặc rắc bột phải chọn lúc có độ ẩm cao, tưới thì phải chọn điểm để tiết kiệm thuốc.

Trong thực tiễn sản xuất để nâng cao hiệu quả phòng trừ người ta thường tìm cách làm tăng tính

nhạy cảm của vi khuẩn, chủ yếu là để bảo vệ các loài thiên địch, có thể thêm một lượng rất ít thuốc trừ sâu hoá học. Thuốc hoá học có thể phá hoại tính trạng sinh lý bình thường của sâu. Giảm bớt sức đề kháng của sâu hại, tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập vào sâu mà từ đó càng nâng cao tính nhạy cảm của vi khuẩn; đồng thời nó cũng làm cho các vật gây bệnh khác tiềm ẩn trong côn trùng có điều kiện gây dịch, sau khi côn trùng đã nhiễm vi khuẩn tính chống thuốc hoá học của sâu cũng giảm xuống, đạt được mục đích phòng trừ. Tăng thêm một ít thuốc hoá học còn có thể kiêm phòng trừ một số loài sâu hại không phải thuộc bộ cánh vẩy bù đắp lại sự co hẹp phạm vi diệt sâu của vi khuẩn.

5. Sử dụng virus gây bệnh côn trùng

Sử dụng virus phòng trừ sâu hại đầu tiên phải kể đến việc phòng trừ ong ăn lá vân sam (*Gilpinia (Diprion) herciniae*) ở châu Âu, sau đó dịch ong ăn lá vân sam lan rộng sang châu Mỹ. Ba mươi năm sau người ta phát hiện trên ong đó có virus NPV. Nguồn gốc của virus này vẫn không rõ, nhưng nói chung người ta đều cho rằng chúng nhập vào từ thiên địch hoặc loài ong châu Âu và lây lan rất nhanh, gây dịch bệnh cho ong

ăn lá vôn sam đồng thời chúng cùng với các loài thiên địch ong ký sinh và ruồi ký sinh nhập vào đã làm giảm rõ rệt loài ong nguy hiểm này, cứu vãn được rừng vôn sam. Loài virus này đã tồn tại lâu dài trong rừng vôn sam trở thành một nhân tố khống chế lâu dài ong ăn lá. Năm 1977 người ta đã phân lập hơn 1000 loài virus từ côn trùng, nhện và động vật chân đốt. Năm 1986 theo thông báo trên thế giới phân lập được 1280 loài virus trên 900 loài côn trùng.

Do virus có thể phòng trừ có hiệu quả các loài sâu hại rừng, trong hệ sinh thái rừng, chúng có tác dụng điều chỉnh số lượng sâu hại trong thời gian rất dài. Ví dụ CPV trên sâu róm thông, NPV trên ngài độc hại thông, chúng đều có hiệu quả phòng trừ rất rõ rệt.

Khái niệm về virus côn trùng

Virus là một sinh vật ký sinh sống trong tế bào vật chủ, chúng dựa vào sự tổng hợp của tế bào để sinh ra các hạt virus gây bệnh.

Virus khác với các sinh vật khác chủ yếu là 4 điểm:

- Chỉ có 1 AND hoặc ARN (các sinh vật khác có cả hai loại)
- Virus thông qua quá trình tổng hợp phức tạp

theo tái tổ hợp AND hoặc ARN mà không qua giảm phân hoặc gián phân.

- Virus thiếu hệ thống enzym, không có ribosome, không có kết cấu tế bào, phải lợi dụng ribosome của tế bào vật chủ để tổng hợp protein cho tự nó.

- Virus không nhạy cảm với thuốc kháng sinh hoặc con đường trao đổi của vi sinh vật khác.

Kích thước của virus chỉ vài nm đến 400nm. Virus lớn nhất cũng chỉ bằng vi khuẩn nhỏ nhất; virus nhỏ nhất chỉ bằng 1 phân tử protein.

Virus là sinh vật nhỏ nhất không có kết cấu tế bào, là một sinh vật nguyên thủy nhất, thành phần chủ yếu của nó là ARN hoặc ADN và protein. Một cá thể virus được coi là 1 virion. Một virion có thể là rất đơn giản cũng có thể là rất phức tạp. Virion đơn giản chỉ có hai loại: đẳng trục (isometric virion) hình cầu hoặc đa diện hoặc bất đẳng trục (tubular virions) dạng sợi hoặc ống (rod-shaped virions).

Cấu tạo virion bao gồm hai bộ phận: bên trong là nhân tuỷ (core nucleod) do axit nucleic cấu tạo thành; bên ngoài là vỏ áo (capsid) thành phần của vỏ áo là protein. Hạt virion còn được gọi là vỏ nhân (nucleocapsid). Vỏ áo đơn giản nhất là một lớp

protein. Chúng sắp xếp với nhau thành thể 20 mặt hoặc thành ống xoắn. Đơn vị kết cấu là hạt vỏ (capsomere). Bên ngoài vỏ áo nhân có một màng bao gọi là màng túi (envelope). Màng túi cấu tạo bởi proteinlipoid và lipoid. Trong màng túi là những hạt màng (peplomers) do các phân tử protein cấu tạo thành. Virion có tính đối xứng thông thường có 3 loại: đối xứng lập thể, đối xứng xoắn ốc và đối xứng phức hợp. Đối xứng lập thể thường có 4 mặt, 12 mặt và 20 mặt. Loại 20 mặt có 20 mặt hình tam giác, 12 góc và 30 cạnh.

Phân loại virus gây bệnh côn trùng

- Họ virus dạng que (Baculoviridae).
- Họ (nhóm) virus β ngài trời thông (Nudavirus Nudarelia β virus).
- Họ virus đồng ruột (Nodaviridae), chi Nodavirus, loài Nodamura virus.
- Họ virus vàng (Iridoviridae).
- Họ virus bệnh đậu (Poxviridae), các chi Entomopoxvirus A, En. B. En. C.
- Họ virus ARN nhỏ (Picornaviridae).
- Họ virus ruột (Reoviridae).
- Họ virus dạng xoắn (Rhabdoviridae).
- Họ virus nhỏ (Parvoviridae).

Những virus quan trọng gây bệnh côn trùng

Có hơn 900 loài thuộc hơn 9 bộ côn trùng và nhận bị nhiễm 1280 chủng virus được phân lập. Tất cả chúng tập trung ở bộ cánh vẩy. Hầu hết tập trung vào virus hình que, virus đa diện tế bào chất (CPV) họ Reoviridae. Gần đây một số loài sâu hại rừng cũng phát hiện nhiều loài thuộc họ Poxviridae. Những virus này đều có thể vùi, sau xâm nhập vào tế bào vật chủ đều sản sinh thể vùi, cho nên người ta gọi là virus thể vùi. Những loài virus quan trọng là virus đa diện kiểu nhân (Nuclear polyhedrosis virus, NPV), virus thể hạt (Granule virus, GV) và virus đa diện tế bào chất (Cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV).

- Virus đa diện kiểu nhân (NPV)

NPV được phát hiện rất sớm và nghiên cứu khá tỉ mỉ. Đặc điểm chủ yếu là sau khi virus xâm nhiễm vào côn trùng, ký sinh trong nhân tế bào côn trùng và sinh sản tái tạo trong nhân. Thể vùi có hình nhiều mặt hay đa diện vào trong tế bào, cho nên người ta gọi là virus đa diện nhân. Sau khi sâu chết chân và đuôi mọc trên cành cây. Thể vùi là kết tinh protein bao hạt virus (virion) hình que vào trong túi. Thể đa diện bao gồm thể vùi và hạt virus.

- Các loài côn trùng bị nhiễm NPV

Theo thống kê chưa đầy đủ, trên thế giới có 284 loài côn trùng bị NPV bị xâm nhiễm, chiếm 40% số lượng côn trùng bị nhiễm virus, trong đó có 243 loài thuộc bộ cánh vẩy, 21 loài thuộc bộ cánh màng, 9 loài thuộc bộ hai cánh, 4 loài thuộc cánh cứng, 4 loài thuộc cánh thẳng và 2 loài bộ cánh nửa.

Bệnh lý học của bệnh NPV

- Triệu chứng bên ngoài.

Sau khi sâu non bộ cánh vẩy bị bệnh sức ăn giảm, động tác chậm, thường bò lên trên cao, thân trước lúc chết bị mềm, các mô trong cơ thể chứa nhiều nước, da dễ bị vỡ, chảy ra dịch màu trắng hoặc nâu, chưa có mùi hôi, cho đến khi nấm mốc mọc mới thể hiện mùi. Sâu non bị chết thường có chân đuôi bám chặt vào cành cây, thân rủ xuống, dịch xuống dưới làm cho phía trước phình to lên. Dịch trong thân chứa nhiều NPV. Sâu non ngài độc (*Lymantria monocha*) thường treo ngược trên cành, nhưng loài *L. dispa* lại bò xuống gốc cây. Sau khi nhiễm bệnh thường phải qua 4 ngày mới chết, một số kéo dài đến 24 ngày.

Đôi với ong ăn lá có những đặc trưng tương tự như bộ cánh vẩy. Triệu chứng rõ nhất là đốt 3 đến đốt 5 biến thành màu vàng nhạt, sâu dần dần giảm

ăn, thân nhỏ, có khi sau hậu môn tiết ra dịch màu nâu sẫm, thân treo lên lá thông. Khi chuyển động chúng thường tiết ra dịch màu trắng sữa.

- *Những biến đổi bệnh trong mô sâu khi NPV xâm nhiễm.*

Con đường xâm nhiễm của NPV là qua da và thức ăn. Khi tiêm virus vào xoang cơ thể sâu non có thể bị bệnh, nhưng khi rửa sạch NPB sâu non không bị bệnh chứng tỏ nhân tố gây bệnh không NPB mà là virion.

Sau khi sâu non ăn phải NPV, bị hệ tiêu hoá dịch vị phân tích ra hạt virion. Virion chui vào thượng bì của ruột giữa vào xoang, lúc đầu vào các tế bào máu, tế bào lipid, tế bào vách khí quản, tế bào da, về sau xâm nhập vào tế bào tuyến tơ, tế bào đốt thần kinh và tế bào mầm trưởng thành.

Những virus hình que (bao gồm NPV và GV) ban đầu xâm nhiễm vào tế bào ruột giữa, thông qua sinh sản tái tổ hợp mới xâm nhập vào xoang, vào các mô nhạy cảm khác.

- *Thời kỳ ủ bệnh (tiềm dục).*

Sau khi virus xâm nhập vào sâu non phải trải qua một giai đoạn mới thể hiện triệu chứng. Thời kỳ này gọi là thời kỳ ủ bệnh. Thời kỳ ủ bệnh dài hay ngắn phụ thuộc vào số lượng virus xâm nhiễm,

nhiệt độ và giai đoạn phát dục của côn trùng. Nói chung số lượng virus càng lớn, nhiệt độ càng cao, tuổi sâu càng nhỏ thời kỳ ủ bệnh càng ngắn.

- *Virus thể hạt (Granule virus, GV)*

Thể vùi của virus có dạng vỏ đậu, hình trứng, dưới kính hiển vi có các hạt nhỏ phát sáng nên được coi là virus thể hạt. Kích thước thể vùi là 0,2-0,5 μ m x 0,15-0,35 μ m. Trong thể vùi có hạt virus (virion), chúng chỉ xâm nhiễm sâu non bộ cánh vẩy, vị trí xâm nhiễm là nhân tế bào và tế bào chất. Côn trùng bị bệnh nhanh là 4 ngày, chậm là 20-30 ngày mới chết.

Đến nay người ta phát hiện GV gây bệnh cho bộ cánh vẩy có trên 80 loài. Về tính chất lý hoá của GV gần giống với NPV cho nên trong phân loại virus hiện nay người ta xếp vào họ virus hình que (Baculoviridae), nhóm B.

- *Bệnh lý học của virus GV*

Sau khi sâu non bị bệnh virus GV, trước hết là sức ăn bị giảm, rồi ngừng ăn. Màu da biến thành màu trắng xám hoặc vàng sữa. Nhưng có màu khác nhau theo loài. Thân thể yếu dần. Bệnh tiếp tục phát triển máu lẫn dịch màu trắng sữa.

Cũng có loài côn trùng như ngài đốm nho sau khi bị bệnh GV, thân nhỏ lại, nhưng ngài đêm bị

GV thân dài ra thô hơn, màu vàng sữa, da cứng dần.

+ Thời kỳ ủ bệnh: Hầu hết sâu bị bệnh GV chết ở thời kỳ sâu non, nhưng có một số chết ở thời kỳ tiền nhộng hoặc nhộng. Thời gian sâu chết khác nhau, nói chung là 4 ngày chậm là 20-25 ngày. Thời gian gần chết liên quan với loài sâu, tuổi sâu, nhiệt độ, lượng virus, độ độc của virus và tình hình sức khỏe của vật chủ. Ví dụ thời gian chết của sâu ngài trắng Mỹ phụ thuộc vào tuổi sâu và lượng GV, đối với sâu non tuổi 2 lượng virus là 10^9 / con. LT_{50} là 4 ngày, tuổi 5 phải là $5,2 \times 10^9$ / con LT_{50} là 9 ngày.

+ Các mô bị xâm nhiễm: Cũng như NPV virus GV dễ xâm nhiễm nhất là mô mỡ (lipit) rồi đến tế bào da, màng da khí quản. Đối với sâu xám, GV xâm nhiễm và sinh sản trong mô cơ. Ngài cuốn lá cây ăn quả (*Archis argyrospila*) bị nhiễm ở mô ruột giữa. Sâu non đục quả (*Carposina niponensis*) bị nhiễm trước hết là mô mỡ, rồi đến mô khí quản, mô da, thậm chí còn có cả thượng bì ruột giữa và ống Malpigi.

+ Sự biến đổi bệnh trong tế bào: Sự biến đổi của sâu bị bệnh GV trước hết là sự sản sinh hàng loạt nhờ tế bào thể mỡ tiến hành phân chia có sợi. Kết

quả làm cho thể mỡ tăng lên. Đồng thời nhân tế bào cũng phình to lên, một phần chất nhiễm sắc do nhân nứt và phân giải mà phân bố bên cạnh màng nhân, hạch nhân bị tiêu đi. Nhân tế bào tiếp tục phình lên cho đến khi chiếm gần hết tế bào, bên ngoài nhân là có rất nhiều hạt lipid, virus phát sinh kết cấu mạng lưới. Cuối cùng màng tế bào nứt ra, vô số thể hạt và các chất khác chạy vào dịch máu. Sự biến đổi bệnh lý của tế bào da và tế bào màng khí quản cũng giống như vậy.

Virus da điều kiện chất (Cytoplasmic polyhedroosis virus, CPV)

CPV được phát hiện vào năm 1934 trên tầm nhà Nhật Bản. Về sau người ta còn phát hiện cả trên sâu ăn lá thông. Khi việc nghiên cứu virus sâu hại rừng phát triển người ta đã tìm CPV trên sâu róm thông đuôi ngựa, thông nhựa, sâu róm chè, ngài độc... Theo thông báo CPV xâm nhiễm 168 loài thuộc bộ cánh vẩy, 2 loài thuộc bộ cánh mạch, 3 loài bộ 2 cánh, 1 loài bộ cánh màng.

Bệnh lý học của bệnh CPV.

- Đặc trng bên ngoài: Triệu chứng ban đầu của bệnh CPV rất ít thấy, tùy theo bệnh phát triển côn trùng sinh trưởng chậm dần, thân nhỏ lại, giảm ăn, đầu ngực bụng có tỷ lệ không bình thường, có

lúc lông mọc dài ra xuất hiện sự biến màu. Ruột chứa nhiều CPV nên biến thành màu trắng hoặc vàng, chúng tiết ra ở miệng hoặc bài tiết ở hậu môn nhiều thể đa diện.

- Thời kỳ ủ bệnh: Thời kỳ này khá dài, tùy theo loài sâu, tuổi sâu, độ độc của CPV, lượng CPV mà có sự khác nhau. Tuổi non, độ độc cao, lượng nhiều thời kỳ ủ bệnh thường ngắn.

- Mô bị xâm nhiễm: Mô bị xâm nhiễm là các tế bào hình ống của thượng bì ruột giữa, ruột trước và sau không phát hiện thấy CPV.

- Sự xâm nhập của CPV được chia ra 3 giai đoạn: Vật lõi virus hấp phụ bề mặt tế bào; hạt virus hấp phụ bề mặt tế bào chặt hơn, vật lõi vùi trong bề mặt tế bào; nhân tuỷ dạng sợi phóng ra chui vào trong tế bào chất, bề mặt tế bào còn hạt virus rỗng.

Ứng dụng virus côn trùng trong phòng trừ sâu hại

Virus côn trùng thường có 7 loài, ít nhất có 6 loài có những chỗ gần giống với virus gây bệnh động vật có xương sống và một ít thực vật. Song chỉ có virus hình que gây bệnh cho động vật không xương sống.

Nói chung đối với sâu hại rừng sử dụng có hiệu quả nhất là NPV ngài độc và CPV sâu róm thông. Hiện nay nhiều nước sử dụng virus phòng trừ các

loại sâu hại cây ăn quả và thu được những hiệu quả rõ rệt.

- *Ứng dụng CPV sâu róm thông đuôi ngựa.*

Năm 1976, người ta phát hiện CPV trên sâu róm thông đuôi ngựa. Năm 1977, ở Quảng Đông đã tiến hành thí nghiệm phòng trừ. Dùng dung dịch sâu chết ngoài rừng pha loãng 100 lần phun lên lúa 1 của sâu róm thông, sau 18 ngày tỷ lệ chết đạt 84%, mà đối chứng chỉ chết 5,9%. Năm 1978 ở Quảng Đông dùng virus này để phòng trừ cho lúa thứ 2 với liều lượng 5,25kg (chế phẩm ướt)/ ha, hiệu quả phòng trừ đạt 79%, tỷ lệ chết khu đối chứng là 28%, rất nhiều sâu chết ở thời kỳ nhộng. Lợi dụng CPV phòng trừ sâu róm thông qua đông có tác dụng khuếch tán nhất định. Sau khi phun 17 ngày ngoài khu vực 50m có thể thu thập được sâu chết hiệu quả như khu phun, tỷ lệ chết đạt 60%, khu đối chứng là 30%. Nếu thêm 1% than hoạt tính tỷ lệ chết còn thêm hơn 14%.

- *Ứng dụng NPV phòng trừ bọ sừng hại cây cọ.*

Bọ sừng hại cây cọ (*oryctes rhinoceros*) là một loài sâu hại dừa, cọ nguy hiểm. Trước đây không có biện pháp nào phòng trừ. Năm 1963, ở Malaysia phát hiện loài virus NPV trên và xếp chúng vào nhóm phụ C trong virus dạng que. Kinh nghiệm

ứng dụng thành công là rắc chế phẩm lên sâu trưởng thành. Virus có thể xâm nhiễm sâu trưởng thành. Sâu trưởng thành thông qua thức ăn tổng hợp ăn mùn cưa, bột nghiền và sâu non bị bệnh mà bị nhiễm bệnh. Bọ sừng bị bệnh thông qua giao phối tiếp xúc virus mà lây bệnh. Sâu trưởng thành bị bệnh thường có tuổi thọ ngắn, lượng trứng đẻ ít. Cho nên không ngừng thả sâu đực bị bệnh sẽ làm cho số lượng quần thể loài giảm hẳn. Nhập chế phẩm virus phòng trừ bọ sừng hại dưa giảm tổn thất tới 72-79%.

- *Ứng dụng GV phòng trừ ngài trời Cacothoesp*

Ngài trời cây lá rộng là loài sâu hại phổ biến trên thế giới, thức ăn tạp, có thể ăn trên 300 loài cây, phân bố rất rộng. Ở nước ta chúng có mặt và gây dịch cho cây trắc ở KomTum năm 1997. Sau trận dịch, người ta phát hiện sâu non chết hàng loạt treo trên cây đó là hiện tượng virus GV. Tại Trung Quốc người ta điều tra trong điều kiện nhiệt độ 25°C độ độc của sâu non tuổi 3 LC_{50} là 10^{-8} sử dụng phương pháp phòng trừ như trên dùng chế phẩm virus với tốc độ 5×10^{-3} và 5×10^{-4} phun lên sâu non tuổi 3, tỷ lệ chết lên tới 95%. Gần 10 năm nay ở khu rừng trên đến nay không có sâu ngài trời gây hại là nhờ kết quả tác dụng

của GV. Triệu chứng của bệnh côn trùng do GV gây ra rất dễ nhận biết thông qua nuôi sâu sống để phục chế phẩm virus GV là vấn đề cần làm và thay chế thuốc hoá học thu được hiệu quả cao. Chúng ta có thể áp dụng phương pháp trên để phòng trừ.

- *Ứng dụng NPV phòng trừ ngài độc ăn lá Lymantria dispar L.*

Ngài độc ăn lá rừng là một loài sâu hại phổ biến nhất trên thế giới, thức ăn rất tạp, chúng có thể ăn trên 500 loài cây, gây ra tổn thất lớn cho ngành lâm nghiệp. Sau trận dịch thường gặp loài virus NPV lúc phát dịch mật độ sâu giảm xuống rõ rệt. Thông thường hay gặp loài ngài độc hại thông *Daxyschira axantha* Coll ở các tỉnh miền Bắc nước ta. Nếu áp dụng phương pháp phòng trừ trên có thể thu được hiệu quả.

6. Sử dụng tuyến trùng ký sinh phòng trừ sâu hại

Đặc điểm

Năm 1972, Krieg đã phân lập được quần thể vi sinh vật tuyến trùng gây bệnh cho côn trùng. Tuyến trùng là một loại thiên địch quan trọng của sâu hại rừng. Tuyến trùng là một động vật thân

mềm không phân đốt, thuộc ngành động vật hình sợi (Nematelminthes) lớp tuyến trùng (Nematoda). Thân hình sợi, bề mặt có màng kitin, không chia đốt, hai bên đối xứng (giun tròn), phần lớn đực cái khác nhau, chưa phát hiện được trường hợp sản sinh vô tính. Trong vòng đời có hiện tượng lột xác, có xoang và hậu môn, đường tiêu hoá có ruột trước, ruột giữa và ruột sau; trong vòng đời có trứng, tuyến trùng non và tuyến trùng trưởng thành, tuyến trùng non qua 4 lần lột xác thành tuyến trùng trưởng thành. Quan hệ với côn trùng có 3 loại: ký sinh, cộng sinh và hợp cơ giới. Chúng thông qua đường tiêu hoá và da xâm nhập vào trong máu hút axit amin và dinh dưỡng. Một số tuyến trùng mang virus và vi khuẩn vào côn trùng. Kích thước, hình dạng và số lượng tuyến trùng trong côn trùng khác nhau theo loài. Có thể chia ra 3 loại: tuyến trùng ký sinh trong đường tiêu hoá; tuyến trùng bán ký sinh và tuyến trùng ký sinh. Côn trùng bị tuyến trùng ký sinh thường biểu hiện mất màu hoặc phồng lên, có lúc bên ngoài thay đổi hình dạng, như cánh ngấn lại, sinh trưởng phát triển giảm, sự sinh sản cũng giảm.

Tại nhiều nước như Mỹ, Australia, Trung Quốc đã nhập nội 11 loài tuyến trùng và thí nghiệm

chứng minh các loài côn trùng đều thể hiện tính nhạy cảm khác nhau và hiệu quả rất tốt.

Thông thường người ta đã sử dụng tuyến trùng DD-136 (*Neoaplectana carpocapsae*) ký sinh trên 1000 loài côn trùng, cơ chế diệt sâu của chúng liên quan với loài vi khuẩn *Achromobacter nematophylus*. Chúng ở trong thân tuyến trùng, sau khi tuyến trùng chui vào sâu non tuổi 3, vi khuẩn cũng vào theo, khi tuyến trùng vào vách ruột để vào xoang máu, tuyến trùng bài tiết qua đường tiêu hoá vào máu côn trùng trong 24 giờ vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng. Tỷ lệ sâu chết đạt 80-90% đối với nhiều loại sâu hại.

Tuyến trùng (*Delacdenus* spp) ký sinh ong đục cây thuộc chi *Sirex* cũng đã được nghiên cứu để phòng trừ. Trên ong đục cây có 2 loài nấm cộng sinh (*Amylostereum* spp) do ong đục cây mang đến. Mỗi khi ong bắt đầu hoá nhộng, hệ thống sinh dục bắt đầu chín muồi, mỗi tuyến trùng cái hình thành mấy ngàn trứng, mặc dù trứng nở trong cơ thể nhưng tuyến trùng non bò ra ngoài thân nhộng sâu, ở đó hoặc chúng ăn trứng của nhộng hoặc ăn dịch hoàn của nhộng đục. Tuyến trùng này có khả năng làm cho sâu bất thụ. Tuy nhiên một số sâu còn sống sót mang theo nấm để nuôi tuyến trùng tiếp tục sinh trưởng phát triển thành tuyến trùng

trưởng thành. Khi sâu non của ong tồn tại tuyến trùng non lại trở thành vật xâm nhiễm sâu non đục cây, bắt đầu một chu kỳ sống của lứa sau.

Hiện nay trong khi chờ đợi về công nghệ gen trong bảo vệ giống cây trồng thành công để đưa vào ứng dụng rộng rãi, một số nước đang đẩy mạnh những biện pháp sinh học thay thế dần các thuốc trừ sâu hoá học. Chẳng hạn:

- Ở nước ta và một số nước đang có biện pháp nuôi ong mắt đỏ để diệt sâu đay.

- Ở Ấn Độ dùng hạt cây sấu dâu để diệt gần 200 loài sâu hại bởi vì trong hạt cây sấu dâu có loại dầu chứa chất Azadirachtin có tác dụng diệt côn trùng mạnh. Ở Ấn Độ đang chuẩn bị xây dựng nhà máy chế biến với công suất 20 tấn hạt sấu dâu/ngày.

- Người Pháp đã dùng phương pháp di truyền học nuôi chọn những ấu trùng bọ rùa. Mỗi con bọ rùa này mỗi ngày có thể ăn hết 100 con rệp hại cây ăn quả. Người ta gọi đó là những con bọ dọn vườn.

- Dùng bọ cánh cứng để tiêu diệt cỏ dại (cỏ Leafy Spurge). Người Mỹ ước tính 7 năm tới loại cỏ này mọc đầy khoảng 2 triệu hecta đất trồng ở Bắc Mỹ, Canada và sẽ làm tổn thất hơn 100 triệu đô la mỗi năm.

- Ở Đức hàng ngàn hecta rừng sồi đã bị một loại nhện tàn phá trong mùa đâm chồi nảy lộc. Người ta nhanh chóng dùng biện pháp diệt nhện độc bằng phương pháp vi sinh. Thuốc này mang tên *Bacillus thuringiensis*. Người ta dùng máy phun thuốc này lên ngọn cây. Khi côn trùng ăn vào cùng với chồi non, lá non thì tác dụng đầu tiên là làm cho chúng không còn muốn ăn nữa và sau đó sẽ làm chúng thủng bụng và lăn ra chết.

- Cũng trong thời gian gần đây, người Mỹ đã nghiên cứu tạo ra một loại virus dùng để "săn đuổi và giết chết" các loại sâu và côn trùng độc hại. Một trong những loại virus này có tên là polyeder. Người ta đã thí nghiệm thả chúng vào rừng và kết quả là 7 hecta thí nghiệm sạch bóng nhện độc. Loại virus này thích ứng với từng loại sâu bệnh nhằm thay thế các loại hoá chất trừ sâu.

- Ở nước ta có phòng thí nghiệm đã nuôi sâu xanh rồi cho trộn thức ăn với virus tức là chiếm khoảng 30% trọng lượng lương khô của con sâu. Khi sâu chết được gấp riêng ra và cho nghiền nát để lấy nước dịch. Đây là loại thuốc trừ sâu vi sinh diệt sâu xanh.

- Nấm *Boveroa* cũng được dùng để trừ sâu róm thông.

- Nấm metthirum cũng đang được nghiên cứu trừ rầy nâu hại lúa.

- Virus NPV - virus đa diện nhân (nuclear polyhedrosis virus) và GV (Graluclar virus) đang được sử dụng vào diệt sâu bông...

7. Sử dụng động vật nguyên sinh phòng trừ sâu hại

Đặc trưng động vật nguyên sinh

Động vật nguyên sinh là vi sinh vật đơn bào, kết cấu tế bào giống như tế bào động vật bậc cao, như màng tế bào, tế bào chất và 1 hoặc nhiều nhân. Phương thức dinh dưỡng của động vật nguyên sinh có 3 loại: (1) Dinh dưỡng thực vật; (2) Dinh dưỡng động vật; (3) Dinh dưỡng hoại sinh. Nguyên sinh động vật ký sinh trong côn trùng phần lớn thuộc phương thức hoại sinh, nghĩa là dựa vào tác dụng thẩm thấu hút chất dinh dưỡng trong cơ thể côn trùng thông qua bề mặt của tế bào động vật nguyên sinh.

Sinh sản của động vật nguyên sinh bao gồm sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính. Sinh sản vô tính có mấy hình thức phân đôi, phân nhiều và mọc mầm. Phần lớn động vật nguyên sinh ký sinh sinh sản theo phân chia nhiều, nghĩa là nhân tế bào chia ra nhiều nhân mới, sau đó phân chia tế bào

mỗi nhân mang tế bào chất, cuối cùng hình thành nhiều cá thể mới. Phương thức sinh sản hữu tính có hai loại: loại giao phối và loại tiếp hợp. Sinh sản giao phối là hai phôi đồng hình hoặc khác hình tiếp xúc nhau và phát triển thành cá thể hay hợp tử mới, hợp tử lại phân chia hình thành nhiều cá thể. Sinh sản tiếp hợp là hai phôi không tiếp xúc nhau mà chỉ trao đổi một phần nhân và tế bào chất, sau đó tách ra mà phân chia tế bào. Phần lớn động vật nguyên sinh gây bệnh côn trùng sinh sản hữu tính theo kiểu sinh sản giao phối, chỉ có trùng roi tiến hành sinh sản tiếp hợp.

Nguyên sinh động vật gây bệnh côn trùng bao gồm:

- Lớp trùng roi Flagellata: Những loài ký sinh côn trùng thuộc họ Trypan osomatidae đặc biệt là 4 giống Leptomonas, Herpetomonas, Crithidia và Blastocrithidia. Loài trùng roi Leptomonas pyrrhocoris gây bệnh cho bọ xít pyrrhocoris apterus, sâu hại sáp ong Galleria mellonella, bọ cánh cứng Tenebrio molitor, ruồi Calliphora sp. Loài Leptomonas pyraustae ký sinh sâu đục thân ngô. Các loài thuộc giống Herpetomonas thường ký sinh côn trùng bộ 2 cánh, cánh vảy và cánh màng.

- Lớp trùng chân giả Sarcodina: Phần lớn trùng amip ký sinh côn trùng thuộc họ Amoebidae và

Endamoebiae. Loài *Malamoeba locustae* (họ Amoebidae) ký sinh ở ống Manpigi và biểu mô ruột của hơn 40 loài châu chấu. Kết quả nghiên cứu cho thấy loài trùng amip *M. locustae* có thể sử dụng trừ các loài châu chấu hại cây trồng.

- Lớp trùng bào tử Aporezoa: Gồm nhiều loại gây bệnh cho côn trùng, thường ký sinh trong tế bào. Côn trùng bị nhiễm nặng sẽ chết. Các nguyên sinh động vật thuộc nhóm này đều có giai đoạn ngủ nghỉ được gọi là bào tử, có khả năng chống chịu khá đối với tác động của các yếu tố môi trường. Đây là điều kiện tốt cho trùng bào tử tồn tại ở ngoài cơ thể vật chủ để lây lan bệnh. Lớp trùng bào tử gồm có:

+ Đại diện của bộ phụ Eugregarinaria (thuộc bộ Gregarinomorpha) là những ký sinh thông thường của côn trùng hại thực vật hoặc côn trùng trong kho, thuộc giống *Gregarina* (*G. cuneata*, *G. polymorpha*, *G. steini*) ký sinh bộ cánh cứng *Tenebrio molitor*, loài *G. vizri* ký sinh bộ Zabrus *tenbrioides*, loài *G. typographi* ký sinh một *Ips typographus*. Các loài trùng bào tử thuộc bộ phụ *Schizogrega - rinaria* của bộ Gregarinomorpha là ký sinh rất nguy hiểm cho côn trùng. Thí dụ: *Mattesia dispersa* ký sinh sâu *Ephestia kuhniella*;

M. trogodermae, B. thuringiensis ký sinh một cứng đốt *Trogoderma granarium*.

+ Bộ trùng Coocidiomorpha có giống *Adelina* ký sinh trong cơ thể côn trùng. Loài *Adelina triboli* ký sinh một *Tribolium castaneum* và *T. confusum*. Loài *A. mesnili* ký sinh sâu *Ephestia kuhniella*, *Tineola biselliella* và *Plodia interpunctella*. Loài *melolonthae* ký sinh bọ hung *Melolontha*.

+ Bộ trùng bào tử nhỏ *Microsporidia* có nhiều loài gây bệnh cho côn trùng và có ý nghĩa thực tiễn trong trừ sâu hại. Chúng ký sinh bên trong các tế bào vật chủ, phá huỷ nhiều loại mô trong cơ thể côn trùng bị bệnh. Người ta đã biết và mô tả khoảng 200 loài trùng bào tử nhỏ ký sinh côn trùng.

Trùng bào tử nhỏ ký sinh ở nhiều nhóm côn trùng nhưng chưa gặp ký sinh ở côn trùng chích hút thực vật. Một số loài trùng bào tử nhỏ rất chuyên tính như *Nosema apis*, *N. bombycis*. Một số khác thì lại đa thực như loài *Plistophora schubergi* ký sinh ở 20 loài cánh vẩy thuộc 5 họ.

Đặc điểm quan trọng của bộ trùng *Microsporidia* là tạo thành những bào tử nhỏ. Sự lây nhiễm cho vật chủ là nhờ những bào tử này. Số lượng bào tử trong 1 túi bào tử phụ thuộc vào loài hoặc giống

nguyên sinh động vật. Các loài thuộc giống *Nosema* có một bào tử trong một túi bào tử. Loài *Nosema bombycis* và *N. apis* là những tác nhân gây bệnh rất nguy hiểm cho tằm và ong mật (tương ứng). Loài *N. locustae* là ký sinh của một số châu chấu và được nghiên cứu để trừ châu chấu.

- Lớp thảo trùng Ciliophora: Nhiều loài thảo trùng ký sinh côn trùng, nhưng chỉ một số ít có khả năng gây bệnh cho côn trùng. Thảo trùng gây bệnh chủ yếu cho côn trùng sống trong nước; ấu trùng muỗi thuộc họ Chironomidae và Culicidae. Trong một ấu trùng muỗi *Chironomus plumosus* bị nhiễm nặng có thể có 100.000 - 200.000 cá thể thảo trùng loài *Tetrahymena chironomi*.

Sử dụng nguyên sinh động vật trừ sâu hại

Trong tất cả các nguyên sinh động vật ký sinh côn trùng thì chỉ có trùng bào tử cỡ nhỏ *Microsporidia* là có khả năng phát triển trừ côn trùng hại. Trùng bào tử nhỏ lây truyền theo 3 cách chính: qua miệng, qua vết thương ở vỏ cơ thể vào trong dịch máu và qua trứng.

Để có nguồn nguyên sinh động vật dùng bổ sung vào môi trường sống của côn trùng có thể nhân nuôi trùng amip *Melamoeba locustae* trên loài muỗi *Melanoplus differentialis*. Sản xuất bào tử

của trùng *Mattesia grandis* và *Glugea gasit* trên bọ vòi voi hại bông *Anthonomus grandis*; sản xuất bào của trùng *Nomesa serbica*, *N. lymantriae*, *N. muscularris* trên sâu róm *Lymantria dispar*. *Nosema locustae* được sản xuất thành một chế phẩm trừ côn trùng có hiệu quả cao.

C. SỬ DỤNG PHÂN LÂN VI SINH

Lân là một trong những yếu tố quan trọng đối với cây trồng. Lân dễ tiêu trong đất thường không đáp ứng được nhu cầu của cây nhất là những cây trồng có năng suất cao. Bón phân lân và tăng cường độ hoà tan các dạng lân khó tiêu là biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Bón phân hữu cơ, vùi xác động vật vào đất ở mức độ nhất định là biện pháp tăng hàm lượng lân cho đất.

Lân hữu cơ có trong cơ thể động vật, thực vật, vi sinh vật thường gặp ở các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipit, axit nucleic. Trong không bào người ta còn thấy lân vô cơ ở dạng octhophosphat làm nhiệm vụ đệm và chất dự trữ. Cây trồng, vi sinh vật không thể trực tiếp đồng hoá lân hữu cơ. Muốn đồng hoá chúng phải được chuyển hoá thành dạng muối H_3PO_4 .

Lân vô cơ thường ở trong các dạng khoáng như

apatit, phosphoric, phosphat sắt, phosphat nhôm... Muốn cây trồng sử dụng được phải qua chế biến để trở thành dạng dễ tan. Vi sinh vật giữ vai trò quan trọng trong quá trình này.

Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan là sản phẩm có chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật còn sống đạt tiêu chuẩn có khả năng chuyển hoá các hợp chất phospho khó tan thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông phẩm. Phân lân vi sinh vật không gây hại đến sức khoẻ của người, động thực vật và không ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái.

Phân lập tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân (VSVPGL)

Người ta thường phân lập tuyển chọn chủng VSVPGL từ đất hoặc từ vùng rễ cây trồng trên các loại đất hay cơ chất giàu hữu cơ theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường đặc Pikovskaya. Khi đó các chủng VSVPGL sẽ tạo vòng phân giải, tức là vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc. Vòng phân giải được hình thành nhờ khả năng hoà tan hợp chất phospho không tan được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Căn cứ vào đường kính vòng phân giải, thời gian hình thành và độ trong của vòng phân giải người ta có thể

đánh giá định tính khả năng phân giải mạnh hay yếu của các chủng vi sinh vật phân lập. Để đánh giá chính xác mức độ phân giải các hợp chất phospho khó tan của vi sinh vật, người ta xác định định lượng hoạt tính phân giải của chúng bằng cách phân tích hàm lượng lân dễ tan trong môi trường nuôi cấy có chứa loại phosphat không tan. Tỷ lệ (%) giữa hàm lượng lân tan và lân tổng số trong môi trường gọi là hiệu quả phân giải. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh vật người ta cố gắng tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ nhiều loại hợp chất phospho và vô cơ khác nhau. Chủng vi sinh vật có khả năng phân giải phospho cao chưa hẳn là có ảnh hưởng tốt đến cây trồng. Vì ngoài hoạt tính phân giải lân, nhiều chủng vi sinh vật còn có các hoạt tính sinh học khác gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Do vậy sau khi đánh giá khả năng phân giải lân, các chủng vi sinh vật dùng để sản xuất phân lân vi sinh cần được đánh giá ảnh hưởng đến đối tượng cây trồng sử dụng. Chỉ sử dụng chủng vi sinh vật vừa có hoạt tính phân giải lân cao vừa không gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng và môi trường sinh thái.

Từ các chủng giống vi sinh được lựa chọn (chủng

gốc) người ta tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật, xử lý sinh khối vi sinh vật và tạo sản phẩm phân lân vi sinh. Các công đoạn sản xuất phân lân vi sinh được tiến hành tương tự như trong quy trình sản xuất phân bón vi sinh vật cố định nitơ. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh từ vi khuẩn người ta sử dụng phương pháp lên men chìm trong các nồi lên men và sản xuất phân lân vi sinh từ nấm sử dụng phương pháp lên men xốp. Sản phẩm tạo ra của phương pháp lên men xốp là chế phẩm dạng sợi hoặc chế phẩm bào tử. Chế phẩm lân vi sinh vật có thể được sử dụng như một loại phân bón vi sinh vật hoặc được bổ sung vào phân hữu cơ dưới dạng chế phẩm vi sinh vật làm giàu phân ủ, qua đó nâng cao chất lượng của phân ủ. Tại Việt Nam, trong sản xuất phân lân vi sinh thường sử dụng bột quặng photphorit bổ sung vào chất mang không khử trùng. Việc này tận dụng được nguồn quặng tự nhiên sẵn có của địa phương làm phân bón qua đó giảm chi phí trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên để phân bón có hiệu quả cần phải kiểm tra đánh giá khả năng phân giải quặng của chủng vi sinh vật sử dụng và khả năng tồn tại của chúng trong chất mang được bổ sung quặng.

* Phương pháp bón phân lân vi sinh.

Phân lân vi sinh thường được bón trực tiếp vào

đất, người ta ít dùng loại phân này để trộn vào hạt. Có nhiều cách bón khác nhau:

+ Có thể trộn đều chế phẩm với đất tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng hoai, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Có thể trộn chế phẩm vi sinh vật với đất hoặc với phân chuồng hoai, sau đó đem bón thúc cho cây (càng bón sớm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích vào đất.

Hiệu quả của phân lân vi sinh.

Hàm lượng lân trong hầu hết các loại đất là thấp, vì vậy việc bón lân cho đất nhằm nâng cao năng suất cây trồng là việc làm cần thiết. Người ta cũng biết rằng khoảng 2/3 lượng lân được bón bị đất hấp thụ trở thành dạng cây trồng không sử dụng được hoặc bị rửa trôi. Phân vi sinh vật phân giải phosphat khó tan không chỉ có tác dụng nâng cao hiệu quả của phân bón lân khoáng nhờ hoạt tính phân giải và chuyển hoá của các chủng vi sinh

vật mà còn có tác dụng tận dụng nguồn phosphat địa phương có hàm lượng lân thấp, không đủ điều kiện sản xuất phân lân khoáng ở quy mô công nghiệp. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy hiệu quả to lớn của phân vi sinh vật phân giải lân. Tại Ấn Độ, vi sinh vật phân giải lân được đánh giá có tác dụng tương đương với 50kg P_2O_5 / ha. Sử dụng vi sinh vật phân giải lân cùng quặng phosphat có thể thay thế được 50% lượng lân khoáng cần bón mà không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Hiện nay Trung Quốc và Ấn Độ là hai quốc gia đang đẩy mạnh chương trình phát triển và ứng dụng công nghệ sản xuất phân lân vi sinh vật ở quy mô lớn với diện tích sử dụng hàng chục triệu hecta. Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu gần đây cho biết một gói chế phẩm vi sinh vật phân giải lân (50g) sử dụng cho cà phê trên vùng đất đỏ Bazan có tác dụng tương đương với 34,3kg P_2O_5 / hecta. Bón phân lân vi sinh có tác dụng làm tăng số lượng VSVPGL trong đất, dẫn đến tăng cường độ phân giải lân khó tan trong đất 23 - 35%. Cây trồng phát triển tốt hơn, thân lá cây mập hơn, to hơn, bản lá dày hơn, tăng sức đề kháng sâu bệnh, tăng năng suất đậu tương 5 - 11%, lúa 4,7 - 15% so với đối chứng.

D. SỬ DỤNG PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC

Phân hữu cơ sinh học là loại sản phẩm phân bón được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học được chuyển hoá thành dạng mùn.

Nguyên liệu sản xuất phân hữu cơ sinh học là phế thải của gia súc, gia cầm; phế thải chế biến thuỷ hải, súc sản; tồn dư cây trồng nông, lâm nghiệp (thân, lá, rễ, cành cây); phế thải sinh hoạt, phế thải đô thị, phế thải chế biến nông, lâm sản và than bùn. Thông thường tồn dư của các cây ngũ cốc chứa 0,5% nitơ, 0,6% P_2O_5 và 1,5% K_2O . Tồn dư các cây họ đậu chứa hàm lượng nitơ cao hơn nhiều so với cây ngũ cốc. Từ các nguyên liệu hữu cơ trên người nông dân từ xa xưa đã biết ủ và chế biến thành phân chuồng, phân rác bón cho đất và cây trồng. Trước đây phân rác, phân chuồng là nguồn phân bón chính được sử dụng cho mọi loại hình canh tác ở nước ta. Ở Việt Nam tiềm năng phân rác khoảng 61-62 triệu tấn và với lượng bón khoảng 8,7 tấn/ha sẽ cung cấp một lượng dinh dưỡng tương

đương với 34,8kg N, 21,8kg P_2O_5 và 26,1kg K_2O /ha/năm. Phân chuồng phân rác là một loại phân hữu cơ sinh học được chế biến bằng cách tận dụng vi sinh vật sẵn có trong nguyên liệu. Với phương pháp chế biến truyền thống để tạo được phân hữu cơ đảm bảo độ hoai chín cần thiết, thời gian ủ kéo dài từ 4 đến 6 tháng. Ứng dụng công nghệ vi sinh vật chế biến phân hữu cơ sinh học không chỉ rút ngắn thời gian ủ mà còn nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm tạo ra.

Phân hữu cơ sinh học với sự trợ giúp của chế phẩm vi sinh vật

Vi sinh vật trợ giúp quá trình chế biến phân ủ là các vi sinh vật lựa chọn có khả năng thúc đẩy nhanh quá trình chuyển hoá phế thải hữu cơ thành phân bón. Thông thường các loại vi sinh vật chuyển hoá xenlulo và ligno xenlulo, đó là các loài *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Paeceilomyces* sp, *Trichurus spiralis*, *Chetomium* sp... Để chế biến, các phế thải hữu cơ được cắt ngắn khoảng 5 - 8 cm, làm ẩm và đưa vào các hố ủ có bổ sung 5kg đạm, 5kg lân supe (hoặc nung chảy) cho 1 tấn nguyên liệu. 750ml sinh khối vi sinh vật sau 10 ngày nuôi cấy được hoà vào 30 lít nước và trộn đều với khối nguyên

liệu. Độ ẩm cuối cùng của khối nguyên liệu được điều chỉnh bằng nước sạch để đạt 60%. Để đảm bảo oxy cho vi sinh vật hoạt động và quá trình chế biến được nhanh chóng nên đảo trộn khối ủ 20 ngày 1 lần. Thời gian chế biến kéo dài khoảng 1 đến 4 tháng tùy thành phần của loại nguyên liệu.

Phân hữu cơ sinh học có bổ sung vi sinh vật trợ lực và làm giàu dinh dưỡng (phân hữu cơ vi sinh vật)

Phân hữu cơ sinh học dạng này được chế biến khi nhiệt độ khối ủ ổn định ở mức 30°C sau khi bổ sung vi sinh vật có ích khác vào khối ủ. Đó là vi khuẩn cố định nitơ tự do (*Azotobacter*), vi khuẩn hoặc nấm sợi phân giải phosphat khó tan (...). Ngoài ra có thể bổ sung 1% quặng phosphat vào khối ủ cùng với sinh khối vi sinh vật. Sản phẩm phân hữu cơ sinh học này không chỉ có hàm lượng mùn tổng số mà còn có hàm lượng nitơ tổng số cao hơn loại phân hữu cơ chế biến bằng phương pháp truyền thống 40-45%.

Xu thế phát triển công nghệ vi sinh vật hiện nay là tạo ra một chế phẩm có nhiều công dụng, thuận lợi cho người sử dụng. Ở Việt Nam nói riêng và nhiều nước trên thế giới nói chung đã sản xuất chế phẩm vi sinh vật vừa có tác dụng đồng hoá nitơ không khí vừa có tác dụng phân huỷ chuyển hoá

lân khó tan trong môi trường để cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, hoặc là sản xuất ra một loại chế phẩm vi sinh vật vừa có cả hai tác dụng như trên, ngoài ra còn có khả năng tiêu diệt sâu bệnh và côn trùng có hại. Những loại chế phẩm như vậy được gọi là chế phẩm vi sinh vật hay vi sinh vật đa chức năng.

E. SỬ DỤNG CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CẢI TẠO ĐẤT

Đất có tính đệm và lọc vì vậy có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự phân tán của các chất ô nhiễm. Tuy nhiên với sự phát triển của công nghệ hoá học và các ngành công nghiệp như: khai khoáng, chế tạo máy, công nghiệp sơn,...sự phát tán của các chất ô nhiễm đã vượt quá khả năng tự cân bằng của đất gây nên hiện tượng tích tụ và làm ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái. Trong số các chất gây ô nhiễm đất trồng người ta quan tâm nhiều đến các kim loại nặng, các thuốc hoá học bảo vệ thực vật hữu cơ. Tái sinh đất ô nhiễm bằng phương pháp sinh học không chỉ giải quyết về mặt môi trường mà còn có tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Các axit hữu cơ có thể hoà tan và làm linh động hơn các hợp chất kim loại nặng không tan. Trong tự nhiên một số sinh vật vùng rễ cây trồng có khả năng sản sinh ra các axit

hữu cơ và tạo phức với kim loại nặng hoặc các kim loại độc hại với cây trồng (nhôm, sắt...), một số khác có khả năng phân huỷ hợp chất hoá học nguồn gốc hữu cơ. Công nghệ vi sinh vật trong cải tạo đất bị ô nhiễm là sử dụng các loại vi sinh vật có khả năng phân giải hoặc chuyển hoá các chất gây ô nhiễm trong đất qua đó tạo lại cho đất sức sống mới. Ngoài ra, các vi sinh vật còn có khả năng phân huỷ các phế thải hữu cơ cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây trồng, đồng thời giúp cây chống lại các tác nhân gây bệnh nguồn gốc từ đất, tạo ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật làm ổn định cấu trúc đất ở vùng rễ cây trồng. Các vi sinh vật thường dùng trong cải tạo đất thoái hoá, đất có vấn đề do ô nhiễm môi trường có thể kể đến là nấm rễ nội cộng sinh (VAM-Vascular Arbuscular Mycorrhiza) và vi khuẩn *Pseudomonas*. Sản phẩm *Agrobacter* sản xuất ở Đức từ 2 loại vi sinh vật trên đã được sử dụng thử nghiệm ở nhiều nơi trên thế giới. Kết quả cho thấy có thể khôi phục vùng đất phèn mặn, vùng đất bị ô nhiễm kim loại nặng hay các vùng cát đang bị sa mạc hoá bằng chế phẩm vi sinh này. Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật để tái sinh, phục hồi đất có vấn đề và nâng cao độ phì của đất đang được đẩy mạnh ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam.

G. MỘT SỐ CHẾ PHẨM SINH VẬT Ở VIỆT NAM

1. Chế phẩm virus trừ sâu

Chế phẩm virus trừ sâu ở Việt Nam hiện đang được nghiên cứu sản xuất là nhóm virus đa diện nhân (NPV). Để sản xuất được các virus này đòi hỏi phải có lượng lớn sâu hại là vật chủ của chúng. Do đó công nghệ sản xuất chế phẩm virus trừ sâu bao gồm 2 khâu quan trọng là: công nghệ sản xuất hàng loạt sâu vật chủ và quá trình tạo sinh khối virus.

Để sản xuất ra số lượng lớn sâu vật chủ người ta đã tiến hành nghiên cứu chế tạo thức ăn cho sâu vật chủ. Trên cơ sở các nghiên cứu môi trường thức ăn nuôi sâu bán tổng hợp, các nhà khoa học Việt Nam đã xây dựng thành công quy trình công nghệ sản xuất hàng loạt sâu vật chủ và tạo chế phẩm virus phòng trừ một số sâu hại như sâu xanh, sâu khoang, sâu keo da láng.

Virus được nhiễm vào cơ thể sâu vật chủ và phát triển trong đó đến khi đạt sinh khối lớn nhất, người ta tiến hành giết sâu vật chủ và xử lý sinh khối virus. Sản phẩm tạo ra có thể là chế phẩm dạng nước hoặc dạng bột khô.

+ Chế phẩm virus NPV sâu xanh sản xuất theo quy trình công nghệ trên được thử nghiệm và áp

dụng trên đồng ruộng trừ sâu xanh trên cây bông và thuốc lá ở Sơn La, Hà Nội, Đồng Nai, Bình Phước, Ninh Thuận, v.v...đều cho kết quả phòng trừ tốt và bảo vệ được năng suất cây trồng. Chế phẩm virus sâu xanh cùng với OMD là những tác nhân sinh học quan trọng trong hệ thống phòng trừ tổng hợp (PTTH) sâu hại bông. Chế phẩm có giá thành cao và người nông dân chưa quen sử dụng nên phạm vi áp dụng còn hạn chế.

+ Chế phẩm virus NPV sâu đo xanh đay: Cho đến nay chưa tìm được môi trường thức ăn nhân tạo nuôi sâu này. Do đó để có sâu vật chủ nhân virus phải nuôi bằng thức ăn tự nhiên. Vì vậy, chế phẩm virus sâu đo đay được sản xuất bằng phương pháp thủ công như sau: dùng nguồn NPV của sâu đo đay phun lên đồng đay nơi có nhiều sâu, thu gom sâu chết bệnh lại để nghiền lọc lấy dịch virus. Sau đó lại đem phun lên đồng đay. Cứ như vậy có thể tạo ra chế phẩm virus tại chỗ để trừ sâu đo đay. Việc sản xuất và sử dụng chế phẩm virus sâu đo đay tại chỗ là một biện pháp có triển vọng vì rẻ tiền, có hiệu quả kinh tế nên người nông dân vùng trồng đay có thể chấp nhận được.

+ Chế phẩm virus sâu róm thông: Chế phẩm virus phòng trừ sâu róm thông cũng bằng phương pháp thủ công như sản xuất chế phẩm virus sâu đo

xanh đay. Hiệu quả diệt sâu róm thông của chế phẩm virus đạt 55,2-83,3%. Chế phẩm này được áp dụng thành công trừ sâu róm thông ở Thanh Hoá. Sử dụng chế phẩm virus sâu róm thông đã hạn chế sử dụng thuốc hoá học và tỷ lệ ký sinh tự nhiên của một số ong ký sinh sâu róm thông tăng lên.

Ngoài các chế phẩm kể trên còn có chế phẩm virus NPV sâu keo da láng cũng được sản xuất theo phương pháp thủ công. Chế phẩm này được sử dụng rộng rãi ở Ninh Thuận, Lâm Đồng mang lại hiệu quả kinh tế xã hội cao.

2. Chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột

Chế phẩm vi sinh vật diệt chuột của Liên Xô (cũ) Bacterodensid là sản phẩm được sản xuất từ vi khuẩn *Salmonella enteritidis* Isatchenko có tác dụng gây bệnh và làm chết các loại chuột nhà, chuột đồng, chuột cống, chuột đen... Chế phẩm đã được sử dụng rộng rãi tại Liên Xô (cũ), Mông Cổ và Cuba, mang lại hiệu quả phòng trừ chuột cao. Tại Việt Nam các chế phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột mang tên BIORAT (Công ty BIOFRAM - Cuba), MIROCA (Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam), bả diệt chuột sinh học (Viện Bảo vệ thực vật) đã được thử nghiệm trên các đối tượng chuột của Việt Nam. Kết quả cho thấy các chế

phẩm có tác dụng tốt trong việc gây ốm và làm chết các loại chuột, lại không gây ảnh hưởng xấu đến gia súc, gia cầm. Sản phẩm vi sinh vật phòng trừ chuột đã được đăng ký vào danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng tại Việt Nam và được ứng dụng rộng rãi tại nhiều địa phương trong cả nước.

Chất mang cho chế phẩm bảo đảm sao cho vi khuẩn có thể tồn tại tốt, không gây ảnh hưởng xấu đến môi trường khi sử dụng và phải là nguồn thức ăn mà chuột ưa thích. Tại Liên Xô (cũ) chất mang được lựa chọn là hạt mạch cho chế phẩm dạng hạt và bột xương cho chế phẩm dạng bột. Tại Việt Nam, qua quá trình nghiên cứu: thóc đồ được lựa chọn là nguyên liệu làm chất mang cho chế phẩm. Thóc đồ có ưu điểm: sẵn có, dễ chế biến, có sức hấp dẫn chuột cao, bảo đảm cho vi khuẩn sinh trưởng phát triển tốt và tồn tại trong thời gian dài. Sản phẩm tạo ra từ nền thóc đồ đảm bảo mật độ 10^9 CFU/g sau ba tháng sản xuất.

III. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ VI SINH TRONG CÔNG NGHIỆP ĐỂ TẠO MEN

1. Ý nghĩa của việc tạo men

- Sản xuất kháng sinh dùng trong chăn nuôi.
- Sản xuất enzym từ nấm mốc.
- Làm tương.
- Sản xuất rượu.

2. Quy trình lên men

a. Giống vi sinh vật

Muốn có sản phẩm tốt ngoài quy trình công nghệ thì khâu giống là quan trọng nhất, nó quyết định chất lượng sản phẩm và giá trị kinh tế của quy trình công nghệ sản xuất.

Trong công nghệ lên men, người ta sử dụng rộng rãi nhiều loại vi sinh vật thuộc nhóm Prokaryote (vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam) và nhóm Eukaryote (nấm men, nấm mốc, tảo).

- *Tiêu chuẩn của giống*: chủng vi sinh vật được coi là chủng tốt trong sản xuất phải có tính ưu việt, có khả năng sinh tổng hợp tạo sinh khối với

hiệu suất cao, đồng thời phải có thêm những đặc điểm sau:

+ Có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các nguyên liệu thô, các phế thải...;

+ Trong quá trình lên men không tạo ra các phẩm phụ không mong muốn của người sản xuất;

+ Ít mẫn cảm đối với sự tạp nhiễm do vi sinh vật khác;

+ Sản xuất sinh khối có thể tách dễ dàng ra khỏi môi trường dinh dưỡng.

Tuy nhiên trong quá trình sản xuất các tiêu chuẩn trên không phải gắn liền với nhau mà cùng tồn tại ở một số đối tượng vi sinh vật nào đó. Các vi sinh vật thuộc nhóm Eukaryote có kích thước tế bào lớn thể hình sợi, do đó dễ tách chúng ra khỏi môi trường dinh dưỡng bằng phương pháp lọc ly tâm thông thường. Nhưng ở chúng thường tồn tại một quy tắc chung là kích thước tế bào tỷ lệ nghịch với hoạt tính trao đổi chất.

Việc chọn chủng cho một quy trình công nghệ là hết sức quan trọng, để chọn được chủng có hoạt tính cao người ta phải tìm cách hoàn thiện genotype của chúng với các phương pháp sau: chọn lọc, lai tạo, gây đột biến trong chất liệu di truyền của tế bào hoặc

trong hệ thống điều hoà trao đổi chất. Gần đây người ta đã sử dụng các phương pháp di truyền hiện đại để tạo các chủng giống có những tính chất mong muốn một cách chủ động, do đó các chủng dùng trong sản xuất ngày càng hoàn hảo, đáp ứng ngày một tốt hơn yêu cầu của con người.

- Các công việc chủ yếu của công tác giống trong sản xuất

Trong sản xuất, việc hoạt hoá giống và thường xuyên kiểm tra chất lượng của giống là điều hết sức cần thiết và không thể thiếu. Muốn làm tốt khâu này cần phải tiến hành các việc sau:

+ Kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lên men;

+ Kiểm tra khả năng hồi biến của giống. Hầu hết các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất là đột biến, do đó phải kiểm tra xem chúng có hồi trở lại giống gốc hay không, bởi hiện tượng này rất hay xảy ra;

+ Hoạt hoá giống sau một thời gian sử dụng. Để hoạt hoá giống người ta sử dụng môi trường nuôi cấy giàu các chất kích thích sinh trưởng như cao nấm men, nước chiết cà chua, hỗn hợp vitamin, axit béo;

+ Giữ giống bằng phương pháp thích hợp để có

mang các tế bào vi sinh vật, chủ yếu là nhóm vi sinh vật có bào tử. Cách làm như sau: Cát và đất được xử lý sạch, sàng lọc qua rây, xử lý pH đạt trung tính, sấy khô và khử trùng. Sau đó bằng thao tác vô trùng trộn bào tử và cơ chất cát hoặc đất trong các ống nghiệm. Dùng paraffin nóng chảy phết lên nút bông của ống nghiệm để giúp cho ống giống không bị ẩm trở lại.

Ngoài cát và đất, người ta còn giữ giống trong hạt ngũ cốc hay trên silicagen... Phương pháp bảo quản giống trên chủ yếu cho nấm mốc và xạ khuẩn.

+ Giữ giống bằng phương pháp lạnh đông

Bằng phương pháp này dựa trên nguyên tắc ức chế sự phát triển của vi sinh vật, đưa chúng vào điều kiện lạnh sâu ở -25°C đến -70°C . Người ta trộn vi sinh vật với dung dịch bảo vệ hay còn gọi là dung dịch nhũ hoá như glycerin 15%, huyết thanh ngựa (loại không cho chất bảo quản), dung dịch glycose hoặc lactose 10%... Việc làm lạnh được tiến hành một cách từ từ. Khi độ lạnh đạt -20°C , nếu tiếp tục làm lạnh thì tốc độ làm lạnh phải đạt $1-2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$.

Phương pháp bảo quản này có ưu điểm là bảo quản được lâu.

Nếu giữ ở nhiệt độ -15°C đến -20°C thì 6 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở nhiệt độ - 30⁰C thì 9 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở nhiệt độ - 40⁰C thì 12 tháng cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở nhiệt độ - 50⁰C thì 3 năm cấy truyền lại 1 lần.

Nếu giữ ở nhiệt độ - 70⁰C thì 10 năm cấy truyền lại 1 lần.

+ Giữ giống bằng phương pháp đông khô.

Về nguyên tắc cũng giống như phương pháp lạnh đông, nhưng khác ở chỗ là đưa chất bảo vệ vào như Glutamate 3% hay Lactose 1,2% + pepton 1,2% hay Saccharose 8% + sữa 5% + gelatin 1,5%.

Điều khác biệt với phương pháp lạnh đông là: Để đảm bảo an toàn hơn cho sự sống của tế bào giống, người ta làm thăng hoa phần nước ở trong tế bào và môi trường có chất bảo vệ trong thiết bị đông khô ở áp suất 1.10^{-4} mmHg. Hỗn hợp tế bào giống và dung dịch bảo vệ được chứa trong các ampul thủy tinh có ϕ 10 - 15 mm được hàn kín để bảo đảm độ khô và chân không cần thiết, những ampul này được bảo quản ở nhiệt độ 3 - 5⁰C.

Đây là phương pháp bảo quản tối ưu nhất hiện nay, có thể tới vài chục năm mới phải làm lại. Những năm gần đây người ta đưa ra phương pháp

giữ giống bằng ngân hàng gen để giữ giống vi sinh vật quý hiếm, song chi phí rất tốn kém.

b. Nhân giống vi sinh vật

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào vi sinh vật. Trong quy trình lên men, thì tùy từng chủng giống vi sinh vật khác nhau mà cần nhân theo cơ chất và môi trường nhân khác nhau. Thường có hai dạng giống: tế bào sinh dưỡng và bào tử.

- Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng

Để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta chọn môi trường nhân sinh khối là môi trường đảm bảo cho vi sinh vật tồn tại thích hợp nhất, để với thời gian ngắn nhất cho sinh khối vi sinh vật lớn nhất. Trong trường hợp này thường dùng môi trường dịch thể (nuôi cấy chìm).

- Trường hợp giống là bào tử conidi: Thông thường chọn môi trường đặc (nuôi cấy bán rắn: cám gạo, bột ngô, thóc, trấu, mùn cưa...)

Nuôi cấy nấm mốc và xạ khuẩn thường cần thời gian khá dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách: Dùng máy hút (như hút bụi) hay dùng chổi lông mềm quét lên bề mặt của môi trường bán rắn để thu hồi giống.

Bào tử được thu hồi cho vào bình khô có gắn

miệng bình bằng paraffin, bảo quản nơi thoáng mát và sử dụng hàng năm.

Trong công nghiệp, người ta thường nhân với lượng lớn sinh khối vi sinh vật bằng các bước như sau:

+ Giai đoạn trong phòng thí nghiệm (gọi là nhân giống cấp I)

Đây là giai đoạn cấy giống vi sinh vật thuần khiết từ ống giống, đem nhân ở môi trường dinh dưỡng chuyên tính vô trùng, nuôi cấy trong phòng thí nghiệm, nhằm đáp ứng đủ lượng giống cần thiết cho bước tiếp theo.

+ Giai đoạn ở xưởng (nhân giống sản xuất)

Đây là giai đoạn cần nhân một lượng giống lớn để đáp ứng cho khâu giống trong sản xuất. Từ giống cấp I; II; III nhân trong nồi lên men hay trong cơ chất đặc (chất nang).

Khi kết thúc mỗi khâu nhân giống cần kiểm tra ngay độ thuần của giống và mật độ tế bào vi sinh vật cần nhân.

c. Lên men

Là giai đoạn nuôi cấy vi sinh vật để chúng tạo sản phẩm hoặc sinh khối vi sinh vật hoặc là sản phẩm trao đổi chất... Đây là khâu quyết định kết quả của một quy trình lên men.

Để thực hiện lên men, người ta thường sử dụng hai phương pháp là lên men bề mặt và lên men chìm.

Khái niệm lên men bề mặt

Lên men bề mặt là thực hiện nuôi cấy vi sinh vật trên bề mặt môi trường dịch thể hoặc bán rắn

- Nuôi cấy trên bề mặt dịch thể (dùng cho nhóm vi sinh vật hiếu khí): Tùy từng loại vi sinh vật khác nhau mà chọn môi trường thích hợp khác nhau. Môi trường được pha loãng với nồng độ thích hợp, sau đó bổ sung nguồn nitrogen (N), nguồn khoáng... Khi môi trường cho vào thiết bị lên men phải đảm bảo cho cột môi trường có bề mặt thoáng, rộng. Nuôi cấy theo phương pháp này đơn giản, nhưng đòi hỏi diện tích sử dụng lớn, khó tự động hoá quy trình sản xuất. Hiện nay phương pháp này ít được sử dụng.

- Nuôi cấy bề mặt sử dụng môi trường bán rắn: Có thể dùng vi sinh vật hiếu khí hoặc bán hiếu khí hoặc kỵ khí. Ở phương pháp lên men này nguyên liệu thường dùng là:

- + Các loại hạt: gạo, đậu tương...
- + Các loại mảnh: mảnh rắn, mảnh ngô...
- + Các loại phế liệu hữu cơ: bã mía, trấu, cọng rơm rạ, rác thải sinh hoạt...

Các loại nguyên liệu chứa tinh bột trước khi sử dụng phải xử lý bằng cách nấu chín. Ngoài các nguyên liệu nói trên người ta phải bổ sung các chất dinh dưỡng vào môi trường để đảm bảo cho dinh dưỡng của vi sinh vật trong quá trình nhân sinh khối (lên men).

Đối với vi sinh vật hiếu khí cần phải có quạt thổi khí vô trùng. Trong lên men bán rắn, ngoài yêu cầu về nguyên liệu thì độ ẩm rất cần thiết cho quá trình lên men. Phải luôn luôn đảm bảo độ ẩm 60 - 75% (độ ẩm không khí 90 - 100%). Phương pháp lên men bán rắn được sử dụng rộng rãi trên thế giới trong các lĩnh vực như:

- + Sản xuất kháng sinh dùng trong chăn nuôi
- + Sản xuất enzym từ nấm mốc
- + Làm tương
- + Đường hoá tinh bột để sản xuất rượu ethanol từ nấm men

Khái niệm về lên men chìm

Áp dụng cho cả vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí

Khi lên men chìm, vi sinh vật được nuôi cấy ở môi trường dịch thể, chúng sẽ phát triển theo chiều đứng của cột môi trường.

Để thực hiện quá trình lên men chìm, cần qua từng bước sau:

- Thực hiện quá trình khuấy đảo và sục khí

Quá trình lên men chìm, vi sinh vật phát triển trong các nổi lên men cần được trộn đều để tăng cường diện tiếp xúc giữa tế bào và môi trường dinh dưỡng đồng thời ngăn cản sự kết lắng của tế bào. Để thực hiện việc này trong các thiết bị lên men người ta lắp hệ thống cánh khuấy, hệ thống này cần cả cho vi sinh vật hiếu khí và yếm khí. Đối với vi sinh vật hiếu khí, có tác dụng đảm bảo cung cấp ôxy đầy đủ theo yêu cầu của từng loại vi sinh vật. Hệ thống cánh khuấy là một phần rất quan trọng của thiết bị lên men. Để tăng tác dụng khuấy trộn người ta còn lắp thêm hệ thống sục khí. Không khí trước khi được bơm vào nổi lên men phải xử lý để đảm bảo sạch về cơ học (sạch bụi) và vô trùng (không có vi sinh vật) bằng cách cho đi qua một hệ thống lọc bằng bông thủy tinh và khử trùng bằng hơi nóng. Tùy từng chủng loại vi sinh vật khác nhau và tùy vào giai đoạn lên men khác nhau, mà cần cường độ thông khí khác nhau.

- Theo dõi sự tạo bọt trong lên men và biện pháp phá bọt

Khi khuấy đảo và sục khí mạnh liên tục trong nổi lên men sẽ tạo ra bọt, nó có khuynh hướng trào ra khỏi nổi lên men và gây nhiễm tạp môi trường lên men. Ngoài ra bọt khí còn cản trở sự tiếp xúc

giữa vi sinh vật và môi trường dinh dưỡng. Do vậy, trong quá trình lên men cần kiểm soát lượng bọt tạo thành và tìm cách phá huỷ chúng. Để phá bọt người ta thường dùng các chất tự nhiên như: dầu thực vật (dầu lạc), mỡ cá heo... và các chất được tổng hợp theo con đường hoá học.

- Điều chỉnh pH của môi trường lên men

Mỗi loài vi sinh vật thích hợp với pH nhất định của môi trường nuôi cấy. Trong quá trình lên men vi sinh vật luôn tạo ra các sản phẩm mang tính axit hoặc kiềm làm cho pH môi trường thay đổi. Khi pH môi trường thay đổi sẽ không thích hợp cho hoạt động sống của chính vi sinh vật ấy. Vì vậy việc chủ động điều chỉnh pH môi trường là rất cần thiết trong suốt quá trình sản xuất.

Có thể điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men bằng các dung dịch NaOH, HCl, NH_4OH , ure, hay bổ sung dịch đậm phosphat... nhưng vẫn phải đảm bảo điều kiện vô trùng.

+ Theo dõi và điều chỉnh nhiệt độ của môi trường lên men

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi sinh vật và hiệu quả lên men. Mỗi loại vi sinh vật thích ứng ở nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng tạo sản phẩm.

Quá trình lên men luôn có sự toả nhiệt rất mạnh, do đó nhiệt độ trong thiết bị lên men thường tăng vượt quá ngưỡng của nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật. Vì vậy phải thường xuyên giám sát và điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của quá trình lên men. Để làm được việc này người ta thường trang bị hệ thống làm nguội, bằng cách cho nước chảy qua nồi lên men hay cho vào hệ thống ống ruột gà làm nguội.

+ Tiếp thêm nguyên liệu và bổ sung các chất tiền thể

Việc bổ sung nguyên liệu trong quá trình sản xuất là việc làm cần thiết, vì có một số chất không cho phép đưa vào quy trình lên men ngay từ đầu với nồng độ và hàm lượng cao (như đường phải bổ sung nhiều đợt với nồng độ thấp).

Đối với một số quy trình sinh tổng hợp số chất như vitamin B12, cần phải bổ sung chất tiền thể của vitamin B12 là 5,6 dimethylbenzimidazol sau một thời gian lên men nhất định.

Ngoài việc theo dõi nghiêm ngặt các bước trên, trong quá trình lên men phải lấy mẫu để kiểm tra các chỉ tiêu sau:

+ Trạng thái tế bào của chủng giống dùng trong quá trình lên men và độ tạp khuẩn;

+ Kiểm tra sự tiêu hao năng lượng, sự tạo thành sản phẩm trong quá trình lên men;

+ Điều cuối cùng cũng là quan trọng nhất đó là xác định thời gian của quá trình lên men.

Tùy từng quy trình lên men khác nhau mà thời gian lên men cũng khác nhau. Người sản xuất phải nắm rất chắc thời gian lên men này để thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao nhất.

Lên men chìm là phương pháp được phổ biến rộng nhất trong quy trình lên men công nghiệp, vì có thể kiểm soát được toàn bộ các khâu trong quá trình một cách dễ dàng. So với phương pháp lên men bề mặt, thì lên men chìm có nhiều ưu điểm đó là: ít choán bề mặt (không mất diện tích), dễ cơ giới hoá và tự động hoá trong quá trình theo dõi. Tuy nhiên phương pháp lên men chìm đòi hỏi đầu tư nhiều kinh phí cho trang thiết bị. Ngoài ra, nếu một mẻ lên men, vì một lý do nào đó bị xử lý thì không thể xử lý cục bộ được, đa phần phải huỷ bỏ cả quá trình lên men, gây tổn kém lớn. Phế liệu của quá trình lên men thải ra phải kèm theo công nghệ xử lý chống ô nhiễm môi trường.

Thu hồi sản phẩm

Việc thu hồi sản phẩm với hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định đối với tính kinh tế của quy trình

công nghệ. Vì vậy việc tách, thu hồi sản phẩm được tính toán ngay từ khi chọn giống chủng vi sinh vật để lên men, chọn nguyên liệu cũng như môi trường dinh dưỡng.

Khi quá trình lên men kết thúc, người ta tiến hành thu hồi sản phẩm. Các sản phẩm của quá trình tổng hợp vi sinh vật thường được tích lũy hoặc ở trong tế bào hoặc trong dung dịch nuôi cấy.

Việc đầu tiên là tách tế bào vi sinh vật ra khỏi pha dịch lỏng của dịch lên men

- Nếu là vi sinh vật có cấu tạo hệ sợi như nấm, tảo... dùng phương pháp lọc vớt.

- Nếu là vi sinh vật dạng bào, có kích thước tế bào nhỏ như nấm men, vi khuẩn dùng phương pháp ly tâm, thường ly tâm ở tốc độ cao.

Việc xử lý tiếp theo sau khi thu hồi sản phẩm phụ thuộc vào mục tiêu của công nghệ

Thông thường người ta dùng các phương pháp sau: chiết rút, hấp phụ, kết tủa, kết tinh, sắc khí, điện ly, phân tích quang phổ hấp phụ...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tủ sách khuyến nông phục vụ người lao động

1. Mai Phương Anh, Trần Khắc Thi, Trần Văn Lại: *Rau và trồng rau*. Nxb Nông nghiệp - 1996.
2. Bùi Chí Bửu - Nguyễn Thị Lang: *Ứng dụng công nghệ sinh học trong cải tiến giống lúa*-Nxb Nông nghiệp - 1995.
3. Luyện Hữu Chỉ và cộng sự. 1997. *Giáo trình giống cây trồng*.
4. *Công nghệ sinh học và một số ứng dụng ở Việt Nam*. Tập II. Nxb Nông nghiệp - 1994.
5. G.V. Guliaeb, IU.L. Guijop. *Chọn giống và công tác giống cây trồng* (bản dịch) Nxb Nông nghiệp - 1978.
6. Cục Môi trường. *Hiện trạng môi trường Việt Nam và định hướng trong thời gian tới*. Tuyển tập Công nghệ môi trường, Hà Nội, 1998.
7. Lê Văn Cát. *Cơ sở hóa học và kỹ thuật xử lý nước*. Nxb Thanh Niên, Hà Nội, 1999.
8. Chương trình KT-02, *Bảo vệ môi trường và phát triển bền vững*, Tuyển tập các báo cáo khoa học tại Hội nghị khoa học về Bảo vệ môi trường và PTBV, Hà Nội, 1995.
9. *Dự báo thế kỷ XXI*, Nxb Thống Kê, 6/1998.
10. Lê Văn Khoa và Trần Thị Lành, *Môi trường và phát triển bền vững ở miền núi*, Nxb Giáo dục, 1997.
11. *Luật Tài nguyên nước*, Nxb Chính trị quốc gia, 1998.
12. Lê Văn Nãi, *Bảo vệ môi trường trong xây dựng cơ bản*, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, 1999.