

CHẾ PHẨM BACILLUS THURINGIENSIS

Đặc tính hình thái và sinh lý

Chế phẩm *Bacillus thuringiensis* (BT) có chứa 02 chủng *Bacillus thuringiensis*, được mã hóa: BT01 và BT02

Chủng BT01

Hình thái khuẩn lạc: Màu trắng ngà, bề mặt khô, viền mỏng, sản hạt liti, hình gần tròn, d=6-7mm

Hình thái tế bào: trực khuẩn, G (+)

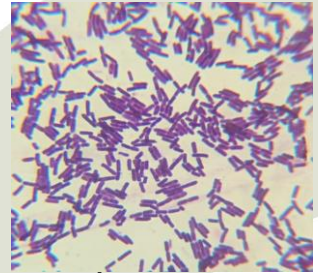
Hình thái tinh thể: hình thoi

Nhiệt độ thích hợp: 30°C

pH thích hợp: 7,0



Khuẩn lạc BT01



Tế bào BT01



Tinh thể BT01

Hình 1: Hình thái của chủng BT01

Chủng BT02

Hình thái khuẩn lạc: Màu trắng ngà, bề mặt trơn, tâm nhô, mỏng dần ra viền, hình gần tròn, d=5-6mm

Hình thái tế bào: trực khuẩn, G (+)

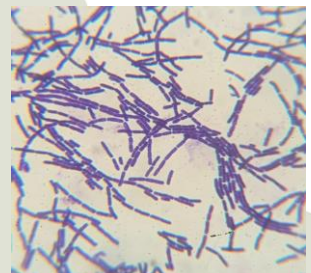
Hình thái tinh thể: hình thoi

Nhiệt độ thích hợp: 30°C

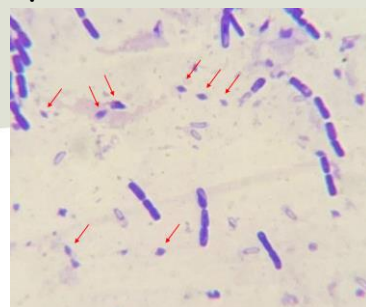
pH thích hợp: 7,0



Khuẩn lạc BT02



Tế bào BT02



Tinh thể BT02

Hình 2: Hình thái của chủng BT02

Đặc tính kiểu gen

Chủng *Bacillus thuringiensis* thuộc chi Bacillus, loài thuringiensis được phân lập từ đất.

Chủng giống *Bacillus thuringiensis* được mã hóa: BT01 và BT02

Đặc tính kiểu hình của chủng *B.thuringiensis*: Khả năng lên men đường và các đặc tính sinh hóa đặc trưng.

Đặc tính kiểu gen của chủng *B.thuringiensis* – BT01 và *B.thuringiensis* – BT02 được xác định bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA.

Trình tự 16S rDNA

Trình tự gen 16S rDNA được sử dụng để xác định, phân loại nhóm vi khuẩn và là phương pháp xác định các loài phân lập mới. Thu một phần trình tự 16S rDNA của chủng *Bacillus thuringiensis* – BT01 và *Bacillus thuringiensis* – BT02 bằng kỹ thuật PCR

Kết quả trình tự gen 16S rDNA chủng BT01 cho kết quả ID: 99,93% loài *B. thuringiensis* và trình tự gen 16S rDNA chủng BT02 cho kết quả ID: 99,93% loài *B. thuringiensis*

Trình tự rADN 16S

Chủng BT01 (1447 bp)

GCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTACTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGG
AAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGA
AAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACT
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCT
GAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA

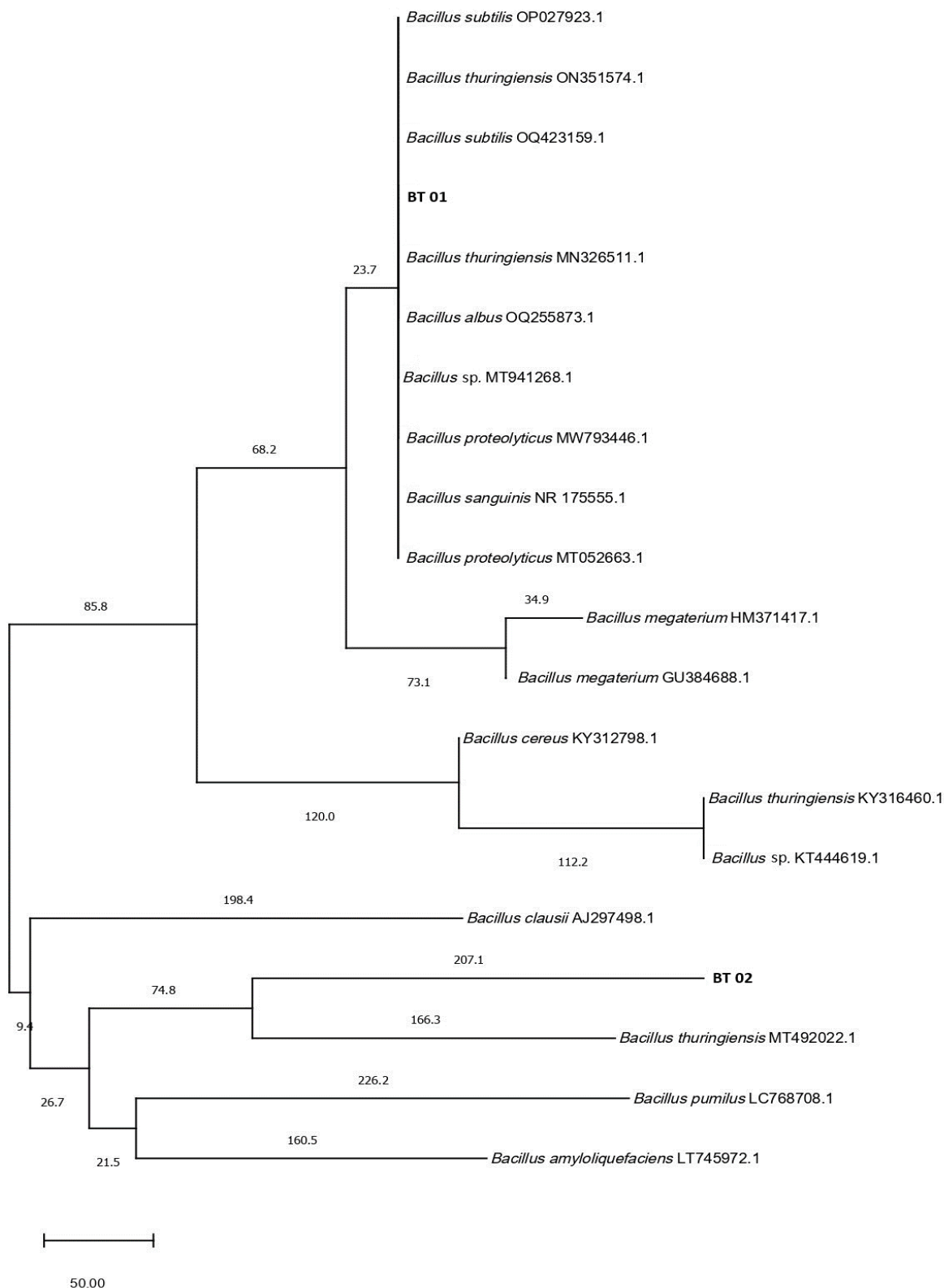
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAAC
CCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGAC
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
GCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCT
AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAA

Chủng BT02 (1441 bp)

CCCCAATCATCTGTCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCCCA
CCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
TCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGCGGT
TTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGACAGCTCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTT
AATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGC
TCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGGCGTACTCCCCA
GGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCT
AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTC
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACAT
GGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCT
CCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGC
GCGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGG
TGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACG
ACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCC
ATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT
CAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCT
TGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCAT
AAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTTGAACCATGCAGTTCAAAATG
TTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAG

GTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGCTAACTTCATAAGAGCAAGCT
CTTAATCCATCGCTCGACTGC

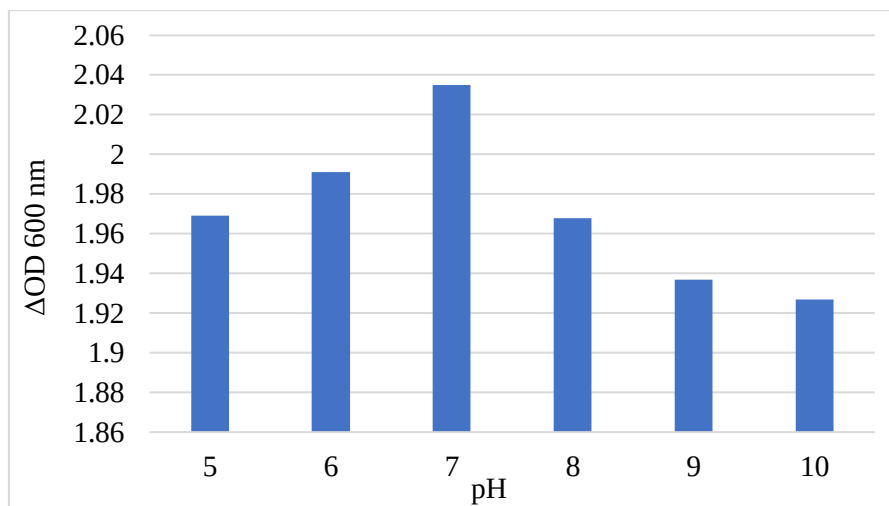
Vị trí phân loại



Khả năng sinh trưởng trong dải pH 5-10

Chủng BT01

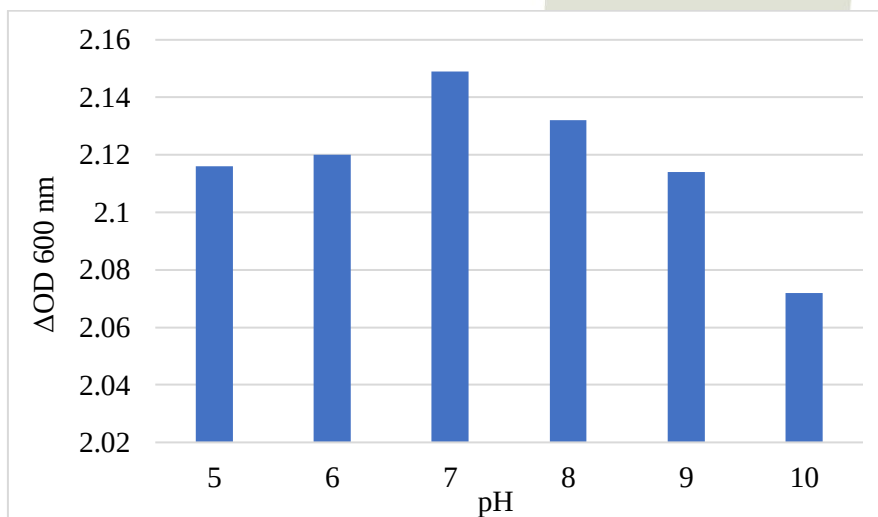
Sinh trưởng tốt trong dải pH 5-10



Hình 3: Khả năng sinh trưởng của chủng BT01 trong dải pH

Chủng BT02

Sinh trưởng tốt trong dải pH 5-10

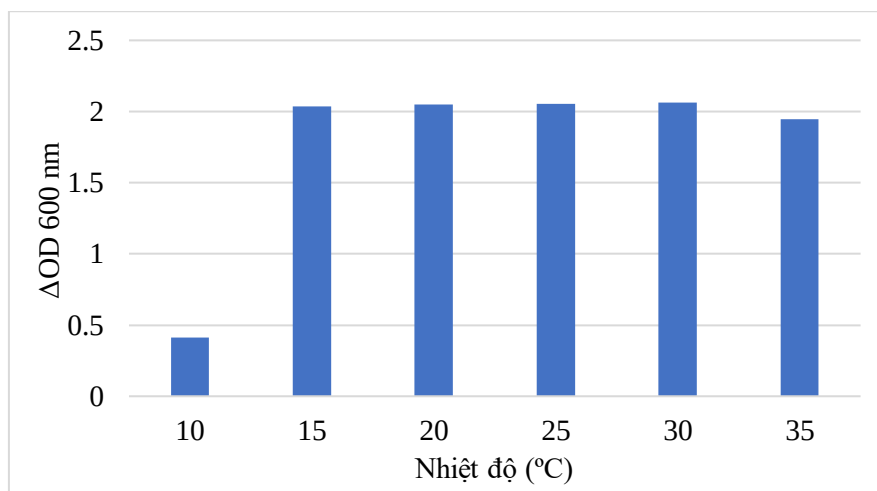


Hình 4: Khả năng sinh trưởng của chủng BT02 trong dải pH

Khả năng sinh trưởng trong dải nhiệt độ 20-40°C

Chủng BT01

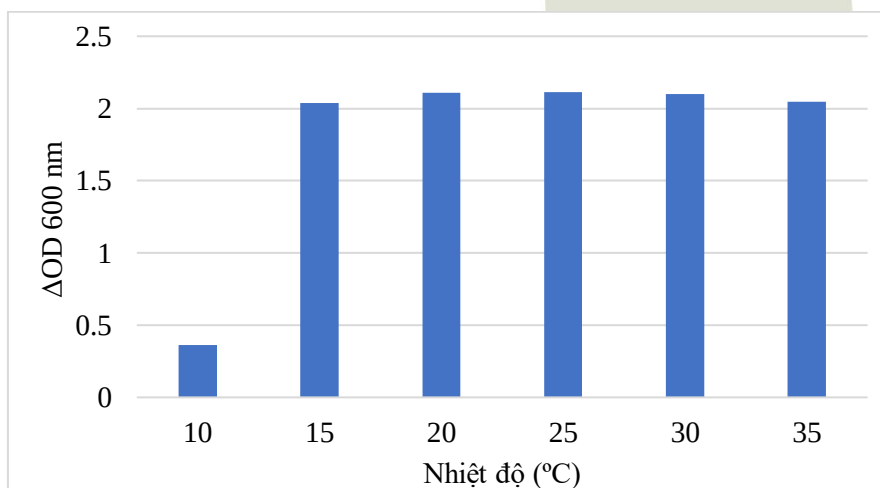
BT01 có khả năng sinh trưởng ở khoảng nhiệt độ rộng từ 10-35°C, sinh trưởng tốt trong khoảng 15-35°C.



Hình 5: Khả năng sinh trưởng của BT01 trong khoảng nhiệt độ

Chủng BT02

BT02 có khả năng sinh trưởng ở khoảng nhiệt độ rộng từ 10-35°C, sinh trưởng tốt trong khoảng 15-35°C.



Hình 6: Khả năng sinh trưởng của BT02 trong khoảng nhiệt độ

Hoạt tính trừ sâu

Quy mô phòng thí nghiệm

- Đối tượng sâu: sâu xanh, sâu róm
- Đối tượng cây bị hại: rau cải canh, cây lá gai
- Địa điểm thí nghiệm: phòng thí nghiệm Công ty TNHH Bio-Floc
- Thời gian thử nghiệm: 10/2022
- Nồng độ vi sinh thử nghiệm: 10^7 cfu/ml
- Kết quả:
 - + Mẫu đối chứng: 100% sâu vẫn sống và hoạt động nhanh
 - + Mẫu thí nghiệm: Sau 24 giờ, sâu chết đen, hoạt lực diệt sâu đạt 60%, 40% sâu còn lại bỏ ăn, hoạt động chậm.
Sau 32 giờ, hoạt lực diệt sâu đạt 80%, số lượng còn lại sức sống kém, thân ngả màu xanh xám.
Sau 48 giờ, hoạt lực diệt sâu đạt 100%.



Đối chứng



Sau 24 giờ phun



Sau 30 giờ phun



Sau 48 giờ phun

Hình 7: Hoạt lực diệt sâu xanh theo thời gian quy mô thí nghiệm

Quy mô thực địa

- Đối tượng sâu: sâu xanh, sâu khoang, sâu tơ
- Đối tượng cây bị hại: rau cải canh, rau cải bắp, cây súp lơ, cây cam
- Địa điểm thử nghiệm:
 - + Nông trại rau hữu cơ Gen xanh - Hiệp Thuận - Phúc Thọ - Hà Nội
 - + Farm trồng cây ăn trái - Sài Gòn
- Diện tích thử nghiệm: 2,5 ha
- Thời gian thử nghiệm: từ 10/2022 đến 2/2023
- Nồng độ vi sinh thử nghiệm: 10^7 cfu/ml

quả:

- + Sâu xanh: Sâu có hiện tượng bỏ ăn, thân ngả màu xanh xám sau 14 giờ phun. Sau 24 giờ, sâu chết đen, hoạt lực diệt sâu đạt 60% và 40% sâu còn lại bỏ ăn, hoạt động chậm. Sau 36 giờ, hoạt lực diệt sâu đạt 80% và 20% sâu còn lại bỏ ăn, hoạt động chậm, thân ngả màu xanh xám. Sau 48 giờ, hầu hết sâu chết đen, hoạt lực diệt sâu đạt 90-100%.
- + Sâu khoang: Sâu chết sau 12 giờ phun, hoạt lực diệt sâu đạt 80-90%
- + Sâu tơ: Hoạt lực diệt sâu đạt 80-90% sau 48 giờ phun



Sau 14 giờ



Sau 24 giờ

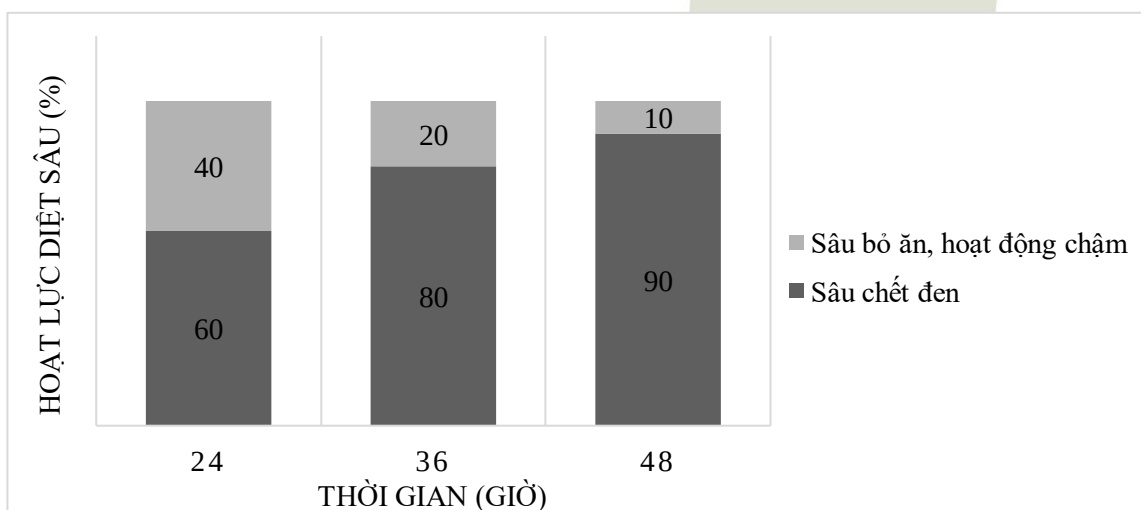


Sau 36 giờ



Sau 48 giờ

Hình 8: Hình ảnh sâu xanh sau các mốc thời gian phun thử nghiệm

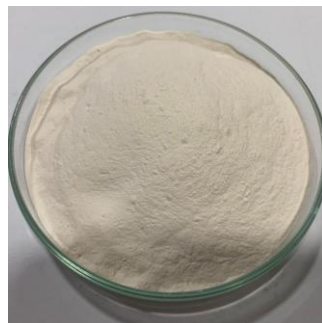


Hình 9: Biểu đồ hoạt lực diệt sâu theo thời gian

Tiêu chuẩn sản phẩm

Đặc tính sản phẩm

- Dạng bột mịn, màu trắng ngà, phân tán được trong nước
- Bị giảm hoặc mất hiệu lực khi tác động bởi ánh nắng trực tiếp từ mặt trời



Hình 10: Hình ảnh chế phẩm BT

Ứng dụng

- Diệt sâu ăn lá thuộc bộ Lepidoptera trên cây rau (sâu tơ, sâu xanh, sâu khoang)
- Tiêu diệt và ức chế các loại rầy, rệp, sâu ăn lá gặm nhấm

Thành phần chính: *Bacillus thuringiensis*

Mã BT01

Bacillus thuringiensis

Mã BT02

Mật độ chỉ tiêu: *Bacillus thuringiensis*

$\geq 1,0 \times 10^{10}$ cfu/gram

Tiêu chuẩn kỹ thuật

Ngoại quan	Thành phẩm ở dạng bột, phân tán được trong nước, tạo một huyền phù khi sử dụng	
Hàm lượng hoạt chất	Tên loài	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	Tỷ lệ tinh thể độc/bào tử	$\geq 20\%$
	Số lượng CFU so với đăng ký (10^n cfu/ml hoặc trên gram sản phẩm)	$\pm 20\%$ số lượng đăng ký
Hiệu lực sinh học	Đạt hiệu lực tối thiểu 80% trong phòng thí nghiệm đối với đối tượng đăng ký phòng trừ	
Tỷ suất lơ lửng	Sản phẩm sau khi tạo huyền phù với nước cứng chuẩn D ở $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ trong 30 phút, số lượng CFU của <i>Bacillus thuringiensis</i> trong dung dịch huyền phù: Không nhỏ hơn 60% số lượng CFU thực tế tính được trong chế phẩm	

Độ thấm ướt	Sản phẩm được thấm ướt hoàn toàn trong 1 phút mà không cần khuấy trộn
Độ mịn thử rây ướt	Lượng cặn còn lại trên rây có đường kính lỗ 75 μ m sau khi thử rây ướt: Không lớn hơn 2%
Độ bọt	Thể tích bọt tạo thành sau 1 phút: Không lớn hơn 60 ml

Hướng dẫn sử dụng:

- Pha 20g sản phẩm vào 20 lít nước, khuấy đều cho tan.
- Phun kỹ bề mặt trên lá và dưới tán lá khi sâu còn nhỏ.
- Nên phun vào chiều tối hoặc sáng sớm.
- Không phải cách ly.
- Bảo quản nơi thoáng mát, tránh ánh nắng trực tiếp từ mặt trời.