

A-MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Sử dụng thuốc Bảo vệ thực vật (BVTV) để phòng trừ sâu bệnh là một trong những biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Dùng thuốc hợp lý, đúng kỹ thuật sẽ giảm tổn thất, nâng cao năng suất và sản lượng cây trồng, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Vì vậy nhu cầu sử dụng các loại thuốc tăng theo hàng năm về số lượng và chủng loại.

Tuy nhiên, do có độc tính nên các thuốc BVTV cũng gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng tới sức khỏe cộng đồng. Ngoài ra, do sử dụng không đúng kỹ thuật dẫn đến hiệu lực phòng trừ của thuốc ngày càng giảm, liều lượng sử dụng ngày càng tăng. Hậu quả vừa ảnh hưởng xấu tới môi trường, vừa gây nên hiện tượng kháng thuốc của dịch hại. Tại Việt Nam hiện nay đã có một số thuốc BVTV bị kháng như thuốc trừ sâu sinh học *Bacillus thuringiensis* (Bt), thuốc trừ rầy Imidacloprid,...

Nhằm tăng hiệu quả sử dụng của thuốc, khắc phục một phần tính kháng thuốc của côn trùng, các nhà khoa học đã nghiên cứu và đề xuất nhiều biện pháp khắc phục, trong đó sử dụng chất hiệp đồng (synergist) hỗn hợp với thuốc BVTV trong phòng trừ dịch hại là biện pháp tiên tiến, mang lại hiệu quả kinh tế - xã hội lớn. Trong số các chất hiệp đồng, các chất có nguồn gốc từ acid béo trong dầu thực vật đặc biệt được quan tâm vì xuất phát từ nguồn nguyên liệu tự nhiên sẵn có, thân thiện với môi trường (không độc, phân hủy sinh học, không để lại dư lượng).

Các chất hiệp đồng đã được thế giới nghiên cứu và đưa vào sử dụng từ hàng chục năm nay nhưng ở Việt Nam hầu như chưa có công trình nào công bố về hướng nghiên cứu này.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu của luận án là điều chế và ứng dụng một số chất hiệp đồng có nguồn gốc từ dầu thực vật, nhằm nâng cao hiệu lực phòng trừ của thuốc trừ sâu sinh học Bt, thuốc trừ rầy Imidacloprid. Đồng thời, bước đầu tìm hiểu cơ chế tác động của chất hiệp đồng đối với một số enzym giải độc và gây kháng thuốc của côn trùng.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Luận án đã lựa chọn hai loại dầu thực vật phù hợp làm nguyên liệu để điều chế 02 chất hiệp đồng, hỗn hợp với thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid, tạo ra các sản phẩm mới ít độc và hiệu quả cao hơn trong phòng trừ một số côn trùng đã kháng thuốc ở Việt Nam là sâu tơ hại rau và rầy nâu hại lúa. Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên áp dụng các

nguyên tắc của Hóa học xanh trong lĩnh vực sản xuất nông nghiệp bền vững ở nước ta.

Trong quá trình nghiên cứu, Luận án đã áp dụng thành công một số phương pháp mới để điều chế và gia công sản phẩm từ nguồn nguyên liệu ban đầu là các hạt chứa dầu thực vật: sử dụng enzym trong quá trình tách dầu; nâng cao hàm lượng methyl oleat bằng phương pháp tạo phức và kết tinh 2 giai đoạn với ure, đồng thời áp dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm để xác định các thông số kỹ thuật tối ưu; sử dụng xúc tác chất lỏng ion trong phản ứng este hóa chéo dầu thực vật thành hỗn hợp các methyleste (FAME); khảo sát hiệu lực sinh học các công thức hỗn hợp sản phẩm trên đối tượng côn trùng cụ thể, từ đó xác định được công thức tối ưu. Ngoài ra, Luận án đã nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng trong việc ức chế một số enzym giải độc của côn trùng gây hại, qua đó giải thích sơ bộ tác dụng làm tăng hiệu quả phòng trừ của các thuốc trừ sâu đã bị giảm hiệu lực. Những kết quả nghiên cứu này đã thể hiện rõ giá trị khoa học của luận án.

Các sản phẩm thuốc trừ sâu và trừ rầy mới ít độc, có hiệu lực sinh học cao sẽ mang lại hiệu quả kinh tế-xã hội lớn, đóng góp vào sự phát triển nông nghiệp bền vững ở nước ta. Do đó luận án có ý nghĩa thực tiễn lớn khi áp dụng vào sản xuất, tạo ra hướng ứng dụng các chất hiệp đồng trong sản xuất gia công các thuốc BTVT nhằm tăng hiệu quả phòng trừ và giảm ô nhiễm môi trường ở Việt Nam.

4. Những đóng góp mới của luận án

1. Đã khảo sát đầy đủ các chất có tác dụng hiệp đồng với thuốc trừ sâu vi sinh Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid, từ đó đã lựa chọn các chất hiệp đồng phù hợp trong phòng trừ các đối tượng sâu, rầy đã kháng thuốc tại Việt Nam: Hỗn hợp K-oleat và K-linoleat (tỷ lệ w/w xấp xỉ 54/43) là chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau họ thập tự (*Plutella xylostella*) và methyl oleat là chất hiệp đồng với Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal).

2. Đã thu thập, khảo sát hàm lượng dầu và hàm lượng một số acid béo không no C18 của 20 nguyên liệu chứa dầu thực vật tại Việt Nam. Dựa vào số liệu khảo sát, đã lựa chọn dầu hạt đào làm nguyên liệu thích hợp để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và dầu hạt sỏ để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid.

3. Dựa trên cơ chế hoạt động và khả năng phá vỡ thành tế bào thực vật chứa dầu của một số enzym, đã nghiên cứu lựa chọn và sử dụng enzym protease để tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào. Phương pháp này giảm lượng

dung môi độc hại sử dụng so với các phương pháp tách dầu thực vật khác nên góp phần giảm ô nhiễm môi trường.

4. Sử dụng xúc tác chất lỏng ion $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$ để thực hiện phản ứng este hóa chéo dầu sỡ thành methyl este. Quá trình tách, tinh chế sản phẩm đơn giản hơn. Đây là hướng nghiên cứu mới được khuyến cáo áp dụng Hóa học xanh trong tổng hợp hữu cơ.

5. Nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng đối với một số enzym giải độc của côn trùng gây hại. Kết quả cho thấy, hỗn hợp K-oleat+K-linoleat có tác dụng ức chế mạnh enzym Aminopeptidase (APN) của sâu tơ (*Plutella xylostella*); methyl oleat có tác động ức chế mạnh enzym Cytochrome P450 monooxygenase (CPY) và ức chế yếu enzym Glutathione S-Transferases (GST) của rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal.). Đây là các kết quả mới, lần đầu tiên được công bố tại Việt Nam, góp phần giải thích cơ chế tác động, phương thức chuyển hóa chất hiệp đồng trong cơ thể côn trùng, từ đó đề xuất biện pháp khắc phục tính kháng thuốc của côn trùng nhằm tăng hiệu lực sinh học cho thuốc BVTV tại Việt Nam.

5. Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 141 trang, được chia thành các phần như sau: Mở đầu 02 trang; tổng quan 37 trang; thực nghiệm 16 trang; kết quả và thảo luận 70 trang; kết luận 03 trang; các điểm mới của luận án 01 trang; danh mục các công trình đã công bố 01 trang; tài liệu tham khảo 13 trang (gồm 123 tài liệu). Luận án có 42 bảng, 37 hình vẽ và đồ thị.

B - NỘI DUNG CHÍNH CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN

Phần này tác giả đã tổng quan về thuốc BVTV, trong đó tập trung vào thuốc trừ sâu Bt và thuốc trừ rầy Imidacloprid, các chất chất hiệp đồng, phương pháp điều chế các chất chất hiệp đồng, phương pháp chế tạo thuốc BVTV sử dụng chất hiệp đồng.

CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận dầu thực vật, acid béo

- Phương pháp chiết tách dầu từ nguyên liệu hạt: Dầu từ mẫu hạt được chiết tách và xác định hàm lượng theo phương pháp nêu tại tiêu chuẩn ISO/DIS 5509:1997, sử dụng dung môi chiết là n-hexan.
- Phương pháp phân lập các acid béo: Sắc kí lớp mỏng (TLC) và sắc kí lớp mỏng điều chế

- Phương pháp xác định thành phần, hàm lượng và cấu trúc hoá học của các acid béo

a. Thành phần, hàm lượng acid béo được xác định dưới dạng methyl este trên sắc kí khí (GC) theo phương pháp tại tiêu chuẩn ISO/FDIS 590:1998

b. Thành phần, hàm lượng acid béo được xác định dưới dạng methyleste trên sắc kí khí –khối phổ (GC-MS)

c. Cấu trúc của acid béo, dầu thực vật được phân tích trên phổ hồng ngoại (FT-IR)

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm hiệu lực sinh học của sản phẩm hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và thuốc trừ sâu qui mô PTN.

Đối tượng khảo nghiệm: sâu tơ *Plutella xylostella* và rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal tuổi 2-3

- Nồng độ sử dụng 0,25%. Thuốc đối chứng là Vi-BT 16.000WP. Để trừ rầy nâu, phun theo nồng độ khuyến cáo là 0,1%. Thuốc đối chứng là Vicondor 50EC (Vipesco).

- Số lượng sâu thả và thời gian theo dõi: Mỗi công thức thí nghiệm thả 20 sâu (rầy) non tuổi 2-3. Đánh giá số sâu (rầy) chết đối với từng công thức sau 1, 3, 5, 7 ngày sau phun. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần (60 sâu (rầy) cho 1 công thức thí nghiệm)

- Hiệu quả của thuốc trong PTN được tính bằng công thức Abbott:

$$H(\%) = \frac{(C_a - T_a) \times 100}{C_a}$$

Trong đó:

+ H (%): là hiệu lực của thuốc tính theo phần trăm;

+ Ca: là số lượng cá thể côn trùng sống ở công thức đối chứng sau xử lý;

+ Ta: là số lượng cá thể côn trùng sống ở công thức thí nghiệm sau xử lý.

2.2. Thực nghiệm

Thực nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ Lọc – Hóa dầu – Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam và Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.1. Khảo sát xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid

Khảo sát hỗn hợp các chất khác nhau và các tỉ lệ K-oleat/K-linoleat để xác định chất hiệp đồng và tỷ lệ tối ưu với thuốc trừ sâu Bt phòng trừ sâu tơ hại rau tại Việt Nam. Khảo sát và xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid phòng trừ rầy nâu hại lúa tại Việt Nam. Sau đó lựa chọn dầu thực vật có thành phần phù hợp làm nguyên liệu ban đầu để điều chế chất hiệp đồng.

2.2.2. Tách dầu thực vật bằng phương pháp thủy phân với enzym làm nguyên liệu để tổng hợp chất hiệp đồng

Hạt thực vật được tách vỏ, nghiền mịn, thủy phân trong nước có bổ sung enzym. Sau đó ly tâm để tách bỏ cặn và tạp chất, thu được dầu thực vật.

2.2.3. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt

Dầu thực vật được phản ứng với KOH trong môi trường ethanol. Sản phẩm thu được là các acid béo tự do.

Sử dụng phương pháp tạo phức kết tinh với ure trong ethanol để tách acidoleic và linoleic khỏi hỗn hợp acid. Điều chỉnh nhiệt độ kết tinh để thu tỷ lệ hỗn hợp acid oleic/linoleic mong muốn. Sau đó thực hiện phản ứng không hoàn toàn với dung dịch KOH, thu được sản phẩm muối kali oleat và kali linoleat đạt yêu cầu dùng làm chất hiệp đồng cho thuốc Bt.

2.2.4. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Imidacloprid

Sử dụng chất lỏng ion để thực hiện phản ứng este hóa chéo dầu thực vật, chuyển hóa triglycerit thành hỗn hợp methyl este (FAME). Sau đó, sử dụng ure tạo phức kết tinh hai giai đoạn với FAME để tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat đạt tiêu chuẩn làm chất hiệp đồng với Imidacloprid.

2.2.5. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng và hoạt chất BVTV

Sử dụng phương pháp thử hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm để xác định công thức hỗn hợp giữa chất hiệp đồng và thuốc trừ sâu Bt, Imidacloprid có hiệu quả phòng trừ cao nhất. Lựa chọn và nghiên cứu dạng gia công các sản phẩm thuốc trừ sâu và trừ rầy mới.

2.2.6. Khảo nghiệm hiệu lực sinh học của sản phẩm mới

Khảo nghiệm, đánh giá hiệu lực sinh học của thuốc trừ sâu mới trên sâu tơ hại rau *Plutella xylostella* và rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* Stal. tại Việt Nam, theo qui định tại QCVN 01-1:2009/BNNPTNT về khảo nghiệm thuốc trừ sâu, nhện và QCVN 01-29:2010/BNNPTNT về khảo nghiệm thuốc trừ rầy nâu hại lúa. Qua đó tính xác định chỉ số hiệp đồng (SF) và tác dụng của các chất hiệp đồng nhằm nâng cao hiệu quả phòng trừ của thuốc BVTV tương ứng.

2.2.7. Nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng

Cơ chế tác động của các chất hiệp đồng đối với thuốc trừ sâu Bt và trừ rầy Imidacloprid được xác định thông qua khả năng ức chế enzym tiêu hóa APN của sâu tơ, enzym giải độc GST, CYP của rầy nâu và nồng độ ức chế 50% hoạt tính enzym (IC_{50}) của các mẫu thí nghiệm.

2.2.8. Các phương pháp phân tích đánh giá chất lượng sản phẩm

Các nguyên liệu và sản phẩm được đặc trưng tính chất và chất lượng bằng các phương pháp hóa lý thông dụng và hiện đại như:

- Một số tính chất hóa lý, chỉ số iod, chỉ số acid, chỉ số xà phòng hóa, hàm lượng dầu được xác định theo các TCVN tương ứng.
- Phương pháp IR để phân tích cấu trúc, GC và GC-MS để xác định thành phần, hàm lượng các acid béo, methyl este và các chất hiệp đồng.
- Chất lượng sản phẩm thuốc trừ sâu mới chứa Bt được đánh giá theo TCVN 8050:2009 và TCCS 09:2010/BVTV; chất lượng thuốc trừ rầy mới chứa Imidacloprid được đánh giá theo TCCS 07:2006 và TCCS 135:2014.

2.9 Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Modde 5.0 để xử lý số liệu và tính toán tối ưu hóa thực nghiệm. Các số liệu thử hiệu lực sinh học của thuốc BVTV được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 17 và IRISTART 4.0.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát và xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu bt và imidacloprid

3.1.1. Khảo sát thành phần các acid béo không no C18 (acid oleic, linoleic) trong hạt chứa dầu

Kết quả khảo sát hàm lượng dầu, thành phần acid oleic, linoleic của một số loại hạt được trình bày tại Bảng 3.1

Bảng 3.1. Hàm lượng dầu và thành phần acid oleic, linoleic trong dầu của một số loại hạt

| Số TT | Tên hạt | Tên khoa học | Hàm lượng dầu (%) | Hàm lượng acid oleic (%) | Hàm lượng acid linoleic (%) | Địa điểm thu hái | Ghi chú |
|-------|-----------|---------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|---------|
| 1 | Cao su | <i>Hevea brasiliensis</i> | 40-60 | 35,07 | 42,36 | | |
| 2 | Đậu tương | <i>Glycine max</i> | 23,1 | 32,0 | 53,4 | | [128] |
| 4 | Lạc | <i>Arachis hypogaea</i> | 44,5 | 41,6 | 34,9 | | |
| 5 | Trôm | <i>Sterculia foetida</i> | 52,36 | 38,88 | 8,83 | Sơn La | [129] |

| | | | | | | | |
|----|------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|------------|-------|
| 6 | Lai | <i>Aleurites moluccana</i> (L) | 68,93 | 24,26 | 40,17 | | |
| 7 | Vùng | <i>Sesamum indicum</i> | 53,32 | 32,25 | 40,67 | Quảng Trị | [130] |
| 8 | Sở | <i>Camellia sasanqua</i> Thunb.)? | 60,4 | 79,48 | 9,29 | Quảng Ninh | |
| 9 | Trám trắng | <i>Canarium tokinensis</i> | 2,48 | 14,9 | 81,13 | Sơn La | |
| 10 | Kê | <i>Setaria italica</i> (L.) Beauv. | 3,5 | 16,39 | 80,35 | Hòa Bình | |
| 11 | Trám chim | <i>Canarium tokinensis</i> | 5,1 | 1,23 | 71,88 | Hà Nội | |
| 12 | Hồi lá nhãn | <i>Llicium leiophyllum</i> | 10,2 | - | 72,8 | Tam Đảo | |
| 13 | Khô sâm nam | <i>Brucea javanica</i> (Bumea) Merr. | 5,3 | 49,7 | 35,34 | Đắk Lắk | |
| 14 | Sòi tía | <i>Sapium dicolor</i> | 21,32 | 52,97 | 30,61 | Hà Nội | |
| 15 | Dâu da xoan | <i>Allospondias lakonensis</i> | 8,7 | 16,9 | 68,1 | Hà Nội | |
| 16 | Hạt đào | <i>Prunus persica</i> | 35,2 | 55 ,0 | 32,5 | Lào Cai | |
| 17 | Hạt cải | <i>Brassica napus</i> | 43,1 | 60,0 | 19,6 | Hà Giang | |
| 18 | Hạt muồng truông | <i>Zanthoxylum avicennae</i> | 17,69 | 66,73 | 11,18 | | |
| 19 | Hạt chuối rừng | <i>Musa acuminata</i> | 0,58 | 53,47 | 25,62 | | |
| 20 | Hạt xoài | <i>Mangifera indica</i> L | 4,2 | 38,36 | 6,82 | | |

3.1.2. Xác định chất hiệp đồng cho Bt

Bảng 3.2. Kết quả trừ sâu tơ trong phòng thí nghiệm của hỗn hợp S/Bt

| Công thức | Chất khảo sát (S) | Tỷ lệ (w/w) K-oleat/K-linoleat | Hiệu quả phòng trừ (%) | |
|-----------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|------------|
| | | | Sau 5 ngày | Sau 7 ngày |
| CT01 | Vi-BT (so sánh), 0,25% | - | 55,6abc | 65,3bc |
| CT02 | Vi-BT (so sánh), 0,125% | - | 33,6e | 35,7d |

| | | | | |
|------|-------------|-----------------------------------|---------|---------|
| CT1 | S1 + Vi-BT | 54/43 | 66,7a | 82,7a |
| CT2 | S2 + Vi-BT | 54/0 | 34,0de | 37,6d |
| CT3 | S3 + Vi-BT | 0/43 | 19,6f | 23,0e |
| CT4 | S4 + Vi-BT | 54/13 | 45,0cd | 61,3c |
| CT5 | S5 + Vi-BT | 54/33 | 50,7bc | 72,0abc |
| CT6 | S6 + Vi-BT | 14/43 | 52,0bc | 63,3c |
| CT7 | S7 + Vi-BT | 34/43 | 54,0abc | 69,9bc |
| CT8 | S8 + Vi-BT | 44/43 | 61,3ab | 74,3ab |
| CT9 | S9 + Vi-BT | Acid leic/acid linoleic: 54/43 | 17,7f | 38,5d |
| CT10 | S10 + Vi-BT | Dầu hạt đào | 17,9ef | 27,2cd |
| CT11 | S11 + Vi-BT | Muối kali của dầu hạt đào | 37,6de | 38,0d |

Từ các kết quả trên có thể nhận thấy ở cùng liều sử dụng, hỗn hợp muối K-oleat và K-linoleat với các tỷ lệ khác nhau đều cho hiệu quả diệt sâu tơ cao hơn sản phẩm Vi-Bt (chỉ có Bt). Trong đó tỷ lệ 54/43 cho hiệu quả cao nhất. Như vậy, chất hiệp đồng tốt nhất với thuốc trừ sâu Bt là hỗn hợp K-oleat/K-linoleat, tỷ lệ 54/43.

Từ bảng 3.1 có thể nhận thấy hạt đào (số thứ tự 16) chứa hàm lượng dầu cao và thành phần các acid oleic và linoleic phù hợp làm nguyên liệu để điều chế chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt.

3.1.3. Xác định chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy *Imidacloprid*

Các chất sử dụng để hỗn hợp với Imidacloprid là: S1: Methyl oleat; S2: Methyl linoleat; S3: Acid oleic; S4: Acid linoleic và S5: FAME của dầu sỏ.

Bảng 3.3. Kết quả trừ rầy nâu trong phòng thí nghiệm của hỗn hợp S/I

| Công thức | Chất khảo sát (S) | Liều lượng sử dụng (mg/L) | Hiệu quả phòng trừ (%) | |
|-----------|-------------------|---------------------------|------------------------|------------|
| | | | Sau 3 ngày | Sau 5 ngày |
| CT1 | S1 + I | 0,5 S1 + 0,5 I | 73,19a | 84,86a |
| CT2 | S2 + I | 0,5 S2 + 0,5 I | 55,36b | 73,53b |
| CT3 | S3 + I | 0,5 S2 + 0,5 I | 51,36b | 62,31c |

| | | | | |
|-----|---------------|----------------|--------|---------|
| CT4 | S4 + I | 0,5 S2 + 0,5 I | 48,24c | 62,2c |
| CT5 | S5 + I | 0,5 S2 + 0,5 I | 52,3b | 63,4c |
| CT5 | Viconдор 50EC | 1,0 | 60,72b | 69,83bc |
| CT6 | Viconдор 50EC | 0,5 | 41,13d | 45,31d |

Nhận xét: Các acid oleic, linoleic và methyl este tương ứng đều cho hiệu quả trừ rầy cao hơn sản phẩm so sánh Viconдор 50EC, chứng tỏ chúng có tác dụng làm tăng hiệu lực của thuốc Imidacloprid. Trong số đó, methyl oleat (S1) là chất hiệp đồng tốt nhất với thuốc Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa.

Dựa vào kết quả khảo sát trên, có thể lựa chọn dầu hạt sỏ (với thành phần acid oleic cao) làm nguyên liệu để điều chế methyl oleat làm chất hiệp đồng với Imidacloprid nhằm nâng cao hiệu quả trừ rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* Stal. tại Việt Nam.

3.2. Tách dầu thực vật bằng phương pháp thủy phân với enzym

3.2.1. Khảo sát lựa chọn enzym để tách dầu

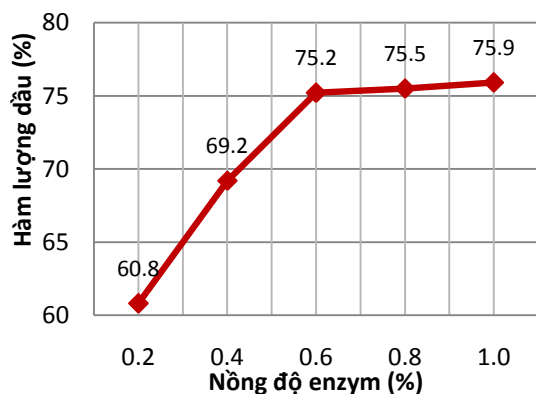
Một số enzym dùng để khảo sát: cellulase, protease, amylase, pectinase. Kết quả cho thấy, hiệu suất phản ứng thủy phân tách dầu từ hạt sỏ và hạt đào khi bổ sung enzym tăng rõ rệt so với mẫu không có enzym. Hiệu suất tách dầu cao nhất thu được khi sử dụng enzym protease (bảng 3.5).

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của chủng loại enzym đến hiệu suất tách dầu hạt sỏ và dầu hạt đào

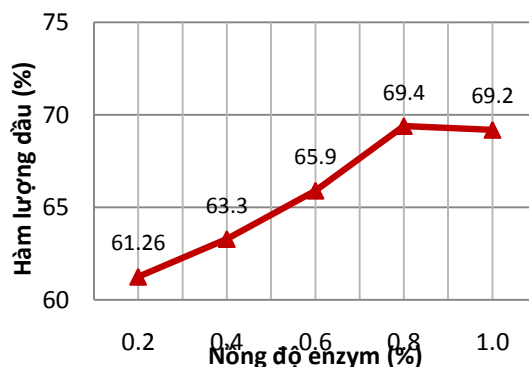
| Chủng loại enzym | Hiệu suất tách dầu từ hạt sỏ (%) | Hiệu suất tách dầu từ hạt đào (%) |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Không có enzym | 5 | 4 |
| Enzym cellulase | 45,2 | 40,6 |
| Enzym protease | 73,2 | 70,2 |
| Enzym amylase | 31,9 | 28,7 |
| Enzym pectinase | 50,5 | 46,5 |

Kết quả khảo sát các điều kiện phản ứng thủy phân tại các hình từ 3.1 đến 3.6 cho thấy:

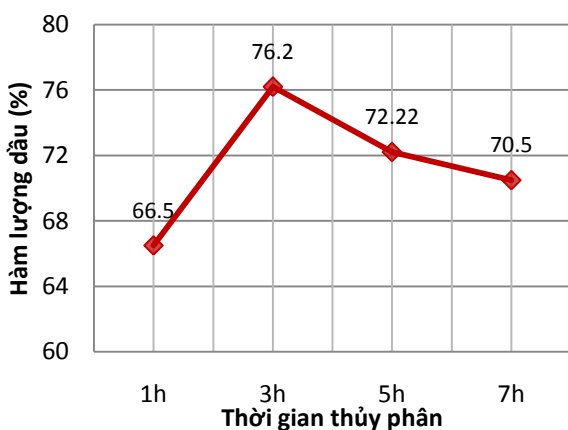
- Với hạt sỏ: hàm lượng enzym: 0,6%; thời gian: 3 giờ; nhiệt độ: 50 °C.
- Với hạt đào: hàm lượng enzym: 0,8%; thời gian: 5 giờ; nhiệt độ: 50 °C



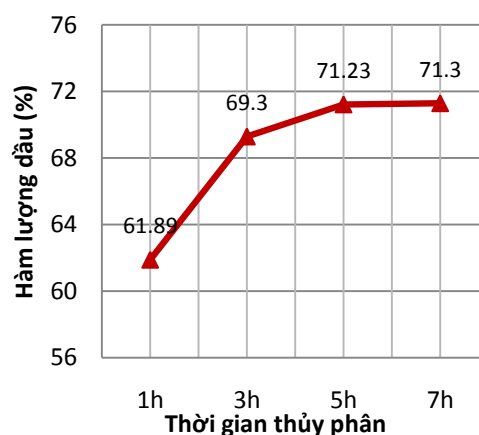
Hình 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách dầu hạt sỏ



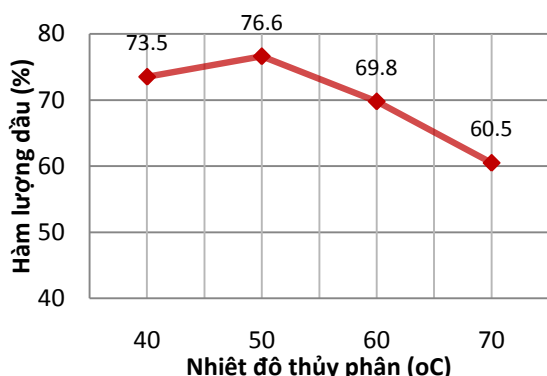
Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ enzym đến hiệu suất tách dầu hạt đào



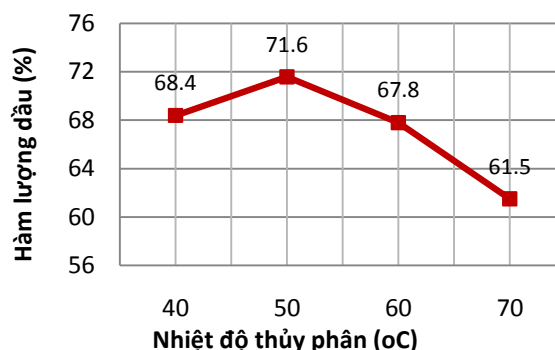
Hình 3.3. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt sỏ



Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến hiệu suất tách dầu hạt đào



Hình 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất tách dầu sỏ



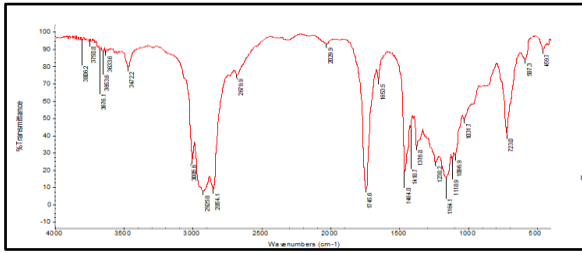
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến hiệu suất tách dầu đào

3.3. Điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu bt

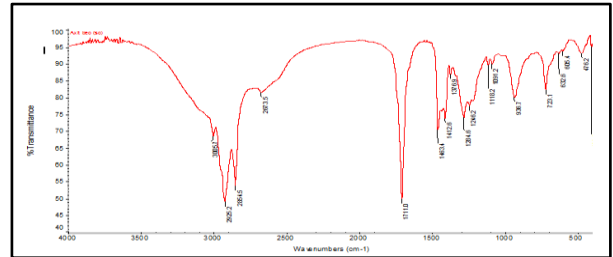
3.3.1. Điều chế hỗn hợp acid béo từ dầu hạt đào

Tiến hành khảo sát các điều kiện phản ứng thủy phân glycerid trong dầu hạt đào bằng KOH/ethanol để thu hỗn hợp acid béo, thu được các thông

số công nghệ thích hợp như sau: Tỷ lệ ethanol+KOH/dầu: 200ml/100g; nồng độ KOH trong ethanol: 1,75M; nồng độ ethanol: 80%; nhiệt độ phản ứng 70°C; thời gian phản ứng 120 phút. Mẫu dầu và mẫu sản phẩm hỗn hợp acid béo được chụp phổ IR.



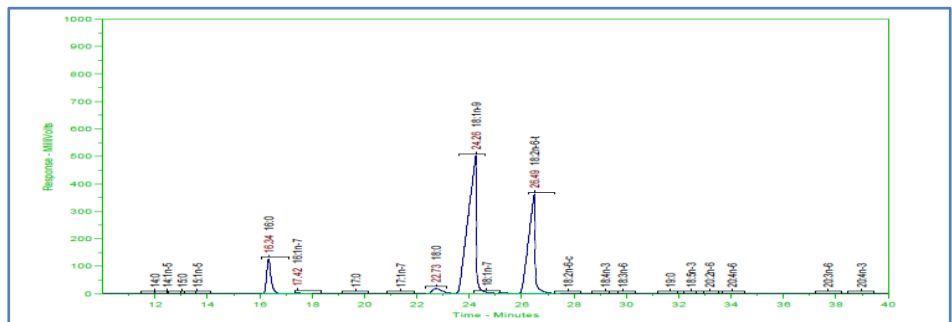
Hình 3.10. Phổ IR của mẫu dầu hạt đào



Hình 3.11 Phổ IR của mẫu acid béo từ dầu hạt đào

Phổ IR (hình 3.10 và 3.11) cho thấy glyxerit đã chuyển hóa hoàn toàn thành các acid béo.

Kết quả phân tích phổ GC cho thấy hàm lượng acid oleic là 57,6%, acid linoleic là 32,4%, các acid béo no còn lại: 9,7%



Hình 3.12. Sắc ký đồ GC của hỗn hợp acid béo từ dầu hạt đào sau thủy phân

3.3.2. Tách hỗn hợp acid oleic và linoleic

Tách acid oleic và linoleic từ hỗn hợp acid thu được bằng phương pháp tạo phức kết tinh với ure trong ethanol. Kết quả khảo sát đơn lẻ các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách thu được như sau: Tỷ lệ urea/FFA: 1/1 – 3/1; Nhiệt độ: -5°C đến 50°C; Thời gian: 6 – 18 h (bảng 3.10 – bảng 3.12)

Bảng 3.10 Ảnh hưởng của tỷ lệ urea/FFA đến tỷ lệ acid oleic/linoleic

| Tỷ lệ urea/ FFA (w/w) | Tỷ lệ acid oleic/acid linoleic (% w/w) | Hàm lượng acid béo no còn lại dư (% w/w) | Hiệu suất thu hồi (%) |
|-----------------------|--|--|-----------------------|
| 0,5/1 | 56,8/34,6 | 8,6 | 77,3 |
| 1/1 | 55,4/37,9 | 6,7 | 76,9 |
| 2/1 | 53,9/43,2 | 2,9 | 70,6 |
| 3/1 | 41,27/56,73 | 2,0 | 65,6 |

| | | | |
|-----|-------------|-----|------|
| 4/1 | 26,73/71,68 | 1,5 | 57,5 |
|-----|-------------|-----|------|

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tỷ lệ acid oleic/linoleic

| Nhiệt độ (oC) | Tỷ lệ acid oleic/ acid linoleic (% w/w) | Hàm lượng acid béo no còn lại (% w/w) | Hiệu suất thu hồi (%) |
|---------------|---|---------------------------------------|-----------------------|
| 10 | 56,03/33,9 | 10,47 | 75,4 |
| 5 | 54,4/38,7 | 6,9 | 72,6 |
| 0 | 54,33/43,28 | 2,39 | 70,3 |
| -5 | 48,27/49,23 | 2,5 | 68,9 |
| -10 | 46,73/50,68 | 2,59 | 66,4 |

Bảng 3.12. Ảnh hưởng thời gian kết tinh đến acid oleic/linoleic

| Thời gian (h) | Tỷ lệ acid oleic/ acid linoleic (% w/w) | Hàm lượng acid béo no còn lại (% w/w) | Hiệu suất thu hồi (% w/w) |
|---------------|---|---------------------------------------|---------------------------|
| 2 | 52,34/44,31 | 3,35 | 61,4 |
| 4 | 52,78/44,0 | 3,22 | 62,5 |
| 6 | 53/43,89 | 2,98 | 65,2 |
| 8 | 53,27/43,76 | 2,97 | 67,9 |
| 12 | 54,35/43,63 | 2,92 | 70,83 |
| 16 | 54,36/43,62 | 2,02 | 70,83 |
| 20 | 54,36/43,62 | 2,02 | 70,83 |

Để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình kết tinh, phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm bậc 2, tâm trực giao được sử dụng để khảo sát sự phụ thuộc của các yếu tố công nghệ đến hàm lượng acid oleic và linoleic thu được. Phương trình hồi quy tương thích với hàm acid oleic có dạng:

$$\hat{y} = 53,089 - 4,482x_1 + 1,781x_2 - 5,11x_1^2 - 1,79x_2^2 + 1,44x_3^2$$

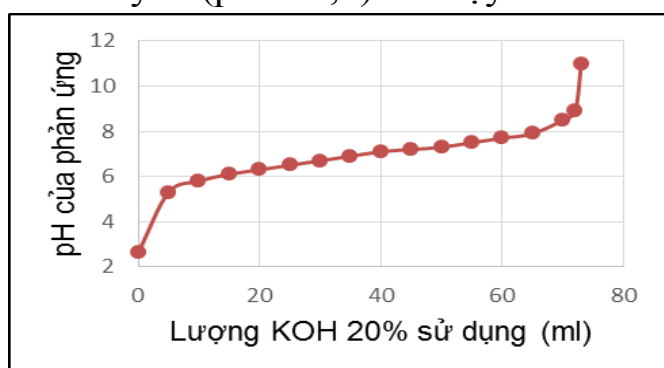
Phương trình hồi quy tương thích với hàm acid oleic có dạng:

$$\hat{y} = 43,148 + 4,2x_1 - 1,51x_2 + 0,49x_3 - 2,64x_1^2 - 1,85x_2^2$$

Kết quả giải bài toán tối ưu cho thấy: tỷ lệ urea/FFA: 2; nhiệt độ: 0°C; thời gian: 16h. Với các điều kiện này, thu được hỗn hợp acid oleic/linoleic với hàm lượng xấp xỉ 54/43 (%), lượng acid béo no còn lại không đáng kể (1,13%).

3.3.3. Tổng hợp kali oleat và kali linoleat là chất hiệp đồng cho Bt

Do vi khuẩn *Bt* không bền trong môi trường kiềm mạnh, nên khi hỗn hợp với hỗn hợp kali oleat và kali linoleat, dung dịch sản phẩm tạo ra cần có tính kiềm yếu ($\text{pH} \leq 8,5$). Vì vậy cần kiểm soát lượng dung dịch KOH



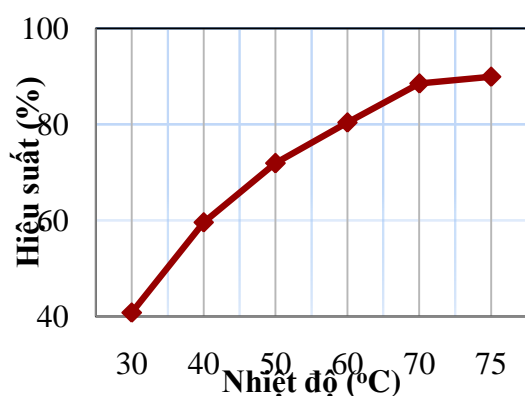
đưa vào phản ứng để sản phẩm có pH mong muốn. Kết quả khảo sát thu được lượng KOH 20% cần thiết để trung hòa 100g acid béo là 70ml. Hiệu suất phản ứng đạt 85,8%.

Hình 3.18. Ảnh hưởng của lượng dung dịch KOH 20% đến pH phản ứng

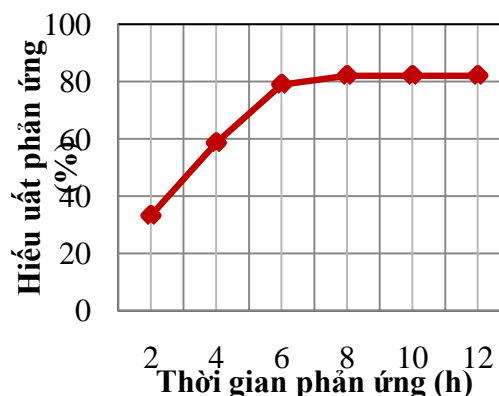
3.4. Tổng hợp chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy imidacloprid

3.4.1. Điều chế methyl este từ dầu sỡ

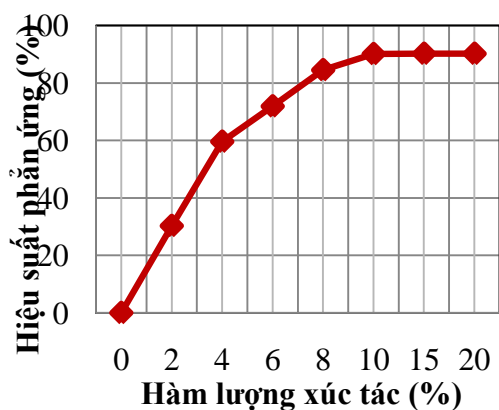
Các điều kiện tối ưu thu được từ khảo sát phản ứng este hóa chéo dầu sỡ với methanol, sử dụng xúc tác chất lỏng ion ($\text{minC}_4\text{H}_8\text{SO}_3\text{H} \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3$), tạo hỗn hợp methyl este (FAME) là: Tỷ lệ mol methanol/dầu: 12/1; nhiệt độ phản ứng: 75°C ; thời gian phản ứng: 8h; hàm lượng xúc tác: 10% khối lượng dầu và được trình bày tại các hình từ 3.20 đến 3.23. Hiệu suất phản ứng đạt 91%.



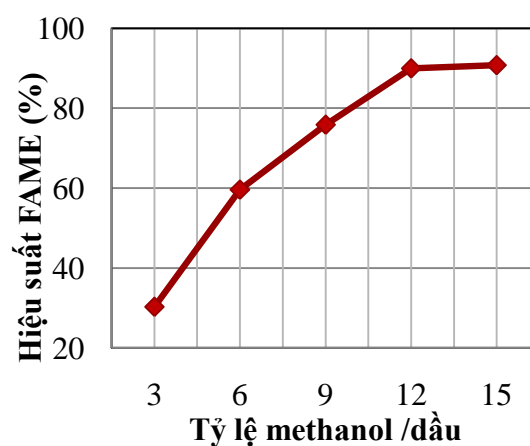
Hình 3.20. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất phản ứng



Hình 3.21. Ảnh hưởng của thời gian đến hiệu suất phản ứng



Hình 3.22. Ảnh hưởng của hàm lượng xúc tác đến hiệu suất phản ứng



Hình 3.23. Ảnh hưởng của tỷ lệ methanol/dầu đến hiệu suất phản ứng

Ở điều kiện này, hiệu suất phản ứng đạt 91%.

Bảng 3.22. Thành phần FAME của dầu hạt sỏ

| Số TT | Acid béo | Tên methyl ester | Hàm lượng % |
|-------|------------|------------------|--------------|
| 1 | 18: 1(n-9) | Methyl oleat | 82,36 |
| 2 | 18: 2(n-6) | Methyl linoleat | 9,29 |
| 3 | 16: 0 | Methyl palmitate | 6,5 |
| 4 | 18:0 | Methyl stearate | 1,86 |

3.4.2. Tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat

Muốn thu được methyl oleat hàm lượng cao, phương pháp kết tinh với urea cần thực hiện theo 2 giai đoạn: Đầu tiên tách loại các FAME bão hòa, sau đó nâng cao hàm lượng methyl oleat đủ tiêu chuẩn sử dụng làm chất hiệp đồng.

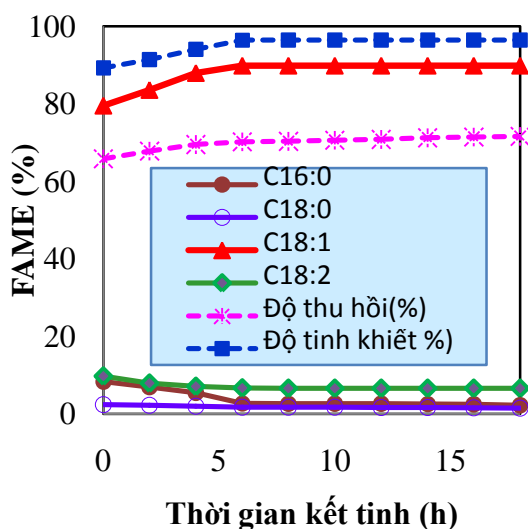
Cũng như tách các acid béo, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình công nghệ, độ tinh khiết của sản phẩm và hiệu suất thu hồi các methyl este. Kết quả khảo sát được trình bày tại các hình 3.25, 3.26, 3.28, 3.30 Tổng hợp các điều kiện tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat như sau:

Giai đoạn 1 (Tách loại FAME bão hòa):

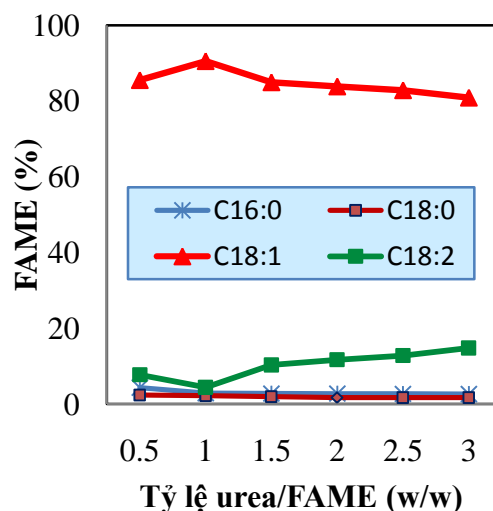
- +Tỷ lệ urea/FAME : 1/1 (w/w);
- +Tỷ lệ ethanol/FAME : 5/1;
- +Nhiệt độ kết tinh 10°C;
- +Thời gian kết tinh: 6h

Giai đoạn 2 (Nâng cao hàm lượng methyl oleat):

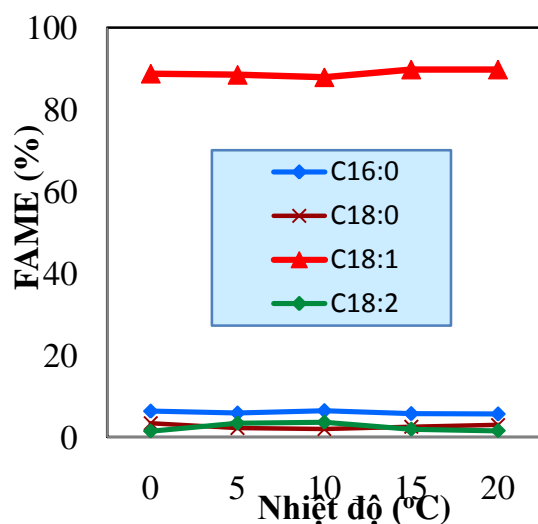
- +Tỷ lệ urea/FAME: 1/1 (w/w);
- +Tỷ lệ ethanol/FAME: 5/1;
- +Nhiệt độ kết tinh 0°C;
- + Thời gian kết tinh: 6h



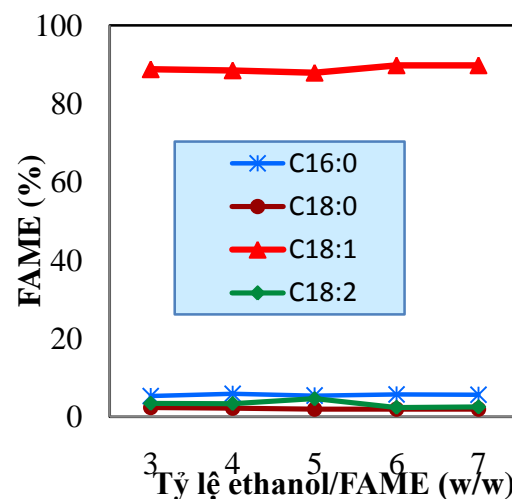
Hình 3.25. Ảnh hưởng của thời gian kết tinh



Hình 3.26. Ảnh hưởng của tỷ lệ ure/FAME



Hình 3.30. Ảnh hưởng của nhiệt độ kết tinh



Hình 3.28. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol/FAME

Kết quả phân tích GC-MS thành phần FAME sau 2 giai đoạn được thể hiện ở Bảng 2.23 và 3.24. Hàm lượng methyl oleat cuối cùng thu được đạt 98,36%, đạt tiêu chuẩn làm chất hiệp đồng cho thuốc Imidacloprid.

Bảng 3.23. Thành phần FAME sau khi tách FAME bão hòa

| Số TT | Acid béo | Tên khoa học | Hàm lượng % |
|-------|------------|------------------|-------------|
| 1 | 18: 1(n-9) | Methyl oleat | 90,53 |
| 2 | 18: 2(n-6) | Methyl linoleat | 5,87 |
| 3 | 16: 0 | Methyl palmitate | 2,18 |
| 4 | 18:1 | Methyl stearate | 1,42 |

Bảng 3.24. Thành phần hỗn hợp FAME sau khi tách giai đoạn 2

| Số TT | Acid béo | Tên khoa học | Tên thường | Hàm lượng % |
|-------|------------|----------------------|---------------|-------------|
| 1 | 18: 1(n-9) | Octadecenoic acid | Acid Oleic | 98,36 |
| 2 | 18: 2(n-6) | Octadecadienoic acid | Acid Linoleic | 1,64 |

3.5. Nghiên cứu chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu, rầy

3.5.1. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt

3.5.1.1. Nghiên cứu công thức hỗn hợp

Gia công hỗn hợp giữa chất hiệp đồng (S1) với Bt theo các tỷ lệ khác nhau S1/Bt: 0,5/1; 1/1; 1,5/1; 2/1. Sản phẩm tạo ra được thử hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm trên sâu tơ hại rau (*Plutella xylostella*).

Bảng 3.25. Hiệu quả trừ sâu tơ của hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với thuốc trừ sâu Bt trong phòng thí nghiệm

| Ký hiệu | Công thức thí nghiệm | Tỷ lệ chất hiệp đồng /Bt (w/w) | Hiệu quả phòng trừ sau 7 ngày (%) |
|---------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| CT1 | S1 (so sánh) | 1/0 | 12,5e |
| CT2 | Vi-Bt (so sánh) | 0/1 | 66,67d |
| CT3 | S1B11 | 0,5/1 | 77,08c |
| CT4 | S1B12 | 1/1 | 89,58a |
| CT5 | S1B13 | 1,5/1 | 85,42ab |
| CT6 | S1B14 | 2/1 | 81,25abc |
| CV | | | 4,1% |

Như vậy, hỗn hợp giữa chất hiệp đồng S1 (K-oleat + K-linoleat) với thuốc trừ sâu Bt cho hiệu quả cao nhất theo tỷ lệ (w/w) là: S/Bt = 1/1.

3.5.1.2. Nghiên cứu chế tạo thuốc trừ sâu mới

Sử dụng sản phẩm Vi-BT 16.000WP của VIPESCO để gia công hỗn hợp với chất hiệp đồng S1. Để tiện so sánh, lựa chọn dạng gia công sản phẩm mới là WP (BT-S 16WP). Đánh giá chất lượng sản phẩm theo TCVN 8050:2009 và TCCS 09:2010/BVTV về “Thuốc BVTV chứa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*”, chất lượng sản phẩm mới đạt yêu cầu.

Bảng 3.27. Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm hỗn hợp chất hiệp đồng với Vi-BT 16000WP

| Thứ | Tên chỉ tiêu | Vi-BT | Sản phẩm mới hỗn hợp |
|-----|--------------|-------|----------------------|
|-----|--------------|-------|----------------------|

| tự | | 16000WP | BT-S 16WP | |
|----|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | Trước gia tốc | Sau gia tốc |
| 1 | Nhận dạng | Bột đồng đều, màu trắng ngà | Bột đồng đều, màu vàng sáng | Bột đồng đều, màu vàng sáng |
| 2 | Hàm lượng hoạt chất <i>Bacillus thuringiensis</i> * (CPU/g) | 6,8 x 10 ¹¹ | 3,42 x 10 ¹¹ | 3,42 x 10 ¹¹ |
| 3 | Lượng chất còn lại trên rây 75µm(uốt) không lớn hơn, (%) | 2 | 2 | 2 |
| 4 | Tỷ suất lơ lửng* (%) | 85,1 | 87,0 | 86,7 |
| 5 | Thể tích bột tạo thành sau 1 phút: ≤ 60 ml. | 55 | 57 | 54 |
| 6 | pH dung dịch huyền phù 1% | 7 | 7 – 7,5 | 7 – 7,5 |

3.5.2. Chế tạo hỗn hợp chất hiệp đồng với thuốc trừ rầy Imidacloprid

3.5.2.1. Nghiên cứu công thức hỗn hợp

Gia công hỗn hợp giữa chất hiệp đồng (S2) với Imidacloprid theo các tỷ lệ khác nhau S2/I: 0,5/1; 1,0/1; 1,5/1; 2,0/1, 2,5/1 và 3,0/1. Sản phẩm tạo ra được thử hiệu lực sinh học trong phòng thí nghiệm trên rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* Stal.

ảng 3.27. Hiệu quả trừ rầy nâu của các công thức hỗn hợp giữa Methyl oleat và Imidacloprid

| Ký hiệu | Công thức thí nghiệm | Tỷ lệ S2/Imidacloprid (w/w) | Hiệu quả phòng trừ sau 7 ngày (%) |
|---------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| CT1 | S2 (So sánh) | 1/0 | 14,17d |
| CT2 | Vicondor 50EC | 0/1 | 59,07c |
| CT3 | S21I | 0,5/1 | 73,92b |
| CT4 | S22I | 1,0/1 | 79,49ab |
| CT5 | S23I | 1,5/1 | 83,30ab |
| CT6 | S24I | 2,0/1 | 87,11a |
| CT7 | S25I | 2,5/1 | 84,1ab |
| CT8 | S26I | 3,0/1 | 75,7b |
| CV% | | | 4,87 |

Tỷ lệ hỗn hợp giữa chất hiệp đồng Methyl oleat với Imidacloprid là 2/1 (S/I = 2/1) cho hiệu quả cao nhất nên được lựa chọn.

3.5.2.2. Nghiên cứu chế tạo thuốc trừ rầy mới

Methyl oleat không tan trong nước nên khi hỗn hợp cần khảo sát bổ sung thêm chất HDBM Sanimal H để đảm bảo chất lượng sản phẩm thuốc trừ rầy mới dạng EC (Imidacloprid-S 50EC). Kết quả cho thấy công thức gia công sản phẩm mới gồm: Imidacloprid: 5%, Methyl oleat: 10%, Sanimal H: 9%, Dung môi Solvesso: Đủ đến 100%.

Chất lượng sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC được đánh giá theo TCCS 07:2006 và TCCS 135:2014 cho thấy sản phẩm đạt yêu cầu.

Bảng 3.29. Một số chỉ tiêu chất lượng thuốc trừ rầy mới Imidacloprid-S 50EC

| TT | Tên chỉ tiêu | Imidacloprid-S 50EC | |
|----|---|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Trước khi TN gia tốc | Sau khi TN gia tốc |
| 1 | Trạng thái bề ngoài | Dịch trong, đồng nhất, màu vàng | Dịch trong, đồng nhất, màu vàng |
| 2 | Hàm lượng hoạt chất (%) | 5,034 | 4,935 |
| 3 | Độ tự nhũ ban đầu | Hoàn toàn | Hoàn toàn |
| 4 | Độ bền nhũ tương (Thể tích lớp kem sau 0,5 giờ, ml) | ≤ 2 | 2 |
| 5 | Độ bọt (Thể tích bọt tạo thành sau 1 phút ≤ 60 ml). | 55 | 57 |

3.6. Khảo nghiệm hiệu lực sinh học của các sản phẩm mới

3.6.1. Khảo nghiệm sản phẩm mới trừ sâu tơ hại rau *Plutella xylostella*

Kết quả thử nghiệm hiệu lực sinh học trên đồng ruộng của thuốc trừ sâu mới BT-S16WP được thể hiện ở bảng 3.30.

Bảng 3.30. Hiệu quả trừ sâu tơ hại su hào qua của các công thức thí nghiệm của sản phẩm mới BT-S16WP

| Công thức | Mật độ sâu trước phun (con/20) | Mật độ sâu sau phun (con/20 cây) | | | Hiệu quả (%) | | |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------|---|---|--------------|---|---|
| | | 1 | 3 | 7 | 1 | 3 | 7 |
| | | | | | | | |

| | cây) | ngày | ngày | ngày | ngày | ngày | ngày |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Nước lã (đối chứng) | 42,7 | 38,0 | 48,3 | 50,0 | - | - | - |
| Vi-BT | 50,3 | 30,7 | 23,3 | 21,7 | 36,6a | 55,2a | 62,7a |
| BT-S 16WP | 53,8 | 30,7 | 23,3 | 12,8 | 66,4b | 77,9b | 88,8b |
| CV (%) | | | | | 17,2 | 14,4 | 13,9 |
| LSD (0,05) | | | | | 3,7 | 4,4 | 4,6 |

Qua bảng 3.30 cho thấy hiệu quả phòng trừ của thuốc mới BT-S 16WP trên sâu tơ hại su hào sau 7 ngày xử lý đạt 88,8% và cao hơn so với sản phẩm so sánh là thuốc trừ sâu Vi-BT (đạt 62,7%), mặc dù lượng hoạt chất của sản phẩm mới chỉ bằng 1/2.

Kết quả này chứng minh tác dụng làm tăng hiệu lực phòng trừ của chất hiệp đồng (hỗn hợp muối kali oleat và kali linoleat) đối với thuốc trừ sâu Bt trên đối tượng sâu tơ hại rau *Plutella xylostella* tại Việt Nam

3.6.2. Khảo nghiệm sản phẩm mới trừ rầy nâu hại lúa (*Nilaparvata lugens* Stal.)

Kết quả thử nghiệm hiệu lực sinh học trên đồng ruộng của thuốc trừ rầy mới Imidacloprid-S 50EC được thể hiện ở bảng 3.31 cho thấy:

So sánh với thuốc trừ rầy Vicondor 50EC, hiệu lực trừ rầy của sản phẩm mới Imidacloprid-S 50EC cao hơn hẳn ở tất cả các kỳ điều tra. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm mới đạt 83,81% sau 7 ngày phun, mặc dù nồng độ sử dụng thấp hơn (0,75 ml/L so với 1,0 ml/L).

Kết quả khảo nghiệm chứng tỏ thuốc trừ rầy mới (hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid) có hiệu lực tốt hơn so với sản phẩm cùng loại không có chất hiệp đồng. Methyl oleat có tác dụng hiệp đồng rõ rệt với Imidacloprid trong phòng trừ rầy nâu hại lúa *Nilaparvata Lugens* Stal. tại Việt Nam.

Bảng 3.31. Hiệu quả phòng trừ của sản phẩm Imidacloprid-S 50EC

| Công thức | Mật độ rầy trước xử lý (con/khóm) | Mật độ rầy sau khi xử lý (con/khóm) | | | Hiệu quả (%) | | |
|------------------|--|--|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|
| | | 1 ngày | 3 ngày | 7 ngày | 1 ngày | 3 ngày | 7 ngày |
| Nước lã (ĐC) | 46,6a | 40,0c | 47,2c | 40,0c | - | - | - |

| | | | | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Vicondor 50EC | 43,5a | 22,0b | 19,4b | 13,3b | 41,08 | 55,97 | 64,38 |
| Imidacloprid-S50EC | 48,2a | 13,8a | 10,4a | 6,7a | 66,65 | 78,7 | 83,81 |
| CV (%) | 10,4 | 12,6 | 6,5 | 14,8 | - | - | - |

3.6.3. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng

3.6.3.1. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng đối với thuốc Bt trừ sâu tơ hại rau

a. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng với thuốc Bt trừ sâu tơ hại rau:

Theo kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, hiệu lực phòng trừ sâu tơ của sản phẩm có chất hiệp đồng BT-S sau 7 ngày là 88,8% còn sản phẩm Bt dùng đơn là 62,7 %. Như vậy, hiệu quả hiệp đồng của sản phẩm BT-S so với thuốc trừ sâu Bt là: $(88,8 - 62,7)/88,8 \times 100\% = 29,39\%$

b. Chỉ số hiệp đồng (SF)

Tương tự, từ kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, chỉ số hiệp đồng là:

$$SF = 88,8 : 62,7 = 1,416$$

3.6.3.2. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng đối với thuốc trừ rầy

a. Xác định tác dụng của chất hiệp đồng với thuốc trừ rầy Imidacloprid

Theo kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, hiệu lực phòng trừ rầy nâu của sản phẩm chứa chất hiệp đồng Imidacloprid-S 50EC sau 7 ngày là 83,81%; của Vicondor 50EC sau 7 ngày là 64,38%. Như vậy, hiệu quả của chất hiệp đồng methyl oleat với thuốc trừ rầy Imidacloprid là:

$$(83,81 - 64,38)/83,81 \times 100\% = 23,18\%$$

b. Chỉ số hiệp đồng(SF)

Tương tự, từ kết quả khảo nghiệm ngoài đồng ruộng, chỉ số hiệp đồng là:

$$SF = 83,81 : 64,38 = 1,30$$

3.7. Bước đầu nghiên cứu cơ chế tác động của chất hiệp đồng

3.7.1 Tác dụng ức chế enzym APN của hỗn hợp kali oleat và kali linoleat

Khảo sát đánh giá khả năng ức chế enzym APN của chất hiệp đồng được thực hiện với các mẫu thí nghiệm bao gồm các công thức sau: CT1: Tinh thể độc chủng *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt); CT2: Chất hiệp đồng S1 (hỗn hợp kali oleat và kali linoleat) và CT3: Hỗn hợp giữa thuốc Bt và chất hiệp đồng S1 theo tỷ lệ khối lượng là 1/1.

Kết quả đánh giá khả năng ức chế enzym APN của các mẫu thử được thể hiện tại bảng 3.34.

Bảng 3.34. Khả năng ức chế enzym APN của mẫu thí nghiệm

| Công thức | Kí hiệu mẫu | Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml) | Ức chế (%) | IC ₅₀ (mg/ml) |
|-----------|-------------|-----------------------------|------------|--------------------------|
| CT1 | Bt | 3 | 0 | > 3 |
| CT2 | S1 | 3 | 78,3 ± 0,9 | 1,06 |
| CT3 | Bt + S1 | 3 | 70,0 ± 0,4 | 0,55 |

-*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* không có tác dụng ức chế enzym APN, nhưng chất hiệp đồng (S1) biểu hiện khả năng ức chế enzym này khá cao, đạt 78,3 % với IC₅₀ = 1,06 mg/ml.

- Sản phẩm hỗn hợp thuốc trừ sâu Bt với chất hiệp đồng có khả năng ức chế enzym APN gần tương đương với chất hiệp đồng (70,0 %), nhưng nồng độ ức chế chỉ bằng 1/2 (IC₅₀ = 0,55 mg/ml).

Như vậy có thể thấy, hỗn hợp kali oleat + kali linoleat có tác dụng ức chế enzym APN tương đối cao. Qua đó có thể kết luận, sự có mặt của chất hiệp đồng S1 đã làm tăng hiệu quả phòng trừ sâu tơ của thuốc trừ sâu Bt. Nhận xét này phù hợp với kết quả khảo nghiệm sản phẩm trên đối tượng sâu tơ hại su hào ngoài đồng ruộng.

3.7.2. Tác dụng ức chế enzym Glutathione S-transferase của Methyl oleat

Glutathione S-transferase (GST) là enzym giải độc quan trọng của côn trùng, bảo vệ tế bào chống lại các chất độc bằng cách liên kết với nhóm thiol (-SH) của Glutathione tạo ái lực với các chất độc.

Kết quả thí nghiệm khả năng ức chế enzym GST của các mẫu thử được thể hiện tại bảng 3.35.

Bảng 3.35. Khả năng ức chế enzym GST của mẫu thí nghiệm

| TT | Mẫu thí nghiệm | Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml) | Ức chế (%) | IC ₅₀ (mg/ml) |
|----|-------------------|-----------------------------|------------|--------------------------|
| 1 | Imidacloprid | 5 | 61,2 ± 7,4 | 4,28 |
| 2 | S2 (methyl oleat) | 5 | 29,7 ± 1,1 | > 5 |
| 3 | Imidacloprid + S2 | 5 | 76,3 ± 1,2 | 3,34 |

Hoạt chất Imidacloprid biểu hiện khả năng ức chế enzym GST đạt 61,2 % ở nồng độ đầu 5 mg/ml chứng tỏ enzym GST có tham gia vào các quá trình giải độc nhưng ở mức độ thấp.

Khả năng ức chế enzym GST của chất hiệp đồng methyl oleat không cao (gần 30%). Tuy nhiên khi hỗn hợp giữa chất hiệp đồng với Imidacloprid thì biểu hiện khả năng ức chế cao hơn so với mẫu đơn chất (76,3%), với nồng độ ức chế thấp hơn.

Như vậy, có thể thấy methyl oleat cũng có tác dụng hiệp đồng với Imidacloprid để ức chế enzym giải độc GST, mặc dù biểu hiện không cao.

3.7.3. Tác dụng ức chế enzym Cytochrom P450-monoxygenases của methyl oleat

Cytochrome P450- monoxygenases (CYP) là enzym chính gây nên sự kháng thuốc Imidacloprid của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stål. vì chúng đóng vai trò giải độc đối với thuốc Imidacloprid.

Để khảo sát khả năng ức chế enzym CYP của chất hiệp đồng Methyl oleat, các mẫu thí nghiệm được sử dụng gồm: hoạt chất Imidacloprid, chất hiệp đồng S2 (methyl oleat) và hỗn hợp giữa Imidacloprid với S2.

Khả năng ức chế enzym CYP của các mẫu thử được thể hiện tại Bảng 3.36.

Bảng 3.36. Khả năng ức chế enzym CYP của mẫu thí nghiệm

| TT | Mẫu thí nghiệm | Nồng độ đầu của mẫu (mg/ml) | Ức chế (%) | IC ₅₀ (mg/ml) |
|----|-------------------|-----------------------------|------------|--------------------------|
| 1 | Imidacloprid | 5 | 50,2 ± 7,4 | 2,58 |
| 2 | S2 (methyl oleat) | 5 | 85,7 ± 1,1 | 1,02 |
| 3 | Imidacoprid + S2 | 5 | 86,3 ± 1,2 | 0,95 |

Có thể dễ dàng nhận thấy sự khác biệt giữa các công thức như sau:

- Thuốc trừ sâu Imidacloprid biểu hiện khả năng ức chế enzym CYP ở nồng độ đầu 5 mg/ml đạt 50,2 %, với giá trị IC₅₀ = 2,58 mg/ml. Kết quả cho thấy Imidacloprid đã bị rầy nâu kháng ở mức độ nhất định.

- Chất hiệp đồng S2 (methyl oleat) có khả năng ức chế tốt enzym CYP (85,7 %, với IC₅₀ = 1,02 mg/ml) và tương đương với khả năng ức chế của hỗn hợp chất hiệp đồng với Imidacloprid (86,3 %, IC₅₀ = 0,95 mg/ml).

Với kết quả khảo sát khả năng ức chế enzym Glutathione S-transferase và Cytochrome P450 monoxygenase trong phòng thí nghiệm của các

mẫu hoạt chất Imidacloprid, methyl oleat và hỗn hợp của chúng có thể sơ bộ kết luận:

- Hoạt chất Imidacloprid đã bị rầy nâu kháng thuốc.
- Liên quan đến sự kháng thuốc của rầy nâu, sự biểu hiện của enzym Cytochrome P450 monooxygenase đóng vai trò chính, còn enzym Glutathione S-transferase có ảnh hưởng yếu.
- Hỗn hợp methyl oleat với Imidacloprid cũng có khả năng ức chế tốt enzym Cytochrome P450 monooxygenase nên có thể khắc phục hiện tượng rầy kháng thuốc Imidacloprid, qua đó làm tăng hiệu quả phòng trừ của sản phẩm hỗn hợp.

KẾT LUẬN

1. Đã khảo sát, xác định 2 chất hiệp đồng phù hợp cho 2 thuốc BVTV đã bị giảm hiệu lực tại Việt Nam: hỗn hợp muối kali của acid oleic và linoleic cho thuốc trừ sâu Bt để phòng trừ sâu tơ hại rau *Plutella xylostella*; methyl oleat cho thuốc trừ rầy Imidacloprid để phòng trừ rầy nâu hại lúa *Nilaparvata lugens* Stal. tại Việt Nam.
2. Lần đầu tiên đã thu thập, khảo sát hàm lượng dầu và hàm lượng một số acid béo không no C18 của 20 nguyên liệu chứa dầu thực vật tại Việt Nam và đã lựa chọn dầu hạt đào làm nguyên liệu thích hợp để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và dầu hạt sỏ để điều chế chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid.
3. Đã nghiên cứu phương pháp dùng enzym để tách dầu hạt sỏ và dầu hạt đào với các thông số sau: Với hạt sỏ: nhiệt độ 50°C; nồng độ enzym protease 0,6 % (w/w); thời gian 3h, hiệu suất thu dầu: 76,9%; với hạt đào: nhiệt độ 50°C; nồng độ enzym protease 0,8 % (w/w); thời gian 3h, hiệu suất thu dầu: 71,3%. Sau khi tách, tỷ lệ acid oleic/linoleic của dầu hạt đào là 55/32 (%), của dầu hạt sỏ là 82,3/7,7 (%), phù hợp làm nguyên liệu để điều chế các chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt và Imidacloprid.
4. Từ dầu hạt đào, đã điều chế hỗn hợp K-oleat/K-linoleat (tỷ lệ 54/43 %) làm chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt, qua các bước: 1) Thủy phân dầu TV với KOH trong ethanol; 2) Tách acid oleic, acid linoleic từ hỗn hợp acid thu được bằng phương pháp tạo phức kết tinh với ure. Sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm để tối ưu hóa quá trình tách, thu được các thông số tối ưu: tỷ lệ ure/FFA: 2/1, kết tinh ở 0°C, thời gian: 16 giờ. Kết quả thu được hỗn hợp acid béo chứa chủ yếu acid oleic (53,9%), acid linoleic (43,62%) và lượng nhỏ acid béo no còn lại (hơn 1%). 3) Chuyển hóa hỗn hợp acid béo thu được thành

muối kali theo tỷ lệ khối lượng và pH đạt yêu cầu dùng làm chất hiệp đồng cho thuốc trừ sâu Bt.

5. Từ dầu hạt sỏ, đã điều chế methyl oleat làm chất hiệp đồng cho thuốc trừ rầy Imidacloprid, qua các bước: 1) Tổng hợp hỗn hợp methyl este của acid béo bằng phản ứng este hóa chéo dầu sỏ với methanol ở 75°C, thời gian 8 giờ, sử dụng lượng xúc tác chất lỏng ion $mimC_4H_8SO_3H.CH_3SO_3$ bằng 10% khối lượng dầu. 2) Tách và nâng cao hàm lượng methyl oleat bằng phương pháp tạo phức với ure qua 2 giai đoạn: kết tinh ở 10°C và 0°C. Sản phẩm thu được có hàm lượng > 98%, đảm bảo chất lượng làm chất hiệp đồng. Thành phần các acid béo và methyl este được xác định bằng phổ GC-MS.
6. Đã chế tạo 2 sản phẩm thuốc BVTV mới, đạt tiêu chuẩn chất lượng: Thuốc trừ sâu BT-S 16WP (hỗn hợp giữa K-oleat/K- linoleat với thuốc trừ sâu Vi-BT 16.000WP theo tỷ lệ 1/1 w/w) và thuốc trừ rầy Imidacloprid-S 50EC (hỗn hợp giữa methyl oleat với Imidacloprid theo tỷ lệ 2/1)
7. Đã khảo nghiệm hiệu lực sinh học của 2 sản phẩm thuốc BVTV mới. Kết quả cho thấy, hiệu lực trừ sâu tơ hại rau của thuốc BT-S 16WP cao hơn 29,9% so với đối chứng, chỉ số hiệp đồng (SF): 1,416; hiệu lực trừ rầy nâu hại lúa của thuốc Imidacloprid-S 50EC cao hơn 23,18% so với đối chứng, SF: 1,30.
8. Lần đầu tiên tại Việt Nam đã nghiên cứu cơ chế tác động của các chất hiệp đồng và có kết luận ban đầu: Hỗn hợp muối K-oleat/K- linoleat có tác dụng ức chế mạnh enzym APN của sâu tơ *Plutella xylostella* (78,3 % với $IC_{50} = 1,06$ mg/ml); Methyl oleat có tác dụng ức chế yếu enzym giải độc GST nhưng ức chế mạnh enzym CYP của rầy nâu *Nilaparvata lugens* Stal. (85,7 %, với $IC_{50} = 1,02$ mg/ml). Nhờ vậy hiệu quả trừ sâu và trừ rầy của các sản phẩm mới đã được nâng cao. Kết quả nghiên cứu góp phần giải thích cơ chế tác động của các chất hiệp đồng lựa chọn cho một số thuốc trừ sâu đã bị giảm hiệu lực ở Việt Nam.