

## ẢNH HƯỞNG CỦA VI NHŨ CHITOSAN-DẦU NEEM ĐẾN SÂU KHOANG HẠI RAU (*Spodoptera litura*) TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

### Effect of Chitosan-Neem Oil Microemulsion on Cutworm Larvae (*Spodoptera litura*) in Laboratory

Nguyễn Thị Như Quỳnh<sup>1\*</sup>, Nguyễn Tiến Thắng<sup>1,2</sup>

Ngày nhận bài: 06.2.2020

Ngày chấp nhận: 21.2.2020

#### Abstract

Neem oil has been used widely in agriculture due to its insecticidal effect and its safety for hot-blooded animals. However, as many bioactive substances, the slow effect time and the high sensitivity of neem oil can reduce its pesticide activity when exposed to adverse environment conditions (high temperatures, light, rain, etc.). In this study, to test the insecticidal effectivity and the other activities of neem oil when it was combined with chitosan microemulsion. The experiments were tested on 6-day-old cutworm larvae for the lethal effect, repelling activity, and antifeeding. The results showed that, 80% and 100% of cutworm larvae were killed after 8 days at 7.5 %, and 100% Chitosan-neem oil. With the low concentration of the combinations, 4.5 and 7.5%, repelling of worm larvae and antifeeding activity occurred. These results indicated that combination of neem oil and chitosan microparticles obtained pesticide effectively and its insect-killing time was prolonged.

**Keywords:** neem oil, cutworm larval, *Spodoptera litura*, Chitosan-neem microemulsion

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc trừ sâu có nguồn gốc hóa học từ lâu đã được sử dụng phổ biến trong nông nghiệp vì hiệu quả tác động nhanh, giá thành rẻ và dễ sử dụng. Tuy nhiên, thuốc hóa học lại bộc lộ nhiều yếu điểm như khó phân hủy, để lại nhiều dư lượng trong đất và nông sản gây ảnh hưởng đến môi trường và ngày càng xuất hiện nhiều loài sâu hại kháng thuốc. Vì vậy mà việc nghiên cứu và tìm kiếm các loại thuốc sinh học có hiệu quả phòng trừ sâu hại, thân thiện với môi trường, an toàn cho con người và các loại sinh vật khác ngày càng được chú trọng và quan tâm nhiều hơn.

Hiện nay, dầu neem được sử dụng để làm thuốc trừ sâu sinh học do có hoạt tính gây ngán ăn, trừ sâu hại, diệt tuyến trùng, ức chế sự sinh trưởng, phát triển và sinh sản của sâu hại (Wilps *et al.* 1993), khả năng làm giảm sự tổng hợp các enzyme giải độc, tăng hiệu quả tiêu diệt các loại côn trùng kháng thuốc (Lowery và Smirle, 2000). Nghiên cứu của Nguyễn Tiến Thắng và ctv (Viện Sinh Học Nhiệt Đới, 2005) cho thấy, dịch chiết

nhân hạt neem có hiệu lực xua đuổi, gây chết và làm biến dạng ở rầy nâu trưởng thành. Các sản phẩm thuốc trừ sâu chế biến từ cây neem (*Azadirachta indica* A. Juss, Việt Nam gọi là cây xoan chịu hạn) hiện đang được ứng dụng rộng rãi, trong đó có sản phẩm Vineem 1500 EC của Công ty thuốc sát trùng Việt Nam, được chiết xuất từ nhân hạt neem chứa hoạt chất azadirachtin. Thuốc có hiệu lực phòng trừ nhiều loại sâu hại trên lúa, rau màu, cây công nghiệp, cây ăn trái, hoa, cây cảnh bằng cách gây chán ăn, xua đuổi, ngăn cản sự lột xác và đẻ trứng, làm giảm khả năng sinh sản. Thuốc không tạo nên tính kháng của dịch hại, không ảnh hưởng đến thiên địch và không để lại dư lượng trên cây trồng,...

Bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn (2010) cho phép dùng azadirachtin trong dầu neem để sử dụng làm thuốc bảo vệ thực vật, thay cho việc nhập khẩu như hiện nay. Thuốc bảo vệ thực vật sử dụng hoạt chất azadirachtin sẽ không lưu lại bã độc lâu mà phân hủy hoàn toàn trong vòng 2 đến 3 ngày. Tuy nhiên, dầu neem có một số hạn chế là thời gian tác dụng chậm và yếu lại dễ bị biến tính bởi các tác động bất lợi từ môi trường như nhiệt độ cao và ánh sáng mặt trời. Do đó, cần có một loại chất mang để che chở và bảo vệ cho dầu neem nhưng phải

1\*. Viện Sinh học Nhiệt đới - VAST;  
quynhntn.itb@gmail.com, 0983007697

2. Trường đại học Nguyễn Tất Thành

có tính an toàn cao và giữ nguyên hoặc nâng cao được hiệu quả của dầu neem. Do đó, nghiên cứu này lựa chọn chitosan để tạo vi hạt mang dầu neem bằng phương pháp vi nhũ tạo ra những vi hạt bao bọc dầu neem bên trong.

Vi hạt chitosan tổng hợp bằng phương pháp vi nhũ tương sẽ tạo thành một hệ phân tán đồng nhất trong nước, dầu và các chất hoạt động bề mặt, có tính đẳng hướng về mặt quang học và ổn định về mặt nhiệt động học như một dịch lỏng (Danielsson và Lindman, 1981). Trong nghiên cứu này chitosan sẽ ở pha nước kết hợp với pha dầu (dầu neem), sau đó thêm các chất nhũ hóa vào, hỗn hợp khuấy từ liên tục ở nhiệt độ phòng để tạo vi hạt chitosan. Dung dịch vi nhũ Chitosan-neem được kiểm tra hoạt tính trên đối tượng ấu trùng sâu khoang 6 ngày tuổi qua các chỉ tiêu hiệu lực gây chết sau 8 ngày theo dõi, hoạt tính xua đuổi và ngán ăn sau 5 ngày theo dõi.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Dung dịch vi nhũ chitosan mang dầu neem (chiết tách từ hạt neem trồng tại Ninh Thuận, Việt Nam bằng phương pháp ép nguội) được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu Viện Sinh học Nhiệt đới.

Sâu khoang (*Spodoptera litura*) được thu thập trên cây rau tại vườn thực nghiệm trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh, khu phố 6, Linh Trung, Thủ Đức.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp khảo sát nồng độ gây chết ấu trùng sâu khoang của Chitosan – dầu Neem (CN)

Nghiên cứu được tiến hành với 11 nghiệm thức gồm 5 nghiệm thức xử lý CN ở các nồng độ 7,5; 9,0; 11,25; 12,86; 15%, 5 nghiệm thức xử lý dầu neem với nồng độ 7,5; 9,0; 11,25; 12,86; 15%; một nghiệm thức đối chứng xử lý nước được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 03 lần lặp lại với mỗi nghiệm thức 30 ấu trùng sâu khoang. Lá rau cải ngọt dùng làm thức ăn cho sâu được rửa sạch, để ráo nước, cân với trọng lượng như nhau, nhúng toàn bộ vào dung dịch, lấy ra để khô tự nhiên.

Sử dụng các hộp nhựa tròn (đường kính đáy

9,5 cm, chiều cao 7 cm và có lót giấy thấm). Trên mỗi hộp có dán nhãn ghi tên từng nghiệm thức. Cho lá cải vào mỗi hộp nhựa và thả 10 con sâu khoang 6 ngày tuổi vào mỗi hộp, đậy nắp hộp và theo dõi. Sau mỗi  $24 \pm 4$  giờ thì thay lá một lần.

Theo dõi và ghi nhận số sâu chết sau mỗi 24 giờ trong 8 ngày. Hiệu lực gây chết ấu trùng sâu khoang được tính theo công thức Abbott

$$H (\%) = \frac{Ca-Ta}{Ca} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: H (%): Hiệu lực của dầu neem tính theo phần trăm

Ca: Số sâu sống ở công thức đối chứng sau xử lý

Ta: Số sâu sống ở nghiệm thức thí nghiệm sau xử lý

#### 2.2.2 Phương pháp đánh giá hoạt tính ngán ăn của Chitosan - neem (CN) lên ấu trùng sâu khoang

Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức bao gồm 2 nghiệm thức xử lý CN ở nồng độ 4,5% (CN 4.5) và 7,5% (CN 7.5) và đối chứng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 03 lần lặp lại.

Chuẩn bị hộp nhựa (đường kính đáy 2,5 cm, chiều cao 6 cm) có nắp đậy, lót một lớp giấy thấm và ghi tên từng nghiệm thức. Lá rau cải ngọt rửa sạch, cân với trọng lượng như nhau, sau đó nhúng toàn bộ vào dung dịch CN đã pha loãng theo các nồng độ 4,5% và 7,5 %, lấy ra để khô tự nhiên. Cho lá cải vào và thả 2 con sâu khoang 6 ngày tuổi vào mỗi hộp nhựa, đậy nắp lại, mỗi nghiệm thức 30 con (15 hộp). Theo dõi, thay lá và cân trọng lượng sâu sau mỗi  $24 \pm 4$  giờ.

#### 2.2.3 Đánh giá hoạt tính xua đuổi của chitosan – neem lên ấu trùng sâu khoang

Chuẩn bị thùng nhựa (kích thước 36×24×15 cm) có nắp đậy, rửa sạch, để khô, lót một lớp giấy thấm. Rau cải ngọt rửa sạch, để ráo nước, cân với trọng lượng như nhau, nhúng toàn bộ vào dung dịch CN nồng độ 4,5 và 7,5 %, lấy ra để khô tự nhiên.

Ở thùng đối chứng đặt lá cải vào 2 bên thùng với trọng lượng như nhau. Ở thùng nghiệm thức đặt một bên lá rau được xử lý dung dịch CN và một bên là lá không xử lý. Sau đó thả vào mỗi thùng 30 con sâu khoang 6 ngày tuổi và đậy nắp lại. Quan sát, chụp hình và thay rau sau mỗi  $24 \pm 4$  giờ.

#### 2.2.4 Phân tích và xử lý số liệu:

Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích bằng phương pháp phương sai đơn

yếu tố (One – way ANOVA) với độ tin cậy 95 % và phân hạng theo trắc nghiệm Tukey. Tất cả các phân tích thống kê sử dụng phần mềm Minitab 16. Các đồ thị được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism 5, độ tin cậy 95 %.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Hiệu lực gây chết ấu trùng sâu khoang của chitosan - neem**

Số liệu ở bảng 1 và hình 1 cho thấy dung dịch vi nhũ tương chitosan – Neem (CN) sau 8 ngày thử nghiệm đều có hiệu lực gây chết sâu khoang cao ở các nghiệm thức, và nồng độ CN càng tăng thì hiệu lực gây chết càng tăng và cao nhất ở nghiệm thức CN15 (15%) đạt 100% số con

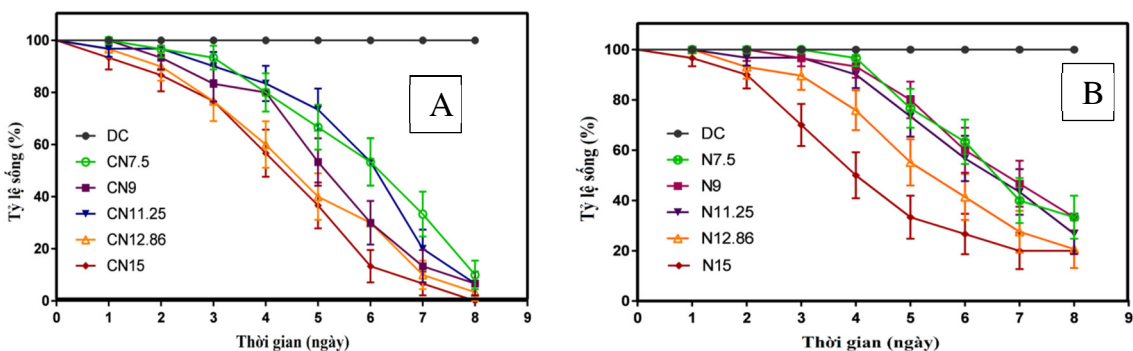
chết, cao hơn so với dầu neem khi so sánh ở cùng nồng độ chỉ đạt 80%. Ấu trùng sâu khoang ở nghiệm thức xử lý CN có dấu hiệu bỏ ăn hoặc ăn ít hơn sau 2 và 3 ngày, chết nhiều nhất vào ngày 7 và 8. Tỷ lệ sống của ấu trùng sâu khoang ở các nghiệm thức thí nghiệm giảm rõ rệt từ ngày thứ 4 và thời gian càng kéo dài thì tỷ lệ sống càng giảm cho đến ngày thứ 8 thì tỷ lệ sống của ấu trùng sâu khoang ở nghiệm thức CN15 chỉ còn 0% (chết 100%) (hình 1). Tuy nhiên, ở các nồng độ 7,5 và 9% đã thể hiện hiệu lực diệt sâu mạnh và có hiệu quả sau 8 ngày theo dõi trên 80% và không có khác biệt thống kê về tỷ lệ sống theo thời gian nên nồng độ CN được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo là nồng độ 7,5%.

**Bảng 1. Hiệu lực gây chết ấu trùng sâu khoang của CN và dầu neem sau 8 ngày xử lý**

Nghiệm thức	Nồng độ xử lý (%)	Hiệu lực (% ± SD)
ĐC	0	0,00 <sup>b</sup>
CN7.5	7,50	88,43 ± 11,14
CN9	9,00	91,67 ± 7,22
CN11.25	11,25	91,67 ± 7,22
CN12.86	12,86	95,83 ± 7,22
CN15	15,00	100,00± 0,00
N7.5	7,50	66,67 ± 5,77
N9	9,00	66,67 ± 11,55
N11.25	11,25	73,33 ± 5,77
N12.86	12,86	76,67 ± 5,77
N15	15,00	80,00 ± 0,00

Kết quả nghiên cứu này cũng có sự tương đồng với nghiên cứu của Fahmi và cộng sự (2017) khi kiểm tra hiệu lực diệt bọ xít (*Riptortus linearis*) của vi hạt chitosan mang dầu neem, hiệu quả khi dầu neem được gói

trong chitosan làm tăng hiệu lực diệt bọ xít. Trong khi Anjali và cộng sự thì thấy rằng, vi nhũ tương mang dầu neem có hiệu quả diệt ấu trùng muỗi tăng khi kích thước hạt mang dầu neem giảm.



**Hình 1. Tỷ lệ sống của ấu trùng sâu khoang ở các nghiệm thức sau 8 ngày xử lý (A) xử lý bằng chitosan neem; (B) xử lý bằng dầu neem**

**3.2 Hoạt tính gây ngán ăn của Chitosan – Neem lên ấu trùng sâu khoang**

Trọng lượng sâu có sự thay đổi đáng kể ở lô đối chứng và lô xử lý CN (bảng 2). Khối lượng sâu ở lô đối chứng tăng nhanh theo thời gian, tăng 0,184 g sau 5 ngày. Trong khi các lô xử lý tuy có tăng nhưng tăng rất chậm và kích thước nhỏ hơn so với lô đối chứng (hình 2). Ở nồng độ CN4.5% khối lượng ấu trùng sâu chỉ đạt 0,0177 g và nồng độ 7,5% là 0,024 g sau 5 ngày xử lý thấp hơn khối lượng trung bình của ấu trùng ở các nghiệm thức đối chứng về mặt thống kê (0,184 g) (Bảng 2). Hiện tượng sâu lớn chậm và tiêu thụ thức ăn ít là do azadirachtin trong dầu neem đã gây ra hiện tượng rối loạn hormone hoặc rối loạn các hệ thống sinh lý khác như sự di chuyển thức ăn ở ruột, ức chế hoạt động co bóp ở ruột thông qua việc ngăn chặn quá trình sản xuất serotonin, chất kích thích nhu động ruột côn trùng, gây ra tình trạng ngán ăn (Trumm và Dorn, 2000). Ngoài ra, tác dụng gây ngán ăn của azadirachtin còn được quan sát trên các đối tượng có sự nhạy cảm cao với các thụ quan hóa học ở vùng miệng côn trùng. Tác dụng kích thích

những tế bào đặc biệt có tác dụng truyền tín hiệu hóa học và khóa luôn các receptor nhận biết đường (bình thường có tác dụng kích thích cảm giác thèm ăn ở côn trùng). Điều đó dẫn đến côn trùng bị chết đói (Mordue Luntz *et al.* 1999). Thí nghiệm này đã chỉ ra rằng, azadirachtin có trong dầu neem khi được mang lên vi nhũ chitosan thì vẫn giữ được hoạt tính gây ngán ăn. Hoạt tính gây ngán ăn thể hiện cao, sâu chậm phát triển so với nghiệm thức đối chứng. Do đó, tỷ lệ chết của sâu khoang cao hơn hẳn so với dầu neem cũng như là đối chứng. Hiện nay, vi nhũ tương chitosan được nghiên cứu mang các hoạt chất sinh học không tan trong nước nhưng chưa có các kết quả nghiên cứu về tác dụng gây ngán hay xua đuổi và đây là một trong những thí nghiệm đầu tiên khảo sát về hiệu quả gây ngán ăn trên đối tượng côn trùng. Hiện nay, chưa có công bố nào chỉ ra rằng chitosan có tác dụng diệt sâu hay gây ngán an cũng như xua đuổi côn trùng mà nó được sử dụng để làm chất mang hoạt chất. Do đó, tác dụng trên ấu trùng sâu khoang trong thí nghiệm là tác dụng của dầu neem.

**Bảng 2. Trọng lượng trung bình của ấu trùng sâu khoang sau 5 ngày theo dõi**

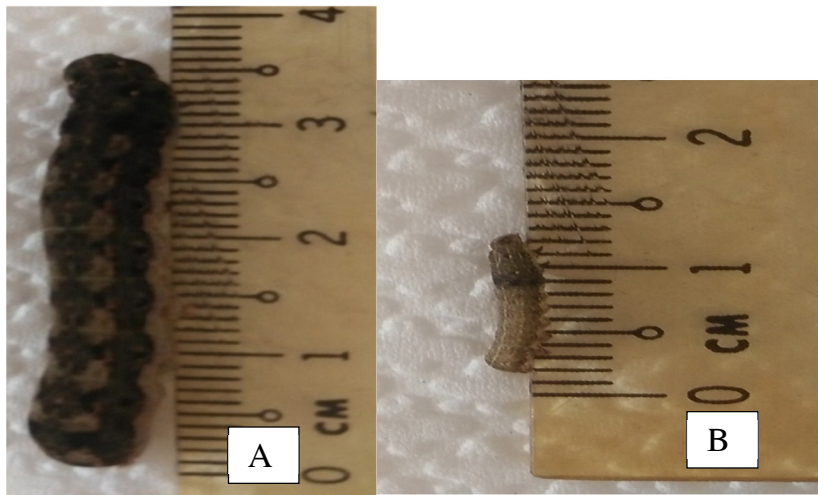
Nghiệm thức	Trọng lượng (g)				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
ĐC	0,0073 <sup>a</sup>	0,0287 <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	0,1097 <sup>a</sup>	0,184 <sup>a</sup>
CN4.5	0,0083 <sup>a</sup>	0,0117 <sup>b</sup>	0,0157 <sup>b</sup>	0,0173 <sup>b</sup>	0,0177 <sup>b</sup>
CN7.5	0,0077 <sup>a</sup>	0,0143 <sup>b</sup>	0,015 <sup>b</sup>	0,019 <sup>b</sup>	0,024 <sup>b</sup>

*Trong cùng một cột, các ký tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức có ý nghĩa ở mức  $p < 0,01$ .*

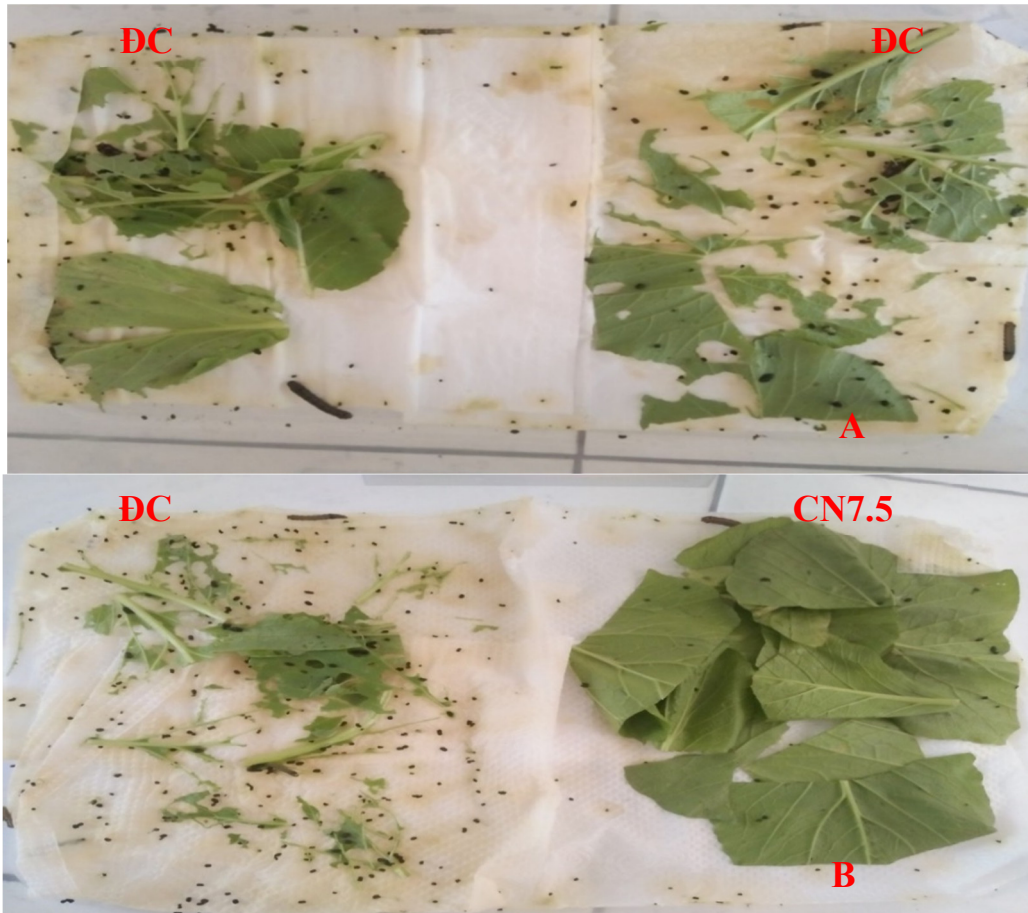
**3.3 Đánh giá hoạt tính xua đuổi của Chitosan – Neem lên ấu trùng sâu khoang**

Kết quả quan sát được sau khi thực hiện thí nghiệm xua đuổi ở các lô thí nghiệm (CN4.5 và

CN7.5), trong cùng một thùng với một bên là thức ăn bình thường (ĐC) và một bên là thức ăn có xử lý CN thì sâu tập trung ăn thức ăn ở bên ĐC nhiều hơn so với bên xử lý CN (hình 3B).



**Hình 2. Kích thước ấu trùng sâu khoang sau 5 ngày xử lý**  
*A: Đối chứng, B: Nghiệm thức CP7.5.*



**Hình 3. Thí nghiệm hoạt tính xua đuổi**  
*A: Lô đối chứng ( 2 bên không xử lý CN)*  
*B: Lô thí nghiệm (1 bên là thức ăn bình thường và 1 bên có xử lý CN).*

Trong khi ở lô đối chứng ấu trùng sâu đều tập trung ăn đều hai bên (Hình 3A). Hiện tượng này xảy ra là do các hoạt chất có trong dầu neem đã tác động đến côn trùng từ xa hoặc là có sự tiếp xúc trực tiếp qua cơ quan cảm thụ hóa học vị giác (phân bố ở đốt râu, hốc miệng hoặc ở đốt bàn chân). Khi đó sẽ gây cho côn trùng cảm giác ngán ăn và di chuyển đến nơi khác (Lê Trường và Nguyễn Trần Oánh, 1975). Kết quả thí nghiệm này cho thấy, hoạt chất có trong dầu neem khi được mang lên vi nhũ chitosan thì hoạt tính của dầu neem được duy trì như hoạt tính xua đuổi thể hiện rất rõ chứ không bị mất đi.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1 Kết luận

Dung dịch vi nhũ Chitosan – Neem có hiệu lực diệt ấu trùng sâu khoang cao đạt >80% sau 8 ngày xử lý ở các nồng độ từ 7,5% và đạt 100% ở nồng độ 15%. Ở 2 nồng độ 4,5% và 7,5% đều có hiệu quả trong việc gây ngán ăn và xua đuổi rất rõ rệt. Nồng độ CN càng cao thì hiệu quả xua đuổi và gây ngán ăn càng rõ. Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, khi mang dầu neem lên vi hạt chitosan thì tác dụng của dầu neem vẫn biểu hiện rất hiệu quả ở tất cả các hoạt tính vốn có của nó.

##### 4.2 Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu thêm ảnh hưởng của vi nhũ Chitosan-neem đến hiệu quả phân tán, thời gian bảo quản dầu neem để tăng tính ứng dụng của vi nhũ Chitosan trong sản xuất thuốc trừ sâu thảo mộc từ dầu neem (hoạt chất azadirachtin) nói riêng và thuốc thảo mộc nói chung.

##### Lời cảm ơn

Để hoàn thành nhiệm vụ chuyên môn, chúng tôi chân thành cảm ơn em Thiên Thị Hồng Lam, Lê Thị Vân Anh đã hỗ trợ một số công việc của đề tài. Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Viện Sinh học Nhiệt đới, VAST. Đặc biệt cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Tp. HCM đã tài trợ cho chúng tôi kinh phí để thực hiện đề tài này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Trường và Nguyễn Trần Oánh, 1975. *Giáo trình hóa học bảo vệ thực vật*. NXB Nông thôn, pp 149-154.
2. Nguyễn Tiến Thắng, Vũ Văn Độ, Lê Thị Thanh Phượng và Bùi Văn Toàn, 2005. Biến động hàm lượng azadirachtin và nimbin trong lá neem (*Azadirachtin indica* A. juss) và hiệu quả xua đuổi, gây chết và biến dạng của dịch chiết nhân hạt neem đối với rầy nâu (*Nilaparvata lugens* Stal.). Trong: *Hội nghị Tổng kết nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên khu vực phía Nam*, Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp. Hồ Chí Minh, p. 49.
3. Anjali CH, Yamini Sharma, Amitava Mukherjee and Natarajan Chandrasekaran, 2012. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion - a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*, *Society of Chemical Industry*, 68, pp 158-163.
4. Danielsson I and Lindman B, 1981. The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces*, 3, pp 391-392.
5. Fahmi MJ, Suwito H, Susilo A, Joeniarti E, Jaswidi A M R, Indrasari N, 2017. Chitosan-based neem seed extract nanocapsules: a new approach on enhancing its effectiveness as an insecticide delivery agent, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52, pp 1129-1134
6. Lowery DT and Smirle MJ, 2000. Toxicity of insecticides to obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, larvae and adults exposed previously to neem seed oil. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95, pp 201- 207.
7. Peter Trumm and August Dorn, 1999. Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*, *Phytoparasitica*, 2000, 28, p 7.
8. Wilps H, Nasseh O and Krall S, 1993. The effects of various neem formulation on mortality rate and morphogenetic defects upon *Schistocera gregaria* (Forsk.) Larvae. In: *World Neem Conference*, India, pp. 221 – 236.

**Phản biện: TS. Trần Thị Hoàng Đông**