NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG DUNG MÔI EUTECTIC SÂU TỰ NHIÊN (NADES) CHIẾT XUẤT HOẠT CHẤT SPINOSAD TỪ XẠ KHUẨN *Saccharopolyspora spinosa* VÀ THỬ NGHIỆM HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ NHỆN ĐỎ NÂU HẠI CHÈ *Oligonychus coffeae* Nietner

Research on the application of natural deep eutectic solvent (NADES) to extract spinosad from *Saccharopolyspora spinosa* and laboratory testing of effectiveness to control the tea red spider mite *Oligonychus coffeae* Nietner

Đào Bách Khoa*, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Phạm Thu Huyền, Đào Hải Long, Nguyễn Anh Nam và Nguyễn Văn Liêm

Viện Bảo vệ thực vật
**Corresponding author: dbachkhoa@yahoo.com*

Ngày nhận bài: 12.6.2024 *Ngày chấp nhận: 16.7.2024*

Abstract

In this study, we initially developed a process for applying natural deep eutectic solvent (NADES) which is a mixture of organic acids, sugar and water to develop green solvent for extracting of spinosad from *Saccharopolyspora spinosa*. Using LGW (lactic acid: glucose: water, 1/1/10, w/w/w) solvent, the ration of sample and solvent was (20:1, v/v), under condition extraction (temperature 60°C, ultrasonic 60 KHz, rotary speed 70 rpm, time extraction 120 minutes), obtained the extracting liquid with concentration of spinosad about 3 gram per liter. The testing results of extracting liquid at concentration from 0.2 to 0.5 gram per liter on the tea red spinder mite (*Oligonychus coffeae* Nietner) had a controling effectiveness from 73.84% to 93.11% after four days treatment. This process can be applied to produce in the pilot and industrial-scale, registration and commercialization as biological insecticide.

Keywords: NADES solvent, extraction, spinosad, bacteria, brown red mite, biological insectide.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Spinosad là một hoạt chất tự nhiên do xạ khuẩn (*Saccharopolyspora spinosa*) tạo ra từ hai hoạt chất spinosyn A và spinosyn D và có thể gây độc cho côn trùng. Thuốc bảo vệ thực vật chứa hoạt chất spinosad được sử dụng để phòng trừ nhện đỏ, bọ trĩ, sâu đục lá, muỗi, kiến, ruồi và các loại khác (EPA, 2009). Cơ chế tác động là ảnh hưởng đến hệ thần kinh làm cho côn trùng co giật, mất kiểm soát dẫn đến chết khi ăn phải hoặc tiếp xúc với spinosad (EPA. 2009). Hoạt chất spinosad được phép sử dụng có giới hạn để phòng trừ sâu hại trên cây trồng sản xuất theo quy trình canh tác hữu cơ (OMRI, 2021). Hoạt chất spinosad được chiết xuất xạ khuẩn (*S. spinosa*) và thông thường sử dụng các dung môi có nguồn gốc hóa thạch (n-hexane, butanol, acetone, vv). Dung môi ion lỏng sâu tự nhiên (NaDES) là hỗn hợp các axit hữu cơ, đường, axit amin, nước, vv pha ở tỷ lệ khác nhau thay thế hiệu quả các các loại dung môi độc hại (Dai và cs., 2003). Nhện đỏ nâu (*Oligonychus coffeae* Nietner) là một trong những đối tượng dịch hại quan trọng trên cây chè. Chúng thường gây hại mạnh vào thời điểm nắng nóng và hạn hán vì vậy cây chè dễ bị tổn thương và có thể chết (Nhung và cs., 2017). Có 18 loại thuốc trừ sâu chứa hoạt chất spinosad được đăng ký và sử dụng ở Việt Nam (Đức và cs., 2016), tuy nhiên chưa có loại nào được đăng ký sử dụng phòng trừ nhện đỏ nâu hại chè. Vì vậy, rất cần thiết thực hiện nghiên cứu thử nghiệm sử dụng dung môi ion lỏng sâu tự nhiên (NaDES) chiết xuất hoạt chất spinosad từ xạ khuẩn và thử nghiệm hiệu lực phòng trừ nhện đỏ nâu hại chè làm tiền đề cho việc sản xuất quy mô công nghiệp và thương mại hóa sản phẩm trên thị trường phục vụ sản xuất nông nghiệp an toàn và hữu cơ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu thí nghiệm

- Chủng xạ khuẩn *Saccharopolyspora*

spinosa SP1 được thu thập và phân lập ở vùng sản xuất mía tỉnh Tây Ninh và lưu giữ tại Viện Bảo vệ thực vật.

- Môi trường dinh dưỡng (PDA, MT1, MT5)

- Hóa chất pha dung môi ion lỏng LGW: lactic acid, glucose, nước.

- Nguồn nhện đỏ nâu hại chè (*Oligonychus coffeae* Nietner) được thu thập từ các vườn chè ở xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nhân nuôi sinh khối xạ khuẩn Saccharopolyspora spinosa SP2

- Nhân giống gốc: Chủng xạ khuẩn *S. spinosa* SP1 được nhân trên môi trường PDA.

- Nhân giống cấp 1: Chủng xạ khuẩn *S. spinosa* SP1 đã nhân trong môi trường PDA lỏng được sử dụng để cấy chuyển sang môi trường nhân giống cấp 1 (lượng sử dụng 2%) trong bình tam giác 1 lít có chứa 0,2 lít môi trường nhân giống cấp 1 (môi trường MT1) để làm nguồn nhân giống cấp 2.

- Nhân giống cấp 2: Chủng xạ khuẩn *S. spinosa* SP1 nhân giống cấp 1 đạt tiêu chuẩn được sử dụng để cây chuyển sang môi trường nhân giống cấp 2 (lượng sử dụng 5%) trong bình tam giác 2 lít có chứa 0,5 lít môi trường nhân giống cấp 2 (môi trường MT5) để làm nguồn giống cho lên men.

- Lên men sinh khối: Chủng *S. spinosa* SP1 nhân giống cấp 2 đạt tiêu chuẩn được sử dụng để cây chuyển sang môi trường lên men (lượng sử dụng 5%) trong bình tam giác 5 lít có chứa 2 lít môi trường MT5 ở điều kiện nhiệt độ 28^{o}C, tốc lắc độ 200 rpm, hàng ngày kiểm tra khả năng phát triển và độ thuần của sản phẩm, sau 8 ngày ngừng nhân nuôi thu nhận sinh khối và dịch lên men.

2.2.2. Phương pháp sử dụng dung môi ion lỏng sâu tự nhiên chiết hoạt chất spinosad từ hỗn hợp sinh khối và dịch lên men

- Phương pháp chuẩn bị

Dung môi ion lỏng được thực hiện theo kết quả nghiên cứu của Nava-Ocampo và cs (2021), dung môi ion lỏng LGW (lactic axit, glucose, water), tỷ lệ pha (1:1:5, 1:1:10, 1:1:20, 1:1:50, 1:1:100, 1:1:200, v/v/v). Mẫu và dung môi được pha theo tỷ lệ 20:1, 10:1, 5:1 và 1:1, (v/v). Chế độ siêu âm (0, 40, 50, 60 KHz). Nhiệt độ chiết (nhiệt độ phòng, 50^{o}C, 70^{o}C và 90^{o}C). Tốc độ khuấy (30, 50, 70, 100 vòng/phút). Thời gian chiết (60, 120, 180, 240 phút).

- Tiến hành chiết

+ Điều kiện: Thực hiện trong phòng thí nghiệm (0,2-0,5 lít/mẻ), số lần lặp lại 03 lần.

+ Xác định dung môi LGW: Điều kiện chiết ban đầu tỷ lệ mẫu và dung môi (5:1, v/v), siêu âm (0 KHz), nhiệt độ phòng, tốc độ khuấy (30 vòng/phút), thời gian chiết 60 phút. Dung môi sử dụng được phối trộn hoạt chất ở tỷ lệ khác nhau. Xác định hàm lượng spinosad trong mẫu chiết để lựa chọn tỷ lệ hoạt chất pha LGW thích hợp.

+ Nhiệt độ chiết: Dung môi LGW đã được xác định, các điều kiện khác không thay đổi, nhiệt độ chiết thay đổi (nhiệt độ phòng, 50^{o}C, 70^{o}C và 90^{o}C), thu mẫu và xác định lượng spinosad lựa chọn nhiệt độ chiết thích hợp.

+ Tần số siêu âm: Dung môi LGW và nhiệt độ chiết đã được xác định, không thay đổi, tần số siêu âm thay đổi (0, 40, 50, 60 KHz), thu mẫu và xác định lượng spinosad lựa chọn tần số siêu âm chiết thích hợp.

+ Tốc độ khuấy: Dung môi LGW, tần số siêu âm và nhiệt độ đã được xác định, thời gian chiết 60 phút, tốc độ khuấy thay đổi (30, 50, 70, 100 vòng/phút), thu mẫu và xác định lượng spinosad lựa chọn tốc độ khuấy thích hợp.

+ Thời gian chiết: Dung môi LGW, tần số siêu, nhiệt độ và tốc độ khuấy đã được xác định, thời gian chiết 60, 120, 180, 240 phút, thu mẫu và xác định lượng spinosad lựa chọn thời gian chiết thích hợp.

+ Hoàn thiện quy trình chiết hoạt chất

2.2.3. Phương pháp định lượng hoạt chất spinosad trong sản phẩm

Xác định hàm lượng hoạt chất spinosad trong sản phẩm bằng thiết bị sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) tại phòng thí nghiệm ISO-17025 của Viện Bảo vệ thực vật.

2.2.4. Phương pháp hiệu lực sinh học của dịch chiết đối với nhện đỏ nâu hại chè (Oligonychus coffeae).

- Thuốc thử: Sản phẩm dịch chiết chứa hoạt chất spinosad pha theo nồng độ 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 g/lít

- Phương pháp thực hiện: Thí nghiệm trong phòng thực hiện theo phương pháp nhúng lá:

Nhúng lá thức ăn trong thời gian 5 giây vào dung dịch nước thuốc đã pha theo nồng độ chủ

đích đối với công thức thuốc thí nghiệm và nhúng lá vào nước cất đối với công thức đối chứng.

Lá sau khi nhúng thuốc được hong khô ở điều kiện trong phòng. Dùng bút lông mềm bắt 20 nhện trưởng thành từ nguồn nuôi chuyển lên bề mặt lá thí nghiệm. Đặt lá đã nhiễm nhện trong hộp petri có lót bông ẩm phía dưới.

Theo dõi số lượng nhện đỏ nâu còn sống sau khi thả nhện 1, 2, 3 và 4 ngày.

Tính toán số liệu: Hiệu lực của thuốc đối với nhện đỏ nâu hại chè được tính theo công thức Abbott (1925);

$$\text{Hiệu lực } (\%) = \left(\frac{C_a - T_a}{C_a}\right) x\ 100$$

Trong đó:

Ca: số nhện sống ở công thức đối chứng sau xử lý

Ta: số nhện sống ở công thức thí nghiệm sau xử lý

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xây dựng quy trình ứng dụng dung môi ion lỏng chiết hoạt chất spinosad từ xạ khuẩn

3.1.1. Xây dựng dung môi ion lỏng

Hỗn hợp sinh khối và dịch lên men chủng xạ khuẩn *S. spinosa* SP1 được sử dụng làm mẫu tách chiết hoạt chất spinosad bằng dung môi LGW theo tỷ lệ pha khác nhau, kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện dung môi LGW được phối trộn lactic axit, glucose và nước

TT	Dung môi ion lỏng LGW	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
1	L:G:W (1:1:5, w/w/w)	0,33^{c}
2	L:G:W (1:1:10, w/w/w)	0,32^{c}
3	L:G:W (1:1:20, w/w/w)	0,28^{b}
4	L:G:W (1:1:50, w/w/w)	0,27^{b}
5	L:G:W (1:1:100, w/w/w)	0,25^{b}
6	Acetone	0,31^{c}
7	Đối chứng (nước lọc)	0,20^{a}
CV (%)		*14,23*

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Kết quả kiểm tra hàm lượng hoạt chất spinosad trong sản phẩm có bổ sung dung môi ion lỏng LGW cao hơn so với đối chứng. Hàm lượng hoạt spinosad đạt mức cao nhất 0,33 g/lít khi cho dung môi LGC (1:1:5, v/v/v), tuy nhiên trong quá trình thực hiện cho thấy dịch chiết có độ nhớt cao vì vậy khó để tinh sạch. Kết quả cho thấy hàm lượng spinosad giữa sử dụng dung môi LGW (1:1:5, v/v/v) và LGW (1:1:10, v/v/v) để chiết không có sự khác biệt vì vậy sử dụng dung môi LGW (1:1:10, v/v/v) phù hợp.

3.1.2. Tỷ lệ pha mẫu và dung môi LGW

Sử dụng dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w) để chiết xuất hoạt chất spinosad từ hỗn hợp sinh khối và dịch lên men, ở điều kiện nhiệt độ phòng, với tỷ lệ mẫu và dung môi khác nhau, kết quả cho ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện tỷ lệ mẫu và dung môi khác nhau

TT	Tỷ lệ mẫu và dung môi LGW	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
1	Mẫu : LGW (5:1, v/v)	0,29^{c}
2	Mẫu : LGW (10:1, v/v)	0,27^{bc}
3	Mẫu : LGW (20:1, v/v)	0,24^{b}
4	Mẫu : LGW (50:1, v/v)	0,19^{a}
CV (%)		*18,03*

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Hàm lượng spinosad đạt mức cao nhất 0,29 g/lít ở tỷ lệ mẫu và dung môi (5:1, v/v) tuy nhiên xét về hiệu quả kinh tế và tinh sạch dịch chiết thì tỷ lệ mẫu và dung môi (10:1, v/v) và (20:1, v/v) phù hợp hơn, vì vậy lựa chọn tỷ lệ mẫu và dung môi (20:1, v/v) là phù hợp.

3.1.3. Điều kiện nhiệt độ chiết

Sử dụng dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), tỷ lệ mẫu và dung môi (20:1, v/v) và điều kiện nhiệt độ chiết khác nhau thì hàm lượng hoạt chất spinosad thu được cho kết quả ở bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện nhiệt độ chiết xuất khác nhau

Mẫu	Dung môi	Nhiệt độ (^oC) chiết	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
Hỗn hợp sinh khối và dịch lên men *S. spinosa* SP1	LGW	70	0,34^c
		60	0,33^c
		50	0,29^b
		nhiệt độ phòng (25-28)	0,22^a
CV (%)			*2,86*

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Nhiệt độ tăng và ổn định 50^{o}C hàm lượng hoạt chất tăng từ 0,22 g/lít lên 0,29 g/lít, tuy nhiên khi nhiệt độ tăng trên từ 50^{o}C lên 60^{o}C hàm lượng hoạt chất có thay đổi nhưng đến mức trên 60^{o}C lên 70^{o}C không có sự thay đổi nhiều vì vậy lựa chọn điều kiện phù hợp 60^{o}C.

3.1.4. Tần số siêu âm

Sử dụng dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), tỷ lệ mẫu và dung môi (20:1, v/v), nhiệt độ 60^{o}C và điều kiện tần số siêu âm (0, 40, 50, 60 KHz) cho kết quả ở bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện tần số siêu âm chiết xuất khác nhau

Mẫu	Dung môi	Tần số siêu âm (KHz) chiết	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
Hỗn hợp sinh khối và dịch lên men *S. spinosa* SP1	LGW	60	2,21^d
		50	1,82^c
		40	0,78^b
		0	0,34^a
CV (%)			4,96

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Kết quả bảng 4 cho thấy ở điều kiện cùng một nền công thức tách chiết thì tần số siêu âm càng cao khả năng tách chiết càng cao. Khi tần số 60 KHz hàm lượng hoạt chất spinosad, tương ứng 2,21 g/lít.

3.1.5. Tốc độ khuấy

Sử dụng dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), tỷ lệ mẫu và dung môi (20:1, v/v), nhiệt độ 60^{o}C, tần số siêu âm 60 KHz, tốc độ khuấy khác nhau cho kết quả ở bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện tốc độ khuấy khác nhau

Mẫu	Dung môi	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
Hỗn hợp sinh khối và dịch lên mên *S. spinosa* SP1	LGW	70	2,46^{c}
		50	2,38^{bc}
		30	2,31^{b}
		0	2,18^{a}
CV (%)			8,79

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Ở điều kiện chiết có sự hỗ trợ của khuấy hàm lượng hoạt chất spinosad tăng lên so với đối chứng tương ứng 2,18 lên 2,31 g/lít, khi tốc độ khuấy 70 vòng/phút cho hàm lượng hoạt chất cao nhất tương ứng 2,46 g/lít. Trong thí nghiệm này tốc độ cao nhất 70 vòng/phút để cho phù hợp với thiết bị chiết ở quy mô công nghiệp.

3.1.6. Thời gian tách chiết

Sử dụng dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), tỷ lệ mẫu và dung môi (20:1, v/v), nhiệt độ chiết 60^{o}C, tần số siêu âm 60 KHz, tốc độ khuấy 70 vòng/phút, ở điều kiện thời gian khác nhau cho kết quả ở bảng 6.

Bảng 6. Xác định hàm lượng hoạt chất spinosad thu được ở điều kiện thời gian chiết khác nhau

Mẫu	Dung môi	Thời gian (phút)	Hàm lượng hoạt chất spinosad (g/lít)
Hỗn hợp sinh khối và dịch lên mên *S. spinosa* SP1	LGW	240	3,12^{b}
		180	3,07^{b}
		120	3,01^{b}
		60	2,41^{a}
CV (%)			1,17

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05)*

Ở điều kiện thời gian 60 phút cho hàm lượng hoạt chất spinosad thu được 2,41 g/lít, khi thời gian tăng lên 120 phút hàm lượng hoạt chất tăng 3,01 g/lít, tuy nhiên khi thời gian tăng lên 180 phút thì hàm lượng hoạt chất tăng tuy nhiên không có sự khác biệt vì vậy thời gian chiết phù hợp 120 phút.

3.1.7. Hoàn thiện quy trình ứng dụng dung môi ion lỏng chiết xuất dịch chiết chứa hoạt chất spinosad từ xạ khuẩn Saccharopolyspora spinosa SP1

Quy trình chiết xuất dịch chiết chứa hoạt chất spinosad từ hỗn hợp sinh khối và men nhân nuôi chủng xạ khuẩn *S. spinosa* SP1 bằng dung môi ion lỏng LGW được thực hiện theo các bước (1) nhân nuôi sinh khối xạ khuẩn, (2) phối trộn dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), (3) phối trộn mẫu và dung môi (20:1, v/v), (4) điều kiện chiết (t^{o} = 60^{o}C, tần số siêu âm 60 KHz, tốc độ khuấy 70 vòng/phút, thời gian chiết 120 phút), (5) Tinh sạch dịch chiết, (6) thu hồi dịch chiết.

3.2 Thử nghiệm hiệu lực dịch chiết đối với nhện đỏ nâu hại chè (*Oligonychus coffeae* Nietner)

Thử nghiệm hiệu lực sinh học của dịch chiết chứa hoạt chất spinosad đối với nhện đỏ nâu hại chè (*O. coffeae* Nietner), kết quả thu được ở bảng 7.

Bảng 7. Hiệu lực sản phẩm dịch chiết chứa hoạt chất spinosad đối với nhện đỏ nâu hại chè

Công thức	Nồng độ hoạt chất spinosad (g/lít)	Hiệu lực (%)			
		1 NSXL	2 NSXL	3 NSXL	4 NSXL
Dịch chiết chứa hoạt chất spinosad	0,10	22,82[a]	30,92[a]	35,01[a]	38,04[a]
	0,20	41,74[ab]	64,09[b]	71,94[b]	73,84[b]
	0,50	78,44[b]	87,62[bc]	90,41[c]	93,11[c]
	1,00	86,04[b]	91,22[c]	95,30[c]	100
	2,00	97,54[c]	100	100	100
	5,00	99,98[c]	100	100	100
Đối chứng	Nhúng nước lã	-	-	-	-

** Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình. Các giá trị trên cùng một cột mang ký tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p=0,05), NSXL: ngày sau xử lý*

Dịch chiết chứa hoạt chất spinosad ở nồng độ pha hoạt chất 0,20 – 0,5 g/l có hiệu quả trừ nhện đỏ nâu hại chè, đạt hiệu lực cao nhất sau 4 ngàysau xử lý tương ứng 73,84% và 93,11%, các kết quả làm cơ sở cho việc xác định hàm lượng hoạt chất spinosad trong sản phẩm phát triển về sau.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Xây dựng được quy trình chiết xuất dịch chiết chứa hoạt chất spinosad từ xạ khuẩn *Saccharopolyspora spinosa* SP1 bao gồm các bước nhân nuôi sinh khối xạ khuẩn, phối trộn dung môi ion lỏng LGW (1:1:10, w/w/w), phối trộn mẫu và dung môi (20:1, v/v), điều kiện chiết (t^o=60^{o}C, tần số siêu âm 60 KHz, tốc độ khuấy 70 vòng/phút, thời gian chiết 120 phút), tinh sạch dịch chiết, thu hồi dịch chiết và kiểm tra hàm lượng hoạt chất spinosad đạt khoảng 3g/l.

Thử nghiệm hiệu lực trong phòng thí nghiệm dịch chiết đối với nhện đỏ nâu hại chè (*Oligonychus coffeae*) cho thấy ở liều lượng pha 0, 2 g/lít cho hiệu lực 73,84% và 0,5 g/lít đạt hiệu lực 93,11% sau 4 ngày xử lý.

4.2 Đề nghị

Quy trình và sản phẩm dịch chiết hoạt chất spinosad cần phải thực hiện các bước tiếp theo để sản xuất và thương mại hóa trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đức, N.M., Nhung, N.T., Vân, N.T.H., Hoài, N.T.T., Huyền, N.P.T., Huy, N.B., Trịnh, L.V., Me, N.T. 2016. Nghiên cứu tính kháng thuốc của nhện đỏ nâu *Oligonychus coffeae* Nietner hại chè tịa Thái Nguyên năm 2014-2016. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* - Số 4/2016.

2. Nhung, N.T., Đức, N.M., Vân, N.T.H., Hoài, N.T.T., Huyền, N.P.T., Huy, N.B., Trịnh, L.V., Me, N.T. 2017. Quy trình quản lý tính kháng thuốc bảo vệ thực vật của nhện đỏ (*Panonychus citri* McGregor) hại cây ăn quả có múi. *Tạp chí Bảo vệ thực vật* - Số 2/2017.

3. Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, J.h. 2013. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in Carthamus tinctorius L. Anal Chem 85(13):6272-8.

4. EPA (2009). EFED Risk Assessment for the Proposed IR-4 Use of the Spinosad product Entrust® on Pomegranate and Dates, PC Code: 110003 DP Barcodes: 358851 and 358852.

5. https://www.omri.org/omri-search?page= 1&query = spinosad&exactMatch=false

Phản biện: **PGS.TS. Nguyễn Văn Viên**