

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 65, SỐ 5, THÁNG 5 NĂM 2023
VOLUME 65, NUMBER 5, MAY 2023

TẠP CHÍ & KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Đoàn Đức Khải - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nham - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Doan Duc Khai - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây bệnh thận đa nang

Nguyễn Thị Việt Hà, Nguyễn Văn Phong, Trần Văn Khoa, Triệu Tiến Sang*

Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/10/2022; ngày chuyển phản biện 25/10/2022; ngày nhận phản biện 15/11/2022; ngày chấp nhận đăng 18/11/2022

Tóm tắt:

Bệnh thận đa nang (Polycystic kidney disease - PKD) là một rối loạn di truyền, đặc trưng bởi sự hình thành và phát triển của nhiều u nang trong thận, kèm theo tăng dần kích thước của cả 2 thận gây suy giảm chức năng và tiến triển dẫn đến suy thận. PKD di truyền gen trội trên nhiễm sắc thể (NST) thường (Autosomal dominant polycystic kidney disease - ADPKD) là rối loạn di truyền phổ biến nhất với tỷ lệ ước tính khoảng 1/500-1/1000 tại các nước phương Tây [1], gây ra do đột biến gen *PKD1* (MIM#601313) và *PKD2* (MIM#173910), trong đó 85% nguyên nhân là do đột biến gen *PKD1* [2]. Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán đột biến gen *PKD1* còn hạn chế và gặp khó khăn ngay từ khâu khuếch đại vùng gen đột biến bởi kích thước gen *PKD1* lớn, có nhiều vị trí đột biến gen và có đến 6 vùng cấu trúc gen giả có độ tương đồng cao (97,7%) với trình tự từ 5'UTR cho đến exon 32 [3, 4]. Do đó, việc xây dựng phương pháp chẩn đoán mới có thể khắc phục những hạn chế của phương pháp truyền thống, với độ chính xác cao và ứng dụng rộng rãi cho nhiều loại đột biến là cần thiết. Mục tiêu nghiên cứu: Hoàn thiện kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 11 đối tượng là thành viên của một gia đình có người mắc PKD mang gen đột biến *PKD1*. Tiến hành thiết kế mỗi khuếch đại các trình tự lặp lại ngắn (STR) liên kết gen *PKD1* và phân tích di truyền liên kết đối với các thành viên khác trong gia đình người bệnh. Kết quả của phương pháp này được so sánh, đối chiếu với kết quả của phương pháp Touchdown-PCR và ARMS-PCR, sau đó đưa ra kỹ thuật hoàn thiện. Kết quả: Nghiên cứu đã hoàn thiện được kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD.

Từ khóa: các trình tự lặp lại ngắn, gen *PKD1*, phân tích di truyền liên kết.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

PKD là một rối loạn di truyền, bệnh đặc trưng bởi sự hình thành và phát triển của nhiều u nang trong thận, kèm theo tăng dần kích thước của cả 2 thận gây suy giảm chức năng và tiến triển dẫn đến suy thận. Có 2 dạng khiếm khuyết di truyền khác nhau gây ra PKD đã được ghi nhận bao gồm: ADPKD - chiếm hầu hết các trường hợp PKD (khoảng 90% các trường hợp) và PKD di truyền lặn trên NST thường (ARPKD) - một dạng di truyền hiếm gặp, tỷ lệ mắc khoảng 1/10.000.

ADPKD là rối loạn di truyền phổ biến nhất với tỷ lệ ước tính khoảng 1/500-1/1000 tại các nước phương Tây [1], gây ra do đột biến gen *PKD1* và *PKD2* [2], trong đó 85% nguyên nhân là do đột biến gen *PKD1*. Gen *PKD1* có kích thước 47,2 kb [3] gồm 46 exon, nằm trên NST số 16 (16p13.3) và chịu trách nhiệm mã hóa tổng hợp protein xuyên màng polycystin-1 (PC1). Bất kỳ đột biến nào xảy ra ở gen *PKD1* dẫn đến sự vắng mặt của protein PC1 sẽ gây nhiễu loạn nhiều con đường tín hiệu tế bào [6], do đó dẫn đến sự bất thường trong vận chuyển ion, tính phân cực, sự sinh sản và chết theo chu trình ở các tế bào biểu mô thận, cuối cùng hình thành các u nang tại thận. U nang ở những người bị PKD làm tăng kích thước thận và mất dần các cấu trúc bình thường, gây giảm chức năng thận và tiến triển thành suy thận [7].

Cho đến nay, việc chẩn đoán và điều trị PKD di truyền do đột biến gen *PKD1* vẫn còn nhiều hạn chế. Các phương pháp chẩn đoán phân tử bị giới hạn và khó khăn ngay từ khâu khuếch đại vùng gen đột biến bởi kích thước gen *PKD1* lớn, có nhiều vị trí đột biến trên toàn bộ gen và có đến 6 vùng cấu trúc gen giả trên NST 16 có độ tương đồng cao (97,7%) với trình tự từ 5'UTR cho đến exon 32 [3, 4]. Bên cạnh đó, các biện pháp điều trị chính vẫn là kiểm soát các biến chứng và điều trị thay thế thận, điều này sẽ để lại những gánh nặng kinh tế không nhỏ cho gia đình người bệnh và xã hội.

Phân tích di truyền liên kết sử dụng các STR là phương pháp chẩn đoán gián tiếp, có thể giúp phát hiện người mang gen đột biến thông qua khảo sát sự di truyền của các STR liên kết. Chúng là những trình tự có kích thước nhỏ dưới 1000 bp tạo nên bởi các trình tự lõi cấu tạo từ khoảng 2 đến 6 bp với số lần lặp khác nhau và mang tính đặc trưng cá thể. Phương pháp này thể hiện ưu điểm khi có thể áp dụng trên nhiều đột biến khác nhau của *PKD1* với giá thành rẻ, kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện. Với mong muốn có thể chẩn đoán bệnh sớm cho những cá nhân mang gen bệnh nhưng chưa có triệu chứng, giúp họ chuẩn bị tốt tâm lý cũng như có các biện pháp giúp trì hoãn suy thận giai đoạn cuối, đồng thời đưa ra phương pháp tiếp cận mới với tính ứng dụng rộng rãi và có thể khắc phục được những hạn chế trong chẩn đoán đột biến *PKD1*,

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

Genetic analysis links the diagnosis of carriers of the *PKD1* mutation gene that causes polycystic kidney disease

Thi Viet Ha Nguyen, Van Phong Nguyen,
Van Khoa Tran, Tien Sang Trieu*

Department of Biology and Genetics, Vietnam Military Medical University,
160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 20 October 2022; revised 15 November 2022; accepted 18 November 2022

Abstract:

Polycystic kidney disease (PKD) is an inherited disorder characterised by the formation and growth of multiple cysts in the kidney, accompanied by a gradual increase in the size of both kidneys leading to impaired kidney function and renal failure. Autosomal dominant PKD is the most common genetic disorder with an estimated prevalence of 1/500-1/1000 in Western countries [1], caused by mutations in the *PKD1* (MIM#601313) and *PKD2* (MIM#173910), of which 85% of cases are caused by mutations in the *PKD1* gene [2]. Because of the *PKD1* gene's enormous size, numerous mutations, and up to 6 structural pseudogenes, which share a high degree of similarity sequences (97.7%) from the 5'UTR to exon 32 [3, 4], the methods for identifying *PKD1* mutations are currently restricted and challenging from amplifying the mutant gene area. Therefore, it is essential to create a novel diagnostic technique with high accuracy and broad applicability for various mutation types that may circumvent the shortcomings of the conventional method. Objective: To develop a genetic linkage analysis technique for detecting the person with *PKD1* mutation causing PKD. Materials and methods: 11 members were from a family with *PKD1* gene mutations causing PKD. Designed *PKD1* gene-linked STRs primers and conducted genetic linkage analysis with the family members. After comparing the outcomes of the technique with those of the Touchdown-PCR and ARMS-PCR methods, the complete technique is subsequently given. Results: Successfully developed the genetic linkage analysis technique for detecting the person with *PKD1* mutation causing PKD.

Keywords: genetic linkage analysis, *PKD1* gene, short tandem repeats (STR).

Classification number: 3.1

nguyên cứu của chúng tôi được tiến hành với mục tiêu hoàn thiện kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là mẫu máu của các thành viên trong một gia đình có tiền sử PKD di truyền bao gồm: II-5, II-6, II-11, III-1, III-2, III-3, III-4, III-5, III-8, III-10 và III-11. Đối tượng III-5 đã được siêu âm thận và phát hiện thận hai bên có nhiều nang. Mẫu DNA của III-5 được đem giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để khảo sát đột biến của nhóm gen gây PKD di truyền và xác định được III-5 mang đột biến *PKD1* c.9859-9861delCTC. Ngoài ra, các đối tượng II-5 và II-11 cũng đã được chẩn đoán xác định mắc PKD (dựa vào tuổi và hình ảnh siêu âm [8]).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kỹ thuật tách chiết và bảo quản DNA từ mẫu máu ngoại vi: Tiến hành tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit QIAamp DNA Blood mini-Kit (Đức) cho các mẫu máu ngoại vi thu thập từ các đối tượng. Quy trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và nồng độ DNA sau tách chiết được đo bằng máy SpectraMax QuickDrop. DNA được pha loãng với nước deion để đạt nồng độ khoảng 20 ng/μl, độ tinh sạch A260/280 1,8-2,2, sau đó được bảo quản ở -20°C.

Phân tích di truyền liên kết:

Phản ứng PCR khuếch đại các STR: Sau khi lựa chọn các chỉ thị STR liên kết gen *PKD1* dùng cho phân tích di truyền liên kết, nhóm nghiên cứu tự thiết kế các cặp mồi bằng phần mềm Primer-BLAST để khuếch đại các STR. Nhiệt độ nóng chảy của các mồi trong khoảng 51,7-59,8°C, chúng khuếch đại cho các STR SM7, 16CA2.5, CW2 và D16S521, với kích thước mồi chỉ thị đa dạng tùy thuộc alen, lần lượt khoảng 90, 140, 120 và 170 bp (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mồi khuếch đại đoạn STR.

STR	Mồi	Trình tự
SM7	D16S283f	5'-/FAM/-ACATATGTAGTCTTCTGCAGG-3'
	D16S283r	5'-ACAAAGAGTGAATCTCTGACAG-3'
16CA2.5	D16S291f	5'-/FAM/-AAGGCTGGCAGAGGAGGTG-3'
	D16S291r	5'-CAGTTGTGTTTCTTAATCGGCG-3'
CW2	CW2f*	5'-GTCTTTCTAGGAATGAAATCAT-3'
	CW2r	5'-ATTGCAGCAAGACTCCATCT-3'
D16S521	D16S521f*	5'-GAGCGAGACTCCGTCTAAA-3'
	D16S521r	5'-CAGCAGCCTCAGGGTT-3'

*: trình tự gắn mồi huỳnh quang M13.

Mỗi ống phản ứng PCR để khuếch đại đoạn STR riêng có thể tích 12,5 μl, trong đó chứa 6,25 μl GoTaq Green Mastermix 2X, 2,75 μl nước, 0,5 μl mồi xuôi và ngược, 2,5 μl DNA mẫu. Thêm 0,5 μl mồi M13 vào riêng các ống phản ứng khuếch đại STR sử dụng mồi gắn M13.

Dựa vào nhiệt độ nóng chảy của các cặp mồi, phản ứng PCR được thực hiện với dải gradient nhiệt độ gần mỗi 52-62°C và dựa vào kết quả phản ứng này, nghiên cứu lựa chọn được 56,1°C làm nhiệt độ gần mỗi tối ưu nhất. Chu trình nhiệt khuếch đại các đoạn STR như sau: 95°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 94°C - 30 giây, 56,1°C - 30 giây, 72°C - 45 giây và 72°C - 10 phút. Sau khi chạy phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 3%, kiểm tra trước khi tiến hành điện di mao quản (bảng 2).

Bảng 2. Thành phần phản ứng biến tính DNA trước khi điện di mao quản.

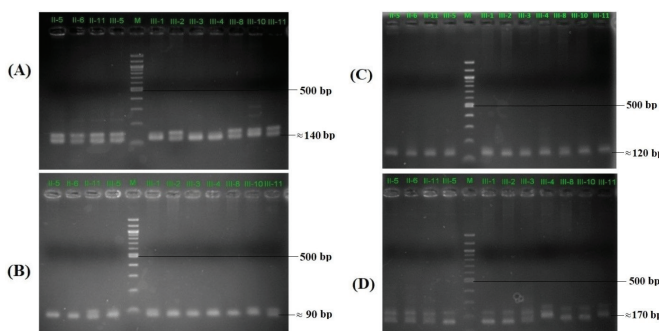
Thành phần	Thể tích (μl)
Hi-di	24,5
WEN ILS 500	0,5
DNA mẫu	1,0
Tổng	26,0

Điện di mao quản và phân tích kết quả: Sản phẩm PCR được trộn cùng dung dịch chứa Hi-di và WEN ILS 500, sau đó đem biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút. Tiến hành điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer. Phần mềm GeneMapper ID 6.0 được sử dụng để phân tích kết quả.

3. Kết quả

3.1. Phản ứng khuếch đại các đoạn marker STR

Sau phản ứng PCR khuếch đại marker STR, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 3%. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di cho thấy đã khuếch đại thành công các đoạn marker STR có kích thước như đã thiết kế trên tất cả các mẫu của các thành viên trong gia đình tham gia nghiên cứu.

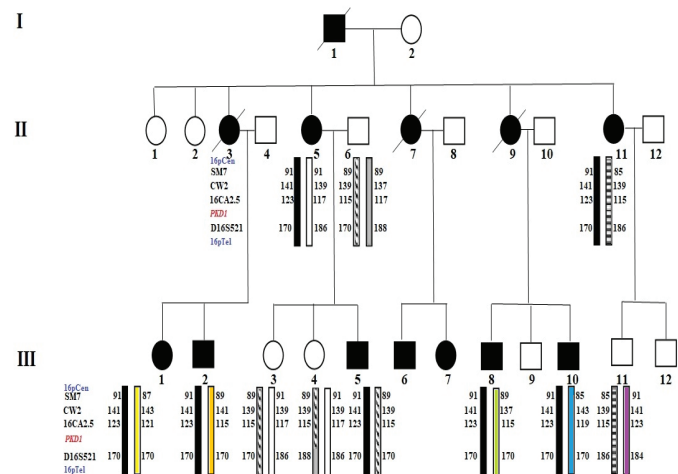


Hình 1. Kết quả khuếch đại các STR 16CA2.5 (A), SM7 (B), CW2 (C) và D16S521 (D). M: marker 100 bp.

Kết quả hình 1 cho thấy, hình ảnh băng điện di các mẫu sáng, gọn và rõ nét. Một số mẫu xuất hiện hình ảnh 2 băng trên điện di thể hiện cho 2 alen của STR với kích thước khác nhau có thể phân biệt trên điện di gel agarose 3%. Sản phẩm sau PCR này sẽ được biến tính và chạy điện di mao quản trên máy SeqStudio Genetic Analyzer.

3.2. Kết quả phân tích di truyền liên kết

Qua kết quả điện di mao quản, nhóm nghiên cứu phân tích trên trường hợp 2 mẹ con II-5, III-5 và thành viên II-11 đã được chẩn đoán mắc PKD để suy luận ra các alen liên kết với đột biến gây bệnh. Trên từng locus SM7, 16CA2.5, CW2 và D16S521, các alen liên kết với đột biến gen gây bệnh của II-5, II-11 và III-5 phải trùng nhau, do vậy có thể suy luận các alen liên kết với đột biến gây bệnh là: alen 124 bp của locus 16CA2.5; alen 91 bp của locus SM7; alen 141 bp của locus CW2 và alen 170 bp của locus D16S521. Căn cứ vào những dữ kiện này, nhóm nghiên cứu đã xác định được kết quả như ở hình 2.



Hình 2. Kết quả phân tích di truyền liên kết.

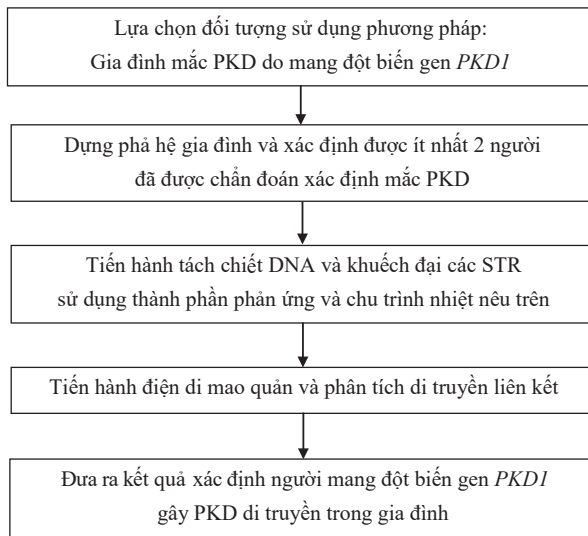
Thông qua phân tích di truyền liên kết, nhóm nghiên cứu kết luận: II-5, II-11, III-1, III-2, III-5, III-8, III-10 là người mang đột biến gây PKD; II-6, III-3, III-4, III-11 là những người khỏe mạnh, không mang gen bệnh.

Khai thác thông tin gia đình và bệnh sử từng cá nhân kết hợp theo kết quả chẩn đoán đột biến *PKD1* c.9859-9861delCTC sử dụng phương pháp Touchdown-PCR và ARMS-PCR (phương pháp chẩn đoán đột biến trực tiếp) do Nguyễn Thị Việt Hà và cs (2020) [9] đã nghiên cứu và công bố thì II-5, II-11, III-1, III-2, III-5, III-8 và III-10 là người mang đột biến gây PKD; II-6, III-3, III-4 và III-11 là những người khỏe mạnh, không mang gen bệnh.

Như vậy, kết quả chẩn đoán đột biến *PKD1* c.9859-9861delCTC bằng phương pháp Touchdown-PCR, ARMS-PCR và phân tích di truyền liên kết là trùng khớp với nhau. Do đó, kết quả của phương pháp phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD di truyền bằng phân tích di truyền liên kết mà nhóm nghiên cứu đã thiết kế là hoàn toàn chính xác và đáng tin cậy.

3.3. Kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD

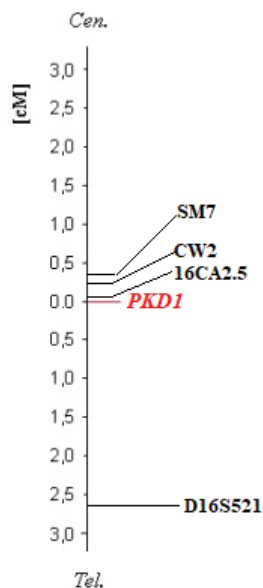
Dựa trên kết quả có được, nhóm nghiên cứu đưa ra sơ đồ kỹ thuật đã hoàn thiện như ở hình 3.



Hình 3. Sơ đồ kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD.

4. Bàn luận

Việc lựa chọn các chỉ thị phân tử STR có ý nghĩa quan trọng, quyết định việc phân tích di truyền liên kết có được thực hiện thành công hay không. Do vậy, việc xác định người mang đột biến gen *PKD1* gây PKD di truyền bằng phương pháp phân tích di truyền liên kết đã được nhóm nghiên cứu tiến hành trên cơ sở lựa chọn chỉ thị STR một cách kỹ lưỡng. Các chỉ thị STR đã chọn nằm trong phạm vi dưới 3 Mbps với gen *PKD1* (vị trí các chỉ thị so với gen khảo sát được minh họa ở hình 4), điều này làm giảm khả năng trao đổi chéo của chúng trong quá trình giảm phân ở các tế bào mầm, do vậy, các chỉ thị STR gần như hoàn toàn di truyền cùng với gen



Hình 4. Bản đồ vị trí các marker STR xung quanh gen *PKD1* (16p13.3). 1 cM = 1 Mbps.

mà nhóm nghiên cứu khảo sát. Bên cạnh đó, các chỉ thị STR cần đảm bảo chỉ số dị hợp tử và chỉ số đa hình di truyền cao ($HET > 0,7$, $PIC > 0,59$) [10], điều này có ý nghĩa trong việc tạo ra tính đặc trưng của từng cá thể, giúp phân biệt được các alen khác nhau, nhờ đó phân tích di truyền liên kết được thực hiện dễ dàng hơn.

Tại Việt Nam, chưa có một thống kê và tính toán nào đưa ra số liệu về chỉ số dị hợp tử cũng như chỉ số đa hình di truyền của các STR SM7, 16CA2.5, CW2 và D16S521. Do đó, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn STR dựa trên các thông tin di truyền của các quần thể có hệ gen gần gũi với người Kinh là người Thái và Hán (dựa trên cơ sở dữ liệu kết quả nghiên cứu hệ gen người Việt: người Kinh và Thái có hệ gen tương đồng cao và quan hệ tiến hóa gần gũi, ngoài ra, có sự giao thoa và dịch chuyển gen từ các quần thể người Hán miền Nam [11]). Một nghiên cứu thực hiện trên 104 người Hán đưa ra kết quả 16CA2.5 và SM7 có 10 và 11 alen với chỉ số đa hình di truyền lần lượt là 68,4 và 77,4%. Nghiên cứu cũng kết luận rằng, 16CA2.5 và SM7 là các chỉ thị STR có tính đa hình cao và có thể sử dụng trong phân tích di truyền liên kết [12]. P. Plurksathaporn và cs (2015) [13] nghiên cứu trên 100 người Thái đã đưa ra chỉ số đa hình của SM7 là 68% với 8 loại alen; CW2 là 78% với 8 loại alen và D16S521 là 59% với 7 loại alen. Như vậy, việc lựa chọn các chỉ thị STR 16CA2.5, SM7, CW2 và D16S521 là phù hợp, đảm bảo cơ sở khoa học.

Sau khi phân tích kết quả, nhận thấy trong các locus STR đã được lựa chọn ở trên đều liên kết hoàn toàn với gen *PKD1*, ngoại trừ marker D16S521. Trong quá trình giám phân của người cha II-6 không mang gen bệnh, trên locus D16S521 của cặp NST số 16 tương đồng đã xảy ra hiện tượng trao đổi chéo. Điều này thể hiện ở trường hợp người con không mang gen bệnh III-4. Theo lý thuyết, trong trường hợp liên kết gen hoàn toàn, III-4 sẽ mang một alen 170 bp nguồn gốc từ bố tại locus D16S521, song thực tế, III-4 lại mang alen 188 bp. Rõ ràng là khoảng cách D16S521 vẫn đảm bảo trong phạm vi dưới 3 Mbps (khoảng 2,7 Mbps) so với gen *PKD1* nhưng vẫn xảy ra hiện tượng trao đổi chéo. Do vậy, để đảm bảo tính chính xác, nhóm nghiên cứu kết luận chỉ nên sử dụng các STR SM7, 16CA2.5 và CW2 trong phân tích di truyền liên kết xác định người mang gen đột biến *PKD1* gây PKD.

Nhìn chung, phương pháp chẩn đoán đột biến truyền thống như giải trình tự Sanger sẽ gặp hạn chế và khó khăn với gen *PKD1* do có nhiều loại đột biến gen khác nhau, đồng thời có đến 6 vùng cấu trúc gen giả có độ tương đồng cao (97,7%) gây khó khăn trong khuếch đại đoạn gen chứa đột biến. Mặt khác, giải trình tự gen thế hệ mới lại có giá thành cao, gây gánh nặng kinh tế cho gia đình người bệnh, đặc biệt là những gia đình đông thành viên. Trong khi đó, các phương pháp chẩn đoán khác lại phụ thuộc vào đặc điểm của từng loại đột biến và không thể ứng dụng rộng rãi. Do vậy, việc sử dụng phương

pháp phân tích di truyền liên kết đã mang lại nhiều ưu điểm hơn khi có thể xác định người mang gen bệnh đột biến một cách chính xác và dễ dàng hơn, áp dụng trên nhiều loại đột biến hơn, đồng thời tiết kiệm thời gian lẫn chi phí thực hiện cho gia đình người bệnh.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thiện kỹ thuật phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến PKD1 gây PKD sử dụng 4 STR: SM7, 16CA2.5, CW2 và D16S521.

Đề xuất nghiên cứu ứng dụng thêm các STR khác có độ dị hợp tử và chỉ số đa hình cao trên quần thể người Việt Nam trong phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến PKD1 gây PKD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.E. Torres, P.C. Harris, Y. Pirson (2007), "Autosomal dominant polycystic kidney disease", *The Lancet*, **369**(9569), pp.1287-1301, DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60601-1.
- [2] R. Magistroni, N. He, K. Wang, et al. (2003), "Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease", *Journal of The American Society of Nephrology*, **14**(5), pp.1164-1174, DOI: 10.1097/01.ASN.0000061774.90975.25.
- [3] B.J. Loftus, U.J. Kim, V.P. Sneddon, et al. (1999), "Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q", *Genomics*, **60**(3), pp.295-308, DOI: 10.1006/geno.1999.5927.
- [4] O. Symmons, A. Váradí, T. Arányi (2008), "How segmental duplications shape our genome: Recent evolution of ABCC6 and PKD1 Mendelian disease genes", *Molecular Biology and Evolution*, **25**(12), pp.2601-2613, DOI: 10.1093/molbev/msn202.
- [5] H.H. Kiem (2010), *Hereditary Polycystic Kidney Disease*, *Clinical Nephrology*, Medical Publishing House one member Company Limited, pp.523-545 (in Vietnamese).
- [6] G. Liu, A.Y. Tan, A. Michael, et al. (2014), "Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using next-generation sequencing", *The Journal of Molecular Diagnostics*, **16**(2), pp.216-228, DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.10.005.
- [7] M.Y. Chang, H.M. Chen, C.C. Jenq, et al. (2013), "Novel PKD1 and PKD2 mutations in Taiwanese patients with autosomal dominant polycystic kidney disease", *Journal of Human Genetics*, **58**(11), pp.720-727, DOI: 10.1038/jhg.2013.91.
- [8] A. Dupuis, Y. Pei, J. Obaji, et al. (2009), "Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD", *Journal of The American Society of Nephrology*, **20**(1), pp.205-212, DOI: 10.1681/ASN.2008050507.
- [9] T.T.N. Nguyen, V.T. Tran, P.C. Dong, et al. (2020), "Research on diagnosis before embryo transfer of PKD1 gene causing dominantly inherited polycystic kidney disease", *Vietnam Journal of Internal Medicine*, **18**, pp.70-76 (in Vietnamese)
- [10] J. Ott (1992), "Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping", *American Journal of Human Genetics*, **51**(2), pp.283-290.
- [11] V.S. Le, K.T. Tran, H.T.P. Bui, et al. (2019), "A Vietnamese human genetic variation database", *Human Mutation*, **40**(10), pp.1664-1675, DOI: 10.1002/humu.23835.
- [12] S. Li, S. Zhu, H. Wang (1998), "The polymorphism of two microsatellites closely linked to the locus for polycystic kidney disease 1 in Chinese population", *Chinese Journal of Medical Genetics*, **15**(6), pp.360-363.
- [13] P. Plurksathaporn, D. Bunditworapoom, E. Rootumnon, et al. (2015), "Multiplex - STR panels comprehensive for a timely molecular diagnosis of ADPKD", *Genomics and Genetics*, **8**(2), pp.143-149, DOI: 10.14456/tjg.2015.15.

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị áp xe gan ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi đồng 2

Hà Huy Khôi^{1*}, Hà Văn Thiệu^{1,2*}, Trần Thanh Trí²

¹Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Nhi đồng 2, Số 14 đường Lý Tự Trọng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/2/2023; ngày chuyển phản biện 17/2/2023; ngày nhận phản biện 13/3/2023; ngày chấp nhận đăng 17/3/2023

Tóm tắt:

Áp xe gan là một trong những nguyên nhân gây bệnh phổ biến ở trẻ em. Việt Nam nằm trong vùng có tỷ lệ mắc sán lá gan lớn cao trên thế giới. Áp xe gan do sán lá gan lớn đang có chiều hướng gia tăng trong những năm gần đây. Mục tiêu nghiên cứu: Xác định một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị áp xe gan ở trẻ em. Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu mô tả hồi cứu. Thời gian nghiên cứu từ tháng 1/2016 đến tháng 1/2021. Tất cả bệnh nhân chẩn đoán áp xe gan được đưa vào mẫu nghiên cứu. Đánh giá khỏi bệnh: Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, đặc biệt là tổn thương gan trên chẩn đoán hình ảnh thuyên giảm. Kết quả: Có 60 trường hợp áp xe gan. Bệnh nhân >5 tuổi chiếm 70,0%. Áp xe gan do ký sinh trùng chiếm 53,3%, vi trùng 5,1%, amip 5,0% và chưa rõ tác nhân 36,6%. Đường kính ổ áp xe gan <5 cm chiếm tỷ lệ cao (70%). Đau hạ sườn phải, gan to, sốt và nôn có tỷ lệ cao trong áp xe gan, lần lượt là 95,0, 75,0, 25,0 và 25,0%. Các giá trị bạch cầu ái toan, C-reactive protein (CRP) và bạch cầu tăng trong áp xe gan chiếm tỷ lệ cao, lần lượt là 68,3, 65,0 và 65,0%. Tỷ lệ thuyên giảm, khỏi bệnh là 95,0%. Kết luận: Áp xe gan chưa rõ tác nhân còn chiếm tỷ lệ cao trong nghiên cứu, do vậy việc xét nghiệm tìm tác nhân gây bệnh cần được tiến hành sớm để điều trị kịp thời nhằm mang lại hiệu quả tốt nhất cho người bệnh.

Từ khóa: áp xe gan, áp xe gan amip, áp xe gan do ký sinh trùng, áp xe gan vi trùng, điều trị áp xe gan.

Chỉ số phân loại: 3.1, 3.2

1. Đặt vấn đề

Áp xe gan hình thành do tổ chức tế bào gan bị phá hủy tạo ổ mủ ở gan. 47 trường hợp áp xe gan đầu tiên được báo cáo vào năm 1938 [1-3]. Có 3 loại áp xe gan phổ biến: áp xe gan do amip, vi trùng và các tác nhân khác (sán lá gan, ký sinh trùng, nấm...).

Việt Nam nằm trong vùng có tỷ lệ mắc sán lá gan lớn cao trên thế giới [4, 5]. Bệnh sán lá gan lớn đang gia tăng có thể lên đến hàng chục ngàn ca mỗi năm. Tại Khoa Tiêu hóa, Bệnh viện Nhi đồng 2, trong 6 tháng đầu năm 2017 đã có 6 ca áp xe gan do sán lá gan lớn nhập viện [6]. Nhằm góp phần giúp các bác sĩ nhi khoa có cái nhìn toàn diện về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị áp xe gan ở trẻ em, các tác giả đã tiến hành thực hiện nghiên cứu này.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Tất cả bệnh nhi được chẩn đoán áp xe gan tại Bệnh viện Nhi đồng 2 từ tháng 1/2016 đến tháng 1/2021.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả hồi cứu.

Tiêu chuẩn chẩn đoán áp xe gan do vi trùng, amip, ký sinh trùng gồm:

- Lâm sàng: Sốt, ớn lạnh, dấu hiệu nhiễm trùng, sụt cân, chán ăn, vàng da, đau bụng, gan to, ấn đau, rung gan (+), ấn kê liên sườn (+).
- Cận lâm sàng: Tổng phân tích tế bào máu, CRP, sinh

hóa (Alkaline phosphatase - ALP, Serum glutamic pyruvic transaminase - SGPT, Serum glutamic oxaloacetic transaminase - SGOT, bilirubin...), cấy máu, cấy mủ ổ áp xe, huyết thanh chẩn đoán.

Siêu âm là phương tiện chẩn đoán, theo dõi điều trị. CT scan ổ bụng phát hiện ổ áp xe gan, chụp cộng hưởng từ (MRI).

Chẩn đoán áp xe gan do vi trùng: Chọc dò ra mủ vàng, xanh. Chẩn đoán dựa vào cấy máu hay cấy mủ ổ áp xe phân lập được vi trùng. Chẩn đoán áp xe gan do amip: Chọc dò ra mủ nâu, vàng, xanh. Huyết thanh chẩn đoán amip (+)... [7].

Chẩn đoán áp xe gan ký sinh trùng, sán lá gan lớn: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (+), có hình ảnh tổn thương ký sinh trùng, sán lá gan lớn trên siêu âm/CT/MRI, bạch cầu ái toan có thể tăng [8].

Điều trị áp xe gan theo kháng sinh đồ đối với tác nhân vi trùng, chưa xác định; metronidazole đối với amip và ký sinh trùng theo hướng dẫn của Bộ Y tế [8].

Đánh giá khỏi bệnh: Triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng thuyên giảm hoặc trở về bình thường, đặc biệt tổn thương gan trên chẩn đoán hình ảnh [8, 9].

Xử lý số liệu: Nhập và xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê Stata 14.

2.3. Ý đức

Đề tài đã được chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Bệnh viện Nhi đồng 2 theo Quyết định số 2817/GCN-BVNĐ2 ngày 9/12/2021.

*Tác giả liên hệ: Email: bshahuykhoi@gmail.com, thieuhv@pnt.edu.vn

Characteristics of clinical, paraclinical and treatment results of children liver abscess in Children's Hospital No. 2

Huy Khoi Ha^{1*}, Van Thieu Ha^{1,2*}, Thanh Tri Tran²

¹Pham Ngoc Thach University of Medicine,
2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Children's Hospital 2,
14 Ly Tu Trong Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 14 February 2023; revised 13 March 2023; accepted 17 March 2023

Abstract:

Liver abscess (LA) is one of the most common cause of morbidity in children. Vietnam located in an area with a high infection incidence of fascioliasis in the world. LA due to fascioliasis is progressing in recent years. Objectives: To determine clinical and paraclinical features and results of treatment of LA. Subjects and research methods: This was a retrospective study. The duration was from January 2016 to January 2021. All the patients with LA were included in this study. Results: Clinical and paraclinical symptoms are in remission or returned to normal, especially liver damage on imaging. Results: There were 60 patients. Patients >5 years old account for 70.0%. LA due to parasitic, pyogenic, amoebic and unknown were 53.3, 5.1, 5.0 and 36.6%, respectively. The diameter of the LA is less than 5 cm accounting for a high rate (70%). Clinical manifestations with right upper quadrant pain, hepatomegaly, fever, nausea and vomiting were 95.0, 75.0, 25.0 and 25.0%, respectively. The values of eosinophilia, C-reactive protein (CRP), and white blood cells were mostly increased in LA at 68.3, 65.0 and 65.0%, respectively. The rate of remission and cure is 95.0%. Conclusions: LA of unknown cause still accounts for a high proportion of research, so testing to find the agent should be early conducted, for timely treatment to bring the best effect to the patient.

Keywords: amoebic liver abscess, liver abscess, parasitic liver abscess, pyogenic liver abscess, treatment of liver abscess.

Classification numbers: 3.1, 3.2

3. Kết quả

Có 60 trường hợp áp xe gan được đưa vào nghiên cứu. Không có biến chứng nào được ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi.

3.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Bảng 1. Phân bố theo tuổi và giới tính.

Phân bố tuổi	Nam (%)	Nữ (%)	Tổng cộng (%)	p
≤5	10 (55,6)	8 (44,4)	18 (30,0)	p=0,573
>5	20 (47,6)	22 (52,4)	42 (70,0)	
Tổng cộng	30 (50)	30 (50)	60 (100)	

Kết quả bảng 1 cho thấy, áp xe gan có độ tuổi >5 chiếm tỷ lệ cao (70,0%). Tỷ lệ nam/nữ là 1/1. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nam và nữ trong các độ tuổi (p>0,05).

Về đặc điểm, áp xe gan do ký sinh trùng chiếm tỷ lệ cao (53,3%), trong khi do vi trùng chỉ chiếm 5,1%, amip 5,0% và chưa rõ tác nhân là 36,6%.

Kết quả bảng 2 cho thấy, có sự khác biệt theo từng tác nhân gây bệnh theo giới tính, p<0,05.

Bảng 2. Đặc điểm tác nhân áp xe gan theo giới tính, tuổi.

Đặc điểm	n=60	Amip (n=3)	Vi trùng (n=3)	Chưa rõ tác nhân (n=22)	Ký sinh trùng (n=32)	p
Giới	Nam	30	6,7	0,0	56,6	0,002
	Nữ	30	3,3	10,0	16,7	
Tuổi	≤5 tuổi	18	0,0	0,0	33,3	0,523
	>5 tuổi	42	7,1	7,1	38,2	

Áp xe gan 1 ổ chiếm 76,7% (bảng 3). Vị trí ở gan phải trên siêu âm chiếm 60%. Kích thước ổ áp xe gan có đường kính ≤5 cm chiếm tỷ lệ cao (70%). Có 38 trường hợp được chụp CT scan ổ bụng, trong đó vị trí ổ áp xe ở gan phải trên CT scan chiếm tỷ lệ cao (57,9%).

Bảng 3. Đặc điểm áp xe gan trên siêu âm, CT scan ổ bụng.

Đặc điểm	Kết quả	n	Tỷ lệ (%)
Số lượng ổ áp xe trên siêu âm (n=60)	Chưa phát hiện trên siêu âm	3	5,0
	1 ổ	46	76,7
	Đa ổ	11	18,3
Vị trí ổ áp xe trên siêu âm (n=60)	Chưa phát hiện trên siêu âm	3	5,0
	Gan trái	14	23,3
	Gan phải	36	60,0
	Hai bên	7	11,7
Đường kính ổ áp xe trên siêu âm (n=60)	≤5 cm	42	70,0
	>5 cm	18	30,0
Vị trí ổ áp xe trên CT scan ổ bụng (n=38)	Gan trái	7	18,4
	Gan phải	22	57,9
	Hai bên	9	23,7

Kết quả bảng 4 cho thấy, có sự khác biệt số lượng ổ áp xe và vị trí theo từng tác nhân gây bệnh, p<0,05.

Bảng 4. Số lượng ổ áp xe và vị trí theo từng tác nhân gây bệnh.

Đặc điểm	Tác nhân				p
	Amip (n=3, %)	Vi trùng (n=3, %)	Ký sinh trùng (n=32, %)	Chưa rõ tác nhân (n=22, %)	
Số lượng ổ áp xe trên siêu âm	0 ổ	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,2)	0,016
	1 ổ	3 (100,0)	0 (0,0)	23 (71,9)	
	Đa ổ	0 (0,0)	3 (100,0)	7 (21,9)	
Vị trí ổ áp xe trên siêu âm	Không ghi nhận trên siêu âm	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)	0,032
	Gan trái	2 (66,7)	0 (0,0)	9 (28,1)	
	Gan phải	1 (33,3)	0 (0,0)	17 (53,1)	
	Hai bên	0 (0,0)	3 (100,0)	4 (12,5)	

Về lâm sàng, nghiên cứu cho thấy đau hạ sườn phải, gan to, sốt và nôn có tỷ lệ cao trong áp xe gan theo thứ tự 95,0, 75,0, 25,0 và

25,0%. Bạch cầu ái toan, CRP và bạch cầu tăng có tỷ lệ cao theo thứ tự là 68,3, 65,0 và 65,0%.

3.2. Kết quả điều trị áp xe gan

Kết quả điều trị cho thấy, tỷ lệ thuyên giảm 95,0%, có 3 trường hợp không thuyên giảm, trong đó 1 trường hợp chẩn đoán áp xe gan đa ổ/u đường mật di căn, cấy máu *Stenotrophomonas maltophilia*, bệnh nặng xin về; 1 trường hợp chẩn đoán áp xe gan đa ổ do *Fasciola hepatica*, chuyển Bệnh viện Bệnh nhiệt đới (TP Hồ Chí Minh); 1 trường hợp áp xe gan do vi trùng đa kháng, bệnh nặng xin về.

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm tuổi, giới, lâm sàng, cận lâm sàng

Trong 60 trường hợp áp xe gan, tỷ lệ nam/nữ là 1/1, nhóm tuổi ≤ 5 (nam: 55,6%) và nhóm tuổi >5 tuổi (nam: 47,6%), tỷ lệ nhóm tuổi >5 chiếm tỷ lệ cao hơn là 70,0%, $p>0,05$.

A.S.K. Dria và cs (2018) [10] nghiên cứu 30 trẻ bị áp xe gan trên 7.815 trẻ nhập viện từ năm 2007 đến năm 2016 tại Bờ Biển Ngà cho thấy tuổi trung bình mắc bệnh là 5,4, nhập viện vì sốt ($n=29$), đau bụng lan tỏa ($n=25$), đau hạ vị bên phải ($n=18$) và có một khối ở bụng ($n=10$). Nghiên cứu trên 34 bệnh nhân áp xe gan dưới 12 tuổi tại Ấn Độ từ năm 2012 đến năm 2016 của W. Mukta và cs (2017) [11] ghi nhận tuổi trung bình là 6,3, trong đó 16 (47,1%) bệnh nhân <5 tuổi, 19 nam (55,8%) và 15 nữ (44,2%). Tuổi mắc bệnh trung bình trong 51 trường hợp áp xe gan trong nghiên cứu của V.N.T. Tien năm 2015 [12] ghi nhận tại Bệnh viện Nhi đồng 2 là $6,81\pm 3,59$. Lứa tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất là 5-10 tuổi (52,9%), tiếp đến là <5 tuổi (31,3%).

Cũng giống như kết quả nghiên cứu của chúng tôi, đại đa số các tác giả ghi nhận áp xe gan chủ yếu xảy ra ở nhóm tuổi >5 . Trẻ em <5 tuổi còn chập chững, chưa tiếp xúc nhiều với môi trường, thức ăn đa số là sữa mẹ, sữa tiệt trùng cũng như các loại thức ăn đậm khác đều được nấu chín. Mặt khác, trong giai đoạn hiện nay mỗi gia đình chỉ có 1-2 con, đời sống xã hội ngày một nâng cao, chăm sóc con cái ngày càng chu đáo, đặc biệt nhóm trẻ <5 tuổi. Điều này góp phần giải thích thêm đặc điểm áp xe gan ít xảy ra ở nhóm <5 tuổi.

4.2. Đặc điểm áp xe gan theo tác nhân, giới tính, độ tuổi trên siêu âm và CT scan ổ bụng

Nghiên cứu trên 30 trẻ bị áp xe gan tại Bờ Biển Ngà ghi nhận có 18 nam và 12 nữ, áp xe gan do vi khuẩn *Entamoeba histolytica* chiếm 30% (9 trường hợp), *Staphylococcus aureus* 13% (4 trường hợp) [10].

Nghiên cứu của W. Mukta và cs (2017) [11] tại Ấn Độ đã ghi nhận 2/3 trường hợp áp xe gan do vi trùng ở gan phải và đại đa số là 1 ổ. *Staphylococcus aureus* là tác nhân phổ biến nhất. Các vi khuẩn khác bao gồm: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* và có cả vi khuẩn kỵ khí.

Tại Đài Loan (Trung Quốc), một nghiên cứu hồi cứu ở 38 trẻ được chẩn đoán áp xe gan kéo dài 20 năm (tháng 1/2000 đến tháng 12/2019) cho thấy, *Klebsiella pneumoniae* là vi trùng được phân lập chiếm tỷ lệ nhiều nhất. Tuổi chẩn đoán trung bình là $9,6\pm 6,2$ và tỷ lệ nam/nữ là 1,92:1. Ung thư máu (28,9%) và các bệnh gan mật thường gặp (23,7%) là 2 yếu tố nguy cơ phổ biến nhất [13].

Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của V.N.T. Tien (2015) [12] ghi nhận 51 trẻ em áp xe gan, nhóm <5 tuổi tác nhân do vi trùng, amip, ký sinh trùng và không rõ tác nhân chiếm lần lượt là 0, 2, 6 và 8 trường hợp; nhóm 5-10 tuổi, tác nhân do vi trùng, amip, ký sinh trùng và không rõ tác nhân lần lượt là 1, 9, 3 và 14 trường hợp; nhóm >10 tuổi tác nhân do vi trùng, amip, ký sinh trùng và không rõ tác nhân lần lượt là 2, 1, 1 và 4 trường hợp.

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận, áp xe gan do ký sinh trùng 32/60 (53,3%), (trong đó *Fasciola hepatica* chiếm tỷ lệ cao (41,7%), tiếp đến là *Strongyloides stercoralis* (5,0%) và *Toxocara canis* (5,0%). Áp xe gan chưa rõ tác nhân có 22/60 (36,6%) bệnh nhân, do vi trùng 3/60 (5,1%) và do amip là 3/60 (5,0%).

Bệnh nhân nhiễm sán lá gan lớn do ăn rau sống mọc dưới nước hoặc uống nước nhiễm ấu trùng của loại sán này. Ấu trùng sán lá gan lớn sau đó vào dạ dày, xuống tá tràng, vào khoang phúc mạc đến gan, đục thủng bao gan và xâm nhập vào nhu mô gan gây tổn thương gan. Do đó, các yếu tố dịch tễ liên quan đến nguy cơ nhiễm sán lá gan lớn như tiền căn uống nước lã, ăn rau thủy sinh sống chưa qua rửa nước sạch cần được khai thác kỹ trong bệnh sử [5, 6].

Bệnh viện Nhi đồng 2 là một bệnh viện chuyên khoa nhi hạng 1, trực thuộc Sở Y tế TP Hồ Chí Minh, theo sự phân công của Bộ Y tế chỉ đạo tuyến khu vực miền Trung và Tây Nguyên. Bệnh viện Nhi đồng 2 tiếp nhận những bệnh nhân của các tuyến chuyên đến, việc dùng kháng sinh ở các bệnh viện tuyến dưới hoặc người nhà tự ý dùng kháng sinh trước nhập viện là điều không thể tránh khỏi. Do vậy, việc cấy máu định danh tác nhân vi trùng hoặc huyết thanh chẩn đoán amip còn gặp nhiều khó khăn, lý giải cho việc áp xe gan chưa rõ tác nhân chiếm tỷ lệ cao (36,7%) trong nghiên cứu của chúng tôi.

Chụp CT scan ổ bụng là một xét nghiệm nhạy hơn trong giai đoạn đầu, nhưng không tốt hơn so với siêu âm trong các giai đoạn sau [14]. Siêu âm có thể bỏ sót những áp xe rất nhỏ hoặc ở vị trí khó quan sát. Những trường hợp lâm sàng nghi ngờ áp xe gan, siêu âm cho kết quả bình thường, CT scan ổ bụng được chỉ định, CT scan ổ bụng có độ nhạy cao hơn siêu âm trong việc phát hiện ổ áp xe ngay cả khi áp xe nhỏ ở bất cứ vị trí nào, chụp CT scan ổ bụng tiếp cận 100% và chính xác hơn trong việc phân biệt áp xe với khối u [15].

Nghiên cứu của chúng tôi đã ghi nhận 3 trường hợp (5,0%) không phát hiện trên siêu âm, 1 ổ có 46 trường hợp (76,7%), 11 trường hợp đa ổ (18,3%). Cả 3 trường hợp triệu chứng lâm sàng nghi ngờ áp xe gan này, khi cho chụp CT scan ổ bụng phát hiện được hình ảnh áp xe gan. Ngoài ra, chúng tôi còn ghi nhận áp xe gan do amip thường là ổ áp xe đơn độc, do vi trùng thường đa ổ. Cỡ mẫu chúng tôi cũng còn khá nhỏ, nên số liệu đưa ra chỉ mang tính chất tham khảo.

4.3. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận các đặc điểm lâm sàng: đau hạ sườn phải, gan to, sốt và nôn có tỷ lệ cao, lần lượt là 95,0, 75,0, 25,0 và 25,0%. Các giá trị bạch cầu ái toan, CRP và bạch cầu tăng, lần lượt là 68,3, 65,0 và 65,0%. Kết quả của chúng tôi tương đối phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu khác [1, 11, 12].

Trong thực hành lâm sàng khi ghi nhận tam chứng Fontan, chẩn đoán áp xe gan cần hướng tới và định hướng các xét nghiệm cận

lâm sàng hỗ trợ để có được chẩn đoán sớm hơn, đặc biệt áp xe gan do sán lá gan lớn.

Ngoài ra, chúng tôi cũng ghi nhận ít có sự biến đổi các chỉ số xét nghiệm sinh hóa máu. Kết quả này phù hợp với y văn là xét nghiệm sinh hóa máu không giúp nhiều cho việc chẩn đoán áp xe gan, các chỉ số này có thể rối loạn khi có tổn thương gan nặng.

4.4. Kết quả điều trị, phương pháp điều trị, số kháng sinh đã dùng

Áp xe gan ở trẻ em hầu hết được điều trị nội khoa. Kháng sinh đối với tác nhân là vi trùng hoặc rõ tác nhân, điều trị amip đối với tác nhân là amip, thuốc điều trị ký sinh trùng đối với tác nhân là ký sinh trùng (sán lá gan, giun đũa chó...). Ngoài ra, còn có kết hợp ngoại khoa chọc hút mủ dẫn lưu qua da dưới hướng dẫn của siêu âm hay phẫu thuật dẫn lưu. Chọc hút bằng kim dưới sự hướng dẫn của siêu âm nên được thực hiện nếu áp xe có thể tiếp cận được, cũng như dẫn lưu qua da nếu áp xe lớn (đường kính >10 cm), vỡ áp xe hoặc kháng thuốc với điều trị [14]. Trường hợp áp xe gan do vi trùng có kích thước lớn, dẫn lưu và phối hợp kháng sinh thích hợp, kịp thời có đáp ứng tốt rõ rệt [16].

Kết quả của nghiên cứu trên 51 trường hợp áp xe gan, có 8 trường hợp cần kết hợp chọc hút mủ dẫn lưu qua da, 3 trường hợp kết hợp phẫu thuật dẫn lưu, 1 trường hợp phải chọc qua da sau đó phẫu thuật dẫn lưu do kém đáp ứng điều trị [12]. Gần 50% trường hợp dùng 3 loại kháng sinh ngay từ đầu, 30% dùng 2 loại. Cephalosporin III + Metronidazole ± Amikacin là phác đồ được dùng đầu tay, trong đó Cephalosporin được dùng trong hầu hết các trường hợp là Cefotaxim. Kết quả điều trị thành công là 86,3% (44/51), tái phát 3,9% (2/51), 2 trường hợp xin về khi đang đáp ứng điều trị, 3 trường hợp chuyển Bệnh viện Bệnh nhiệt đới (TP Hồ Chí Minh) để điều trị sán lá gan và không có trường hợp tử vong [12].

Tổ chức Y tế thế giới (WHO) khuyến cáo 10 mg/kg/liều x 2 liều Triclabendazol, mỗi liều cách nhau từ 12 đến 24 giờ. Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt 2 liều như trên để điều trị bệnh sán lá gan lớn cấp tính và mạn tính ở người từ 6 tuổi trở lên vào năm 2019 [17].

Kết quả điều trị áp xe gan trong nghiên cứu của chúng tôi có 3 trường hợp không thuyên giảm. 46 (76,6%) trường hợp dùng 2 kháng sinh chiếm tỷ lệ cao trong mẫu nghiên cứu. Can thiệp ngoại khoa là 8 (13,3%), trong đó, dẫn lưu catheter (5 trường hợp) chiếm 62,5%, kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới cũng như tại Việt Nam, hầu hết áp xe gan là điều trị nội khoa, có một số trường hợp kết hợp ngoại dẫn lưu hoặc phẫu thuật.

Với sự tiến bộ của các phương tiện cận lâm sàng như xét nghiệm, huyết thanh chẩn đoán, chẩn đoán hình ảnh học (siêu âm, CT scan, MRI) phục vụ cho công tác chẩn đoán và theo dõi sự đáp ứng điều trị; sự phối hợp nhịp nhàng giữa đội ngũ bác sỹ điều trị nội khoa và ngoại khoa cùng với sự phát triển được lâm sàng tại các tuyến bệnh viện cũng đã góp phần đáng kể trong cải thiện công tác điều trị áp xe gan hiện nay.

5. Kết luận

Áp xe gan vẫn là một trong những nguyên nhân gây bệnh phổ biến ở trẻ em. Trong thực hành lâm sàng khi có đau hạ sườn phải, gan to, sốt, nôn kèm theo tăng CRP, bạch cầu ái toan, bạch cầu, đặc biệt siêu âm có hình ảnh áp xe gan thì cần hướng tới chẩn đoán áp xe gan.

Tác nhân là ký sinh trùng và chưa xác định được tác nhân gây áp xe gan vẫn còn chiếm tỷ lệ cao, vì vậy ngoài siêu âm/CT scan ổ bụng cần tiến hành cấy máu, cấy mủ, huyết thanh chẩn đoán để xác định tác nhân gây bệnh.

Điều trị nội khoa với liệu pháp kháng sinh, thuốc điều trị ký sinh trùng thích hợp cùng với sự can thiệp ngoại khoa kịp thời là yếu tố quyết định trong điều trị áp xe gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Chaubey, A. Pandey, P. Kumar, et al. (2016), "Liver abscess in children: Challenges in management", *International Surgery Journal*, **4**(1), pp.107-110, DOI: 10.18203/2349-2902.isj20164051.
- [2] S.B. Lal, V. Venkatesh, A. Kumar, et al. (2021), "Liver abscess in children-experience from a single tertiary care center of north India: Etiology, clinical profile and predictors of complications", *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **40**(5), pp.179-184, DOI: 10.1097/INF.0000000000003053.
- [3] D.M. Koziellewicz, K. Sikorska, P. Stalke (2021), "Liver abscesses - from diagnosis to treatment", *Clin. Exp. Hepatol.*, **7**(4), pp.329-336, DOI: 10.5114/ceh.2021.110998.
- [4] H.V. Thieu (2021), "Liver abscess in children", *Pediatric Digestive Pathology*, Ho Chi Minh City National University Press, pp.135-154 (in Vietnamese).
- [5] T.D. Bui, P.N. Doanh, C. Saegerman, et al. (2016), "Current status of fasciolosis in Vietnam: An update and perspectives", *Journal of Helminthology*, **90**(5), pp.511-522, DOI: 10.1017/S0022149X15000929.
- [6] H.V. Thieu (2017), "Liver abscess due to fascioliasis at Children's Hospital 2: Report of 3 cases", *Ho Chi Minh City Medical Journal*, **21**(6), pp.124-135 (in Vietnamese).
- [7] R.M. Kliegman, J.S. Geme (2019), "Liver abscess", *Nelson Textbook of Pediatrics*, 1, 21th Edition, Elsevier, 4264pp.
- [8] Ministry of Health (2022), *Decision No. 1203/QĐ-BYT dated 16 May 2022 on Promulgating Guidelines for Diagnosis, Treatment and Prevention of Fascioliasis* (in Vietnamese).
- [9] M. Muorah, R. Hinds, A. Verma, et al. (2006), "Liver abscesses in children: A single center experience in the developed world", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **42**(2), pp.201-206, DOI: 10.1097/01.mpg.0000189344.23387.26.
- [10] A.S.K. Dria, N.E. Moh, Y.L. Aké, et al. (2018), "Liver abscess of children in Côte-d'Ivoire: Retrospective analysis of a series of 30 cases", *Annals of Pediatric Surgery*, **14**(2), pp.51-55, DOI: 10.1097/01.XPS.0000521800.43379.30.
- [11] W. Mukta, H. Shah, C. Tiwari, et al. (2017), "Management of liver abscess in children: Our experience", *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology*, **7**(1), pp.23-26, DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1206.
- [12] V.N.T. Tien (2015), *Survey on Characteristics of Liver Abscesses in Children at Children's Hospital 2 from 2010-2015*, Master's Thesis in Medicine, Pham Ngoc Thach University of Medicine (in Vietnamese).
- [13] P.J. Yeh, C.C. Chen, M.W. Lai, et al. (2020), "Pediatric liver abscess: Trends in the incidence, etiology, and outcomes based on 20-years of experience at a tertiary center", *Frontiers in Pediatrics*, **24**(8), DOI: 10.3389/fped.2020.00111.
- [14] S.L. Deguelte, E. Ragot, K. Amroun, et al. (2015), "Hepatic abscess: Diagnosis and management", *Journal of Visceral Surgery*, **152**(4), pp.231-243, DOI: 10.1016/j.jviscsurg.2015.01.013.
- [15] J.A.A. Pérez, J.J. González, R.F. Baldonado, et al. (2001), "Clinical course, treatment, and multivariate analysis of risk factors for pyogenic liver abscess", *The American Journal of Surgery*, **181**(2), pp.177-186, DOI: 10.1016/S0002-9610(00)00564-X.
- [16] Y.L. Hsu, H.C. Lin, T.Y. Yen, et al. (2015), "Pyogenic liver abscess among children in a medical center in central Taiwan", *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **48**(3), pp.302-305, DOI: 10.1016/j.jmii.2013.08.009.
- [17] M.A. Caravedo, M.M. Cabada (2020), "Human fascioliasis: Current epidemiological status and strategies for diagnosis, treatment, and control", *Research Reports in Tropical Medicine*, **26**(11), pp.149-158, DOI: 10.2147/RRTM.S237461.

Đặc điểm kháng thể bất thường ở bệnh nhân thiếu máu tan máu tự miễn tại Bệnh viện Bạch Mai

Nguyễn Tuấn Tùng^{1*}, Phạm Quang Thịnh²

¹Bệnh viện Bạch Mai, 78 Giải Phóng, phường Phương Mai, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Khương Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/2/2023; ngày chuyển phản biện 8/2/2023; ngày nhận phản biện 6/3/2023; ngày chấp nhận đăng 9/3/2023

Tóm tắt:

Tự kháng thể (TKT) ở bệnh nhân thiếu máu tan máu tự miễn (TMTMTM) “gắn” với kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu gây ra tình trạng tan máu. Ngoài ra, TKT còn có thể lưu hành trong huyết thanh và sự tồn tại của loại kháng thể này có thể che lấp hoặc làm nhiễu kháng thể bất thường (KTBT). Do vậy, xác định sự xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM gặp rất nhiều khó khăn. Mục tiêu nghiên cứu: Xác định tỷ lệ xuất hiện và mô tả đặc điểm của KTBT ở bệnh nhân TMTMTM. Đối tượng nghiên cứu: 150 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị TMTMTM tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 6/2019 đến tháng 6/2021. Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang. Kết quả và kết luận: Tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM là 9,3%, tỷ lệ này rất cao ở nhóm bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh (28,6%); KTBT chủ yếu phối hợp với TKT (85,7%) và chủ yếu các KTBT chống lại các kháng nguyên nhóm máu thuộc hệ Rh (60,0%) và MNS (35,0%).

Từ khóa: kháng thể bất thường, nhóm máu, thiếu máu tan máu tự miễn.

Chỉ số phân loại: 3.2

Characterisation of irregular antibodies in patients with autoimmune hemolytic anaemia at Bach Mai Hospital

Tuan Tung Nguyen^{1*}, Quang Thinh Pham²

¹Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Phuong Mai Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Khuong Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 3 February 2023; revised 6 March 2023; accepted 9 March 2023

Abstract:

Autoantibodies in patients with autoimmune hemolytic anaemia (AIHA) which “bind” to antigens on the surface of red blood cells, cause hemolysis. In addition, autoantibodies may also circulate in the serum, and their presence may mask or interfere with the irregular antibodies. Therefore, the authors encounter many difficulties in determining the appearance of irregular antibodies in AIHA patients. Objectives: To determine the prevalence and characterisation of irregular antibodies in patients with AIHA. Subjects: 150 patients were diagnosed and treated for AIHA at Bach Mai Hospital from June 2019 to June 2021. Method: Cross-sectional description. Results and conclusions: The rate of occurrence of irregular antibodies in AIHA patients is 9.3%, which is very high in AIHA patients with autoantibodies (28.6%). Irregular antibodies mainly combine with autoantibodies (85.7%), and most irregular antibodies are against antigens of the Rh (60.0%) and MNS (35.0%) blood groups.

Keywords: autoimmune hemolytic anaemia, blood group, irregular antibodies.

Classification number: 3.2

1. Đặt vấn đề

TKT ở bệnh nhân TMTMTM được sinh ra và “gắn” trên bề mặt hồng cầu của chính bệnh nhân làm giảm đời sống của hồng cầu. TKT cũng có thể lưu hành tự do trong huyết thanh, kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đình Lương (1973) [1] cho thấy, 40% bệnh nhân TMTMTM tìm thấy TKT

trong huyết thanh. Mặt khác, trong huyết thanh của những bệnh nhân TMTMTM cũng có thể tồn tại KTBT do những bệnh nhân này đã từng được truyền máu trước đó hoặc trải qua quá trình chữa đẽ.

Sự tồn tại của KTBT trong huyết thanh là một yếu tố làm tăng nguy cơ xảy ra các phản ứng không mong muốn liên quan đến truyền máu [2]. Vì vậy, xác định sự tồn tại

*Tác giả liên hệ: Email: tunghbm@gmail.com

của KTBT thông qua xét nghiệm sàng lọc và định danh KTBT rất có ý nghĩa, đặc biệt với những bệnh nhân có tiền sử truyền máu hoặc/và chữa, đẻ. Tuy nhiên, giải quyết yêu cầu trên ở bệnh nhân TMTMTM là một vấn đề không hề đơn giản do sự tồn tại của TKT trong huyết thanh có thể che lấp hoặc làm nhiễu KTBT [3]. Đây cũng chính là lý do chúng tôi thực hiện đề tài “Đặc điểm KTBT ở bệnh nhân TMTMTM tại Bệnh viện Bạch Mai” nhằm giải quyết mục tiêu: Xác định tỷ lệ xuất hiện và mô tả đặc điểm của KTBT ở bệnh nhân TMTMTM.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Gồm 150 bệnh nhân được chẩn đoán TMTMTM và điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 6/2019 đến tháng 6/2021 với những tiêu chuẩn như sau:

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân được chẩn đoán TMTMTM theo “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị một số bệnh lý huyết học” của Bộ Y tế [4].
- Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân mất máu phối hợp các nguyên nhân khác; được truyền máu trong khoảng thời gian 1 tháng hoặc truyền các chế phẩm huyết tương, tiểu cầu trong thời gian 1 tuần.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.
- Phương pháp chọn mẫu: Thuận tiện.
- Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6/2019 đến tháng 6/2021 tại Bệnh viện Bạch Mai.

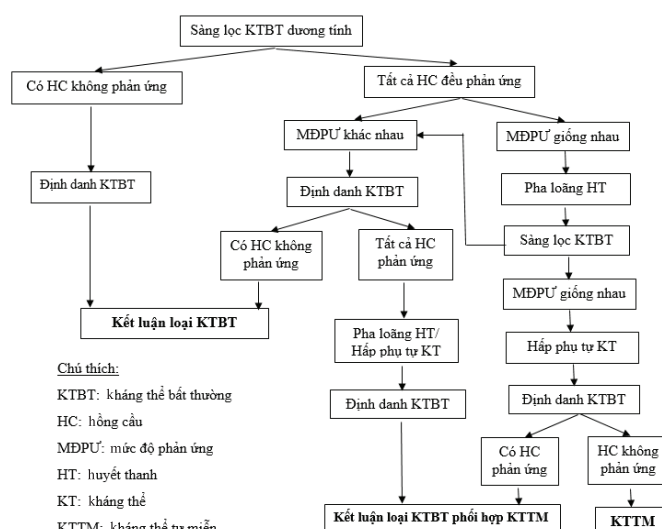
- Nội dung nghiên cứu:

Bước 1: Chọn đối tượng nghiên cứu theo tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ.

Bước 2: Tiến hành xét nghiệm sàng lọc KTBT cho bệnh nhân trong đối tượng nghiên cứu và phân tích kết quả: i) Huyết thanh bệnh nhân không phản ứng với hồng cầu sàng lọc: KTBT âm tính; ii) Huyết thanh bệnh nhân phản ứng với hồng cầu sàng lọc: KTBT dương tính.

Bước 3: Định danh KTBT với những trường hợp có kết quả xét nghiệm sàng lọc KTBT dương tính (sơ đồ 1).

Bước 4: Tổng hợp kết quả, đánh giá và phân tích theo mục tiêu nghiên cứu.



Sơ đồ 1. Định danh KTBT ở bệnh nhân TMTMTM có sàng lọc KTBT dương tính.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật ngưng kết cột gel: Các xét nghiệm Coombs trực tiếp, sàng lọc KTBT và định danh KTBT.
- Kỹ thuật ống nghiệm: Pha loãng huyết thanh, hấp phụ TKT.

Sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu

- Gelcard AHG đa giá và gelcard nước muối của Hãng Tulip, Ấn Độ.
- Panel hồng cầu sàng lọc KTBT (bộ 3 hồng cầu) và định danh KTBT (bộ 10 hồng cầu) của Viện Huyết học - Truyền máu Trung Ương sản xuất và phân phối.

Xử lý số liệu

Tính toán các tỷ lệ phần trăm, so sánh giá trị trung bình bằng thuật toán T-test trên phần mềm SPSS 16.0.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Trong số 150 bệnh nhân nghiên cứu, bệnh nhân nữ chiếm tỷ lệ 79,3%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với bệnh nhân nam là 20,7%. Tuổi trung bình $45,1 \pm 21,1$ tuổi, thấp nhất 16 tuổi, cao nhất 87 tuổi.

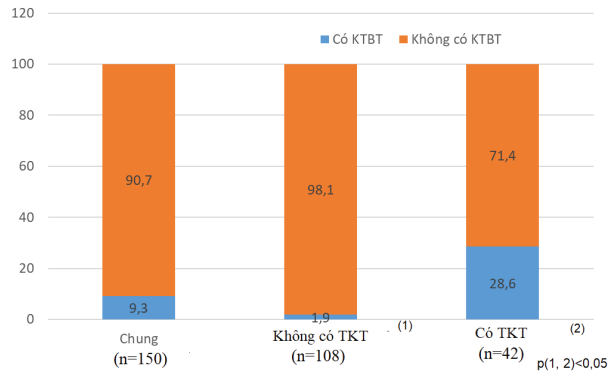
3.2. Tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM

Bảng 1. Tỷ lệ bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh (n=150).

TKT trong huyết thanh	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Có TKT	42	28,0
Không có TKT	108	72,0
Tổng số	150	100

Nguồn: Nhóm tác giả tổng hợp.

Nhận xét: Kết quả bảng 1 cho thấy, 72,0% bệnh nhân TMTMTM không có TKT trong huyết thanh. Bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh chiếm tỷ lệ thấp hơn (28,0%).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ xuất hiện KTBT ở các nhóm bệnh nhân TMTMTM.

Nhận xét: Kết quả biểu đồ 1 cho thấy, tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM là 9,3%. Ở nhóm bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh, tỷ lệ xuất hiện KTBT rất cao (chiếm 28,6%). Tỷ lệ này thấp hơn ở nhóm bệnh nhân TMTMTM không có TKT trong huyết thanh (chiếm 1,9%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

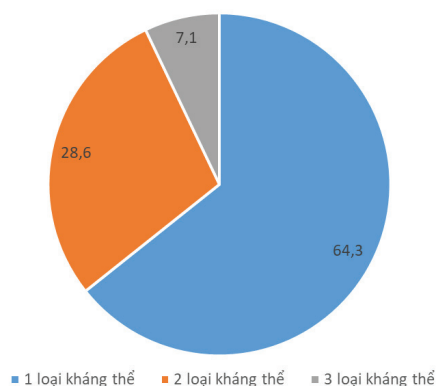
3.3. Đặc điểm của KTBT ở bệnh nhân TMTMTM

Bảng 2. Đặc điểm xuất hiện KTBT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM (n=14).

Đặc điểm xuất hiện KTBT	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Chỉ có KTBT	2	14,3
KTBT phối hợp TKT	12	85,7
Tổng số	14	100

Nguồn: Nhóm tác giả tổng hợp.

Nhận xét: Kết quả bảng 2 cho thấy, KTBT chủ yếu phối hợp với TKT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM (chiếm 85,7%).



Biểu đồ 2. Dạng tồn tại của KTBT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM (n=14).

Nhận xét: Kết quả biểu đồ 2 cho thấy, trong số 14 bệnh nhân có KTBT, bệnh nhân có 1 loại KTBT chiếm tỷ lệ cao nhất (64,3%), bệnh nhân có nhiều loại KTBT phối hợp với nhau chiếm tỷ lệ thấp hơn.

Bảng 3. Các loại KTBT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM (n=14).

KTBT	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
1 loại kháng thể Anti-E	6	43,0
Anti-Mi ^a	3	21,4
2 loại kháng thể Anti-C, anti-e	1	7,1
Anti-C, anti-Mi ^a	1	7,1
Anti-E, anti-Mi ^a	2	14,3
3 loại kháng thể Anti-e, anti-S, anti-P _I	1	7,1
Tổng số	14	100

Nguồn: Nhóm tác giả tổng hợp.

Nhận xét: Kết quả bảng 3 cho thấy, KTBT tồn tại ở dạng đơn độc hay gặp nhất, kháng thể chống lại kháng nguyên E và Mi^a rất phổ biến, với tỷ lệ lần lượt là 43,0 và 21,4%. Ở dạng nhiều KTBT kết hợp, 2 loại kháng thể trên phối hợp với nhau cũng thường gặp nhất với tỷ lệ là 14,3%.

Bảng 4. Tỷ lệ các loại KTBT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM (n=20).

KTBT	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Hệ Rh Anti-C	2	10,0
Anti-e	2	10,0
Anti-E	8	40,0
Hệ MNS Anti-Mi ^a	6	30,0
Anti-S	1	5,0
Hệ PP _I Anti-P _I	1	5,0
Tổng số	20	100

Nguồn: Nhóm tác giả tổng hợp.

Nhận xét: Kết quả bảng 4 cho thấy, hầu hết KTBT chống lại kháng nguyên thuộc hệ Rh (chiếm 60,0%) và MNS (chiếm 35,0%). Trong đó, các kháng thể chống lại kháng nguyên E và Mi^a phổ biến nhất, với tỷ lệ lần lượt là 40 và 30%, các loại kháng thể chống lại kháng nguyên khác như C, e, S... ít gặp hơn.

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số 150 bệnh nhân TMTMTM có 79,3% là nữ, tỷ lệ theo giới nam/nữ xấp xỉ 1/4. Đây là một bệnh liên quan đến rối loạn điều hòa miễn dịch nên thường gặp ở nữ hơn nam. Nghiên cứu của nhiều tác giả khác cũng cho kết quả tương tự, ví dụ như 78,5% bệnh nhân là nữ trong nghiên cứu của C. Chen và cs (2020)

[5], tỷ lệ này trong nghiên cứu của N.Q. Tung và cs (2020) [3] là 83%.

Tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu khá thấp (45,1 tuổi), bệnh nhân nhỏ tuổi nhất là 16 tuổi và lớn nhất là 87 tuổi. Nghiên cứu của R. Prabhu và cs (2016) [6] chỉ ra tuổi mắc TMTMTM trung bình là 41 tuổi và gặp nhiều ở độ tuổi 17-40. Kết quả nghiên cứu của N.Q. Tung và cs (2020) [3] cũng cho kết quả tương tự với tuổi trung bình của bệnh nhân TMTMTM là 45,9 tuổi.

4.2. Tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM

Có thể phát hiện TKT trong huyết thanh bệnh nhân TMTMTM bằng các xét nghiệm sàng lọc và định danh KTBT. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, có 28,0% bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh (bảng 1), kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nhận xét của N.D. Luong (1973) [1] và một số tác giả khác như L.N. Zhang và cs (2019) [7], R.K. Chaudhary và cs (2014) [8]. Các TKT ngoài khả năng phản ứng với hồng cầu của chính mình thì còn phản ứng với hầu hết các kháng nguyên trên hồng cầu người cho máu. Vì vậy, sự tồn tại của TKT là một thách thức rất lớn đối với các vấn đề liên quan đến truyền máu ở những bệnh nhân TMTMTM.

Nhiều bệnh nhân TMTMTM phải truyền khối hồng cầu trong quá trình điều trị, nghiên cứu của P.Q. Thinh và cs (2022) [9] trước đó cho thấy, có gần 50% bệnh nhân TMTMTM phải truyền máu và trung bình mỗi bệnh nhân đã truyền 3,2 đơn vị khối hồng cầu. Do vậy, nhóm bệnh nhân này có nguy cơ xuất hiện KTBT. Ngoài ra, những bệnh nhân TMTMTM thường là nữ, độ tuổi trung bình là 45,1 nên chủ yếu đã trải qua quá trình chữa, đẻ, đây cũng là một yếu tố làm tăng nguy cơ xuất hiện KTBT ở những bệnh nhân này. Nghiên cứu của N.T.T. Ha và cs (2014) [10] đã đưa ra nhận xét, tỷ lệ KTBT gặp ở nhóm bệnh nhân đã từng chữa, đẻ cao hơn hẳn so với nhóm bệnh nhân chưa từng chữa, đẻ ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sự tồn tại của TKT lại có khả năng che lấp hoặc làm nhiễu các KTBT. Sau khi tiến hành các xét nghiệm miễn dịch chuyên sâu với các kỹ thuật hỗ trợ phù hợp, chúng tôi đã xác định được tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM là 9,3%, ở nhóm bệnh nhân TMTMTM không có TKT trong huyết thanh thì tỷ lệ xuất hiện KTBT là 1,9% và tỷ lệ này ở nhóm bệnh nhân TMTMTM có TKT cao hơn nhiều (28,6%). Dễ dàng nhận thấy, tỷ lệ xuất hiện KTBT ở nhóm bệnh nhân TMTMTM cao hơn so các nhóm bệnh nhân khác: Thống kê tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2015-2016 về tỷ lệ xuất hiện KTBT với cỡ mẫu trên 8.000 bệnh nhân của N.B. Long (2016) [11] cho kết quả 2,47%; nghiên cứu của V.D. Binh và cs (2014) [12] trên nhiều bệnh nhân bệnh máu tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương cho thấy, tỷ lệ xuất hiện KTBT là 3,4%, cao nhất ở nhóm bệnh nhân thalassemia với 6,9% và kết quả này ở nhóm bệnh nhân rối loạn sinh tủy là 5,7%, nhóm bệnh nhân lơ xê mi cấp là 1%. Nhiều nghiên cứu về

bệnh nhân TMTMTM cũng chỉ ra tỷ lệ xuất hiện KTBT cao hơn so với các nhóm bệnh nhân khác, cụ thể: Nghiên cứu của N.Q. Tung và cs (2020) [3] cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân TMTMTM có KTBT là 19,1%; nghiên cứu của L.N. Zhang và cs (2019) [7] là 28,3%, hay 30,4% trong nghiên cứu của R.K. Chaudhary và S.S. Das (2014) [8]. Nhìn chung, các nghiên cứu chỉ ra tỷ lệ xuất hiện KTBT ở những bệnh nhân TMTMTM dao động từ 7,5 đến 54%. Một điều đặc biệt có thể thấy trong nghiên cứu của chúng tôi là tỷ lệ xuất hiện KTBT ở nhóm bệnh nhân TMTMTM không có TKT trong huyết thanh (1,9%) xấp xỉ tỷ lệ xuất hiện KTBT ở những nhóm bệnh nhân khác, nhưng tỷ lệ xuất hiện KTBT ở nhóm bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh lại cao hơn rất nhiều (28,6%). Sự khác biệt trên có thể do tính đặc hiệu tương đối của TKT với một số kháng nguyên hồng cầu hệ Rh, Kell, Kidd [13] hoặc các TKT đã “bắt chước” tính đặc hiệu của kháng thể đồng loài chống lại các kháng nguyên của hệ Rh [14, 15] dẫn tới tăng tỷ lệ xuất hiện KTBT trong huyết thanh của bệnh nhân TMTMTM.

4.3. Đặc điểm của KTBT ở bệnh nhân TMTMTM

Trong số 14 bệnh nhân TMTMTM có KTBT thì 12/14 trường hợp phối hợp với TKT trong huyết thanh và chỉ có 2/14 trường hợp trong huyết thanh chỉ tồn tại KTBT (bảng 3). Một giả thiết có thể đặt ra rằng, sự tồn tại của TKT trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM là một yếu tố nguy cơ làm tăng sự tồn tại của KTBT. Vì vậy, trong thực hành lâm sàng, chúng ta phải rất cẩn trọng trong việc xác định sự tồn tại của KTBT ở bệnh nhân TMTMTM, đặc biệt với những bệnh nhân tìm thấy TKT trong huyết thanh.

Phân tích dạng tồn tại của KTBT, chúng tôi nhận thấy, phần lớn huyết thanh của bệnh nhân TMTMTM có một loại KTBT, dạng có nhiều loại KTBT phối hợp với nhau ít gặp hơn (biểu đồ 2). Điều này cũng phù hợp với đặc điểm xuất hiện KTBT ở nhiều nhóm bệnh nhân khác nhau, ví dụ nghiên cứu của V.D. Binh và cs (2014) [12] nhận thấy có 62,5% bệnh nhân xuất hiện một loại KTBT, hay tỷ lệ này trong nghiên cứu của N.B. Long (2016) [11] là 64,6%. Sự tồn tại của KTBT chính là kết quả của quá trình đáp ứng miễn dịch xảy ra trong cơ thể khi cơ thể được tiếp xúc với kháng nguyên “lạ” thì sẽ sinh ra kháng thể chống lại kháng nguyên đó. Tuy nhiên, phản ứng này không phải xảy ra trong mọi trường hợp vì phụ thuộc vào nhiều yếu tố như cấu trúc của kháng nguyên, số lượng vị trí kháng nguyên... hay khả năng đáp ứng của cơ thể [2]. Đây chính là lý do vì sao thường thấy một loại KTBT ở trong huyết thanh của bệnh nhân.

Đánh giá cụ thể các loại KTBT xuất hiện trong huyết thanh ở bệnh nhân TMTMTM chúng tôi nhận thấy, tần suất xuất hiện kháng thể chống lại kháng nguyên E và M^a rất cao. Dù tồn tại ở dạng đơn độc hay phối hợp nhiều KTBT với nhau, phổ biến hơn cả là bệnh nhân có kháng thể chống kháng nguyên E và M^a (bảng 3). Nhiều nghiên cứu cũng

chỉ ra tỷ lệ xuất hiện KTBT chống kháng nguyên E và Mi^a là cao nhất. Một báo cáo của N.A. Tri và cs (2010) [16] cho thấy, tần suất kháng nguyên E và Mi^a lần lượt là 30,4 và 10,4%. Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân không có các kháng nguyên trên khá cao, đây là một yếu tố thuận lợi và cũng là điều kiện cần thiết để cơ thể sản xuất ra các KTBT chống lại các kháng nguyên này.

Với những kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi nhận thấy, các KTBT ở bệnh nhân TMTMTM chủ yếu chống lại các kháng nguyên thuộc hệ Rh (60,0% trường hợp) và MNS (35,0% trường hợp). Như vậy, có 95,0% các KTBT ở bệnh nhân TMTMTM chống lại các kháng nguyên thuộc hệ Rh và MNS (bảng 4). Nghiên cứu của N.A. Tri và cs (2016) [17] cũng cho thấy, tỷ lệ KTBT cao nhất thuộc nhóm Rh, sau đó đến KTBT thuộc nhóm MNS; kết quả nghiên cứu của M. Franchini và cs (2019) [18] cũng chỉ ra KTBT chống lại hệ Rh là phổ biến nhất (52,4%). Xác định chính xác KTBT chống lại kháng nguyên nào trên bề mặt hồng cầu chính là cơ sở để giải quyết các vấn đề liên quan đến an toàn truyền máu. Nhiều tác giả trong nước cho rằng, nếu thực hiện truyền máu hòa hợp kháng nguyên các hệ nhóm máu ABO, Rh (D, C, c, E, e) và MNS (Mi^a) có thể giảm nguy cơ sinh KTBT lên tới 86,8% [2, 17]. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nếu truyền máu hòa hợp các kháng nguyên kể trên có thể giảm nguy cơ sinh KTBT lên tới 95%. Thực tế, nhóm bệnh nhân TMTMTM thường xuyên phải truyền các đơn vị máu có phản ứng chéo dương tính (trên 60%) và điều này sẽ làm tăng nguy cơ xuất hiện các phản ứng không mong muốn liên quan đến truyền máu, đặc biệt là phản ứng miễn dịch giữa KTBT và kháng nguyên tương ứng trên hồng cầu người cho máu [9]. Do vậy, để tăng an toàn truyền máu cũng như giảm nguy cơ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM, truyền máu hòa hợp phenotype một phần (hệ Rh và một số hệ khác) đã được tiến hành tại một số quốc gia [19].

5. Kết luận

Nghiên cứu đặc điểm của KTBT trên 150 bệnh nhân TMTMTM tại Bệnh viện Bạch Mai, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

- Tỷ lệ xuất hiện KTBT ở bệnh nhân TMTMTM là 9,3%, tỷ lệ này rất cao ở nhóm bệnh nhân TMTMTM có TKT trong huyết thanh (28,6%).
- KTBT chủ yếu phối hợp với TKT (85,7%) và chủ yếu các KTBT chống lại các kháng nguyên hệ nhóm máu Rh (60,0%) và MNS (35,0%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.D. Luong (1973), *Comments on The Immune Characteristics of Hemolytic Anemia Due to Autoantibodies Seen at Bach Mai Hospital from 1965-1973*, Master's Thesis, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [2] N.M. Quan (2020), "Abnormal antibodies in Thalassemia patients", *Vietnam Medical Journal*, **496**, pp.208-215 (in Vietnamese).

- [3] N.Q. Tung, P.Q. Thinh (2020), "Characteristics of anti-red blood cell antibodies in patients with autoimmune hemolysis", *Vietnam Medical Journal*, **496**, pp.183-189 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Health (2015), *Decision No. 1832/QĐ-BYT dated 1 July 2022 on Promulgating The Professional Document "Guidelines for Diagnosis and Treatment of Some Hematological Diseases"* (in Vietnamese).
- [5] C. Chen, L. Wang, B. Han, et al. (2020), "Autoimmune hemolytic anemia in hospitalised patients: 450 patients and their red blood cell transfusion", *Medicine*, **99**(2), DOI: 10.1097/MD.00000000000018739, DOI: 10.1097/MD.00000000000018739.
- [6] R. Prabhu, R. Bhaskaran, V. Shenoy, et al. (2016), "Clinical characteristics and treatment outcomes of primary autoimmune hemolytic anemia: A single center study from south India", *Blood Research*, **51**(2), pp.88-94, DOI: 10.5045/br.2016.51.2.88.
- [7] L.N. Zhang, X.F. Liu, Y. Li (2019), "Serological characteristics of patients with autoimmune hemolytic anemia and efficacy and safety of incompatible transfusion of red blood cells", *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **27**(3), pp.916-919, DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2019.03.045.
- [8] R.K. Chaudhary, S.S. Das (2014), "Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside", *Asian Journal of Transfusion Science*, **8**(1), pp.5-12, DOI: 10.4103/0973-6247.126681.
- [9] P.Q. Thinh, N.T. Phuong, P.Q. Vinh (2022), "Characteristics of autoantibodies and the relationship with red blood cell transfusions in patients with autoimmune hemolytic anemia at Bach Mai Hospital", *Vietnam Medical Journal*, **520**, pp.321-328 (in Vietnamese).
- [10] N.T.T. Ha, V.D. Binh, N.A. Tri (2014), "Research on abnormal antibody characteristics in Thalassemia patients with blood transfusions at the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion (2011-2013)", *Vietnam Medical Journal*, **423**, pp.748-753 (in Vietnamese).
- [11] N.B. Long (2016), *Characteristics of Abnormal Antibody Rates in Blood Transfusion Patients at Bach Mai Hospital*, Graduation Thesis, Hanoi Medical University (in Vietnamese).
- [12] V.D. Binh (2014), "Research on screening results and identification of abnormal antibodies in Thalassemia patients at the Central Institute of Hematology and Blood Transfusion", *Vietnam Medical Journal*, **423**, pp.671-676 (in Vietnamese).
- [13] P.Q. Vinh, N.H. Thanh (2019), *Postgraduate Lectures: Hematology - Blood Transfusion*, Medical Publishing House, **1**, pp.178-203 (in Vietnamese).
- [14] P.D. Issitt, B.G. Pavone (1978), "Critical re-examination of the specificity of auto-anti-Rh antibodies in patients with a positive direct antiglobulin test", *British Journal of Haematology*, **38**(1), pp.63-74, DOI: 10.1111/j.1365-2141.1978.tb07109.x.
- [15] P.D. Issitt, M.R. Combs, D.J. Bumgarner, et al. (1996), "Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies", *Transfusion*, **36**(6), pp.481-486, DOI: 10.1046/j.1537-2995.1996.36696269503.x.
- [16] N.A. Tri (2010), "Research on non-ABO blood group antigens of blood donors to build a red blood cell panel and blood donor bank with current blood groups at the National Institute of Hematology and Blood Transfusion", *Vietnam Medical Journal*, **373**, pp.404-408 (in Vietnamese).
- [17] N.A. Tri, B.T.M An (2016), "Some unwanted complications related to blood transfusion and preventive measures", *Some topics on Hematology - Blood Transfusion*, Medical Publishing House one member Company Limited, **VII**, pp.71-82 (in Vietnamese).
- [18] M. Franchini, G.L. Forni, G. Marano, et al. (2019), "Red blood cell alloimmunization in transfusion-dependent thalassemia: A systematic review", *Blood Transfusion*, **17**(1), pp.4-15, DOI: 10.2450/2019.0229-18.
- [19] Y. Ueda (2018), "Transfusion of patients with autoimmune hemolytic anemia", *The Japanese Journal of Clinical Hematology*, **59**(10), pp.2354-2361, DOI: 10.11406/rinketsu.59.2354.

Thực trạng của người bệnh nuôi ăn qua sonde tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An

Nguyễn Đức Phúc^{1*}, Nguyễn Quỳnh Anh², Nguyễn Thị Thơm², Phạm Thị Thu Hà²

¹Khoa Hồi sức Tích cực, Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An, Km5, Đại lộ Lê Nin, xã Nghi Phú, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

²Khoa Dinh dưỡng, Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An, Km5, Đại lộ Lê Nin, xã Nghi Phú, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/12/2022; ngày chuyển phản biện 12/12/2022; ngày nhận phản biện 6/1/2023; ngày chấp nhận đăng 9/1/2023

Tóm tắt:

Nuôi ăn qua sonde là một phương pháp nuôi dưỡng người bệnh nặng, giảm nguy cơ nhiễm trùng, sử dụng chức năng ruột bình thường, tránh teo nhung mao, giảm khả năng mất cân bằng điện giải, tiết kiệm kinh tế và an toàn. Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát thực trạng của người bệnh nuôi ăn qua sonde tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An. Nghiên cứu sử dụng phương pháp tiến cứu mô tả trên 255 người bệnh từ tháng 4/2022 đến tháng 6/2022, tại các Khoa: Hồi sức Tích cực, Hồi sức Tích cực Ngoại khoa, Chống độc, Nhiễm khuẩn Tổng hợp, Bỏng, Ngoại tiêu hóa và Trung tâm Đột quỵ. Kết quả cho thấy, tỷ lệ suy dinh dưỡng đánh giá theo chỉ số khối cơ thể (BMI) là 14,5%, chỉ số chu vi vòng cánh tay (MUAC) là 6,7%, đánh giá tổng thể tình trạng dinh dưỡng theo chủ quan (SGA) là 54,9% (điểm SGA mức B và C), chỉ số albumin huyết thanh 79,2%. Tỷ lệ ngày đầu nuôi dưỡng qua sonde kết hợp tĩnh mạch chiếm 45,9%, ngày thứ 7 còn 8,2%. Ngày đầu can thiệp, tỷ lệ bệnh nhân cung cấp năng lượng ở mức đáp ứng thiếu chiếm 18,8%, đáp ứng đủ 56,1%, đáp ứng thừa 25,1%; ngày thứ 7 sau can thiệp, tỷ lệ bệnh nhân cung cấp thiếu năng lượng chiếm 38,4%, đáp ứng đủ chiếm 55,7%, đáp ứng thừa chiếm 5,9%. Ngày đầu tổng năng lượng đạt 75,5%, ngày thứ 7 đạt 85,9% nhu cầu khuyến nghị. Tỷ lệ suy dinh dưỡng của người bệnh khi nhập viện khá cao (đánh giá theo SGA là 54,9% và chỉ số albumin 79,2%), phần lớn người bệnh được cung cấp năng lượng đủ nhu cầu khuyến nghị, những ngày đầu tỷ lệ người bệnh nuôi dưỡng phối hợp tĩnh mạch và tiêu hóa cao, sau đó giảm dần nuôi dưỡng tĩnh mạch, chuyển sang nuôi dưỡng tiêu hóa hoàn toàn.

Từ khóa: bệnh nhân nặng, nuôi ăn qua sonde, suy dinh dưỡng.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Nuôi ăn qua sonde là một phương pháp nuôi dưỡng người bệnh nặng, giảm nguy cơ nhiễm trùng, sử dụng chức năng ruột bình thường, tránh teo nhung mao, giảm khả năng mất cân bằng điện giải, an toàn, sinh lý và tiết kiệm kinh tế. Chỉ định ăn qua sonde cho người bệnh không đưa đủ nhu cầu dinh dưỡng bằng đường miệng [1], hỗ trợ nuôi dưỡng sớm đường tiêu hóa sau mổ. Theo Hiệp hội dinh dưỡng lâm sàng và chuyển hóa châu Âu (ESPEN) 2006, tỷ lệ suy dinh dưỡng chiếm 20-60% bệnh nhân nằm viện và có đến 30-90% bị mất cân đối trong thời gian điều trị, tỷ lệ suy dinh dưỡng ở người bệnh điều trị tích cực (ICU) dao động 38-78% [1]. Tại Việt Nam, tỷ lệ suy dinh dưỡng của người bệnh ICU dao động 35-51%. Có nhiều phương pháp nuôi ăn qua sonde như: nuôi ăn qua sonde mũi - dạ dày, sonde mũi - hồng tràng, mở thông dạ dày, mở thông hồng tràng. Để đánh giá thực trạng nuôi ăn qua sonde, các tác giả tiến hành nghiên cứu với mục tiêu khảo sát thực trạng nuôi ăn bằng súp nhỏ giọt qua sonde tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenducphuckhoacc@gmail.com

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An từ tháng 4/2022 đến tháng 6/2022, ở những người bệnh hôn mê, phẫu thuật đường tiêu hóa, bỏng nặng, hẹp thực quản, suy dinh dưỡng nặng... tại các Khoa: Hồi sức Tích cực, Hồi sức Tích cực Ngoại khoa, Chống độc, Nhiễm khuẩn Tổng hợp, Bỏng, Ngoại tiêu hóa và Trung tâm Đột quỵ.

2.2. Tiêu chuẩn chọn người bệnh

Người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt trên 7 ngày, chức năng đường tiêu hóa hoạt động bình thường, hồ sơ bệnh án đầy đủ thông tin.

Tiêu chuẩn loại trừ: Người bệnh hoặc người nhà người bệnh không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.3. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả tiến cứu.

Cỡ mẫu: 255 người bệnh được chỉ định nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt.

Current situation of enteral tube feeding for patients at Nghe An General Friendship Hospital

Duc Phuc Nguyen^{1*}, Quynh Anh Nguyen²,
Thi Thom Nguyen², Thi Thu Ha Pham²

¹Department of Intensive Care, Nghe An General Friendship Hospital

²Department of Nutrition, Nghe An General Friendship Hospital

Received 9 December 2022; accepted 9 January 2023

Abstract:

Enteral tube feeding is a method to supply nutrients for critically ill patients, reducing the risk of infection, using normal bowel function, avoiding villous atrophy, reducing the possibility of electrolyte imbalance, reducing treatment costs and safe for patients. This paper aims to study the current situation of patients with feeding tubes at Nghe An General Friendship Hospital. The research applied a descriptive prospective method to study 255 patients, from April 2022 to June 2022, in Intensive Care, Surgical Intensive Care, Poison Control Department, General Infections Department, Stroke Center, Burns and Gastrointestinal Surgery Departments. Results showed that the malnutrition rate assessed by BMI (Body mass index) was 14.5%, by MUAC (Mid-upper arm circumference) was 6.7%, by SGA (Subjective global assessment) was 54.9%, by serum albumin index was 79.2%. On the first day of enteral tube feeding, the combining rate of enteral and parenteral nutrition was 45.9%, on the 7th day, it was 8.2%. On the first day, the rate of hypocaloric diet was 18.8%; isocaloric diet was 56.1%; hypercaloric diet was 25.1%. On the 7th day, these rates were 38.4, 55.7, and 5.9% respectively. The total energy intake on the first day and the 7th day achieved 75.5 and 85.9% recommended dietary allowance respectively. In conclusion, the rate of malnourished patients in hospitalised was high (assessed by SGA tool 54.9% and serum albumin index 79.2%), most patients are provided energy to meet the recommended dietary allowance. In the early days, the percentage of patients receiving combined parenteral and enteral was high, then gradually reducing parenteral, switching to complete enteral nutrition.

Keywords: critically ill patients, enteral tube feeding, malnourished patients.

Classification number: 3.2

Biên số nghiên cứu:

- Đặc điểm chung: tuổi, giới tính, ngày vào viện, ngày ra viện, số ngày nằm viện, địa chỉ, chẩn đoán.

- Lâm sàng: chỉ số nhân trắc (chiều cao, cân nặng, BMI), MUAC, thang điểm SGA (người bệnh được đánh giá suy dinh dưỡng khi có BMI<18,5 hoặc chỉ số MUAC<23 cm ở nữ, <24 cm ở nam hoặc SGA điểm B hay C), các dấu hiệu dung nạp đường tiêu hóa (trào ngược, chướng bụng, dịch tồn dư, tiêu chảy sau khi ăn súp).

- Cận lâm sàng: sinh hóa máu (albumin bình thường 35-48 g/l, suy dinh dưỡng khi albumin <35 g/l...).

- Kết quả nuôi ăn bằng súp nhỏ giọt qua sonde: dung nạp đường tiêu hóa, tỷ lệ nuôi ăn theo đường tiêu hóa và tình mạch, tình trạng dinh dưỡng của người bệnh.

Các công cụ nghiên cứu: đánh giá bằng BMI, MUAC, SGA và bảng phân loại suy dinh dưỡng theo albumin huyết thanh.

3. Kết quả

Bảng 1 trình bày các đặc điểm về tuổi, giới tính và thời gian nhập viện của 255 người bệnh tham gia nghiên cứu.

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi, giới tính, thời gian nhập viện.

Đặc điểm	Số người bệnh (n=255)	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	182
	Nữ	73
Tuổi ($\bar{x} \pm SD$) 61,7 $\pm$ 17,7 (22-89)	20-39	29
	40-59	75
	≥ 60	151
Bệnh chính	Hôn mê	180
	Phẫu thuật đường tiêu hóa	20
	Bỏng nặng	1
	Hẹp thực quản	2
	Suy dinh dưỡng nặng	23
	Khác	29
	Tổng	255

Bảng 2. Chỉ số BMI của người bệnh theo giới khi bắt đầu cho ăn qua sonde ($p > 0,05$).

Phân loại BMI	Nam (%)	Nữ (%)	Tổng (%)
BMI ($\bar{x} \pm SD$)	21,6 $\pm$ 2,7	21,2 $\pm$ 2,7	21,5 $\pm$ 2,7
Suy dinh dưỡng (BMI<18,5 kg/m ²)	23 (12,6)	14 (19,2)	37 (14,5)
Bình thường (18,5 $\leq$ BMI $\leq$ 24,9 kg/m ²)	147 (80,8)	53 (72,6)	200 (78,4)
Thừa cân, béo phì (BMI $\geq$ 25 kg/m ²)	12 (6,6)	6 (8,2)	18 (7,1)

Kết quả bảng 2 cho thấy, tỷ lệ suy dinh dưỡng chung theo BMI là 14,5%, trong đó nữ (19,2%) cao hơn nam (12,6%). Tỷ lệ thừa cân béo phì ở nữ (8,2%) cao hơn nam (6,6%).

Bảng 3. Chỉ số MUAC của người bệnh theo giới khi bắt đầu cho ăn qua sonde ($p>0,05$).

Phân loại MUAC	Giới		
	Nam (%)	Nữ (%)	Tổng (%)
MUAC ($\bar{x}\pm SD$)	27,97 $\pm$ 1,93	26,77 $\pm$ 2,83	27,6 $\pm$ 2,3
Suy dinh dưỡng (nam <24 cm, nữ <23 cm)	9 (4,9)	8 (11,0)	17 (6,7)
Không suy dinh dưỡng (nam $\geq$ 24 cm, nữ $\geq$ 23 cm)	173 (95,1)	65 (89,0)	238 (93,3)

Tỷ lệ suy dinh dưỡng đánh giá bằng MUAC là 6,7%, tỷ lệ suy dinh dưỡng ở nữ (11,0%) cao hơn nam (4,9%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) (bảng 3).

Bảng 4. Chỉ số SGA của người bệnh theo giới khi bắt đầu cho ăn qua sonde ($p<0,05$).

Phân loại SGA	Giới		
	Nam (%)	Nữ (%)	Tổng (%)
SGA A (bình thường)	94 (51,7)	21 (28,8)	115 (45,1)
SGA B (suy dinh dưỡng vừa hoặc nhẹ)	35 (19,2)	15 (20,5)	50 (19,6)
SGA C (suy dinh dưỡng nặng)	53 (29,1)	37 (50,7)	90 (35,3)

Tỷ lệ suy dinh dưỡng chung theo SGA là 45,1%, trong đó nữ là 28,8% thấp hơn nam 51,7% (bảng 4).

Bảng 5. Tình trạng dinh dưỡng theo chỉ số albumin huyết thanh của người bệnh theo giới khi bắt đầu cho ăn qua sonde ($p>0,05$).

Phân loại albumin	Giới		
	Nam (%)	Nữ (%)	Tổng (%)
Albumin ($\bar{x}\pm SD$)	30,6 $\pm$ 4,9	30,3 $\pm$ 4,2	30,5 $\pm$ 4,7
Bình thường (35-48 g/l)	40 (22,0)	13 (17,8)	53 (20,8)
Suy dinh dưỡng nhẹ (28-35 g/l)	95 (52,2)	43 (58,9)	138 (54,1)
Suy dinh dưỡng vừa (21-27 g/l)	43 (23,6)	13 (17,8)	56 (22,0)
Suy dinh dưỡng nặng (albumin <21 g/l)	4 (2,2)	4 (5,5)	8 (3,1)

Kết quả bảng 5 cho thấy, tỷ lệ suy dinh dưỡng khi đánh giá bằng albumin huyết thanh là rất cao (79,2%), nữ (82,2%) cao hơn nam (78,0%), mức độ nặng 3,1%, vừa 22% và nhẹ 54,1%.

Bảng 6. Khẩu phần ăn qua sonde ngày thứ 1 của người bệnh.

Thành phần dinh dưỡng	Đường cung cấp		Tổng thành phần dinh dưỡng/ngày	Tỷ lệ % các thành phần dinh dưỡng đường tiêu hóa	Mức đáp ứng so với nhu cầu khuyến nghị*
	Tĩnh mạch	Tiêu hóa			
Năng lượng (kcal)	257,34 $\pm$ 333,5	1015,2 $\pm$ 249,9	1272,5 $\pm$ 310,4	79,8	75,5
Protein (g)	10,9 $\pm$ 14,5	37,8 $\pm$ 8,9	48,7 $\pm$ 13,8	77,6	72,2
Lipid (g)	12,5 $\pm$ 17,1	39,8 $\pm$ 9,8	52,3 $\pm$ 15,3	76,1	79,8
Glucid (g)	24,8 $\pm$ 32,7	141,4 $\pm$ 34,8	166,2 $\pm$ 15,9	85,1	80,5
Vitamin A (UI)	137,3 $\pm$ 680,7	2262,1 $\pm$ 587,6	2399,4 $\pm$ 381,4	94,3	23,9
Vitamin B1 (mg)	0,14 $\pm$ 0,68	1,0 $\pm$ 0,26	1,2 $\pm$ 0,7	88,1	107,3
Vitamin B2 (mg)	0,16 $\pm$ 0,8	0,94 $\pm$ 0,23	1,1 $\pm$ 0,85	85,5	69,0
Vitamin B3 (mg)	1,80 $\pm$ 8,9	16,2 $\pm$ 4,0	17,9 $\pm$ 9,39	90,0	51,3
Vitamin C (mg)	4,9 $\pm$ 24,3	62 $\pm$ 15,5	66,9 $\pm$ 27,3	92,7	66,9
Vitamin D (UI)	8,6 $\pm$ 42,7	464 $\pm$ 117,9	472,6 $\pm$ 126,1	98,2	59,1
Canxi (mg)	-	759,8 $\pm$ 187,1	759,8 $\pm$ 187,1	100	76,0
Kẽm (mg)	-	9,4 $\pm$ 2,4	9,4 $\pm$ 2,4	100	52**
Sắt (mg)	-	10,2 $\pm$ 2,5	10,2 $\pm$ 2,5	100	92,4***

*: nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam 2016; **: khả năng hấp thu kẽm: nhu cầu khuyến nghị kẽm là 18 mg/ngày; ***: khẩu phần có giá trị sinh học sắt cao (15% sắt được hấp thu): khẩu phần có lượng thịt, cá >90 g/ngày hoặc lượng vitamin C >75 mg/ngày.

Kết quả bảng 6 cho thấy, khẩu phần trung bình ngày nuôi ăn qua sonde ngày thứ 1: tổng năng lượng đạt 75,5% nhu cầu khuyến nghị. Trong đó, năng lượng cung cấp qua đường tiêu hóa chiếm 79,8% so với tổng năng lượng, nhu cầu protein đạt 72,2% so với nhu cầu khuyến nghị, glucid đạt 80,5% so với nhu cầu khuyến nghị.

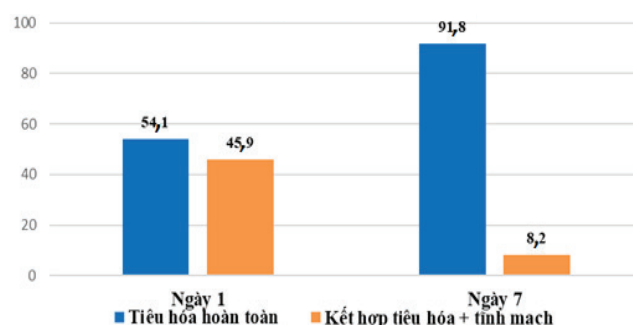
Bảng 7. Khẩu phần ăn qua sonde ngày thứ 7 của người bệnh.

Thành phần dinh dưỡng	Đường cung cấp		Tổng thành phần dinh dưỡng/ngày	Tỷ lệ % các thành phần dinh dưỡng đường tiêu hóa	Mức đáp ứng so với nhu cầu khuyến nghị*
	Tĩnh mạch	Tiêu hóa			
Năng lượng (kcal)	38,5 $\pm$ 154,0	1409,0 $\pm$ 174,9	1447,5 $\pm$ 220,6	97,3	85,9
Protein (g)	1,51 $\pm$ 5,7	56,4 $\pm$ 13	57,9 $\pm$ 17,9	97,4	90,0
Lipid (g)	1,9 $\pm$ 7,8	54,8 $\pm$ 6,9	56,7 $\pm$ 10,0	96,6	86,5
Glucid (g)	3,6 $\pm$ 14,6	172,6 $\pm$ 24,4	176,2 $\pm$ 27,6	98,0	85,3
Vitamin A (UI)	-	3140,6 $\pm$ 389,7	3140,6 $\pm$ 389,7	100	31,4
Vitamin B1 (mg)	-	1,4 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	100	130,9
Vitamin B2 (mg)	-	1,3 $\pm$ 0,16	1,3 $\pm$ 0,16	99,7	82,1
Vitamin B3 (mg)	-	22,6 $\pm$ 2,8	22,6 $\pm$ 2,8	100	64,5
Vitamin C (mg)	-	86,0 $\pm$ 10,7	86,0 $\pm$ 10,7	100	86,0
Vitamin D (UI)	-	531,4 $\pm$ 66,2	531,4 $\pm$ 66,2	100	66,9
Canxi (mg)	-	1055,3 $\pm$ 30,9	1055,3 $\pm$ 30,9	100	105,5
Kẽm (mg)	-	12,8 $\pm$ 1,6	12,8 $\pm$ 1,6	100	71,0**
Sắt (mg)	-	14,1 $\pm$ 1,7	14,1 $\pm$ 1,7	100	128,5***

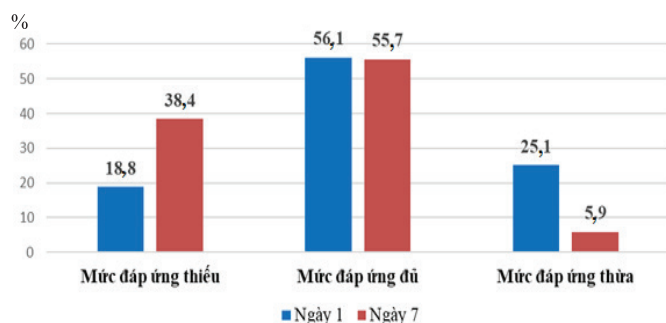
*: nhu cầu dinh dưỡng khuyến nghị cho người Việt Nam 2016; **: khả năng hấp thu kẽm: nhu cầu khuyến nghị kẽm là 18 mg/ngày; ***: khẩu phần có giá trị sinh học sắt cao (15% sắt được hấp thu): khẩu phần có lượng thịt, cá >90 g/ngày hoặc lượng vitamin C >75 mg/ngày.

Kết quả bảng 7 cho thấy, khẩu phần trung bình nuôi ăn qua sonde ngày thứ 7 về năng lượng đạt 85,9% so với nhu cầu khuyến nghị. Trong đó, năng lượng cung cấp qua đường tiêu hóa chiếm 97,3% so với tổng năng lượng, nhu cầu protein đạt 90% so với nhu cầu khuyến nghị, glucid đạt 85,3% và lipid đạt 86,5% so với nhu cầu khuyến nghị.

Tỷ lệ phân bố các đường nuôi ăn của người bệnh được thể hiện ở biểu đồ 1. Kết quả cho thấy, tỷ lệ bổ sung dinh dưỡng tĩnh mạch ngày đầu ăn qua sonde chiếm 45,9%, ngày thứ 7 giảm còn 8,2%.



Biểu đồ 1. Phân bố các đường nuôi ăn của người bệnh.



Biểu đồ 2. Mức đáp ứng nhu cầu năng lượng của từng người bệnh ngày thứ 1 và 7 ăn qua sonde.

Từ biểu đồ 2 có thể thấy, ngày thứ 1 đáp ứng thiếu 18,8%, đáp ứng đủ 56,1%, đáp ứng thừa 25,1%. Ngày thứ 7 đáp ứng thiếu 38,4%, đáp ứng đủ 55,7%, mức đáp ứng thừa 5,9%.

4. Bàn luận

Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $61,7 \pm 17,7$, thấp nhất là 22, cao nhất là 89 tuổi, tuổi ≥ 60 chiếm 59,2%, tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thư và cs (2018) [2], khi tuổi trung bình là $66,7 \pm 15,3$, tuổi trên 60 chiếm 61,9%. Tuổi cao, nguy cơ dinh dưỡng cao hơn có liên quan đến tỷ lệ tử vong cao hơn [3]. Tỷ lệ nam/nữ là 2,5/1, chủ yếu người bệnh ăn sonde tại Khoa Hồi sức (89,1%), nguyên nhân nuôi ăn qua sonde chủ yếu là hôn mê (70,6%).

4.1. Tình trạng dinh dưỡng của người bệnh

Tỷ lệ suy dinh dưỡng khi đánh giá bằng BMI là 14,5%, tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thư và cs (2018) [2] là 16,7%; thấp hơn kết quả nghiên cứu của N.T.L. Hương và cs (2021) [4] là 48,8%. Tỷ lệ thừa cân béo phì trong nghiên cứu của chúng tôi khi đánh giá theo BMI là 7,1%, theo J. Pan và cs (2017) [5], cân nặng quá mức có thể làm tăng nguy cơ mắc một số bệnh đe dọa tính mạng. Đánh giá bằng MUAC ở ngày đầu tiên ăn sonde là 6,7%, đánh giá bằng SGA là 54,9% (19,6% mức độ vừa và nhẹ, 35,3% mức độ nặng, nữ 71,2%, nam 48,3%), tương đương nghiên cứu của N.T.L. Hương và cs (2021) [4] (51,6%) và L.T. Thuý và cs (2019) [6] (56,1%); cao hơn nghiên cứu của N.T. Thu và cs (2018) [2] (35,7%). Theo P.T. Diệp và cs (2021) [7], tỷ lệ suy dinh dưỡng ở người bệnh nhập ICU là 90,3%, trong khi C.C.H. Lew và cs (2017) [8] chứng minh tỷ lệ suy dinh dưỡng ở người bệnh ICU dao động trong khoảng 38-78%. Đánh giá bằng chỉ số albumin huyết thanh là 79,2%, tương đương kết quả nghiên cứu của N.T. Thu và cs (2018) (73,8%) [2].

4.2. Tỷ lệ năng lượng cung cấp và protein so với nhu cầu khuyến nghị [9, 10]

Mức đáp ứng nhu cầu năng lượng ngày thứ 1 là 75,5%, ngày thứ 7 là 85,9%, ngày thứ 1 nuôi ăn qua sonde có 18,8% mức đáp ứng thiếu so với nhu cầu khuyến nghị. Mức đáp ứng đủ 56,1%, mức đáp ứng thừa 25,1%. Kết quả nghiên cứu của Z. Javid và cs (2021) [11] cho thấy, ở ngày thứ 2 nuôi ăn qua sonde chỉ có 16,2% người bệnh được cung cấp đủ năng lượng và 10,2% người bệnh được cung cấp đủ protein ngay từ đầu. Theo khuyến cáo ngày đầu tiên nuôi ăn qua sonde nên nuôi từ 1/3 nhu cầu khuyến nghị tăng dần đến 80% trong 3-5 ngày tiếp theo [9]. Suy dinh dưỡng có liên quan độc lập với kết quả lâm sàng kém hơn trong ICU [8].

Trong nghiên cứu này, năng lượng ngày thứ 1 ăn qua sonde đạt $1272,5 \pm 310,4$ kcal/ngày, tương đương 75,5%, lượng protein đạt 72,2%, trung bình 0,86 g/kg cân nặng/ngày, glucid đạt 80,5%. Nghiên cứu trên 1321 người bệnh ICU, tỷ lệ ăn qua đường ruột ngày thứ 2 đạt $59,2 \pm 37,78\%$ lượng calo và $55,5 \pm 30,04\%$ lượng protein cần thiết [11]. Ngày thứ 2 nuôi ăn qua sonde chưa thể cung cấp đủ 100% nhu cầu năng lượng của người bệnh. Ngày thứ 7 năng lượng đạt 85,9%, đường tiêu hóa chiếm 97,3%, đường tĩnh mạch chiếm 2,7%. Về thành phần tỷ lệ các chất sinh năng lượng protein, lipid, glucid đạt lần lượt là 90, 86,5 và 85,3% [11].

4.3. Tỷ lệ cung cấp vitamin so với nhu cầu khuyến nghị [10]

Vitamin A đạt tỷ lệ thấp 23,9%, vitamin B1 đạt 107,3%, vitamin B2 đạt 69%, vitamin B3 đạt 51,3%, vitamin C đạt 66,9%, vitamin D đạt 59,1%, canxi đạt 76%, kẽm đạt 52% và sắt đạt 92,4% nhu cầu khuyến nghị ở ngày thứ 1. Ngày thứ 7, hàm lượng vitamin A đạt 31,4%, vitamin B1 đạt 130,9%, vitamin B2 đạt 82,1%, vitamin B3 đạt 64,5%, vitamin C đạt 86%, vitamin D đạt 66,9%, canxi đạt 105,5%, kẽm đạt 71,0% và sắt đạt 128,5%.

4.4. Tỷ lệ cung cấp chất khoáng so với nhu cầu khuyến nghị [10]

Nhu cầu canxi ngày thứ 1 đạt 76,0% và 7 đạt 105,5%, kẽm ngày thứ 1 đạt 52% và 7 đạt 71%, sắt ngày thứ 1 đạt 92,4% và 7 đạt 128,5%.

Kết luận

Tỷ lệ suy dinh dưỡng đánh giá bằng chỉ số BMI là 14,5%, MUAC là 6,7%, SGA là 54,9%, đánh giá bằng albumin huyết thanh là 79,2%, nữ cao hơn nam, ngày thứ nhất có 45,9% người bệnh được nuôi qua sonde kết hợp tĩnh mạch, ngày thứ 7 giảm còn 8,2%.

Ngày thứ 1 mức năng lượng đạt 75,5% nhu cầu khuyến nghị, đáp ứng thiếu chiếm 18,8%, đáp ứng đủ 56,1%, đáp ứng thừa 25,1%. Ngày thứ 7 mức năng lượng đạt 85,9%, đáp ứng thiếu tăng lên 38,4%, đáp ứng đủ 55,7%, đáp ứng thừa 5,9%.

Các thành phần dinh dưỡng chưa đạt nhu cầu, các vitamin và chất khoáng đạt tỷ lệ khá cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R. Scott, T.E. Bowling (2015), "Enteral tube feeding in adults", *J. R. Coll. Physicians Edinb.*, **45(1)**, pp.49-54, DOI: 10.4997/jrpe.2015.112.

[2] N.T. Thu, N.T.T. Hien, T.V. Dung, et al. (2018), "Assessment of nutritional status and related factors in critically ill patients at the Infectious Resuscitation Department, Central Military Hospital 108", *Journal of Nursing Science*, **1(4)**, pp.14-20 (in Vietnamese).

[3] A. Gatta, A. Verardo, M. Bolognesi et al. (2012), "Hypoalbuminemia", *Intern. Emerg. Med.*, **7**, pp.193-199, DOI: 10.1007/s11739-012-0802-0.

[4] N.T.L. Huong, T.T. Anh, H.G. My, et al. (2021), "Effective feeding with high-energy nutritional solution on critically ill patients receiving tube feeding at Phu Tho Provincial General Hospital in 2020", *Journal of Preventive Medicine*, **31(9)**, pp.251-257 (in Vietnamese).

[5] J. Pan, R. Shaffer, Z. Sinno, et al. (2017), "The obesity paradox in ICU patients", *39th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, IEEE Publisher, DOI: 10.1109/EMBC.2017.8037576.

[6] L.T. Thuy, L.V. Hoi, N.T.L. Huong, et al. (2019), "Nutritional status according to the SGA method and some related factors of pulmonary tuberculosis in patients treated at the Department of Respiratory Tuberculosis, Central Lung Hospital in 2018", *Journal Vietnamese Medical Journal*, **481(2)**, pp.226-230 (in Vietnamese).

[7] P.T. Diep, P.D. Tuong (2021), "Nutrition risk and some related factors in patients admitted to the Intensive Care Department, Agricultural General Hospital in 2020", *Journal of Medical Research*, **142(6)**, pp.126-132 (in Vietnamese).

[8] C.C.H. Lew, R. Yandell, R.J.L. Fraser, et al. (2017), "Association between malnutrition and clinical outcomes in the Intensive Care Unit: A systematic review", *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, **41(5)**, pp.744-758, DOI: 10.1177/0148607115625638.

[9] L.N. Tam (2019), *Nutritional Guidelines for Treating Seriously Ill Patients*, Medical Publishing House one member Company Limited, 83pp (in Vietnamese).

[10] Institute of Nutrition (2016), *Recommended Nutritional Needs for Vietnamese People*, Medical Publishing House one member Company Limited, 184pp (in Vietnamese).

[11] Z. Javid, M. Shadnough, M.K. Rezaian, et al. (2021), "Nutritional adequacy in critically ill patients: Result of PNSI study", *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.*, **40(2)**, pp.511-517.

Kết quả ghép thận và xử trí các biến chứng sớm sau ghép thận từ người cho sống tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên

Lê Thị Hương Lan^{1*}, Trần Ngọc Tuấn²

¹Khoa Sinh hóa, Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên, 479 Lương Ngọc Quyến, phường Phan Đình Phùng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Khoa Ngoại tiết niệu, Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên, 479 Lương Ngọc Quyến, phường Phan Đình Phùng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/6/2022; ngày chuyển phản biện 10/6/2022; ngày nhận phản biện 8/7/2022; ngày chấp nhận đăng 12/7/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả phẫu thuật ghép thận từ người cho sống tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên, khảo sát các biến chứng ngay sau ghép và kết quả xử trí các biến chứng. Nghiên cứu sử dụng phương pháp quan sát mô tả, chọn mẫu toàn bộ trên 29 bệnh nhân (BN) được ghép thận đủ tiêu chuẩn lựa chọn, có chỉ định ghép thận. Kết quả cho thấy, 24/29 (82,8%) BN phẫu thuật lấy thận trái, chỉ có 5/29 (17,2%) BN lấy thận phải. Phẫu thuật nối động mạch thận tận - tận có 24/29, 5 trường hợp còn lại nối động mạch thận tận - bên. 100% các trường hợp thận ghép đặt vào hố chậu phải. Có 5 trường hợp tạo hình động mạch kiểu nòng súng, 29/29 trường hợp khâu nối tĩnh mạch thận với tĩnh mạch chậu ngoài. 100% các ca ghép trồng niệu quản vào bàng quang theo kỹ thuật Lich - Gregoir. Tất cả các BN ghép thận đều có nước tiểu ngay trên bàn mổ, thể tích nước tiểu sau 24 giờ trung bình là 6.327 ± 2.479 ml, sau 4 tuần thể tích nước tiểu là 2.983 ± 1.784 ml. Sau 5 ngày chức năng thận trở lại gần bình thường với nồng độ ure trung bình $8,2 \pm 6,0$ mmol/l, creatinin $118,3 \pm 27,52$ μ mol/l và kali $4,1 \pm 0,6$ mmol/l. Xử lý kịp thời các biến chứng ngoại khoa: có khối dịch quanh thận (5/29) và tụ máu (1/29); xử trí: mổ lại, hút dịch quanh thận; 3 trường hợp hỗ trợ chạy thận nhân tạo. Nhiễm trùng tại chỗ vết mổ (1/29) và đường tiết niệu do *E. Coli*, nấm từ âm đạo (1/29). Xử trí: cấy nước tiểu, làm kháng sinh đồ, điều trị kháng sinh. Tóm lại, 29/29 (100%) BN ghép thận từ người cho sống thành công, phẫu thuật lấy thận trái là chủ yếu. Phẫu thuật nối động mạch thận tận - tận chiếm đa số. Biến chứng sớm sau ghép là có khối dịch quanh thận, tụ máu, nhiễm trùng với tỷ lệ thấp, kết quả xử trí các biến chứng BN ổn định.

Từ khóa: biến chứng sau ghép, phẫu thuật ghép thận, xử trí biến chứng.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Ghép thận là phẫu thuật lấy một quả thận khỏe mạnh của người hiến tặng còn sống hoặc đã chết não để cấy ghép vào cơ thể BN bị suy thận nặng không hồi phục. Đây là phương pháp điều trị tốt nhất cho BN suy thận giai đoạn cuối có chỉ định được ghép, sau ghép nguy cơ tử vong ở BN ghép thận chỉ bằng một nửa so với BN lọc máu chu kỳ [1-4], đời sống của BN được cải thiện đáng kể so với các phương pháp điều trị khác.

Hiện nay, nhu cầu ghép thận trên thế giới cũng như ở Việt Nam là rất lớn. Tại Việt Nam, 19 trung tâm ghép thận đã ra đời. Số BN được ghép thận đến nay ước tính >3000. Ghép thận hiện nay đã có nhiều tiến bộ vượt bậc nhờ sự chuẩn hóa về kỹ thuật của phẫu thuật viên, sự hỗ trợ của trang thiết bị hiện đại, gây mê hồi sức và xét nghiệm cũng như thuốc chống thải ghép. Ê kíp ghép thận gồm 3 nhóm kỹ thuật: lấy thận, rửa thận, ghép thận và nhóm theo dõi sau ghép thực hiện đồng bộ theo các quy trình đã xây dựng của Bộ Y tế (2006) [5]. BN đã đủ điều kiện ghép sẽ thực hiện phẫu thuật ghép thận. Quyết định ghép thận phải hay thận trái, nối mạch thận kiểu nào là phụ thuộc vào chức năng thận cho và độ dài, đường kính của động mạch thận sao cho thuận tiện khi ghép. Căn cứ vào tiêu chuẩn đánh giá cuộc ghép thành công mà phẫu thuật viên đánh giá kết quả ghép thành công hay không.

*Tác giả liên hệ: Email: lanhuong.bvtutn@gmail.com

Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên là trung tâm ghép thận thứ 15 của cả nước đã áp dụng thành công quy trình ghép thận từ người cho sống. Nhằm nghiên cứu, đánh giá kết quả phẫu thuật ghép thận tại Bệnh viện và xem xét những biến chứng sớm sau ghép để có kinh nghiệm, phương án xử trí kịp thời trong quá trình ghép thận nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài nhằm: 1) Đánh giá kết quả phẫu thuật ghép thận từ người cho sống tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên; 2) Khảo sát các biến chứng ngay sau ghép và kết quả xử trí các biến chứng sau ghép thận từ người cho sống.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

29 BN được ghép thận có đủ điều kiện lựa chọn nghiên cứu.

Tiêu chuẩn chọn BN: Tất cả BN ghép thận tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên được thực hiện các bước tuyển chọn theo quy định.

- Chỉ định ghép thận:

+ Người nhận thận: Ghép thận chỉ định cho người suy thận giai đoạn cuối (IIIb, IV), có nguyện vọng ghép thận, >18 tuổi và <60 tuổi, tình trạng tim mạch đã ổn định, huyết áp kiểm soát tốt.

Results of kidney transplant and monitoring of complications in the patients after kidney transplantation from living donors in Thai Nguyen National Hospital

Thi Huong Lan Le^{1*}, Ngoc Tuan Tran²

¹Department of Biochemistry, Thai Nguyen National Hospital, 479 Luong Ngoc Quyen Street, Phan Dinh Phung Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

²Department of Urology, Thai Nguyen National Hospital, 479 Luong Ngoc Quyen Street, Phan Dinh Phung Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 7 June 2022; revised 8 July 2022; accepted 12 July 2022

Abstract:

This study aims to evaluate the results of kidney transplant surgery from living donors at Thai Nguyen National Hospital and investigate complications immediately after transplantation and the results of management of complications after kidney transplantation. The study used descriptive observation and whole sampling methods, on 29 patients with a kidney transplant were eligible for selection, with indications for a kidney transplant. Results showed that 24/29 (82.8%) of surgery cases are left kidney transplants, only 5/29 (17.2%) cases are right kidney transplants. End-to-end anastomosis was 24 cases, the remaining 5 cases are en to side. 100% of kidney transplants are placed in the right iliac fossa. There are 5 cases of gun barrel angioplasty; 29/29 cases of external iliac vein anastomosis. 100% of ureteral transplants to the bladder follow the Lich - Gregoir technique. All kidney transplant patients had urine on the operating table, the average urine volume after 24 hours was $6,327 \pm 2,479$ ml. After 4 weeks, the urine volume was $2,983 \pm 1,784$ ml. After 5 days, kidney function nearly returned to normal, average urea concentration: 8.2 ± 6.0 mmol/l; creatinine: 118.3 ± 27.52 μ mol/l, kali: 4.1 ± 0.6 mmol/l. timely treatment of surgical complications: perirenal fluid block (5/29); hematoma (1/29); treatment: re-operation, aspiration of fluid around the kidney; 3 cases supported hemodialysis. Infectious complications: infection at the surgical site (1/29); have urinary tract infections caused by *E. coli* and vaginal yeast (1/29). Treatment with antibiotics, urine culture, antibiotic susceptibility testing. In conclusions, 29/29 (100%) patients with a kidney transplant from living donors had successful surgery, the left kidney surgery was the main one. The majority of the surgical method was end-to-end anastomosis. Complications after transplantation are perirenal fluid mass, hematoma, infection with a low rate, the results of the management of complications are stable.

Keywords: complications after transplantation, kidney transplant surgery, management of complications.

Classification number: 3.2

+ Người cho thận: Có tình trạng toàn thân, mạch máu tốt để có thể tiến hành phẫu thuật lấy thận.

- Chống chỉ định: Người bệnh bị ung thư, nhiễm khuẩn cấp chưa khống chế, rối loạn tâm thần, chưa kiểm soát, bệnh cường giáp chưa điều trị ổn định, xơ gan hoặc viêm gan mạn hoạt động, nhiễm HIV, lao, giang mai, lupus ban đỏ, viêm cầu thận tăng sinh màng, viêm cầu thận có kháng thể kháng màng nền thận; bệnh Berger và cần cân nhắc trường hợp có bệnh đái tháo đường.

Tiêu chuẩn loại trừ: BN thuộc nhóm chống chỉ định, BN không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Máu của BN được lấy tại các thời điểm sau ghép. Xét nghiệm sinh hóa máu, nước tiểu và định lượng tacrolimus được theo dõi hàng ngày. BN ghép thận được khám hàng ngày theo mẫu bệnh án nghiên cứu, các kết quả khám được ghi chép đầy đủ vào hồ sơ bệnh án.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Quan sát mô tả.

Thu thập số liệu:

- Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu: tuổi, địa chỉ, nghề nghiệp, tiền sử bệnh tật, mạch, nhiệt độ, huyết áp, chỉ số khối cơ thể (BMI), thủ tục pháp lý cho từng cặp BN được ghép, nguồn thận cho.

- Các dấu hiệu lâm sàng và cận lâm sàng trong ghép và sau ghép: thực hiện hỏi, thăm khám BN theo mẫu bệnh án nghiên cứu.

2.3. Phác đồ sử dụng thuốc ức chế miễn dịch trong ghép thận

Phần lớn BN được sử dụng phác đồ 3 thuốc: Thuốc CNI(Tac), thuốc chống tăng sinh tế bào lympho T (MMF, 1 BN sử dụng AZA) và corticoid.

2.4. Phương pháp phẫu thuật

Kỹ thuật ghép trên người gồm lấy thận ghép, rửa thận và ghép thận.

+ Phẫu thuật lấy thận: phẫu thuật mở lấy thận: bóc lộ niệu quản, bảo tồn mạch nuôi niệu quản, các thành phần cuống thận phẫu tích độ dài tối đa có thể. Niệu quản giải phóng xuống cách bề thận 15-20 cm.

+ Rửa thận: thận được rửa bằng dung dịch Custodiol.

+ Kỹ thuật ghép thận: Đặt thận vào hố chậu phải, khâu nối động mạch thận với động mạch chậu tận - tận hoặc tận - bên, khâu nối tĩnh mạch thận với tĩnh mạch chậu ngoài, trồng bàng quang theo kỹ thuật Lich - Gregoir. 10 cặp ghép thận đầu tiên có sự tham gia của chuyên gia từ Bệnh viện Quân y 103, từ cặp thứ 11 trở đi, các bác sỹ Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên chủ động thực hiện.

2.5. Các chỉ tiêu đánh giá chất lượng

Tiêu chuẩn đánh giá ghép thận thành công:

+ Lấy thận: Thận lấy nhanh gọn, không gây tổn thương, kết quả mạch máu và niệu quản đủ dài, đảm bảo thuận lợi khi nối ghép.

+ Rửa thận: Thực hiện cho đến khi thận có màu trắng ngà, trắng đều, dịch rửa chảy ra từ tĩnh mạch thận ghép trong.

+ Ghép thận: Sau khi thận được ghép, kiểm tra không có chảy máu khi mở clamp tĩnh mạch chậu ngoài, quan sát màu sắc thận ghép: Nếu mạch máu căng, động mạch đập tốt, thận tươi, hồng và căng là dấu hiệu tốt. Sau khoảng 2-5 phút thấy niệu quản có nhu động và xuất hiện những giọt nước tiểu đầu tiên là thận ghép thành công.

Xét nghiệm đánh giá chức năng thận: Creatinin máu trở về bình thường khi: nam là 62-115 $\mu\text{mol/l}$, nữ 44-88 $\mu\text{mol/l}$, ure máu 2,5-8,3 mmol/l. Lượng nước tiểu duy trì 2 ml/kg/giờ, ngày đầu đạt ở mức 300-500 ml/giờ [5].

Các trị số xét nghiệm theo hằng số sinh học người Việt Nam và các tài liệu công bố theo chuyên ngành [2, 5].

2.6. Thu thập và xử lý số liệu

Lập bệnh án nghiên cứu: Những số liệu và kết quả nghiên cứu được ghi chép và lưu trữ trong bệnh án.

Các số liệu nghiên cứu được xử lý bằng các chương trình thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm Epidata 3.1 và Stata 10. Các phép so sánh có $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng đạo đức Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên cho phép thực hiện. Các thông tin về kết quả nghiên cứu đảm bảo được giữ bí mật.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Một số thông tin chung của nhóm BN ghép thận.

Chỉ tiêu	Nhóm BN ghép thận (mean±SD)		p
	n	%	
Giới tính	Nam	18	62,1
	Nữ	11	37,9
Tuổi tại thời điểm ghép (tuổi)	32,9±11,4		<0,05
Thời gian chạy thận nhân tạo trước ghép (tháng)	12,8±10,4		
BMI (kg/m²)	20,8±2,56		
Nguyên nhân suy thận mạn:			
- Viêm cầu thận mạn	19	65,5	
- Tăng huyết áp	2	6,9	
- Hội chứng thận hư	2	6,9	
- Nguyên nhân khác	6	20,7	

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ nam ở nhóm BN ghép thận chiếm khoảng 2/3. Điều này phù hợp với tỷ lệ suy thận mạn chung trong dân số là nam nhiều hơn nữ [2], tuổi trung bình ở nhóm BN ghép thận là 32,9 $\pm$ 11,4. Độ tuổi ghép thận nhiều nhất là 14-50

(86,2%), độ tuổi >50 là 13,8%. Theo nghiên cứu của Đỗ Ngọc Sơn và cs (2018a) [4] ở 101 BN ghép thận từ người cho sống cho thấy, độ tuổi trung bình tại thời điểm ghép là 36,7 $\pm$ 7,5, tỷ lệ ghép thận nhiều nhất là 21-55 tuổi. Tuổi tại thời điểm ghép càng cao càng làm gia tăng nguy cơ tử vong do bệnh tim mạch, bệnh ác tính và các biến chứng nhiễm trùng liên quan đến tình trạng suy giảm miễn dịch quá mức. Nguyên nhân suy thận chủ yếu là viêm cầu thận mạn (19/29) chiếm 65,5%, không rõ nguyên nhân chỉ có dấu hiệu là một mồi đi khám phát hiện suy thận là 6/29 (20,7%) [2].

Bảng 2. Tỷ lệ phân bố nguồn cho thận.

Nguồn cho thận	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Người cho sống	29	100
Bố, mẹ	17	58,6
Anh, em ruột	4	13,8
Không cùng huyết thống	8	27,6

100% BN được ghép tại Bệnh viện từ nguồn cho sống (bảng 2). Trong đó, chủ yếu nguồn thận từ gia đình: bố mẹ cho con cái (58,6%), anh em ruột (13,8%). Đây cũng là yếu tố thuận lợi cho thành công của các cặp ghép khi cùng huyết thống thì tỷ lệ hòa hợp HLA cao, liều thuốc ức chế miễn dịch thấp hơn, tỷ lệ thành công của cuộc ghép tốt hơn. Theo báo cáo của Cơ quan điều phối tạng ghép Liên bang Hoa Kỳ (United Network of Organ Sharing - UNOS) cho thấy, tuổi thận cho càng cao thì mức lọc cầu thận (MLCT) cũng như hoạt động bù trừ của thận càng giảm do số đơn vị thận hoạt động giảm theo tuổi, đây có thể là nguyên nhân gây bệnh thận ghép mạn tính [6]. Nghiên cứu này có một người cho thận tuổi cao nhất là 61 (cha cho con), còn lại người cho thận có độ tuổi tương đối trẻ.

Bảng 3. Kết quả xạ hình đánh giá chức năng thận ở người cho thận.

MLCT (ml/phút)	MLCT nhỏ nhất	MLCT lớn nhất	MLCT trung bình
Tổng 2 thận	90	156	114,99 $\pm$ 9,9
Riêng thận cho	41,3	76,5	53,98 $\pm$ 9,93

Kết quả bảng 3 cho thấy, người cho thận có MLCT tốt, trung bình tổng hai thận của người cho là 114,99 $\pm$ 9,9 (nhỏ nhất là 90, lớn nhất 156), riêng thận cho trung bình 53,98 $\pm$ 9,93 (nhỏ nhất 41,3, lớn nhất 76,5). Căn cứ vào kết quả xạ hình thận, đánh giá MLCT và hình ảnh chụp mạch thận sẽ quyết định lựa chọn thận lấy từ người cho. Nguyên tắc lấy thận là lấy quả có chức năng kém hơn, để lại quả có chức năng thận tốt cho người hiến thận [4, 6]. Hầu hết trong nhóm BN ghép khi xạ hình chức năng thận thì thận phải có MLCT lớn hơn thận trái, có 3 trường hợp MLCT ở thận phải nhỏ hơn thận trái, do vậy 2 trường hợp mạch thận trái quá ngắn phải phẫu thuật lấy thận phải để ghép cho người nhận. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các nghiên cứu thực hiện ở Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức [4, 6].

3.2. Kết quả phẫu thuật ghép thận từ người cho sống

Bảng 4. Kết quả phẫu thuật lấy thận, rửa thận và ghép thận.

Cách thức phẫu thuật	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Lấy thận trái	24	82,8
Lấy thận phải	5	17,2
Rửa thận thành công	29	100
Phẫu thuật nối động mạch thận tận - tận	24	82,8
Phẫu thuật nối động mạch thận tận - bên	5	17,2
Thận ghép đặt vào hố chậu phải	29	100
Tạo hình động mạch kiểu nòng súng	5	17,2
Khâu nối tĩnh mạch thận với tĩnh mạch chậu ngoài	29	100
Trồng niệu quản vào bàng quang theo kỹ thuật Lich - Gregoir.	29	100

Kết quả bảng 4 cho thấy, trong 29 BN ghép, 24 BN lấy thận trái, 5 BN lấy thận phải. 100% các trường hợp rửa thận thành công. 24/29 trường hợp khâu nối động mạch thận tận - tận với động mạch chậu trong và 5/29 BN nối tận - bên với động mạch chậu ngoài; 5/29 trường hợp phải tạo hình động mạch kiểu nòng súng; 29/29 trường hợp khâu nối tĩnh mạch thận với tĩnh mạch thận chậu ngoài; 100% trồng niệu quản vào bàng quang theo kỹ thuật Lich - Gregoir. Kết quả phẫu thuật thành công 100%. Kỹ thuật ghép thận từ người cho sống của chúng tôi cũng tương tự như kết quả ghép thận tại Bệnh viện Quân y 103 [1, 2], Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức [4, 6] và nước ngoài [7, 8].

3.3. Kết quả đánh giá thành công của ca ghép thận

Bảng 5. Kết quả đánh giá phẫu thuật thành công ngay sau ghép.

Kết quả sau ghép	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Có nước tiểu ngay trên bàn mổ sau 2-5 phút	29	100
Phẫu thuật thành công	29	100
Theo dõi dài hạn chức năng thận ổn định	6 tháng	1
	1 năm	2
	3 năm	22
	>5 năm	4

Ngay sau ghép thận, 29/29 BN có nước tiểu trên bàn mổ (bảng 5). Theo tiêu chuẩn đánh giá sự thành công của ghép thận, khi mở Bulldog tĩnh mạch và động mạch thận quan sát màu sắc thận ghép: Nếu thấy mạch máu căng, động mạch đập tốt, thận tươi hồng và căng là dấu hiệu tốt. Sau khoảng 2-5 phút, thấy niệu quản có nhu động và xuất hiện những giọt nước tiểu đầu tiên là dấu hiệu tốt. Đây là dấu hiệu quan trọng đánh giá chức năng thận mới ghép đã hoạt động, chứng tỏ sự thành công của ca ghép thận. BN tiếp tục được theo dõi chức năng thận chặt chẽ sau ghép đến khi ra viện. 22 BN đã theo dõi chức năng thận ổn định 3 năm, 4 BN chức năng thận ổn định >5 năm.

Bảng 6. Kết quả thay đổi nước tiểu của BN sau ghép thận.

Thời gian (giờ)	Thể tích nước tiểu trung bình (ml/24 giờ)	Vô niệu (n)	Thiểu niệu (n)	Nước tiểu bình thường (n)
Trước ghép	630±589,6	13/29	9/29	7/29
Trên bàn mổ	Có nước tiểu	29/29 (100%)		
Sau ghép 24 giờ	6.327±2.479	Nhỏ nhất: 3.220 ml, lớn nhất: 10.900 ml		
Sau 4 tuần	2.983±1.784	Nhỏ nhất: 2.000 ml, lớn nhất: 9.000		

Nước tiểu là dấu hiệu khẳng định thận có chức năng sau ghép. Trước ghép có 13/29 BN vô niệu, 9/29 BN thiểu niệu, thể tích nước tiểu trung bình chỉ 630±589,6 ml/24 giờ do thận suy hạn chế chức năng bài tiết nước tiểu (bảng 6). Sau ghép thận mới 2-5 phút xuất hiện giọt nước tiểu đầu tiên đánh dấu thận mới hoạt động, vài giờ sau thể tích nước tiểu tăng rõ rệt so với trước ghép. Lượng nước tiểu ở BN ghép thận hoàn toàn phù hợp theo tiêu chuẩn lượng nước tiểu sau ghép trung bình 2 ml/kg/giờ [5].

Bảng 7. Các chỉ số hóa sinh đánh giá chức năng thận ghép 5 ngày đầu.

Thời gian	n	Ure (mmol/l)	Creatinin (μmol/l)	Kali (mmol/l)
Trước ghép 1 giờ	29	18,89±11,3	658,0±25,32	4,4±0,80
Sau ghép 2 giờ	29	14,20±7,4	409,0±364,50	4,2±0,76
Sau ghép 24 giờ	29	13,49±7,3	346,0±242,02	4,1±0,70
Sau ghép 48 giờ	29	12,9±9,0	148,50±120,25	4,1±0,60
5 ngày sau ghép	29	8,2±6,0	118,3±27,52	4,1±0,60

Kết quả bảng 7 cho thấy, nồng độ ure máu giảm ngay sau ghép so với trước ghép, nồng độ giảm dần ngay những ngày đầu tiên. Đến ngày thứ 5 sau ghép, nồng độ ure bình thường 8,2±6,0 mmol/l; nồng độ creatinin máu giảm mạnh sau ghép, sau 24 giờ nồng độ này giảm 1/2 so với trước ghép, sau ghép 5 ngày nồng độ creatinin trung bình là 118,3±27,52 μmol/l. Có 3/29 BN có biến chứng sau ghép, sau 5 ngày creatinin vẫn ở mức cao và được chỉ định hỗ trợ lọc máu nhân tạo. Sau lọc máu chức năng thận ổn định trở về bình thường sau 2-4 tuần điều trị. Với những BN kali máu cao, lọc máu trước ghép 1 ngày, do vậy nồng độ kali được kiểm soát trung bình trước ghép 1 giờ là 4,4±0,8 mmol/l (BN có nồng độ kali cao nhất được ghép là 5,8 mmol/l), sau ghép nồng độ kali được theo dõi ổn định trong giới hạn bình thường 5 ngày sau ghép (4,1±0,60 mmol/l). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của N.T. Hoa (2012) [2].

Bảng 8. Kết quả xét nghiệm huyết học và đánh giá MLCT sau ghép thận 4 tuần.

Kết quả	Trước ghép	Sau ghép 4 tuần	p
Hemoglobin trước ghép (g/l)	99,9±24,4	117,9±16,17	<0,05
MLCT (ml/phút)	4,8±2,7	53,98±9,9	<0,001

Sau ghép thận chức năng thận trở lại bình thường, tình trạng thiếu máu của BN được cải thiện do chức năng thận phục hồi kết hợp tình trạng dinh dưỡng tốt (bảng 8). MLCT ở BN nhận thận sau ghép cải thiện rõ rệt so với trước ghép, chứng tỏ chức năng thận được ghép hoạt động tốt.

Bảng 9. Các biến chứng ngay sau ghép thận từ người cho sống.

Biến chứng người nhận thận	Số lượng	Cách xử trí	Kết quả xử trí
Khối dịch quanh thận	5/29	3 BN mổ lại	BN ổn định ra viện
Tụ máu quanh thận	1/29	3 BN lọc máu hỗ trợ (thận nhân tạo)	BN ổn định ra viện
Nhiễm trùng vết mổ sau ghép	1/29	Nhiễm trùng tại chỗ, điều trị kháng sinh theo kháng sinh đồ	BN ổn định ra viện
Nhiễm trùng đường tiết niệu	1/29	Do <i>E. coli</i> , nấm candida, điều trị kháng sinh	BN ổn định ra viện

Ở BN nhận thận sau ghép có 1 BN tụ máu quanh thận (bảng 9). Xử trí 3 BN mổ lại, hút dịch, cầm máu, đặt sone dẫn lưu; 3 BN có lọc máu hỗ trợ. Kết quả sau xử trí BN ổn định ra viện sau 2-4 tuần điều trị.

Nhiễm trùng sau ghép: 2 BN (nhiễm trùng tại vết mổ và đường tiết niệu). Xử trí vết mổ: Cấy nước tiểu dùng kháng sinh theo kháng sinh đồ. Kết quả cho thấy, 2/2 BN sau điều trị nhiễm trùng ổn định ra viện sau 7 ngày.

4. Kết luận

29/29 BN ghép thận từ người cho sống thành công, chức năng thận hoạt động bình thường. Tất cả các BN ghép thận đều có nước tiểu ngay trên bàn mổ, thể tích nước tiểu sau 24 giờ trung bình là 6.327 ± 2.479 ml, sau 4 tuần là 2.983 ± 1.784 ml. Sau 5 ngày chức năng thận trở lại gần bình thường, nồng độ ure máu trung bình là $8,2 \pm 6,0$ mmol/l, creatinin máu $118,3 \pm 27,52$ μ mol/l, kali $4,1 \pm 0,6$ mmol/l.

Về kỹ thuật ghép thận: 24/29 (82,8%) BN lấy thận trái, 5/29 (17,2%) BN lấy thận phải. Phẫu thuật nối động mạch thận tận - tận chiếm tỷ lệ cao (82,8%). 100% các trường hợp thận ghép đặt vào hố chậu phải. Có 5 trường hợp tạo hình động mạch thận kiểu nông sùng; 29/29 trường hợp khâu nối tĩnh mạch thận với tĩnh mạch chậu ngoài. 100% các ca ghép trồng niệu quản vào bàng quang theo kỹ thuật Lich - Gregoir.

Về biến chứng sớm được ghi nhận và xử lý kịp thời: có khối dịch quanh thận (5/29), tụ máu (1/29), 3 BN đã được mổ lại, hút dịch quanh thận, 3 BN hỗ trợ chạy thận nhân tạo. 2 BN có biến chứng nhiễm trùng tại chỗ vết mổ và đường tiết niệu. Xử trí bằng cách cấy nước tiểu, điều trị kháng sinh theo kháng sinh đồ. Cả 2 BN đều ổn định ra viện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.V. Manh, D.T. Cuong (2009) "Research on kidney transplant function and some common complications after kidney transplant", *Journal of Military Pharmaco-medicine*, **34(3)**, pp.30-35 (in Vietnamese).
- [2] N.T. Hoa (2012), *Research on Changes in Biochemical Indexes in Kidney Transplant Patients Treated with Cyclosporin or Tacrolimus*, Doctoral Thesis in Medicine, Hanoi Medical University, 114pp (in Vietnamese).
- [3] V.N. Thang, L.A. Tuan (2022), "Evaluation of some kidney and vascular transplant characteristics of living donor kidney transplant at Military Hospital 103", *Vietnam Medical Journal*, **517**, pp.207-211 (in Vietnamese).
- [4] D.N. Son (2018a), "Results of ureteral-bladder implantation surgery in kidney transplantation from living donors at Viet Duc Friendship Hospital in 101 cases", *Vietnam Medical Journal*, **472(2)**, pp.33-36 (in Vietnamese).
- [5] Ministry of Health (2006), *Decision No. 43/2006/QĐ-BYT dated 29 December 2006 Promulgating Technical Procedures for Kidney Transplantation from Living Donors and Technical Procedures for Liver Transplantation from Living Donors* (in Vietnamese).
- [6] D.N. Son, T.H. Thang, T.T.K. Thanh (2018b), "Results of kidney transplant surgery from living donors at Viet Duc Friendship Hospital", *Vietnam Medical Journal*, **471(2)**, pp.1-4 (in Vietnamese).
- [7] D.A. Axelrod, K.P. McCullough, E.D. Brewer, et al. (2010), "Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1999-2008: The changing face of living donation", *Am. J. Transplant.*, **10(4)**, pp.987-1002, DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03022.x.
- [8] J. Vella (2021), "Kidney transplantation in adults: Patient survival after kidney transplantation", *Uptodate*, <https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-adults-patient-survival-after-kidneytransplantation>, accessed 2 May 2022.

Nghiên cứu định lượng hỗn hợp 3 thành phần paracetamol, ibuprofen và caffeine trong chế phẩm viên nang bằng quang phổ tử ngoại tỷ đối

Nguyễn Đức Thiện^{1*}, Nguyễn Ngọc Ánh²

¹Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Lớp M1 K74, Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 11/10/2022; ngày gửi phản biện 14/10/2022; ngày nhận phản biện 10/11/2022; ngày chấp nhận đăng 15/11/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu sử dụng quang phổ tử ngoại tỷ đối để xác định nồng độ các chất trong hỗn hợp 3 thành phần chứa paracetamol (PA), ibuprofen (IBU) và caffeine (CA) mà không cần xử lý hóa học. Dung môi sử dụng trong phân tích là hỗn hợp ethanol và nước, đảm bảo thân thiện môi trường và an toàn cho người sử dụng. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối là dựa vào hiệu số giữa biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối ở 2 bước sóng để xây dựng phương trình hồi quy, thông số phân tích. Hai bước sóng được chọn trong phổ tử ngoại tỷ đối với PA, IBU, CA lần lượt là 246 và 275 nm, 218 và 245 nm, 244 và 278 nm. Khoảng nồng độ xét tuyến tính với PA và IBU là 4-40 µg/ml, với CA là 0,8-8 µg/ml; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của PA, IBU, CA lần lượt là 0,78, 1,18, 0,38 µg/ml và 2,37, 3,59, 1,17 µg/ml. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối đã xác định thành công nồng độ 3 chất trong hỗn hợp thuốc trong phòng thí nghiệm và thuốc thương mại.

Từ khóa: caffeine, định lượng, ibuprofen, paracetamol, quang phổ tử ngoại tỷ đối, 3 thành phần.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

PA là một loại thuốc không steroid (Non-steroidal anti-inflammatory drug -NSAID), được coi là một trong những thuốc giảm đau được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới, mặc dù PA cực kỳ độc với gan. IBU là thuốc NSAID dùng đường uống có đặc tính giảm đau, hạ sốt và được sử dụng rộng rãi trong điều trị viêm khớp. CA là một trong những loại thuốc giảm đau phổ biến nhất, hoạt động bằng cách ngăn chặn tác dụng của adenosine, là chất dẫn truyền thần kinh giúp thư giãn não bộ và chống sự mệt mỏi cơ thể. Sự hấp thụ PA tăng lên khi kết hợp với CA, giúp tăng tác dụng giảm đau [1], trong khi đó tác dụng chống viêm của IBU được tăng gấp đôi khi dùng bằng liều có kết hợp với CA [2]. Việc sử dụng PA và IBU trong một công thức khi kết hợp với thuốc NSAID mang lại hiệu quả giảm đau vượt trội hơn so với từng loại thuốc riêng lẻ [3].

Có nhiều nghiên cứu đưa ra các phương pháp xác định đồng thời PA và CA, PA và IBU, IBU và CA. Tuy nhiên, để xác định đồng thời PA, IBU và CA chỉ có một số phương pháp như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [1], quang phổ tử ngoại tỷ đối và đạo hàm [4-6], điện hóa [7]. Phương pháp HPLC có độ tin cậy, độ bền, độ chọn lọc cao và thường được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, kỹ thuật này tạo ra một lượng lớn chất thải (chủ yếu là dung môi hữu cơ), thời gian phân tích dài và đầu tư kinh tế cao cho việc bảo trì. Các đặc điểm hóa lý của IBU (logP và độ hòa tan) khác PA và CA dẫn đến khó có một quy trình duy nhất để xác định đồng thời bằng HPLC. Mặt khác, giá trị pKa của CA cản trở việc phân tích nó bằng điện hóa. Vì vậy, sử dụng phương pháp định lượng bằng quang phổ tử ngoại tỷ đối để xác định 3 thành phần PA, IBU và

CA trong hỗn hợp mà không cần bất cứ sự chiết tách nào được lựa chọn. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối chỉ sử dụng một bước là chia phổ hỗn hợp 3 thành phần cho một thừa số (phổ dung dịch chất chuẩn có 2 thành phần), tiếp theo là xác định khoảng cách từ đỉnh đến đáy trong phổ tử ngoại tỷ đối và thực hiện các tính toán để xác định nồng độ chất. Phương pháp này không sử dụng bước đạo hàm và không tìm kiếm các điểm giao nhau hoặc bất kỳ xử lý toán học, hóa học phức tạp nào đối với tập dữ liệu. Phương pháp được thẩm định và áp dụng thử nghiệm để định lượng 3 chất PA, IBU và CA trong viên nang thương mại trên thị trường.

2. Cơ sở lý thuyết

Xét một hỗn hợp gồm 3 thành phần X, Y và Z không có tương tác hóa học. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo là A_m , với chiều dày cốc đo được xác định bởi phương trình sau:

$$A_m = \varepsilon_X C_X + \varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z \quad (1)$$

trong đó ε_X và C_X , ε_Y và C_Y , ε_Z và C_Z lần lượt là hệ số hấp thụ và nồng độ của các thành phần X, Y và Z.

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp đo quang phổ tử ngoại tỷ đối là hiệu số giữa biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối (ở 2 bước sóng khác nhau) của một hỗn hợp chất là tỷ lệ với một trong các chất trong hỗn hợp. Điều này cho phép xác định một trong các chất trong hỗn hợp mà không có sự ảnh hưởng từ các thành phần và tá dược khác. Độ hấp thụ của hỗn hợp 3 thành phần ở phương trình (1) được chia cho độ hấp thụ của hỗn hợp 2 thành phần ở phương trình (2) (với nồng độ đã biết C_Y và C_Z) để ra phương trình (3).

$$A_{YZ} = \varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z \quad (2)$$

*Tác giả liên hệ: Email: thiennd@hup.edu.vn

Quantitative study ternary mixture of paracetamol, ibuprofen and caffeine in solid pharmaceutical dosage forms by ratio ultraviolet spectroscopy

Duc Thien Nguyen^{1*}, Ngoc Anh Nguyen²

¹Faculty of Basic Science, Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Class M1 K74, Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 11 October 2022; revised 10 November 2022; accepted 15 November 2022

Abstract:

This paper aims to apply ratio ultraviolet spectroscopy to determine the concentration of substances in a ternary mixture containing paracetamol (PA), ibuprofen (IBU), and caffeine (CA) without chemical treatment, the solvent used in the analysis is a mixture of ethanol with water friendly to environment and safety for users. The ratio ultraviolet spectroscopy method is based on the difference between the peak amplitude of the proportional spectrum at two wavelengths to build regression equations and analytical parameters. The two wavelengths selected in the ratio spectrum for PA, IBU, CA are 246 and 275 nm, 218 and 245 nm, 244 and 278 nm, respectively. The linear range for PA and IBU is 4-40 µg/ml, and for CA, it is 0.8-8 µg/ml; limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of PA, IBU, CA were 0.78, 1.18, 0.38 µg/ml and 2.37, 3.59, 1.17 µg/ml, respectively. The ratio ultraviolet spectroscopy method has successfully determined the concentrations of three substances in a mixture of laboratory and commercial drugs.

Keywords: caffeine, ibuprofen, paracetamol, quantitative, ratio ultraviolet spectroscopy, ternary mixtures.

Classification number: 3.4

$$\frac{A_m}{A_{Y'Z'}} = \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'}} + \frac{\varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z}{\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'}} \quad (3)$$

Trong phương trình (3), với một giá trị λ thì tỷ lệ $(\varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z)$ với $(\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'})$ là một hằng số K, điều này đúng khi xét ở một vùng hoặc một điểm của bước sóng. Do vậy, phương trình (3) có thể viết:

$$\frac{A_m}{A_{Y'Z'}} = \frac{A_X}{A_{Y'Z'}} + K \rightarrow W_m = W_p + K \quad (4)$$

trong đó $W_m = A_m/A_{Y'Z'}$, và $W_p = A_X/A_{Y'Z'}$

Khi lấy hiệu biên độ (ΔW) ở 2 bước sóng (λ_1 và λ_2) của phổ tử ngoại tỷ đối sẽ loại bỏ được hằng số K như phương trình (5).

$$\Delta W = W_{m1} - W_{m2} = (W_{p1} + K) - (W_{p2} + K) = W_{p1} - W_{p2} \quad (5)$$

Ở đây, W_{m1} và W_{m2} lần lượt là biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối tại 2 bước sóng khác nhau λ_1 và λ_2 . Phương trình (5) cho thấy sự hấp thụ của 2 thành phần Y và Z bị loại bỏ hoàn toàn và sự khác biệt về biên độ đỉnh chỉ đại diện cho thành phần X. Tiếp theo, đường chuẩn được xây dựng bằng cách lấy biến thiên biên độ của các phổ với nồng độ X khác nhau. Tương tự, 2 thành phần Y và Z có thể được xác định như trên nhưng ở cặp 2 bước sóng khác.

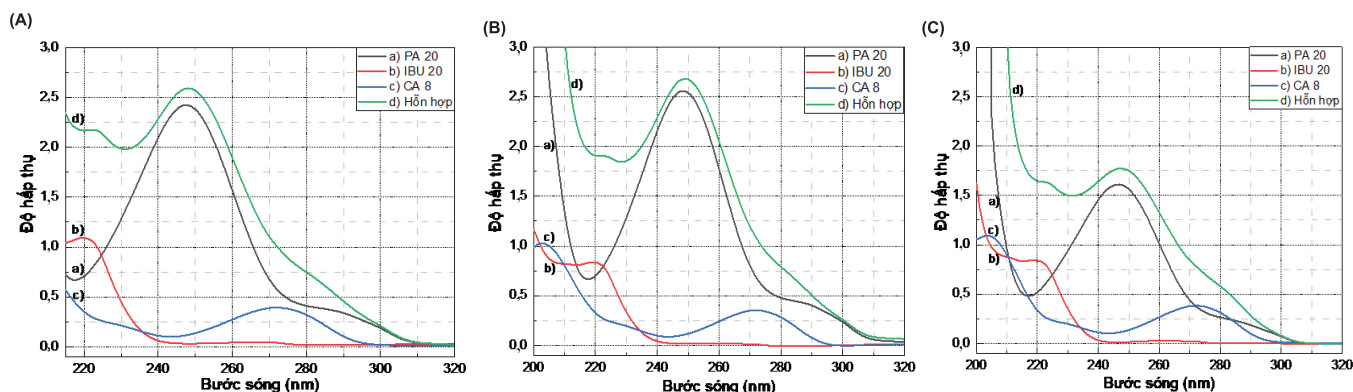
3. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Các chất chuẩn PA (98%), IBU (98%) và CA (98,5%) có nguồn gốc từ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương. Methanol, ethanol và các dung môi khác đạt tiêu chuẩn phân tích. Dung môi sau khi được tối ưu hóa được chọn và sử dụng là hỗn hợp ethanol với nước cất (tỷ lệ 1:1).

Chế phẩm thương mại là viên nang Ibuparavic (Công ty TNHH sản xuất thương mại dược phẩm Thành Nam, số lô 110222) chứa đồng thời PA, IBU, CA với tỷ lệ 300:200:20 mg.

Các dung dịch gốc sơ cấp PA, IBU và CA có nồng độ 1 mg/ml được pha bằng dung môi lựa chọn. 3 dung dịch thứ cấp PA 80 µg/ml, IBU 80 µg/ml và CA 40 µg/ml được pha loãng từ các dung dịch gốc sơ cấp ở trên. Pha loãng tiếp các dung dịch gốc thứ cấp để được dãy chuẩn PA, IBU và CA. Đối với hỗn hợp 2 và 3 thành phần thì các dung dịch được pha loãng từ các dung dịch gốc thứ cấp của PA, IBU và CA với dung môi để có được các khoảng nồng độ quy định. Phổ hấp thụ tử ngoại của các dung dịch chuẩn đã pha được đo trong khoảng 200-400 nm với mẫu trắng là dung môi lựa chọn.

Để xác định PA, tiến hành đo phổ hấp thụ tử ngoại của các dung dịch chuẩn PA theo bước sóng và ghi lại. Tiếp đến lấy các phổ tử ngoại của dung dịch chuẩn PA đó chia cho phổ tử ngoại của dung dịch hỗn hợp 2 thành phần IBU (20 µg/ml) với CA (2 µg/ml) ta được các phổ tử ngoại tỷ đối. Xác định các biên độ đỉnh đến đây trong phổ tử ngoại tỷ đối PA thu được ở giữa 246 và 275 nm và vẽ đồ thị phổ tử ngoại tỷ đối với nồng độ tương ứng. Tương tự, tiến hành đo phổ hấp thụ tử ngoại của dãy dung dịch chuẩn IBU, sau đó



Hình 1. Phổ hấp thụ của dung dịch CA (8 µg/ml) (a), IBU (20 µg/ml) (b), PA (20 µg/ml) (c), hỗn hợp 3 thành phần (PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml, CA 8 µg/ml) (d) trong dung môi methanol (A), ethanol (B) và hỗn hợp ethanol với nước cất (tỷ lệ 1:1) (C).

chia cho phổ của dung dịch hỗn hợp 2 thành phần PA (30 µg/ml) với CA (2 µg/ml) để được các phổ từ ngoại tỷ đối, giá trị hiệu biên độ thu được giữa 2 bước sóng 218 và 247 nm sẽ được dùng để xây dựng đồ thị với các nồng độ tương ứng. Tương tự, phổ của dung dịch hỗn hợp PA (30 µg/ml) và IBU (20 µg/ml) được sử dụng làm số chia trong phổ từ ngoại tỷ đối của các dung dịch chuẩn CA để xác định nồng độ CA, các giá trị đo biên độ trong khoảng 244 và 278 nm được ghi lại và vẽ đồ thị phổ từ ngoại tỷ đối với nồng độ tương ứng.

Để định lượng hoạt chất trong các viên nang thương mại, tiến hành nghiền mịn 10 viên và cân lượng bột nghiền tương đương với 300 mg PA, 200 mg IBU và 20 mg CA, cho tương ứng vào 3 bình định mức 100 ml, cho dung môi, lắc, siêu âm khoảng 5 phút và thêm dung môi cho vừa đủ 100 ml. Tiến hành lọc loại bỏ 20-30 ml dịch lọc đầu. Tiếp đến mỗi bình lấy 10 ml dịch lọc, cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi vừa đủ và lắc đều, khi đó ta được dung dịch chứa PA 300 µg/ml, IBU 200 µg/ml và CA 20 µg/ml. Cuối cùng, pha loãng tiếp 10 lần để được dung dịch PA 30 µg/ml, IBU 20 µg/ml và CA 2 µg/ml.

Toàn bộ phép đo quang phổ từ ngoại được thực hiện bằng máy quang phổ Hitachi model U1900 UV-Vis (Nhật Bản) và kết nối

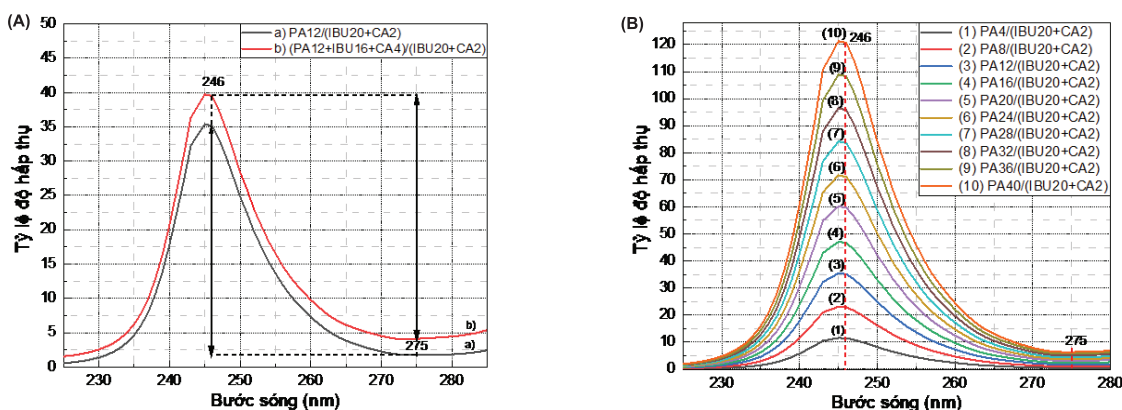
với máy vi tính (hệ điều hành Windows) với phần mềm chuyên dụng Solution 2.2. Chế độ bước sóng bắt đầu 200 nm, kết thúc 400 nm, kiểu dữ liệu: độ hấp thụ A, độ rộng 4,0 nm, tốc độ quét 100 nm/phút, cuvet thạch anh 1 cm. Tiến hành lọc nhiễu sơ bộ bằng bộ lọc Savitzky - Galay (đa thức bậc 3, số điểm 15).

4. Kết quả

4.1. Đặc điểm quang phổ và lựa chọn dung môi

Khảo sát sơ bộ phổ hấp thụ từ ngoại của PA, IBU, CA trong dung môi lựa chọn nên các dung dịch được khảo sát trong khoảng bước sóng UV. Phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml, CA 8 µg/ml và dung dịch hỗn hợp 3 thành phần (PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml và CA 8 µg/ml) từ 200 đến 320 nm như ở hình 1. Với 3 dung môi là methanol, ethanol và hỗn hợp ethanol với nước (tỷ lệ 1:1) thì cả PA, IBU và CA đều tan tốt, phổ hấp thụ của PA, IBU và CA trong hỗn hợp ở 3 dung môi này đều có tính cộng độ hấp thụ ở hình 1. Do đó, đảm bảo phân tích xanh, thân thiện với môi trường, an toàn nên hỗn hợp ethanol với nước (tỷ lệ 1:1) được chọn làm dung môi để hòa tan và pha loãng.

Phổ từ ngoại tỷ đối của phổ PA tinh khiết và phổ hỗn hợp 3 thành phần (cùng lượng PA) với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần (IBU, CA) như hình 2A. Hình 2A cho thấy, biên độ đỉnh



Hình 2. Phổ từ ngoại tỷ đối của PA 12 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 12 µg/ml, IBU 16 µg/ml, CA 4 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (IBU 20 µg/ml, CA 2 µg/ml) (A); dãy chuẩn PA với số chia là hỗn hợp (IBU 20 µg/ml, CA 2 µg/ml) (B).

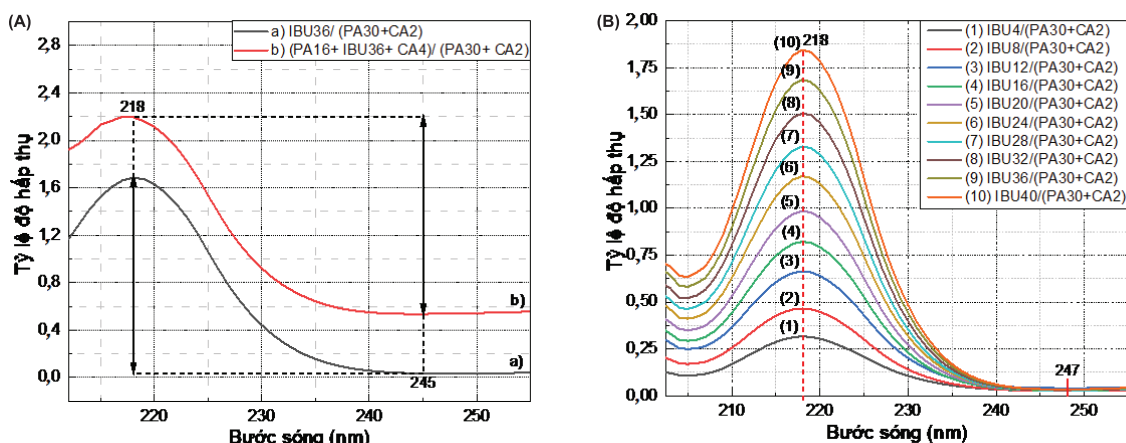
Bảng 1. Các thông số hồi quy và phân tích để xác định sự kết hợp 2 thuốc bằng phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối.

Thông số	Dược chất		
	PA	IBU	CA
Hai bước sóng lựa chọn (nm)	246 và 275	218 và 245	244 và 278
Khoảng nồng độ khảo sát (µg/ml)	4-40	4-40	0,8-8
Hệ số chặn (a)	-0,8217	0,1108	-0,0057
Độ lệch chuẩn hệ số chặn (SD_a)	0,6800	0,0153	0,0109
Độ dốc (b)	2,8576	0,0426	0,0932
Độ lệch chuẩn độ dốc (SD_b)	0,0274	0,0006	0,0022
Độ lệch chuẩn tương đối độ dốc (RSD_b , %)	0,9588	1,4486	2,3537
Hệ số hồi quy (r)	0,9999	0,9998	0,9998
LOD (µg/ml)	0,78	1,18	0,38
LOQ (µg/ml)	2,37	3,59	1,17

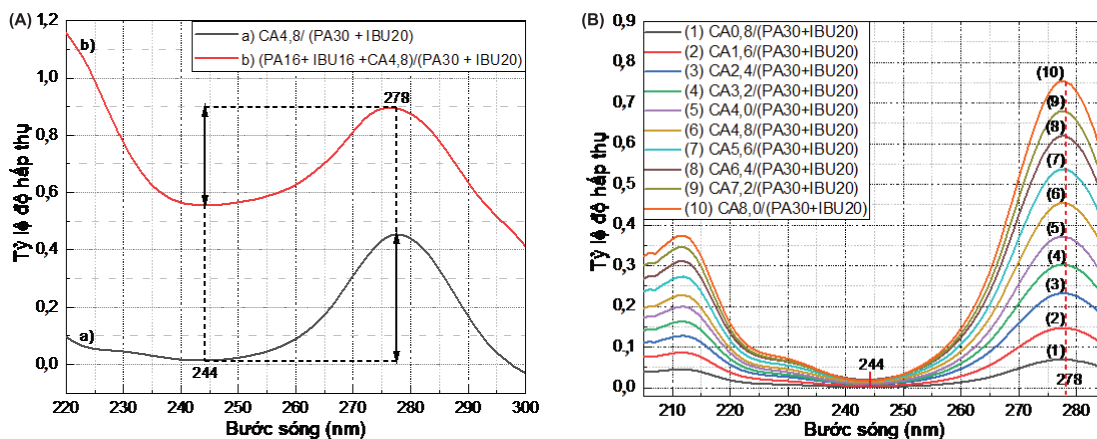
đến đáy ở giữa 2 bước sóng 246 và 275 nm trên phổ tử ngoại tỷ đối đo được trong phổ hỗn hợp 3 thành phần bằng với phổ PA. Nghĩa là có thể định lượng được PA trong hỗn hợp 3 thành phần dựa vào phổ PA vì không có sự ảnh hưởng của IBU và CA trong hỗn hợp khi xét phổ tử ngoại tỷ đối, điều này cũng được lý thuyết trên chứng minh. Vì vậy, đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn

PA có nồng độ 4-40 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 4 µg/ml) với mẫu trắng là hỗn hợp ethanol với nước. Sau đó vẽ và chồng phổ hấp thụ tử ngoại tỷ đối của PA (nồng độ 4-40 µg/ml) với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp IBU, CA (nồng độ 20 µg/ml, 2 µg/ml) (hình 2B). Xây dựng đường chuẩn giữa hiệu biên độ tại 2 bước sóng 246 và 275 nm với nồng độ PA. Đường chuẩn này được xây dựng dựa vào 10 điểm chuẩn và có các thông số hồi quy như ở bảng 1. Từ phương trình chuẩn độ này ta có thể xác định được nồng độ PA trong hỗn hợp mà không cần biết nồng độ IBU và CA.

Tương tự, hình 3A cho thấy giá trị biên độ hấp thụ tử ngoại tỷ đối từ đỉnh tới đáy (tại 218 và 245 nm) là bằng nhau của phổ tử ngoại tỷ đối IBU (36 µg/ml), phổ tử ngoại tỷ đối hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 36 µg/ml, CA 2 µg/ml) với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml). Nghĩa là, ta có thể định lượng IBU trong hỗn hợp 3 thành phần dựa vào phổ IBU vì không có sự ảnh hưởng của PA và CA trong hỗn hợp khi xét phổ tử ngoại tỷ đối. Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn IBU có nồng độ 4-40 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 4 µg/ml). Vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ đối của dãy dung dịch IBU này với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp PA và CA (nồng độ 30 và 2 µg/ml) (hình 3B).



Hình 3. Phổ tử ngoại tỷ đối của IBU 36 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 36 µg/ml, CA 4 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml) (A); dãy chuẩn IBU với số chia là hỗn hợp (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml) (B).



Hình 4. Phổ tử ngoại tỷ đối của CA 4,8 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 16 µg/ml, CA 4,8 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (PA30 µg/ml, IBU 20 µg/ml) (A); dãy chuẩn CA với số chia là hỗn hợp (PA 30 µg/ml, IBU 20 µg/ml) (B).

Xây dựng phương trình đường chuẩn với các thông số hồi quy như ở bảng 1 của hiệu biên độ hấp thụ tỷ đối tại 2 bước sóng 218 và 245 nm với nồng độ IBU.

Tương tự ở hình 4A, 2 bước sóng được chọn là 244 và 278 nm để khảo sát biên độ từ đỉnh đến đáy của độ hấp thụ tỷ đối. Phổ hấp thụ tỷ đối của dãy dung dịch chuẩn CA có nồng độ 0,8-8,0 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 0,8 µg/ml) với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp PA và IBU (nồng độ 30 và 20 µg/ml) (hình 4B). Phương trình đường chuẩn ở đây cũng dựa vào 10 điểm chuẩn và có các thông số hồi quy như ở bảng 1. Dựa vào đường chuẩn của hiệu độ hấp thụ tỷ đối tại 2 bước sóng trên và nồng độ CA, ta có thể xác định nồng độ của CA trong hỗn hợp 3 thành phần.

4.2. Thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính và phạm vi: Khoảng tuyến tính của đường chuẩn trong phương pháp dựa vào 10 giá trị nồng độ liên tiếp cách nhau 4 µg/ml mỗi chất PA, IBU và cách nhau 0,2 µg/ml với CA. Thông số, phương trình hồi quy và phân tích tương ứng mỗi chất ở bảng 1 được xác định dựa vào bộ số liệu phổ tử ngoại tỷ đối của các chất. Với số bị chia là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn gốc PA, IBU, CA và số chia là các dung dịch 2 thành phần cho các giá trị độ hấp thụ tỷ đối về dưới dạng hàm của nồng độ tương ứng và phương trình hiệu chuẩn xác định bằng phương pháp hồi quy bình phương nhỏ nhất.

Giới hạn phát hiện và định lượng: Ở đây, LOD và LOQ được tính toán theo hướng dẫn của International Council for Harmonisation (ICH) [8]. LOD được định tính là $3,3 \times SD_a/b$ và LOQ được tính là $10 \times SD_a/b$, trong đó SD_a là độ lệch chuẩn của điểm chặn và b là độ dốc của đường chuẩn. Độ nhạy của phương pháp định lượng hỗn hợp PA, IBU, CA dựa vào quang phổ tử ngoại tỷ đối được xác nhận bằng giá trị LOD và LOQ có giá trị thu được ở bảng 1.

Độ chính xác (độ đúng và độ chụm): Theo hướng dẫn của ICH [8], độ lặp lại trong ngày của phương pháp đề xuất được đánh giá thông qua phân tích 3 mức nồng độ được đo tại 3 thời điểm khác nhau trong cùng một ngày. Tương ứng, độ chính xác giữa các ngày được xác định ở cùng nồng độ trong 3 ngày liên tiếp, kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Độ chính xác và độ chụm xác định của các dược chất trong phương pháp.

Dược chất	Nồng độ pha (µg/ml)	Giá trị đo được trong ngày			Giá trị đo được trong 3 ngày		
		Nồng độ (±SD, µg/ml)	RSD (%)	E_r (%)	Nồng độ (±SD, µg/ml)	RSD (%)	E_r (%)
PA	24	24,16±0,35	1,48	1,03	24,02±0,53	2,20	1,57
	28	28,13±0,57	0,02	1,50	28,36±0,19	0,65	0,46
	32	31,67±0,67	2,11	1,42	32,18±0,95	2,97	2,24
IBU	16	16,07±0,41	2,59	1,94	15,92±0,41	2,59	2,00
	20	20,63±0,32	1,56	1,18	19,82±0,35	1,79	1,29
	24	24,23±0,42	1,72	1,25	24,00±0,51	2,12	1,54
CA	1,6	1,68±0,08	3,90	3,23	1,58±0,09	5,46	3,95
	2,0	1,97±0,08	3,80	2,59	2,02±0,11	5,33	4,06
	2,4	2,44±0,09	3,57	2,63	2,42±0,08	3,16	2,29

Mỗi nồng độ lặp lại 10 lần đo và tính nồng độ trung bình.

Độ ổn định: Để khảo sát sự ổn định của các dược chất thì dung dịch gốc của nó được để tĩnh ở 4°C trong 1 tháng. Thêm vào đó, độ ổn định còn được xác định bằng cách đo phổ tử ngoại tỷ đối của dung dịch chuẩn PA, IBU và CA ở nhiệt độ phòng sau 4 giờ pha chế. Kết quả cho thấy, phổ tử ngoại tỷ đối của dung dịch PA, IBU và CA không có sự thay đổi đáng kể nào.

Phân tích hỗn hợp thuốc thương mại: Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối của hỗn hợp 3 thành phần được áp dụng để phân tích hỗn hợp trong chế phẩm chứa cả PA, IBU và CA trên thị trường có tên Ibuparavic.

Lấy khối lượng bột trung bình của 20 viên nang, tiến hành pha loãng 20.000 lần. Sau đó sử dụng phương pháp thêm chuẩn và dựa vào phương trình đường chuẩn thiết lập phía trên để xác định nồng độ từng chất PA, IBU và CA có trong chế phẩm. Kết quả phân tích nồng độ mỗi chất cùng độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Xác định PA, IBU và CA bằng phương pháp thêm chuẩn trong viên nang thương mại trên thị trường.

Dược chất	Nồng độ pha định kiến		Nồng độ xác định phương pháp	
	Ban đầu (µg/ml)	Thêm chuẩn (µg/ml)	Khối lượng (µg/ml)	%
PA	30	2	30,324	101,08
		6	30,182	100,61
		10	30,295	100,98
			Trung bình	100,89
			SD	0,25
			% RSD	0,25
IBU	20	2	19,876	99,38
		4	20,058	100,29
		6	20,125	100,63
			Trung bình	100,10
			SD	0,65
			% RSD	0,65
CA	2	0,4	2,06	103,00
		0,8	1,99	99,50
		1,2	2,05	102,50
			Trung bình	101,67
			SD	1,89
			% RSD	1,86

5. Bàn luận

Phổ hấp thụ của PA, IBU, CA trong khoảng bước sóng 200-300 nm trong các dung môi khác nhau đều cho sự chồng chéo lớn, gây cản trở việc sử dụng phương pháp đo quang phổ tử ngoại tỷ đối thông thường để xác định đồng thời chúng trong hỗn hợp (hình 1). Khi đo phổ hấp thụ quang phổ tử ngoại tỷ đối, có 2 yếu tố ảnh hưởng là dung môi và nồng độ số chia. Ở đây, sự ảnh hưởng của dung môi pha loãng đến cường độ của phép đo đã được khảo sát. Các dung môi bao gồm nước, NaOH 0,1 M và HCl 0,1 M đã bị loại trừ do tính không hòa tan hoặc ít tan của PA, IBU và CA. Để đảm bảo phân tích an toàn, thân thiện môi trường và đảm bảo sự

tan của PA, IBU, CA nên nghiên cứu lựa chọn hỗn hợp ethanol với nước làm dung môi để hòa tan và pha loãng.

Trong phổ tử ngoại tỷ đối giữa số bị chia là phổ hấp thụ PA, IBU, CA với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần có bước nhảy nồng độ đều là 4 µg/ml. Kết quả thu được ở hình 2B, 3B, 4B cho thấy, sự tuyến tính ở nồng độ thấp 4 µg/ml và cao 40 µg/ml, 3 đường chuẩn tương ứng đều có hệ số tương quan gần bằng 1. Với phổ tử ngoại tỷ đối của phổ hấp thụ CA với phổ hỗn hợp (PA, IBU) có thể xét 2 cặp bước sóng 244-278 nm và 212-244 nm (hình 3B), nhưng ở đây lựa chọn cặp 244-278 nm để có giá trị lớn của biên độ đỉnh đến đáy.

Theo bảng 2, giá trị của %RSD trong ngày của các dung dịch chuẩn PA và IBU đều không vượt quá 2,6%, với CA các giá trị này đều dưới 4,0%, kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây [1, 6, 7]. Dễ thấy %RSD khi xác định nồng độ CA đều có giá trị cao, nguyên nhân có thể là do nồng độ CA nhỏ hơn nhiều so với nồng độ PA và IBU trong dung dịch 3 thành phần pha tại phòng thí nghiệm.

Đầy nồng độ xác định được thích hợp cùng với các giá trị thấp của sai số tương đối ($E_r\%$) được ghi trong bảng 2 có thể xác nhận độ chính xác của phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối 3 thành phần có thể thực hiện được.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, RSD của PA, IBU có giá trị lần lượt là 0,25 và 0,65%. Giá trị RSD của CA nhỏ (1,86%) và đạt tiêu chuẩn phân tích [9]. Có thể thấy rằng, để giảm %RSD của CA khi kiểm nghiệm viên nang thương mại thì số lần lặp lại phép đo phải được tăng lên. Các kết quả xác định nồng độ PA, IBU và CA trong chế phẩm thương mại có giá trị sai khác rất ít với nồng độ ghi trên bao bì.

6. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng quang phổ tử ngoại tỷ đối của hỗn hợp 3 thành phần cũng như của 1 trong 3 thành phần với số chia là hỗn hợp 2 thành phần còn lại để định lượng thành phần kia là rất khả quan, thao tác đơn giản, cho kết quả nhanh và chính xác. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối đã định lượng 3 thành phần trong hỗn hợp 3 chất mà không cần bất kỳ xử lý hóa học nào, dung môi phân tích xanh và an toàn. Phương pháp này phù hợp để kiểm soát chất lượng thường quy thuộc phòng đảm bảo chất lượng tại các công ty sản xuất, cũng như ở các trung tâm kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm ở các tỉnh, thành phố, khi chỉ cần có máy quang phổ tử ngoại thông thường. Đồng thời, phương pháp này được áp dụng để định lượng cho biệt dược 2 và 3 thành phần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.R. Cunha, S.C. Chaves, M.M.A.C. Ribeiro, et al. (2015), "Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by highperformance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection", *J. Sep. Sci.*, **38**(10), pp.1657-1662, DOI: 10.1002/jssc.201401387.
- [2] J.R.M. Lopez, A.M. Dominguez-Ramirez, H.J. Cook, et al. (2006), "Enhancement of antinociception by o-administration of ibuprofen and caffeine in arthritic rats", *Eur. J. Pharmacol.*, **544**(1-3), pp.31-38, DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.06.041.
- [3] C.K.S. Ong, R.A. Seymour, P. Lirk, et al. (2010), "Combining paracetamol (acetaminophen) with nonsteroidal antiinflammatory drugs: A qualitative systematic review of analgesic efficacy for acute postoperative pain", *Anesth. Analg.*, **110**(4), pp.1170-1179, DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181cf9281.
- [4] N.M. Habib, M.M. Abdelrahman, N.S. Abdelwhab, et al. (2017), "Spectrophotometric methods for resolving binary mixture of diflunisal, naproxen and diflunisal toxic impurity", *Anal. Chem. Lett.*, **7**(1), pp.97-108, DOI: 10.1080/22297928.2017.1294990.
- [5] M. Attimarad, M.S. Chohan, R.E.E. Elgorashe (2020), "Smart analysis of a ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and telmisartan by manipulation of UV spectra: Development, validation and application to formulations", *J. Mol. Struct.*, **1212**, DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128095.
- [6] B.T. Tran, T.N. Tran, A.M.T. Tran, et al. (2022), "Simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen, and caffeine in tablets by molecular absorption spectroscopy combined with classical least square method", *Molecules*, **27**(9), DOI: 10.3390/molecules27092657.
- [7] M.R. Khoshayand, H. Abdollahi, M. Shariatpanahi, et al. (2008), "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by hemometric methods", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **70**(3), pp.491-499, DOI: 10.1016/j.saa.2007.07.033.
- [8] P. Borman, D. Elder (2017), "Q2(R1) validation of analytical procedures", *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, John Wiley & Sons, Inc, **2**, pp.127-166, DOI: 10.1002/9781118971147.ch5.
- [9] AOAC International (2007), "How to meet ISO 17025 requirements or method verification", <https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/09/ALACC-method-verification.pdf>, accessed 20 September 2022.

Đánh giá hoạt tính kháng *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 và độc tính tế bào của dịch sắc cây lựu (*Punica granatum*)

Trần Thị Lệ Quyên^{1,2}, Bùi Nguyễn Hải Linh¹, Nguyễn Việt Hà¹, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng¹,
Bùi Thị Việt Hà², Trịnh Thành Trung^{1*}

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/9/2021; ngày chuyển phân biên 16/9/2021; ngày nhận phản biện 8/10/2021; ngày chấp nhận đăng 12/10/2021

Tóm tắt:

Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây ra bởi vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei*, đặc biệt có yếu tố nguy cơ dịch tễ cao đối với nghề nông do điều kiện làm việc thường xuyên tiếp xúc với môi trường đất hoặc nước chứa vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) của dịch chiết cây lựu (*Punica granatum*) ở các nhiệt độ chiết khác nhau và độ bền của hoạt tính này trong điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, độ pha loãng ức chế tối thiểu (MID) và diệt khuẩn tối thiểu (MBD). Bên cạnh đó, độc tính của dịch chiết cũng được đánh giá trên các dòng tế bào HEK293, HepG2 và HT29. Kết quả cho thấy, dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của cây lựu đều có hoạt tính kháng khuẩn cao với vòng kháng khuẩn đạt 21-28 mm, giá trị MID dưới 1:256 và MBD dưới 1:128. Dịch chiết các bộ phận cây lựu khi được chiết ở 100°C cho hoạt tính kháng khuẩn cao hơn đáng kể so với khi chiết ở 25 và 70°C. Ngoài ra, khi xử lý với dịch mô phỏng đường tiêu hóa, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu không có sự khác biệt đáng kể, ngoại trừ giá trị MID của dịch chiết cành giảm 2 lần. Ngoài ra, khi thử nghiệm trên một số dòng tế bào người, các dịch chiết đều có độc tính tế bào thấp với giá trị độ pha loãng ức chế (ID_{50}) luôn cao hơn giá trị MID tương ứng. Các kết quả thu được cho thấy, dịch chiết từ các bộ phận cây lựu thu được bằng cách sắc theo y học cổ truyền có thể sử dụng hiệu quả để điều trị bệnh melioidosis thông qua đường uống.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, dịch chiết nước của cây lựu, độc tính tế bào, hoạt tính kháng khuẩn.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

B. pseudomallei là tác nhân gây bệnh melioidosis - một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm thường xuất hiện ở các khu vực nhiệt đới như phía Bắc của nước Úc và Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Theo ước tính hàng năm trên thế giới có khoảng 165.000 ca mắc melioidosis, trong đó 54% bệnh nhân tử vong [1]. Không giống như nhiều bệnh truyền nhiễm khác, điều trị bệnh melioidosis cần có phác đồ kháng sinh đặc biệt do vi khuẩn *B. pseudomallei* kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh đang sử dụng hiện nay như aminoglycosides, cephalosporins (thế hệ 3 và 4), penicillin và rifamycin. Đến nay, việc *B. pseudomallei* kháng kháng sinh ceftazidim dùng để điều trị melioidosis cấp tính cũng đã được ghi nhận [2]. Do đó, bên cạnh chẩn đoán đúng bệnh và sử dụng kháng sinh phù hợp thì việc tìm kiếm chất kháng khuẩn mới cũng được các nhà khoa học hết sức quan tâm.

Tại một số quốc gia, nhiều loại thực vật đã được sử dụng trong các bài thuốc y học cổ truyền để điều trị các bệnh khác nhau. Ngày nay, mặc dù nhiều loại thuốc điều trị đã được tổng hợp nhân tạo, nhưng thực vật vẫn được xem là nguồn dược liệu tự nhiên quan trọng, một nguồn thuốc chữa bệnh vô giá cho con người. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy sự quan tâm ngày càng tăng đối với thực vật có nhiều đặc tính dược lý đa dạng và quan trọng, trong đó có cả hoạt tính kháng khuẩn [3].

Cây lựu là một trong những loại cây lâu đời nhất được biết đến có nguồn gốc từ Trung Á [4]. Tại Việt Nam, cây lựu được trồng rất phổ biến để làm cảnh, cây thuốc và ăn quả [5]. Trong nhiều nền y học cổ truyền trên thế giới, lựu là bài thuốc phổ biến được áp dụng điều trị các bệnh nhiễm trùng khi có 75 ứng dụng trị bệnh nhiễm trùng khác nhau của cây lựu được tìm thấy [6]. Ở Ấn Độ và Iran, nước sắc vỏ quả lựu được sử dụng để điều trị viêm họng, tiêu chảy, vết thương hở... Trong các tài liệu văn hóa của người Ai Cập, các bệnh phổ biến như viêm, tiêu chảy, nhiễm giun và ho đã được điều trị bằng chiết xuất vỏ quả lựu. Lựu cũng được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền để điều trị bệnh tiêu chảy, rối loạn tiêu hóa ở Nam Phi, Algeria và Mexico.

Tại Việt Nam, nước sắc vỏ quả lựu là bài thuốc chữa lỵ trực tràng cho hiệu quả tốt hơn so với rau sam, lá chè và thuốc berberin. Các bộ phận khác của cây lựu gồm vỏ thân, vỏ cành và vỏ rễ cũng được sử dụng trong các bài thuốc chữa giun sán, tuy nhiên cũng cần cân trọng khi sử dụng bởi chúng có độc tính [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính kháng *B. pseudomallei* VTCC 70157 của dịch chiết các bộ phận cây lựu khi chiết ở các nhiệt độ khác nhau. Ảnh hưởng của dịch mô phỏng đường tiêu hóa đến độ bền hoạt tính kháng khuẩn và độc tính của dịch chiết đối với một số dòng tế bào người cũng đã được nghiên cứu. Ở Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá khả năng

*Tác giả liên hệ: Email: tttrung@vnu.edu.vn

Evaluation of antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 and cytotoxicity of pomegranate (*Punica granatum*) aqueous extract

Thi Le Quyen Tran^{1,2}, Nguyen Hai Linh Bui¹,
Viet Ha Nguyen¹, Huu Tuan Dung Nguyen¹,
Thi Viet Ha Bui², Thanh Trung Trinh^{1*}

¹Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University - Hanoi,
144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi,

334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 13 September 2021; revised 8 October 2021; accepted 12 October 2021

Abstract:

Melioidosis is a severe acute infectious disease caused by *Burkholderia pseudomallei*, especially high epidemiological risk factors in agricultural operations with people frequently exposed to soil or water sources containing this bacterium. In this study, the thermal and gastric stability of antimicrobial activity of aqueous extracts prepared from pomegranate (*Punica granatum*) against *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) was evaluated by agar plate diffusion, minimal inhibitory dilution (MID), and minimal bactericidal dilution (MBD) methods. Additionally, the cytotoxicity of aqueous extract to HEK293, HepG2, and HT29 cell lines was also studied. The results showed that aqueous extracts of different pomegranate parts had a high antibacterial activity with an antibacterial zone diameter in the range of 21-28 mm. MID and MBD values were under 1:256 and 1:128, respectively. At the extraction temperature of 100°C, antibacterial activities were significantly higher than those of 25 and 70°C. This study also demonstrated that the antibacterial activity of the extracts highly remained under simulated gastrointestinal conditions except for the MID value of the twig extracts which was increased by two times. In addition, the extracts exhibited low cytotoxicity with the tested human cell lines, with ID₅₀ values consistently being remarkably higher than the corresponding MID values. The study results suggest that aqueous extracts of pomegranate prepared by decoction according to traditional medicine might be effective through oral administration for the treatment of melioidosis.

Keywords: antibacterial activity, aqueous extract of pomegranate, *Burkholderia pseudomallei*, cytotoxicity.

Classification number: 3.4

kháng lại *B. pseudomallei* của dịch chiết từ các bộ phận cây lựu cũng như tính an toàn của chúng trên tế bào người.

2. Nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Sáu bộ phận của cùng một cây lựu 4 năm tuổi (vỏ rễ, vỏ thân, cành, lá, hoa và vỏ quả) được thu hái vào tháng 6/2020 tại vườn nhà dân ở xã Bảo Thanh, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ. Mẫu sau khi thu hái được vận chuyển trong ngày về phòng thí nghiệm Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trong không gian kín và sử dụng máy hút ẩm tới khối lượng không đổi. Mẫu khô được bảo quản tại nhiệt độ phòng.

Chủng *B. pseudomallei* VTCC 70157 (NA23) phân lập từ bệnh phẩm máu của bệnh nhân nhiễm trùng melioidosis và thuộc kiểu hình di truyền ST 46 phổ biến tại Việt Nam được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học (Đại học Quốc gia Hà Nội). Chủng vi khuẩn được hoạt hóa từ điều kiện lạnh sâu trên môi trường thạch Mueller Hinton (Becton, Dickinson and Company, Mỹ) ở 37°C trong 24 giờ. Hòa tan các khuẩn lạc tách rời vào dung dịch NaCl 0,9% vô trùng để được huyền dịch có độ đục tương đương McFarland 0,5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dịch chiết từ các bộ phận của cây lựu: Mẫu cây khô được xay thành bột mịn bằng máy xay. Một lượng nước cất tương đương với lượng nước đã bay hơi do quá trình sấy khô được bổ sung vào bột mịn tạo thành một hỗn hợp dạng bột nhão. Sau đó, hỗn hợp được bổ sung thêm một lượng nước cất (pha loãng 2 lần) trước khi chiết ở các nhiệt độ 25, 70 và 100°C trong 1 giờ (bảng 1). Sau khi chiết, toàn bộ hỗn hợp được lọc qua túi vải hai lớp. Sau khi lọc, dịch chiết tiếp tục được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút và lọc qua màng lọc khuẩn 0,22 µm (Sartorius, Đức) để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần.

Bảng 1. Công thức chiết mẫu cây lựu.

Bộ phận	Khối lượng khô (g)	Thể tích nước bổ sung (ml)
Vỏ quả	5,2±0,08	14,8±0,08
Hoa	4,9±0,05	15,1±0,05
Lá	3,1±0,08	16,9±0,08
Cành	4,2±0,09	15,8±0,09
Vỏ thân	4,5±0,09	15,5±0,09
Vỏ rễ	4,3±0,21	15,7±0,21

Xác định hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết lựu:

- Phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Dùng tấm bông vô trùng thấm huyền dịch và ria đều vi khuẩn trên mặt đĩa thạch Mueller Hinton. Tạo giếng trên đĩa thạch bằng ống nhựa vô trùng, đường kính 6 mm và nhỏ 70 µl dịch chiết cây lựu vào mỗi giếng, ủ đĩa ở 37°C trong 24 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn theo công thức: D (mm) = d - 6 (với d là đường kính vòng kháng khuẩn, 6 là

đường kính của giếng). Kháng sinh meropenem (Sigma Aldrich, Mỹ) và nước cất được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm trong tất cả các thí nghiệm [2].

- Phương pháp xác định giá trị MID: Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết được xác định bằng phương pháp vi pha loãng theo hướng dẫn của Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) [7]. Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Trước tiên, 50 μ l dịch chiết được cho vào cột giếng đầu tiên của đĩa, trong khi các giếng còn lại được bổ sung 25 μ l nước cất. Một dãy pha loãng liên tục hệ số 2 của dịch chiết được thực hiện từ các giếng tiếp theo. Sau đó, một lượng tương đương (25 μ l) môi trường Mueller Hinton được bổ sung vào mỗi giếng. Để chuẩn bị chủng vi khuẩn ủ cùng dịch chiết, huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương McFarland 0,5 được pha loãng 10 lần bằng dịch môi trường Mueller Hinton. Sau đó, một thể tích tương đương (50 μ l) huyền dịch vi khuẩn đã pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng, trừ giếng đối chứng âm. Đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ, giá trị MID của dịch chiết được xác định là độ pha loãng thấp nhất mà tại đó ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn kiểm tra.

- Phương pháp xác định giá trị MBD: Hút 20 μ l dịch từ các giếng mà tại đó không có sự sinh trưởng của vi khuẩn và cấy trải trên đĩa thạch Mueller Hinton ở 37°C trong 24-48 giờ. Giá trị pha loãng của dịch chiết mà tại đó sự sinh trưởng của vi khuẩn không được quan sát thấy được gọi là MBD [3].

Xác định ảnh hưởng của dịch mô phỏng đường tiêu hóa đến hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết: Độ bền của hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* được đánh giá trong điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa theo mô tả của The United States Pharmacopeial (2018) [8] và thực hiện ở 37°C, lắc 1.000 vòng/phút. Theo đó, dịch chiết cây lựu được xử lý 2 giờ với hỗn hợp gồm NaCl 35 mM và pepsin 3,2 mg/ml (Sigma Aldrich, Mỹ) được chỉnh về pH 2,0 bằng HCl 0,1 N. Dịch chiết sau đó tiếp tục được xử lý trong 4 giờ với dịch ruột mô phỏng có thành phần gồm KH_2PO_4 50 mM và pancreatin 10 mg/ml (Sigma Aldrich, Mỹ) với pH 7,0 được chỉnh bằng NaOH 1 N. Trước khi đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, dịch chiết đã xử lý với dịch mô phỏng đường tiêu hóa được ủ ở 99°C trong 10 phút để bất hoạt các enzym tiêu hóa. Độ bền của hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* được đánh giá bằng cách xác định cả giá trị MID và MBD theo mô tả ở trên.

Đánh giá tính gây độc tế bào của dịch chiết: Độc tính của dịch chiết được đánh giá trên 3 dòng tế bào người (ung thư biểu mô ruột kết HT29, ung thư gan HepG2 và phôi thận HEK293), sử dụng phương pháp MTT theo mô tả của T. Mosmann (1983) [9]. Các dòng tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện CO_2 5% với độ ẩm 95-100%. Môi trường Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, PAN Biotech, Đức) nồng độ glucose 4,5 g/l được sử dụng cho nuôi cấy dòng tế bào HEK293 và môi trường DMEM nồng độ glucose 1 g/l được sử dụng cho dòng tế bào HT29 và HepG2. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) và 1% penicillin - streptomycin (10.000 U/ml - 10.000 μ g/ml, Gibco,

Mỹ). 175 μ l huyền dịch tế bào được đưa vào đĩa 96 giếng đáy phẳng ở mật độ khoảng 2×10^4 tế bào/giếng. Sau khi ủ 24 giờ để tạo tế bào đơn lớp với mật độ đạt 80%, 25 μ l dịch chiết được bổ sung vào mỗi giếng và tiếp tục ủ đĩa thêm 24 giờ. Hút bỏ môi trường, sau đó bổ sung vào mỗi giếng 50 μ l dung dịch 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT, Biobasic, Canada) 2 mg/ml và 50 μ l môi trường DMEM. Sau khi ủ đĩa trong 3 giờ, hút bỏ dịch nổi và bổ sung 100 μ l DMSO vào mỗi giếng. Đĩa được lắc đều và ủ trong tối 15 phút ở nhiệt độ phòng để hòa tan tinh thể formazan. Mật độ quang học của mỗi giếng được đọc ở bước sóng 490 nm (sử dụng máy đọc đĩa 800 TS BioTek, Mỹ). Môi trường nuôi cấy thích hợp và DMSO (Sigma, Mỹ) được sử dụng là đối chứng âm và đối chứng dương. Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng ID_{50} mà tại đó số lượng tế bào sống giảm bằng 50% so với đối chứng âm.

3. Kết quả

3.1. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu được chiết ở các nhiệt độ khác nhau

Cả 6 mẫu dịch chiết từ các bộ phận khác nhau của cây lựu đều cho thấy hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* VTCC 70157 (bảng 2). Đáng chú ý là cả 6 mẫu đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn tốt hơn nhiều lần khi chiết ở 100°C so với 25 và 70°C. Ở 100°C, dịch chiết cành và lá cho vòng kháng khuẩn nhỏ nhất (21 mm), trong khi đó dịch chiết vỏ thân có vòng kháng khuẩn lớn nhất (28 mm), cao hơn đối chứng dương là kháng sinh meropenem (17 mm).

Bảng 2. Hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết 6 bộ phận cây lựu ở các nhiệt độ chiết khác nhau.

Bộ phận	Tác dụng điều trị	Nhiệt độ chiết (°C)	D (mm)	MID	MBD
Vỏ quả	Kiết lị, tiêu chảy, viêm đường tiết niệu [5, 7]	25	5±0,5	1:128	1:16
		70	19±0,8	1:512	1:64
		100	27±0,5	1:1024	1:256
Hoa	-	25	6±0,8	1:128	1:32
		70	20±0,5	1:512	1:64
		100	26±0,8	1:1024	1:256
Lá	Kiết lị, tiêu chảy [5]	25	3±0,5	1:128	1:8
		70	12±0,5	1:128	1:8
		100	21±0,5	1:256	1:128
Cành	Kiết lị, tiêu chảy [5]	25	0	1:8	-
		70	16±0,8	1:64	-
		100°C	21±0,5	1:512	1:128
Vỏ thân	Giun sán, đau răng [7]	25°C	7±0,5	1:256	1:64
		70°C	21±0,8	1:256	1:64
		100°C	28±1,2	1:1024	1:256
Vỏ rễ	Giun sán, đau răng [7]	25°C	6±0,8	1:128	1:8
		70°C	20±0,5	1:128	1:16
		100°C	24±0,5	1:512	1:128
Meropenem (30 µg/ml)			17±0,5	1:32	1:32
Doxycycline (30 µg/ml)				1:16	>1:4
Augmentin (60/30 µg/ml)				1:16	1:8

-: dịch chiết không thể hiện tính diệt khuẩn.

Giá trị MID của 6 loại dịch chiết nằm trong khoảng 1:256 đến 1:1024, cụ thể MID của dịch chiết lá là 1:256; dịch chiết cành và vỏ rễ là 1:512; dịch chiết vỏ quả, hoa và vỏ thân là 1:1024. Giá trị MBD đối với vi khuẩn *B. pseudomallei* lớn hơn gấp 4 lần so với giá trị MID ở dịch chiết vỏ quả, hoa, cành, vỏ thân và vỏ rễ; lớn hơn gấp 2 lần ở dịch chiết lá.

3.2. Tính bền của hoạt tính kháng *B. pseudomallei* ở điều kiện dịch mô phỏng đường tiêu hóa

Khi tiếp xúc với dịch mô phỏng đường tiêu hóa chứa các enzyme thủy phân pepsin trong pH thấp và pancreatin, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết vỏ quả, cành và vỏ rễ không đổi với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng là 27, 21 và 24 mm. Trong khi đó, dịch chiết hoa có đường kính vòng kháng khuẩn giảm từ 26 xuống 24 mm, dịch chiết lá giảm từ 21 xuống 20 mm và dịch chiết vỏ thân giảm từ 28 xuống 26 mm. Tuy nhiên, giá trị MID không thay đổi ở hầu hết các dịch chiết ngoại trừ dịch chiết cành tăng từ 1:512 lên 1:256. Giá trị MBD của dịch chiết vỏ quả, vỏ thân và vỏ rễ đã xử lý qua dịch mô phỏng đường tiêu hóa vẫn được giữ nguyên không đổi so với dịch chiết tương ứng chưa xử lý, nhưng giá trị này tăng gấp 2 lần ở dịch chiết hoa, lá và cành (bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của dịch chiết lựu khi xử lý với dịch tiêu hóa mô phỏng.

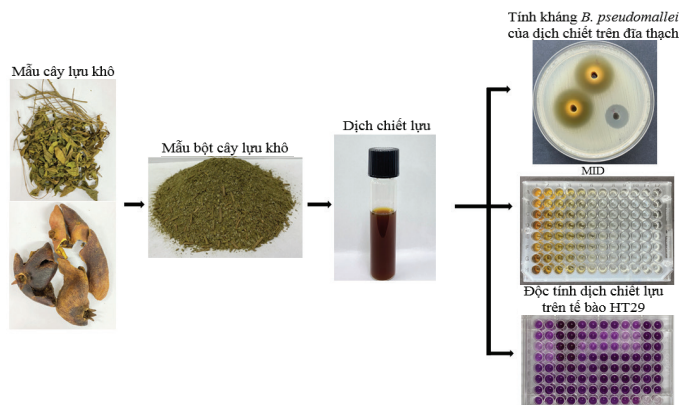
Hoạt tính kháng khuẩn	Dịch chiết các bộ phận của cây lựu					
	Vỏ quả	Hoa	Lá	Cành	Vỏ thân	Vỏ rễ
D (mm)	27±0,5	24±0,8	20±0,5	21±0,5	26±1,0	24±0,5
MID	1:1024	1:1024	1:256	1:256	1:1024	1:512
MBD	1:256	1:128	1:64	1:64	1:256	1:128

3.3. Độc tính tế bào

Tất cả các dịch chiết cây lựu cho thấy độc tính thấp trên các dòng tế bào thử nghiệm với giá trị ID_{50} ở trên giá trị MID tương ứng. Trong 3 loại tế bào thử nghiệm, dòng tế bào HEK293 chịu được độc tính của cả loại 6 dịch chiết gấp 1,5-4,2 lần so với hai dòng tế bào HT29 và HepG2 (bảng 4, hình 1).

Bảng 4. Độc tính tế bào của dịch chiết lựu.

Loại dịch thử nghiệm	Độc tính tế bào (ID_{50})		
	HT29	HepG2	HEK293
Vỏ quả	1:154	1:110	1:64
Hoa	1:140	1:110	1:64
Lá	1:94	1:61	1:36
Cành	1:96	1:64	1:32
Vỏ thân	1:150	1:120	1:36
Vỏ rễ	1:96	1:70	1:48
Meropenem (30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
Doxycycline (30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
Augmentin (60/30 µg/ml)	>1:8	>1:8	>1:8
DMSO (%)	2,6	2,6	3,5



Hình 1. Mẫu cây lựu, hoạt tính kháng vi khuẩn *B. pseudomallei* và độc tính trên dòng tế bào HT29 của dịch chiết lựu.

4. Bàn luận

Giống như vi sinh vật, thực vật là một nguồn tài nguyên đa dạng về mặt sinh học với ước tính có khoảng 250.000 đến 500.000 loài thực vật trên Trái đất [10]. Trong lịch sử nhân loại, nhiều loài thực vật đã được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc y học cổ truyền để điều trị các bệnh khác nhau. Cho đến nay, thực vật vẫn là nguồn dược liệu quan trọng, đặc biệt ở những nước đang phát triển, nơi mà nền y học cổ truyền vẫn được sử dụng rộng rãi và hiệu quả [3]. Tuy nhiên, chỉ một phần nhỏ trong số chúng đã được điều tra về hoạt tính kháng khuẩn [11]. Để đánh giá hoạt tính sinh học của cây thuốc, các nhà khoa học thường sử dụng các dung môi hữu cơ phân cực để tách chiết các hợp chất mong muốn. Dịch chiết sau đó được tinh sạch qua các phân đoạn và loại bỏ dung môi trước khi tiến hành các nghiên cứu về tính kháng khuẩn hoặc phân tích cấu trúc hóa học. Tuy nhiên, trong y học cổ truyền, nhiều loại cây thuốc được điều chế bằng phương pháp sắc với nước và uống trực tiếp. Do vậy, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết lựu trong nghiên cứu này đã được cân nhắc về ảnh hưởng của nhiệt độ trong quá trình sắc thuốc theo y học cổ truyền. Đồng thời, do cách sử dụng thuốc bằng đường uống nên ảnh hưởng của điều kiện đường tiêu hóa đến hiệu quả kháng khuẩn của dịch chiết cũng được đánh giá. Giá trị MID và MBD đã tăng ít nhất tương ứng 2 lần (mẫu lá) và 4 lần (vỏ thân); tăng nhiều nhất tương ứng 64 (mẫu cành) và 128 lần (mẫu cành) khi chiết ở nhiệt độ 100°C so với 25°C. Kết quả thu được chỉ ra rằng, phương pháp chiết chất kháng khuẩn ở nhiệt độ 100°C cho hiệu quả tốt nhất và phù hợp với phương pháp sắc thuốc truyền thống.

Dịch chiết thô từ các bộ phận của cây lựu là hỗn hợp nhiều chất và không được cô đặc thành cao để tính toán khối lượng khô của dịch chiết. Do vậy, chúng tôi sử dụng giá trị MID thay vì MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) mặc dù cả hai giá trị này được tính toán dựa trên phương pháp vi pha loãng. Việc sử dụng giá trị MID giúp chúng tôi thực hiện thí nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn phù hợp với cách sử dụng dịch sắc thuốc theo y học cổ truyền. Bởi mục đích của nghiên cứu này là tìm kiếm cây thuốc phổ biến ở trong vườn mà người dân có thể sử dụng trực tiếp chỉ bằng cách đun sôi

và uống cho phòng và điều trị bệnh nhiễm trùng melioidosis ở giai đoạn duy trì.

Các nghiên cứu đã công bố cho thấy, nhiều dịch chiết từ thực vật vẫn duy trì gần như nguyên vẹn hoạt tính kháng khuẩn khi xử lý với nhiệt độ cao lên đến 121°C. Ngược lại, cũng có mẫu bị mất hoạt tính khi xử lý ở nhiệt độ 60°C [12]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế và kháng khuẩn của dịch chiết ở nhiệt độ 100°C cao hơn đáng kể so với khi chiết ở nhiệt độ 25 và 70°C. Kết quả này chứng minh hoạt tính kháng khuẩn trong dịch chiết lựu là bền nhiệt và sắc thuốc là một phương pháp hiệu quả mà y học cổ truyền đã sử dụng cho việc điều chế thuốc điều trị các bệnh nhiễm trùng.

Cây lựu được chứng minh chứa nhiều hoạt chất sinh học, trong đó có các chất trao đổi bậc hai có đặc tính kháng khuẩn cao thuộc các nhóm như phenol, polyphenol, flavonoid, coumarin, tannins và quercetin [6]. Do việc sử dụng thuốc qua đường uống, nên sự có mặt của các enzym tiêu hóa và môi trường pH thấp có thể làm thay đổi cấu trúc hoặc phân hủy các hoạt chất này dẫn đến việc làm giảm hoặc mất hoạt tính kháng khuẩn. Trong số 6 mẫu dịch chiết cây lựu, giá trị MID không thay đổi ngoại trừ mẫu dịch chiết cành tăng 2 lần sau khi xử lý với enzym tiêu hóa ở điều kiện pH thấp. Bên cạnh đó, giá trị MBD không đổi ở các mẫu vỏ quả, vỏ thân và vỏ rễ trong khi các mẫu còn lại tăng 2 lần sau khi xử lý. Như vậy, có thể thấy hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết cây lựu bền với điều kiện của dịch tiêu hóa và phù hợp cho việc sử dụng bằng đường uống.

Vỏ quả và lá lựu là 2 bộ phận được coi là ít độc và có hoạt tính chống nhiễm trùng thường được sử dụng trong y học cổ truyền. Nhiều nghiên cứu sử dụng các dịch sắc các bộ phận này cho điều trị các chứng nhiễm trùng đường tiêu hóa, viêm đường tiết niệu và các vết thương ngoài da [5, 6]. Trong y học cổ truyền Việt Nam, các bộ phận vỏ thân và vỏ rễ cây lựu được ghi nhận là có độc và thường dùng chữa bệnh nhiễm ký sinh trùng [5]. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã chứng minh dịch chiết tất cả các bộ phận cây lựu không gây độc với các tế bào thử nghiệm ở các MBD tương ứng. Ngoài ra, so với các kháng sinh đang được dùng cho điều trị melioidosis như augmentin, doxycycline hay meropenem thì hoạt tính kháng *B. pseudomallei* của nước sắc cây lựu có hiệu quả tốt hơn rõ rệt. Do vậy qua nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy, nguồn dược liệu từ cây lựu có tiềm năng trong phòng và điều trị melioidosis ở giai đoạn duy trì. Tuy nhiên, để có minh chứng cụ thể, các nghiên cứu sâu hơn về tính kháng khuẩn và tác dụng dược lý của dịch sắc lựu cần được tiến hành *in vivo*.

5. Kết luận

Dịch chiết từ các bộ phận của cây lựu có hoạt tính kháng *B. pseudomallei* và độc tính thấp trên một số dòng tế bào người. Dịch chiết lựu bền với nhiệt độ và điều kiện đường tiêu hóa, do vậy việc điều chế thuốc bằng phương pháp sắc và sử dụng qua đường uống là phù hợp. Phát hiện của chúng tôi cung cấp thêm bằng chứng chứng minh tiềm năng sử dụng nước sắc cây lựu cho điều trị bệnh

melioidosis. Trong định hướng nghiên cứu tiếp theo, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và độc tính tế bào cần được thử nghiệm *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu hoạt tính kháng *B. pseudomallei* từ một số loại trà, thảo dược và thực phẩm ở Việt Nam”, mã số QG.19.48 do Đại học Quốc gia Hà Nội tài trợ. Trần Thị Lệ Quyên được tài trợ bởi Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ trong nước của VINIF, Viện Nghiên cứu dữ liệu lớn (mã số 2020.TS.33). Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Limmathurotsakul, N. Golding, D.A.B. Dance, et al. (2016), “Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis”, *Nature Microbiology*, **1**(1), DOI: 10.1038/nmicrobiol.20158.
- [2] P. Panomket, S. Wanram, T. Srivorasmas, et al. (2012), “Bioactivity of plant extracts against *Burkholderia pseudomallei*”, *Asian Biomedicine*, **6**(4), pp.619-623, DOI: 10.5372/1905-7415.0604.100.
- [3] T.T. Vu, H. Kim, V.K. Tran, et al. (2015), “*In vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Vietnam against human pathogenic bacteria”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**(32), DOI: 10.1186/s12906-016-1007-2.
- [4] M. Erkan, A. Dogan (2018), “Pomegranate/Roma - *Punica granatum*”, *Exotic Fruits*, **1**, DOI: 10.1016/B978-0-12-803138-4.00049-6.
- [5] D.T. Loi (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Medical Publishing House one member Company Limited, 1494pp (in Vietnamese)
- [6] C. Joshi, P. Patel, V. Kothari (2019), “Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens”, *F1000Research*, **8**(70), DOI: 10.12688/f1000research.17430.1.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 10th Edition, 279pp.
- [8] The United States Pharmacopeial (2018), *U.S. Pharmacopeia National Formulary 2018: USP 41 NF 36*, United Book Press, 2413pp.
- [9] T. Mosmann (1983), “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods*, **65**(1-2), pp.55-63, DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [10] R.P. Borris (1996), “Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company”, *Journal of Ethnopharmacology*, **51**(1-3), pp.29-38, DOI: 10.1016/0378-8741(95)01347-4.
- [11] S. Mickymaray (2019), “Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens”, *Antibiotics*, **8**(4), DOI: 10.3390/antibiotics8040257.
- [12] M.M. Ginovyan (2017), “Effect of heat treatment on antimicrobial activity of crude extracts of some Armenian herbs”, *Proceedings of The Yerevan State University*, **51**(2), pp.113-117, DOI: 10.46991/PYSU:B/2017.51.2.113.

Đánh giá hiệu quả của xét nghiệm sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR trong giảm nguy cơ dị ứng thuốc Carbamazepine

Võ Thị Ngọc Hảo¹, Chu Văn Sơn¹, Nguyễn Đoàn Thủy², Nguyễn Văn Liệu^{2,3}, Nguyễn Thị Vân Anh^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Thần kinh - Đột quỵ, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, 108 Hoàng Như Tiếp, phường Bồ Đề, quận Long Biên, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Thần kinh, Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Khương Thượng, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/6/2022; ngày chuyển phản biện 20/6/2022; ngày nhận phản biện 11/7/2022; ngày chấp nhận đăng 14/7/2022

Tóm tắt:

Hai đa hình kháng nguyên bạch cầu người *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* đã được chứng minh có liên quan chặt chẽ với các phản ứng có hại nghiêm trọng trên da (SCAR) do Carbamazepine (CBZ) gây ra và được khuyến cáo cần phải sàng lọc cho các bệnh nhân trước khi sử dụng CBZ để giảm nguy cơ dị ứng thuốc. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã áp dụng xét nghiệm sàng lọc đồng thời *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR Taqman Locked-nucleic acid (LNA) probe có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trên 35 bệnh nhân được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh. Trong số 13 bệnh nhân dương tính với một hoặc cả hai alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* (37,14%) được kê thuốc thay thế cho CBZ và theo dõi các tác dụng phụ, chỉ có 1 bệnh nhân bị phản ứng có hại nhẹ trên da sau 24 ngày dùng Trileptal (Oxcarbazepine) với liều 600 mg/ngày, 12 bệnh nhân còn lại không có biểu hiện dị ứng. Các bệnh nhân âm tính với hai alen này không xuất hiện dị ứng khi chỉ định điều trị bằng CBZ. Khi so sánh với 30 mẫu đối chứng dương tính với một hoặc hai alen này và 21 trường hợp SCAR khi điều trị bằng CBZ (OR=28, 95%CI: 3,15-248,78), kết quả thu được khẳng định sự cần thiết của việc sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* trước khi sử dụng CBZ trong tư vấn điều trị một số bệnh thần kinh, giúp giảm tỷ lệ SCAR khi thay thế CBZ bằng thuốc khác cho các bệnh nhân dương tính với một trong hai alen này.

Từ khóa: Carbamazepine, *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02*, multiplex real-time PCR, phản ứng có hại nghiêm trọng trên da (SCAR).

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

CBZ là thuốc đầu tay trong điều trị một số bệnh lý thần kinh như động kinh, đau dây thần kinh sọ não V và rối loạn lưỡng cực, dưới dạng liệu pháp đơn trị liệu hoặc kết hợp điều trị ở cả người lớn và trẻ em. Một trong những điều đáng lo ngại nhất khi sử dụng CBZ là người bệnh sử dụng thuốc có nguy cơ mắc SCAR, bao gồm hội chứng hệ thống tăng bạch cầu ái toan do thuốc (DRESS), hội chứng Stevens-Johnson (SJS) và hoại tử biểu bì nhiễm độc (TEN) được quyết định bởi các yếu tố di truyền khác nhau. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra mối liên quan chặt chẽ giữa những người mang alen kháng nguyên bạch cầu người *HLA-B*15:02* với SJS/TEN do CBZ gây ra ở nhiều quần thể người châu Á và alen *HLA-A*31:01* ở quần thể người châu Âu [1-5]. Để giảm nguy cơ tử vong và gánh nặng bệnh tật do dị ứng thuốc CBZ, năm 2007 Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã khuyến cáo kiểm tra sự có mặt của *HLA-B*15:02* trước khi kê đơn CBZ điều trị động kinh cho những bệnh nhân gốc Á. Tổ chức Thực hành lâm sàng dược di truyền (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) khuyến cáo bệnh nhân mang

alen *HLA-A*31:01* hoặc *HLA-B*15:02* nên được loại trừ khỏi liệu pháp CBZ. Vai trò của xét nghiệm phát hiện alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trước khi điều trị CBZ cho bệnh nhân trong việc phòng chống dị ứng thuốc đã được nhiều nhóm nghiên cứu thực hiện, cụ thể một nghiên cứu được thực hiện với 4.877 bệnh nhân tại Đài Loan (Trung Quốc) cho thấy, sàng lọc alen *HLA-B*15:02* trước khi bắt đầu điều trị với CBZ hiệu quả trong ngăn ngừa SJS/TEN hoàn toàn do CBZ gây ra [2]. Tại Việt Nam, xét nghiệm xác định kiểu gen *HLA-B*15:02* đã được thực hiện tại một số cơ sở y tế, tuy nhiên theo tìm hiểu của chúng tôi, chưa có nghiên cứu nào báo cáo kết quả đánh giá vai trò của xét nghiệm sàng lọc 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trong tư vấn điều trị thuốc cho quần thể bệnh nhân động kinh người Việt Nam. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp multiplex real-time PCR với cặp mồi và đầu dò LNA được thiết kế đặc hiệu với alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* để sàng lọc đồng thời 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* ở các bệnh nhân có chỉ định dùng CBZ trước khi bác sỹ lâm sàng kê đơn thuốc điều trị, giúp làm giảm nguy cơ tử vong hoặc các biến chứng do dị ứng thuốc CBZ.

*Tác giả liên hệ: Email: vananbiolab@gmail.com

Evaluating the effect of screening dual *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles by multiplex real-time PCR technique on reducing the risk of Carbamazepine-induced hypersensitivity reactions

Thi Ngoc Hao Vo¹, Van Son Chu¹, Doan Thuy Nguyen², Van Lieu Nguyen^{2,3}, Thi Van Anh Nguyen^{1*}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Neurology and Stroke Department, Tam Anh General Hospital, 108 Hoang Nhu Tiep Street, Bo De Ward, Long Bien District, Hanoi, Vietnam

³Department of Neurology, Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Khuong Thuong Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 15 June 2022; revised 11 July 2022; accepted 14 July 2022

Abstract:

Human leukocyte antigen (HLA) gene polymorphisms *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* are strongly associated with Carbamazepine (CBZ)-induced severe cutaneous adverse reactions (SCARs). As a result, it is recommended to screen these two alleles before CBZ therapy to reduce the risk of drug allergy. In this study, the authors applied the simultaneous screening test for *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles by multiplex real-time PCR Taqman LNA probe with high sensitivity and specificity in 35 patients that were diagnosed with neurological diseases. Among thirteen patients (37.14% of total) who were positive for single or dual *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01* alleles were prescribed alternatives to CBZ and monitored for adverse events, only one patient had a mild skin adverse reaction after 24 days using Trileptal (Oxcarbazepine) at a dose of 600 mg/day, 12 patients had no symptoms or allergic reactions. The remaining negative patients showed good tolerance to CBZ therapy without any allergy symptoms. Compared to the data of 30 control samples carrying these one or two alleles and 21 patients exhibiting CBZ-induced severe hypersensitivity reactions (OR=28, 95%CI: 3.15-248.78), these results confirm the importance of screening for *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles before using CBZ in neurological diseases treatment to reduce SCAR rates by replacing CBZ with another drug in patients positive for one of these two alleles.

Keywords: Carbamazepine, *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02*, multiplex real-time PCR, severe cutaneous adverse reactions (SCARs).

Classification number: 3.5

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu được tiến hành trên tổng cộng 35 bệnh nhân nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh được thăm khám tại Khoa Thần kinh - Đột quỵ, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh từ tháng 4/2021 đến tháng 4/2022 và được sàng lọc đa hình gen HLA để tư vấn trước khi điều trị thuốc. Các bệnh nhân nhóm thử nghiệm được đưa vào nghiên cứu đánh giá nguy cơ dị ứng do CBZ hoặc Oxcarbazepin phải thỏa mãn đủ các tiêu chuẩn sau: được khám, chẩn đoán bệnh lý thần kinh, có đủ bằng chứng chẩn đoán bệnh trên lâm sàng và cận lâm sàng; có chỉ định điều trị bằng CBZ nếu kết quả sàng lọc không mang alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* hoặc chỉ định điều trị bằng Oxcarbazepin nếu kết quả sàng lọc dương tính mang alen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01*; hiện tại, không dùng các thuốc có nguy cơ dị ứng cao và bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ của nhóm thử nghiệm bao gồm: bệnh nhân đã điều trị bằng CBZ, các trường hợp đã xuất hiện tình trạng dị ứng trên lâm sàng trước khi sàng lọc và khởi đầu dùng thuốc; bệnh nhân không đủ xét nghiệm cần thiết cho nghiên cứu; bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu.

Song song với nhóm thử nghiệm, thông tin của 30 bệnh nhân mang các gen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* thuộc nhóm đối chứng được tập hợp để so sánh dữ liệu với nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân này được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh được điều trị bằng CBZ dưới 3 tháng và có biểu hiện dị ứng hoặc bệnh nhân dùng CBZ trên 3 tháng và không biểu hiện dị ứng, không dùng các thuốc có nguy cơ dị ứng khác được các bác sỹ theo dõi dị ứng; các bệnh nhân này được thực hiện xét nghiệm sàng lọc 2 alen nêu trên trong quá trình điều trị thuốc (không phải trước khi điều trị thuốc); bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Thu nhận mẫu bệnh phẩm

Trước khi điều trị với CBZ, bác sỹ lâm sàng sẽ thu nhận 2-5 ml máu của bệnh nhân. Quá trình xác định kiểu gen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội).

2.3. Multiplex real-time PCR sử dụng đầu dò Taqman LNA probe xác định kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*

Mẫu máu được xử lý trong vòng 24 giờ kể từ lúc lấy của bệnh nhân. DNA tổng số từ mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được tách chiết bằng bộ QIAamp DNA minikit

(Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kiểu gen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được xác định bằng phản ứng multiplex real-time PCR sử dụng đầu dò Taqman LNA probe với hệ thống máy PCR LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Đức). Phản ứng được thiết kế gồm một cặp mồi và đầu dò oligonucleotide nhân bản đặc hiệu gen *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* và gen nội chuẩn *beta-actin* (*ACTB*) để kiểm soát hiện tượng âm tính giả trong phản ứng multiplex real-time PCR. Đầu dò dùng phát hiện alen *HLA-A*31:01* có gắn chất phát huỳnh quang HEX (525/556 nm) và đầu dò phát hiện *HLA-B*15:02* được gắn chất phát huỳnh quang FAM (495/520), cả 2 đầu dò này được thiết kế cải biến theo dạng Taqman LNA probe, một dạng nucleotide đặc biệt có nhiệt độ biến tính cao hơn so với nucleotide thông thường, có thể giúp làm giảm độ dài probe, giảm khoảng cách giữa các dye huỳnh quang quencher và reporter mà vẫn đảm bảo nhiệt động nóng chảy của đầu dò. Từ đó giảm nhiễu và tăng độ nhạy, độ đặc hiệu cho phản ứng multiplex real-time PCR với mục đích phân biệt được alen đích *HLA-A*31:01/HLA-B*15:02* với các biến thể phức tạp của gen HLA phổ biến trong tộc người Kinh và quần thể người Đông Nam Á. Đầu dò gắn đặc hiệu gen *ACTB* được thiết kế có gắn chất phát huỳnh quang Texas Red (590/610 nm). Trình tự mồi và đầu dò được mô tả trong giải pháp hữu ích đã được chấp nhận đơn hợp lệ số 9826w/QĐ-SHTT ngày 17/6/2021 của Cục Sở hữu trí tuệ cho đơn đăng ký sáng chế “Kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* và quy trình sản xuất kit này” (mã số 1-2021-02498) [6].

2.4. Xác định kiểu gen HLA bằng kỹ thuật Sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO)

Kết quả xác định kiểu gen HLA bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR được khẳng định lại bằng kỹ thuật PCR-SSO. Kỹ thuật này được thực hiện tại Trung tâm Máu quốc gia, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương sử dụng lifecodes HLA SSO Typing kit (Luminex Technology, Mỹ).

2.5. Tư vấn kê đơn thuốc điều trị động kinh

Kết quả xác định kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* được gửi tới bác sĩ lâm sàng trong 1-2 ngày kể từ khi nhận được mẫu máu. Sau khi có kết quả sàng lọc gen, ở các trường hợp bệnh nhân dương tính với *HLA-B*15:02* hoặc/ và *HLA-A*31:01* khi các bệnh nhân quay lại tái khám được tư vấn về nguy cơ dị ứng và lựa chọn liệu pháp điều trị với thuốc khác thay thế cho CBZ. Các đối tượng âm tính đồng thời với cả alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được tư vấn điều trị bằng CBZ (các bác sĩ vẫn tiến hành tư vấn về

nguy cơ dị ứng). Các bệnh nhân sau khi được kê đơn điều trị tiếp tục theo dõi các triệu chứng phản ứng có hại của thuốc và phải thông báo ngay cho bác sĩ lâm sàng khi xuất hiện các triệu chứng dị ứng.

2.6. Phân tích dữ liệu

Số liệu được thu thập và xử lý với biến số định lượng có phân phối chuẩn trình bày giá trị trung bình $\pm$ SD, không phân phối chuẩn sẽ trình bày giá trị trung vị và tỷ lệ phần trăm. Các tiêu chuẩn phân tích, so sánh dựa vào phân bố chuẩn kiểm định T-test hoặc Fisher's exact test.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội (mã số 118/GCN-HDDDCYSH-DHYHN ngày 8/6/2020) và theo đề cương của đề tài mã số 63/19-DTDL.CN-XNT được hội đồng khoa học của Bộ Khoa học và Công nghệ phê duyệt. Nghiên cứu được thực hiện theo đúng các quy định về đạo đức nghiên cứu trong y học. Bệnh nhân được cung cấp đầy đủ thông tin về nghiên cứu, được bảo mật thông tin cá nhân và xác nhận đồng thuận tham gia nghiên cứu.

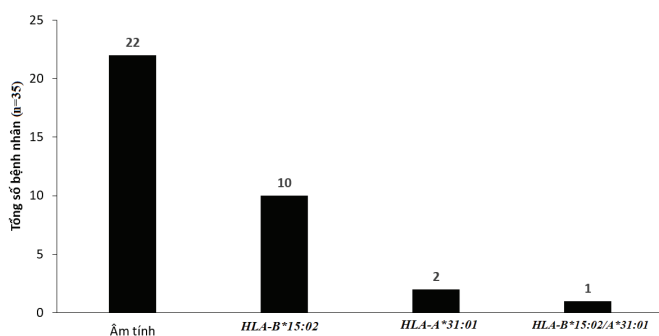
3. Kết quả

3.1. Phân tích đặc điểm lâm sàng của các bệnh nhân nhóm thử nghiệm

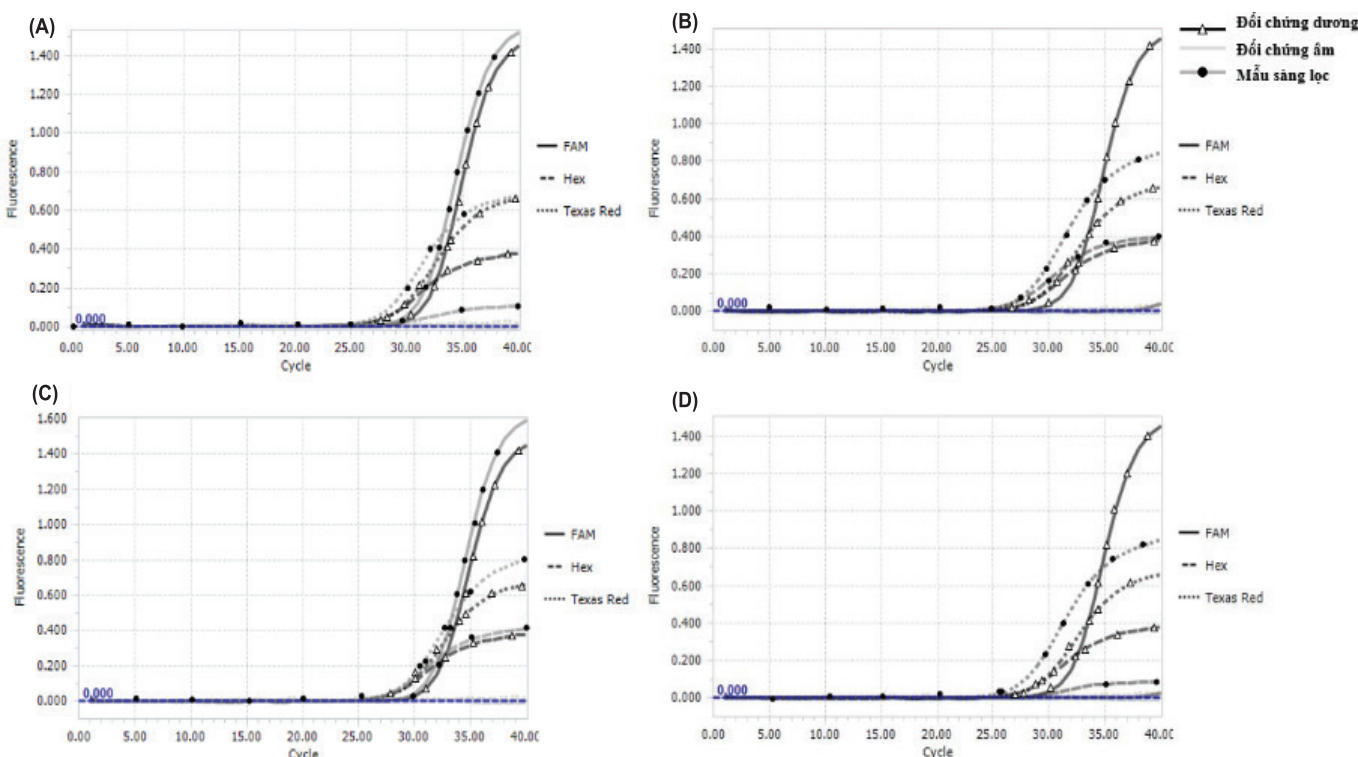
Thông tin tổng hợp về tuổi, giới, bệnh lý thần kinh trên lâm sàng của bệnh nhân nhóm thử nghiệm được mô tả ở bảng 1. Trong 35 bệnh nhân thu thập, tỷ lệ nam (chiếm 57,14%) nhiều hơn nữ, độ tuổi trung bình là 26 tuổi (2-63 tuổi). Phần lớn các đối tượng tham gia nghiên cứu được chẩn đoán động kinh với số lượng 32 bệnh nhân (chiếm 91,43%) và 2 trường hợp đau dây thần kinh tam thoa/dây thần kinh sọ não V (chiếm 5,71%), còn lại 1 trường hợp chẩn đoán bệnh thần kinh khác (2,86%) (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng các bệnh nhân nhóm thử nghiệm.

Đặc điểm	Tổng số bệnh nhân (n=35)
Tuổi trung bình (nhỏ nhất - lớn nhất)	26 (2-63)
Giới tính	
Nam	20 (57,14%)
Nữ	15 (42,86%)
Chẩn đoán lâm sàng	
Động kinh	32 (91,43%)
Đau dây thần kinh sọ não V (đau dây thần kinh tam thoa)	2 (5,71%)
Bệnh thần kinh khác	1 (2,86%)



Hình 1. Kết quả sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* ở bệnh nhân nhóm thử nghiệm.



Hình 2. Đường biểu diễn tín hiệu kết quả multiplex real-time PCR ở các mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm. (A) Dương tính với *HLA-B*15:02*; (B) Dương tính với *HLA-A*31:01*; (C) Dương tính với cả 2 alen; (D) Âm tính với cả 2 alen.

3.2. Xác định kiểu gen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* ở bệnh nhân nhóm thử nghiệm bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR sử dụng dụng cụ đầu dò Taqman LNA probe

Xét nghiệm sàng lọc kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* được thực hiện trên 35 bệnh nhân đưa vào nghiên cứu. Kết quả ghi nhận có 13 (37,14%) bệnh nhân được phát hiện mang các alen *HLA-B*15:02* (28,57%), *HLA-A*31:01* (5,71%) hay dương tính cả 2 alen (2,86%) và có 22 (62,86%) trường hợp âm tính (hình 1). Kết quả đường tín hiệu huỳnh quang sàng lọc 2 alen trên một số mẫu đại diện được thể hiện ở hình 2. Mẫu bệnh nhân dương

tính với alen *HLA-B*15:02* cho tín hiệu khuếch đại gen đích *HLA-B*15:02* (FAM) và gen nội chuẩn *ACTB* (Texas Red) (hình 2A), bệnh nhân dương tính với alen *HLA-A*31:01* cho tín hiệu khuếch đại gen đích *HLA-A*31:01* (HEX) và gen nội chuẩn *ACTB* (Texas Red) (hình 2B), bệnh nhân dương tính với cả 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* cho tín hiệu khuếch đại FAM, HEX và Texas Red rõ ràng (hình 2C), bệnh nhân âm tính chỉ mang tín hiệu khuếch đại Texas Red của gen nội chuẩn *ACTB* (hình 2D).

Song song với nhóm bệnh nhân thử nghiệm, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* bằng phương pháp multiplex real-time PCR ở 30 bệnh nhân thuộc nhóm đối chứng. Kết quả cho thấy, có 24 (chiếm 80%) trường hợp mang alen *HLA-B*15:02*, 5 (chiếm 16,67%) trường hợp mang alen *HLA-A*31:01* và 1 (chiếm 3,33%) trường hợp mang đồng thời 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* (phụ lục 1, 2).

Bên cạnh kết quả sàng lọc bằng phương pháp multiplex real-time PCR, chúng tôi đã tiến hành xác định kiểu gen HLA của 18 mẫu bệnh nhân bằng phương pháp tham chiếu

Phụ lục 1. Kết quả multiplex real-time PCR và PCR-SSO trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở một số mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm (n=18).

STT	Mã mẫu	Kết quả multiplex real-time PCR (chu kỳ ngưỡng - C _t)			Kết luận	PCR-SSO	
		<i>FAM B1502</i>	<i>HEX A3101</i>	<i>TEXAS ACTB</i>		<i>Locus A</i>	<i>Locus B</i>
1	NTL.TV01	-	-	26,33	Âm tính	11:01/11:02	38:02/46:01
2	TQL.TV03	-	-	26,57	Âm tính	24:02/29:01	07:05/52:01
3	DDH.TV04	23,32	-	28,19	Dương tính B15:02	11:01/24:02	15:02/15:25
4	NTL.TV08	25,38	-	25,96	Dương tính B15:02	02:01/24:02	15:02/46:01
5	LHV.TV09	-	-	25,41	Âm tính	02:03/02:03	15:25/46:01
6	PQM.TV13	-	-	26,58	Âm tính	02:06/24:07	15:01/44:03
7	PDLT.TV15	-	-	25,06	Âm tính	11:01/24:07	15:01/51:01
8	TKT.TV17	26,69	-	25,81	Dương tính B15:02	11:01/24:02	15:02/15:02
9	HHQ.TV18	29,31	-	27,22	Dương tính B15:02	02:03/29:01	15:02/58:01
10	NBN.TV21	-	-	23,44	Âm tính	02:03/24:02	18:02/46:01
11	ĐTH.TV22	-	-	24,42	Âm tính	11:01/24:07	35:05/51:01
12	TĐT.TV23	-	-	26,13	Âm tính	02:01/24:02	35:05/46:01
13	NTV.TV29	30,13	28,03	28,00	Dương tính B15:02/A31:01	11:01/31:01	15:02/51:02
14	PKV.TV32	-	27,05	26,89	Dương tính A31:01	11:01/31:01	13:01/40:01
15	MTL.TV33	-	-	25,00	Âm tính	02:03/11:01	54:01/55:02
16	NTH.TV34	-	-	26,11	Âm tính	01:01/24:02	27:04/55:02
17	LTT.TV35	-	-	27,87	Âm tính	01:01/33:01	38:02/57:01
18	TMT.TV36	-	-	27,20	Âm tính	29:01/33:01	07:05/58:01

Phụ lục 2. Kết quả multiplex real-time PCR (n=30) và PCR-SSO (n=14) trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở các mẫu bệnh nhân nhóm đối chứng.

STT	Mã mẫu	Kết quả multiplex real-time PCR (chu kỳ ngưỡng - C _t)			Kết luận	PCR-SSO	
		<i>FAM B1502</i>	<i>HEX A3101</i>	<i>TEXAS ACTB</i>		<i>Locus A</i>	<i>Locus B</i>
1	HLA/CA 19.04	-	26,15	24,25	Dương tính A31:01		
2	HLA/CA 19.08	18,32	-	20,94	Dương tính B15:02		
3	HLA/CA 19.13	19,55	-	21,86	Dương tính B15:02		
4	HLA/CA 19.14	20,08	-	23,09	Dương tính B15:02		
5	HLA/CA 19.17	20,01	-	23,0	Dương tính B15:02		
6	HLA/CA 19.21	-	26,91	25,22	Dương tính A31:01		
7	HLA/CA 19.22	21,06	-	24,94	Dương tính B15:02		
8	HLA/CA 19.25	23,07	-	23,41	Dương tính B15:02	02:01/11:01	15:02/15:11
9	HLA/NP 19.28	-	25,89	24,9	Dương tính A31:01	11:02/31:01	35:03/40:02
10	HLA/NP 20.29	30,74	-	32,72	Dương tính B15:02	24:02/33:03	15:02/58:01
11	HLA/NP 20.32	24,12	-	24,03	Dương tính B15:02	02:03/11:01	15:02/27:04
12	HLA/NP 20.33	24,72	-	24,32	Dương tính B15:02	02:06/11:02	15:02/40:01
13	HLA/NP 20.36	22,42	-	25,15	Dương tính B15:02	11:02/24:07	15:02/15:02
14	HLA/CA 20.46	21,89	-	24,77	Dương tính B15:02	02:01/33:03	15:02/58:01
15	HLA/DP 20.51	22,58	22,56	25,7	Dương tính A31:01/B15:02	02:01/31:01	15:02/15:18
16	HLA/DP 20.55	24,38	-	26,84	Dương tính B15:02		
17	HLA/DP 20.56	24,36	-	27,26	Dương tính B15:02	02:03/02:06	15:02/51:01
18	HLA/DP 20.59	-	25,58	27,55	Dương tính A31:01	31:01/68:01	51:01/51:02
19	HLA/DP 20.61	25,3	-	26,32	Dương tính B15:02		
20	HLA/DP 20.62	21,84	-	25,32	Dương tính B15:02		
21	HLA/DP 20.67	25,85	-	26,5	Dương tính B15:02	02:01/11:01	15:02/46:01
22	HLA/DP 20.73	24,32	-	24,85	Dương tính B15:02		
23	HLA/DP 20.77	27,57	-	25,44	Dương tính B15:02	11:01/24:07	15:02/15:25
24	HLA/DP 20.80	28,37	-	25,73	Dương tính B15:02		
25	HLA/DP 21.92	28,19	-	25,61	Dương tính B15:02	02:01/02:01	15:02/15:25
26	HLA/DP 21.93	28,66	-	25,19	Dương tính B15:02	02:03/11:01	15:02/56:04
27	HLA/DP 21.94	-	24,55	25,49	Dương tính A31:01		
28	HLA/DP 21.96	30,5	-	27,15	Dương tính B15:02		
29	HLA/DP 22.98	27,01	-	25,49	Dương tính B15:02		
30	HLA/DP 22.107	29,88	-	27,48	Dương tính B15:02		

Chú thích: -: không có tín hiệu, tương đương với giá trị C_t=0.

PCR-SSO sử dụng bộ kit LIFECODES HLA SSO Typing kit (Luminex Technology). Ở nhóm đối chứng, chúng tôi chỉ có điều kiện thực hiện phân tích 14/30 mẫu bằng kỹ thuật PCR-SSO sử dụng bộ kit LIFECODES HLA SSO Typing kit (Luminex Technology) để kiểm tra khẳng định lại kết quả. Kết quả thể hiện ở bảng 2 đã cho thấy sự tương đồng của 2 phương pháp là 100%.

Bảng 2. Kết quả multiplex real-time PCR và PCR-SSO trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở một số mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm (n=18) và nhóm đối chứng (n=14).

Nhóm thử nghiệm (n=18)				Nhóm đối chứng (n=14)			
PCR-SSO	Multiplex real-time PCR		Tổng cộng	PCR-SSO	Multiplex real-time PCR		Tổng cộng
	+	-			+	-	
+	6	0	6	+	14	0	14
-	0	12	12	-	0	0	0
Tổng cộng	6	12	18	Tổng cộng	14	0	14

+: dương tính với alen *HLA-A*31:01* hoặc/và *HLA-B*15:02*;
-: không mang 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*; độ đặc hiệu: 100%.

Tất cả những trường hợp có kết quả sàng lọc dương tính với alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* đã được tư vấn về nguy cơ dị ứng do CBZ gây ra và chỉ định các thuốc điều trị thay thế ở dạng đơn điều trị hoặc kết hợp điều trị. Thuốc thay thế ở dạng đơn điều trị và kết hợp điều trị bao gồm: Trileptal, Lamotrigine, Depakine, Levetiracetam và Topamax. Với các bệnh nhân có kết quả sàng lọc gen âm tính, sau khi quay lại tái khám được các bác sỹ tư vấn và tiến hành kê đơn điều trị với CBZ (Tegretol). Tất cả các bệnh nhân đều được theo dõi, thăm hỏi tình trạng sức khỏe, các trường hợp bệnh nhân có xuất hiện dị ứng sau khi dùng thuốc được yêu cầu dùng thuốc và tái khám.

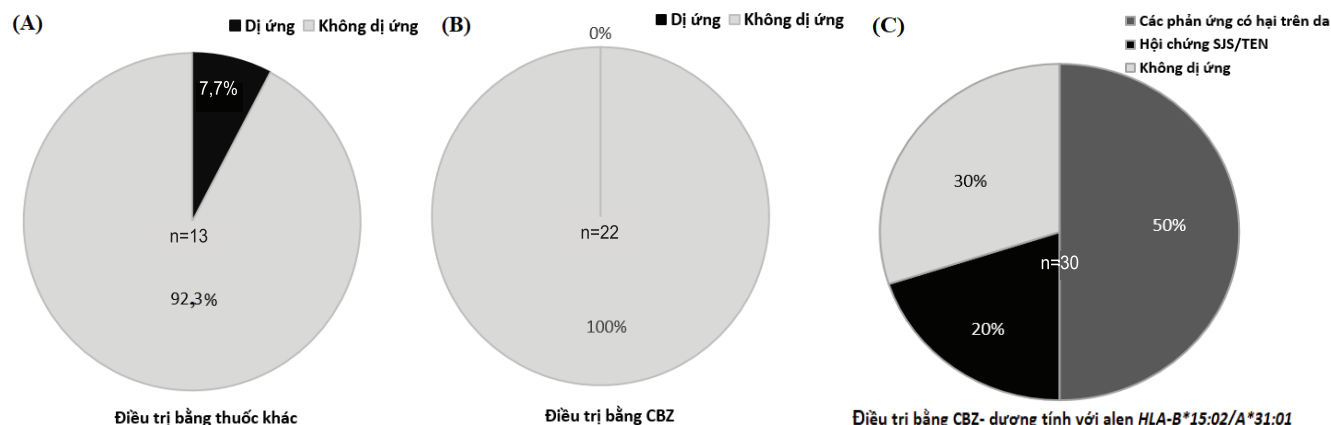
3.3. Tỷ lệ xuất hiện SCAR ở nhóm thử nghiệm sau khi được tư vấn điều trị dùng thuốc so sánh với nhóm đối chứng

Sau khi tiến hành kê đơn điều trị dựa trên các kết quả chẩn đoán lâm sàng và sàng lọc gen, chúng tôi tiếp tục theo

dõi sự xuất hiện dị ứng ở các bệnh nhân nhóm thử nghiệm nếu có. Trong tổng số 13 trường hợp dương tính với các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được kê đơn điều trị bằng thuốc thay thế, có 1 bệnh nhân xuất hiện tình trạng dị ứng với các phản ứng trên da ở thể nhẹ và 12 (92,3%) trường hợp dương tính còn lại không xuất hiện dị ứng (hình 3A). Cụ thể, bệnh nhân này sàng lọc mang alen *HLA-B*15:02* được chỉ định điều trị bằng Trileptal (Oxcarbazepine, 600 mg/ngày) xuất hiện mẩn ngứa tay, chân, bụng, không gây loét ở ngày điều trị thứ 24. 22 trường hợp âm tính với *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được điều trị bằng CBZ (Tegretol) không ghi nhận ca nào có biểu hiện dị ứng (hình 3B).

Bên cạnh xét nghiệm gen trước khi kê đơn, nghiên cứu cũng tiến hành theo dõi dị ứng trên 30 mẫu bệnh nhân đối chứng đã được kê đơn điều trị với CBZ và sàng lọc mang các alen *HLA-A*31:01* và/hoặc *HLA-B*15:02*. Trong đó, có 21 (70,0%) bệnh nhân xuất hiện tình trạng dị ứng, bao gồm các phản ứng có hại trên da như xuất hiện ban đỏ và mẩn ngứa ở mặt, tay, bụng hay toàn thân với 16 trường hợp bệnh nhân (53,3%). Đặc biệt, có 6 trường hợp bệnh nhân (20,0%) xuất hiện tình trạng dị ứng là SCAR với hội chứng SJS ở 5 bệnh nhân (16, 7%) và 1 bệnh nhân xuất hiện hội chứng TEN. Ngoài ra, vẫn xuất hiện 9 (30,0%) bệnh nhân được điều trị bằng CBZ và dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* không xuất hiện dị ứng (hình 3C).

Khi phân tích mối liên hệ ở 13 bệnh nhân đã sàng lọc mang các alen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* trước khi kê đơn điều trị bằng thuốc khác và 30 bệnh nhân đã điều trị bằng CBZ mang các alen này, tỷ số chênh (OR) được tính toán có giá trị là 28 với khoảng tin cậy 95%CI: 3,15-248,78 (p=0,0028).



Hình 3. Kết quả theo dõi dị ứng ở các bệnh nhân tham gia trong nghiên cứu. (A-B) Nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* được điều trị bằng các thuốc khác (A) và bệnh nhân âm tính với 2 alen này được điều trị bằng CBZ (B); (C) Nhóm đối chứng. Các bệnh nhân đối chứng đã điều trị với CBZ và dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01*.

4. Bàn luận

*HLA-B*15:02* được nhiều nhóm nghiên cứu chứng minh là có liên quan chặt chẽ với SJS/TEN do CBZ gây ra trong các quần thể thuộc khu vực Đông Á và Đông Nam Á như Đài Loan (Trung Quốc), Thái Lan, Malaysia và cả Việt Nam [2, 4, 7-9]. Mỗi liên quan giữa sự có mặt của alen *HLA-A*31:01* và SCAR đã được các tác giả như T. Ozeki và cs (2011) [10] nghiên cứu trên quần thể người Nhật Bản; M. McCormack và cs (2011) [5] nghiên cứu trên quần thể người châu Âu; X. Wu và cs (2010) [9] nghiên cứu trên quần thể người Hán. Tại Việt Nam, M.D. Do và cs (2020) [11] khi nghiên cứu về đa hình gen HLA ở tộc người Kinh đã phát hiện thấy tần suất xuất hiện cao của *HLA-B*15:02* (11,88%), *HLA-A*31:01* (1,5%) và như vậy tiềm ẩn nguy cơ dị ứng thuốc CBZ khá cao đối với bệnh nhân động kinh Việt Nam. Trong một nghiên cứu khác về mối liên quan giữa tình trạng dị ứng CBZ và đa hình HLA của người Việt Nam, D.V. Nguyen và cs (2015) [4] (thực hiện chủ yếu tại Úc và lấy mẫu trên 38 bệnh nhân điều trị CBZ tại Bệnh viện Bạch Mai) đã chỉ ra các trường hợp SCAR bao gồm 52,6% SJS, 18,4% TEN, 21,1% các hội chứng chồng chéo và 7,9% bệnh nhân DRESS. Trong đó, 34/38 bệnh nhân SCAR do CBZ có *HLA-B*15:02* (89,47%) và có mối liên quan chặt chẽ giữa *HLA-B*15:02* và hội chứng SJS/TEN với OR: 33,78, 95%CI: 7,55-151,03 ($p < 0,0001$). Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên thực hiện tại Việt Nam công bố đánh giá hiệu quả của sàng lọc 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* trước khi kê đơn điều trị CBZ cho bệnh nhân động kinh. Tuy cỡ mẫu (35 bệnh nhân nhóm thử nghiệm) còn nhỏ, nghiên cứu bước đầu ghi nhận 13 bệnh nhân mang alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* (10 bệnh nhân dương tính *HLA-B*15:02*, 2 bệnh nhân *HLA-A*31:01* và 1 bệnh nhân dương tính với cả 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*). Trong số 13 trường hợp dương tính mang gen *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* (37,14%), bệnh nhân đã được điều trị bằng thuốc thay thế như: Trileptal, Lamotrigine, Depakine, Levetiracetam, Topamax và được theo dõi trong 2 tháng. Duy nhất có 1 trường hợp mang alen *HLA-B*15:02* xuất hiện triệu chứng nhẹ khi điều trị bằng Trileptal (Oxcarbazepine). Oxcarbazepine là thuốc chống động kinh có cấu trúc vòng thơm tương tự như CBZ, nhưng được báo cáo là có ít tác dụng phụ hơn so với CBZ [12]. Việc xuất hiện bệnh nhân dị ứng thuốc Trileptal cho thấy cần có nhiều nghiên cứu đánh giá nguy cơ dị ứng loại thuốc này ở các bệnh nhân điều trị động kinh. Kết quả có 22 bệnh nhân âm tính với 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được lựa chọn điều trị CBZ (Tegretol) không ghi nhận hiện tượng dị ứng thuốc cho thấy tính chính xác và hiệu quả của việc sàng lọc 2 alen này trong tư vấn điều trị thuốc cho bệnh nhân. Kết hợp cùng kết quả theo dõi dị ứng trên 30 mẫu đối chứng điều trị bằng CBZ mang các alen *HLA-A*31:01* và/hoặc *HLA-B*15:02* với OR: 28, 95%CI: 3,15-248,78 ($p = 0,0028$) đã giúp giảm và phòng ngừa các trường hợp dị ứng khi điều trị bằng CBZ, đặc biệt là các SCAR như hội chứng SJS/TEN. Việc sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* là các dấu chuẩn sinh học giúp bệnh nhân giảm chi phí điều trị khi được kê đơn CBZ có giá rẻ hơn so với các thuốc khác mà không bị dị ứng thuốc.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy được giá trị của việc sàng lọc các bệnh nhân mang các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trước khi điều trị bằng CBZ đem lại hiệu quả giúp giảm nguy cơ dị ứng xuống 28 lần (95%, CI: 3,15-248,78, $p = 0,0028$), chỉ có 1/13 ca bị phản ứng có hại nhẹ trên da, đặc biệt là không xuất hiện các phản ứng nặng như hội chứng SJS-TEN. Việc sàng lọc 2 alen này bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR có độ đặc hiệu cao, chi phí thấp và thời gian ngắn sẽ giúp cho việc tư vấn điều trị nhanh chóng, hiệu quả và giảm nguy cơ dị ứng thuốc CBZ. Nghiên cứu cần được mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn trong tương lai để đưa ra những khuyến cáo phù hợp cho tư vấn điều trị thuốc động kinh ở người Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.C. Chang, C.L. Too, S. Murad, et al. (2011), "Association of *HLA-B*1502* allele with carbamazepine-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in the multiethnic Malaysian population", *Int. J. Dermatol.*, **50**(2), pp.221-224, DOI: 10.1111/j.1365-4632.2010.04745.x.
- [2] P. Chen, J.J. Lin, C.S. Lu, et al. (2011), "Carbamazepine-induced toxic effects and *HLA-B*1502* screening in Taiwan", *N. Engl. J. Med.*, **364**(12), pp.1126-1133, DOI: 10.1056/NEJMoa1009717.
- [3] W.H. Chung, S.I. Hung, H.S. Hong, et al. (2004), "A marker for Stevens-Johnson syndrome", *Nature*, **428**(6982), DOI: 10.1038/428486a.
- [4] D.V. Nguyen, H.C. Chu, D.N. Van, et al. (2015), "*HLA-B*1502* and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in Vietnamese", *Asia Pacific Allergy*, **5**(2), pp.68-77, DOI: 10.5415/apallergy.2015.5.2.68.
- [5] M. McCormack, A. Alfirevic, S. Bourgeois, et al. (2011), "*HLA-A*3101* and carbamazepine hypersensitivity reactions in Europeans", *N. Engl. J. Med.*, **364**(12), pp.1134-1143, DOI: 10.1056/NEJMoa1013297.
- [6] National Office of Intellectual Property (2021), "Kit to detect human leukocyte antigen gene causing allergy to epilepsy drugs *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* and kit production process this", *Industrial Property Official Gazette volume 1: Inventions; Useful Solutions; Semiconductor Integrated Circuit Layout Design*, 661pp (in Vietnamese).
- [7] A.H.P. Khor, K.S. Lim, C.T. Tan, et al. (2017), "*HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* association with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis to carbamazepine in a multiethnic Malaysian population", *Pharmacogenetics and Genomics*, **27**(7), pp.275-278, DOI: 10.1097/FPC.0000000000000287.
- [8] C. Lochareonkul, J. Loplumlert, C. Limotai, et al. (2008), "Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with *HLA-B*1502* allele in Thai population", *Epilepsia*, **49**(12), pp.2087-2091, DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01719.x.
- [9] X.T. Wu, F.Y. Hu, D.M. An, et al. (2010), "Association between carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions and the *HLA-B*1502* allele among patients in central China", *Epilepsy and Behavior*, **19**(3), pp.405-408, DOI: 10.1016/j.yebeh.2010.08.007.
- [10] T. Ozeki, T. Mushiroda, A. Yowang, et al. (2011), "Genome-wide association study identifies *HLA-A*3101* allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population", *Hum. Mol. Gene*, **20**(5), pp.1034-1041, DOI: 10.1093/hmg/ddq537.
- [11] M.D. Do, L.G.H. Le, T.N. Dang, et al. (2020), "High-resolution HLA typing of *HLA-A*-, *B*-, *C*-, *DRB1*, and *DQB1* in Kinh Vietnamese by using next-generation sequencing", *Front. Genet.*, **11**, DOI: 10.3389/fgene.2020.00383.
- [12] D. Schmidt, C.E. Elger (2004), "What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs?", *Epilepsy and Behavior*, **5**(5), pp.627-635, DOI: 10.1016/j.yebeh.2004.07.004.

Nghiên cứu mật độ trồng thích hợp cho giống chuối tiêu già Nam Mỹ trên đất dòn thừa, đồi ruộng tại tỉnh Vĩnh Phúc

Nguyễn Văn Lam^{1*}, Lê Thành Phương¹, Nguyễn Phương Tùng¹, Lê Thị Lý²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ, 70 Trần Hưng Đạo, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn huyện Vĩnh Tường, thị trấn Vĩnh Tường, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/2/2023; ngày chuyển phản biện 2/3/2023; ngày nhận phản biện 24/3/2023; ngày chấp nhận đăng 28/3/2023

Tóm tắt:

Vĩnh Tường là huyện đi đầu trong công tác dòn thừa, đồi ruộng của tỉnh Vĩnh Phúc. Diện tích đất được dòn thừa, đồi ruộng của huyện Vĩnh Tường là vùng đất bãi ven sông Hồng, rất phù hợp cho cây chuối tiêu sinh trưởng, phát triển. Trong các năm 2019-2021, nông dân Vĩnh Tường đã đưa giống chuối tiêu Hồng vào sản xuất, tuy nhiên tỷ lệ cây bị mắc bệnh thối củ cao, sinh trưởng kém, năng suất thấp. Giống chuối tiêu già Nam Mỹ có nhiều ưu điểm hơn các giống chuối tiêu khác như: sinh trưởng khỏe, kháng sâu bệnh tốt, năng suất cao... Tuy nhiên, mật độ trồng có ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây giống. Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 1/2022 đến tháng 12/2022, với 4 mật độ trồng: 3.330, 2.000, 1.600 và 1.340 cây/ha. Kết quả nghiên cứu đã xác định được với mật độ trồng 2.000 cây/ha (2,5x2 m) cây có sức sinh trưởng thân, lá tốt, ít sâu bệnh hại, năng suất đạt 55.200 kg/ha, đây là mật độ phù hợp nhất đối với giống chuối tiêu già Nam Mỹ sản xuất tại huyện Vĩnh Tường.

Từ khóa: chuối tiêu già Nam Mỹ, dòn thừa, mật độ trồng, Vĩnh Phúc.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Cây chuối có tên khoa học là *Musa* spp., chi *Musa*, họ *Musaceae*. Hiện nay có khoảng 300 giống được trồng trên thế giới, đặc biệt ở các vùng nhiệt đới [1]. Chuối được trồng phổ biến ở 110 quốc gia trên thế giới [2]. Ở Việt Nam, chuối là một trong những giống cây ăn quả chủ lực do đặc điểm khí hậu nhiệt đới nóng ẩm rất phù hợp với đặc tính phát triển của cây chuối [3]. Tuy nhiên, sản xuất chuối, đặc biệt là chuối tiêu ở các tỉnh miền Bắc nước ta nói chung và Vĩnh Phúc nói riêng ngoài những thành tựu đã đạt được còn bộc lộ một số hạn chế như: sử dụng giống chưa phù hợp với từng vùng sinh thái, xác định thời vụ và mật độ trồng chuối chưa phù hợp cho từng loại đất, chế độ chăm sóc thiếu khoa học, chưa khai thác hết tiềm năng của cây chuối... [3]. Cây chuối sinh trưởng, phát triển kém, nhiều sâu bệnh hại, năng suất thấp, độ đồng đều và phẩm chất quả hàng hóa chưa cao [4]. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả đã công bố cho thấy, mật độ trồng chuối có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây chuối. Từ tháng 1/2022-12/2022, Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng đã đưa vào trồng thử nghiệm và nghiên cứu xác định mật độ trồng cho giống chuối tiêu già Nam Mỹ trên loại đất dòn thừa, đồi ruộng của huyện Vĩnh Tường nhằm xác định được mật độ trồng thích hợp trong điều kiện đất trồng của huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.

*Tác giả liên hệ: Email: nvlam@most.gov.vn

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Giống chuối tiêu già Nam Mỹ.

Tiêu chuẩn cây giống: Cây giống nuôi cấy mô, ương trong bầu đất, chiều cao thân cây 20-25 cm, 4-6 lá, đường kính thân giả 2,0-2,5 cm, bộ rễ khỏe, đầu rễ màu trắng, bộ lá xanh tốt, không có biểu hiện bệnh.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2022 đến 12/2022 tại xã Cao Đại, huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Công thức thí nghiệm:

Công thức 1 (CT1): Mật độ trồng 1,5x2,0 m (3.330 cây/ha).

Công thức 2 (CT2): Mật độ trồng 2,5x2,0 m (2.000 cây/ha).

Công thức 3 (CT3): Mật độ trồng 2,5x2,5 m (1.600 cây/ha).

Công thức 4 (CT4): Mật độ trồng 3,0x2,5 m (1.340 cây/ha).

- Phương pháp bố trí: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCBD), nhắc lại 3 lần cho 4 công thức, mỗi công thức 30 cây, tổng số cây thí nghiệm 360 cây.

- Kỹ thuật áp dụng:

Research on suitable plant densities for South American cavendish banana plants in land consolidation and exchange in Vinh Phuc province

Van Lam Nguyen^{1*}, Thanh Phuong Le¹,
Phuong Tung Nguyen¹, Thi Ly Le²

¹Institute of Regional Research and Development, Ministry of Science and Technology,
70 Tran Hung Dao, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Department of Agriculture and Rural Development of Vinh Tuong District,
Vinh Tuong Town, Vinh Tuong District, Vinh Phuc Province, Vietnam

Received 28 February 2023; revised 24 March 2023; accepted 28 March 2023

Abstract:

Vinh Tuong is the leading district in land consolidation and exchange in Vinh Phuc province. The district's land area for plotting and changing fields is the land along the Red river, which is very suitable for bananas to grow and develop. In 2019-2021, Vinh Tuong farmers put the "Tieu Hong" banana variety into production, but the rate of plants suffering from tuber rot is high, growth is poor, and yield is low. The South American cavendish banana variety has many advantages over other banana varieties, such as healthy growth, good pest resistance, and high yield... However, planting density has a great influence on growth and development. The study was carried out from January 2022 to December 2022, with 4 planting densities: 3,330, 2,000, 1,600 and 1,340 plants/ha. As a result of this study, the research team determined that with a planting density of 2,000 plants/ha (2.5x2 m), plants with good stem growth, good leaves, and few pests and diseases, yield 55,200 kg/ha. This is the most suitable density for the South American cavendish banana variety produced in the Vinh Tuong district.

Keywords: land consolidation and exchange, planting density, South American cavendish banana, Vinh Phuc.

Classification number: 4.1

+ Thời vụ trồng: Ngày 8/2/2022.

+ Nền đất trồng: Đất phù sa ven sông Hồng.

+ Căn cứ vào kết quả phân tích chất lượng đất tại địa điểm thí nghiệm của Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng và tập quán canh tác của người dân của địa phương, công thức bón phân cho một cây chuối cụ thể là: 5 kg phân chuồng ủ hoai + 300 g lân super + 500 g ure + 900 g kali clorua + 0,5 kg vôi bột/cây/năm.

+ Kỹ thuật bón phân và chăm sóc:

Bón lót: 5 kg phân chuồng ủ hoai + 300 g lân super/hố + 0,5 kg vôi bột.

Bón thúc: Lần 1 sau trồng 3 tháng; lần 2 sau trồng 7 tháng; lần 3 sau trồng 9 tháng: 5 kg phân chuồng ủ hoai + 300 g lân super + 167 g ure + 300 g kali clorua + 0,5 kg vôi bột/cây/năm.

Tia bỏ chồi: Dùng dụng cụ chuyên dụng hủy bỏ chồi bên, chỉ để lại cây chính và 1 chồi cho vụ 2, cứ 7-10 ngày cắt chồi một lần.

- Các chỉ tiêu và kỹ thuật theo dõi:

+ Động thái ra lá: Đếm số lá thực/cây, 1 tháng đếm một lần, ghi lại số liệu và đánh giá động thái ra lá.

+ Chu vi gốc: Dùng thước dây để đo chu vi thân giả, đo tại điểm lớn nhất, cách mặt đất 10 cm.

+ Chiều cao thân giả: Dùng thước dây đo từ gốc (cách mặt đất 5 cm) đến điểm đầu tiên của cuống buồng.

- Các yếu tố cấu thành năng suất:

+ Số nải/buồng: Đếm số nải thực tế trên một buồng. Đếm 3 buồng/lần nhắc lại, lấy số liệu trung bình.

+ Số quả/nải: Đếm tổng số quả trên nải thứ nhất, nải số 6 và nải cuối cùng của buồng, đếm 3 buồng/lần nhắc lại rồi lấy số trung bình.

+ Chiều dài quả (cm): Dùng thước dây để đo, đo lúc thu hoạch, đo 3 quả đại diện/nải, ở nải đầu tiên, nải số 6 và nải cuối buồng, rồi tính trung bình.

+ Đường kính quả (cm): Cắt ngang quả chuối ở vị trí trung điểm của quả, dùng thước nhựa thẳng để đo, đo lúc thu hoạch, đo quả đã đo chiều dài.

+ Khối lượng cả buồng (kg): Dùng cân đồng hồ, cân cả buồng nguyên vẹn, cân lúc thu hoạch.

+ Năng suất cả buồng (kg/ha): Khối lượng cả buồng x số cây cho thu hoạch/ha.

- Các chỉ tiêu đánh giá chất lượng cảm quan: Mức độ đồng đều, màu sắc.

- Theo dõi sâu, bệnh hại chính: Theo dõi 2 lần/tháng (vào ngày 1 và 15 hàng tháng), sau đó thống kê các loại sâu bệnh hại chính, bộ phận bị hại và mức độ gây hại. Mức độ gây hại được đánh giá theo các cấp độ sau:

Cấp -: Xuất hiện lẻ tẻ, gây hại không đáng kể, <5% tần suất bắt gặp.

Cấp +: Xuất hiện ít, gây hại nhẹ, 6-25% tần suất bắt gặp.

Cấp ++: Xuất hiện phổ biến, gây hại trung bình, 26-50% tần suất bắt gặp.

Cấp +++: Xuất hiện nhiều và gây hại nặng, >50% tần suất bắt gặp.

Nếu bệnh gặp chủ yếu ở cấp độ (-) và (+) thì tiến hành đếm số cây bị hại trên ô, rồi tính tỷ lệ % cây bị hại. Nếu có tất cả các cấp độ thì đánh giá mức độ gây hại và xác định nguy cơ phát sinh thành dịch.

- Theo dõi tuyến trùng: Kiểm tra đồng ruộng định kỳ 2 lần/tháng (hình 1), quan sát trên vườn chuối thí nghiệm nếu có biểu hiện cây còi cọc, lá ngắn sinh trưởng kém, bị vàng lá, biểu hiện héo mà không bị úng nước thì tiến hành kiểm tra rễ và củ nếu thấy rễ ngắn, bề mặt rễ nổi sần, có nhiều vết đen hoại tử và thối rữa, vòng ngoài củ nổi màu hồng thì đó là biểu hiện của tuyến trùng gây hại. Đếm số cây có biểu hiện tương tự và tính tỷ lệ % cây bị hại.



Hình 1. Cán bộ nghiên cứu của Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng kiểm tra cây chuối thí nghiệm sau trồng 5 tháng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tình hình sinh trưởng và phát triển của cây chuối thí nghiệm

Một số chỉ tiêu sinh trưởng cơ bản của cây chuối là động thái ra lá, chiều dài và chiều rộng lá, chiều cao thân giả và chu vi thân giả. Kết quả theo dõi một số chỉ tiêu nêu trên của cây chuối thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm.

Chỉ tiêu Công thức	Số lá ra trung bình/tháng (lá/cây/tháng)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều cao thân giả (cm)	Chu vi thân giả (cm)
CT1	2,54	187,00	47,36	190,00	55,60
CT2	2,70	238,00	53,94	200,00	55,81
CT3	2,46	206,00	49,97	193,00	56,78
CT4	2,46	213,00	53,41	190,00	55,83
CV (%)	4,30	5,50	3,30	5,00	1,90
LSD _{0,05}	0,21	23,28	3,36	19,50	2,16

Kết quả bảng 1 cho thấy, số lá ra trung bình/cây/tháng của cây chuối thí nghiệm ở các công thức dao động trong khoảng 2,46-2,70, trong đó số lá/cây/tháng ở CT2 cao hơn so với CT3 và CT4 ở mức tin cậy 95%. Số lá/cây/tháng ở CT3, CT4 và CT1 có sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê. Như vậy, tốc độ ra lá của cây chuối thí nghiệm tương đối nhanh, thể hiện sức sống mạnh mẽ, ở CT2, cây chuối có số lá ra trung bình/cây/tháng nhiều nhất.

Chiều dài lá của cây chuối thí nghiệm dao động trong khoảng 187,00-238,00 cm, trong đó CT2, CT3, CT4 cây có chiều dài lá lớn hơn CT1 ở mức tin cậy 95%, CT2 cây có chiều dài lá lớn hơn so với CT3, CT4 ở mức tin cậy 95%. CT2 cây có chiều dài lá lớn nhất. CT1 cây có chiều dài lá nhỏ nhất.

Chiều rộng lá của cây chuối thí nghiệm dao động trong khoảng 47,36-53,94 cm, trong đó chiều rộng lá của cây chuối thí nghiệm ở CT2 lớn hơn so với CT1 và CT3 ở mức tin cậy 95% nhưng sai khác về chiều dài lá so với CT3 không có ý nghĩa về mặt thống kê. Chiều dài lá của cây chuối thí nghiệm ở CT1 và CT3 có sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Chiều cao thân giả của cây chuối thí nghiệm dao động 190,00-200,00 cm, sự sai khác về chỉ tiêu chiều cao thân giả của cây chuối thí nghiệm không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tương tự như chỉ tiêu chiều cao thân giả thì chỉ tiêu chu vi thân giả của cây chuối thí nghiệm cũng có sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Như vậy, sau khi so sánh một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm ở các công thức với nhau thì ở CT2 có nhiều chỉ tiêu vượt trội hơn so với các công thức còn lại.

3.2. Một số chỉ tiêu về quả và năng suất cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm

Kết quả theo dõi một số chỉ tiêu về số nải/buồng, số quả/nải, chiều dài quả và đường kính quả của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc điểm về nải và quả của giống chuối tiêu già Nam Mỹ.

Công thức	Chỉ tiêu	Số nải/buồng (nải)	Số quả/nải (quả)	Chiều dài quả trung bình (cm)	Đường kính quả (cm)
CT1		8,90	18,80	20,50	3,30
CT2		9,40	19,30	20,80	3,30
CT3		9,30	19,14	21,30	3,50
CT4		9,20	18,90	20,80	3,30
CV(%)		3,90	1,30	1,50	1,70
LSD _{0,05}		0,70	0,48	0,60	0,11

Kết quả bảng 2 cho thấy, số nải/buồng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm dao động trong khoảng 8,90-9,40 nải/buồng, sự sai khác về chỉ tiêu số nải/buồng của cây chuối thí nghiệm không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Số quả/nải của chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm dao động trong khoảng 18,80-19,30 quả/nải, trong đó số quả/nải của cây chuối thí nghiệm ở CT2 cao hơn so với CT1 ở mức tin cậy 95%, sự sai khác về số quả/nải của cây chuối thí nghiệm ở CT2, CT3 và CT4 không có ý nghĩa thống kê.

Chiều dài quả của chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm dao động trong khoảng 20,50-21,30 cm, trong đó chiều dài quả ở CT3 lớn hơn so với chiều dài quả ở CT1 ở mức tin cậy 95%, sự sai khác về chiều dài quả ở các công thức CT2, CT3 và CT4 không có ý nghĩa thống kê.

Năng suất buồng thực thu của cây chuối tiêu già Nam Mỹ phụ thuộc vào mật độ trồng, khối lượng buồng. Trong điều kiện chăm sóc tốt, đảm bảo mật độ thì giống chuối tiêu già Nam Mỹ cho năng suất cao và ngược lại. Kết quả theo dõi chỉ tiêu năng suất buồng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Năng suất buồng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm.

Công thức	Chỉ tiêu	Khối lượng buồng (kg)	Năng suất (kg/ha)
CT1		26,50	88.245
CT2		32,40	64.800
CT3		34,50	55.200
CT4		34,00	45.560
CV(%)		4,90	7,50
LSD _{0,05}		2,68	9,54

Kết quả bảng 3 cho thấy, khối lượng buồng của cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm dao động trong khoảng 26,50-34,50 kg/buồng, trong đó khối lượng buồng của cây chuối thí nghiệm ở CT2, CT3 và CT4 cao hơn so với CT1 ở mức tin cậy 95%, sai khác về khối lượng buồng của cây chuối thí nghiệm ở CT2, CT3 và CT4 không có ý nghĩa thống kê. Năng suất buồng thực thu trung bình đạt 45.560-88.245 kg/ha, trong đó CT1 có năng suất cao hơn các công thức còn lại ở mức tin cậy 95%. Năng suất thực thu ở công thức 2 cao hơn các CT3 và CT4 ở mức tin cậy 95%. Sai khác về chỉ tiêu năng suất giữa CT3 và CT4 không có ý nghĩa thống kê.

Nhìn tổng thể về năng suất buồng thì CT1 có năng suất cao nhất vì mật độ trồng dày (3.330 cây/ha), tuy nhiên về khối lượng buồng lại thấp, số nải/buồng, số quả/nải ít, quả nhỏ và ngắn hơn so với các công thức còn lại. Ở CT3 và CT4 cây chuối tiêu già Nam Mỹ có năng suất thấp hơn do mật độ trồng thưa hơn (số lượng cây/ha lần lượt là 1.600 và 1.340 cây/ha) nhưng khối lượng buồng lại cao hơn, chiều dài và đường kính quả lớn hơn. Ở CT2 các chỉ tiêu năng suất, khối lượng buồng, chiều dài, đường kính quả tương ứng với mật độ, phù hợp hơn so với các công thức còn lại.

3.3. Tình hình sâu bệnh hại trên cây chuối thí nghiệm

Sâu hại: Khu vực triển khai thí nghiệm có khí hậu nhiệt đới gió mùa, nhiệt độ và ẩm độ không khí cao, đây là điều kiện thuận lợi cho các loại sâu bệnh phát sinh gây hại trên cây chuối nói riêng và các loại cây trồng nói chung. Kết quả theo dõi một số loại sâu hại chính trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm, được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Một số loại sâu hại chính trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm.

Công thức	Tỷ lệ (%)	Sâu đục thân	Sâu cuốn lá lớn	Rầy mềm	Bọ net xanh
CT1		4,44	12,22	10,00	16,67
CT2		1,11	3,33	10,00	10,00
CT3		6,67	10,00	3,33	10,00
CT4		4,44	4,44	16,67	6,67

Kết quả bảng 4 cho thấy, trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm xuất hiện 4 loại sâu (côn trùng) phát sinh gây hại. Cụ thể:

Sâu đục thân (*Cosmopolites sordidus*) xuất hiện gây hại với tỷ lệ cây bị hại dao động trong khoảng 1,11-6,67% số cây thí nghiệm trong công thức thí nghiệm. Tỷ lệ cây bị hại ở CT2 thấp hơn so với các công thức còn lại, tỷ lệ cây bị sâu đục thân gây hại cao nhất ở CT 3.

Sâu cuốn lá (*Erionota thrax*) xuất hiện gây hại với tỷ lệ cây bị hại dao động trong khoảng 3,33-12,22%, trong đó CT1 có tỷ lệ cây bị hại lớn nhất, CT2 có tỷ lệ cây bị hại thấp nhất.

Rầy mềm (*Pentalonia nigronervosa*) xuất hiện và gây hại trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm với tỷ lệ cây bị hại dao động trong khoảng 3,33-16,67%, trong đó ở CT4 có tỷ lệ cây bị hại nhiều hơn so với các công thức còn lại. CT3 có tỷ lệ cây bị hại thấp nhất.

Bọ net xanh (*Parasa consocia*) xuất hiện và gây hại trên cây chuối thí nghiệm với tỷ lệ cây bị hại giao động trong khoảng 6,67-16,67% số cây trong công thức thí nghiệm. Trong các công thức thí nghiệm, CT1 tỷ lệ cây bị bọ net xanh gây hại là nhiều nhất (16,67%), CT4 có tỷ lệ cây bị hại thấp nhất.

Bệnh hại: Trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm xuất hiện 3 loại bệnh chính là bệnh chùn đọt chuối, tuyến trùng, đốm lá, số liệu cụ thể được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Một số loại bệnh hại chính trên cây chuối tiêu già Nam Mỹ thí nghiệm.

Công thức	Tỷ lệ (%)	Bệnh chùn đọt chuối	Bệnh tuyến trùng	Bệnh đốm lá
CT1		13,33	10,00	12,22
CT2		0,00	3,33	4,44
CT3		4,44	7,77	15,56
CT4		5,55	3,33	7,77

Kết quả bảng 5 cho thấy, bệnh chùn đọt chuối (*Banana bunchy-top*) xuất hiện gây hại với tỷ lệ cây bị hại dao động 0,00-13,33% số cây trong công thức thí nghiệm. Trong đó CT2 không có cây nào bị hại, CT1 có tỷ lệ cây bị hại nhiều nhất (13,33%).

Bệnh tuyến trùng (*Radopholus similis*) xuất hiện, gây hại với tỷ lệ 3,33-10,00%, trong đó CT2 và CT4 có tỷ lệ cây bị hại tương tự nhau ở mức 3,33%, đây cũng là tỷ lệ thấp hơn so với hai công thức còn lại.

Bệnh đốm lá (*Clasdosporium musae*) xuất hiện gây hại nhiều hơn so với bệnh chùn đọt và tuyến trùng, tỷ lệ cây bị hại dao động trong khoảng 4,44-15,56%, trong đó CT3 có tỷ lệ cây bị hại nhiều nhất (15,56%), CT2 có tỷ lệ cây bị hại thấp nhất (4,44%).

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Về khả năng sinh trưởng thân lá, CT2 với mật độ trồng 2.000 cây/ha, có số lá ra trung bình/tháng cao nhất (đạt 2,70 lá/cây/tháng), chiều dài lá trung bình lớn nhất (238 cm), chiều rộng lá đạt 53,94 cm, lớn hơn CT1 và CT3. Chỉ tiêu chiều cao thân giả và chu vi thân giả không có sự sai khác về mặt thống kê.

- Về năng suất thu được, CT1 có năng suất buồng cao nhất (88.245 kg/ha) nhưng do mật độ trồng dày (3.330 cây/ha), khối lượng buồng, quả nhỏ và ngắn. CT2 với mật độ trồng 2.000 cây/ha có năng suất đạt được lớn hơn so với các công thức thí nghiệm có mật độ trồng thưa hơn; các chỉ tiêu đánh giá về khối lượng buồng, chiều dài, đường kính quả đạt được tương tự so với các công thức có mật độ trồng thưa hơn (1.600 và 1.340 cây/ha) các chỉ tiêu đạt tiêu chuẩn chuối xuất khẩu.

- Về sâu, bệnh gây hại, ở hầu hết các công thức với các mật độ trồng khác nhau đều bị các đối tượng gây hại bao gồm: sâu đục thân, sâu cuốn lá lớn, rầy mềm, bọ net xanh, bệnh chùn đọt, tuyến trùng và đốm lá. Công thức với mật độ trồng 3.330 cây có xu hướng bị các đối tượng sâu, bệnh gây hại nhiều hơn. Các đối tượng sâu, bệnh gây hại đều không có khả năng phát sinh thành dịch.

- Mật độ trồng phù hợp đối với cây chuối tiêu già Nam Mỹ trên đất dòn thừa đổi ruộng tại huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc là 2,5x2 m, tương đương mật độ 2.000 cây/ha.

Từ các kết quả nêu trên, khuyến nghị: Đối với vùng đất dòn thừa, đổi ruộng tại huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc, mật độ phù hợp nhất trong trồng chuối tiêu già Nam Mỹ là 2.000 cây/ha, hàng cách hàng 2,5 m, cây cách cây 2 m.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L.T.T. Vi (2019), *Report on The Topic "Research on The Production of Local Banana Varieties Using Tissue Culture Methods and Building an Intensive Farming Model in Tien Phuoc District, Quang Nam Province"*, Application Center and Quang Nam Science and Technology Information (in Vietnamese).

[2] Faostas (2023), "Information about banana trees (*Musa* spp.)", <https://www.fao.org/faostat/en/#search/banana>, accessed 20 February 2023 (in Vietnamese).

[3] N.T.N Hoa (2021), *Report on The Topic "Research on Perfecting Technology and Developing Commodity Production of Red Banana (*Artocarpus interger*) in a Chain in Hanoi City"*, Department of Agriculture and Development Rural area of Hanoi city (in Vietnamese).

[4] N.V. Nghiem, D.T.V. Lan, V.V. Thang, et al. (2015), "Research results on some technical measures for cultivating pink pepper banana crop 2 in the Northern Delta", *Journal of Agriculture and Rural Development*, 2, pp.51-58 (in Vietnamese).

Xác định trọng số các tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển nuôi cá nước ngọt tại tỉnh Hưng Yên bằng phương pháp phân tích thứ bậc (AHP)

Đỗ Đức Tùng*, Nguyễn Ngọc Hân, Đỗ Phương Linh

Viện Kinh tế và Quy hoạch Thủy sản, 10 Nguyễn Công Hoan, phường Ngọc Khánh, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/8/2022; ngày chuyển phản biện 1/9/2022; ngày nhận phản biện 26/9/2022; ngày chấp nhận đăng 29/9/2022

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm ứng dụng phương pháp phân tích thứ bậc (Analytic hierarchy process - AHP) xác định trọng số các tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển nuôi cá nước ngọt (NCNN) tại tỉnh Hưng Yên. Các nhóm yếu tố chính liên quan đến hoạt động NCNN gồm điều kiện tự nhiên, môi trường sinh thái và điều kiện kinh tế - xã hội. AHP là phương pháp toán học hỗ trợ phân tích, xử lý các vấn đề ra quyết định đa tiêu chí theo các cấp thứ bậc, với nguyên tắc xác định mức độ quan trọng tương đối của các tiêu chí chính, tiêu chí phụ bằng cách so sánh cặp và dùng thang đánh giá theo con số tuyệt đối. Bên cạnh đó, phương pháp tham vấn chuyên gia cũng đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu, nhằm đánh giá mức độ ưu tiên, điều chỉnh thứ bậc và đưa ra các nhận định khách quan trong việc xác định trọng số. Kết quả nghiên cứu chính là bảng tổng hợp xác định trọng số được tính toán từ ý kiến đánh giá của các chuyên gia trong lĩnh vực quy hoạch thủy sản, NCNN và hệ thống thông tin địa lý (GIS). Các trọng số gắn với bộ tiêu chí đánh giá là cơ sở của việc chồng ghép thông tin, dữ liệu và phân tích GIS, từ đó xây dựng bản đồ đánh giá tiềm năng phát triển NCNN của tỉnh Hưng Yên đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy cao.

Từ khóa: cá nước ngọt, Hưng Yên, phân tích thứ bậc (AHP), tiêu chí, trọng số.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Thủy sản là ngành nghề gắn bó lâu đời với người dân Hưng Yên, đặc biệt là những người dân ở các vùng trũng ven sông Hồng và sông Luộc. Trong những năm qua, ngành thủy sản Hưng Yên đã và đang trên đà phát triển với những thành tựu đáng kể. Cơ cấu đàn cá thay đổi theo hướng năng suất, chất lượng cao được thị trường chấp nhận như: cá trắm cỏ, cá diêu hồng, cá lăng, cá chim trắng, rô phi đơn tính, chép V1, cá rô đồng... được nuôi nhiều thay thế các giống, loài truyền thống hiệu quả kinh tế thấp như cá mè trắng, cá trôi... Sản xuất thủy sản trên địa bàn tỉnh đã từng bước chuyển đổi theo hướng sản xuất hàng hóa, đời sống của người dân tham gia sản xuất thủy sản được cải thiện rõ rệt, góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế - xã hội vùng nông thôn trong tỉnh, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của trường trong và ngoài tỉnh Hưng Yên [1]. Tuy nhiên, việc phát triển NCNN trên địa bàn tỉnh Hưng Yên vẫn còn mang tính tự phát, thiếu quy hoạch, đầu tư chưa thực sự hiệu quả trên một đơn vị diện tích, vì vị trí nuôi chưa thực sự phù hợp, trong quá trình nuôi đã xuất hiện các dịch bệnh và gây tác động tiêu cực đến môi trường vùng nuôi, thậm chí xung đột với các khu vực sản xuất nông nghiệp, công nghiệp khác... [2]. Vì vậy, một phương pháp đánh giá phân tích xác định tiềm năng NCNN chuyên biệt, kết hợp hài hòa các yếu tố kinh tế, xã hội và điều kiện tự nhiên, môi trường để hỗ trợ nhà quy hoạch ra quyết định lựa chọn vùng không gian thích hợp cho phát triển NCNN ở tỉnh Hưng Yên là hết sức cần thiết.

Sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ GIS mở ra hướng tiếp cận một cách hiệu quả trong đánh giá phân tích xác định tiềm năng phát triển NCNN. Tích hợp GIS cùng các công cụ hỗ trợ

và phương pháp AHP cho phép đánh giá đồng thời nhiều vùng không gian một cách nhanh chóng và có hệ thống, góp phần thúc đẩy quá trình phân tích, đánh giá theo hướng chính xác và bền vững [3]. Nội dung quan trọng nhất được chỉ ra của sự kết hợp này là việc xác định trọng số cho các lớp GIS thành phần sẽ tham gia quá trình đánh giá tiềm năng phát triển NCNN tại tỉnh Hưng Yên. Sau quá trình xác định này có được các trọng số càng chính xác và sát với thực tiễn sẽ là tiền đề giúp tạo ra bản đồ tiềm năng có chất lượng tốt nhất.

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã sử dụng phương pháp AHP trên cơ sở kết quả tham vấn ý kiến đánh giá của các chuyên gia trong lĩnh vực quy hoạch phát triển nuôi trồng thủy sản (NTTS) và GIS để tính toán xác định các trọng số tương ứng cho từng tiêu chí đánh giá. Bảng trọng số thành phần và tổng hợp được sử dụng trong quá trình phân tích chồng ghép các lớp thông tin, dữ liệu GIS, từ đó xây dựng bản đồ đánh giá tiềm năng phát triển NCNN trên địa bàn tỉnh Hưng Yên phục vụ các nghiên cứu chuyên sâu cũng như công tác quy hoạch của địa phương.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Bộ tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển NCNN

Theo các tài liệu trong và ngoài nước liên quan đến nội dung nghiên cứu, đồng thời dựa trên quá trình phân tích, đánh giá của nhóm chuyên gia, các tiêu chí về nhóm yếu tố tự nhiên, môi trường sinh thái và kinh tế - xã hội được lựa chọn tham gia đánh giá và xây dựng thành bộ tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển NCNN tỉnh Hưng Yên (bảng 1).

*Tác giả liên hệ: Email: mrdoductung@gmail.com

Determining criteria weight for assessing the potential development of freshwater fish farming in Hung Yen province by analytic hierarchy process (AHP)

Duc Tung Do*, Ngoc Han Nguyen, Phuong Linh Do

Vietnam Institute of Fisheries Economics and Planning,
10 Nguyen Cong Hoan Street, Ngoc Khanh Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

Received 29 August 2022; revised 26 September 2022; accepted 29 September 2022

Abstract:

This study aims to apply the analytic hierarchy process (AHP) to determine the criteria weight for assessing the potential development of freshwater fish farming in Hung Yen province. The main groups of factors related to freshwater fish farming include natural conditions, environmental ecology and socio-economic conditions. AHP is a mathematical method to support the analysis and handling of multi-criteria decision-making problems according to hierarchical levels, with the principle of determining the relative importance of main criteria and sub-criteria by pairwise comparisons, and using absolute numerical ratings. Besides, the expert consultation method also plays an essential role in the study to assess the priority, adjust the hierarchy and make objective judgments in determining the weights. The main research result was a summary table determining the weights calculated from the opinions of experts in the fields of fisheries planning, freshwater fish farming, and Geographic Information Systems (GIS). The weights associated with the set of evaluation criteria are the basis of the superposition of information, data, and GIS analysis, thereby building a map to assess the potential for developing freshwater fish farming in Hung Yen province to ensure accuracy and high reliability.

Keywords: analytic hierarchy process (AHP), criteria, freshwater fish, Hung Yen province, weight.

Classification number: 4.5

Bảng 1. Bộ tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển NCNN tỉnh Hưng Yên.

STT	Yếu tố/tiêu chí	Mức độ thích hợp			Tài liệu tham khảo
		Thích hợp nhất (3)	Thích hợp vừa phải (2)	Không thích hợp (1)	
1	Nhóm yếu tố tự nhiên				
1.1	Nhiệt độ trung bình (°C)	24-30	15-24 và 30-35	<15 và >35	[4]
1.2	Loại hình thủy văn gần nhất	Sông, ao, hồ lớn (sông Hồng, sông Luộc)	Sông, ao, hồ nhỏ (nhánh của sông lớn)	Còn lại	
1.3	Độ cao địa hình (m)	Tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh			
2	Nhóm yếu tố môi trường sinh thái				
2.1	Loại đất	Phù sa gầy (trũng, ngập nước)	Phù sa động nước (địa hình vắn thấp)	Còn lại	
2.2	Chất lượng nước				[5, 6]
2.2.1	pH	7,0-8,0	6,0-7,0 và 8,0-8,5	>8,5 và <6,0	
2.2.2	Ôxy hòa tan (DO) (mg/l)	>5,0	4,0-5,0	<4,0	
2.2.3	BOD ₅ (mg/l)	<6,0	6,0-15,0	>15,0	
2.2.4	COD (mg/l)	<15	15-30	>30	
2.2.5	Tổng chất rắn lơ lửng (TSS) (mg/l)	<30	30-50	>50	
2.2.6	Nitrit (NO ₂ ⁻) (mg/l)	<0,04	0,04-0,05	>0,05	
2.2.7	Nitrat (NO ₃ ⁻) (mg/l)	<5,0	5,0-10,0	>10,0	
2.2.8	Amoni (NH ₄ ⁺) (mg/l)	<0,3	0,3-0,9	>0,9	
2.2.9	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	<0,2	0,2-0,3	>0,3	
2.2.10	Coliform (MPN/100 ml)	<5.000	5.000-7.500	>7.500	
3	Nhóm yếu tố kinh tế - xã hội				
3.1	Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)				
3.1.1	Hệ thống kênh mương	Có cả kênh cấp, kênh thoát	Chỉ có kênh cấp hoặc kênh thoát	Không có kênh cấp, kênh thoát	
3.1.2	Tương quan vị trí với đê	Phía trong đê và cách đê ≤500 m	Phía trong đê và cách đê >500 m	Phía ngoài đê	
3.1.3	Hệ thống trạm bơm	≥2 trạm bơm	1 trạm bơm	0	
3.2	Sử dụng đất				[7]
3.2.1	Hiện trạng sử dụng đất	Đất NTTS (NTS)	Đất trồng lúa (LUC), lúa khác (LUK), vùng trồng, đất chưa sử dụng	Còn lại	
3.2.2	Quy hoạch sử dụng đất đến năm 2030	Đất quy hoạch NTTS (NTS)	Đất quy hoạch lúa khác (LUK)...	Còn lại	
3.3	Đặc điểm vị trí NCNN và cơ sở hạ tầng khác				
3.3.1	Khoảng cách đến nguồn nước (m)	<500	500-1.000	>1.000	[4]
3.3.2	Khoảng cách đến trục giao thông (m)	<500	500-1.000	>1.000	[4]
3.3.3	Khoảng cách đến trạm dịch vụ thú y thủy sản (m)	<4.000	4.000-8.000	>8.000	[7]
3.3.4	Khoảng cách đến chợ (m)	1.000-5.000	<1.000 và 5.000-10.000	>10.000	[7]
3.3.5	Hệ thống trạm biến thế	Tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh			
3.4	Đặc điểm dân số				[7]
3.4.1	Mật độ dân số (người/km ²)	<250	250-1.000	>1.000	
3.4.2	Dân số trung bình (người)	<100.000	100.000-150.000	>150.000	
3.5	Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)	Tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh			

Nhóm yếu tố tự nhiên:

- Về nhiệt độ trung bình: Nhìn chung, Hưng Yên chịu ảnh hưởng của khí hậu nhiệt đới gió mùa, có mùa đông lạnh, mùa hè nóng ẩm và có 4 mùa rõ rệt, vì vậy, trong nghiên cứu

này tiêu chí nhiệt độ được đánh giá tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh, sự khác nhau sẽ được đánh giá theo mùa tương ứng với 4 thời điểm đo quan trắc môi trường tỉnh Hưng Yên năm 2020, trên cơ sở đó có thể xác định được thời điểm nuôi, mùa vụ thả thích hợp.

- Về loại hình thủy văn gần nhất: Nguồn cung cấp nước cho NCNN là tiêu chí hết sức quan trọng. Theo đặc điểm thủy văn tại địa phương, nhóm nghiên cứu đã đưa ra đánh giá những vùng thích hợp nhất cho NCNN là những vùng gần với nguồn cung cấp nước ở các sông lớn như Sông Hồng, Sông Luộc; những vùng ít thích hợp hơn là những vùng gần với các nhánh sông lớn và những vùng không thích hợp là những vùng không có nguồn nước hoặc không đủ để cung cấp nước cho ao nuôi.

- Về độ cao địa hình: Địa hình càng cao thì khả năng tiếp cận của vùng nuôi với nguồn nước càng khó. Do nằm ở trung tâm Đồng bằng Bắc Bộ, Hưng Yên có địa hình tương đối bằng phẳng, không đồi, không núi, không biển, đơn giản hơn so với nhiều tỉnh ở miền Bắc. Có hướng dốc từ tây bắc xuống đông nam, xen kẽ những ô đất trũng (đầm, hồ, ao, ruộng trũng) thường xuyên bị ngập nước. Điểm cao nhất có cốt cao không quá +10 m, vì vậy với NTTS tiêu chí này được đánh giá tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh.

Nhóm yếu tố môi trường sinh thái:

- Về loại đất: Chất lượng đất chủ yếu xác định khả năng thích hợp cho sản xuất cây trồng, tuy nhiên, đề tài vẫn đưa tiêu chí này vào đánh giá vì tính chất của từng loại đất có ảnh hưởng đến khả năng giữ nước và chất lượng nước của ao nuôi. Trên cơ sở kế thừa kết quả đề tài “Điều tra, đánh giá tài nguyên đất nông nghiệp, đề xuất bố trí cơ cấu cây trồng hợp lý tỉnh Hưng Yên” [8], nhóm thực hiện đã đánh giá mức độ thích hợp của từng đơn vị đất thích hợp với NCNN như sau: Đất phù sa glây là loại đất thích hợp nhất, vì đặc tính của loại đất này là trũng và ngập nước, tuy không được bồi đắp phù sa hàng năm do lũ lụt, nhưng thường xuyên có nguồn nước tưới từ hệ thống sông Hồng; đất phù sa động nước có mức độ thích hợp vừa phải, vì có đặc tính chủ yếu ở địa hình vằn thấp, khả năng tiêu thoát nước trung bình; đất phù sa điển hình là loại đất ít thích hợp nhất, vì có ở địa hình khá cao, khả năng giữ nước không tốt.

- Về chất lượng nước: Các thông số liên quan đến chất lượng nước được lựa chọn trên cơ sở kết quả thu được định kỳ từ hệ thống điểm quan trắc môi trường nước mặt của tỉnh Hưng Yên, đồng thời căn cứ theo QCVN 02-22:2015/BNNPTNT [5] và QCVN 08-MT:2015/BTNMT [6].

Nhóm yếu tố kinh tế - xã hội:

- Về điều kiện thủy lợi: Hệ thống công trình thủy lợi trên địa bàn tỉnh cơ bản đảm bảo cấp đủ nước tưới kịp thời cho toàn bộ diện tích canh tác (trừ diện tích bãi ngoài đê),

ngoài ra cũng giúp ích không nhỏ trong việc cung cấp nước cho hệ thống ao NTTS tại địa phương. Các yếu tố thủy lợi ảnh hưởng đến đánh giá tiềm năng phát triển NCNN ở đây gồm mật độ kênh mương, tương quan vị trí với đê và mật độ trạm bơm.

- Về sử dụng đất: Đây là một trong những dữ liệu đầu vào quan trọng cho việc phân tích, đánh giá tiềm năng NCNN, dựa vào hệ thống bản đồ hiện trạng, quy hoạch sử dụng đất có thể đề xuất cơ bản được những vùng có khả năng nuôi cá như ao, hồ, ruộng trũng... và loại bỏ những vùng không có khả năng nuôi cá như giao thông, khu công nghiệp, dân cư...

- Về đặc điểm vị trí nuôi và cơ sở hạ tầng khác: Trong hoạt động NTTS, vùng nuôi gần với nguồn nước cấp là rất quan trọng, cơ bản những vùng gần nguồn nước hơn sẽ thuận lợi hơn trong sản xuất (môi trường nước tốt hơn, tốn ít kinh phí hơn); tiếp đến là các tiêu chí về khoảng cách đến trục giao thông (vận chuyển giống, thức ăn, tiêu thụ sản phẩm...); khoảng cách đến trạm dịch vụ thú y thủy sản (hỗ trợ dịch vụ về thủy sản tốt hơn) và khoảng cách đến chợ (mua trang thiết bị, tiêu thụ sản phẩm...). Đối với hệ thống trạm biến thế, hiện tại, Hưng Yên có khoảng 6.000 trạm biến áp với hệ thống lưới điện phủ khắp trên địa bàn tỉnh nên cơ bản về hệ thống điện đang rất thuận lợi trong phát triển kinh tế - xã hội nói chung, hoạt động NTTS nói riêng, do đó tiêu chí này được đánh giá tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh.

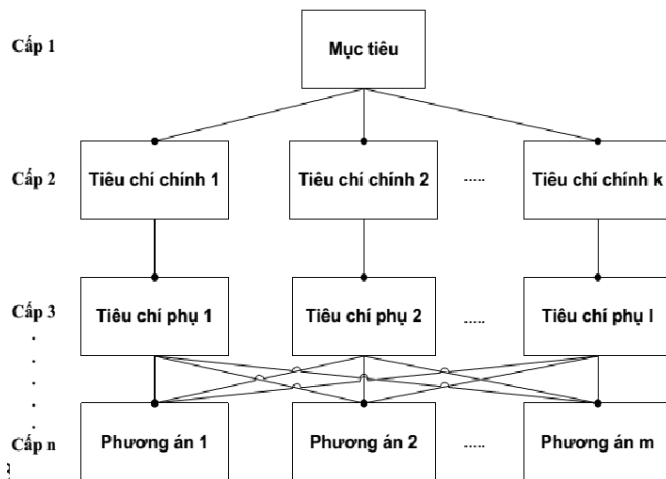
- Về đặc điểm dân số: Tiêu chí này được đưa vào đánh giá mức độ ảnh hưởng đến hoạt động NTTS như mật độ dân số càng cao thì có thể càng ảnh hưởng tiêu cực do tác động về an ninh, môi trường đến vùng nuôi, nhưng ở một khía cạnh nhỏ khác lại đóng vai trò tích cực do có thể là thị trường tiêu thụ sản phẩm tốt hơn những vùng có mật độ dân số thấp.

- Về tập huấn NTTS: Mục đích của tập huấn là cung cấp kiến thức, giúp người nuôi cá có thể áp dụng kỹ thuật mới vào quá trình nuôi thực tế tại gia đình, truyền đạt tới người nuôi kỹ thuật nuôi cá, một số bệnh thường gặp và các biện pháp phòng trị bệnh cho cá; trao đổi về những vướng mắc gặp phải trong quá trình nuôi... Trong giai đoạn 2015-2020, tỉnh đã tổ chức 80 lớp tập huấn với hơn 7.000 lượt người tham gia về kỹ thuật NTTS, phòng trừ bệnh, NTTS đảm bảo an toàn thực phẩm, tuyên truyền luật thủy sản..., được phân chia gần như đồng đều cho các huyện thị/thành phố. Huyện được tập huấn nhiều nhất là 9 lớp (Phù Cừ, Kim Động, Khoái Châu) và huyện được tập huấn ít nhất là 6 lớp (Văn Giang, Văn Lâm), các lớp có nội dung về kỹ thuật NTTS được triển khai trên toàn tỉnh. Do đó, cơ bản không có sự khác biệt nhiều về chất lượng đào tạo thông qua các lớp tập huấn trên địa bàn, vì vậy tiêu chí này được đánh giá tương đồng trên phạm vi toàn tỉnh.

2.2. Phương pháp AHP

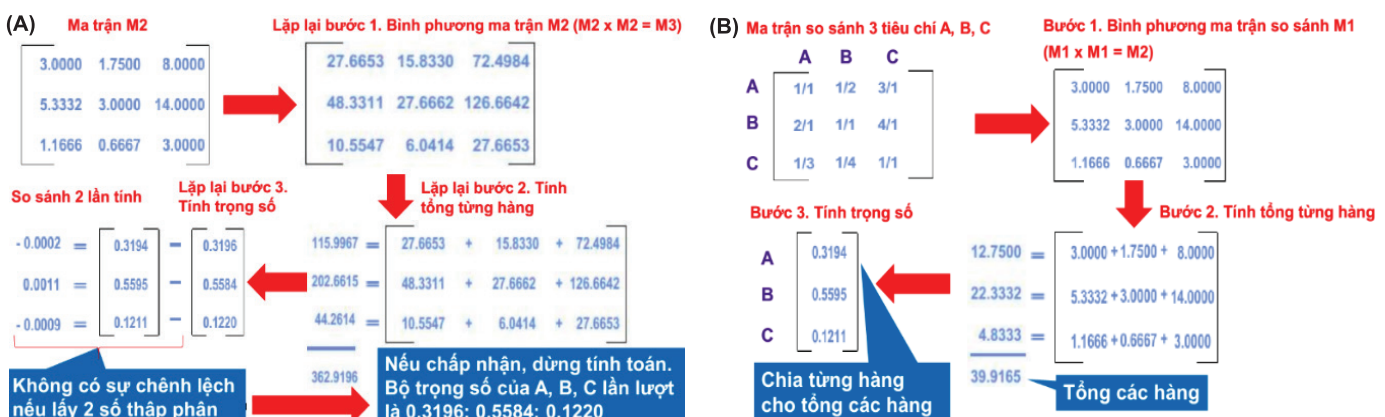
Phân tích đa tiêu chí (Multi criteria analysis - MCA) là một kỹ thuật phân tích tổ hợp các tiêu chí khác nhau để đưa ra kết quả cuối cùng. AHP là một trong những cách tiếp cận MCA linh hoạt và dễ dàng nhất được đề xuất bởi T.L. Saaty (1980) [9].

AHP là phương pháp toán học hỗ trợ phân tích, xử lý các vấn đề ra quyết định đa tiêu chí phức tạp theo các cấp thứ bậc: bắt đầu với mục tiêu, được phân tích qua các tiêu chí lớn, tiêu chí thành phần và cấp bậc cuối cùng thường bao gồm các phương án có thể lựa chọn (hình 1). Các tiêu chí chính, tiêu chí phụ được xác định mức độ quan trọng tương đối thông qua so sánh cặp và sử dụng thang đánh giá bằng con số tuyệt đối [9, 10].



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc thứ bậc [9].

Hai phương pháp thường được sử dụng để tính toán trọng số các tiêu chí là vector riêng và chuẩn hóa ma trận. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả sử dụng phương pháp vector riêng để tính toán trọng số cho mỗi tiêu chí, với các bước chính được minh họa ở hình 2, trong đó, hình 2A gồm



Hình 2. Sơ đồ các bước tính trọng số bằng vector riêng [11].

các bước: bình phương ma trận so sánh cặp, tính tổng từng hàng trong ma trận bình phương, chia tổng từng hàng cho tổng của tất cả các hàng được bộ trọng số tương ứng cho các tiêu chí; hình 2B là quá trình tính toán kết thúc khi bộ trọng số trong 2 lần tính toán liên tiếp nhỏ hơn giá trị cho trước.

AHP cung cấp cách đo lường toán học để xác định mức độ không nhất quán của các nhận định thông qua tỷ số nhất quán (CR), được ước lượng qua các bước sau: (i) Xác định vector tổng trọng số bằng cách nhân ma trận so sánh cặp ban đầu với ma trận trọng số của các tiêu chí; (ii) Xác định vector nhất quán bằng cách chia vector tổng trọng số cho trọng số của các tiêu chí đã được xác định trước đó; (iii) Tính giá trị riêng lớn nhất ($\lambda_{\max}$) bằng cách lấy giá trị trung bình của vector nhất quán; (iv) Tính chỉ số nhất quán (CI), hay chỉ số đo lường mức độ lệch hướng nhất quán, được xác định theo công thức: $CI = (\lambda_{\max} - n) / (n - 1)$, với $\lambda_{\max}$ là giá trị trung bình của vector nhất quán; n là số tiêu chí (trong ma trận nghịch đảo, $\lambda_{\max}$ luôn luôn lớn hơn hoặc bằng số hàng hay cột (n), nếu nhận định càng nhất quán, giá trị tính toán $\lambda_{\max}$ càng gần n, còn nếu một ma trận so sánh cặp không có bất kỳ sự không nhất quán nào thì $\lambda_{\max} = n$); (v) Xác định CR theo công thức: $CR = CI / RI$, với RI là chỉ số ngẫu nhiên, hay giá trị trung bình của CI khi nhận định so sánh ngẫu nhiên, phụ thuộc vào số tiêu chí được so sánh. Nếu giá trị CR nhỏ hơn hoặc bằng 10%, nghĩa là có thể chấp nhận được, ngược lại nếu giá trị này lớn hơn 10% cần phải thẩm định lại các bước trước đó [11].

2.3. Phương pháp tham vấn chuyên gia

Đây là phương pháp sử dụng, khai thác tri thức, ý kiến đánh giá các chuyên gia, các nhà khoa học cũng như cán bộ quản lý địa phương có trình độ chuyên môn để xem xét, nhận định một vấn đề, một sự kiện khoa học, từ đó đề xuất các giải pháp góp phần nâng cao năng lực quản lý. Nói cách khác, hình thức tham vấn chuyên gia được sử dụng để tham vấn kiến thức và kinh nghiệm của một số hay nhóm các chuyên gia có chuyên môn sâu liên quan đến nội dung

nghiên cứu. Cách thức tham vấn có thể thông qua tham vấn cá nhân từng chuyên gia hoặc nhóm chuyên gia dưới hình thức hội nghị, hội thảo chuyên đề, phỏng vấn trực tiếp qua email hoặc bằng văn bản, phiếu đánh giá.

Trong nội dung nghiên cứu của bài báo, phương pháp tham vấn chuyên gia đóng vai trò quan trọng, nhằm xác định mức độ ưu tiên, tính toán trọng số các tiêu chí được lựa chọn trong phân tích xác định tiềm năng phát triển NCNN. Nhóm thực hiện đã xây dựng phiếu tham vấn ý kiến và gửi đến các chuyên gia trong lĩnh vực quy hoạch thủy sản, NCNN và GIS, gồm các nhà khoa học và cán bộ quản lý nhà nước. Với bảng đánh giá của mỗi chuyên gia, phương pháp AHP được sử dụng bằng các công thức trong phần mềm Excel để tính toán ra các bảng kết quả: giá trị trọng số, $\lambda_{\max}$, CI và CR.

3. Kết quả

3.1. Quy trình chung xác định trọng số các tiêu chí đánh giá

Theo phương pháp AHP, nhóm chuyên gia sử dụng các số tự nhiên 1, 2, 3..., tương ứng với mức độ quan trọng gấp 1, 2, 3... lần hoặc tỷ lệ 1/2, 1/3, 1/4..., tương ứng với mức độ ít hoặc kém quan trọng chỉ bằng 1/2, 1/3, 1/4... lần, thể hiện sự tương quan giữa các tiêu chí trong cùng nhóm yếu tố đánh giá.

Trong trường hợp đánh giá đối với 3 nhóm yếu tố chính, ta có bảng xác định tương quan ví dụ như bảng 2. Theo đó, nhóm yếu tố tự nhiên quan trọng bằng/tương đương nhóm môi trường sinh thái; nhóm yếu tố tự nhiên kém quan trọng hay chỉ bằng 1/3 nhóm kinh tế - xã hội, cũng có thể hiểu ngược lại là nhóm kinh tế - xã hội quan trọng gấp 3 lần nhóm yếu tố tự nhiên; nhóm yếu tố môi trường sinh thái quan trọng bằng/tương đương nhóm yếu tố kinh tế - xã hội.

Bảng 2. Ví dụ xác định tương quan giữa các nhóm yếu tố.

Ba nhóm yếu tố: đánh giá độ quan trọng nhóm yếu tố nào hơn nhóm yếu tố nào bao nhiêu lần theo hướng tốt với NCNN	Tự nhiên	Môi trường sinh thái	Kinh tế - xã hội
Tự nhiên	-	1	1/3
Môi trường sinh thái		-	1
Kinh tế - xã hội			-

Ví dụ liên quan đến nhóm yếu tố kinh tế - xã hội, bảng 3A đưa ra kết quả đánh giá tương quan các tiêu chí trong nhóm yếu tố này của một chuyên gia; bảng 3B thể hiện kết quả xác định giá trị trọng số tương ứng. Trong trường hợp ví dụ này, kết quả tính toán $\lambda_{\max}=5,055$, CI=0,014 và CR=0,012.

Bảng 3A. Ví dụ kết quả đánh giá tương quan các tiêu chí liên quan đến nhóm yếu tố kinh tế - xã hội của một chuyên gia.

Năm yếu tố: đánh giá độ quan trọng yếu tố nào hơn yếu tố nào bao nhiêu lần theo hướng tốt với NCNN	Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)	Sử dụng đất	Cơ sở hạ tầng, đặc điểm vị trí NCNN	Đặc điểm dân số	Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)
Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)	-	1	1	2	1/2
Sử dụng đất	1	-	1	2	1/2
Cơ sở hạ tầng, đặc điểm vị trí NCNN	1	1	-	2	1
Đặc điểm dân số	1/2	1/2	1/2	-	1/3
Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)	2	2	1	3	-

Bảng 3B. Kết quả xác định giá trị trọng số.

Yếu tố	Trọng số tính toán
Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)	0,18717
Sử dụng đất	0,18717
Cơ sở hạ tầng, đặc điểm vị trí NCNN	0,21717
Đặc điểm dân số	0,09859
Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)	0,30990

Trong quá trình xác định trọng số của các tiêu chí/nhóm yếu tố, về cơ bản phương pháp vector riêng được áp dụng như trên với từ 3 tiêu chí trở lên; còn trong trường hợp cần đánh giá trọng số chỉ với 2 tiêu chí/nhóm yếu tố thì giá trị có được sẽ là $\lambda_{\max}=2$ và CI=CR=0.

Trên cơ sở giá trị trọng số xác định được, sẽ gán mỗi chuyên gia một ký hiệu P1 đến P11 (tương ứng với 11 chuyên gia đã tham vấn ý kiến) để tính toán giá trị trung bình theo công thức: Giá trị trung bình = Tổng giá trị/11.

3.2. Kết quả xác định trọng số các tiêu chí đánh giá

Đối với các nhóm yếu tố chính: Kết quả tính toán trọng số từ các phiếu tham vấn ý kiến chuyên gia cho 3 nhóm yếu tố chính được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định trọng số của các nhóm yếu tố chính.

STT	Nhóm yếu tố chính	Giá trị trọng số										Giá trị trung bình	
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10		P11
1	Tự nhiên	0,3333	0,2611	0,2000	0,1698	0,3119	0,2611	0,4000	0,2611	0,2000	0,2254	0,2254	0,2590
2	Môi trường sinh thái	0,3333	0,3278	0,4000	0,4429	0,4905	0,3278	0,4000	0,3278	0,4000	0,3206	0,3206	0,3719
3	Kinh tế - xã hội	0,3333	0,4111	0,4000	0,3873	0,1976	0,4111	0,2000	0,4111	0,4000	0,4540	0,4540	0,3690

Đối với các tiêu chí trong từng nhóm yếu tố chính: Kết quả tính toán trọng số từ các phiếu tham vấn ý kiến chuyên gia cho từng tiêu chí liên quan đến nhóm yếu tố tự nhiên, môi trường sinh thái và kinh tế - xã hội trong đánh giá tiềm năng phát triển NCNN được trình bày lần lượt ở bảng 5A, 5B và 5C.

Bảng 5A. Kết quả xác định trọng số của các tiêu chí liên quan đến nhóm yếu tố tự nhiên.

STT	Tiêu chí	Giá trị trọng số											Giá trị trung bình
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	
1	Nhiệt độ trung bình	0,1638	0,3333	0,4000	0,2643	0,6000	0,3333	0,5000	0,4111	0,4000	0,4071	0,5000	0,3921
2	Loại hình thủy văn gần nhất	0,5390	0,3333	0,4000	0,3286	0,2000	0,3333	0,2500	0,2611	0,4000	0,3286	0,2500	0,3294
3	Địa hình	0,2973	0,3333	0,2000	0,4071	0,2000	0,3333	0,2500	0,3278	0,2000	0,2643	0,2500	0,2785

Bảng 5B. Kết quả xác định trọng số của các tiêu chí liên quan đến nhóm yếu tố môi trường sinh thái.

STT	Tiêu chí	Giá trị trọng số											Giá trị trung bình
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	
1	Loại đất	0,25	0,3333	0,25	0,3333	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,3333	0,5	0,3636
2	Chất lượng nước	0,75	0,6666	0,75	0,6666	0,75	0,5	0,5	0,5	0,75	0,6666	0,5	0,6363

Bảng 6. Tổng hợp kết quả xác định trọng số của các tiêu chí/nhóm yếu tố đánh giá tiềm năng NCNN tại tỉnh Hưng Yên.

STT	Tiêu chí/nhóm yếu tố	Giá trị trọng số											Giá trị trung bình
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	
1	Tự nhiên	0,3333	0,2611	0,2000	0,1698	0,3119	0,2611	0,4000	0,2611	0,2000	0,2254	0,2254	0,2590
1.1	Nhiệt độ trung bình	0,1638	0,3333	0,4000	0,2643	0,6000	0,3333	0,5000	0,4111	0,4000	0,4071	0,5000	0,3921
1.2	Loại hình thủy văn gần nhất	0,5390	0,3333	0,4000	0,3286	0,2000	0,3333	0,2500	0,2611	0,4000	0,3286	0,2500	0,3294
1.3	Địa hình	0,2973	0,3333	0,2000	0,4071	0,2000	0,3333	0,2500	0,3278	0,2000	0,2643	0,2500	0,2785
2	Môi trường sinh thái	0,3333	0,3278	0,4000	0,4429	0,4905	0,3278	0,4000	0,3278	0,4000	0,3206	0,3206	0,3719
2.1	Loại đất	0,2500	0,3333	0,2500	0,3333	0,2500	0,5000	0,5000	0,5000	0,2500	0,3333	0,5000	0,3636
2.2	Chất lượng nước	0,7500	0,6666	0,7500	0,6666	0,7500	0,5000	0,5000	0,5000	0,7500	0,6666	0,5000	0,6363
2.2.1	pH	0,1053	0,1398	0,1143	0,1693	0,1429	0,0617	0,1308	0,1396	0,1563	0,1667	0,1405	0,1334
2.2.2	Ôxy hòa tan (DO)	0,1053	0,1796	0,1666	0,1253	0,1429	0,0665	0,1671	0,1396	0,1658	0,1667	0,1974	0,1475
2.2.3	BOD ₅	0,1053	0,0898	0,0906	0,0685	0,1429	0,0958	0,0836	0,0980	0,0829	0,0833	0,1225	0,0966
2.2.4	COD	0,1053	0,0898	0,0906	0,0685	0,1429	0,1092	0,0836	0,0927	0,0829	0,0833	0,1225	0,0974
2.2.5	Tổng chất rắn lơ lửng (TSS)	0,0526	0,0835	0,0851	0,0685	0,0714	0,1566	0,0836	0,0846	0,0651	0,0833	0,0820	0,0833
2.2.6	Nitrit (NO ₂ ⁻)	0,1053	0,0835	0,0906	0,1299	0,0714	0,1020	0,0846	0,0846	0,0968	0,0833	0,0670	0,0908
2.2.7	Nitrat (NO ₃ ⁻)	0,1053	0,0835	0,0906	0,1087	0,0714	0,1020	0,0846	0,0846	0,0891	0,0833	0,0670	0,0882
2.2.8	Amoni (NH ₄ ⁺)	0,1053	0,0835	0,0906	0,1087	0,0714	0,1020	0,0898	0,0846	0,0891	0,0833	0,0670	0,0887
2.2.9	PO ₄ ³⁻	0,1053	0,0835	0,0906	0,0900	0,0714	0,1020	0,0783	0,0846	0,0891	0,0833	0,0670	0,0859
2.2.10	Coliform	0,1053	0,0835	0,0906	0,0704	0,0714	0,1020	0,1142	0,1070	0,0829	0,0833	0,0670	0,0889
3	Kinh tế - xã hội	0,3333	0,4111	0,4000	0,3873	0,1976	0,4111	0,2000	0,4111	0,4000	0,4540	0,4540	0,3690
3.1	Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)	0,2516	0,1978	0,2234	0,1624	0,1872	0,2515	0,1924	0,1468	0,2516	0,2478	0,2583	0,2155
3.1.1	Hệ thống kênh mương	0,4000	0,4111	0,4111	0,4071	0,3333	0,3333	0,3333	0,3333	0,4111	0,3333	0,3333	0,3673
3.1.2	Tương quan vị trí với đê	0,2000	0,2611	0,2611	0,2643	0,3333	0,3333	0,3333	0,3333	0,2611	0,3333	0,3333	0,2952
3.1.3	Hệ thống trạm bơm	0,4000	0,3278	0,3278	0,3286	0,3333	0,3333	0,3333	0,3333	0,3278	0,3333	0,3333	0,3374
3.2	Sử dụng đất	0,2230	0,1978	0,2213	0,3247	0,1872	0,2515	0,1669	0,2840	0,2230	0,2478	0,1964	0,2294
3.2.1	Hiện trạng sử dụng đất	0,5000	0,5000	0,5000	0,6666	0,3333	0,5000	0,5000	0,3333	0,6666	0,6666	0,5000	0,5151
3.2.2	Quy hoạch sử dụng đất đến năm 2030	0,5000	0,5000	0,5000	0,3333	0,6666	0,5000	0,5000	0,6666	0,3333	0,3333	0,5000	0,4848
3.3	Cơ sở hạ tầng, đặc điểm vị trí NCNN	0,2516	0,1756	0,2234	0,1931	0,2172	0,1958	0,2691	0,2232	0,2516	0,2478	0,2249	0,2246
3.3.1	Khoảng cách đến nguồn nước	0,2230	0,2260	0,2584	0,2858	0,3299	0,2583	0,2854	0,1761	0,3518	0,3293	0,2971	0,2746
3.3.2	Khoảng cách đến trục giao thông	0,2516	0,1975	0,2507	0,1904	0,1935	0,2249	0,1273	0,2906	0,1866	0,1869	0,1971	0,2088
3.3.3	Khoảng cách đến trạm dịch vụ thú y thủy sản	0,1480	0,2260	0,1971	0,1817	0,1649	0,1964	0,1677	0,2165	0,1498	0,1869	0,1686	0,1821
3.3.4	Khoảng cách đến chợ	0,1258	0,1975	0,1435	0,1879	0,1468	0,1491	0,2520	0,1915	0,1252	0,1869	0,1686	0,1704
3.3.5	Hệ thống trạm biến thế	0,2516	0,1530	0,1503	0,1543	0,1649	0,1714	0,1677	0,1253	0,1866	0,1101	0,1686	0,1640
3.4	Đặc điểm dân số	0,1480	0,1978	0,1768	0,1728	0,0986	0,1708	0,1944	0,1506	0,1258	0,1461	0,1491	0,1573
3.4.1	Mật độ dân số	0,5000	0,5000	0,5000	0,6666	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,6666	0,5000	0,5000	0,5303
3.4.2	Dân số trung bình	0,5000	0,5000	0,5000	0,3333	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,3333	0,5000	0,5000	0,4697
3.5	Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)	0,1258	0,2311	0,1551	0,1470	0,3099	0,1304	0,1772	0,1954	0,1480	0,1106	0,1714	0,1729

Bảng 5C. Kết quả xác định trọng số của các tiêu chí liên quan đến nhóm yếu tố kinh tế - xã hội.

STT	Tiêu chí	Giá trị trọng số											Giá trị trung bình
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	
1	Điều kiện thủy lợi (trong phạm vi 500 m)	0,2516	0,1978	0,2234	0,1624	0,1872	0,2515	0,1924	0,1468	0,2516	0,2478	0,2583	0,2155
2	Sử dụng đất	0,2230	0,1978	0,2213	0,3247	0,1872	0,2515	0,1669	0,2840	0,2230	0,2478	0,1964	0,2294
3	Cơ sở hạ tầng, đặc điểm vị trí NCNN	0,2516	0,1756	0,2234	0,1931	0,2172	0,1958	0,2691	0,2232	0,2516	0,2478	0,2249	0,2248
4	Đặc điểm dân số	0,1480	0,1978	0,1768	0,1728	0,0986	0,1708	0,1944	0,1506	0,1258	0,1461	0,1491	0,1573
5	Tập huấn về NTTS (lớp tham gia)	0,1258	0,2311	0,1551	0,1470	0,3099	0,1304	0,1772	0,1954	0,1480	0,1106	0,1714	0,1729

Tổng hợp kết quả xác định trọng số từ phiếu tham vấn ý kiến của các chuyên gia được trình bày ở bảng 6. Kết quả cho thấy, giá trị nhỏ nhất là giá trị trọng số của tiêu chí môi trường nitrat (NO₃⁻) (2.2.7) là 0,0882 khi tương quan trong nhóm 10 tiêu chí chất lượng nước (2.2). Giá trị lớn nhất là giá trị trọng số của nhóm chất lượng nước (2.2) khi tương quan với loại đất (2.1) trong nhóm tiêu chí liên quan đến yếu tố môi trường sinh thái (2).

KẾT LUẬN

Phương pháp AHP được sử dụng phù hợp với mục tiêu xác định trọng số cho các tiêu chí xác định tiềm năng phát triển NCNN. Các chuyên gia tham vấn ý kiến từ các lĩnh vực chuyên môn khác nhau giúp điều chỉnh thứ bậc và đưa ra các nhận định khoa học, khách quan trong việc xác định trọng số. Phương pháp tham vấn chuyên gia đảm bảo tính đại diện để định hình các trọng số phù hợp với điều kiện thực tế tiến hành nghiên cứu. Bảng tổng hợp trọng số tính toán với các giá trị trung bình được đưa ra là cơ sở hình thành giá trị trọng số cho các lớp bản đồ GIS của việc chồng ghép và phân tích GIS xây dựng bản đồ đánh giá tiềm năng phát triển NCNN tỉnh Hưng Yên.

Kết quả trọng số phản ánh vai trò của nhóm yếu tố môi trường sinh thái (0,3719 điểm) giữ vai trò quan trọng hơn cả trong 3 nhóm yếu tố đối với việc phát triển NCNN, tuy nhiên cũng không vượt quá nhiều so với nhóm yếu tố kinh tế - xã hội (0,3690 điểm). Chất lượng nước trong nghiên cứu này chiếm vai trò quan trọng nhất trong xác định tiềm năng phát triển NCNN với mức trọng số cao vượt trội (0,6363 điểm). Trong đó, chỉ số ôxy hòa tan (DO) và pH được nhận định đóng vai trò quan trọng hơn cả trong nhóm chỉ tiêu hình thành tiêu chí về chất lượng nước.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trong quá trình thực hiện bài báo khoa học này đã sử dụng thông tin, tài liệu và tham khảo các kết quả đạt được trong khuôn khổ nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp tỉnh “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ GIS và AHP đánh giá tiềm năng phát triển NCNN tại tỉnh Hưng Yên” do Viện Kinh tế và Quy hoạch Thủy sản (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn) chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đề tài đã tạo điều kiện tốt nhất để có được những kết quả phân tích và tính toán đảm bảo tính khoa học, mang ý nghĩa trong nghiên cứu cũng như thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hung Yen Fisheries Sub-department (2020), *Report on Results of Implementing Tasks in 2020, Directions and Solutions to Implement Tasks in 2021* (in Vietnamese).
- [2] Department of Agriculture and Rural Development of Hung Yen (2020), *Report “Aquaculture Development Project in Hung Yen Province for The Period 2020-2025”* (in Vietnamese).
- [3] Institute of Fisheries Economics and Planning (2016), *Summary Report on The Topic “Research on The Scientific Basis for Ecological Zoning to Adapt to Climate Change in Aquaculture in The Mekong Delta” (code BDKH-44) under The Science and Technology Program Serving The National Target Program to Respond to Climate Change for The Period 2011-2015* (in Vietnamese).
- [4] A.K. Nayak, P. Kumar, D. Pant, et al. (2018), “Land suitability modeling for enhancing fishery resource development in central Himalayas (India) using GIS and multi-criteria evaluation approach”, *Aquacultural Engineering*, **83**, pp.120-129, DOI: 10.1016/j.aquaeng.2018.10.003.
- [5] Ministry of Agriculture and Rural Development (2015), *QCVN 02-22:2015/BNNPTNT National Technical Regulation on Freshwater Cage/Raft Fish Farming Facilities - Conditions to Ensure Food Safety and Environmental Protection* (in Vietnamese).
- [6] Ministry of Natural Resources and Environment (2015), *QCVN 08-MT:2015/BTNMT National Technical Regulation on Surface Water Quality* (in Vietnamese).
- [7] T.X. Thanh (2014), “Integrating GIS and analytical hierarchy (AHP) to evaluate land adaptation for developing white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Ben Tre province”, *Journal of Agriculture and Development Rural Development*, **12**, pp.28-39 (in Vietnamese).
- [8] Institute of Agrochemical Soils (2015), *Summary Report on The Topic “Investigation and Assessment of Agricultural Land Resources, Proposal to Arrange Reasonable Crop Structure in Hung Yen Province”* (in Vietnamese).
- [9] T.L. Saaty (1980), *The Analytic Hierarchy Process: Planning, Priority Setting, Resource Allocation*, McGraw - Hill, 287pp.
- [10] T.L. Saaty (2008), “Decision making with the analytic hierarchy process”, *International Journal of Services Sciences*, **1(1)**, pp.83-98, DOI: 10.1504/IJSSCI.2008.017590.
- [11] N.D. Liem (2013), *Lecture on GIS Application in Land Adaptation Assessment*, Ho Chi Minh City University of Agriculture and Forestry (in Vietnamese).

Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (*Cymbidium wenshanense*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*

Phạm Phương Thu^{1,2*}, Nguyễn Thị Tình³, Trần Ngọc Hùng⁴, Ngô Xuân Bình³

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, 32 Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

²Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, đường Vĩnh Quỳnh, xã Vĩnh Quỳnh, huyện Thanh Trì, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 31/10/2022; ngày chuyển phản biện 3/11/2022; ngày nhận phản biện 23/11/2022; ngày chấp nhận đăng 28/11/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (*Cymbidium wenshanense*) từ hạt được tiến hành bằng nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện nhiệt độ phòng 25°C, ẩm độ 65%, cường độ chiếu sáng 2000 lux, 16 giờ sáng/24 giờ với mục đích tìm hiểu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, các chất kích thích sinh trưởng nhóm cytokinin (kinetin, TDZ, BA) và đường sucrose đến khả năng tái sinh của hạt. Kết quả cho thấy, môi trường MS (Murashige và Skoog) giúp hạt nảy mầm tốt (cao nhất 90,54%), cytokinin BA có tác dụng làm tăng khả năng tái sinh chồi (bổ sung 1 mg BA tạo ra được 4,42 chồi/mẫu, chiều dài chồi đạt 3,63 cm, khối lượng tươi đạt 272,67 mg). Ngoài ra, bổ sung đường sucrose vào môi trường nuôi cấy (MS + 1 mg BA/l) cũng đem lại hiệu quả tốt (hàm lượng đường sucrose 5% đạt 4,47 chồi, chiều dài chồi đạt 3,6 cm, khối lượng tươi đạt 315 mg). Đây là kết quả có ý nghĩa thực tiễn trong bảo tồn, khai thác phát triển loài địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công khu vực phía Bắc Việt Nam.

Từ khóa: chất kích thích sinh trưởng, *Cymbidium wenshanense*, *in vitro*, môi trường nuôi cấy, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Chi địa lan (*Cymbidium*) thuộc họ phụ *Orchidoideae*, được phân bố ở khu vực Đông Nam Á và các vùng đảo khu vực Thái Bình Dương. Các loài trong chi địa lan có hoa lớn, đẹp, bền, sinh sống trên các thảm mục hoặc nơi có độ mùn cao. Theo các số liệu đã công bố, chi địa lan trên thế giới hiện nay có khoảng 120 loài, tại Việt Nam có 24 loài [1, 2]. Loài địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công phân bố ở Cao Bằng, Bắc Kạn là loài phụ sinh, chùm hoa có cấu tạo đặc biệt, cánh hoa và lá dài thuôn dài, màu xanh trắng kèm theo sọc đỏ thẫm (bạch ngọc), khi hoa nở có mùi rất thơm và hình dáng bông hoa giống đuôi của con chim công nên được gọi là địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công.

Địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công nở hoa vào dịp tết Nguyên đán hàng năm, hoa to, màu sắc rực rỡ, độ bền lâu (1,5-2 tháng) nên nhu cầu thị trường rất cao, dẫn đến tình trạng bị khai thác cạn kiệt trong tự nhiên, dễ có nguy cơ tuyệt chủng. Hiện nay, loài địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công chủ yếu được người nuôi trồng nhân giống bằng phương pháp truyền thống (tách chồi), hệ số nhân giống rất thấp, hiệu quả không cao, không đáp ứng được nhu cầu cung cấp giống cho thị trường. Các kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* các loài địa lan nói chung cho thấy phương pháp này có ưu điểm tạo một lượng lớn cây con, giữ nguyên đặc điểm di truyền của cây mẹ, hệ số nhân giống cao, có thể thực hiện quanh năm. Kết quả từ đề tài khoa học “Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi của địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (*Cymbidium wenshanense*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*” được trình bày trong bài báo này là tiền đề

bổ sung thêm kiến thức nhân giống *in vitro* các loài địa lan, đồng thời góp phần bảo tồn, khai thác và phát triển loài địa lan quý hiếm này, đáp ứng nhu cầu thực tiễn.

2. Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguồn nguyên liệu cây mẹ sử dụng trong nghiên cứu này được thu thập trong tự nhiên tại các tỉnh Cao Bằng, Bắc Kạn và được lưu giữ tại vườn thực nghiệm Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên. Mẫu quả địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công được thu hái trên vườn lưu giữ cây mẹ để thu hạt sử dụng cho nuôi cấy *in vitro*.

2.2. Nội dung

Nội dung 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công.

Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của các hoạt chất trong nhóm cytokinin (kinetin, TDZ, BA) đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công.

Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose bổ sung đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại, trong đó thí nghiệm về môi trường nuôi cấy bố trí mỗi công thức 3 bình, các thí nghiệm còn lại mỗi công thức 10 bình,

*Tác giả liên hệ: Email: phamphuongthu0283@gmail.com

A study on the bud regeneration ability of *Cymbidium wenshanense* by *in vitro* culture

Phuong Thu Pham^{1,2*}, Thi Tinh Nguyen³,
Ngoc Hung Tran⁴, Xuan Binh Ngo³

¹Hanoi Pedagogical University 2,
32 Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

²Vietnam Academy of Agricultural Sciences (VAAS),
Vinh Quynh Street, Vinh Quynh Commune, Thanh Tri District, Hanoi, Vietnam

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry,
Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

⁴Fruit and Vegetable Research Institute, VAAS,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 31 October 2022; revised 23 November 2022; accepted 28 November 2022

Abstract:

The study on the buds regeneration of *Cymbidium wenshanense* orchid seedlings cultured *in vitro* in the conditions of 25°C room temperature, 65% humidity, 2000 lux light intensity, and 16 hours of lighting a day was implemented with the aim of finding out the proper medium, cytokinin growth stimulators (kinetin, TDZ, and BA), and sucrose concentrations on seed regeneration. Results showed that MS medium had a good effect on seed germination (the highest is 90.54%) and cytokinin BA significantly improved the buds regeneration of *Cymbidium wenshanense* orchid (4.42 buds of 3.63 cm length, and 272.67 mg weight formed from a sample when 1 mg of BA was added). In addition, sucrose supplemented at 5% concentration was considered to be successful (4.47 buds of 3.6 cm length and 315 mg were produced when 5% sucrose was added). This is a result of practical significance in the conservation and development of *Cymbidium wenshanense* orchid in north Vietnam.

Keywords: buds regeneration, culture medium, *Cymbidium wenshanense*, growth stimulators, *in vitro*.

Classification number: 4.6

mỗi bình cấy 3 mẫu. Nhiệt độ phòng nuôi cấy 25°C, ẩm độ 65%, cường độ chiếu sáng 2000 lux, 16 giờ sáng/24 giờ.

Nội dung 1 - Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công: Những mẫu quả địa lan được xử lý bằng cách rửa sạch bằng xà phòng, rửa lại dưới vòi nước đang chảy, khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây, cồn còn dính trên quả được đốt cháy (trong vài giây) để khử trùng bề mặt quả, quá trình này được lặp lại 3 lần, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Kết thúc khử trùng, mẫu được tách bỏ phần vỏ quả theo chiều dọc và hạt được gieo bằng cách trải mỏng trên bề mặt môi trường nuôi cấy thí nghiệm [3]. Thí nghiệm sử dụng 4 môi trường dinh dưỡng gồm MS, 1/2 MS, Knudson 'C' (KC) và Vacin & Went (VW) để đánh giá khả năng nảy mầm của hạt và sự phát triển sớm của protocorm [4]. Tất cả các môi trường

được bổ sung 3% đường sucrose và 5 g agar/l [4, 5]; độ pH của môi trường là 5,8±0,1. Thời gian theo dõi thí nghiệm trong vòng 14 tuần, các chỉ tiêu theo dõi gồm: thời gian hạt bắt đầu phát triển thành phôi, thời gian hình thành protocorm và tỷ lệ phần trăm hạt nảy mầm.

Nội dung 2 - Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hoạt chất thuộc nhóm cytokinin (kinetin, TDZ, BA) đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công: Sử dụng môi trường thích hợp nhất thu được ở nội dung 1 với các công thức thí nghiệm là các hoạt chất kích thích sinh trưởng riêng rẽ trong nhóm cytokinin bao gồm: kinetin, TDZ, BA ở các nồng độ 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 và 4,0 mg/l. Thời gian theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi gồm: số lượng chồi/mẫu nuôi cấy, chiều dài chồi, số lượng rễ/mẫu, khối lượng tươi của mẫu.

Nội dung 3 - Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose bổ sung đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công: Thí nghiệm được tiến hành trên chồi tái sinh đạt tiêu chuẩn ở nội dung 2 (chồi tái sinh có chiều cao 1,5-2 cm). Cấy chuyển chồi sang môi trường nhân nhanh bổ sung hoạt chất nhóm cytokinin thích hợp nhất (kết quả thu được từ nội dung 2); đường sucrose được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng với các nồng độ 0, 3, 5, 7 và 10%. Theo dõi thí nghiệm sau nuôi cấy 8 tuần với các chỉ tiêu số lượng chồi/mẫu cấy, chiều dài chồi và khối lượng tươi của mẫu nuôi cấy.

2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được thống kê và xử lý theo phương pháp thống kê toán học bằng phần mềm Excel 2010 và Sirichai Statistics Version 6.00.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công

Bốn môi trường dinh dưỡng bao gồm MS, 1/2 MS, KC và VW được sử dụng để đánh giá khả năng nảy mầm của hạt và sự phát triển sớm của protocorm. Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất ở môi trường MS (90,54%), tiếp theo là môi trường 1/2 MS (81,75%), KC (71,75%) và VW (51,36%), sự sai khác giữa các công thức đều đạt độ tin cậy ở mức 95%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (sau 14 tuần).

Môi trường	Thời gian hạt bắt đầu phát triển thành phôi (tuần)	Thời gian hình thành protocorm (tuần)	Tỷ lệ phần trăm hạt nảy mầm
MS	5-6	8-9	90,54 ^a
1/2 MS	5-6	7-8	81,75 ^b
KC	7-8	9-10	71,75 ^c
VW	8-9	11-12	51,36 ^d
CV%			5,35
LSD _{0,05}			7,45

a, b, c, d: thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% (theo phương pháp phân tích Duncan, p<0,05).

Trên môi trường MS, sự nảy mầm được thể hiện bằng quá trình phôi hạt hút nước, hấp thu dinh dưỡng và to dần nên có thể bắt đầu quan sát được. Sự nảy mầm của hạt đầu tiên được thể hiện rõ ràng bằng sự phồng lên sau khi gieo 5-6 tuần, các phôi chưa phân hóa đã hình thành một khối tế bào có hình dạng không đồng đều, hình các quả cầu. Sau 7-9 tuần, những quả cầu này chuyển sang màu xanh và hình thành các cấu trúc tròn (protocorms); tiếp theo là sự phát triển của cây con có 2-3 lá và 1-2 rễ sau 14 tuần (bảng 1, hình 1). Đối với môi trường KC và VW, sự phát triển của protocorms đạt đến giai đoạn mô phân sinh sau 12 tuần nuôi cấy. Kết quả thu được cho thấy, môi trường MS có tác dụng tốt nhất đến khả năng nảy mầm của hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công thể hiện qua các tiêu chí protocorm hình thành sớm hơn, tỷ lệ hạt nảy mầm cao hơn (90,54%). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của P. Mohanty và cs (2012) [4] khi nhân giống *in vitro* loài địa lan *Cymbidium masterii* từ vật liệu khởi đầu là quả thông qua thụ phấn nhân tạo sau 7 tháng. Theo báo cáo của tác giả này, môi trường thích hợp nhất cho hạt *Cymbidium masterii* nảy mầm là MS với tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 93,58% [4].



Hình 1. Kết quả tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công. (A) Hoa địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công để thu quả; (B) Quả địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công giai đoạn chín sinh lý; (C) Hạt được gieo trên môi trường nuôi cấy MS; (D) Phôi hạt sau 6 tuần nuôi cấy; (E) Protocorms sau 12 tuần nuôi cấy; (F) Protocorms sau 14 tuần nuôi cấy; (G) Chồi tái sinh trên môi trường MS + 1,0 mg BA/l; (H) Chồi tái sinh trên môi trường MS + 3% Sucrose + 1,0 mg BA/l; (I) Chồi tái sinh trên môi trường MS + 5% Sucrose + 1,0 mg BA/l.

3.2. Ảnh hưởng một số hoạt chất thuộc nhóm cytokinin (kinetin, TDZ, BA) đến khả năng nhân nhanh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công

Cây con thu được từ môi trường MS cơ bản sau 14 tuần nuôi cấy hạt được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung riêng lẻ với 3 thí nghiệm lần lượt là: bổ sung kinetin, TDZ và BA ở các nồng độ 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 và 4,0 mg/l để nghiên cứu ảnh hưởng của nhóm cytokinin đến khả năng nhân chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của kinetin, TDZ và BA đến khả năng nhân nhanh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (sau 8 tuần).

Cytokinin (mg/l)	Số lượng chồi/mẫu cây	Chiều dài chồi (cm)	Số lượng rễ/mẫu cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi của mẫu (mg)
ĐC	0,0	1,66 ^a	1,77 ^b	1,40 ^a	198,67 ^a
	0,5	0,74 ^c	2,53 ^a	0,67 ^b	163,33 ^b
	1,0	1,01	2,40 ^a	-	142,67 ^c
Kinetin	2,0	1,62 ^a	2,03 ^b	-	140,33 ^c
	3,0	1,51 ^a	1,80 ^b	-	159,0 ^b
	4,0	1,11 ^b	1,67 ^b	-	158,33 ^b
CI/%	6,57	9,70			4,42
LSD _{0,05}	0,15	0,35			12,61
ĐC	0,0	1,66 ^d	1,77 ^b	1,40 ^a	198,67 ^a
	0,5	2,01 ^c	2,30 ^{ab}	0,82 ^b	170,67 ^b
	1,0	2,51 ^b	2,50 ^a	-	138,33 ^c
TDZ	2,0	2,99 ^a	2,10 ^{ab}	-	143,67 ^c
	3,0	2,63 ^b	2,23 ^{ab}	-	133,67 ^c
	4,0	2,09 ^c	2,30 ^{ab}	-	180,68 ^b
CI/%	4,31	13,47			4,50
LSD _{0,05}	0,18	0,53			12,89
ĐC	0,0	1,66 ^d	1,77 ^c	1,40 ^a	198,67 ^c
	0,5	2,49 ^a	2,73 ^b	0,28 ^b	217,33 ^b
	1,0	4,42 ^a	3,63 ^a	-	272,67 ^a
BA	2,0	3,38 ^b	3,27 ^{ab}	-	225,67 ^b
	3,0	3,30 ^b	3,03 ^b	-	181,67 ^d
	4,0	3,18 ^b	3,23 ^{ab}	-	176,67 ^d
CI/%	4,51	9,60			3,66
LSD _{0,05}	0,25	0,5			13,82

a, b, c, d: thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% (theo phương pháp phân tích Duncan, p<0,05).

Kết quả bảng 2 cho thấy sự tác động khác nhau của các hoạt chất trong nhóm cytokinin đến quá trình cảm ứng trên cây con hình thành từ chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công sau 8 tuần nuôi cấy.

Bổ sung kinetin ở 5 nồng độ (từ 0,5 đến 4 mg/l), số lượng chồi/mẫu thấp hơn đối chứng, ngoại trừ 2 công thức (2 và 3 mg) có giá trị tương đương (1,62 và 1,51 chồi so với 1,66 chồi). Với chỉ tiêu chiều dài chồi, các công thức bổ sung kinetin 0,5 và 1 mg vượt trội hơn đối chứng (2,53 và 2,40 cm so với 1,77 cm), các công thức còn lại chiều dài rễ không tăng cao hơn. Về khối lượng mẫu tươi, tất cả các công thức bổ sung kinetin đều giảm hơn đối chứng với độ tin cậy ở mức 95%. Mặt khác, kinetin còn có tác dụng ức chế quá trình hình thành rễ, khi bổ sung kinetin ở các nồng độ 1,0, 2,0, 3,0 và 4,0 mg/l, cây con hoàn toàn không ra rễ, sự chênh lệch nằm trong ngưỡng sai khác ở độ tin cậy 95%.

Theo số liệu bảng 2, TDZ có hiệu quả làm tăng số lượng chồi/mẫu cây, các công thức có bổ sung TDZ, số lượng chồi đạt 2,01-2,99, cao hơn so với đối chứng (1,66 chồi). Với chỉ tiêu chiều dài chồi, công thức bổ sung TDZ 1 mg cho kết quả cao nhất (2,50 cm), cao hơn đối chứng khá rõ (chỉ đạt 1,77 cm), các công thức còn lại gần như tương đương nhau. Tuy nhiên, khối lượng tươi của mẫu nuôi cấy ở các công thức thí nghiệm đạt từ 133,67 đến 180,68 mg, thấp hơn so với đối chứng (đạt 198,67 mg), số liệu ở mức độ tin cậy 95%. Tương tự như kinetin, TDZ ức chế sự hình thành rễ, ngoại trừ công thức bổ sung TDZ 0,5 mg (cho số lượng rễ thấp hơn với đối chứng), các công thức còn lại, mẫu nuôi cấy không ra rễ sau 8 tuần nuôi cấy.

Đối với hoạt chất BA, số lượng chồi ở các công thức thí nghiệm đạt 2,49-4,42, cao hơn so với đối chứng (chỉ đạt 1,66 chồi), trong đó công thức bổ sung 1 mg BA phát sinh số lượng chồi tốt nhất (4,42 chồi). Chiều dài chồi ở các công thức thí nghiệm đạt giá trị 2,73-3,63 cm, đạt cao hơn so với đối chứng (chỉ đạt 1,77 cm), trong đó công thức bổ sung BA 1 mg cho kết quả chiều dài chồi cao nhất (3,63 cm). Khối lượng tươi của mẫu nuôi cấy đạt giá trị cao nhất ở công thức BA 1 mg/l (272,67 mg).

X.F. Liu và cs (2020) [6] đã chỉ ra rằng, chất kích thích sinh trưởng nhóm cytokinin gồm kinetin, TDZ và BA có tác dụng cảm ứng chồi hiệu quả trong nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, K.Y. Paek và cs (1991) [7] cho rằng, tác dụng của các cytokinin phụ thuộc vào loại mẫu nuôi cấy, ở các loài thực vật khác nhau, mỗi loại cytokinin có tác dụng tái sinh khác nhau, nồng độ phù hợp sẽ có tác dụng kích thích tái sinh chồi, nồng độ cao có tác dụng ngược lại ức chế và gây chết cho mẫu nuôi cấy. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đối với khả năng tái sinh chồi *in vitro* loài địa lan *Cymbidium forrestii*, nhóm tác giả này đã khuyến cáo sử dụng BA có hiệu quả rõ rệt nâng cao khả năng tái sinh của chồi, nhận xét này tương đối trùng hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Như vậy, trong 3 loại cytokinin, BA có hiệu quả cao trong việc kích thích tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công. Xử lý BA 1 mg/l cho hiệu quả đạt 4,42 chồi/mẫu, chiều dài chồi đạt 3,63 cm, khối lượng tươi đạt 272,67 mg.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose bổ sung đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của đường sucrose đến khả năng nhân nhanh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (sau 8 tuần).

Sucrose (%)	Số lượng chồi/mẫu cấy	Chiều dài chồi (cm)	Khối lượng tươi của mẫu (mg)
0	2,24 ^c	1,60 ^c	234,67 ^c
3	4,42 ^a	3,63 ^a	272,67 ^b
5	4,47 ^a	3,60 ^a	315,0 ^a
7	3,17 ^b	2,17 ^b	240,33 ^c
10	2,19 ^c	1,50 ^c	238,67 ^c
CV%	5,20	9,40	4,42
LSD _{0,05}	0,33	0,43	20,91

a, b, c: thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% (theo phương pháp phân tích Duncan, p<0,05).

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi cấy tốt nhất (kết quả từ nội dung 1) với lượng bổ sung BA phù hợp nhất (kết quả từ nội dung 2) để thử nghiệm bổ sung nguồn các bon từ đường sucrose với các nồng độ khác nhau (0% - đối chứng, 3, 5, 7 và 10%). Kết quả bảng 3 cho thấy, số lượng chồi/mẫu nuôi cấy đạt 2,19-4,47, trong đó 2 công thức bổ sung đường 3 và 5% cho số lượng chồi cao nhất, lần lượt là 4,42 và 4,47 chồi. Công thức có số lượng chồi thấp nhất là đối chứng (2,24 chồi) và công thức bổ sung đường 10% (2,19 chồi). Với chỉ tiêu chiều dài chồi, 2 công thức đạt giá trị cao nhất là công thức bổ sung 3 (3,63 cm) và 5% đường (3,60 cm). Khối lượng tươi của chồi đạt 238,67-315,0 mg, trong đó 2 công thức bổ sung 3 và 5% đường cho khối lượng mẫu cao nhất, lần lượt đạt giá trị là 272,67 và 315,0 mg, các công thức còn lại thấp hơn và cùng mức giá trị kết quả tương đương so với đối chứng, số liệu ở độ tin cậy 95%.

Sucrose là thành phần quan trọng trong môi trường nuôi cấy *in vitro* mô tế bào thực vật, sucrose cung cấp nguồn các bon, bổ sung thêm sucrose vào môi trường giúp cho tế bào tăng cường quá trình tổng hợp chất hữu cơ, tái tạo các cơ quan thực vật, tăng nhanh tái sinh và sinh khối [8]. J.D. Chung và cs (1985) [8] khi nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy ở loài địa lan *Cymbidium kanran* đã chỉ ra rằng, nồng độ đường sucrose phù hợp giúp tăng quá trình tái sinh chồi, tăng sinh khối của mẫu nuôi cấy. Cụ thể: nồng độ sucrose tối ưu đối với địa lan *Cymbidium ensifolium* là 4% và *Cymbidium kanran* là 6%, đây là các nồng độ thúc đẩy tái sinh chồi và tăng khối lượng tươi của chồi đạt giá trị tối đa. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, khả năng tái sinh chồi đạt tối đa ở nồng độ đường 3 đến 5% và đạt khối lượng tươi lớn nhất ở nồng độ đường 5%. Khi tăng nồng độ đường lên cao hơn (7 và 10%), nhóm nghiên cứu nhận thấy chồi cứng và nhỏ hơn, khả năng tái sinh giảm đi đáng kể (bảng 3).

Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy, có thể bổ sung đường 3-5% vào môi trường tái sinh địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công, khả năng tái sinh chồi có giá trị tương đương ở cả 2 nồng độ 3 và 5%, nhưng khối lượng chồi đạt cao nhất ở nồng độ đường 5%.

Kết luận

1. Môi trường nuôi cấy phù hợp cho hạt địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công này mầm là MS, tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất đạt 90,54%.

2. Hoạt chất BA thuộc nhóm cytokinin có tác động tốt đến khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công, môi trường MS bổ sung BA 1 mg/l cho kết quả tái sinh cao nhất (4,42 chồi/mẫu, chiều dài chồi đạt 3,63 cm, khối lượng tươi đạt 272,67 mg).

3. Bổ sung đường sucrose vào môi trường MS + 1 mg BA/l có tác dụng tốt đến sự tái sinh chồi Bạch Ngọc Đuôi Công, trong đó hàm lượng đường sucrose 5% cho kết quả tốt nhất (số chồi đạt 4,47 chồi, chiều dài chồi đạt 3,6 cm, khối lượng tươi đạt 315 mg).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.V. Averyanov, A.L. Averyanova (2003), "Updated Checklist of The Orchids of Vietnam", Vietnam National University Publishing House Hanoi, 45pp.
- [2] G.Q. Zhang, G.Z. Chen, L.J. Chen, et al. (2021), "Phylogenetic incongruence in *Cymbidium orchids*", *Plant Diversity*, **43**(6), pp.452-461, DOI: 10.1016/j.pld.2021.08.002.
- [3] M.C. Das, S. Kumaria, P. Tandon (2007), "Protocorm regeneration, multiple shoot induction and *ex vitro* establishment of *Cymbidium devonianum* Paxt", *Asian Journal of Plant Sciences*, **6**(2), pp.349-353.
- [4] P. Mohanty, S. Paul, M.C. Das, et al. (2012), "A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: An ornamental orchid of northeast India", *AoB Plants*, **1**, DOI: 10.1093/aobpla/pls023.
- [5] H.Y. Park, K.W. Kang, D.H. Kim, et al. (2018), "In vitro propagation of *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. through direct adventitious shoot regeneration", *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **24**(2), pp.307-313, DOI: 10.1007/s12298-017-0503-2.
- [6] X. Liu, L. Xiang, Y. Huang, et al. (2020), "Efficient propagation with *in vitro* seed germination of *Vanda falcata*", *Journal of Zhejiang University Science B*, **21**(12), pp.999-1004, DOI: 10.1631/jzus.B2000505.
- [7] K.Y. Paek, E.C. Yeung (1991), "The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N 6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*", *Plant Cell Tissue Org.*, **24**, pp.65-71, DOI: 10.1007/BF00039732.
- [8] J.D. Chung, C.K. Chun, S.S. Kim, et al. (1985), "Factors affecting growth of rhizome and organogenesis of Korean native *Cymbidium kanran*", *J. Kor. Soc. Hort. Sci. (Korea R.)*, **26**(3), pp.281-288.

Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối

Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Nguyễn Thị Thu², Trần Văn Tuấn³, Phạm Hồng Hiền⁴, Nguyễn Xuân Cảnh^{2*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

⁴Ban Khoa học và Hợp tác Quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, xã Vĩnh Quỳnh, huyện Thanh Trì, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/2/2023; ngày chuyển phản biện 13/2/2023; ngày nhận phản biện 10/3/2023; ngày chấp nhận đăng 13/3/2023

Tóm tắt:

Nhằm mục đích sử dụng chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 (chủng xạ khuẩn VNUA27) để sản xuất chế phẩm phòng trừ nấm gây bệnh trên cây chuối, nghiên cứu này tập trung vào xác định khả năng đối kháng nấm bệnh hại cây chuối và một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn VNUA27. Bằng phương pháp đồng nuôi cấy và khuếch tán đĩa thạch đã xác định được chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng đối kháng phổ rộng với các nấm *C. musa*, *C. gloeosporioides* và *A. alternata* gây bệnh trên cây chuối với tỷ lệ đối kháng lần lượt là 71,89±3,86%, 60,00±1,24% và 55,38±3,39%. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cũng xác định chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng tổng hợp siderophore, các enzym ngoại bào (cellulase, chitinase, xylanase, pectinase, protease), phân giải phosphate khó tan và tổng hợp IAA (axit phytohormone indole-3-acetic). Chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng sinh trưởng, phát triển tối ưu ở các khoảng chịu đựng tương đối rộng: nhiệt độ 25-37°C, pH 6-11, nồng độ NaCl 0-2% và có khả năng sử dụng nhiều nguồn cacbon và nitơ khác nhau.

Từ khóa: bệnh hại cây chuối, enzym ngoại bào, nấm, phân giải phosphate, siderophore, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Xạ khuẩn là nguồn tài nguyên sinh vật quan trọng tạo ra các chất chuyển hoá chuyên biệt đa dạng về cấu trúc và thể hiện một loạt các hoạt tính sinh học. Hơn 7.000 chất chuyển hoá đã được phân lập từ chi *Streptomyces* và khoảng 3.000 chất chuyển hoá từ các chi xạ khuẩn hiếm [1]. Với kích thước bộ gen trung bình trên 5 Mb xạ khuẩn đã sử dụng 0,8-3,0 Mb trong bộ gen để tạo ra chất chuyển hoá chuyên biệt [2]. Các hợp chất này đóng vai trò quan trọng trong việc phòng trừ các tác nhân gây bệnh trên thực vật [3, 4]. Trong tương tác với thực vật, xạ khuẩn sử dụng các chất khoáng từ sinh quyển và tạo ra các hợp chất có lợi cho cây trồng. Sắt là một thành phần thiết yếu đối với nhiều quá trình sinh học, trong tự nhiên một số xạ khuẩn có khả năng sinh ra siderophore để hoà tan sắt khó tan trong môi trường cung cấp dinh dưỡng sắt cho cây [5]. IAA cũng được tìm thấy trong số các hợp chất được tạo ra từ xạ khuẩn. Sản xuất IAA của vi sinh vật hoạt động như một trong những cơ chế quan trọng ảnh hưởng đến sinh lý thực vật và kích thích tăng trưởng trong quá trình tương tác giữa thực vật và vi sinh vật [6]. Cùng với đó, xạ khuẩn còn có khả năng phân giải phosphate khó tan và sinh ra một số enzym ngoại bào có khả năng xử lý một lượng lớn các phụ phẩm nông nghiệp trong đất góp phần cải tạo đất, thúc đẩy phát triển cây trồng [7].

Nghiên cứu gần đây của của D.T. Sơn và cs (2022) [8] đã chỉ ra

rằng, chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc TR4), một tác nhân gây bệnh thiệt hại nhất trên cây chuối. Dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 đã ức chế sự phát triển hệ sợi và sự nảy mầm của bào tử nấm Foc TR4. Nghiên cứu đã cho thấy, chủng VNUA27 rất có tiềm năng ứng dụng trong phòng trừ bệnh héo vàng panama trên chuối tại Việt Nam [8]. Tuy nhiên, trong thực tế một chủng vi sinh vật tiềm năng được xác định và sử dụng khi chúng có hoạt tính phổ rộng cũng như thích nghi với các điều kiện sống khác nhau [9]. Do đó, mở rộng nghiên cứu đánh giá các điều kiện sinh trưởng, khả năng đối kháng nấm bệnh phổ rộng và sinh chất kích thích sinh trưởng cây trồng là “chìa khoá” để chọn lọc và phát triển các chủng vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng trong thực tiễn.

Với mục đích ứng dụng chủng xạ khuẩn VNUA27 vào sản xuất chế phẩm phòng trừ bệnh trên cây chuối, chúng tôi tập trung nghiên cứu khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn VNUA27 với các nấm gây bệnh trên chuối: *Colletotrichum musae*, *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư [10-13] và nấm *Alternaria alternata* gây bệnh bạc lá [14, 15]; đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật như IAA, khả năng sinh tổng hợp siderophore, phân giải phosphate khó tan; xác định các đặc điểm nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VNUA27.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

*Tác giả liên hệ: Email: nxcanh@vnua.edu.vn

Characterisation of *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 used for controlling fungal pathogens causing banana plant diseases

Thi Thanh Mai Nguyen¹, Thi Thu Nguyen², Van Tuan Tran³, Hong Hien Pham⁴, Xuan Canh Nguyen^{2*}

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, 25 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

⁴Department of Science and International Cooperation, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, Vinh Quynh Commune, Thanh Tri District, Hanoi, Vietnam

Received 8 February 2023; revised 10 March 2023; accepted 13 March 2023

Abstract:

In this study, the biological characteristics and anti-fungal pathogen activities of the *Streptomyces* VNUA27 were studied to produce the bioproduct used for preventing fungal pathogens in bananas. The fungal pathogens used in this study were isolated from banana-affected wilts, and the antifungal activities of the actinomycetes were assessed using the co-culture and agar well diffusion methods. The results showed that *Streptomyces* VNUA27 exhibited a broad-spectrum antifungal activity with an inhibition rate of $71.89 \pm 3.86\%$, 60.00 ± 1.24 , and $55.38 \pm 3.39\%$ against *C. musa*, *C. gloeosporioides*, and *A. alternata*, respectively. Additionally, this research demonstrated that VNUA27 could produce siderophore, extracellular enzymes (cellulase, chitinase, xylanase, pectinase and protease), phosphate solubilisation, and IAA production. *Streptomyces* VNUA27 could grow optimally within relatively wide tolerance ranges, including temperature of 25-37°C, pH values of 6-11, and NaCl concentration of 0-2%, and they could assimilate many various carbon and nitrogen sources.

Keywords: banana disease, extracellular enzyme, fungi, phosphate solubilisation, siderophore, *Streptomyces*.

Classification number: 4.6

2.1. Đối tượng

Chủng xạ khuẩn VNUA27 và các chủng nấm gây bệnh trên chuối: *C. musa*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata* là sản phẩm kế thừa từ đề tài khoa học và công nghệ tiềm năng cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (mã số ĐTTN.13/21) và được lưu giữ tại Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng đối kháng nấm bệnh hại cây chuối: Đánh giá khả năng kháng nấm bệnh của chủng xạ khuẩn VNUA27 được thực hiện theo phương pháp đồng nuôi cấy [16] và khuếch tán đĩa thạch [17]. Hoạt tính đối kháng nấm của chủng xạ khuẩn VNUA27 trong cả 2 phương pháp này được xác định bằng tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển hệ sợi nấm (PIRG) theo công thức sau:

$$\text{PIRG} = (R_1 - R_2) / R_1 \times 100$$

trong đó R_1 là đường kính của hệ sợi nấm trong đĩa đối chứng; R_2 đường kính của hệ sợi nấm trong đĩa thí nghiệm.

Xác định khả năng sinh các enzym ngoại bào: chitinase, cellulase, xylanase, protease, pectinase được xác định bằng cách cấy xạ khuẩn trên môi trường có bổ sung các nguồn cơ chất khác nhau. Sau 7 ngày nuôi cấy, hoạt tính enzym ngoại bào được phát hiện khi xuất hiện vòng sáng quanh khuẩn lạc sau khi nhuộm [18].

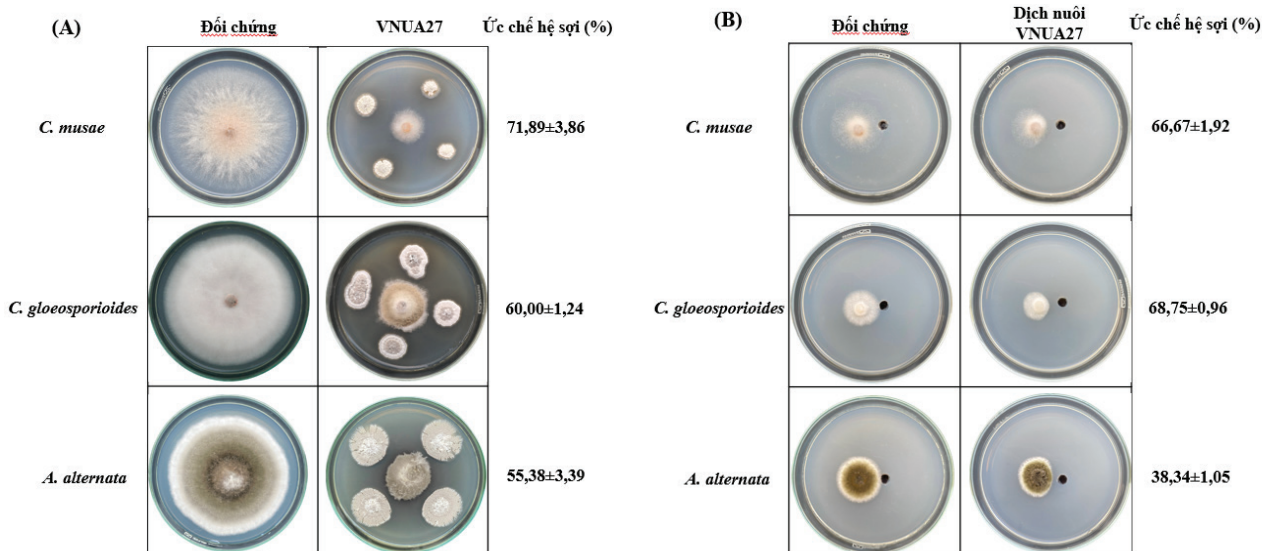
Xác định khả năng sinh siderophore được thực hiện theo phương pháp của B. Schwyn và J.B. Neilands (1987) [19]: Đặt khối thạch (đường kính 5 mm) có chứa các khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn lên trên môi trường thạch Chrome azurol S (CAS). Sau 14 ngày nuôi cấy tại 30°C, sự xuất hiện vòng sáng xung quanh khối thạch của chủng xạ khuẩn chứng tỏ chủng có khả năng sinh siderophore.

Xác định khả năng sinh tổng hợp IAA được thực hiện theo phương pháp Salkowski [20]: Lượng IAA ($\mu\text{g/ml}$) trong dịch nuôi cấy của chủng xạ khuẩn VNUA27 được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Salkowski ở bước sóng 530 nm. Đường chuẩn IAA được dựng với các mẫu có nồng độ IAA chuẩn khác nhau (chất chuẩn IAA mua của Hãng Sigma). Phương trình đường chuẩn IAA như sau:

$$y = 0,022x + 0,0028$$

Xác định khả năng phân giải phosphate khó tan: Đặt khối thạch (đường kính 5 mm) có chứa các khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn VNUA27 lên trên môi trường Pikovskayas (PKV). Sau 14 ngày nuôi ở 30°C, xác định khả năng phân giải phosphate của vi sinh vật nghiên cứu thông qua sự hình thành vòng sáng xung quanh khối thạch [21].

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh trưởng, phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27: Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn



Hình 1. Kết quả kháng nấm phổ rộng của chủng xạ khuẩn VNUA27 với một số nấm gây bệnh trên chuối. (A) Phương pháp đồng nuôi cấy; (B) Phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

VNUA27 được thực hiện theo phương pháp của B. Zhang và cs (2018) [22].

Đánh giá khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ của chủng xạ khuẩn VNUA27: Nuôi cấy chủng xạ khuẩn VNUA27 trong các bình tam giác chứa 50 ml môi trường ISP9 lỏng có bổ sung 1% các nguồn đường khác nhau [23], gồm: glucose, maltose, D-fructose, D-galactose, lactose, D-ribose, D-manitol, sorbitol, cellulose, xylose hoặc môi trường Starch nitrate lỏng [24] với các nguồn nitơ gồm: cao thịt bò, NH_4Cl , peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NH_4NO_3 , L-asparagine, L-tyrosine, glycine trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở 30°C trong 7 ngày. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ của chủng xạ khuẩn VNUA27 được xác định thông qua sinh khối được hình thành sau thời gian nuôi cấy bằng cách dùng giấy lọc thu sinh khối, sấy ở 50°C trong 12 giờ, cân sinh khối và đánh giá.

Xử lý số liệu: Số liệu thí nghiệm được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Kết quả mỗi thí nghiệm được thể hiện là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) sau 3 lần lặp lại ngẫu nhiên.

3. Kết quả và bàn luận

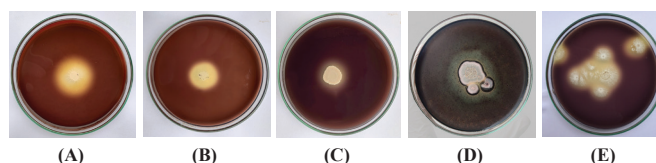
3.1. Khảo sát khả năng đối kháng nấm bệnh hại cây chuối của chủng xạ khuẩn VNUA27

Nhiều kết quả nghiên cứu đã công bố cho biết, các vùng trồng chuối lớn thường là những vùng trồng chuyên canh và cùng một thời điểm cây chuối có thể bị nhiễm nhiều loại nấm bệnh khác nhau. Chủng xạ khuẩn VNUA27 đã được nghiên cứu và xác định có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Foc* TR4 [8]. Bằng phương

pháp đồng nuôi cấy nấm *C. musa*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata* gây bệnh trên chuối và chủng xạ khuẩn VNUA27 cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 có hoạt tính đối kháng nấm *C. musa* đạt 71,89±3,86%, *C. gloeosporioides* đạt 60,00±1,24% và nấm *A. alternata* đạt 55,38±3,39% (hình 1A). Bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, tỷ lệ phần trăm đối kháng các chủng nấm gây bệnh đạt lần lượt là 66,67±1,92, 68,75±0,96 và 38,34±1,05% (hình 1B). Tỷ lệ đối kháng này cao hơn rất nhiều so với công bố của N.T. Vân và cs (2019) [25], tương đương với nghiên cứu của Y. Wei và cs (2020) [9].

3.2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn VNUA27

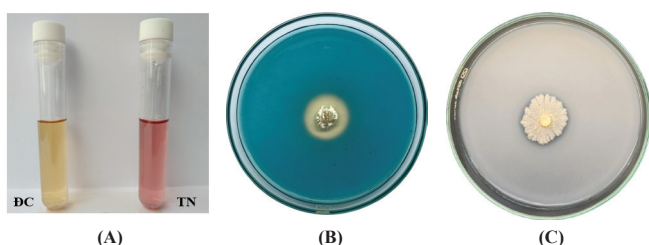
Xạ khuẩn đối kháng nấm bệnh thông qua cơ chế đối kháng trực tiếp hoặc gián tiếp như tổng hợp chất kháng sinh, sinh enzyme ngoại bào, cạnh tranh dinh dưỡng và kích thích sinh trưởng cây trồng [26]. Khảo sát khả năng tổng hợp enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn VNUA27 đã xác định chủng xạ khuẩn nghiên cứu có khả năng tổng hợp chitinase, cellulase, xylanase, protease và pectinase. Kết quả hình 2 cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào.



Hình 2. Khả năng tổng hợp enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn VNUA27. (A) Chitinase; (B) Cellulase; (C) Xylanase; (D) Protease; (E) Pectinase.

3.3. Khả năng tổng hợp các hợp chất hỗ trợ sinh trưởng cây trồng

Kiểm tra khả năng sinh IAA của chủng xạ khuẩn VNUA27 sau khi ủ dịch ly tâm với thuốc thử Salkowski và so màu ở bước sóng 530 nm cho kết quả là 19,10 µg/ml. Kết quả này cao hơn so các nghiên cứu gần đây của M. Sari và cs (2021) [27], P. Kawicha và cs (2020) [6]. Thí nghiệm thử khả năng sinh siderophore và phân giải phosphate khó tan đều thấy, sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường CAS và PKV, xung quanh khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn VNUA27 đã xuất hiện vòng sáng. Như vậy, chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng sinh siderophore và phân giải phosphate khó tan. Kết quả này cho thấy, chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng hình thành các hợp chất hỗ trợ sinh trưởng cây trồng. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Kết quả khảo sát khả năng hình thành các hợp chất hỗ trợ sinh trưởng cây trồng của chủng xạ khuẩn VNUA27. (A) Khả năng sinh IAA; (B) Khả năng sinh siderophore; (C) Khả năng phân giải phosphate khó tan.

3.4. Một số đặc điểm sinh trưởng, phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27

Khảo sát các điều kiện sinh trưởng, phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27 đã xác định được khoảng pH chịu đựng của chủng này là tương đối rộng (pH 4-12), chủng phát triển tối ưu ở pH kiềm cao (pH 6-11). Đặc điểm này rất có ý nghĩa trong sản xuất chế phẩm phòng trừ nấm bệnh hại cây chuối bởi pH kiềm không phù hợp với sự phát triển của mầm bệnh [28]. Bên cạnh đó, chủng

xạ khuẩn VNUA27 còn có khả năng sinh trưởng và phát triển trong khoảng chịu đựng của nhiệt độ và nồng độ NaCl tương đối rộng lần lượt là 20-40°C và 0-4%, trong đó chủng phát triển tối ưu ở nhiệt độ 25-37°C và ở nồng độ NaCl 0-2%. Kết quả nghiên cứu các điều kiện sinh trưởng, phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27 được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn VNUA27.

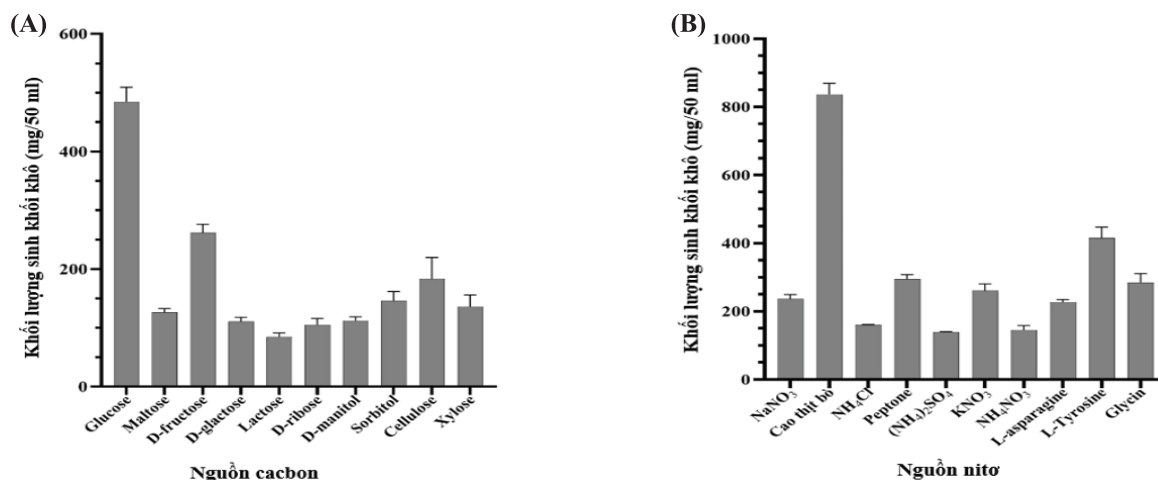
Yếu tố	Khoảng tối ưu	Khoảng chịu đựng
Nhiệt độ (°C)	25-37	20-40
pH	6-11	4-12
Nồng độ NaCl (%)	0-2	0-4

3.5. Khảo sát khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ khác nhau

Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VNUA27 trên các nguồn cacbon và nitơ cho thấy, chủng xạ khuẩn này có khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn cacbon và nitơ thử nghiệm khác nhau. Tuy nhiên, chủng xạ khuẩn VNUA27 phát triển tốt nhất trên nguồn cacbon là glucose, D-fructose, cellulose; nguồn nitơ là: cao thịt bò, L-tyrosine, pepton. Việc khảo sát khả năng sử dụng các nguồn cacbon và nitơ khác nhau là cơ sở ban đầu giúp lựa chọn được nguồn nguyên liệu lên men phù hợp nhất cho sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VNUA27. Kết quả khảo sát được thể hiện ở hình 4.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng đối kháng mạnh, đối kháng phổ rộng với các loại nấm: *C. musa*, *C. gloeosporioides* và *A. alternata* gây bệnh trên cây chuối lần lượt là 71,89±3,86%, 60,00±1,24% và 55,38±3,39%. Đồng thời, chủng xạ khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp các enzym ngoại bào (chitinase, cellulase, xylanase, protease và pectinase),



Hình 4. Khả năng sinh trưởng của chủng xạ khuẩn VNUA27 trên các nguồn cacbon và nitơ khác nhau. (A) Nguồn cacbon; (B) Nguồn nitơ.

sinh các chất kích thích sinh trưởng cây trồng: IAA đạt 19,10 µg/ml, siderophore và phân giải phosphate khó tan. Chủng xạ khuẩn VNUA27 có khả năng sinh trưởng, phát triển tối ưu trong khoảng chịu đựng tương đối rộng: nhiệt độ (25-37°C), pH (6-11), NaCl (0-2%); sử dụng đa dạng các nguồn cacbon và nitơ khác nhau. Với các đặc điểm sinh học được công bố trong nghiên cứu này thì việc sử dụng chủng xạ khuẩn VNUA27 vào sản xuất chế phẩm vi sinh trong phòng trừ bệnh do nấm gây ra trên cây chuối có tính khoa học và ý nghĩa thực tiễn cao. Đây là vấn đề cấp thiết trong quản lý dịch bệnh trên cây chuối theo hướng hiệu quả, bền vững và thân thiện với môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ chủng giống từ đề tài khoa học và công nghệ tiềm năng cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn mã số ĐTTN.13/21. Nguyễn Thị Thanh Mai được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS071. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.H. Baltz (2008), "Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes", *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8**(5), pp.557-563, DOI: 10.1016/j.coph.2008.04.008.
- [2] R.H. Baltz (2017), "Gifted microbes for genome mining and natural product discovery", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **44**(4-5), pp.573-588, DOI: 10.1007/s10295-016-1815-x.
- [3] D. Qi, L. Zou, D. Zhou, et al. (2019), "Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*", *Frontiers in Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01390.
- [4] M. Girao, I. Ribeiro, T. Ribeiro, et al. (2019), "Actinobacteria isolated from *Laminaria ochroleuca*: A source of new bioactive compounds", *Frontiers in Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.00683.
- [5] A. Baakza, A.K. Vala, B.P. Dave, et al. (2004), "A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **311**(1), pp.1-9, DOI: 10.1016/j.jembe.2003.12.028.
- [6] P. Kawicha, A. Laopha, W. Chamnansing, et al. (2020), "Biocontrol and plant growth-promoting properties of *Streptomyces* isolated from vermicompost soil", *Indian Phytopathology*, **73**(4), pp.655-666, DOI: 10.1007/s42360-020-00267-2.
- [7] A. Ali, N. Kurnia, A. Asrini Nurani Ulfah, et al. (2021), "Diversity of endophytic actinomycetes producing indole-3-acetic acid and *in vitro* evaluation of plant growth-promoting activity on *Brassica oleracea* L.", *Tropical Agricultural Science*, **44**(2), pp.275-292.
- [8] D.T. Son, N.T.T. Mai, N.T. Thu, et al. (2022), "Research on the antagonistic properties of the actinomycete strain *Streptomyces* sp. VNUA27", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(8), tr.1042-1053 (in Vietnamese)
- [9] Y. Wei, Y. Zhao, D. Zhou, et al. (2020), "A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4", *Frontiers in Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01712.
- [10] S.M. Williamson, M. Guzman, D.H. Marin, et al. (2008), "Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose of banana", *Biol. Control*, **46**(3), pp.279-286, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.05.016.
- [11] M. Maqbool, A. Ali, S. Ramachandran, et al. (2010), "Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating", *Crop Prot.*, **29**(10), pp.1136-1141, DOI: 10.1016/j.cropro.2010.06.005.
- [12] K. Alemu (2014), "Importance and pathogen spectrum of crown rot of banana in Jimma town, southwestern Ethiopia", *J. Biol. Agric. Healthcare*, **4**(23), pp.106-111.
- [13] N. Riera, D. Ramirez-Villacis, N. Barriga-Medina, et al. (2014), "First report of banana anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Ecuador", *Plant Disease*, **103**(4), DOI: 10.1094/PDIS-01-18-0069-PDN.
- [14] V. Parkunan, S. Li, E.G. Fonsah, et al. (2013), "First report of alternaria leaf spot of banana caused by *Alternaria alternata* in the United States", *Plant Disease*, **97**(8), DOI: 10.1094/PDIS-01-13-0007-PDN.
- [15] B.Z. Fu, Z.H. Zhang, L.H. Wang, et al. (2014), "First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on Chinese dwarf banana in China", *Plant Disease*, **98**(5), DOI: 10.1094/PDIS-08-13-0831-PDN.
- [16] M. Sadeghian, G.H.S. Bonjar, G.R.S. Sirchi (2016), "Pos harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist", *Postharvest Biology and Technology*, **112**, pp.46-54, DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.09.035.
- [17] C. Phuakjaiphaeo, C.I. Chang, O. Ruangwong, et al. (2016), "Isolation and identification of an antifungal compound from endophytic *Streptomyces* sp. CEN 26 active against *Alternaria brassicicola*", *Letters in Applied Microbiology*, **63**(1), pp.38-44, DOI: 10.1111/lam.12582.
- [18] L.T. Hien, D.V. Loi, V.T. Van, et al. (2014), "Isolation and selection of actinomycete strains (*Streptomyces* spp.) resistant to plant fungal pathogens", *Journal of Science and Development*, **12**(5), pp.656-664 (in Vietnamese)
- [19] B. Schwyn, J.B. Neillands (1987), "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores", *Analytical Biochemistry*, **160**(1), pp.47-56, DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
- [20] S.A. Gordon, R.P. Weber (1951), "Colorimetric estimation of indoleacetic acid", *Plant Physiol.*, **26**(1), pp.192-195, DOI: 10.1104/pp.26.1.192.
- [21] C.S. Nautiyal (1999), "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms", *FEMS Microbiology Letters*, **170**(1), pp.265-270, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x.
- [22] B. Zhang, S. Tang, X. Chen, et al. (2018), "*Streptomyces qaidamensis* sp. nov., isolated from sand in the Qaidam Basin, China", *The Journal of Antibiotics*, **71**(10), pp.880-886, DOI: 10.1038/s41429-018-0080-9.
- [23] E.B. Shirling, D. Gottlieb (1966), "Methods for characterization of *Streptomyces* species", *International Journal of Systematic Bacteriology*, **16**(3), pp.313-340.
- [24] N.X. Canh, H.T. Cuong, N.T. Dinh, et al. (2016), "Research on actinomycete strains with the ability to oppose *Vibrio parahaemolyticus* bacteria causing disease in shrimp", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **14**(11), pp.1809-1816.
- [25] N.T. Van, D.T.N. Mai, H.T. Yen, et al. (2019), "Investigating the ability of actinomycetes isolated from Cuc Phuong and Ba Be National Parks to resist 4 types of plant-pathogenic fungi", *Journal of Biotechnology*, **17**(3), pp.527-535 (in Vietnamese)
- [26] H.J. Lacey, P.J. Rutledge (2022), "Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species", *Molecules*, **27**(3), DOI: 10.3390/molecules27030887, DOI: 10.3390/molecules27030887.
- [27] M. Sari, A.A. Nawangsih, A.T. Wahyudi (2021), "Rhizosphere *Streptomyces* formulas as the biological control agent of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and plant growth promoter of soybean", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **22**(6), DOI: 10.13057/biodiv/d220602.
- [28] Y. Li, S. Jiang, J. Jiang, et al. (2022), "Synchronized efficacy and mechanism of alkaline fertilizer and biocontrol fungi for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4", *Journal of Fungi*, **8**(3), DOI: 10.3390/jof8030261.

Vi nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (*Fragaria ananassa* “pajaro”) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Trịnh Ngọc Ái^{1*}, Trần Thị Thúy Liễu¹, Hồ Tuấn Kiệt¹, Thái Nhật Quang¹,
Lê Văn Thức², Nguyễn Minh Hiệp², Nguyễn Tiến Dũng^{3*}

¹Trường Đại học Trà Vinh, 126 Nguyễn Thiện Thành, phường 5, TP Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam, 59 Lý Thường Kiệt, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/9/2022; ngày chuyển phản biện 18/9/2022; ngày nhận phản biện 11/10/2022; ngày chấp nhận đăng 14/10/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ chất điều hòa sinh trưởng trong vi nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (*Fragaria ananassa* “pajaro”). Mẫu ngó dâu tây Mỹ thơm được khử trùng bằng dung dịch NaOCl với các nồng độ khác nhau (1, 2 và 3%) trong 20 phút. Mẫu đỉnh sinh trưởng được tách ra và nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog) có chứa 0,3 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) trong 8 tuần, sau đó được chuyển sang môi trường nhân chồi MS có chứa BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (6-furfurylaminopurine) mức 0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Các mẫu chồi tái sinh sau 6 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường tạo rễ 1/2 MS có chứa nồng độ NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp. Kết quả cho thấy, khử trùng ở nồng độ 3% NaOCl trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất (10%) và tỷ lệ tái sinh mẫu cao nhất (80%). Môi trường MS có chứa 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin đạt số chồi cao nhất (16,2 chồi/mẫu). Môi trường 1/2 MS có chứa 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP tạo ra 14,4 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt dài nhất (9,1 cm). Ngược lại, mô sẹo được quan sát rõ khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung nồng độ NAA (0,3-1,0 mg/l) hoặc kết hợp với BAP. Giá thể phân chuồng được ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn dừa (1:1:1 v/v/v) được xem là phù hợp cho quá trình ra ngôi của giống dâu tây Mỹ thơm.

Từ khóa: dâu tây Mỹ thơm, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, α -naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây Dâu tây (*Fragaria ananassa* L.) hay còn gọi là dâu đất, là một chi thực vật hạt kín và loài thực vật có hoa thuộc họ hoa hồng (*Rosaceae*). Dâu tây là loại cây trồng được tiêu thụ phổ biến vì có hương thơm và khả năng kháng oxy hóa cao như pelargonidin, axit ellagic, ellagitannin... [1]. Dâu tây còn là loại trái cây chứa rất ít calo, với nguồn vitamin, khoáng chất dồi dào nên mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, như làm giảm hàm lượng cholesterol, hạ huyết áp, phòng chống ung thư... [2]. Chính vì vậy, việc phát triển các giống dâu tây được xem là hoạt động hấp dẫn và thu hút nhiều nhà vườn. Giống dâu tây Mỹ thơm được trồng phổ biến do có khả năng thích nghi tốt với điều kiện khí hậu (có khả năng chịu nhiệt lên đến 40°C), có giá trị kinh tế cao, dễ trồng và chăm sóc, ra quả sau 100-120 ngày gieo trồng, cho quả quanh năm, chất lượng quả tốt, năng suất cao.

Dâu tây có thể nhân giống bằng ngó hoặc hạt, tuy nhiên, trồng bằng hạt thì tỷ lệ nảy mầm thấp, cây con tạo ra không đồng đều, thời gian sinh trưởng kéo dài. Đặc biệt là phương pháp nhân giống truyền thống không cung cấp đủ cây giống cho thị trường. S. Karhu và cs (2002) [3] chỉ ra rằng, các cây dâu tây được nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô cho số lượng thân bò nhiều hơn, thời gian nở

hoa dài hơn và năng suất cao hơn so với cây được nhân giống theo phương pháp truyền thống.

Bên cạnh đó, cây dâu tây con dễ bị nhiễm một số bệnh từ cây mẹ, đặc biệt là virus như Strawberry mottle virus (SMoV) và Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng quả [4]. Một số loài virus làm giảm hơn 80% năng suất cây dâu tây [5]. Vì thế, phương pháp nhân giống truyền thống trở nên không phù hợp trong việc kháng lại các tác nhân gây bệnh.

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng nhằm mục đích loại bỏ vi khuẩn, virus [6], thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, quá trình phân chia tế bào tích cực làm giảm sự phân hóa các mô mạch [7]. Sau khi được tách ra, mô đỉnh sinh trưởng có thể được nuôi cấy và phát triển thành cây hoàn chỉnh, đồng nhất về mặt di truyền và sạch bệnh.

Một trong các yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của quá trình vi nhân giống cây dâu tây chính là loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng [8]. BAP được dùng khá phổ biến trong vi nhân giống cây dâu tây [9, 10]. K.A. Quiroz và cs (2017) [11] cho biết, môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP làm gia

*Tác giả liên hệ: Email: ngocai@tvu.edu.vn, dungnt@tuaf.edu.vn

Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa* “pajaro”) by meristem culture method

Ngoc Ai Trinh^{1*}, Thi Thuy Lieu Tran¹, Tuan Kiet Ho¹,
Nhat Quang Thai¹, Van Thuc Le²,
Minh Hiep Nguyen², Tien Dung Nguyen^{3*}

¹Tra Vinh University, 126 Nguyen Thien Thanh Street, Hamlet 4,
Tra Vinh City, Tra Vinh Province, Vietnam

²Dalat Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute,
59 Ly Thuong Kiet Street, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry,
Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 15 September 2022; revised 11 October 2022; accepted 14 October 2022

Abstract:

Experiments were carried out to examine the effects of different combinations of plant growth regulators *in vitro* micropropagation of strawberry plants. Specimens were sterilised by a different concentration of sodium hypochlorite - NaOCl (1, 2, and 3%) for 20 mins. A meristem was separated and cultured on Murashige and Skoog (MS) containing 0.3 mg/l BAP for 8 weeks. Initial shoots were transferred to MS with various concentrations of BAP (0, 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l) and kinetin (0, 0.1, 0.2, and 0.3 mg/l) in either single or combination. After 6 weeks of culture, the regenerated shoots were transferred on 1/2 MS with different concentrations of NAA (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 mg/l) and BAP (0, 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l) in either single or combination. The results showed that the lowest percentage of contamination (10%) and the highest percentage of regeneration (80%) response were achieved on MS media by sterilisation with 3% NaOCl for 20 mins. The highest shoot proliferation per explant (16.2 shoots/explant) was reached on MS with 0.3 mg/l BAP plus 0.1 mg/l kinetin. 1/2 MS media with 0.1 mg/l NAA plus 0.1 mg/l BAP induced 14.4 roots per shoot and produced the longest roots (9.1 cm). However, the higher concentration of NAA (0.3-1.0 mg/l) or in combination with BAP resulted in callus formation. The plantlets, thus developed, were hardened and successfully established in soil containing organic fertiliser: Trichoderma: coconut peat (1:1:1 v/v/v).

Keywords: *Fragaria ananassa* “pajaro”, meristem culture, α -naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP).

Classification number: 4.6

tăng 3-6 chồi/mẫu cấy. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP tối ưu cho quá trình tái sinh chồi ở cây dâu tây Sweet Charlie [12]. Bên cạnh đó, kinetin có khả năng gây ra sự tăng sinh của tế bào và quá trình hình thành chồi [13]. Kết quả nghiên cứu của F. Haddadi và cs (2010) [14] cho thấy, cytokinin và auxin đóng vai trò hình thành chồi hoặc rễ. Các chồi được tạo ra từ chồi ngọn giống dâu tây Camarosa trên môi trường MS có bổ sung 2 μ M TDZ và 4 μ M BAP cho số chồi cao nhất (14 chồi/mẫu). Trên môi trường MS có bổ sung 1 μ M NAA hoặc 1 μ M IBA được xem là phù hợp cho quá trình hình thành rễ (6 rễ/mẫu).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào ảnh hưởng của nồng độ auxin và cytokin khác nhau (BAP, kinetin và NAA) lên sự tạo chồi và rễ *in vitro* ở cây dâu tây Mỹ thơm. Bên cạnh đó, giá thể phân hữu cơ cũng được đánh giá đến tỷ lệ sống của cây khi ra ngôi nhằm xây dựng được quy trình nhân giống cây dâu tây sạch bệnh.

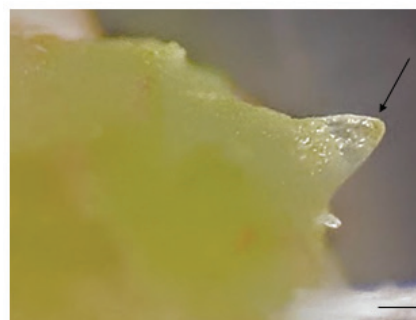
2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Ngó dâu tây Mỹ thơm từ cây trưởng thành 4-12 tháng tuổi, có chiều dài 10-15 cm được lấy tại Trang trại trồng dâu tây Ichigo, Đà Lạt, Lâm Đồng. Thời điểm thu ngó trước 8 giờ sáng và sau 3 giờ chiều. Ngó sau khi cắt được quấn vào khăn giấy ẩm và bảo quản trong túi nilon để vận chuyển về phòng thí nghiệm và được bảo quản ở nhiệt độ 12°C để phục vụ nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy: Ngó được rửa sạch dưới vòi nước chảy mạnh trong 2 phút, sau đó lắc đều trong dung dịch xà phòng (1-2 giọt xà phòng trong 100 ml nước) trong 3 phút, tiếp tục rửa dưới vòi nước cho sạch xà phòng rồi rửa lại 3 lần bằng nước cất. Sau đó lắc mẫu trong cồn 70% trong 1 phút, tiếp tục lắc trong dung dịch NaClO (1, 2 và 3%) trong 20 phút và rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được cắt bỏ phần thân, giữ lại phần đỉnh phía trên khoảng 1-2 cm. Mẫu được đặt dưới kính hiển vi soi nổi, sau đó dùng panke và dao cắt để loại bỏ lá bao phủ bên ngoài cho đến khi gặp mô phân sinh (đỉnh sinh trưởng có hình dạng má vòm - hình 1). Sau đó, dùng dao mổ cắt theo góc và đỉnh sinh trưởng rồi đặt vào môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8.



Hình 1. Mẫu đỉnh sinh trưởng được tách từ ngó dâu tây Mỹ thơm.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin lên khả năng nhân chồi: Mẫu đỉnh sinh trưởng tái sái sinh sau 8 tuần sẽ được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ, pH 5,8. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại chứa 12 mẫu cấy. Sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thống kê các chỉ tiêu:

- Số chồi trung bình (chồi/mẫu): Tổng số chồi tái sinh/số mẫu nuôi cấy.
- Chiều cao trung bình chồi (cm): Dùng thước đo từ cổ đến chóp lá cao nhất của cây.
- Số lá trung bình (lá): Đếm tổng số lá trên thân tính từ lá thật đầu tiên đến lá ngọn còn xanh.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BAP lên khả năng tạo rễ: Chồi sau 6 tuần tái sinh (5-6 lá) được chuyển sang môi trường tạo rễ 1/2 MS có bổ sung 30 g/l đường, 9 g/l agar, NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp, pH 5,8. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại chứa 12 mẫu cấy. Sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thống kê các chỉ tiêu:

- Số rễ trung bình/mẫu (rễ): Tổng số rễ/số mẫu nuôi cấy.
- Chiều dài trung bình rễ (cm): Đo từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chóp rễ dài nhất.
- Chiều cao trung bình cây (cm): Dùng thước đo từ cổ rễ đến chóp lá cao nhất của cây.
- Số lá trung bình (lá): Đếm tổng số lá trên thân tính từ lá thật đầu tiên đến lá ngọn còn xanh.

Đánh giá khả năng sống: Cây con nuôi cấy trên môi trường ra rễ sau 8 tuần được dùng để ra ngôi. Bịch cây mô được đặt ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày trước khi trồng vào giá thể. Cây dâu tây Mỹ thơm có khoảng 10 rễ, chiều cao cây trung bình 4-5 cm, khoảng 10 lá thật thì được chuyển sang nhà lưới để thích nghi với điều kiện bên ngoài trong 3-4 ngày. Cây được trồng vào giá thể phân hữu cơ (phân chuồng được ủ hoai với nấm Trichoderma và mụn dừa theo tỷ lệ 1:1:1 v/v/v trước khi sử dụng). Theo dõi và thống kê tỷ lệ sống của cây sau 4 tuần ra ngôi. Tỷ lệ sống (%) được tính bằng số cây sống/tổng số cây.

2.3. Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật. Môi trường được khử trùng bằng nồi autoclave ở nhiệt độ 121°C, thời gian 20 phút, áp suất 1 atm. Nhiệt độ phòng nuôi cấy là 22-25°C. Cường độ chiếu sáng là 1500-2000 lux. Thời gian chiếu sáng là 16 giờ sáng/8 giờ tối.

2.4. Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận và xử lý thông kê bằng Excel và SAS 9.4.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy

Sự lây nhiễm của các mẫu trong nuôi cấy in vitro từ nhiều nguồn khác nhau là một trong những trở ngại lớn cho sự thành công của quá trình nuôi cấy mô. Khử trùng mẫu được xem là điều kiện tiên quyết đánh giá sự thành công của tái sinh in vitro. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá hiệu quả của tác nhân khử trùng lên quá trình tái sinh đỉnh sinh trưởng của giống dâu tây Mỹ thơm ở các nồng độ NaOCl khác nhau (1, 2 và 3%) trong 20 phút (bảng 1). Kết quả cho thấy, nồng độ NaOCl càng thấp (1%) tỷ lệ mẫu nhiễm càng cao (chiếm 30%) và tỷ lệ tái sinh mẫu thấp (65%). Khi tăng nồng độ NaOCl lên 2% tỷ lệ mẫu nhiễm giảm (20%) và tăng tỷ lệ mẫu tái sinh (78%). Mẫu vô trùng và tái sinh cao nhất ở công thức NaOCl 3%, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (10%) và tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 80% (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy.

Nồng độ NaOCl (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
1	30±11,2 ^a	65±13,7 ^b
2	20±11,2 ^{ab}	78±32,6 ^a
3	10±13,7 ^b	80±11,2 ^a

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05.

NaOCl được xem là chất khử trùng hiệu quả, có khả năng chống lại vi khuẩn, nấm và virus. NaOCl tiêu diệt vi sinh vật thông qua cơ chế hoạt động peroxide của các phân tử chlorua và các ion kết hợp với phân tử protein gây ra cái chết sinh học của sinh vật [15]. Nhìn chung, tất cả nồng độ của NaOCl được sử dụng để vô trùng bề mặt mẫu đều ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tái sinh mẫu. Trong đó, nồng độ NaOCl 3% được xem là phù hợp nhất cho quá trình vô trùng mẫu dâu tây Mỹ thơm.

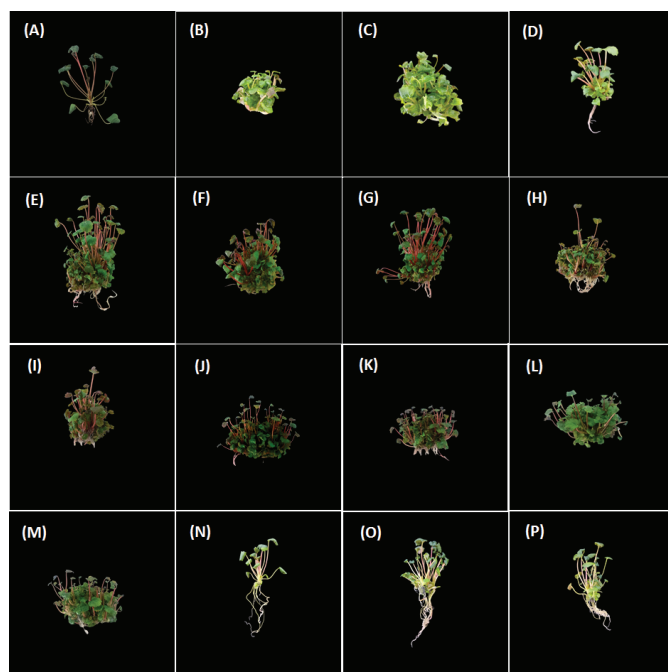
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi

Để tối ưu môi trường nhân chồi, mẫu đỉnh sinh trưởng sau 8 tuần tái sinh được chuyển sang môi trường MS có chứa nồng độ BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Hiệu quả của quá trình nhân chồi được quan sát rõ sau 6 tuần nuôi cấy. Kết quả cho thấy, sự kết hợp giữa BAP và kinetin cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất. Cụ thể, môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin cho số chồi cao nhất (16,2 chồi/mẫu), ngược lại môi trường chỉ có kinetin cho số chồi thấp nhất, trung bình 2,3 chồi/mẫu (từ 2,2 đến 2,4), hoặc BAP có số chồi trung bình 8,1 chồi/mẫu (từ 6,8 đến 10,7), cao hơn so với đối chứng (bảng 2, hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần.

BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chiều cao chồi (cm)
0	0	1,8±1,1 ^f	9,1±2,8 ^a	3,7±0,8 ^{ab}
0,1	0	10,7±4,5 ^{cd}	5,9±1,1 ^{ode}	1,6±0,3 ^f
0,3	0	6,9±3,1 ^e	5,3±1,3 ^{ode}	1,7±0,4 ^f
0,5	0	6,8±2,8 ^e	5,0±2,1 ^e	2,8±0,6 ^{de}
0,1	0,1	14,0±7,7 ^{abc}	6,9±2,0 ^b	3,7±1,0 ^{ab}
0,1	0,2	12,2±9,2 ^{bcd}	6,5±1,7 ^{bc}	3,8±1,2 ^a
0,1	0,3	9,5±6,4 ^{de}	6,4±1,8 ^{bc}	4,0±1,1 ^a
0,3	0,1	16,2±12,7 ^a	5,9±1,4 ^{bcd}	3,3±0,7 ^{bc}
0,3	0,2	15,6±11,3 ^{ab}	5,8±1,6 ^{ode}	3,0±0,7 ^{de}
0,3	0,3	14,4±9,0 ^{abc}	6,2±2,0 ^{bcd}	2,7±0,6 ^e
0,5	0,1	15,3±9,0 ^{ab}	5,6±1,7 ^{ode}	2,7±0,6 ^e
0,5	0,2	14,6±9,9 ^{ab}	5,6±1,4 ^{ode}	2,8±0,6 ^{de}
0,5	0,3	13,5±7,1 ^{abc}	5,5±1,6 ^{ode}	3,0±0,7 ^{de}
0	0,1	2,4±1,4 ^f	9,6±1,9 ^a	3,2±0,7 ^{cd}
0	0,2	2,3±1,6 ^f	8,8±2,5 ^a	3,0±0,7 ^{de}
0	0,3	2,2±1,7 ^f	8,8±2,0 ^a	2,7±0,8 ^e

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin (KN) đến quá trình hình thành chồi ở cây dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Đối chứng; **(B)** 0,1 mg/l BAP; **(C)** 0,3 mg/l BAP; **(D)** 0,5 mg/l BAP; **(E)** 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(F)** 0,1 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(G)** 0,1 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(H)** 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(I)** 0,3 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(J)** 0,3 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(K)** 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(L)** 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(M)** 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(N)** 0,1 mg/l KN; **(O)** 0,2 mg/l KN; **(P)** 0,3 mg/l KN.

Theo số liệu ở bảng 2, nồng độ chất điều hoà sinh trưởng tỷ lệ nghịch với số lá được hình thành và tỷ lệ thuận với chiều cao chồi. Kinetin được xem là phù hợp cho quá trình hình thành lá và chiều cao chồi ở cây dâu tây Mỹ thơm hơn so với BAP. Thật vậy, môi trường nuôi cấy có chứa 0,1 mg/l BAP có số lá là 5,9 lá/chồi và chiều cao chồi là 1,6 cm, ngược lại, trong môi trường có chứa 0,1 mg/l kinetin có số lá là 9,6 lá/chồi và chiều cao chồi là 3,2 cm. Tuy nhiên, khi có sự kết hợp giữa BAP và kinetin, chiều cao chồi tăng lên đáng kể, cụ thể môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BAP và 0,3 mg/l kinetin có chiều cao chồi cao nhất là 4,0 cm.

Trong nuôi cấy mô, chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần môi trường quan trọng trong việc xác định con đường phát triển của tế bào thực vật. Cytokinin như là BAP và kinetin có vai trò trong việc làm giảm ưu thế của chồi ngọn, kích thích sự hình thành chồi nách và chồi bất định trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của cây chuối [16]. Tầm quan trọng của BAP cũng được M.K. Biswas và cs (2007) [17] nhấn mạnh trong nghiên cứu nhân giống cây dâu tây, theo đó BAP có vai trò quan trọng trong quá trình tái sinh cây dâu tây. Kết quả tương tự cũng được báo cáo ở cây *Fragaria indica* Andr [18], đu đủ [19] và *Eucalyptus grandis* [20].

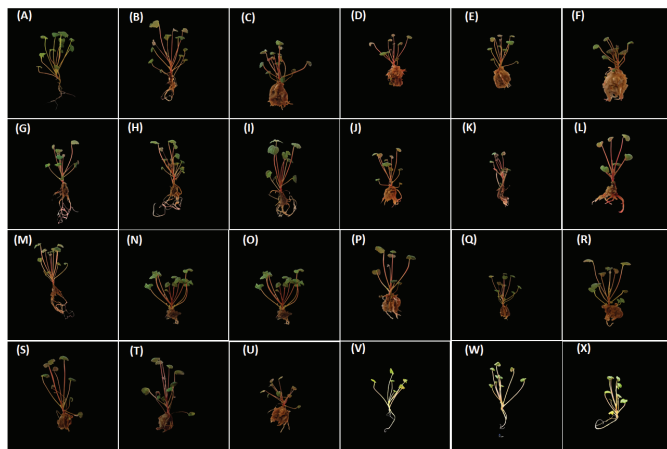
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BAP đến khả năng tạo rễ

Các chồi nhỏ sau 6 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường 1/2 MS có chứa nồng độ NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy có sự khác biệt đáng kể ở các công thức thí nghiệm (bảng 3). Ở công thức không bổ sung NAA và BAP, chiều cao cây đo được khoảng 5,3 cm, có 13,1 lá/cây, 7,6 rễ/mẫu và chiều dài rễ trung bình là 5,4 cm (bảng 3). Khi bổ sung NAA (0,1 đến 1,0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy, số rễ trung bình/mẫu tăng đáng kể, dao động 11,8-18,0 rễ/mẫu. Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ NAA có xu hướng làm giảm dần chiều dài rễ (2,2-6,1 rễ), chiều cao cây (2,6-4,7 cm) và số lá/cây (10,0-12,0 lá) so với không hoặc bổ sung nồng độ thấp NAA (0,1 mg/l). Ngoài ra, việc bổ sung NAA 0,3-1,0 mg/l còn tạo mô sẹo cao ở mẫu nuôi cấy (bảng 3, hình 3C-3F). Ở các công thức bổ sung riêng lẻ BAP (0,1-0,5 mg/l) cho thấy, mẫu nuôi cấy gia tăng về chiều cao cây, dao động 5,3-5,8 cm, cao hơn các công thức bổ sung riêng lẻ NAA hoặc kết hợp với NAA. Tuy nhiên, kết quả thống kê cũng cho thấy, số lá/cây, số rễ/mẫu lại thấp hơn đáng kể so với các công thức còn lại (bảng 3, Hình 3V-3X). Khi bổ sung kết hợp NAA với BAP cho thấy, môi trường 0,1 mg/l NAA kết hợp với BAP (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) được xem là phù hợp cho quá trình hình thành rễ và không hình thành mô sẹo ở giống dâu tây Mỹ thơm. Trong đó, kết hợp 0,1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BAP cho kết quả tốt nhất với chiều cao cây đạt 5,4 cm, 11,2 lá/cây, 12,6 rễ/mẫu và rễ dài 4,2 cm (bảng 3, hình 3I).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến quá trình hình thành rễ của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy.

NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Số rễ/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/cây (lá)	Chiều cao cây (cm)	Mô sẹo
0	0	7,6±1,2 ^{bc}	5,4±1,0 ^{bc}	13,1±1,6 ^{ab}	5,3±0,6 ^{abcd}	-
0,1	0	11,8±2,2 ^{bc}	6,1±3,0 ^b	12,0±1,2 ^{abcd}	4,7±1,1 ^{bcdefg}	-
0,3	0	18,0±7,4 ^a	3,7±0,6 ^{defg}	11,0±0,9 ^{bcdef}	3,9±0,6 ^{ghijk}	++
0,5	0	15,4±2,4 ^{ab}	2,6±1,0 ^{fg}	11,0±1,1 ^{bcdef}	3,3±0,8 ^{klm}	++
0,7	0	13,2±9,3 ^{bc}	2,4±0,4 ^g	12,2±1,3 ^{abc}	3,5±0,7 ^{ijkl}	++
1,0	0	12,6±2,7 ^{bc}	2,2±0,5 ^g	10,0±2,5 ^{defg}	2,6±1,0 ⁿ	++
0,1	0,1	14,4±2,3 ^{abc}	9,1±3,7 ^a	12,7±1,1 ^{abc}	4,8±1,0 ^{bcdef}	-
0,1	0,3	14,1±3,4 ^{abc}	8,0±2,6 ^a	11,9±2,0 ^{abcd}	4,6±1,0 ^{bcdefg}	-
0,1	0,5	12,6±2,0 ^{bc}	4,2±1,2 ^{bcdef}	11,2±1,9 ^{bcdef}	5,4±1,2 ^{ab}	-
0,3	0,1	15,4±2,5 ^{ab}	3,4±1,0 ^{fg}	11,1±1,1 ^{bcdef}	4,1±0,7 ^{ghijk}	-
0,3	0,3	13,7±6,0 ^{bc}	3,1±0,7 ^{fg}	11,1±3,9 ^{bcdef}	3,3±0,5 ^{klm}	-
0,3	0,5	13,4±6,0 ^{bc}	2,7±0,9 ^g	7,0±1,9 ^b	2,9±0,9 ^m	-
0,5	0,1	10,9±2,6 ^{cd}	8,7±3,7 ^a	13,3±1,4 ^a	4,7±0,6 ^{bcdefg}	+
0,5	0,3	12,1±2,0 ^{bc}	3,0±1,0 ^{fg}	12,0±3,9 ^{abcd}	4,9±1,0 ^{bcdef}	+
0,5	0,5	13,2±4,7 ^{bc}	2,2±0,5 ^g	10,6±0,9 ^{bcdefg}	3,5±0,7 ^{kl}	++
0,7	0,1	15,4±2,1 ^{ab}	2,9±0,6 ^{fg}	11,2±2,0 ^{bcdef}	3,9±0,8 ^{ghijk}	+
0,7	0,3	12,9±1,9 ^{bc}	2,8±0,8 ^g	12,4±1,7 ^{abc}	4,3±0,4 ^{efghij}	+
0,7	0,5	10,9±2,8 ^{cd}	2,9±0,9 ^{fg}	12,3±1,4 ^{abc}	4,4±0,9 ^{bcdefgh}	+
1,0	0,1	13,3±3,0 ^{bc}	2,2±0,6 ^g	11,7±1,2 ^{bcdef}	5,3±0,9 ^{abc}	+
1,0	0,3	16,2±3,4 ^{ab}	2,6±0,4 ^{fg}	11,3±1,7 ^{bcdef}	3,8±0,7 ^{ijkl}	+
1,0	0,5	13,2±4,1 ^{bc}	2,3±0,4 ^g	10,9±1,8 ^{bcdef}	2,4±1,1 ⁿ	++
0	0,1	6,7±1,7 ^c	4,5±0,8 ^{de}	8,9±1,3 ^e	5,8±0,9 ^a	-
0	0,3	5,8±1,0 ^c	4,1±1,0 ^{def}	9,2±1,2 ^e	5,7±1,0 ^a	-
0	0,5	5,3±1,5 ^c	5,1±1,1 ^{bcd}	9,8±1,6 ^{de}	5,3±1,3 ^{abcd}	-

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05; +: mô sẹo nhỏ; ++: mô sẹo to; -: không hình thành mô sẹo.



Hình 3. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến quá trình hình thành rễ của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Đối chứng; (B) 0,1 mg/l NAA; (C) 0,3 mg/l NAA; (D) 0,5 mg/l NAA; (E) 0,7 mg/l NAA; (F) 1 mg/l NAA; (G) 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (H) 0,1 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (I) 0,1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (J) 0,3 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (K) 0,3 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (L) 0,3 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (M) 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (N) 0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (O) 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (P) 0,7 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (Q) 0,7 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (R) 0,7 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (S) 1,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (T) 1,0 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (U) 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (V) 0,1 mg/l BAP; (W) 0,3 mg/l BAP; (X) 0,5 mg/l BAP.

M. Ikeuchi và cs (2013) [21] báo cáo rằng, việc bổ sung auxin và cytokinin ngoại sinh có thể cảm ứng tạo mô sẹo ở các loài thực vật khác nhau. Tuy nhiên, quá trình cảm ứng mô sẹo khi nồng độ auxin và cytokinin cân bằng nhau. Khi nồng độ auxin cao hơn cytokinin sẽ hình thành rễ, ngược lại sẽ tái sinh chồi.

Mẫu nuôi cấy bắt đầu hình thành rễ sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, nhưng cũng không hình thành mô sẹo. Số rễ trung bình trong môi trường cảm ứng tạo rễ là 14,4 rễ/mẫu và chiều dài rễ trung bình cao nhất là 9,1 cm được tìm thấy ở công thức 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP, trong khi đó, số lá trung bình/mẫu được tìm thấy cao nhất (13,3 lá) ở công thức 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP, chiều cao cây trung bình lớn nhất ở công thức 0,1 mg/l BAP (5,8 cm) (bảng 3).

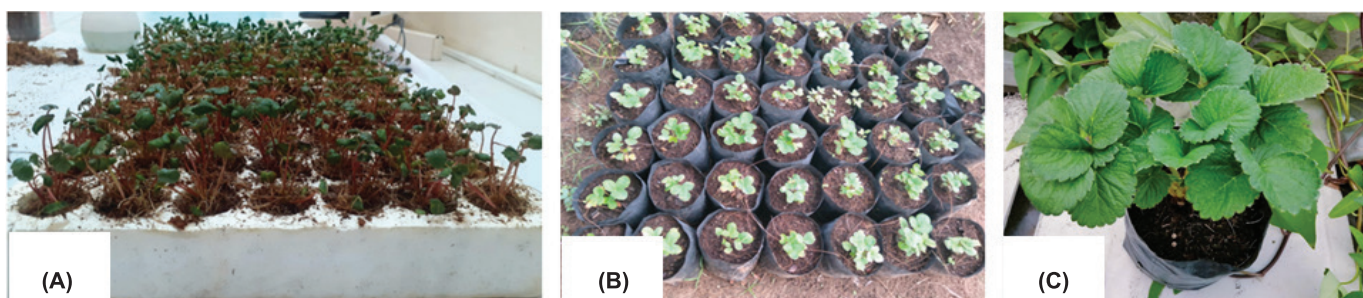
Kết quả nghiên cứu của I.D. Bhatt và cs (2000) [18] cho thấy, môi trường có chứa 1 µM NAA có khoảng 97% rễ được hình thành ở giống dâu tây Ấn Độ, đồng thời nồng độ NAA càng cao, số rễ hình thành càng ít. Tóm lại, trong môi trường có chứa BAP và NAA sẽ sản sinh ra mô sẹo, có thể gây ức chế sự kéo dài của rễ vì mô sẹo bao phủ chồi và ức chế sự hình thành rễ từ chồi.

Với môi trường không bổ sung auxin hoặc cytokinin, mẫu cấy trung bình có 7,6 rễ/mẫu, chiều dài trung bình rễ đạt 5,4, số lá trung bình 13,1 và chiều cao cây trung bình 5,3 cm. Tuy nhiên, số lá/cây không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với công thức có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP (bảng 3).

S.C. Debnath (2005) [22] cũng chỉ ra rằng, môi trường MS không có hormone tạo ra rễ thích hợp cho cây dâu tây ra ngó. Kết quả tương tự cũng tìm thấy trong nghiên cứu của A.Y. ElKichaoui (2014) [23], theo đó môi trường MS không chứa chất điều hoà sinh trưởng có thể tạo ra số lượng rễ, chiều dài rễ và chiều cao cây cao nhất.

3.4. Đánh giá khả năng sống của giống dâu tây Mỹ thơm

Cây con được nuôi cấy trong môi trường tạo rễ sau 8 tuần được chuyển ra ngoài để thuần cây. Sau 2 tuần thuần dưỡng trong giá thể có khoảng 64% mẫu cây sống và sinh trưởng. Cây con bắt đầu ra ngó sau 3 tháng ở nhà lưới và tiếp tục được theo dõi để đánh giá quá trình phát triển của cây (hình 4). Nghiên cứu của F. Haddadi và cs (2010) [14] cho thấy, giá thể chứa perlite, vermiculite và cocopeat (tỷ lệ 2:1:2 v/v/v) có 90% cây sống và khi được tưới với dung dịch Hoagland sẽ kích thích quá trình hình thành ngó. J.J. Medina và cs (2007) [24] cũng đã thành công thuần cây dâu tây con trong giá thể có chứa than bùn, đá trân châu (1:1 v/v) và giữ cây con trong màng polypropylene với 90% độ ẩm trong 3 tuần. Sau đó, cây con được chuyển sang chậu có chứa than bùn, đất cát và đá trân châu (7:2:1 v/v/v) trong 3 tuần tiếp theo.



Hình 4. Cây con dâu tây Mỹ thơm nuôi cấy mô được trồng bằng giá thể phân chuồng ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn dừa (1:1:1 v/v/v) (A); cây con được chuyển sang chậu lớn sau 6 tuần thuần dưỡng (B); cây con ra ngó sau 3 tháng (C).

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, ngó dâu tây Mỹ thơm được khử trùng trong 3% NaClO trong 20 phút cho hiệu quả tái sinh cao nhất và tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất; số chồi tái sinh tốt nhất được tìm thấy trên môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin với 16,2 chồi/mẫu. Chồi dâu tây Mỹ thơm tạo rễ tốt nhất trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP với 14,4 và giá thể phân chuồng được ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1 v/v/v) phù hợp cho quá trình ra ngó của giống dâu tây Mỹ thơm (64%). Tuy nhiên, để hoàn thiện quy trình nhân giống cần tiếp tục thử nghiệm các giá thể khác nhau như xơ dừa và phân hữu cơ để tối ưu quá trình ra ngó cho cây dâu tây Mỹ thơm.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Trà Vinh thông qua hợp đồng số 254/2021/HĐ.HĐKH&ĐT-DHTV. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.S. Nehra, K.K. Kartha, C. Stushnoff, et al. (1994), "Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars", *Euphytica*, **76**, pp.107-115, DOI: 10.1007/BF00024027.
- [2] S. Afrin, M. Gasparrini, P.R. Rodriguez, et al. (2016), "Promising health benefits of the strawberry: A focus on clinical studies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**(22), pp.4435-4449, DOI: 10.1021/acs.jafc.2c07828.
- [3] S. Karhu, K. Hakala (2002), "Micropropagated strawberries on the field", *Acta Hort.*, **567**, pp.321-324, DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.68.
- [4] R.R. Martin, I.E. Tzanetakis (2013), "High-risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: Implications for certification, nurseries, and fruit production", *Plant Disease*, **97**(10), pp.1358-1362, DOI: 10.1094/PDIS-09-12-0842-RE.
- [5] J.R. Thompson, W. Jelkman (2003), "The detection and variation of strawberry mottle virus", *Plant Disease*, **87**(4), pp.385-390, DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.4.385.
- [6] E. Seemüller, F. Merkle (1984), "Eliminierung von phytophthora fragariae durch meristemkultur", *Gartenbauwissenschaft*, **49**(5-6), pp.227-230.
- [7] R.G. Gonzales, K. Quiroz, B. Carrasco, et al. (2010), "Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges", *Cienc. Inv. Agr.*, **37**(3), pp.5-30.
- [8] E. Ambros, E.I. Chertenkova (2021), "Effect of antioxidants and growth regulators on shoot organogenesis in the apical meristem culture of *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier", *Proceedings of Universities Applied Chemistry and Biotechnology*, **11**(4), pp.549-560.
- [9] M. Ashrafuzzaman, S.M. Faisal, D. Yadav, et al. (2013), "Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture", *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, **38**(3), pp.467-472.
- [10] A.J. Passey, K. Barrett, D. James (2003), "Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types", *Plant Cell Rep.*, **21**(5), pp.397-401, DOI: 10.1007/s00299-002-0530-4.
- [11] K.A. Quiroz, M. Berrios, B. Carrasco, et al. (2017), "Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.)", *Biological Research*, **50**(1), DOI: 10.1186/s40659-017-0125-8.
- [12] S. Knyazev, M.V. Vinter (2021), "Fundamental and applied research in biology and agriculture: Current issues, achievements and innovations", *International Scientific and Practical Conference*, EDP Sciences, **254**, DOI: 10.1051/e3sconf/202125404004.
- [13] S.M. Jain, S.J. Ochatt (2010), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, Humana Press, **589**, 414pp, DOI: 10.1007/978-1-60327-114-1.
- [14] F. Haddadi, M. Abd Aziz, G. Saleh, et al. (2010), "Micropropagation of strawberry cv. Camarosa: Prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6- benzylamino-purine", *HortScience*, **45**(3), pp.453-456, DOI: 10.21273/HORTSCI.45.3.453.
- [15] L. Pauling (1955), "The stochastic method and the structure of proteins", *American Scientist*, **43**(2), pp.285-297.
- [16] P. Madhulatha, M. Anbalagan, S. Jayachandran, et al. (2004), "Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on *in vitro* propagation of banana (*Musa* spp. AAA)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **76**, pp.189-192, DOI: 10.1023/B:TICU.0000007291.31439.6c.
- [17] M.K. Biswas, M. Hossain, M.B. Ahmed, et al. (2007), "Multiple shoots regeneration of strawberry under various colour illuminations", *American - Eurasian Journal of Scientific Research*, **2**(2), pp.133-135.
- [18] I.D. Bhatt, U. Dhar (2000), "Micropropagation of Indian wild strawberry", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **60**, pp.83-88, DOI: 10.1023/A:1006471815566.
- [19] R.A. Cononer, R.E. Litz (1978), "In vitro propagation of papaya (*Carica papaya* L.)", *Hort. Sci.*, **13**, pp.241-242, DOI: 10.21273/HORTSCI.13.3.241.
- [20] L.L.D. Silva (1990), *In vitro Propagation of Adults Eucalyptus Grandis Hill Ex. Maiden from Epicormic Shoots*, Thesis, Universidade Federal De Vicos, 60pp.
- [21] M. Ikeuchi, K. Sugimoto, A. Iwase (2013), "Plant callus: Mechanisms of induction and repression", *The Plant Cell*, **25**(9), pp.3159-3173, DOI: 10.1105/tpc.113.116053.
- [22] S.C. Debnath (2005), "Strawberry sepal: Another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **41**, pp.671-676, DOI: 10.1079/IVP2005688.
- [23] A.Y. ElKichaoui (2014), "In vitro propagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through organogenesis via runner tips", *Ann. Pl. Sci.*, **3**(3), pp.619-627.
- [24] J.J. Medina, I. Clavero-Ramírez, M.E. Gonzalez-Benito, et al. (2007), "Field performance characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants derived from cryopreserved apices", *Sci. Hort.*, **113**(1), pp.28-32, DOI: 10.1016/j.scienta.2007.01.030.

Nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng (*Curcuma longa*) tại Hưng Yên trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Lê Thu Hương^{1,2}, Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh¹, Lê Thị Hoàng Yến¹, Đỗ Mai Linh¹

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/3/2023; ngày chuyển phản biện 24/3/2023; ngày nhận phản biện 17/4/2023; ngày chấp nhận đăng 20/4/2023

Tóm tắt:

Tình hình trồng và chế biến nghệ vàng (*Curcuma longa*) đang ngày càng được mở rộng, kéo theo đó là lượng lớn phụ phẩm bã nghệ vàng chưa được xử lý gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Nấm *Trichoderma* được coi là nguồn vi sinh vật xử lý phụ phẩm nông nghiệp hiệu quả do có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym ngoại bào cao. Trong nghiên cứu này, 15 chủng nấm *Trichoderma* được phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại tỉnh Hưng Yên, trong đó tuyển chọn được 4 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh tổng hợp cellulase, amylase và protease cao. Dựa trên các đặc điểm hình thái đặc trưng và trình tự gen vùng ITS rDNA, 3 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 được xác định thuộc loài *Trichoderma asperellum*, còn HYT14 thuộc loài *Trichoderma harzianum*. Cả 4 chủng nấm này đều có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên cơ chất bã nghệ vàng. Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định được điều kiện thích hợp cho sự hình thành bào tử của 4 chủng nấm, bao gồm môi trường dinh dưỡng chứa dịch chiết khoai tây (200 g/l) bổ sung 2% glucose, 1% pepton, 2% agar, nuôi 7 ngày ở 30°C. Như vậy, nghiên cứu đã tuyển chọn được 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.

Từ khóa: amylase, bã nghệ vàng, cellulase, *Curcuma longa*, protease, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây nghệ vàng thuộc họ gừng (*Zingiberaceae*), được trồng ở nhiều quốc gia khác nhau như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Việt Nam... có công dụng làm gia vị và nguyên liệu cho ngành dược. Đặc biệt, củ nghệ vàng được coi là nguồn nguyên liệu chủ yếu cho sản xuất curcumin - hoạt chất có nhiều ứng dụng trong y học như kháng ung thư, tác dụng điều trị với các bệnh tự miễn, thần kinh, tim mạch, tiểu đường [1]. Chính vì vậy, những năm gần đây diện tích trồng nghệ vàng liên tục được mở rộng. Tại Việt Nam, cây nghệ vàng được trồng tại nhiều tỉnh như Yên Bái, Đắk Lắk, Hưng Yên... Tại Hưng Yên, cây nghệ vàng được quy hoạch trồng nhiều tại huyện Khoái Châu với diện tích trồng nghệ vàng khoảng 300 ha, sản lượng hàng năm trên 9.000 tấn củ, tập trung ở các xã như Chí Tân, Tứ Dân... Việc phát triển các vùng trồng nghệ vàng đã hình thành nên các vùng nguyên liệu gắn liền với chế biến và tiêu thụ. Tuy nhiên, việc chế biến nghệ vàng chủ yếu diễn ra tại các cơ sở thu mua nhỏ với hoạt động chính là thu mua, sơ chế, nghiền củ để thu tinh bột nghệ vàng và curcumin. Củ nghệ vàng chứa khoảng 6,3% protein, 5,1% chất béo, 3,5% khoáng, 69,4% carbohydrat... Phụ phẩm trong quá trình sản xuất tinh bột nghệ vàng và curcumin thải ra rất lớn, đặc biệt là bã nghệ vàng. Nguồn phụ phẩm bã thải này chứa thành phần chủ yếu cellulose, tinh bột [2], chúng là nguy cơ gây ô nhiễm môi trường cao nếu nguồn bã thải này không được xử lý.

Việc ứng dụng vi sinh vật xử lý các nguồn phụ phẩm trong chế biến và sản xuất nông nghiệp thành phân hữu cơ vi sinh là biện pháp hiệu quả, không những tạo ra nguồn phân bón chất lượng cao

mà còn giải quyết được vấn đề dư thừa nguồn phụ phẩm gây ô nhiễm môi trường. Nhiều loài vi nấm đã được nghiên cứu sử dụng vào việc phân giải các chất hữu cơ làm phân bón, trong đó chỉ nấm *Trichoderma* được đánh giá là một chi nấm an toàn và có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym ngoại bào phân giải chất hữu cơ như cellulase, amylase, protease [3-5]. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* có hoạt tính sinh enzym ngoại bào cao dùng cho phân giải các loại phụ phẩm như rơm rạ, bã thải trồng nấm làm phân bón [6, 7]. Nguồn phân bón tạo ra đã được chứng minh có hiệu quả tốt khi bón cho giống Đậu xanh 208 [6], hiệu quả cao khi bón cho rau với năng suất rau tăng 20,34%, đặc biệt là tỷ lệ sâu bệnh giảm 15% [7]. Hơn nữa, đây là chi nấm có hoạt tính đối kháng với một số nấm gây bệnh cũng như kích thích sinh trưởng ở cây trồng [8].

Việc ứng dụng các chủng nấm *Trichoderma* trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng chưa có nhiều nghiên cứu đề cập. Trong củ nghệ vàng chứa nhiều curcumin và tinh dầu dẫn tới phần bã thải sau chế biến sẽ chứa một lượng nhất định các thành phần này. Curcumin và tinh dầu nghệ vàng là các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh [9, 10], do đó, điều kiện đầu tiên cần có đối với các chủng vi sinh vật dùng cho xử lý bã nghệ vàng là phải có khả năng sinh trưởng mạnh trên nguồn bã thải này. Hơn nữa, mục đích của việc tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* là dùng cho xử lý bã nghệ vàng làm phân bón sử dụng cho chính cây nghệ vàng tại các vùng trồng nghệ vàng chuyên canh, vì vậy đối tượng dùng để phân lập các chủng nấm là các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng khỏe

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Screening *Trichoderma* strains isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province for treating waste after turmeric processing

Xuan Tao Vu^{1*}, Thu Huong Le^{1,2}, Bao Tram Tran¹,
Ngoc Anh Dao¹, Thi Hoang Yen Le¹, Mai Linh Do¹

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, No. 25 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 21 March 2023; revised 17 April 2023; accepted 20 April 2023

Abstract:

The cultivation and processing of turmeric are developing, resulting in a large amount of turmeric waste causing serious environmental pollution. *Trichoderma* fungi are potential microbial sources for agricultural waste treatment thanks to their ability to synthesise several extracellular enzymes. In this study, 15 strains of *Trichoderma* were isolated from turmeric-growing soil in Hung Yen province. Among them, 4 strains, which were named HYT11, HYT12, HYT13, and HYT14, were found to have a high potential for synthesising cellulase, amylase, and protease enzymes. Based on morphological characteristics and ITS rDNA sequence analysis, 3 strains (HYT11, HYT12, and HYT13) were identified as *Trichoderma asperellum* and the strain HYT14 was identified as *Trichoderma harzianum*. All four strains showed the ability to grow and form conidia on turmeric waste. The study also determined the optimal conditions for the conidia formation of these strains, including a nutrient medium containing potato extract (200 g/l) supplemented with 2% glucose, 1% peptone, and 2% agar, and the cultivation of 7 days at 30°C. In summary, the research has selected four *Trichoderma* strains, HYT11, HYT12, HYT13, and HYT14, which are promising for application in treating turmeric waste.

Keywords: amylase, cellulase, *Curcuma longa*, protease, *Trichoderma*, turmeric waste.

Classification number: 4.6

manh. Đây là nghiên cứu khá mới với các kết quả bước đầu đánh giá được tiềm năng ứng dụng các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng sinh trưởng tốt được thu thập sử dụng cho phân lập các chủng nấm *Trichoderma*. Các mẫu được bảo quản trong túi nilon sạch. Sau khi thu thập, mẫu được đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập.

Mẫu bã nghệ vàng được thu thập tại một số cơ sở chế biến tinh bột nghệ vàng. Mẫu được bảo quản trong túi nilon sạch và lưu giữ ở 4°C.

Các mẫu đất và bã nghệ vàng được thu thập tại vùng chuyên canh và chế biến nghệ vàng ở xã Chí Tân, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên. Thời gian thu mẫu từ tháng 1 đến tháng 6/2022.

2.2. Phân lập và xác định đặc điểm hình thái các chủng nấm *Trichoderma*

Các mẫu đất thu thập được tiến hành pha loãng ở các nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁵ bằng nước cất đã khử trùng. Cây trái các mẫu đã pha loãng trên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (100 µg/ml) để ức chế vi khuẩn. Các đĩa được nuôi ở 28°C trong 3-5 ngày để thu nhận các khuẩn lạc nấm riêng rẽ. Các khuẩn lạc có các đặc trưng như sợi nấm màu trắng, bào tử có màu xanh hoặc xanh vàng được tách riêng, nuôi cấy thuần khiết và giữ trong ống nghiệm thạch nghiêng PDA. Hình thái hệ sợi nấm và cường độ sinh bào tử của mỗi chủng nấm được xác định bằng cách nuôi cấy trực tiếp mỗi chủng nấm trên bề mặt tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa sẵn môi trường PDA trong 2-3 ngày ở 28°C và quan sát dưới kính hiển vi [11].

2.3. Thu bào tử nấm

Các chủng nấm *Trichoderma* được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25-28°C sau 3-5 ngày để thu bào tử nấm. Quy trình thu bào tử nấm *Trichoderma* được tiến hành theo T.X. Vu và cs (2018) [11]. Nồng độ của dịch bào tử được xác định bằng buồng đếm Thoma.

2.4. Đánh giá khả năng sinh cellulase, amylase và protease của các chủng nấm phân lập

Các chủng nấm *Trichoderma* được tiến hành lên men xốp để thu dịch enzym thô theo V.H. Vu và cs (2011) [12] có cải tiến. Môi trường lên men xốp bao gồm: 5 g vỏ trấu, 0,2% chất cảm ứng (Carboxymethyl cellulose - CMC, tinh bột, sữa gầy) và bổ sung 10 ml nước cất chứa trong hộp nhựa hình trụ (650 ml và đường kính 9 cm) được khử trùng. Mỗi hộp môi trường được cấy 1 ml dịch bào tử nấm (10⁶ bào tử/ml) và tiến hành nuôi ở 30°C. Sau 3 ngày nuôi, bổ sung 10 ml nước cất, lắc đều và thu phần dịch enzym thô. 50 µl dịch enzym thô được nhỏ vào giếng đã đục sẵn trên môi trường thạch chứa 1% cơ chất tương ứng. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ để dịch enzym khuếch tán và ủ tiếp 12 giờ ở 30°C. Sử dụng dung dịch Lugol để hiện vòng phân giải đối với dịch cellulase và amylase thô [13].

Xác định hoạt độ cellulase và amylase trong dịch enzym thô theo quy trình của G.L. Miller (1959) [14], hoạt độ protease được xác định theo M.L. Anson (1938) [15].

2.5. Định danh các chủng nấm *Trichoderma* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA

Các chủng nấm được tiến hành nuôi cấy trong môi trường PDB ở 28-30°C trong 3 ngày để thu hệ sợi nấm dùng cho tách chiết DNA tổng số. DNA tổng số của các chủng nấm được tách chiết theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [16]. Vùng ITS rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA tổng số mỗi chủng nấm bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGC-GG)/ITS4 (TCC TCCGCTTATTGATATGC) [17]. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,7%, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch DNA của Hãng Promega (Mỹ). Mẫu DNA thu được sau tinh sạch được tiến hành giải trình tự tại Công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự gen sau khi giải được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank (NCBI). Phần mềm MEGA6 được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài [18].

2.6. Đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng

Thí nghiệm được bố trí trong các hộp nhựa có nắp đậy, hình trụ (650 ml), mỗi hộp chứa 100 g môi trường gồm bã nghệ vàng và 1% ri đường, độ ẩm môi trường đạt 80-85%. Các hộp chứa môi trường được chia làm 2 lô thí nghiệm, gồm lô không khử trùng và lô khử trùng. Tiến hành cấy 1 ml dịch bào tử (10^6 bào tử/ml) mỗi chủng nấm *Trichoderma* đều lên bề mặt môi trường. Các hộp ở 2 lô thí nghiệm được ủ ở 30°C trong 10 ngày. Tiến hành quan sát sự sinh trưởng của các chủng nấm ở cả 2 lô thí nghiệm, xác định mật độ bào tử nấm bằng phương pháp pha loãng môi trường sau 10 ngày ủ và cấy trải trên môi trường TSM (môi trường chọn lọc cho nấm *Trichoderma*) [19, 20]. Đồng thời trước khi cấy nấm, môi trường ở 2 lô thí nghiệm (khử trùng và không khử trùng) được tiến hành xác định hàm lượng curcuminoid và tinh dầu. Hàm lượng curcuminoid (gồm các loại curcumin I, II, III) được xác định bằng phương pháp quang phổ UV theo S. Revathy và cs (2016) [21]. Hàm lượng tinh dầu được xác định theo phương pháp chưng cất lôi kéo hơi nước trên hệ thống Clevenger [22].

2.7. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự hình thành bào tử đối với các chủng nấm *Trichoderma*

Điều kiện nuôi cấy tối ưu đối với mỗi chủng nấm *Trichoderma* được xác định bằng cách so sánh mật độ bào tử nấm thu được của mỗi chủng nấm ở các điều kiện khác nhau. $10 \mu\text{l}$ dịch bào tử mỗi chủng nấm (10^6 bào tử/ml) được cấy vào giữa đĩa môi trường (đĩa petri Ø9) và nuôi ở các điều kiện thử nghiệm, sau đó bổ sung 15 ml nước cất đã khử trùng lên mỗi đĩa để thu dịch bào tử. Quá trình thu bào tử nấm *Trichoderma* được tiến hành theo quy trình của T.X. Vu và cs (2018) [11]. Mật độ bào tử nấm được xác định bằng cách đếm trên buồng đếm Thoma. Các điều kiện tối ưu bao gồm: nguồn cacbon (môi trường PDA được thay thế nguồn cacbon (glucose) lần lượt là sucrose, maltose, glucose, lactose và tinh bột với lượng thay thế là 2%, điều kiện nuôi là 25°C trong 5 ngày); hàm lượng nguồn cacbon là 1, 2, 3 và 4%; nguồn nitơ là pepton, cao nấm men, bột

đậu tương với hàm lượng 1%; hàm lượng nguồn nitơ là 0,25, 0,5, 1 và 2%; nhiệt độ nuôi cấy là 25, 30 và 35°C; thời gian nuôi cấy là 5, 7, 10 và 12 ngày.

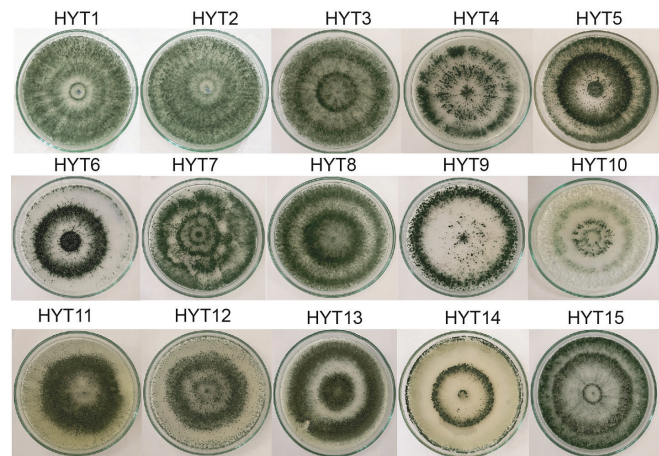
2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

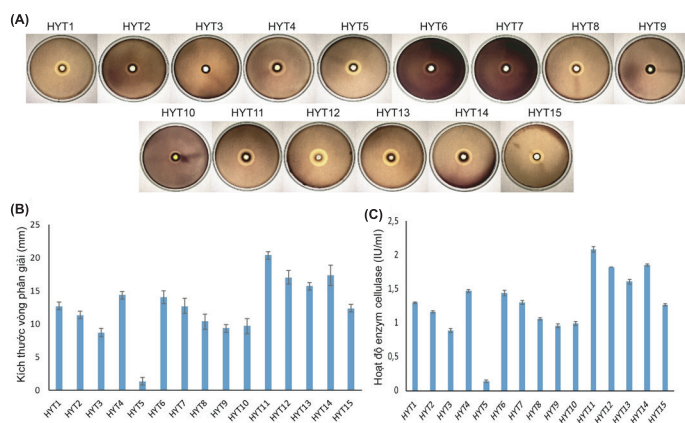
3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* sinh cellulase, amylase và protease cao

Từ các mẫu đất thu thập, 15 chủng nấm có đặc điểm hình thái giống với nấm *Trichoderma* đã được phân lập. Trên môi trường thạch PDA, sau 5 ngày ở 28°C, hệ sợi của các chủng nấm đã phát triển thành các vòng đồng tâm, lan phủ toàn bộ bề mặt đĩa thạch, trên hệ sợi nấm hình thành bào tử màu xanh nhạt tới đậm (hình 1). Đây là các đặc điểm điển hình của chi nấm *Trichoderma* [23].

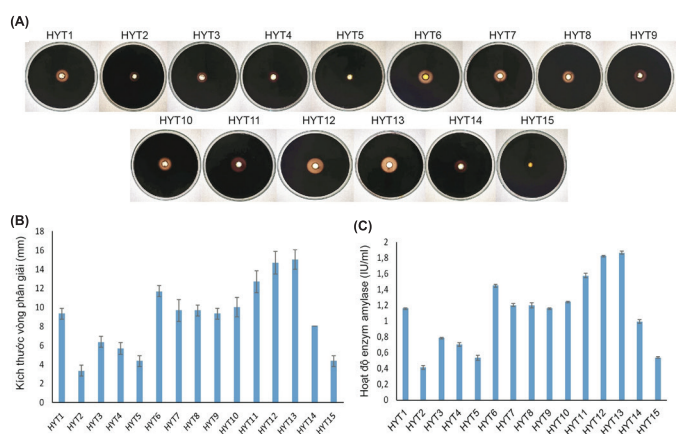


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng nấm có đặc điểm hình thái giống *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng trên môi trường PDA.

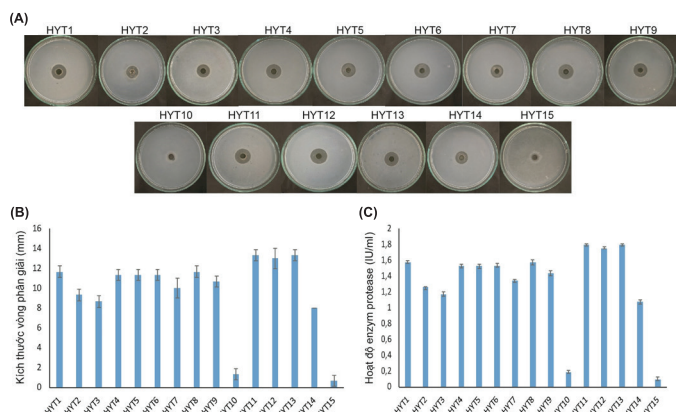
Kết quả xác định kích thước vòng phân giải cơ chất CMC và hoạt độ cellulase cho thấy, 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh cellulase mạnh nhất (hình 2). Tương tự, nghiên cứu này cũng cho thấy, 3 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 có khả năng sinh tổng hợp mạnh amylase và protease (hình 3 và 4). Nấm *Trichoderma* đã được chứng minh có khả năng sinh một số enzym ngoại bào cao như cellulase, amylase, protease [3-5]. Nghiên cứu này nhằm tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* xử lý nguồn bã nghệ vàng làm phân bón hữu cơ vi sinh cho chính cây nghệ vàng. Do đó, việc có được các chủng nấm *Trichoderma* bản địa từ đất vùng rễ cây nghệ vàng là định hướng ưu tiên. Trong khi đó, các nghiên cứu tuyển chọn chủng nấm *Trichoderma* từ đất vùng rễ cây nghệ vàng có khả năng sinh enzym ngoại bào cao chưa được thực hiện. Vì vậy, với kết quả nghiên cứu đạt được, 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 được lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Khả năng sinh cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% CMC; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ cellulase.



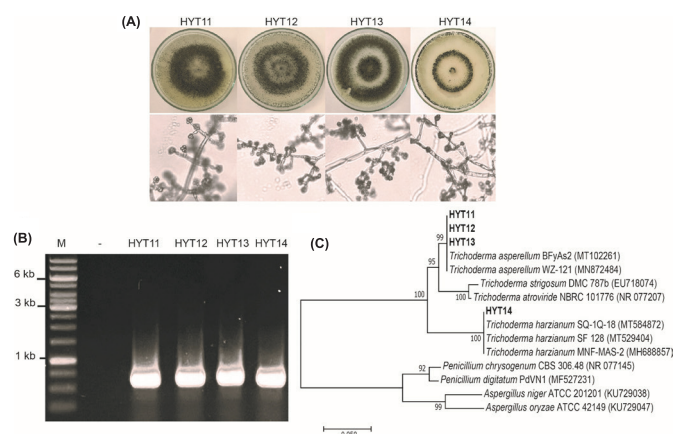
Hình 3. Khả năng sinh amylase của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% tinh bột; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ amylase.



Hình 4. Khả năng sinh protease của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% sữa gầy; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ protease.

3.2. Định danh các chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *HYT14* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS rDNA

Để đảm bảo độ chính xác tới loài cho 4 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *HYT14* dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý bã thải nghệ vàng làm phân bón, 4 chủng nấm này được định danh tới loài dựa vào các đặc điểm về hình thái kết hợp với trình tự vùng ITS rDNA. Trình tự vùng ITS (gồm ITS1, 5,8S rRNA, ITS2) được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm do đây là vùng trình tự có mức độ biến đổi cao khi so sánh giữa các loài gần gũi [24]. Trên môi trường PDA, hệ sợi của 4 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13*, *HYT14* đều hình thành và phát triển thành các vòng đồng tâm, lan phủ toàn bộ bề mặt đĩa thạch, trên hệ sợi nấm hình thành bào tử màu xanh nhạt tới đậm. Hệ sợi các chủng nấm có cấu trúc phân nhánh, trên cuống sinh bào tử hình thành các bào tử hình chai đặc trưng của chi nấm *Trichoderma* [23] (hình 5A). DNA tổng số của 4 chủng nấm trên được tiến hành tách chiết từ hệ sợi nấm dùng cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự vùng ITS rDNA với cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4. Kết quả khuếch đại vùng ITS rDNA của 4 chủng nấm chỉ cho 1 băng DNA duy nhất, có kích thước khoảng hơn 500 bp (hình 5B). Kết quả phân tích cho thấy, 3 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* thuộc loài *T. asperellum*, chủng nấm *HYT14* thuộc loài *T. harzianum* với độ tương đồng về trình tự ITS rDNA 99-100% (hình 5C). Theo các nghiên cứu đã công bố [8, 23] và hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học, 2 loài nấm *T. asperellum* và *T. harzianum* được xếp vào mức độ an toàn cấp 1, được sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho cây trồng.

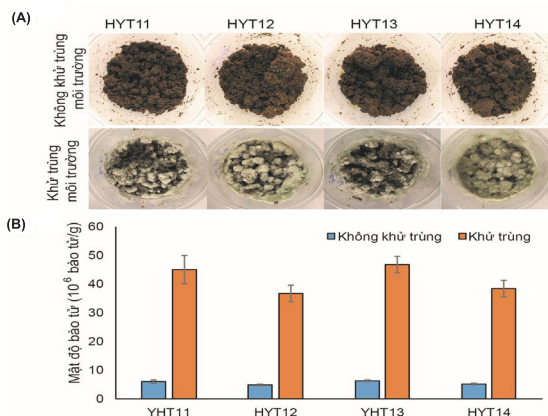


Hình 5. Định danh các chủng nấm *Trichoderma* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS rDNA. (A) Hình thái hệ sợi, cấu trúc sinh bào tử; (B) Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR vùng ITS rDNA; (C) Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng ITS rDNA, M: 1 kb DNA marker.

3.3. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng

Bốn chủng nấm tuyển chọn *T. asperellum* *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *T. harzianum* *HYT14* là những chủng nấm có hoạt tính sinh các enzym ngoại bào cao như cellulase, amylase, protease. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng các chủng nấm này trong xử lý bã nghệ vàng thì điều kiện đầu tiên cần có là các chủng nấm này phải có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng.

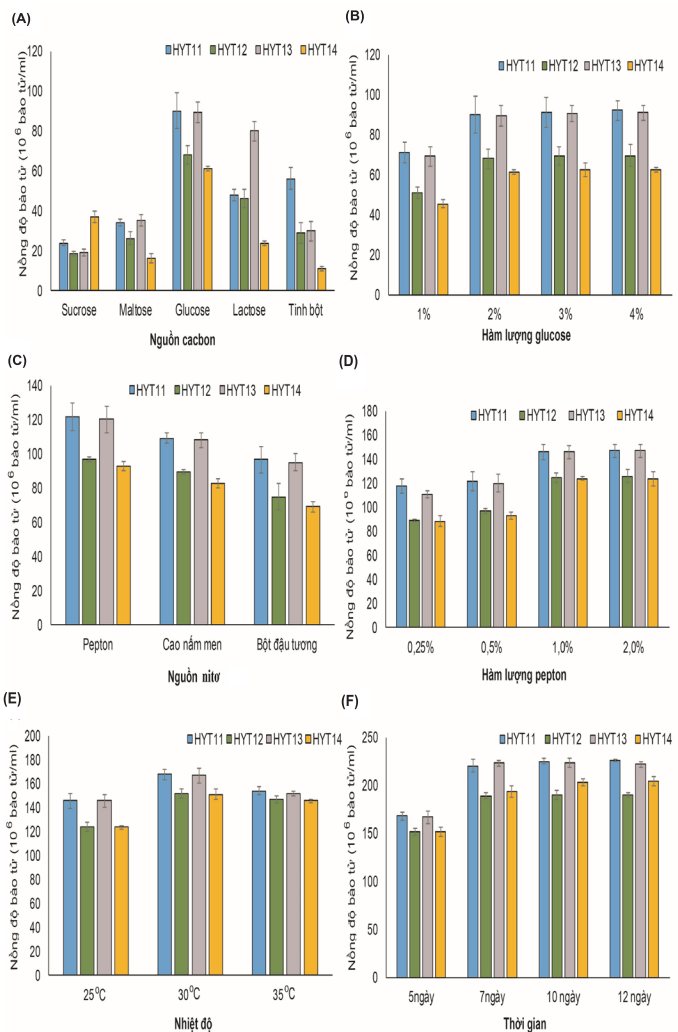
năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng. Trong nghiên cứu này, 4 chủng nấm *Trichoderma* tuyển chọn được đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng có bổ sung 1% ri đường. Ri đường là thành phần thường được bổ sung vào các công thức ủ các loại phụ phẩm làm phân bón nhằm cung cấp nguồn cacbon ban đầu cho vi sinh vật phát triển, lượng ri đường bổ sung thường là 1-5% [25, 26]. Kết quả cho thấy, cả 4 chủng nấm đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa bã nghệ vàng chưa khử trùng, sau 10 ngày nuôi cấy hệ sợi nấm đã xuất hiện trên bề mặt môi trường (hình 6A). Mật độ bào tử trung bình của 4 chủng nấm *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 trên môi trường bã nghệ vàng không khử trùng đạt tương ứng là 6×10^6 , $4,8 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$ và $5,2 \times 10^6$ bào tử/g (hình 6B). Hơn nữa, trên môi trường đã khử trùng, các chủng nấm sinh trưởng rất mạnh, hệ sợi nấm bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường sau 10 ngày nuôi cấy (hình 6A). Mật độ bào tử trung bình của 4 chủng nấm thử nghiệm trên môi trường bã nghệ vàng đã khử trùng sau 10 ngày đạt tương ứng là 45×10^6 , 37×10^6 , 47×10^6 và 38×10^6 bào tử/g. Kết quả này bước đầu cho thấy, việc xử lý nhiệt (khử trùng) bã nghệ vàng sẽ tạo điều kiện cho sự phát triển của nấm *Trichoderma*. Đồng thời trong nghiên cứu này, các mẫu môi trường bã nghệ vàng (không khử trùng và khử trùng) trước khi cấy nấm đã được xác định hàm lượng curcuminoid và tinh dầu, đây là các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh [8, 9]. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng curcuminoid trong mẫu không khử trùng và khử trùng không có sự chênh lệch nhiều, hàm lượng tương ứng là 0,022 và 0,02%. Trong khi đó, việc khử trùng môi trường đã làm bay hơi hết tinh dầu, cụ thể trong môi trường chưa khử trùng lượng tinh dầu được xác định là 0,5%, trong khi đó môi trường bã nghệ vàng khử trùng tinh dầu đã không còn. Kết quả này có thể cho thấy, bã nghệ vàng nếu được xử lý nhiệt thích hợp thì tiềm năng hiệu quả xử lý bằng nấm *Trichoderma* sẽ cao hơn. Tuy nhiên, vấn đề này cần được nghiên cứu sâu hơn để xác định được phương pháp xử lý nhiệt hiệu quả và phù hợp với thực tế. Với kết quả đạt được cho thấy, cả 4 chủng *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 đều có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã nghệ vàng.



Hình 6. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng. (A) Các chủng nấm sinh trưởng trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng; (B) Khả năng hình thành bào tử sau 10 ngày nuôi cấy.

3.4. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hình thành bào tử đối với các chủng nấm *Trichoderma*

Mật độ bào tử là thông số quan trọng hàng đầu đối với việc sản xuất chế phẩm nấm *Trichoderma*. Trong khi đó, môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy... là các yếu tố quan trọng, ảnh hưởng tới khả năng hình thành bào tử ở nấm *Trichoderma* [27]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng nấm *Trichoderma* hình thành bào tử mạnh nhất trên môi trường với nguồn cacbon là 2% glucose, nguồn nitơ là 1% pepton và nuôi ở 30°C trong 7 ngày (hình 7). Ở điều kiện nuôi cấy thích hợp với môi trường gồm dịch chiết khoai tây 200 g/l, glucose 2%, 1% pepton và agar 2%, nuôi ở 30°C trong 7 ngày, lượng bào tử thu được của 4 chủng *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 lần lượt là 220×10^6 , 189×10^6 , 222×10^6 và 193×10^6 bào tử/ml. Các điều kiện nuôi cấy này sẽ là cơ sở khoa học quan trọng để thiết lập quy trình sản xuất bào tử 4 chủng nấm trên ở quy mô sản xuất để tạo chế phẩm xử lý nguồn bã thải sau chế biến nghệ vàng.



Hình 7. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy tới khả năng hình thành bào tử các chủng nấm *Trichoderma*. (A) Nguồn cacbon; (B) Hàm lượng glucose; (C) Nguồn nitơ; (D) Hàm lượng pepton; (E) Nhiệt độ; (F) Thời gian.

4. Kết luận

Từ các mẫu đất trồng nghệ vàng tại tỉnh Hưng Yên đã phân lập được 15 chủng nấm *Trichoderma*, trong đó 4 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh tổng hợp cellulase, amylase, protease cao. Dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự gen vùng ITS rDNA, 3 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 được xác định thuộc loài *T. asperellum*, chủng nấm HYT14 thuộc loài *T. harzianum*. Tất cả 4 chủng nấm này đều có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên cơ chất bã nghệ vàng trong điều kiện phòng thí nghiệm. Điều kiện thích hợp cho sự hình thành bào tử của 4 chủng nấm *Trichoderma* bao gồm, môi trường dinh dưỡng chứa dịch chiết khoai tây (200 g/l) bổ sung 2% glucose, 1% pepton, 2% agar, nuôi 7 ngày ở 30°C. 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã nghệ vàng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN cấp tỉnh Hưng Yên và sự hỗ trợ về trang thiết bị của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Kocaadam, N. Şanlıer (2017), "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**(13), pp.2889-2895, DOI: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- [2] A. Kumar, J. Dora, A. Singh (2011), "A review on spice of life *Curcuma longa* (turmeric)", *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, **2**(4), pp.371-379.
- [3] P. Liu, A. Lin, G. Zhang, et al. (2019), "Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT-C30 by comparative genomic screening", *Microbial Cell Factories*, **18**(1), pp.1-16, DOI: 10.1186/s12934-019-1131-z.
- [4] W.H. Abdulaal (2018), "Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*", *BMC Biochemistry*, **19**(1), pp.1-6, DOI: 10.1186/s12858-018-0094-8.
- [5] L. Kredics, Z. Antal, A. Szekeres, et al. (2005), "Extracellular proteases of *Trichoderma* species", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **52**(2), pp.169-184, DOI: 10.1556/amicro.52.2005.2.3.
- [6] T.T. Le (2012), "Selection of *Trichoderma* spp. strongly decompose cellulose to produce microbial organic fertilizer and study their effects on green bean variety 208 in the spring 2011 crop at Huong Long cooperative, Hue city", *Journal of Science, Hue University*, **17**(2), pp.203-214 (in Vietnamese).
- [7] N.T. Minh (2016), "Research on treatment of mushroom by-products as safe organic substrate for growing vegetables", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **14**(11), pp.1781-1788 (in Vietnamese).
- [8] M. Verma, S.K. Brar, R.D. Tyagi, et al. (2007), "Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control", *Biochemical Engineering Journal*, **37**(1), pp.1-20, DOI: 10.1016/j.bej.2007.05.012.
- [9] Y. Hussain, W. Alam, H. Ullah, et al. (2022), "Antimicrobial potential of curcumin: Therapeutic potential and challenges to clinical applications", *Antibiotics*, **11**(3), pp.322-343, DOI: 10.3390/antibiotics11030322.
- [10] Z. Parveen, S. Nawaz, S. Siddique, et al. (2013), "Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Curcuma longa* L. Kasur variety", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**(1), pp.117-122, DOI: 10.4103/0250-474X.113544.
- [11] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, et al. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.
- [12] V.H. Vu, T.A. Pham, K. Kim (2011), "Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid-state fermentation", *Mycobiology*, **39**(1), pp.20-25, DOI: 10.4489/MYCO.2011.39.1.020.
- [13] P. Yang, H. Zhang, L. Cao, et al. (2016), "Construction of *Aspergillus niger* integrated with cellulase gene from *Ampullaria gigas* Spix for improved enzyme production and saccharification of alkaline-pretreated rice straw", *3 Biotech*, **6**(2), pp.1-10, DOI: 10.1007/s13205-016-0545-0.
- [14] G.L. Miller (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, **31**(3), pp.426-428, DOI: 10.1021/ac60147a030.
- [15] M.L. Anson (1938), "The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin", *The Journal of General Physiology*, **22**(1), pp.79-89, DOI: 10.1085/jgp.22.1.79.
- [16] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.
- [17] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322.
- [18] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al. (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- [19] Y. Elad, I. Chet, Y. Henis (1981), "A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil", *Phytoparasitica*, **9**, pp.59-67, DOI: 10.1007/BF03158330.
- [20] N.T. Phuong (2018), "Producing and evaluating the effectiveness of microbial organic fertilizer from wastewater sludge from beer factories and seafood processing factories on vegetable productivity", *Journal of Science, University of Science and Technology, Can Tho University*, **54**, pp.81-89 (in Vietnamese).
- [21] S. Revathy, S. Elumalai (2016), "Evaluation of curcuminoids in turmeric rhizome (*Curcuma longa* L.) collected from different places in India", *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **8**(1), pp.259-264.
- [22] T.B. Tram (2022), "Chemical composition and ability to resist *Malassezia* fungus that causes disease on human skin of tulsi essential oil (*Ocimum sanctum* L.) grown in Hanoi", *Journal of Science and Technology Vietnam - MOST*, **64**(5), pp.26-30 (in Vietnamese).
- [23] L. Li, Q. Qu, B. Tian, et al. (2005), "Induction of chlamydoconidia in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* C2", *Journal of Phytopathology*, **153**(11-12), pp.686-693, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2005.01038.x.
- [24] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, et al. (1994), "Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data", *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80478-4.
- [25] D.D. Hieu, L.C.N. Phuong, V.T.K. Thanh, et al. (2012), "Production of bio-organic fertilizer from sawdust waste after mushroom harvest and livestock waste", *Journal of Biology*, **34**(3), pp.154-160 (in Vietnamese).
- [26] T.T. Lua, N.T. Nguyet, N.V. Hiep, et al. (2021), "Isolation and selection of microbial strains used for treating pangasius sludge as organic fertilizer", *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, **4**(125), pp.124-130.
- [27] S. Sachdev, A. Singh, R.P. Singh (2018), "Optimization of culture conditions for mass production and bio-formulation of *Trichoderma* using response surface methodology", *3 Biotech*, **8**(8), pp.360-367, DOI: 10.1007/s13205-018-1360-6.

Nghiên cứu điều kiện chế biến nước uống lên men từ măng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV002

Đoàn Thị Kiều Tiên¹, Đỗ Thị Tuyết Nhung¹, Đặng Thị Hồng Diệu¹,
Nguyễn Ngọc Thanh², Huỳnh Thị Ngọc Mi¹, Huỳnh Xuân Phong^{2*}

¹Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ, 256 Nguyễn Văn Cừ, phường An Hoà, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/9/2021; ngày chuyển phản biện 30/9/2021; ngày nhận phản biện 25/10/2021; ngày chấp nhận đăng 28/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát điều kiện thích hợp lên men nước măng cầu xiêm bằng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV200 để góp phần đa dạng hóa sản phẩm từ trái măng cầu xiêm. Các tỷ lệ pha loãng dịch quả với nước lần lượt là 1:1, 1,5:1 và 2:1 được lựa chọn để khảo sát tỷ lệ pha loãng thích hợp cho quá trình lên men. Bên cạnh đó, các điều kiện lên men như hàm lượng chất khô hòa tan (19, 22 và 25°Brix), pH (4,0, 4,5 và 5,0), tỷ lệ nấm men (0,01, 0,02 và 0,03% w/v) và thời gian lên men (24, 48 và 72 giờ) cũng được khảo sát cho quy trình lên men nước măng cầu xiêm. Nghiên cứu đã xác định được nước măng cầu xiêm với tỷ lệ pha loãng 1,5:1 và lên men ở nhiệt độ thường với các điều kiện thích hợp là pH 4,5, hàm lượng chất khô hòa tan 22°Brix, tỷ lệ nấm men bổ sung 0,02% với 48 giờ lên men. Sản phẩm sau lên men được đánh giá cảm quan khá với 17,92 điểm theo TCVN 3215-79. Sản phẩm có hàm lượng đường tổng và acid tổng lần lượt là 15,15% và 0,42 g/100 ml, hàm lượng ethanol đạt 5,1% v/v và các chỉ tiêu vi sinh vật đạt theo QCVN 6-2:2010/BYT.

Từ khóa: *Annona muricata* L., măng cầu xiêm, nấm men, nước uống lên men, *Saccharomyces cerevisiae*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Măng cầu xiêm là loại trái cây thơm ngon, giá trị dinh dưỡng cao, có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh rất tốt và giúp tăng cường hệ miễn dịch của cơ thể [1]. Măng cầu xiêm được trồng rộng rãi từ khu vực đông nam Trung Hoa đến Úc, những vùng đông và tây châu Phi. Ngày nay, măng cầu xiêm được trồng nhiều ở khu vực Đông Nam Á và một số đảo ở Thái Bình Dương [2]. Ở Việt Nam, diện tích trồng măng cầu xiêm rất lớn ở các tỉnh, thành phố như Tiền Giang, Hậu Giang, Đồng Tháp, Sóc Trăng, Cần Thơ... [2, 3]. Cây măng cầu xiêm cho trái quanh năm, tuy nhiên thời gian bảo quản trái chín khá ngắn, chỉ vài ngày sau khi chín. Nếu trái quá chín sẽ bị mềm, thâm đen và rất dễ dập nát, không còn tiêu thụ được ở dạng trái tươi [4]. Đã có nhiều nghiên cứu về chế biến các sản phẩm khác nhau từ trái măng cầu xiêm như làm mứt, sấy khô, kem, siro, rượu vang..., bên cạnh đó sản xuất nước măng cầu xiêm lên men cũng là cách giúp sử dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu này. Hơn nữa, đồ uống lên men cũng góp phần quan trọng trong chế độ ăn uống của con người. Việc phát triển các sản phẩm nước ép lên men cũng là kỹ thuật để bảo quản cùng với việc nâng cao giá trị dinh dưỡng và cảm quan của thực phẩm [5]. Việc nghiên cứu tận dụng nguồn nguyên liệu vào quy trình chế biến nước măng cầu xiêm lên men sẽ góp phần giải quyết vấn đề đầu ra cho loại trái cây này, tạo sản phẩm mới bổ dưỡng, đồng thời đáp ứng nhu cầu đa dạng hóa sản phẩm đồ uống trên thị trường.

*Tác giả liên hệ: Email: hxphong@ctu.edu.vn

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Măng cầu xiêm: Trái măng cầu xiêm được thu mua tại vườn ở thị xã Ngã Năm, tỉnh Sóc Trăng. Lựa chọn quả chín mềm đều, không bị sượng cứng, có thể sử dụng những trái đã chín nhiều, bị dập nhưng không hư hỏng và sâu bệnh.

Nguyên liệu măng cầu xiêm sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm được rửa sạch, bóc vỏ, bỏ hạt và ép lấy dịch quả. Bổ sung enzyme pectinase 0,1% w/v, ủ trong bể điều nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong 90 phút, sau đó tiến hành lọc thu hồi dịch quả [6].

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV200: Sản phẩm thương mại ứng dụng trong lên men rượu vang (Angel Yeast). Nấm men được hoạt hóa bằng nước ấm ở nhiệt độ khoảng 30-40°C trong 15 phút trước khi tiến hành thí nghiệm.

Đường saccharose: Sản phẩm của Công ty Cổ phần đường Biên Hòa (độ tinh khiết 99,8%).

Hóa chất: Sodium hydroxide, sodium hydrogen sunfite, acid citric 10%, acid clohydric, acid oxalic 1%, glucose, dinitrosalicylic acid (DNS), phenolphthalein 0,1%, 2,6 dichlorophenolindophenol được sản xuất tại Trung Quốc.

Study on the appropriate conditions of the soursop (*Annona muricata* L.) juice fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* RV002

Thi Kieu Tien Doan¹, Thi Tuyet Nhung Do¹,
Thi Hong Dieu Dang¹, Ngoc Thanh Nguyen²,
Thi Ngoc Mi Huynh¹, Xuan Phong Huynh^{2*}

¹Can Tho University of Technology,
256 Nguyen Van Cu Street, An Hoa Ward, Ninh Kieu District, Campus, Can Tho City, Vietnam

²Can Tho University,
3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 28 September 2021; revised 25 October 2021; accepted 28 October 2021

Abstract:

This study aims to survey the appropriate conditions of fermented soursop juice using *Saccharomyces cerevisiae* RV200, contributing to diversify the soursop products. The dilution ratios of juice and water (1:1, 1.5:1, and 2:1) were performed to determine the suitable dilution of soursop juice. Besides, the initial fermentation conditions such as total solid contents (19, 22, and 25°Brix), pH (4.0, 4.5, and 5.0), the yeast contents (0.01, 0.02, and 0.03% w/v), and the fermentation time (24, 48, and 72 hours) were also investigated for fermented soursop juice. The results determined the soursop juice with the ratio of 1.5:1 fermented at room temperature with the appropriate conditions was pH 4.5, 22°Brix, and 0.02% yeast content in 48 hours of fermentation time. The final product had an ethanol content of 5.1% v/v, the total sugar content and total acid of 15.15% and 0.42 g/100 ml, respectively. The final product had good sensory with the score of 17.92 according to TCVN 3215-79 and the microbiological criteria meet the requirement of QCVN 6-2:2010/BYT.

Keywords: *Annona muricata* L., fermented juice, *Saccharomyces cerevisiae*, soursop, yeast.

Classification number: 4.6

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Quy trình tổng quát chế biến nước quả măng cầu xiêm lên men: Quy trình tổng quát như sau: Măng cầu xiêm → xử lý sơ bộ → ép → ủ enzym pectinase → lọc → pha loãng dịch quả → điều chỉnh °Brix và pH → thanh trùng bằng NaHSO₃ → lên men → lọc → thanh trùng (75°C/10 phút) → sản phẩm.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng dịch quả với nước đến quá trình chế biến nước măng cầu xiêm lên men: Pha loãng dịch quả măng cầu xiêm và nước cất ở các tỷ lệ tương ứng theo khối lượng lần lượt là 1:1, 1,5:1 và 2:1. Điều chỉnh dịch quả đạt hàm lượng chất khô hòa tan ở 22°Brix (bổ sung đường saccharose) và pH 4,5 (sử dụng acid citric và Na₂CO₃). Sau đó, bổ sung NaHSO₃ (140 mg/l), khuấy đều và để yên trong 2 giờ. Nấm men đã hoạt hóa được thêm vào với tỷ lệ 0,02% w/v, đậy kín (sử dụng water-lock) tạo điều kiện kỵ khí và ủ ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong 48 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng chất khô hòa tan (°Brix) và pH đến quá trình lên men nước măng cầu xiêm: Pha loãng dịch quả măng cầu xiêm theo tỷ lệ được lựa chọn ở thí nghiệm trên. Bố trí thí nghiệm ở hàm lượng chất khô hòa tan 19, 22 và 25°Brix cùng với các giá trị pH 4,0, 4,5 và 5,0 tương ứng cho từng giá trị °Brix [7]. Tiến hành lên men dịch quả măng cầu xiêm tương tự thí nghiệm trên.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến quá trình lên men nước măng cầu xiêm: Dịch quả măng cầu xiêm được pha loãng, điều chỉnh °Brix và pH về giá trị phù hợp được lựa chọn từ thí nghiệm trên. Bổ sung nấm men với các tỷ lệ 0,01, 0,02 và 0,03% w/v [8] đậy kín để tạo điều kiện kỵ khí và lên men ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong thời gian 24, 48 và 72 giờ.

Phân tích, đánh giá các chỉ tiêu sản phẩm nước măng cầu xiêm lên men: Thử nghiệm lên men được thực hiện ở thể tích 1 lít theo các thông số được chọn ở các thí nghiệm trên. Sau khi hoàn tất quá trình lên men, tiến hành đo lường các chỉ tiêu hóa lý và đánh giá cảm quan sản phẩm.

Các chỉ tiêu hóa lý như: hàm lượng ethanol (% v/v ở 20°C) được xác định bằng phương pháp chưng cất; pH được đo bằng pH kế; hàm lượng chất khô hòa tan theo °Brix được đo bằng chiết quang kế; hàm lượng acid tổng được thực hiện theo phương pháp chuẩn độ bằng dung dịch kiềm chuẩn NaOH 0,1 N; hàm lượng đường tổng được xác định theo G.L. Miller (1959) [9]. Chỉ tiêu cảm quan sản phẩm phân tích đánh giá theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3215-79 [10]. Các chỉ tiêu vi sinh vật bao gồm *Coliforms* (CFU/ml) được xác định theo phương pháp ISO 4832:2006 và *E. coli* (CFU/ml) theo phương pháp ISO 16649-2:2001.

Phân tích và xử lý số liệu: Các kết quả nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng dịch mĂNG cầu xiêm và nước đến quá trình lên men

Tỷ lệ dịch quả mĂNG cầu xiêm và nước ảnh hưởng trực tiếp đến màu sắc sản phẩm, đồng thời làm thay đổi nồng độ chất dinh dưỡng trong dịch lên men cũng như ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của nấm men (bảng 1). Tỷ lệ dịch quả mĂNG cầu xiêm càng cao thì màu sắc, mùi, vị của dịch quả thu được càng gần mùi, vị của nguyên liệu.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng dịch quả mĂNG cầu xiêm đến sản phẩm.

Tỷ lệ dịch quả:nước (w/w)	Các chỉ tiêu sau 48 giờ lên men					
	°Brix	pH	Chỉ tiêu cảm quan			Hàm lượng ethanol (% v/v)
			Trạng thái	Mùi	Vị	
1:1	17,93 ^c	4,31 ^c	3,83 ^c	4,10 ^b	3,67 ^c	4,07 ^c
1,5:1	16,13 ^b	4,26 ^b	4,63 ^a	4,50 ^a	4,47 ^a	5,07 ^b
2:1	14,93 ^a	4,21 ^a	4,47 ^b	3,57 ^c	4,03 ^b	6,03 ^a

Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả bảng 1 cho thấy, sự khác biệt giữa các tỷ lệ pha loãng có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%. Ở tỷ lệ 1:1, hàm lượng chất khô hòa tan sau lên men còn lại là 17,93°Brix, cao nhất ứng với giá trị pH sau lên men là 4,31. Tuy nhiên, tỷ lệ này có hàm lượng ethanol sau lên men là 4,07% (v/v) và đánh giá cảm quan về trạng thái đạt 3,83 điểm, vị đạt 3,67 điểm thấp hơn so với tỷ lệ pha loãng 1,5:1 và 2:1, trong khi mùi đạt 4,10 điểm. Với tỷ lệ 1,5:1, sản phẩm sau lên men đạt 16,13°Brix, hàm lượng ethanol 5,07% (v/v), có vị chua và ngọt hài hòa, trạng thái và hương thơm đặc trưng của sản phẩm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu nước giải khát cider dâu [11]. Do đó, tỷ lệ pha loãng dịch mĂNG cầu xiêm và nước là 1,5:1 được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng chất khô hòa tan và pH đến quá trình lên men nước mĂNG cầu xiêm

Hàm lượng chất khô hòa tan và pH ảnh hưởng nhiều đến màu sắc, mùi, vị và trạng thái của sản phẩm (bảng 2). Nấm men điều chỉnh pH nhờ vào ATP được tiêu thụ bởi H⁺ của ATPase (Na/K⁺ - ATPase) ở màng sinh chất, vì vậy tế bào nấm men cần có độ pH thích hợp để các phản ứng trao đổi chất bên trong tiến hành dẫn đến ảnh hưởng tới quá trình lên men [12]. Theo V.C. Hau (1999) [3], hàm lượng chất khô hòa tan phù hợp cho quá trình lên men rượu là 20-22%, hàm lượng chất khô hòa tan ảnh hưởng đến hàm lượng ethanol cũng như hàm lượng đường khử trong thành phẩm.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của °Brix và pH ban đầu đến sản phẩm.

Nghiệm thức	Ban đầu		Chỉ tiêu đánh giá sau lên men			
	°Brix	pH	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng đường tổng (%)	°Brix	pH
1	19	4,0	6,83 ^a	9,98 ^a	11,50 ^a	3,74 ^b
2	19	4,5	6,50 ^b	11,69 ^b	12,89 ^b	4,30 ^c
3	19	5,0	6,10 ^c	12,29 ^b	13,11 ^b	4,61 ^c
4	22	4,0	6,43 ^b	13,83 ^c	15,61 ^c	3,69 ^a
5	22	4,5	5,20 ^d	15,09 ^d	16,03 ^d	4,29 ^d
6	22	5,0	4,60 ^e	15,73 ^d	16,61 ^c	4,64 ^b
7	25	4,0	3,17 ^f	19,42 ^e	20,78 ^f	3,94 ^c
8	25	4,5	3,07 ^g	19,86 ^{ef}	20,94 ^g	4,37 ^f
9	25	5,0	2,87 ^g	20,22 ^f	21,08 ^g	4,67 ⁱ

Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.

Sau 48 giờ lên men, ở tất cả các nghiệm thức khảo sát khi tăng giá trị pH tương ứng thì hàm lượng chất khô hòa tan sau lên men tăng tỷ lệ thuận, trong khi hàm lượng ethanol sinh ra giảm. Với hàm lượng chất khô hòa tan 19°Brix ở các nghiệm thức 1, 2 và 3 có lượng đường ban đầu khá thích hợp cho nấm men sử dụng, quá trình lên men diễn ra nhanh, mạnh nên tạo hàm lượng ethanol cao (6,10-6,83% v/v) và đường tổng còn lại thấp (9,98-12,29%).

Hàm lượng ethanol và đường tổng sau lên men tỷ nghịch với nhau, nếu ethanol sinh ra cao thì đường tổng còn lại thấp, do đó sản phẩm sau lên men có vị hơi chua, mùi nồng và chưa hòa hợp. Thêm vào đó, hàm lượng chất khô hòa tan ban đầu cũng ảnh hưởng đến hàm lượng đường tổng sau cùng. Ở 22°Brix, nghiệm thức 5 và 6 có hàm lượng ethanol sinh ra phù hợp với chỉ tiêu mong muốn (lần lượt là 5,2 và 4,6% v/v) và hàm lượng đường tổng đạt 15,09 và 15,73% (khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%), phù hợp với các chỉ tiêu nghiên cứu mong muốn. Tuy nhiên, khi tăng lên 25°Brix thì nước mĂNG cầu xiêm sau lên men có hàm lượng đường tổng khá cao (19,42-20,22%), hàm lượng ethanol thấp (2,87-3,17% v/v) so với 19 và 22°Brix.

Đối với nước giải khát lên men như cider, hàm lượng ethanol cuối cùng thường là 4,0-6,0% v/v. Dựa trên kết quả ở bảng 2, nghiệm thức 5 (22°Brix và pH 4,5) đáp ứng yêu cầu sản phẩm với hàm lượng ethanol ở mức 5,2% v/v, tương tự với kết quả nghiên cứu nước quả táo mèo [13]. Vì vậy, điều kiện lên men ban đầu về hàm lượng chất khô hòa tan 22°Brix và pH 4,5 được lựa chọn để lên men nước mĂNG cầu xiêm.

3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến quá trình lên men nước mĂNG cầu xiêm

Tỷ lệ nấm men và thời gian lên men ảnh hưởng nhiều đến sự thay đổi hàm lượng chất khô hòa tan và pH so với ban đầu. Kết quả cho thấy, với tỷ lệ nấm men được bổ sung

tăng dần 0,01, 0,02 và 0,03% w/v, thời gian lên men tương ứng lần lượt 24, 48 và 72 giờ làm cho °Brix và pH sau lên men giảm dần. Nấm men khi cho vào môi trường dịch quả cần có thời gian thích nghi, phát triển đến mật số thích hợp, khi thời gian quá ngắn sẽ hạn chế khả năng lên men của nấm men [12]. Do đó, ở các tỷ lệ nấm men khảo sát sau 24 giờ lên men đều nhận thấy °Brix (11,07-19,89) và pH (4,14-4,39) (bảng 3) giảm nhưng không đáng kể so với ban đầu. Độ axit và pH cuối cùng không những đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định và thời hạn sử dụng của sản phẩm nước đóng chai mà còn có tác động lớn đến hương vị của sản phẩm. Nồng độ axit cao có thể làm cho nước táo có vẻ khó uống, thường cần thêm một số đường để cân bằng hương vị [13]. Độ chua thấp (pH>3,8) có thể dẫn đến sự phát triển của các sinh vật hư hỏng và mùi vị không ngon [14].

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến sản phẩm.

Thí nghiệm	Tỷ lệ nấm men bổ sung (w/v)	Thời gian lên men (giờ)	Chỉ tiêu đánh giá			
			°Brix	pH	Hàm lượng đường tổng (% w/v)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
1	0,01	24	19,89 ⁱ	4,39 ⁱ	19,13 ⁱ	0,43 ^h
2	0,01	48	17,50 ^f	4,30 ^f	16,45 ^f	3,23 ^f
3	0,01	72	13,67 ^c	4,25 ^d	12,27 ^c	5,83 ^c
4	0,02	24	19,23 ^h	4,36 ^h	18,24 ^h	0,73 ^{gh}
5	0,02	48	16,33 ^e	4,27 ^e	15,15 ^e	5,07 ^e
6	0,02	72	12,93 ^b	4,21 ^b	11,81 ^b	6,27 ^b
7	0,03	24	18,53 ^g	4,34 ^g	17,49 ^g	1,03 ^g
8	0,03	48	15,13 ^d	4,24 ^c	14,17 ^d	5,47 ^d
9	0,03	72	11,07 ^a	4,14 ^a	9,96 ^a	6,87 ^a

Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các thí nghiệm khảo sát theo kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, hàm lượng ethanol ở thí nghiệm thứ 3 (0,01% và 72 giờ), 5 (0,02% và 48 giờ) và 8 (0,03% và 48 giờ) đều thu được độ cồn đạt yêu cầu của sản phẩm 4-6% [6, 13]. Ở thí nghiệm thứ 3, có độ cồn sinh ra đạt 5,83%, mẫu này có thời gian lên men dài hơn, làm hao phí thời gian cho quá trình sản xuất, sản phẩm tạo thành có mùi nồng, vị chua gắt, không đặc trưng của sản phẩm. Nhưng với cùng thời gian lên men là 48 giờ thì hàm lượng ethanol sinh ra với tỷ lệ nấm men 0,03% ở thí nghiệm thứ 8 (5,47% v/v) cao hơn so với tỷ lệ 0,02% ở thí nghiệm thứ 5 (5,07% v/v), tuy nhiên sự khác biệt này không quá lớn. Thêm vào đó, hàm lượng đường tổng sau lên men là 15,15% ở tỷ lệ nấm men 0,02% cao hơn so với 0,03% là 14,17%. Mặt khác, sản phẩm tạo thành có mùi vị tương đối hài hòa không có sự chênh lệch nhiều giữa hai tỷ lệ nấm men khảo sát, vì vậy thí nghiệm thứ 5 (tỷ lệ nấm men 0,02% và 48 giờ lên men) được lựa chọn cho quá trình lên men nước mãng cầu xiêm nhằm giảm chi phí trong sản xuất mà hiệu quả lên men vẫn đạt yêu cầu.

3.4. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu sản phẩm nước mãng cầu xiêm lên men

Áp dụng quy trình chế biến nước mãng cầu xiêm lên men với các thông số được lựa chọn ở các thí nghiệm trên, bao gồm tỷ lệ pha loãng dịch quả mãng cầu xiêm và nước 1,5:1, tỷ lệ nấm men bổ sung, hàm lượng chất khô hòa tan và pH ban đầu lần lượt là 0,02% w/v, 22°Brix và 4,5, lên men trong thời gian 48 giờ (hình 1). Sản phẩm nước mãng cầu xiêm lên men đạt chất lượng thuộc loại khá với 17,92/20 điểm theo TCVN 3215-79 (bảng 4) và chỉ tiêu vi sinh sản phẩm phù hợp với QCVN 6-2:2010/BYT [15].



Hình 1. Sản phẩm nước uống lên men từ quả mãng cầu xiêm.

Bảng 4. Kết quả đánh giá cảm quan nước mãng cầu xiêm lên men.

Chỉ tiêu chất lượng cảm quan	Điểm của từng thành viên										Tổng điểm chưa có trọng lượng	Điểm trung bình chưa có trọng lượng	Hệ số quan trọng	Điểm có trọng lượng
	A	B	C	D	E	F	G	H	K	L				
Trạng thái	5	4	5	5	4	4	5	5	5	5	47	4,7	0,8	3,76
Mùi	5	4	4	4	5	3	4	5	4	5	43	4,3	1,2	5,16
Vị	4	5	4	4	5	4	5	5	4	5	45	4,5	2,0	9,0
Tổng (điểm chung)													4,0	17,92

Bảng 5. Các chỉ tiêu hóa lý của sản phẩm nước mãng cầu xiêm lên men.

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Tiêu chuẩn	Kết quả	Ghi chú
Hàm lượng chất khô hòa tan	Chiết quang kế (Atago master-T 0-32% atc Brix refractometer, Mỹ)	-	16 °Brix	Tự công bố
Giá trị pH	Máy đo pH	-	4,27	Tự công bố
Hàm lượng ethanol (% v/v)	Chưng cất và đo bằng cồn kế	4-6%	5,1	Đạt
Hàm lượng acid tổng (g/100 ml)	Chuẩn độ bằng dung dịch kiềm chuẩn NaOH 0,1 N	-	0,42	Tự công bố
Hàm lượng đường tổng (%)	So màu với thuốc thử Dimethylsalicylic	-	15,15	Tự công bố

Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, các chỉ tiêu hóa lý của sản phẩm nước mãng cầu xiêm lên men có độ cồn ở mức 5,1% v/v đạt yêu cầu mong muốn. Kết quả này cũng tương ứng với sản phẩm nước sơ ri [6] và quả táo mèo lên men [13]. Hàm lượng đường tổng và acid tổng ở mức trung bình tạo sản phẩm có vị hài hòa và được ưa thích (4,7 điểm trạng thái, 4,3 điểm mùi và 4,5 điểm vị).

Bên cạnh đó, chỉ tiêu phân tích *Coliforms* và *E. coli* của nước mãng cầu xiêm lên men cho kết quả phù hợp với tiêu chuẩn QCVN 6-3:2010/BYT (bảng 6). Như vậy, qua các kết quả kiểm tra các chỉ tiêu cảm quan, hoá lý và vi sinh cho thấy sản phẩm nước mãng cầu xiêm lên men đạt chất lượng tốt, có giá trị cảm quan cao, độ cồn nhẹ, phù hợp với sản phẩm nước uống lên men có độ cồn thấp.

Bảng 6. Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh của nước mãng cầu xiêm lên men.

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	QCVN 6-2: 2010/BYT	Kết quả*	So sánh
<i>Coliforms</i> (CFU/ml)	ISO 4832:2006	Không được có	<1	Đạt
<i>E. coli</i> (CFU/ml)	ISO 16649-2:2001	Không được có	<1	Đạt

*: kết quả kiểm nghiệm từ Trung tâm Chất lượng Nông Lâm Thủy sản vùng 6.

4. Kết luận

Trái mãng cầu xiêm là nguồn nguyên liệu tiềm năng để chế biến nước uống lên men. Sản phẩm sau lên men có vị chua ngọt hài hòa, mùi thơm đặc trưng của mãng cầu xiêm, có mùi cồn nhẹ, đạt điểm cảm quan khá là 17,92 điểm theo TCVN 3215-79 và đáp ứng tiêu chuẩn QCVN 6-2:2010/BYT về thành phần vi sinh vật. Qua đó cho thấy tiềm năng ứng dụng quy trình chế biến và phát triển nước uống lên men từ trái mãng cầu xiêm nhằm đa dạng hóa sản phẩm cũng như tận dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu sẵn có.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.F. Morton (1987), *Fruits of Warm Climates*, Florida Flair Book, pp.75-80.
- [2] D. Phong (2016), *Breeding, Care and Disease Prevention Techniques for Custard Apple, Soursop and Jackfruit Trees*, Hong Duc Publishing House, 112pp (in Vietnamese).
- [3] V.C. Hau (1999), *Growing Fruit Trees in Vietnam*, Agriculture Publishing House, 502pp (in Vietnamese).
- [4] H.B.M.A Khaidatul (2009), *Physical Properties of Soursop (Annona muricata) Power Produce by Spray Drying*, Faculty of Chemical of Natural Resources Engineering, Universiti Malaysia Pahang, pp.38-41.

- [5] A.B. Shori, A.S. Baba, P. Muniandy, et al. (2019), “Potential health-promoting effects of probiotics in dairy beverages”, *Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages*, **14**, pp.173-204, DOI: 10.1016/B978-0-12-816687-1.00005-9.

- [6] T.T.N. Mai (2020), “Research on processing fermented beverage from cherry fruit (*Malpighia glabra* L.)”, *Journal of Agriculture and Development, Ho Chi Minh City University of Agriculture and Forestry*, **19(2)**, pp.99-105 (in Vietnamese).

- [7] H.X. Phong (2021), “Optimizing fermentation conditions for soursop wine (*Annona muricata* L.) using *Saccharomyces cerevisiae* FBY015”, *Journal of Science and Technology*, **226(5)**, pp.95-103 (in Vietnamese).

- [8] T.T.A. Hong, N.T.T. Sang (2017), “Research on wine production from *Annona reticulata* fruit”, *Proceedings of The Scientific Conference of Ho Chi Minh City University of Food Industry*, pp.115-123 (in Vietnamese).

- [9] G.L. Miller (1959), “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, **31(3)**, pp.426-428, DOI: 10.1021/ac60147a030.

- [10] Ministry of Science and Technology (2008), *Vietnamese Standard TCVN 3215-79: Sensory Analysis of Food Products: Scoring Method* (in Vietnamese).

- [11] S. Sharma, V.K. Joshi, G. Abrol, et al. (2009), “An overview on strawberry [*Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier] wine production technology, composition, maturation and quality evaluation”, *Natural Product Radiance*, **8(4)**, pp.356-365.

- [12] L.D. Pham (2010), *Fermentation Technology Textbook*, Vietnam Education Publishing House Limited Company, 251pp (in Vietnamese).

- [13] N.D. Hanh (2016), “Research on the use of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in processing fermented *Docynia indica* fruit juice with low alcohol content”, *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, **8(69)**, pp.89-93 (in Vietnamese).

- [14] B.V. Tu (2019), “Optimizing the fermentation process of strawberry cider beverage using the surface method that meets four factors”, *Journal of Science, Sao Do University*, **2(65)**, pp.77-85 (in Vietnamese).

- [15] Ministry of Health (2010), *QCVN 6-2:2010/BYT: National Technical Regulations for Non-Alcoholic Beverage Products* (in Vietnamese).

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 65 - Number 5 - May 2023

Phân tích di truyền liên kết phát hiện người mang gen đột biến *PKD1* gây bệnh thận đa nang.

Nguyễn Thị Việt Hà, Nguyễn Văn Phong, Trần Văn Khoa, Triệu Tiến Sang

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị áp xe gan ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi đồng 2.

Hà Huy Khôi, Hà Văn Thiệu, Trần Thanh Trí

Đặc điểm kháng thể bất thường ở bệnh nhân thiếu máu tan máu tự miễn tại Bệnh viện Bạch Mai.

Nguyễn Tuấn Tùng, Phạm Quang Thịnh

Thực trạng của người bệnh nuôi ăn qua sonde tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.

Nguyễn Đức Phúc, Nguyễn Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Thơm, Phạm Thị Thu Hà

Kết quả ghép thận và xử trí các biến chứng sớm sau ghép thận từ người cho sống tại Bệnh viện Trung ương Thái Nguyên.

Lê Thị Hương Lan, Trần Ngọc Tuấn

Nghiên cứu định lượng hỗn hợp 3 thành phần paracetamol, ibuprofen và caffeine trong chế phẩm viên nang bằng quang phổ tử ngoại tỷ đối.

Nguyễn Đức Thiện, Nguyễn Ngọc Anh

Đánh giá hoạt tính kháng *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 và độc tính tế bào của dịch sắc cây lựu (*Punica granatum*).

Trần Thị Lệ Quyên, Bùi Nguyễn Hải Linh, Nguyễn Việt Hà, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng, Bùi Thị Việt Hà, Trịnh Thành Trung

Đánh giá hiệu quả của xét nghiệm sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR trong giảm nguy cơ dị ứng thuốc Carbamazepine.

Võ Thị Ngọc Hào, Chu Văn Sơn, Nguyễn Đoàn Thủy, Nguyễn Văn Liệu, Nguyễn Thị Vân Anh

Nghiên cứu mật độ trồng thích hợp cho giống chuối tiêu già Nam Mỹ trên đất đôn thừa, đồi ruộng tại huyện Vĩnh Tường, tỉnh Vĩnh Phúc.

Nguyễn Văn Lam, Lê Thành Phương, Nguyễn Phương Tùng, Lê Thị Lý

Xác định trọng số các tiêu chí đánh giá tiềm năng phát triển nuôi cá nước ngọt tại tỉnh Hưng Yên bằng phương pháp phân tích thứ bậc (AHP).

Đỗ Đức Tùng, Nguyễn Ngọc Hân, Đỗ Phương Linh

Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (*Cymbidium wenshanense*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*.

Phạm Phương Thu, Nguyễn Thị Tinh, Trần Ngọc Hùng, Ngô Xuân Bình

Khảo sát một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 sử dụng trong kiểm soát nấm bệnh hại cây chuối.

Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Trần Văn Tuấn, Phạm Hồng Hiền, Nguyễn Xuân Cảnh

Vì nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (*Fragaria ananassa* “pajaro”) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Trịnh Ngọc Ái, Trần Thị Thúy Liễu, Hồ Tuấn Kiệt, Thái Nhật Quang, Lê Văn Thức, Nguyễn Minh Hiệp, Nguyễn Tiến Dũng

Nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng (*Curcuma longa*) tại Hưng Yên trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.

Vũ Xuân Tạo, Lê Thu Hương, Trần Bảo Trâm, Đào Ngọc Ánh, Lê Thị Hoàng Yến, Đỗ Mai Linh

Nghiên cứu điều kiện chế biến nước uống lên men từ măng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV002.

Đoàn Thị Kiều Tiên, Đỗ Thị Tuyết Nhung, Đặng Thị Hồng Diệu, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Thị Ngọc Mí, Huỳnh Xuân Phong

1 Genetic analysis links the diagnosis of carriers of the *PKD1* mutation gene that causes polycystic kidney disease.

Thi Viet Ha Nguyen, Van Phong Nguyen, Van Khoa Tran, Tien Sang Trieu

6 Characteristics of clinical, paraclinical and treatment results of children liver abscess in Children's Hospital No. 2.

Huy Khoi Ha, Van Thieu Ha, Thanh Tri Tran

10 Characterisation of irregular antibodies in patients with autoimmune hemolytic anaemia at Bach Mai Hospital.

Tuan Tung Nguyen, Quang Thinh Pham

15 Current situation of enteral tube feeding for patients at Nghe An General Friendship Hospital.

Duc Phuc Nguyen, Quynh Anh Nguyen, Thi Thom Nguyen, Thi Thu Ha Pham

20 Results of kidney transplant and monitoring of complications in the patients after kidney transplantation from living donors in Thai Nguyen National Hospital.

Thi Huong Lan Le, Ngoc Tuan Tran

25 Quantitative study ternary mixture of paracetamol, ibuprofen and caffeine in solid pharmaceutical dosage forms by ratio ultraviolet spectroscopy.

Duc Thien Nguyen, Ngoc Anh Nguyen

31 Evaluation of antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* VTCC 70157 and cytotoxicity of pomegranate (*Punica granatum*) aqueous extract.

Thi Le Quyen Tran, Nguyen Hai Linh Bui, Viet Ha Nguyen, Huu Tuan Dung Nguyen, Thi Viet Ha Bui, Thanh Trung Trinh

36 Evaluating the effect of screening dual *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles by multiplex real-time PCR technique on reducing the risk of Carbamazepine-induced hypersensitivity reaction.

Thi Ngoc Hao Vo, Van Son Chu, Doan Thuy Nguyen, Van Lieu Nguyen, Thi Van Anh Nguyen

43 Research on suitable plant densities for South American cavendish banana plants in land consolidation and exchange in Vinh Phuc province.

Van Lam Nguyen, Thanh Phuong Le, Phuong Tung Nguyen, Thi Ly Le

48 Determining criteria weight for assessing the potential development of freshwater fish farming in Hung Yen province by analytic hierarchy process (AHP).

Duc Tung Do, Ngoc Han Nguyen, Phuong Linh Do

55 A study on the bud regeneration ability of *Cymbidium wenshanense* by *in vitro* culture.

Phuong Thu Pham, Thi Tinh Nguyen, Ngoc Hung Tran, Xuan Binh Ngo

59 Characterisation of *Streptomyces diastatochromogenes* VNUA27 used for controlling fungal pathogens causing banana plant diseases.

Thi Thanh Mai Nguyen, Thi Thu Nguyen, Van Tuan Tran, Hong Hien Pham, Xuan Canh Nguyen

64 Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa* “pajaro”) by meristem culture method.

Ngoc Ai Trinh, Thi Thuy Lieu Tran, Tuan Kiet Ho, Nhat Quang Thai, Van Thuc Le, Minh Hiep Nguyen, Tien Dung Nguyen

70 Screening *Trichoderma* strains isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province for treating waste after turmeric processing.

Xuan Tao Vu, Thu Huong Le, Bao Tram Tran, Ngoc Anh Dao, Thi Hoang Yen Le, Mai Linh Do

76 Study on the appropriate conditions of the soursop (*Annona muricata* L.) juice fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* RV002.

Thi Kieu Tien Doan, Thi Tuyet Nhung Do, Thi Hong Dieu Dang, Ngoc Thanh Nguyen, Thi Ngoc Mi Huynh, Xuan Phong Huynh