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

TẬP 68, SỐ 1, THÁNG 1 NĂM 2026
VOLUME 68, NUMBER 1, JANUARY 2026

TẠP CHÍ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Tập 68 - Số 1 - Tháng 1 năm 2026

B

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 - *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 Mỏ - 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 Nghiệm - *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*

Phó Tổng biên tập

Trần Anh Tú - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Phạm Thị Minh Nguyệt - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*

Ban biên tập

Phí Công Thường - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Nguyễn Lan Phương - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Lê Thị Bắc - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Lê Thu Hiền - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Hà Thị Minh Lộc - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Phùng Thị Tuyết Mai - *Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam*
Tăng Xuân Bình - *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 Buu - *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 Dac Loc - *HUTECH University*
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 Nhuan - *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*

Deputy Editors-in-Chief

Tran Anh Tu - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Pham Thi Minh Nguyet - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*

Managing Editors

Phi Cong Thuong - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Nguyen Lan Phuong - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Le Thi Bac - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Le Thu Hien - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Ha Thi Minh Loc - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Phung Thi Tuyet Mai - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Tang Xuan Binh - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*
Truong Thi Thao Duong - *Ministry of Science and Technology, Vietnam*

TÒA SOẠN

115 Trần Duy Hưng, Phường Yên Hòa, Hà Nội, Việt Nam
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@mst.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

115 Tran Duy Hung Street, Yen Hoa Ward, Hanoi, Vietnam
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@mst.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021
No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Phát triển mô hình nhận dạng tiếng nói dân tộc thiểu số Hrê, Co sang tiếng Việt dạng văn bản sử dụng trí tuệ nhân tạo

Nguyễn Thành Việt[1*], Trần Duy Linh[2]

[1]Trường Đại học Phạm Văn Đồng, 509 Phan Đình Phùng, phường Cẩm Thành, tỉnh Quảng Ngãi, Việt Nam
[2]Trung tâm Chuyển đổi số và Đổi mới sáng tạo, 118 Hùng Vương, phường Nghĩa Lộ, tỉnh Quảng Ngãi, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/7/2024; ngày chuyển phản biện 29/7/2024; ngày nhận phản biện 19/8/2024; ngày chấp nhận đăng 23/8/2024

Tóm tắt:

Việc xây dựng cơ sở dữ liệu (CSDL) điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co là hết sức cần thiết nhằm thu hẹp khoảng cách giao tiếp và ngôn ngữ giữa người Hrê, Co và người Kinh. Hiện nay, công nghệ nhận diện lời nói bằng trí tuệ nhân tạo (AI) đạt độ chính xác cao với tiếng Việt và nhiều ngôn ngữ khác, cho phép ứng dụng nhận diện tiếng Việt trong chiều dịch Việt - Hrê và Việt - Co của CSDL điện tử. Tuy nhiên, chiều ngược lại, nhận dạng và dịch tiếng Hrê, Co sang tiếng Việt hiện chưa có nghiên cứu. Trong bài báo này, các cặp từ tương ứng để tạo lập kho dữ liệu Việt - Hrê, Việt - Co đã được tiến hành số hóa đồng nhất. Nhờ vào kho dữ liệu đã xây dựng, nhóm tác giả đã phát triển thành công bộ phần mềm CSDL điện tử cho phép tra cứu ngữ nghĩa giữa các ngôn ngữ Việt - Hrê, Việt - Co với hai phiên bản web và thiết bị di động. Đặc biệt, nhóm tác giả cũng đã nghiên cứu và xây dựng thành công mô hình nhận dạng lời nói tiếng Hrê và Co, mở rộng khả năng ứng dụng cho CSDL điện tử này.

Từ khóa: **Co, cơ sở dữ liệu điện tử, Hrê, mô hình nhận dạng lời nói, tiếng đồng bào dân tộc thiểu số.**

Chỉ số phân loại: **1.2, 1.9**

Developing a speech recognition model of Hre and Co ethnic minority languages into Vietnamese text using artificial intelligence

Thanh Viet Nguyen[1*], Duy Linh Tran[2]

[1]Pham Van Dong University, 509 Phan Dinh Phung Street, Cam Thanh Ward, Quang Ngai Province, Vietnam
[2]Center for Digital Transformation and Innovation, 118 Hung Vuong Street, Nghia Lo Ward, Quang Ngai Province, Vietnam

Received 26 July 2024; revised 19 August 2024; accepted 23 August 2024

Abstract:

Building an electronic database of the ethnic minority languages of Viet - Hre, Viet - Co is extremely necessary to narrow the communication and language gap between the Hre, Co and Kinh people. Currently, AI speech recognition technology has achieved high accuracy with Vietnamese and many other languages, allowing the application of Vietnamese recognition in the Vietnamese - Hre and Vietnamese - Co translation direction of the electronic database. However, the opposite direction - recognition and translation of Hre, Co into Vietnamese - has never been studied before. In this article, the corresponding word pairs to create the Vietnamese - Hre, Vietnamese - Co data warehouse have been digitized uniformly. Thanks to the built data warehouse, the authors have successfully developed an electronic database software package that allows semantic lookup between the Vietnamese - Hre, Vietnamese - Co languages. This software package has both a web version and a mobile application "Hre - Co - Viet". In particular, the authors also researched and successfully built a speech recognition model for Hre and Co languages, expanding the application capabilities for this electronic database.

Keywords: **Co, electronic database, ethnic minority languages, Hre, speech recognition model.**

Classification numbers: **1.2, 1.9**

[*]Tác giả liên hệ: Email: ntviet@pdu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Theo thống kê năm 2019, dân số trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi khoảng 1,2 triệu người với hơn 30 dân tộc sinh sống, trong đó, dân tộc Hrê chiếm khoảng 10,8%, dân tộc Co chiếm khoảng 1,6% tổng dân số. Hầu hết các xã, phường và đặc khu của tỉnh đều có đồng bào dân tộc thiểu số cư trú [1, 2].

Trong những năm qua, với sự quan tâm của các cấp ngành có liên quan, Sở Nội vụ tỉnh Quảng Ngãi phối hợp với Trường Đại học Phạm Văn Đồng hằng năm đều tổ chức các lớp giảng dạy tiếng đồng bào dân tộc thiểu số trong đó có tiếng Hrê và Co cho đối tượng cán bộ công chức, viên chức, giáo viên. Tuy nhiên, chưa có CSDL tiếng đồng bào dân tộc thiểu số nào được biên soạn, xây dựng để phục vụ việc tra cứu ngôn ngữ trong quá trình học mà chỉ có các tài liệu giáo trình giảng dạy, tài liệu nghiên cứu của các nhóm tác giả ngôn ngữ học.

Vì vậy, việc nghiên cứu, xây dựng CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co là hết sức cần thiết nhằm thu hẹp khoảng cách giao tiếp, ngôn ngữ, giúp cho người đồng bào dân tộc thiểu số học hỏi, nâng cao kiến thức, hòa nhập với sự phát triển chung của tỉnh, của đất nước; đồng thời cũng giúp cho các cá nhân người Kinh đang làm việc với người đồng bào có thể hiểu và giao tiếp thuận lợi hơn, qua đó truyền đạt các kiến thức, các chủ trương, chính sách của chính quyền đến người đồng bào, tiếp thu kinh nghiệm và hiểu rõ các vấn đề của người đồng bào được sâu sắc hơn. Bên cạnh đó, việc xây dựng CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co cũng là một hình thức số hóa tiếng đồng bào dân tộc thiểu số của tỉnh Quảng Ngãi. Việc thu thập, lưu trữ để xây dựng kho dữ liệu ngữ vựng dạng số của tiếng Hrê, Co không chỉ giúp cho người bản ngữ có ý thức bảo tồn, phát triển tiếng mẹ đẻ, mà còn hình thành một kho tài nguyên thông tin đầy đủ, chân thực, giúp cho các thế hệ nghiên cứu hiện tại và sau này có tư liệu chính xác. Đồng thời, góp phần gìn giữ cho các thế hệ sau không chỉ ngôn ngữ mà còn những giá trị văn hoá truyền thống đặc sắc của người đồng bào dân tộc tỉnh Quảng Ngãi.

Trên cơ sở hai bộ tài liệu tiếng Hrê và tiếng Co đã được UBND tỉnh Quảng Ngãi phê duyệt: "Tài liệu Đào tạo, bồi dưỡng tiếng Hrê" (dùng cho cán bộ công chức tại miền núi và công tác dân tộc tỉnh Quảng Ngãi) của UBND tỉnh Quảng Ngãi (ban hành tạm thời kèm theo Quyết định số 893/QĐ-UBND ngày 27/4/2007 của UBND tỉnh Quảng Ngãi) [3] và tài liệu "Bài học tiếng Co" (là một công trình thuộc đề tài khoa học và công nghệ cấp tỉnh có tên "Nghiên cứu, biên soạn tài liệu dạy - học tiếng Co cho cán bộ, công chức (người Kinh) công tác tại huyện Trà Bồng và huyện Tây Trà, tỉnh Quảng Ngãi", chủ trì đề tài ThS. Nguyễn Minh Trí, thực hiện năm 2016) [4], nhóm tác giả đã tiếp cận và nghiên cứu vốn từ Việt, Hrê và Co cơ bản và thường xuyên sử dụng trong cuộc sống. Nhóm đã thực hiện việc số hóa đồng nhất giữa các từ tương ứng để thành lập một kho dữ liệu Việt - Hrê, Việt - Co. Cơ sở dữ liệu gồm: kho ngữ vựng song ngữ Việt - Hrê và ngược lại; kho ngữ vựng song ngữ Việt - Co và ngược lại.

Nhờ vào kho dữ liệu đã xây dựng, nhóm tác giả đã phát triển thành công bộ phần mềm CSDL điện tử có thể sử dụng được trên các thiết bị điện tử như: máy tính, điện thoại thông minh… nhằm mục đích tra ngữ nghĩa giữa các ngôn ngữ Việt - Hrê, Việt - Co. Bên cạnh đó, phần mềm trang bị thêm một số công cụ để người dùng có thể đề xuất cập nhật thêm một số từ chưa có trong cơ sở dữ liệu. Bộ phần mềm CSDL điện tử Việt - Hrê, Việt - Co gồm các phiên bản chạy trên web [5] và ứng dụng (app) "Hrê - Co - Việt" chạy trên thiết bị di động.

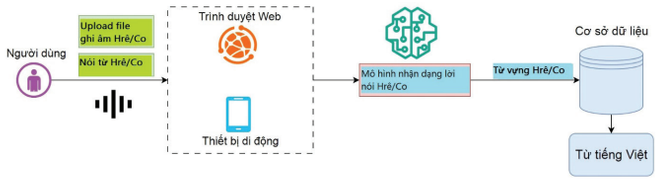
Hiện nay, các kỹ thuật AI đang phát triển mạnh mẽ cùng với những tiến bộ đồng thời về sức mạnh máy tính, dữ liệu lớn và hiểu biết lý thuyết. AI đã trở thành một phần thiết yếu của nhiều ngành và công nghệ, giúp giải quyết nhiều vấn đề thách thức trong học máy, công nghệ phần mềm, nghiên cứu vận hành, đặc biệt trong ngôn ngữ và nhận dạng lời nói.

Trong đó, đối với tiếng Việt và nhiều ngôn ngữ khác trên thế giới, công nghệ nhận diện giọng nói (ASR) bằng AI đã đạt được những kết quả với độ chính xác rất cao, cho phép nhận dạng tiếng nói và tự động chuyển tiếng nói thành văn bản điện tử. Trên cơ sở đó, có thể ứng dụng công nghệ này trong việc nhận diện tiếng Việt trong chiều dịch Việt - Hrê và Việt - Co của CSDL điện tử. Tuy nhiên, đối với chiều ngược lại - nhận dạng lời nói tiếng đồng bào dân tộc thiểu số, cụ thể là Hrê và Co rồi dịch sang tiếng Việt vẫn chưa ghi nhận nghiên cứu công bố trong nước. Với những thành tựu và xu hướng phát triển của công nghệ AI hiện nay, đặc biệt là khả năng huấn luyện thông qua mô hình học sâu (Deep learning), các tác giả đã nghiên cứu phương pháp và thực hiện xây dựng mô hình nhận dạng lời nói tiếng Hrê và Co để ứng dụng vào CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Mô hình ứng dụng công nghệ nhận dạng lời nói vào cơ sở dữ liệu điện tử

Các mô hình nhận dạng lời nói bằng AI và Deep learning sau khi được nghiên cứu thành công sẽ ứng dụng vào CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co theo mô hình như sau (hình 1): trong đó, người sử dụng nói trực tiếp hoặc gửi file âm thanh lên. Hệ thống nhận diện và chuyển lời nói sang văn bản, sau đó chuyển từ cần truy vấn đến CSDL. CSDL truy vấn lấy kết quả và trả kết quả (nếu tìm thấy) cho người dùng ở dạng văn bản. Nếu không tìm thấy từ vựng tương ứng, hệ thống sẽ đề xuất các từ vựng tương tự, gần giống nhất với từ được nhận diện bởi mô hình.



Hình 1. Mô hình ứng dụng nhận dạng lời nói vào cơ sở dữ liệu điện tử.

Ứng dụng nhận dạng lời nói vào CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co sẽ giúp người sử dụng có thể tra cứu bằng cách "nói từ" bên cạnh cách "nhập từ", mang lại nhiều hiệu quả thiết thực cho người sử dụng như: khả năng truy cập: Đây là một thuận lợi đối với người biết phát âm nhưng không biết cách viết, người không rành công nghệ, hoặc người khuyết tật khi không thể dùng chuột hay bàn phím, nhưng có thể dùng giọng nói để hệ thống chuyển thành văn bản, giúp nhập liệu hay thao tác một cách dễ dàng; tốc độ nhanh: phần mềm nhận dạng giọng nói có thể nắm bắt giọng nói của người dùng với tốc độ nhanh hơn so với khi nhập liệu bằng bàn phím, vì vậy tốc độ khi nhập liệu bằng giọng nói sẽ cải thiện đáng kể, từ đó giúp việc tra cứu từ vựng trở nên thuận tiện hơn.

2.2. Các mô hình học sâu phổ biến cho tác vụ công nghệ nhận diện giọng nói

Deep learning bao gồm các thuật toán học từ nhiều cấp độ để tạo ra các mô hình biểu diễn các mối quan hệ phức tạp giữa các dữ liệu. Deep learning sử dụng một hệ thống phân cấp các đặc trưng, trong đó các đặc trưng cấp cao hơn được xác định theo các đặc trưng cấp thấp hơn. Sự phổ biến của Deep learning có thể là do tăng khả năng xử lý của máy tính, xử lý lượng lớn dữ liệu huấn luyện và từ đó thúc đẩy những tiến bộ gần đây trong học máy, đặc biệt là trong xử lý thông tin và tín hiệu.

Xử lý tiếng nói là một lĩnh vực chuyên biệt của xử lý tín hiệu số liên quan đến việc thu nhận, thao tác và xuất tín hiệu lời nói. Nó bao gồm nhiều nhiệm vụ khác nhau như nhận dạng tiếng nói, nhận dạng người nói, nhận dạng cảm xúc, nhận dạng sức khỏe, hiểu ngôn ngữ, phát hiện giọng nói, nhận dạng tuổi và nhận dạng giới tính. Mục tiêu cuối cùng của các công nghệ nhận dạng tiếng nói là cho phép máy tính diễn giải và hiểu thông tin được nói để thực hiện các hành động phù hợp [6].

Trong những năm qua, lĩnh vực này đã có thành tựu đáng kể nhất là với sự phát triển của các mô hình Deep learning như: mạng nơ-ron sâu (Deep Neural Networks - DNN), mạng nơ-ron tích chập (Convolutional Neural Network - CNN) [7] đã cải tiến quá trình xử lý giọng nói bằng cách tự động học các đặc trưng có ý nghĩa từ tín hiệu giọng nói thô, cải thiện độ chính xác trong các ứng dụng khác nhau [8].

Tuy nhiên, trong thời gian gần đây, các mô hình nhận dạng lời nói tự động dựa trên kiến trúc Transformer, về bản chất cũng là các DNN xếp chồng lên nhau theo phương pháp của Deep learning [9] đã đạt được những bước đột phá trong việc xây dựng các mô hình đào tạo trước để tinh chỉnh (fine-tune) cho các tác vụ nhận dạng lời nói. Kiến trúc Transformer ban đầu được thiết kế để dịch văn bản viết từ ngôn ngữ này sang ngôn ngữ khác, trong đó gồm bộ mã hóa (Encoder) và bộ giải mã (Decoder), có nguyên tắc hoạt động như sau:

- Bộ mã hóa nhận đầu vào, trong trường hợp này là một chuỗi mã văn bản và tạo biểu diễn về nó (các thuộc tính - features). Phần này của mô hình được đào tạo để thu được sự hiểu biết từ dữ liệu đầu vào.

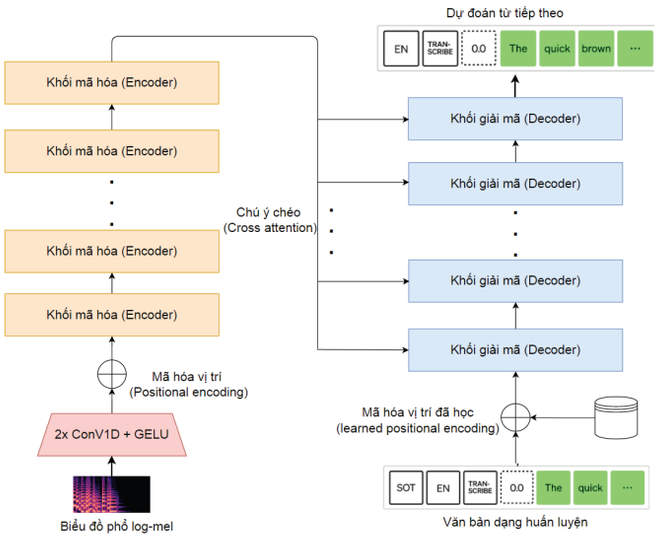
- Bộ giải mã sử dụng biểu diễn của bộ mã hóa (các thuộc tính) cùng với các đầu vào khác (các mã token được dự đoán trước đó) để tạo chuỗi mục tiêu. Phần này của mô hình được đào tạo để tạo ra kết quả đầu ra. Trong thiết kế ban đầu của Transformer, chuỗi đầu ra bao gồm các token văn bản.

Trong đó, CTC (Connectionist Temporal Classification) là một kỹ thuật được sử dụng với các kiến trúc Transformer chỉ có bộ mã hóa để nhận dạng lời nói tự động. Ví dụ về các mô hình như vậy là Wav2Vec2 [10], HuBERT [11] và M-CTC-T [12].

Tính đến trước năm 2022, CTC là kiến trúc phổ biến trong tác vụ ASR, với các mô hình chỉ dành cho bộ mã hóa như Wav2Vec2, HuBERT và XLSR [13] đã đạt được những bước đột phá trong các mô hình đào tạo trước và tinh chỉnh cho ASR. Các tập đoàn lớn, chẳng hạn như Meta và Microsoft, đã đào tạo trước bộ mã hóa Encoder lượng lớn dữ liệu âm thanh chưa được gắn nhãn trong nhiều ngày hoặc nhiều tuần. Sau đó, người dùng có thể sử dụng một điểm kiểm tra (checkpoint) được đào tạo trước và tinh chỉnh bằng CTC head trên dữ liệu giọng nói được gắn nhãn chỉ trong 10 phút để đạt được hiệu suất cao trong tác vụ ASR của mình.

Tuy nhiên, các mô hình CTC có những nhược điểm do chỉ sử dụng phần mã hóa của kiến trúc Transformer. Với các kiến trúc Transformer chỉ có bộ mã hóa, mô hình sẽ đưa ra dự đoán cho từng phần tử trong chuỗi đầu vào. Do đó, cả chuỗi đầu vào và đầu ra sẽ luôn có cùng độ dài.

Do đó, việc thêm bộ giải mã để tạo ra mô hình bộ mã hóa-giải mã (Encoder-Decoder), còn được gọi là mô hình chuỗi-sang-chuỗi (sequence-to-sequence, viết tắt là Seq2Seq). Mô hình này ánh xạ một chuỗi của một loại dữ liệu này sang một chuỗi của một loại dữ liệu khác. Với mô hình Seq2Seq, không có sự tương ứng một-một như vậy và các chuỗi đầu vào và đầu ra có thể có độ dài khác nhau. Điều đó làm cho các mô hình Seq2Seq phù hợp với các tác vụ như tóm tắt văn bản hoặc dịch giữa các ngôn ngữ khác nhau - cũng như cho các tác vụ âm thanh như nhận dạng lời nói. Trong đó, kiến trúc của bộ giải mã rất giống với kiến trúc của bộ mã hóa, cả hai đều sử dụng các lớp tương tự với tính năng tự chú ý (self-attention) làm tính năng chính.



Hình 2. Kiến trúc của mô hình Whisper.

Để xem cách thức hoạt động của tính năng này, có thể xem xét cách mô hình Whisper [14] thuộc kiến trúc Seq2Seq thực hiện nhận dạng lời nói tự động. Kiến trúc của mô hình Whisper được mô tả trong hình 2 [15]:

Trong thiết kế này, bộ giải mã đóng vai trò là mô hình ngôn ngữ, xử lý các biểu diễn trạng thái ẩn từ bộ mã hóa và tạo ra các bản phiên âm văn bản tương ứng. Đây là một cách tiếp cận hiệu quả hơn CTC, ngay cả khi mô hình CTC được kết hợp với mô hình ngôn ngữ ngoài, vì hệ thống Seq2Seq có thể được huấn luyện từ đầu đến cuối với cùng dữ liệu huấn luyện và hàm mất mát, mang lại tính linh hoạt cao hơn và hiệu suất nói chung vượt trội hơn.

Đặc biệt, nhu cầu về lượng lớn dữ liệu đào tạo đã là trở ngại trong quá trình phát triển kiến trúc Seq2Seq cho tác vụ ASR. Rất khó để có được dữ liệu giọng nói được gắn nhãn, với bộ dữ liệu có gắn nhãn lớn nhất vào thời điểm đó chỉ đạt 10.000 giờ. Tất cả điều này đã thay đổi vào tháng 9 năm 2022 khi Alec Radford và cộng sự từ OpenAI công bố Whisper - mô hình được đào tạo trước để nhận dạng giọng nói [14]. Không giống như các phiên bản CTC tiền nhiệm, vốn được huấn luyện hoàn toàn bằng dữ liệu âm thanh chưa được gắn nhãn, Whisper được đào tạo trước với một lượng lớn dữ liệu âm thanh được gắn nhãn với 680.000 giờ.

Đây là lượng dữ liệu lớn hơn nhiều so với dữ liệu âm thanh chưa được gắn nhãn được sử dụng để huấn luyện Wav2Vec 2.0 (60.000 giờ). Hơn nữa, 117.000 giờ dữ liệu đào tạo trước này là dữ liệu đa ngôn ngữ (hoặc "không phải tiếng Anh" - non-English). Điều này dẫn đến các điểm kiểm tra có thể được áp dụng cho hơn 96 ngôn ngữ, nhiều ngôn ngữ trong số đó được coi là có nguồn tài nguyên thấp, nghĩa là ngôn ngữ đó thiếu kho dữ liệu lớn phù hợp cho việc đào tạo.

Khi được mở rộng thành 680.000 giờ dữ liệu đào tạo trước được gắn nhãn, mô hình Whisper thể hiện khả năng khái quát hóa mạnh mẽ cho nhiều bộ dữ liệu và lĩnh vực. Các điểm kiểm tra được đào tạo trước đạt được kết quả cạnh tranh với các mô hình hiện đại, với tỷ lệ lỗi từ (WER) gần 3% trên các tập hợp con đã được kiểm tra của LibriSpeech pipe và TED-LIUM với 4,7% WER [14].

Điều đặc biệt quan trọng là khả năng của Whisper trong việc xử lý các mẫu âm thanh dạng dài, khả năng chống nhiễu đầu vào và khả năng dự đoán các văn bản được viết hoa và dấu câu. Do vậy, nhóm tác giả quyết định sử dụng Whisper để bắt đầu huấn luyện cho các mô hình nhận dạng lời nói trong công trình của mình.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thu thập và khảo sát tập dữ liệu âm thanh

Trên cơ sở danh mục từ tiếng Hrê và tiếng Co đã chuẩn hóa, tiến hành ghi âm phát âm từ theo danh mục và đặt tên cho file ghi âm (định dạng .mp3) theo mã số của từ trong danh mục từ. Sau khi hoàn thành, đã thu thập được bộ file âm thanh thô của danh mục từ tiếng Hrê gồm 3868 file (tương ứng với 1934 từ Hrê do giọng nam và giọng nữ đọc) và tiếng Co gồm 1050 file (tương ứng 1050 từ giọng nam).

Tiếp theo, nghiên cứu sử dụng thư viện Datasets, cung cấp khả năng truy cập dễ dàng vào tuyển tập các bộ dữ liệu học máy có sẵn công khai trên nền tảng Hugging Face Hub [16]. Hơn nữa, Datasets bao gồm nhiều tính năng được điều chỉnh cho phù hợp với bộ dữ liệu âm thanh giúp đơn giản hóa cho việc nghiên cứu và thử nghiệm các mô hình học máy. Cụ thể, tạo kho lưu trữ tập dữ liệu trên Hugging Face Hub và tải lên thư mục tập dữ liệu theo cấu trúc của AudioFolder. Trong thư mục data chứa 2 thư mục con là train (gồm dữ liệu huấn luyện) và test (gồm dữ liệu kiểm tra). Trong đó, tệp siêu dữ liệu metadata.csv phải bao gồm cột file_name (chứa đường dẫn tới file âm thanh) để liên kết đến tệp âm thanh với từ vựng (transcription) tương ứng.

Ngoài ra, tăng cường dữ liệu là một kỹ thuật thường được sử dụng trong học máy và thị giác máy tính để tăng kích thước và tính đa dạng của một tập dữ liệu đào tạo một cách nhân tạo. Tác vụ này bao gồm việc áp dụng một số phép biến đổi hoặc sửa đổi cho các mẫu dữ liệu hiện có, tạo ra các mẫu mới giữ nguyên nhãn hoặc lớp như dữ liệu gốc. Dữ liệu tăng cường giúp cải thiện hiệu suất mô hình bằng cách giảm tình trạng quá khớp, cải thiện khả năng khái quát hóa và tăng độ mạnh mẽ của mô hình. Vì vậy, để cải thiện độ tin cậy và chính xác của mô hình huấn luyện, tác giả đã làm giàu dữ liệu huấn luyện bằng việc thực hiện tăng cường dữ liệu âm thanh (audio data augmentation) với 2 kỹ thuật:

- *Pitch Shifting:* Thay đổi ngẫu nhiên các tần số thành phần của Audio, trong đó cao độ của âm thanh được thay đổi trong khi vẫn duy trì độ dài của nó. Kỹ thuật này có thể mô phỏng các biến thể của giọng nói.

Bảng 1. Phân chia bộ dữ liệu từ Hrê để huấn luyện và kiểm tra.

	Từ bắt đầu	Từ kết thúc	Số lượng audio
Giọng nam	1	1934	1934
Giọng nữ	1	1934	1934
Nhiễu	1	200	200
Tăng cao độ	1	200	200
Tổng cộng			**4268**
Tập dữ liệu huấn luyện			
Giọng nam	1	1934	1934
Giọng nữ	601	1934	1334
Nhiễu	1	100	100
Tăng cao độ	1	100	100
Tổng cộng			**3468**
Tập dữ liệu kiểm tra			
Giọng nam	1	55	55
Giọng nữ	1	600	600
Nhiễu	101	200	100
Tăng cao độ	101	200	100
Tổng cộng			**855**

- *Noise Addition:* nhiễu ngẫu nhiên được thêm vào tín hiệu âm thanh. Điều này có thể giúp mô hình được huấn luyện linh hoạt hơn trước tiếng ồn môi trường hoặc sự thay đổi trong điều kiện ghi âm.

Cụ thể, lần lượt thực hiện Pitch shifting (tăng 3 tone giọng) và Noise addition (nhiễu Gauss với trung bình 0, độ lệch chuẩn 0,01) cho 200 file audio giọng nữ có số thứ tự từ 1 đến 200. Trong đó 100 từ đầu tiên dùng cho huấn luyện, 100 từ tiếp theo được đưa vào tập kiểm tra. Dữ liệu phân chia cho huấn luyện và kiểm tra được cụ thể hóa trong bảng 1.

Như vậy có trong tổng số 4268 file âm thanh, sử dụng 3468 file cho việc huấn luyện, còn lại 855 file (chiếm khoảng 20%) được dùng để kiểm tra, đánh giá chất lượng mô hình.

3.2. Huấn luyện mô hình nhận dạng lời nói và đánh giá chất lượng mô hình

Tiếp theo, tải mô hình được đào tạo trước của Whisper trên môi trường Google Colab, trong đó có sẵn trình trích xuất thuộc tính để chuẩn bị cho bước tiền xử lý trên tập dữ liệu âm thanh. Ở đây, khi muốn tinh chỉnh trên một ngôn ngữ mới (nằm ngoài danh sách các ngôn ngữ được huấn luyện trước của Whisper) như Hrê và Co, Whisper có khả năng tận dụng kiến thức về 96 ngôn ngữ khác mà nó được đào tạo trước. Bởi lẽ, tất cả các ngôn ngữ hiện đại sẽ có sự tương đồng với ít nhất một trong 96 ngôn ngữ mà Whisper đã được huấn luyện trước dựa trên mô hình biểu diễn kiến thức đa ngôn ngữ. Do vậy, để tinh chỉnh Whisper trên một ngôn ngữ mới (như Hrê và Co) là tìm ngôn ngữ giống nhất mà Whisper đã được đào tạo trước, mà cụ thể chính là tiếng Việt.

Sau khi chuẩn bị xong dữ liệu, có thể thực hiện huấn luyện mô hình nhận dạng tiếng Hrê và mô hình nhận dạng tiếng Co. Những gì cần chuẩn bị gồm:

- Xác định bộ đối chiếu dữ liệu (data collator): lấy dữ liệu đã qua tiền xử lý và chuẩn bị các tensor PyTorch sẵn sàng cho mô hình.

- Thước đo đánh giá: trong quá trình đánh giá, sử dụng tỷ lệ lỗi ký tự (character error rate - CER).

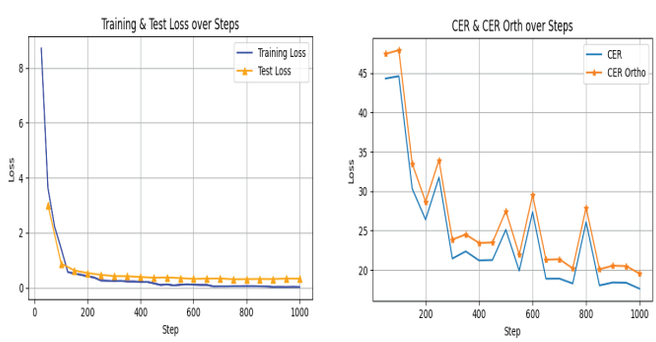
- Tải điểm kiểm tra được đào tạo trước (pre-trained checkpoint) Whisper small và thiết lập cấu hình chính xác để đào tạo.

- Xác định các đối số cho huấn luyện: những đối số này sẽ được đối tượng Trainer sử dụng trong việc xây dựng lịch trình huấn luyện. Ở đây, thiết lập số bước huấn luyện max_steps là 1000, và các siêu tham số khác như hiển thị trong hình 3.

```
from transformers import Seq2SeqTrainingArguments
training_args = Seq2SeqTrainingArguments(
    output_dir = "./ntviet/whisper-small-hre4.4",
    per_device_train_batch_size=16, gradient_accumulation_steps=1, learning_rate=1e-5,
    lr_scheduler_type="constant_with_warmup", warmup_steps=50, max_steps=1000,
    gradient_checkpointing=True, fp16=True, fp16_full_eval=True, evaluation_strategy="steps",
    per_device_eval_batch_size=16, predict_with_generate=True, generation_max_length=225,
    save_steps=1000, eval_steps=1000, logging_steps=25, report_to=["tensorboard"],
    load_best_model_at_end=True, metric_for_best_model="cer", greater_is_better=False,
    push_to_hub=True)
```

Hình 3. Thiết lập các siêu tham số để huấn luyện mô hình nhận dạng tiếng Hrê.

Sau cùng, có thể chuyển tiếp các đối số huấn luyện tới đối tượng Trainer cùng với mô hình, tập dữ liệu, trình đối chiếu dữ liệu để bắt đầu huấn luyện mô hình nhận dạng tiếng Hrê và mô hình nhận dạng tiếng Co (thực hiện hoàn toàn tương tự). Có thể thấy các mô hình nhận dạng đã huấn luyện cải thiện được độ chính xác qua từng bước và kết quả đạt khá tốt trên tập kiểm tra, với giá trị mất mát Loss sau cùng là 0,32, tỷ lệ lỗi ký tự CER sau cùng là 17,6% đối với mô hình nhận dạng tiếng Hrê, được hiển thị trong hình 4.



Hình 4. Đánh giá quá trình huấn luyện mô hình nhận diện tiếng Hrê.



Hình 5. Lớp tập huấn sử dụng phần mềm tại xã Minh Long, Quảng Ngãi (cũ).

3.3. Thử nghiệm và đánh giá kết quả trong thực tế ở địa phương

Để triển khai thử nghiệm và phát huy hiệu quả của sản phẩm, nhóm nghiên cứu đã thực hiện đưa sản phẩm vào sử dụng trong thực tế, trong đó: hướng dẫn khai thác CSDL điện tử tiếng Hrê, Co thông qua các lớp tập huấn tại 5 xã miền núi của tỉnh Quảng Ngãi (hình 5).

Nhóm tác giả đã phối hợp với Ban Dân tộc tỉnh tổ chức 5 lớp tập huấn hướng dẫn quản lý và hướng dẫn khai thác CSDL điện tử cho các đối tượng sử dụng, gồm: cán bộ công chức tại phòng Dân tộc các xã, cán bộ thôn bản, cán bộ Đoàn thanh niên, phụ nữ, hội nông dân xã miền núi; giáo viên và học sinh miền núi của tỉnh tại các xã: Ba Tơ, Minh Long, Trà Bồng, Sơn Hà, Sơn Tây; 1 lớp hướng dẫn quản trị, vận hành hệ thống cho Ban Dân tộc tỉnh và phòng Dân tộc các xã. Các lớp tập huấn đã có gần 300 học viên được giới thiệu về sản phẩm (gồm phiên bản web và app), được hướng dẫn các thao tác để khai thác, sử dụng các tính năng của CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co, biết cách gửi đóng góp về CSDL điện tử. Qua các lớp tập huấn, nhóm thực hiện cũng được tiếp xúc, trao đổi trực tiếp với đa dạng các đối tượng sử dụng, qua đó nắm bắt thêm những ý kiến, góp ý từ các học viên để hoàn thiện thêm sản phẩm, giúp sản phẩm ngày càng dễ dùng hơn, hiệu quả hơn với đông đảo người dân, từ đó giúp chia sẻ, lan truyền ứng dụng này rộng rãi đến cộng đồng.

- Thực hiện tuyên truyền, quảng bá sản phẩm trên các phương tiện truyền thông, nền tảng số: đơn vị chủ trì chủ động trong việc quảng bá và tuyên truyền sản phẩm CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co trên các phương tiện truyền thông, nền tảng số như Zalo, Facebook, các trang thông tin điện tử và các nền tảng số khác. Nhờ vào đó, thu hút được sự quan tâm của đông đảo cộng đồng mạng và các nhóm quan tâm đến bảo tồn và phát triển ngôn ngữ dân tộc.

- Giới thiệu đến tổ công nghệ số cộng đồng: Trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi (cũ), đã thành lập tổ công nghệ số cộng đồng đến cấp thôn, với tổng cộng hơn 1.140 tổ công nghệ số cộng đồng với hơn 7.500 thành viên tham gia. Thành viên tổ công nghệ số cộng đồng là những hạt nhân tích cực, có sứ mệnh đưa công nghệ số đến mọi ngõ ngách của cuộc sống, bằng cách tiếp cận với các công nghệ số, ứng dụng số hữu ích và triển khai, hướng dẫn lại cho người dân tại thôn, bản, tổ dân phố mình nắm bắt, sử dụng.

- Kết hợp giới thiệu, triển khai trong các lớp bồi dưỡng tiếng Hrê, Co: hằng năm, Sở Nội vụ tỉnh Quảng Ngãi phối hợp Trường Đại học Phạm Văn Đồng tổ chức các lớp bồi dưỡng tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Hrê, Co cho các đối tượng cán bộ công chức, viên chức, giáo viên làm việc tại các xã miền núi.

- Đã tổ chức Hội thảo cấp tỉnh vào ngày 14/08/2024 để giới thiệu về kết quả sản phẩm nghiên cứu [17]. Hội thảo đã mời các chuyên gia trong lĩnh vực, các đại biểu có liên quan để tăng cường giới thiệu kết quả của công trình đến phạm vi bên ngoài tỉnh.

Thông qua việc triển khai các mô hình ứng dụng sản phẩm, đến cuối tháng 4/2025, web "Cơ sở dữ liệu điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co" [3] (hình 6) đã được khai thác sử dụng bởi hơn 617.000 lượt truy cập, và app Hrê - Co - Việt đã có hơn 1000 lượt tải và cài đặt ứng dụng.



Hình 6. Cơ sở dữ liệu điện tử tiếng Việt - Hrê, Việt - Co phiên bản web.

Sau khi triển khai thử nghiệm, thông qua các hình thức trực tiếp (lớp tập huấn) và gián tiếp (qua nền tảng số), đông đảo người sử dụng cho biết sản phẩm rất dễ sử dụng và hữu ích, giúp việc học tiếng Hrê, Co trở nên thuận tiện và dễ dàng hơn bao giờ hết. Đồng thời, người sử dụng cũng góp ý thêm để hoàn thiện sản phẩm như: có thể bổ sung các từ ghép từ các từ đơn, bổ sung chức năng cho tra cứu từ theo lĩnh vực để phục vụ tốt hơn nữa nhu cầu sử dụng của người dùng.

4. Kết luận

Hiện nay, AI đã có nhiều ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, trong đó có lĩnh vực từ điển điện tử với công nghệ nhận diện lời nói. Tuy nhiên, việc nhận diện lời nói tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Hrê, Co vẫn chưa ghi nhận nghiên cứu công bố trong nước, nên kết quả trong bài báo này là một nghiên cứu mới, vừa mang giá trị học thuật, vừa mang

lại hiệu quả thiết thực với sản phẩm ứng dụng thực tế, và sẽ là nền tảng cho các nghiên cứu khác liên quan đến ứng dụng công nghệ vào lĩnh vực xử lý ngôn ngữ tự nhiên, nhất là các ngôn ngữ tài nguyên thấp như tiếng Hrê và Co.

Hầu hết các mô hình dựa trên kiến trúc Transformer cho xử lý âm thanh đều khá giống nhau - đều được xây dựng trên nguyên tắc của các lớp Attention, mặc dù một số mô hình sẽ chỉ sử dụng bộ mã hóa, trong khi những mô hình khác sử dụng cả bộ mã hóa và bộ giải mã. Trước năm 2022, CTC là kiến trúc phổ biến trong tác vụ ASR, với các mô hình chỉ dùng bộ mã hóa, đã đạt được những bước đột phá trong mô hình đào tạo trước/tinh chỉnh cho giọng nói. Tuy nhiên, các mô hình CTC có những nhược điểm do thêm một lớp tuyến tính đơn giản vào bộ mã hóa dẫn đến dễ mắc lỗi chính tả về ngữ âm.

Trong khi đó kiến trúc Seq2Seq, tiêu biểu là mô hình Whisper, mạnh hơn hẳn mô hình chỉ sử dụng bộ mã hóa. Bằng cách tách mã hóa chuỗi đầu vào khỏi giải mã chuỗi đầu ra, việc căn chỉnh âm thanh và văn bản sẽ ít gặp vấn đề hơn. Do vậy, chúng tôi đã sử dụng mô hình Whisper small để thực hiện tiền xử lý bằng thư viện Datasets trên bộ dữ liệu đầy đủ tiếng Hrê và tiếng Co. Sau đó thực hiện tinh chỉnh huấn luyện được mô hình nhận dạng tiếng Hrê (trải nghiệm mô hình tại https://csdlhreco.nuian.vn/aihre.aspx và app "Hrê - Co - Việt"), và mô hình nhận dạng tiếng Co (trải nghiệm mô hình tại địa chỉ https://csdlhreco.nuian.vn/aico.aspx và app "Hrê - Co - Việt").

Ngoài ra, để triển khai thử nghiệm và phát huy hiệu quả của sản phẩm, nhóm tác giả đã đưa sản phẩm đi vào sử dụng trong thực tế. Mô hình ứng dụng bao gồm nhiều hoạt động và giải pháp để có thể giới thiệu sản phẩm đến đông đảo các đối tượng người dùng, đồng thời tiếp thu, hoàn thiện thêm sản phẩm, làm giàu thêm CSDL tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Hrê, Co. Các hoạt động này bao gồm: hướng dẫn khai thác CSDL điện tử Hrê, Co thông qua các lớp tập huấn tại các khu vực miền núi của tỉnh Quảng Ngãi; tuyên truyền, quảng bá sản phẩm trên các phương tiện truyền thông, nền tảng số; giới thiệu đến tổ công nghệ số cộng đồng trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi; kết hợp giới thiệu, triển khai trong các lớp bồi dưỡng tiếng Hrê, Co; tổ chức hội thảo cấp tỉnh để giới thiệu về kết quả sản phẩm nghiên cứu.

Các mô hình ASR cho tiếng Hrê và tiếng Co giờ đây đã có thể ứng dụng vào CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co, giúp mang lại nhiều hiệu quả thiết thực cho người sử dụng CSDL điện tử. Việc nghiên cứu, xây dựng CSDL điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co là cần thiết và mang lại nhiều lợi ích, giá trị to lớn cho cộng đồng. Đây sẽ là nơi lưu giữ ngôn ngữ truyền thống của các dân tộc thiểu số trên địa bàn tỉnh, đồng thời qua đó cũng sẽ lưu giữ các giá trị văn hóa truyền thống, hình ảnh, phong tục, tập quán và văn hoá của người Hrê, Co, góp phần bảo tồn và phát huy các giá trị truyền thống độc đáo của mỗi dân tộc, cùng hòa vào dòng chảy phát triển chung của tỉnh Quảng Ngãi nói riêng và đất nước nói chung, bởi trong quá trình chuyển đổi số nhân văn và rộng khắp, sẽ không có ai bị bỏ lại phía sau.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được thực hiện trong khuôn khổ đề tài KH&CN cấp tỉnh "Xây dựng Cơ sở dữ liệu điện tử tiếng đồng bào dân tộc thiểu số Việt - Hrê, Việt - Co" do Trung tâm Chuyển đổi số và Đổi mới sáng tạo - Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Quảng Ngãi phối hợp cùng Sở Dân tộc và Tôn giáo tỉnh Quảng Ngãi chủ trì thực hiện, mã số đề tài: 03/2023/HĐ-ĐTKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] United Nations and the General Statistics Office (2024a), "Hre ethnic population in Vietnam", https://danso.info/dan-so-dan-toc-hre-o-viet-nam, accessed 29 July 2025 (in Vietnamese).

[2] United Nations and the General Statistics Office (2024b), "Co ethnic population in Vietnam", https://danso.info/dan-so-dan-toc-co-o-viet-nam, accessed 29 July 2025 (in Vietnamese).

[3] People's Committee of Quang Ngai Province (2007), *Temporarily Issued with Decision No. 893/QD-UBND dated April 27, 2007 on Training and Fostering Materials in H're Language* (in Vietnamese).

[4] N.M. Tri (2016), *Lessons in Co language,* Part of the provincial-level science and technology project: Research and compilation of teaching materials for Co language for Kinh public servants working in Tra Bong and Tay Tra districts, Quang Ngai province, Quang Ngai Department of Science and Technology (in Vietnamese).

[5] People's Committee of Quang Ngai Province (2024), "Database of ethnic minority languages Viet - Hre, Viet - Co", https://csdlhreco.nuian.vn, accessed 30 April 2025 (in Vietnamese).

[6] H. Purwins, B. Li, T. Virtanen, et al. (2019), "Deep learning for audio signal processing", *IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing*, **13(2)**, pp.206-219, DOI: 10.1109/JSTSP.2019.2908700.

[7] A. Mehrish, N. Majumder, R. Bharadwaj, et al. (2023), "A review of deep learning techniques for speech processing", *Information Fusion*, **99**, DOI: 10.1016/j.inffus.2023.101869.

[8] A. Alsobhani, H.M.A. ALabboodi, H. Mahdi (2021), "Speech recognition using convolution deep neural networks", *Journal of Physics: Conference Series*, **1973(1)**, DOI: 10.1088/1742-6596/1973/1/012166.

[9] A. Vaswani, N. Shazeer, N. Parmar, et al. (2017), "Attention is all you need", *Advances in Neural Information Processing Systems*, 11pp, DOI: 10.48550/arXiv.1706.03762.

[10] A. Baevski, H. Zhou, A. Mohamed, et al. (2020), "Wav2vec 2.0: A framework for self-supervised learning of speech representations", *Advances in Neural Information Processing Systems*, 19pp, DOI: 10.48550/arXiv.2006.11477.

[11] W.N. Hsu, B. Bolte, Y.H.H. Tsai, et al. (2021), "HuBERT: Self-supervised speech representation learning by masked prediction of hidden units", *IEEE*, **29**, pp.3451-3460, DOI: 10.1109/TASLP.2021.3122291.

[12] L. Lugosch, T. Likhomanenko, G. Synnaeve, et al. (2022), "Pseudo-labeling for massively multilingual speech recognition", *IEEE*, pp.7687-7691, DOI: 10.1109/ICASSP43922.2022.9746832.

[13] A. Conneau, A. Baevski, R. Collobert, et al. (2021), "Unsupervised cross-lingual representation learning for speech recognition", *ISCA*, pp.2426-2430, DOI: 10.21437/Interspeech.2021-329.

[14] A. Radford, J.W. Kim, T. Xu, et al. (2022), "Robust speech recognition via large-scale weak supervision", *Proceedings of Machine Learning Research*, 28pp, DOI: 10.48550/arXiv.2212.04356.

[15] OpenAI (2022), "Introducing Whisper", https://openai.com/index/whisper/, accessed 25 December 2024.

[16] Hugging Face (2024), "Create a new dataset repository", https://huggingface.co/new-dataset, accessed 25 December 2024.

[17] Quang Ngai Newspaper (2024), "Introducing the electronic database of ethnic languages", https://baoquangngai.vn/van-hoa/202408/gioi-thieu-co-so-du-lieu-dien-tu-tieng-dong-bao-dan-toc-c0a2512, accessed 25 December 2024 (in Vietnamese).

 DOI: 10.31276/VJST.2025.3538

Nghiên cứu phát triển hệ thống học lập trình trực tuyến tích hợp công cụ phản hồi và chấm điểm tự động

Tống Văn Trường*

Trường Đại học Tân Trào, phường Minh Xuân, tỉnh Tuyên Quang, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/7/2025; ngày chuyển phản biện 3/7/2025; ngày nhận phản biện 25/7/2025; ngày chấp nhận đăng 29/7/2025

Tóm tắt:

Trong bối cảnh chuyển đổi số trong giáo dục, việc nâng cao năng lực lập trình cho sinh viên, đặc biệt là sinh viên không chuyên công nghệ thông tin, ngày càng trở nên quan trọng. Tuy nhiên, nhiều sinh viên vẫn gặp khó khăn trong việc tiếp cận và thực hành lập trình một cách hiệu quả. Nghiên cứu này khảo sát thực trạng học lập trình và đánh giá nhu cầu hỗ trợ của 50 sinh viên không chuyên công nghệ thông tin thuộc các ngành Giáo dục Mầm non, Giáo dục Tiểu học và Nông nghiệp tại Trường Đại học Tân Trào. Dựa trên kết quả khảo sát, nhóm tác giả đã phát triển một hệ thống học lập trình trực tuyến tích hợp công cụ phản hồi và chấm điểm tự động, nhằm hỗ trợ sinh viên luyện tập thường xuyên và nhận phản hồi tức thì. Hệ thống được xây dựng theo kiến trúc mô-đun, gồm các thành phần chính như giao diện người dùng, máy chủ API (Application Programming Interface: Giao diện lập trình ứng dụng), cơ sở dữ liệu và công cụ chấm mã trong môi trường cách ly an toàn. Bài báo cũng đề xuất các chiến lược giảng dạy như dạy học phân hóa theo trình độ, sử dụng microlearning và thực hành lập trình thường xuyên trên nền tảng LMS (Learning Management System: Hệ thống quản lý học tập) của nhà trường. Kết quả đánh giá cho thấy, hệ thống đã góp phần nâng cao đáng kể hiệu quả học tập, sự tự tin và khả năng vận dụng kiến thức lập trình vào các bài toán thực tiễn.

Từ khóa: **đánh giá mã nguồn, hệ thống chấm điểm tự động, học lập trình trực tuyến, nền tảng e-learning, phản hồi tự động.**

Chỉ số phân loại: **1.2, 2.11**

Developing and evaluating an online programming learning platform with integrated automated assessment for university students

Van Truong Tong*

Tan Trao University, Minh Xuan Ward, Tuyen Quang Province, Vietnam

Received 1 July 2025; revised 25 July 2025; accepted 29 July 2025

Abstract:

In the context of digital transformation in education, enhancing programming competence among university students, especially those who are not majoring in information technology, has become increasingly important. However, many non-IT students still face significant difficulties in effectively accessing and practicing programming skills. This study investigates the current status of programming learning and assesses the support needs of 50 non-IT students from various majors at Tan Trao University, including Early Childhood Education, Primary Education, and Agriculture. Based on the survey results, the authors developed an online programming learning system integrated with automated assessment to support regular practice and provide immediate feedback for students. The system is designed using a modular architecture, consisting of key components such as a user interface, an API (Application Programming Interface) server, a database, and a secure isolated code evaluation environment. The article also proposes teaching strategies including differentiated instruction based on student proficiency levels, the use of microlearning, and frequent programming practice through the university's LMS (Learning Management System). Evaluation results indicate that the system significantly improves learning effectiveness, student confidence, and the ability to apply programming knowledge to real-world problem-solving tasks.

Keywords: **automated feedback, automated grading system, code evaluation, e-learning platform, online programming learning.**

Classification numbers: **1.2, 2.11**

Email: tongtruongdhtt@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Trong kỷ nguyên số, lập trình không còn là kỹ năng chuyên biệt dành riêng cho sinh viên ngành khoa học máy tính mà đã trở thành một năng lực nền tảng, có tính liên ngành cao, được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như kinh tế, kỹ thuật, giáo dục và khoa học xã hội. Khi các ngành công nghiệp ngày càng phụ thuộc vào quá trình ra quyết định dựa trên dữ liệu, tự động hóa và chuyển đổi số, năng lực lập trình giúp sinh viên đại học hiểu sâu hơn về tư duy tính toán, phát triển kỹ năng giải quyết vấn đề và thích nghi hiệu quả với yêu cầu của thị trường lao động tương lai.

Tại Việt Nam, cũng như nhiều quốc gia đang phát triển khác, cải cách giáo dục ở tầm quốc gia đã nhấn mạnh vai trò của năng lực số và việc tích hợp công nghệ thông tin trong chương trình đào tạo. Tuy nhiên, khoảng cách giữa định hướng chính sách và năng lực thực tế của sinh viên vẫn là một thách thức lớn, đặc biệt tại các cơ sở giáo dục đại học vùng sâu, vùng xa như Trường Đại học Tân Trào, tỉnh Tuyên Quang.

Cách tiếp cận truyền thống trong giảng dạy lập trình tại các trường đại học Việt Nam chủ yếu vẫn dựa vào phương pháp thuyết trình, bài tập thực hành cố định và chấm điểm thủ công các bài nộp của sinh viên. Những phương pháp này bộc lộ nhiều hạn chế về hiệu quả, đặc biệt trong bối cảnh lớp học đông hoặc có nhiều sinh viên không đến từ nền tảng kỹ thuật. Một trong những điểm yếu cốt lõi là thiếu phản hồi kịp thời, đây là yếu tố then chốt trong giáo dục lập trình. Sinh viên không chỉ cần biết mã của mình có chạy được hay không, mà còn cần hiểu rõ nguyên nhân khi chương trình không hoạt động. Việc chấm bài thủ công thường tốn nhiều công sức và bị trì hoãn, gây ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu quả học tập và làm giảm động lực học của sinh viên.

Bên cạnh đó, sự đa dạng về nền tảng kiến thức và trình độ lập trình giữa các sinh viên đòi hỏi một môi trường học tập mang tính cá nhân hóa, điều mà lớp học truyền thống khó đáp ứng. Một số sinh viên có thể tiếp thu nhanh các khái niệm cơ bản, trong khi những người khác lại cần sự hướng dẫn cụ thể, từng bước. Nếu thiếu các cơ chế học tập thích ứng, giảng viên sẽ gặp khó khăn trong việc điều chỉnh tốc độ giảng dạy sao cho phù hợp với tất cả người học. Ngoài ra, các yếu tố bên ngoài như sự chênh lệch trong khả năng tiếp cận máy tính, hạ tầng internet yếu kém hoặc thiếu công cụ lập trình hiện đại tại các trường đại học vùng nông thôn càng làm trầm trọng thêm rào cản giáo dục.

Để ứng phó với những thách thức nêu trên, bài báo này giới thiệu việc xây dựng và đánh giá một nền tảng học lập trình trực tuyến có tích hợp công cụ chấm điểm tự động. Nền tảng cho phép sinh viên viết mã trực tiếp trên trình duyệt mà không cần cài đặt phần mềm, hỗ trợ nhiều ngôn ngữ lập trình, cung cấp tính năng gợi ý mã (auto-completion), tô sáng cú pháp và tự động đánh giá bài nộp dựa trên các bộ kiểm thử được định nghĩa trước. Hệ thống chấm điểm cung cấp phản hồi tức thời về cả lỗi cú pháp và lỗi ngữ nghĩa, từ đó giúp sinh viên cải thiện mã nguồn một cách lặp đi lặp lại. Ngoài ra, nền tảng còn tích hợp công cụ hỗ trợ giảng viên theo dõi tiến độ học tập, giao bài và phân tích hiệu suất học tập ở cả cấp độ cá nhân và toàn lớp.

Nền tảng này đã được triển khai thử nghiệm trong một học phần lập trình cơ bản dành cho sinh viên không chuyên ngành công nghệ thông tin. Phương pháp đánh giá hỗn hợp được áp dụng, kết hợp dữ liệu định lượng (như tỷ lệ hoàn thành bài tập, điểm tiền kiểm tra và hậu kiểm tra, nhật ký sử dụng hệ thống) với phản hồi định tính thu thập từ khảo sát và phỏng vấn. Kết quả cho thấy mức độ tham gia của sinh viên được cải thiện rõ rệt, chu kỳ học tập ngắn hơn và khả năng ghi nhớ các khái niệm lập trình được nâng cao. Việc tự động hóa quá trình đánh giá không chỉ giúp giảm tải công việc cho giảng viên mà còn tạo nên một môi trường học tập chủ động, nơi sinh viên học thông qua thử - sai và phản hồi tức thời.

Thông qua việc phát triển và đánh giá nền tảng học lập trình trực tuyến này, nghiên cứu hướng đến việc cung cấp một giải pháp giảng dạy lập trình có khả năng mở rộng, thích ứng linh hoạt và tiết kiệm tài nguyên - đặc biệt phù hợp với bối cảnh giáo dục đại học tại Việt Nam. Bài báo cũng chứng minh rằng, việc tích hợp các công cụ học tập dựa trên công nghệ có thể góp phần giải quyết hiệu quả những thách thức về sư phạm và tổ chức, nhất là trong điều kiện cơ sở vật chất còn hạn chế. Các phát hiện từ nghiên cứu mang đến hàm ý thiết thực cho đội ngũ giảng viên, cán bộ quản lý và nhà hoạch định chính sách trong nỗ lực hiện đại hóa hoạt động giảng dạy lập trình và kỹ năng số trong các ngành học tại Việt Nam và những bối cảnh tương tự.

2. Cơ sở lý luận

Hoạt động giảng dạy và học tập lập trình từ lâu đã đặt ra nhiều thách thức đáng kể cho cả giảng viên và người học, do đặc thù mang tính trừu tượng cao, đòi hỏi tư duy logic và yêu cầu thực hành thường xuyên. Trong vài thập kỷ gần đây, đã có nhiều công trình nghiên cứu được công bố nhằm giải quyết các khó khăn này, đặc biệt tập trung vào việc phát triển các môi trường học lập trình trực tuyến, hệ thống chấm mã tự động và cơ chế học tập thích ứng nhằm hỗ trợ người học đa dạng. Phần này trình bày tổng quan các công trình tiêu biểu trong bốn hướng nghiên cứu chính: (1) Nền tảng học lập trình trực tuyến, (2) Công cụ chấm mã tự động, (3) Kỹ thuật phân tích và đánh giá mã nguồn, (4) Hệ thống học tập cá nhân hóa và thích ứng trong giáo dục lập trình.

2.1. Nền tảng học lập trình trực tuyến

Các môi trường học lập trình trực tuyến ngày càng trở nên phổ biến nhờ khả năng tiếp cận thuận tiện, tính mở rộng linh hoạt và tiềm năng hỗ trợ học tập tương tác theo nhịp độ cá nhân. Các nền tảng như Codecademy, Khan Academy, freeCodeCamp và Code.org đã góp phần dân chủ hóa việc học lập trình bằng cách cung cấp các khóa học tương tác miễn phí hoặc chi phí thấp, dẫn dắt người học vượt qua chuỗi thử thách lập trình có mức độ khó tăng dần. Những hệ thống này được đặc trưng bởi các tính năng như thực thi mã ngay trên trình duyệt, phản hồi theo thời gian thực và thiết kế bài học theo hướng trò chơi hóa - các yếu tố đã được chứng minh là có tác dụng thúc đẩy động lực và khả năng ghi nhớ của người học [1].

Trong bối cảnh giáo dục đại học chính quy, nhiều cơ sở đào tạo đã phát triển nền tảng riêng để đáp ứng yêu cầu sư phạm cụ thể. Chẳng hạn, hệ thống Kattis do Viện Công nghệ Hoàng gia Thụy Điển (KTH) phát triển phục vụ cho các khóa học và thi đấu lập trình; trong khi đó, CodeRunner - một plugin mã nguồn mở tích hợp với Moodle cho phép giảng viên tạo câu hỏi lập trình có thể chấm điểm tự động. Các nền tảng này hỗ trợ tạo bài tập tùy chỉnh, tích hợp với hệ thống quản lý học tập (LMS) và sử dụng nhiều bộ kiểm thử để đánh giá.

Tại Việt Nam, nhiều trường đại học hiện đang sử dụng các nền tảng phổ thông như HackerRank hoặc repl.it để hỗ trợ giảng dạy lập trình, tuy nhiên việc xây dựng và triển khai các hệ thống riêng có tích hợp công cụ đánh giá chuyên biệt vẫn còn hạn chế. Một trong những rào cản đáng kể là thiếu giao diện và nội dung bằng tiếng Việt, điều này gây khó khăn cho sinh viên không chuyên ngành hoặc sinh viên đến từ vùng sâu, vùng xa.

2.2. Công cụ chấm mã tự động

Một trong những đột phá quan trọng trong giáo dục lập trình là sự phát triển của các hệ thống chấm mã tự động, cho phép đánh giá bài làm của sinh viên theo thời gian thực dựa trên các bộ kiểm thử được định nghĩa sẵn. Những hệ thống này giúp giảm đáng kể khối lượng công việc chấm điểm cho giảng viên, đồng thời mang lại phản hồi tức thì - một yếu tố then chốt trong dạy học lập trình hiệu quả [2].

Các hệ thống đầu tiên như Mooshak, AutoLab và DOMjudge được phát triển phục vụ thi đấu lập trình và sau đó được điều chỉnh để sử dụng trong đào tạo. Các hệ thống này thường áp dụng phương pháp kiểm thử hộp đen ("black-box testing"), trong đó độ chính xác của lời giải được xác định bằng cách chạy mã trên các đầu vào ẩn và so sánh đầu ra với kết quả mong đợi. Những hệ thống hiện đại hơn như Gradescope và CodeGrade không chỉ tích hợp với LMS mà còn cung cấp phản hồi nâng cao về phong cách mã, cấu trúc và hiệu suất.

Dù đã có nhiều tiến bộ, nhưng nghiên cứu của H. Keuning và cs (2018) [3] cho thấy, các hệ thống hiện hành vẫn thiếu phản hồi có tính ngữ nghĩa sâu - yếu tố quan trọng với người học mới bắt đầu. Ngoài ra, phần lớn công cụ chỉ tập trung vào kiểm tra độ đúng của mã mà bỏ qua chất lượng mã nguồn, điều này hạn chế hiệu quả sư phạm. Xu hướng hiện nay là tích hợp phân tích mã tĩnh và thực thi ký hiệu (symbolic execution) vào quy trình đánh giá nhằm cung cấp thông tin phản hồi mang tính chẩn đoán chuyên sâu hơn.

2.3. Kỹ thuật phân tích và đánh giá mã nguồn

Để hỗ trợ đánh giá sâu hơn đối với bài lập trình, các nhà nghiên cứu đã đề xuất nhiều kỹ thuật phân tích mã vượt ra ngoài kiểm thử đơn thuần. Các phương pháp phân tích tĩnh như phân tích cây cú pháp trừu tượng (AST), phân tích luồng điều khiển và phân tích luồng dữ liệu được sử dụng để xác định đặc trưng cấu trúc của mã, đo lường độ phức tạp và phát hiện mẫu lập trình sai hoặc gian lận. Các công cụ như PMD, SonarQube và JPlag được ứng dụng rộng rãi trong môi trường học thuật để phân tích chất lượng mã và phát hiện đạo văn.

Trong các hệ thống chấm điểm tự động, phương pháp dựa trên AST cho phép giảng viên định nghĩa cấu trúc lời giải mẫu và so sánh với bài làm của sinh viên để đánh giá mức độ hiểu bài [4]. Ví dụ, so sánh AST có thể xác định sinh viên có sử dụng đúng cấu trúc đệ quy khi cài đặt thuật toán sắp xếp hay không, thay vì chỉ gọi hàm thư viện. Những phương pháp này rất hữu ích cho đánh giá hình thành và nhận diện sai lệch nhận thức.

Một số hệ thống tiên tiến như PraireLearn hay FeedbackFruits còn triển khai mô hình đánh giá dựa trên lời giải chuẩn ("model-driven assessment"), trong đó hệ thống tự động phát hiện các sai lệch về logic, cấu trúc hoặc hiệu suất so với lời giải chuẩn. Kỹ thuật này hỗ trợ việc tạo phản hồi cá nhân hóa và được chứng minh là giúp nâng cao kết quả học tập trong các khóa học nhập môn lập trình.

2.4. Hệ thống học tập cá nhân hóa và thích ứng

Trước sự đa dạng về xuất phát điểm, kinh nghiệm lập trình và năng lực nhận thức của sinh viên, việc cá nhân hóa hoạt động học đã trở thành trọng tâm trong nghiên cứu giáo dục lập trình. Các hệ thống học tập thích ứng hướng tới việc điều chỉnh nội dung, tốc độ và phản hồi sao cho phù hợp với từng người học. Các hệ thống như IntelliJ Edu, SmartTutor và BlueJ đã tích hợp yếu tố thích ứng bằng cách theo dõi hiệu suất học tập và điều chỉnh mức độ khó phù hợp.

Gần đây, một số hướng tiếp cận mới đã ứng dụng thuật toán học máy để phân tích tương tác của sinh viên với các bài lập trình và dự đoán khả năng gặp khó khăn trong học tập. Theo đó, các nhà khoa học đã sử dụng mạng nơ-ron hồi tiếp (RNN) để mô hình hóa hành vi lập trình và dự báo kết quả học. Những hệ thống dựa trên dữ liệu này mở ra khả năng xây dựng các hệ thống gia sư thông minh có thể hỗ trợ chủ động như đưa gợi ý, đề xuất bài tập hoặc động viên học tập.

Tuy nhiên, việc phát triển và triển khai các hệ thống như vậy tại những môi trường hạn chế về nguồn lực - như các trường đại học vùng miền ở Việt Nam - còn đối mặt với thách thức kỹ thuật, sư phạm và hạ tầng [5-7]. Việc cân bằng giữa mục tiêu cá nhân hóa với thực tế hạn chế về năng lực giảng viên, băng thông internet và hỗ trợ thể chế là điều tất yếu.

2.5. Khoảng trống trong nghiên cứu

Mặc dù thế giới đã đạt được nhiều thành tựu trong việc thiết kế nền tảng học lập trình trực tuyến và hệ thống chấm điểm tự động, phần lớn các hệ thống hiện có được phát triển trong môi trường giàu tài nguyên và khó thích ứng với điều kiện thực tế của giáo dục đại học tại Việt Nam. Những thách thức điển hình tại các trường thuộc tỉnh như Tuyên Quang bao gồm thiếu hạ tầng máy tính, hạn chế về hỗ trợ kỹ thuật và thiếu đào tạo giảng viên trong việc ứng dụng công nghệ mới.

Hơn nữa, hiện vẫn còn thiếu các nghiên cứu thực nghiệm đánh giá hiệu quả của nền tảng lập trình tích hợp - đặc biệt là các hệ thống kết hợp giảng dạy, môi trường lập trình và phản hồi tự động - trong bối cảnh Việt Nam hoặc các quốc gia Đông Nam Á có

điều kiện tương tự. Nghiên cứu này nhằm lấp đầy khoảng trống đó thông qua việc thiết kế, triển khai và đánh giá một nền tảng học lập trình nhẹ, hoạt động trên trình duyệt, đảm bảo tính khả thi kỹ thuật và phù hợp sư phạm tại Trường Đại học Tân Trào.

3. Thiết kế và triển khai hệ thống

Nền tảng được đề xuất được thiết kế với kiến trúc dạng mô-đun và có khả năng mở rộng cao, nhằm hỗ trợ toàn bộ quy trình giảng dạy lập trình bao gồm: nộp bài, đánh giá tự động, cung cấp phản hồi và theo dõi tiến trình học tập. Hệ thống được xây dựng trên nền tảng các công nghệ mã nguồn mở hiện đại, đảm bảo tính linh hoạt, dễ triển khai và có thể mở rộng trong các môi trường giáo dục có nguồn lực hạn chế. Mô hình triển khai theo kiến trúc client-server điển hình, bao gồm bốn thành phần chính: giao diện web phía người dùng (frontend), máy chủ API (backend), cơ sở dữ liệu quan hệ và công cụ chấm điểm tự động trong môi trường cách ly an toàn (sandboxed auto-grading engine).

3.1. Giao diện người dùng (Frontend): Phát triển trên nền React

Phần giao diện người dùng được xây dựng bằng thư viện ReactJS - một công nghệ JavaScript phổ biến được sử dụng rộng rãi trong phát triển các ứng dụng web tương tác. Kiến trúc dựa trên thành phần (component-based) của React giúp phân tách rõ ràng các chức năng, tăng tính tái sử dụng và dễ dàng bảo trì. Giao diện được thiết kế cho hai nhóm người dùng chính là sinh viên và giảng viên, mỗi nhóm được cung cấp một bảng điều khiển (dashboard) tùy biến riêng.

Đối với sinh viên, giao diện bao gồm:

- Trình soạn thảo mã (code editor) hỗ trợ tô sáng cú pháp và gợi ý mã tự động (sử dụng Monaco Editor - tương tự VSCode).

- Các tab để xem mô tả bài toán, ví dụ vào/ra và kết quả kiểm thử.

- Thông báo lỗi biên dịch hoặc lỗi thực thi theo thời gian thực.

- Bộ theo dõi lịch sử nộp bài cùng trạng thái đánh giá và thời gian nộp.

Đối với giảng viên, giao diện hỗ trợ:

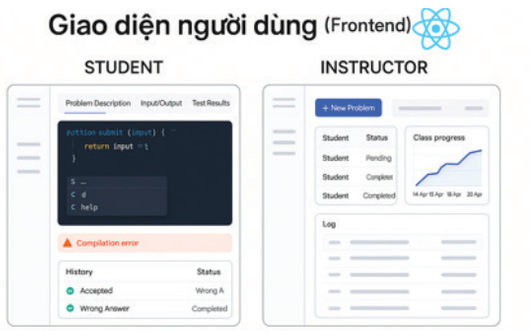
- Tạo bài toán và quản lý bộ kiểm thử.

- Theo dõi tiến độ nộp bài của sinh viên theo thời gian thực.

- Trực quan hóa tiến độ lớp học thông qua biểu đồ và nhật ký hệ thống.

- Tùy chọn chấm điểm thủ công và điều chỉnh kết quả khi cần thiết.

Giao diện frontend tương tác với máy chủ backend thông qua API chuẩn REST trên giao thức HTTPS và hỗ trợ mở rộng giao diện đa ngôn ngữ (ví dụ: chuyển đổi Anh - Việt) phục vụ nội địa hóa (hình 1).



Hình 1. Giao diện người dùng dành cho sinh viên và giảng viên trên hệ thống, cho phép lập trình, theo dõi tiến độ và quản lý bài tập.

3.2. Máy chủ xử lý trung tâm (Backend): Lớp API (Flask hoặc Node.js)

Phần backend được phát triển bằng Python Flask hoặc Node.js kết hợp Express, tùy theo yêu cầu triển khai và sở thích của đội ngũ phát triển. Flask tích hợp tốt với các logic chấm điểm bằng Python và có độ nhẹ cao; trong khi đó Node.js hỗ trợ xử lý sự kiện bất đồng bộ (asynchronous), phù hợp với môi trường có số lượng truy cập đồng thời lớn.

Các chức năng chính của backend bao gồm:

- Xác thực và phân quyền người dùng sử dụng JWT (JSON Web Tokens).

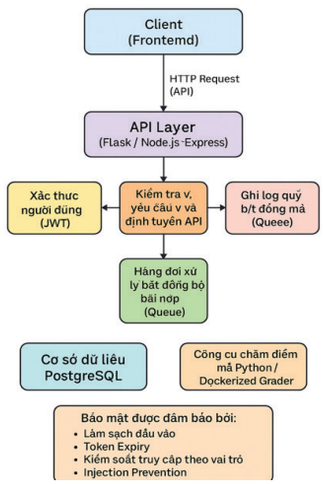
- Điều hướng và kiểm tra hợp lệ các yêu cầu API (ví dụ: nộp bài, truy xuất bộ kiểm thử, lịch sử điểm).

- Quản lý hàng đợi xử lý bài nộp theo cơ chế bất đồng bộ.

- Giao tiếp với công cụ chấm điểm và cơ sở dữ liệu PostgreSQL.

- Ghi log sự kiện phục vụ phân tích và gỡ lỗi hệ thống.

Các yếu tố bảo mật được chú trọng như làm sạch đầu vào (input sanitization), thiết lập thời hạn cho token, kiểm soát truy cập theo vai trò nhằm ngăn chặn tấn công chèn mã độc và truy cập trái phép (hình 2).



Hình 2. Kiến trúc hệ thống chấm điểm mã nguồn tự động sử dụng API, hàng đợi bất đồng bộ và công cụ chấm điểm trong Docker.

3.3. Cơ sở dữ liệu (Database): Hệ quản trị PostgreSQL

Hệ thống sử dụng cơ sở dữ liệu quan hệ PostgreSQL để lưu trữ toàn bộ dữ liệu lâu dài, bao gồm:

- Hồ sơ người dùng (sinh viên, giảng viên, quản trị viên).

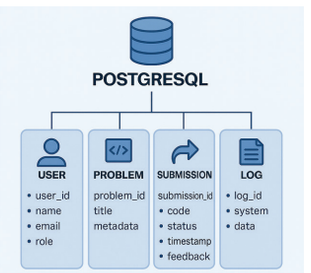
- Danh sách bài toán lập trình và siêu dữ liệu liên quan.

- Bộ kiểm thử (các cặp dữ liệu vào/ra).

- Bản ghi nộp bài (mã nguồn, trạng thái, thời gian, phản hồi).

- Nhật ký hệ thống và dữ liệu phân tích.

PostgreSQL được lựa chọn nhờ độ ổn định cao, khả năng xử lý các truy vấn phức tạp, hỗ trợ chỉ mục, trường JSON và tiềm năng mở rộng theo mô hình lai (kết hợp dữ liệu quan hệ và tài liệu). Cơ sở dữ liệu được chuẩn hóa nhằm tối ưu hóa truy vấn và hỗ trợ kiểm tra truy vết (audit trail) đảm bảo tính toàn vẹn dữ liệu (hình 3).



Hình 3. Cấu trúc cơ sở dữ liệu PostgreSQL của hệ thống.

3.4. Công cụ chấm điểm tự động: Thực thi cách ly bằng Docker

Trung tâm của hệ thống là công cụ chấm điểm tự động, được thiết kế để thực thi và đánh giá mã nguồn của sinh viên trong môi trường cách ly bảo mật. Nền tảng sử dụng công nghệ Docker để cô lập (sandbox) từng phiên thực thi mã nhằm đảm bảo an toàn, kiểm soát tài nguyên và khả năng tái lập.

Quy trình xử lý mỗi bài nộp diễn ra như sau:

i) Mã nguồn của sinh viên được gửi đến backend và xếp vào hàng đợi.

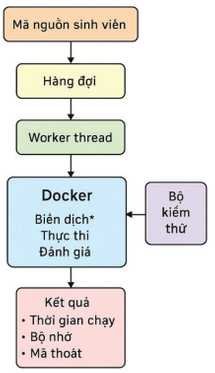
ii) Một luồng xử lý (worker thread) khởi tạo container Docker mới theo môi trường ngôn ngữ lập trình tương ứng (ví dụ: Python, C++, Java).

iii) Bên trong container, mã được biên dịch (nếu cần), thực thi và đánh giá dựa trên bộ kiểm thử định sẵn.

iv) Thời gian chạy, bộ nhớ sử dụng và mã thoát (exit code) được ghi nhận. Nếu bài làm cho kết quả đúng với tất cả các kiểm thử trong giới hạn tài nguyên, bài được đánh dấu "Đạt".

v) Sau khi hoàn tất, container được hủy để tránh rò rỉ tài nguyên.

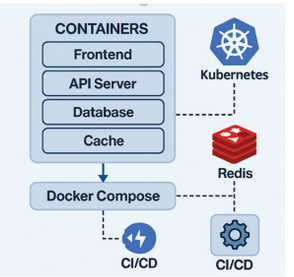
Docker đảm bảo giới hạn tài nguyên CPU và bộ nhớ cho mỗi container nhằm ngăn chặn lạm dụng (ví dụ: vòng lặp vô hạn). Hệ thống có cơ chế giới hạn thời gian chạy và kích thước đầu ra để phòng ngừa treo hệ thống. Mọi bản ghi chấm điểm đều được lưu để phục vụ phân tích hậu kỳ và gỡ lỗi (hình 4).



Hình 4. Công cụ chấm điểm tự động: Thực thi cách ly bằng Docker.

3.5. Tích hợp và triển khai hệ thống

Toàn bộ nền tảng được đóng gói và quản lý bằng Docker Compose, cho phép triển khai nhanh chóng trên nhiều môi trường khác nhau (máy chủ nội bộ, máy chủ đám mây hoặc VPS). Đối với các cơ sở giáo dục có ngân sách hạn chế, hệ thống có thể chạy ổn định trên một máy chủ đơn. Trong tương lai, để mở rộng quy mô, các thành phần có thể được tách riêng và triển khai trên Kubernetes hoặc hệ thống điều phối container tương đương (hình 5). Ngoài ra, hệ thống hỗ trợ tích hợp tùy chọn với bộ nhớ đệm Redis để xử lý hàng đợi và tăng tốc truy xuất. Các tập lệnh CI/CD cơ bản (ví dụ: GitHub Actions) được sử dụng để tự động hóa quá trình cập nhật và triển khai hệ thống.



Hình 5. Mô hình tích hợp và triển khai hệ thống sử dụng Docker Compose, Redis, CI/CD và hỗ trợ mở rộng với Kubernetes.

4. Đánh giá hiệu quả

Để đánh giá hiệu quả của nền tảng học lập trình trực tuyến tích hợp hệ thống chấm điểm tự động được đề xuất, nghiên cứu đã tiến hành một quá trình đánh giá theo phương pháp hỗn hợp, kết hợp thu thập dữ liệu định lượng và định tính. Mục tiêu của đánh giá là làm rõ tác động của nền tảng đối với kết quả học tập, mức độ tham gia và sự hài lòng của sinh viên, đồng thời xem xét cách hệ thống hỗ trợ giảng viên trong việc quản lý bài tập và cung cấp phản hồi. Quá trình đánh giá được triển khai trong suốt sáu tuần của học phần "Lập trình cơ bản" tại Trường Đại học Tân Trào, với sự tham gia của 50 sinh viên đại học thuộc các ngành không chuyên công nghệ thông tin.

4.1. Thiết kế đánh giá

Khung đánh giá bao gồm bốn thành phần chính:

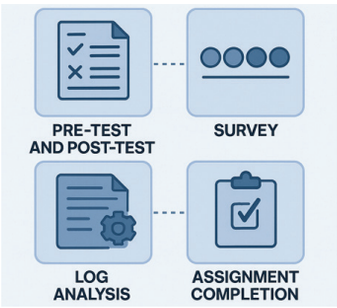
- Bài kiểm tra đầu khóa và cuối khóa nhằm đo lường sự tiến bộ về kiến thức lập trình và kỹ năng giải quyết vấn đề.

- Phiếu khảo sát theo thang đo Likert để thu thập nhận định của sinh viên về khả năng sử dụng hệ thống, hiệu quả phản hồi và mức độ hài lòng trong quá trình học.

- Phân tích nhật ký hoạt động của hệ thống nhằm lượng hóa hành vi học tập, tần suất nộp bài và hiệu suất qua các bộ kiểm thử.

- Đánh giá tỷ lệ hoàn thành và độ chính xác của bài tập để xác định mức độ tác động của hệ thống đối với hiệu quả học tập.

Nội dung học và thời lượng giảng dạy được giữ nguyên cho cả hai nhóm sinh viên: nhóm thực nghiệm (n=25) sử dụng nền tảng, và nhóm đối chứng (n=25) học theo phương pháp truyền thống với hình thức chấm điểm thủ công (hình 6).



Hình 6. Các phương pháp thu thập dữ liệu: bài kiểm tra trước và sau, khảo sát, phân tích log hệ thống và hoàn thành bài tập.

4.2. Phân tích kết quả tiền kiểm tra và hậu kiểm tra

Cả hai nhóm đều thực hiện bài kiểm tra chẩn đoán gồm 20 câu hỏi về các khái niệm lập trình cơ bản (biến, vòng lặp, điều kiện, hàm) vào đầu và cuối khóa học. Nhóm thực nghiệm cho thấy mức độ cải thiện có ý nghĩa thống kê, với điểm trung bình tăng từ 48,6 lên 76,2%, so với mức tăng từ 47,2 lên 63,8% của nhóm đối chứng. Kết quả kiểm định t (paired-samples t-test) cho thấy $p<0,01$, khẳng định sự cải thiện trong nhóm thực nghiệm là có ý nghĩa và không xảy ra ngẫu nhiên.

Điều này cho thấy phản hồi tức thời và mang tính lặp lại do hệ thống chấm điểm tự động cung cấp đã đóng vai trò then chốt trong việc củng cố kiến thức và giúp sinh viên sửa lỗi sớm ngay trong quá trình học.

4.3. Phản hồi của sinh viên qua khảo sát Likert

Kết thúc học phần, sinh viên nhóm thực nghiệm đã hoàn thành bảng khảo sát chi tiết theo thang đo Likert 5 mức độ (1 = hoàn toàn không đồng ý, 5 = hoàn toàn đồng ý), tập trung vào bốn khía cạnh: khả năng sử dụng nền tảng, mức độ rõ ràng của phản hồi, cảm nhận về sự tiến bộ trong học tập và động lực học.

Một số kết quả nổi bật bao gồm:

- Khả năng sử dụng và tiếp cận: 88% sinh viên đồng ý hoặc hoàn toàn đồng ý rằng nền tảng dễ sử dụng, không yêu cầu cài đặt phức tạp.

- Chất lượng phản hồi: 92% đánh giá phản hồi tự động là kịp thời và hữu ích trong việc hiểu và sửa lỗi.

- Tiến bộ trong học tập: 86% tin rằng họ cải thiện kỹ năng lập trình nhanh hơn so với các trải nghiệm học tập trước đó.

- Động lực và mức độ gắn kết: 84% cho biết họ cảm thấy có động lực hơn khi làm bài nhờ cơ chế phản hồi tức thì và hệ thống chấm điểm minh bạch.

Trong phần phản hồi mở, nhiều sinh viên chia sẻ rằng việc được thử nghiệm mã và nhận phản hồi ngay lập tức khiến quá trình học "bớt áp lực" và "giống như một trò chơi khám phá".

4.4. Phân tích nhật ký hệ thống và hành vi nộp bài

Để bổ sung cho dữ liệu khảo sát, nhóm nghiên cứu đã phân tích chi tiết nhật ký hoạt động của hệ thống. Các chỉ số thu thập bao gồm:

- Số lượt nộp bài trung bình mỗi bài tập: 6,2 lần, cho thấy hành vi học tập lặp lại - cải thiện qua thử nghiệm.

- Tỷ lệ hoàn thành bài tập: nhóm thực nghiệm đạt 96%, cao hơn đáng kể so với 68% của nhóm đối chứng.

- Thời gian trung bình để nộp bài thành công sau lần thử đầu tiên: giảm từ 42 phút (tuần 1) xuống còn 18 phút (tuần 6), cho thấy sự tiến bộ về hiệu quả giải quyết vấn đề.

- Tỷ lệ vượt qua từng bộ kiểm thử: tăng 27% trong suốt quá trình học, với số sinh viên vượt qua toàn bộ các trường hợp biên trong lần nộp đầu tiên nhiều hơn vào các tuần sau.

Dữ liệu từ hệ thống xác nhận rằng, sinh viên tích cực tham gia vào quá trình học thử - sai và sử dụng phản hồi để cải thiện dần bài làm. Đồng thời, dữ liệu này giúp giảng viên nhận diện các lỗi phổ biến để có biện pháp giảng dạy bổ trợ phù hợp, cả ở cấp độ lớp và cá nhân.

4.5. Quan điểm của giảng viên và giảm tải khối lượng công việc

Từ góc nhìn của giảng viên, hệ thống đã giúp giảm đáng kể thời gian dành cho các công việc chấm điểm lặp đi lặp lại. Trung bình, giảng viên báo cáo thời gian chấm bài giảm khoảng 70%, từ đó có thêm thời gian dành cho hỗ trợ cá nhân hóa và thảo luận chuyên sâu về nội dung môn học trong giờ học. Việc chấm điểm tự động cũng đảm bảo tính nhất quán và loại bỏ sự thiên lệch chủ quan - điều đặc biệt quan trọng trong các lớp học lập trình nhập môn với số lượng lớn sinh viên.

Bảng điều khiển của giảng viên cung cấp cái nhìn tức thời về tiến độ học tập của sinh viên, bao gồm các biểu đồ trực quan về tần suất nộp bài, xu hướng thành công và thời gian hoàn thành

mỗi bài. Các dữ liệu phân tích này được sử dụng để điều chỉnh tiến độ giảng dạy và xác định những sinh viên có nguy cơ tụt lại phía sau.

Tóm lại, quá trình đánh giá đã chứng minh rằng nền tảng học lập trình được đề xuất không chỉ cải thiện rõ rệt kết quả học tập và mức độ gắn kết của sinh viên mà còn mang lại giá trị hỗ trợ thực tiễn cho giảng viên trong việc giảng dạy hiệu quả hơn. Việc tích hợp cơ chế đánh giá tự động và phản hồi tương tác tạo ra một giải pháp học tập có khả năng mở rộng, tiết kiệm tài nguyên, đặc biệt phù hợp với các trường đại học tại vùng sâu, vùng xa đang trong quá trình hiện đại hóa chương trình đào tạo lập trình.

5. Kết luận và đề xuất

Nghiên cứu này đã trình bày quá trình thiết kế, triển khai và đánh giá một nền tảng học lập trình trực tuyến tích hợp hệ thống đánh giá tự động nhằm hỗ trợ hoạt động giảng dạy lập trình ở bậc đại học. Nền tảng được xây dựng với định hướng trọng tâm vào khả năng tiếp cận, khả năng mở rộng và hiệu quả sư phạm, đặc biệt phù hợp với các cơ sở giáo dục hoạt động trong điều kiện hạn chế về hạ tầng kỹ thuật. Thông qua việc kết hợp phản hồi tức thì, giao diện thân thiện với người dùng và cơ chế thực thi mã an toàn trong môi trường container cách ly, hệ thống cho phép sinh viên chủ động học tập theo tiến độ cá nhân và đồng thời giúp giảm đáng kể khối lượng công việc chấm điểm cho giảng viên.

Kết quả đánh giá thực nghiệm với 50 sinh viên đại học tại Trường Đại học Tân Trào đã khẳng định những lợi ích rõ rệt của hệ thống trong việc nâng cao kết quả học tập, tăng cường động lực học tập và cải thiện chất lượng giảng dạy lập trình nói chung. Sinh viên thể hiện mức độ hài lòng và sự tự tin cao hơn trong việc viết và gỡ lỗi chương trình, trong khi giảng viên được hỗ trợ đáng kể nhờ quy trình chấm điểm hiệu quả và minh bạch hơn. Đồng thời, phân tích nhật ký hệ thống cũng xác nhận rằng sinh viên đã chủ động tận dụng vòng phản hồi liên tục để cải thiện lời giải, qua đó làm nổi bật giá trị của việc đánh giá hình thành tức thời trong giáo dục lập trình.

Đóng góp của nghiên cứu này thể hiện trên hai phương diện chính. Thứ nhất, nghiên cứu cung cấp một giải pháp công nghệ khả thi, đáp ứng được các thách thức đặc thù mà các trường đại học tại khu vực đang phát triển thường gặp phải - đặc biệt là nhu cầu về một hệ thống học lập trình nhẹ, chạy trên trình duyệt và không phụ thuộc vào hạ tầng phức tạp. Thứ hai, nghiên cứu chứng minh rằng việc tích hợp có chủ đích giữa phản hồi tự động và phân tích học tập có thể thúc đẩy môi trường học tương tác, linh hoạt và phù hợp với người học mới bắt đầu.

Trong thời gian tới, nhiều hướng phát triển tiềm năng được đặt ra nhằm nâng cao hiệu quả và giá trị ứng dụng của nền tảng. Một trong những cải tiến quan trọng là tích hợp mô-đun gợi ý bài luyện tập cá nhân hóa, sử dụng các thuật toán học máy để phân tích hiệu suất của từng người học và đề xuất các bài tập phù hợp dựa trên khoảng trống kiến thức và lộ trình học tập. Điều này sẽ giúp khắc phục sự chênh lệch về trình độ giữa các sinh viên và thúc đẩy các lộ trình học thích ứng. Ngoài ra, việc ứng dụng phân tích hành vi học tập - như theo dõi mẫu chỉnh sửa mã, mức độ sử dụng gợi ý và chiến lược sửa lỗi - có thể cung cấp những hiểu biết sâu hơn về hành vi giải quyết vấn đề và hỗ trợ can thiệp sớm đối với người học có nguy cơ gặp khó khăn.

Một số hướng mở rộng khác bao gồm phát triển tính năng lập trình hợp tác, tích hợp các yếu tố trò chơi hóa để duy trì động lực học tập, bổ sung hỗ trợ đa ngôn ngữ nhằm mở rộng khả năng tiếp cận và kết nối hệ thống với nền tảng quản lý học tập (LMS) của nhà trường để tối ưu hóa công tác quản lý khóa học. Đồng thời, một nghiên cứu theo chiều dọc với quy mô lớn hơn, bao gồm nhiều cơ sở đào tạo và đa dạng đối tượng người học cũng đang được lên kế hoạch, nhằm đánh giá tính khái quát và tác động dài hạn của nền tảng đối với giáo dục lập trình trong các bối cảnh học tập khác nhau.

Tổng kết lại, nghiên cứu này đóng góp một cách tiếp cận mang tính thực tiễn, dựa trên dữ liệu và có cơ sở sư phạm vững chắc nhằm cải thiện chất lượng giáo dục lập trình trong giáo dục đại học. Bằng cách khai thác hiệu quả công nghệ tự động hóa và phản hồi thông minh, nền tảng không chỉ nâng cao kết quả học tập của sinh viên mà còn hỗ trợ giảng viên trong việc triển khai giảng dạy lập trình hiệu quả, có thể mở rộng và bao trùm - điều đặc biệt cần thiết trong thời đại chuyển đổi số của giáo dục.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P.J. Guo, J. Kim, R. Rubin (2014), "How video production affects student engagement: An empirical study of MOOC videos", *Proceedings of The First ACM Conference on Learning at Scale*, pp.41-50.

[2] P. Ihantola, T. Ahoniemi, V. Karavirta, et al. (2010), "Review of recent systems for automatic assessment of programming assignments", *Proceedings of The 10th Koli Calling International Conference on Computing Education Research*, pp.86-93, DOI: 10.1145/1930464.1930480.

[3] H. Keuning, J. Jeuring, B. Heeren (2018), "A systematic literature review of automated feedback generation for programming exercises", *ACM Transactions on Computing Education (TOCE)*, **19(1)**, pp.1-43, DOI: 10.1145/3231711.

[4] R. Zhi, A. Lishinski, R. Enbody (2019), "A novel AST-based programming assignment grader for Python", *Proceedings of The 50th ACM Technical Symposium on Computer Science Education*, pp.1084-1090, DOI: 10.1145/3287324.3287427.

[5] T.A. Dung (2021), "Application of automatic grading system in teaching C++ programming at university", *University of Danang - Journal of Science and Technology*, **19(3)**, pp.56-64 (in Vietnamese).

[6] N.T. Chinh, N.T.T. Huyen, V.P. Duy (2022), "Designing an automatic grading system to improve the self-learning ability of students at Hanoi National University of Education", *HNUE Journal of Science*, **67(2)**, pp.206-217 (in Vietnamese).

[7] L. Hoan, N.Q. Anh, P.N. Linh (2023), "Applying automatic code grading system for teaching programming languages in universities", *TNU Journal of Science and Technology*, **228(15)**, pp.224-234 (in Vietnamese).

Khử trùng môi trường nuôi cấy mô và kích thích sinh trưởng cây chuối ở giai đoạn ra rễ và vườn ươm bằng hạt nano bạc chitosan nồng độ thấp

Vũ Thị Huyền*, Lê Thị Hiên

Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/10/2024; ngày chuyển phản biện 22/10/2024; ngày nhận phản biện 15/11/2024; ngày chấp nhận đăng 20/11/2024

Tóm tắt:

Chuối là loại cây ăn quả chủ lực của Việt Nam. Để tạo ra một số lượng lớn cây giống chuối sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền, hiện nay đang sử dụng công nghệ nuôi cấy mô. Môi trường nuôi cấy mô được khử trùng ở nhiệt độ và áp suất cao. Trong bài báo này, hạt nano bạc chitosan (AgCS) tổng hợp được với kích thước 54 nm được sử dụng để khử trùng môi trường nuôi cấy mà không dùng nhiệt. Với nồng độ AgCS là 0,25 và từ 0,5 ppm trở lên, tỷ lệ môi trường không nhiễm vi sinh sau 4 tuần tương ứng là 96,7 và 100%. Khảo sát ảnh hưởng của AgCS (0,25-4 ppm) lên cây chuối ở giai đoạn ra rễ cho thấy, AgCS 0,25 ppm làm tăng chiều dài rễ (70%) và khối lượng tươi (30%). Cây chuối ngoài vườn ươm từ cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm đều sinh trưởng tốt hơn đối chứng. AgCS (0,25-0,5 ppm) làm tăng số rễ mới (khoảng 5 lần), chiều dài rễ mới (1,1-3 lần), chiều dài thân (1,4-1,7 lần) và khối lượng tươi (2,4-4,5 lần). Như vậy, AgCS vừa có khả năng khử trùng môi trường, vừa kích thích sinh trưởng cây chuối nuôi cấy mô giai đoạn ra rễ và giai đoạn vườn ươm.

Từ khóa: **cây chuối, hạt nano bạc chitosan, khử trùng môi trường, kích thích sinh trưởng, nuôi cấy mô thực vật.**

Chỉ số phân loại: **1.6, 2.9, 4.6**

Sterilising of tissue culture media and growth stimulation of banana seedlings at rooting and *ex vitro* nursery stages using chitosan silver nanoparticles at low concentration

Thi Huyen Vu*, Thi Hien Le

Faculty of Agriculture Technology, VNU University of Engineering and Technology, 144 Xuan Thuy Street, Cau Giay Ward, Hanoi, Vietnam

Received 19 October 2024; revised 15 November 2024; accepted 20 November 2024

Abstract:

Banana is a major fruit crop in Vietnam. Plant tissue culture technology is used to produce a large number of disease-free and genetically identical banana seedlings. Tissue culture media are generally thermally sterilised at high temperature and pressure. In this study, the synthesised highly stable silver chitosan nanoparticles (AgCS) with an average size of 54 nm were utilised for sterilising plant tissue culture media without thermal treatment. After four weeks, the percentage of uncontaminated culture media at concentrations of 0.25 and ≥0.5 ppm reached 96.7 and 100%, respectively. Investigation of the effects of AgCS (0.25-4 ppm) on tissue-cultured banana plantlets at the rooting stage showed that AgCS at 0.25 ppm increased root length and fresh weight by 70 and 30%, respectively. The *ex vitro* banana plantlets derived from *in vitro* cultures supplemented with AgCS 0.25 and 0.5 ppm grew better than the control. AgCS (0.25-0.5 ppm) increased the number of new roots (about 5 times), root length (1.1-3 times), pseudostem length (1.4-1.7 times), and fresh weight (2.4-4.5 times). In conclusion, AgCS can be used as a culture medium steriliser and plant growth stimulant for *in vitro* and *ex vitro* banana plantlets.

Keywords: **banana seedlings, culture media sterilant, growth stimulation, plant tissue culture, silver chitosan nanoparticles.**

Classification numbers: **1.6, 2.9, 4.6**

Tác giả liên hệ: Email: huyenvu@vnu.edu.vn

1. Mở đầu

Chuối là một trong 14 loại cây ăn quả thuộc Đề án Phát triển cây ăn quả chủ lực đến năm 2030 do Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phê duyệt theo Quyết định số 4085/QĐ-BNN-TT Hà Nội, ngày 27/10/2022. Theo đó, Việt Nam định hướng phát triển khoảng 165-175 ngàn ha chuối với sản lượng 2,6-3 triệu tấn/năm, trong đó chú trọng áp dụng đồng bộ các quy trình sản xuất tiên tiến trong sản xuất. Trong quy trình trồng chuối, việc phát triển số lượng lớn cây chuối sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền là một điều cần thiết. Để đáp ứng được điều đó, hiện nay đang sử dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Vô trùng là một trong những yếu tố quan trọng trong quy trình nuôi cấy mô tế bào thực vật để đảm bảo cây nuôi cấy mô khỏe mạnh với tỷ lệ cao là tiền đề tăng hiệu suất sản xuất cây giống sạch bệnh. Hiện nay, môi trường nuôi cấy mô thường được khử trùng bằng nhiệt độ và áp suất cao (khoảng 121^{o}C và 1 atm) trong 20 phút, với tổng thời gian khử trùng khoảng 2,5 giờ [1]. Trong trường hợp này, tỷ lệ nhiễm vi sinh của các mẫu cấy vẫn chiếm trên 10% có thể do thao tác cấy mẫu hoặc do môi trường xung quanh [2]. Vì vậy, với sự phát triển nhanh chóng của lĩnh vực công nghệ nano sinh học thực vật, có một số công trình nghiên cứu sử dụng các vật liệu nano như nano bạc [3], nano oxit kẽm [4] để khử trùng môi trường nuôi cấy mô và khử trùng mẫu cấy, kết hợp với khử trùng nhiệt để giảm tỷ lệ nhiễm vi sinh xuống tối thiểu. Bổ sung hạt nano bạc nồng độ 4 ppm vào môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc mà không khử trùng nhiệt có thể làm cho môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc không bị nhiễm vi sinh trong vòng 4 tuần [1].

Không những vậy, một số hạt nano với nồng độ phù hợp còn kích thích sinh trưởng và phát triển của cây nuôi cấy mô. Khử trùng mẫu cấy bằng nano bạc nồng độ 250 ppm trong vòng 15 đến 20 phút kết hợp với khử trùng môi trường bằng nano bạc cho thấy tăng một số chỉ tiêu về hóa sinh của cây cúc nuôi cấy mô [1]. Bổ sung hạt nano đồng nồng độ 9 ppm vào môi trường ra rễ của cây chuối làm tăng số lá, chiều dài rễ và chỉ số diệp lục tố [5].

Hạt nano bạc với các chất làm bền khác nhau có thể ảnh hưởng không giống nhau lên các cây nuôi cấy mô. Thông thường, các hạt nano bạc với chất làm bền bằng polyme tương thích sinh học sẽ ít gây ảnh hưởng tiêu cực đến tế bào thực vật hơn là hạt nano bạc được làm bền bằng polyme tổng hợp hoặc các chất làm bền hữu cơ khác. Trong số các polyme có nguồn gốc tự nhiên và tương thích sinh học với thực vật, chitosan đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng trong nuôi cấy mô thực vật [6].

Một yếu tố quan trọng khi sử dụng hạt nano bạc trong môi trường nuôi cấy mô thực vật là cần xác định khoảng nồng độ hạt của hạt nano bạc, sao cho trong khoảng nồng độ này, hạt nano bạc có tác dụng khử trùng môi trường, đồng thời không ảnh hưởng tiêu cực đến cây nuôi cấy mô. Trong công trình của S.M. Tamimi và cs (2023) [7], nồng độ nano bạc 12 ppm trong môi trường nuôi cấy mô kích thích sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô, trong khi nồng độ 15 ppm ức chế sự phát triển. Trong khi đó, trong công trình của P. Siriporn và cs (2024) [8], hạt nano bạc nồng độ 100 ppm trong môi trường nuôi cấy kích thích cây phát triển tốt hơn so với đối chứng.

Do đó, trong công trình này nghiên cứu sử dụng hạt nano bạc được làm bền bằng chitosan - một polyme tương thích sinh học với thực vật để khử trùng môi trường nuôi cấy mô cây chuối trong vòng 4 tuần mà không kết hợp với khử trùng nhiệt. Đồng thời, nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc chitosan tại các nồng độ xung quanh nồng độ khử trùng được môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng và phát triển của cây chuối nuôi cấy mô, trong giai đoạn ra rễ và giai đoạn vườn ươm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các vật liệu sử dụng: $AgNO_3$ (Fisher Chemical), $NaBH_4$ (Weng Jiang Reagent) và chitosan (Bio Basic). Nguồn mẫu chồi chuối được sử dụng là các chồi *in vitro* của cây chuối già Nam Mỹ (*Cavendish bananas*) được nhân đủ số lượng thí nghiệm tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô (Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội), mẫu 4 tuần tuổi và chiều cao cây khoảng 2 cm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tổng hợp hạt nano bạc chitosan: Hạt nano bạc chitosan (AgCS) được tổng hợp theo phương pháp khử dung dịch bạc nitrat bằng chất khử $NaBH_4$, sử dụng chất làm bền chitosan được mô tả ở công trình [9], trong đó thể tích tổng hợp là 200 ml, nồng độ của bạc nitrat, chitosan và $NaBH_4$ lần lượt là 4,95 mM, 500 µg/ml, 9,9 mM. Hạt nano bạc sau khi tổng hợp được đặc trưng bằng quang phổ kế hấp thụ trong vùng UV-Vis (nano Thermo Scientific NanoDrop 8000). Phân bố kích thước hạt và thế zeta được đo bằng thiết bị tán xạ ánh sáng động (SZ-100Z2).

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan đến khả năng khử trùng môi trường: Môi trường MS được bổ sung 30 g/l đường, 5 g/l agar và hạt nano bạc chitosan với các nồng độ khác nhau (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 ppm); mỗi nồng độ hạt nano tương ứng với một nghiệm thức. Sau đó không hấp khử trùng môi trường bằng nhiệt độ cao mà chỉ đun trên bếp từ, vừa đun vừa khuấy cho đến khi sôi (tổng thời gian đun là khoảng 1 phút). Đổ môi trường ra các túi nilon (50 ml/túi, túi không khử trùng trước đó), gấp miệng túi và cài lại bằng ghim. Mỗi nghiệm thức làm 10 túi môi trường và lặp lại 3 lần. Mẫu đối chứng được chuẩn bị tương tự, nhưng không bổ sung hạt nano bạc chitosan và được hấp khử trùng bằng nhiệt (118^{o}C trong 20 phút), (tổng thời gian hấp khử trùng là khoảng 2,5 giờ). Sau đó, các mẫu môi trường nuôi cấy mô được để trên giá nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25±2^{o}C, độ ẩm trung bình 55-60% và theo dõi số túi không bị nhiễm vi sinh sau 4 tuần. Tỷ lệ mẫu không bị nhiễm vi sinh được xác định theo công thức sau:

$$D = \frac{n_D \times 100}{n} (\%)$$

trong đó: D là tỷ lệ % mẫu không nhiễm; n_D là số mẫu không bị nhiễm; n là tổng số mẫu.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan lên cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ: Môi trường sử dụng trong thí nghiệm này là môi trường MS, bổ sung 30 g/l đường

saccharose, 5 g/l agar và AgCS với các nồng độ 0,25; 0,5; 1; 2 và 4 ppm. Môi trường này không khử trùng bằng nhiệt, mà chỉ đun sôi và đổ vào các túi nilon (túi không được khử trùng nhiệt) với thể tích 50 ml/túi, gập miệng túi và cài lại bằng ghim. Môi trường đối chứng là môi trường MS, bổ sung 30 g/l đường, 5 g/l agar, không bổ sung AgCS và hấp khử trùng ở 118°C trong 20 phút; sau đó đổ vào các túi nilon đã được khử trùng ở cùng điều kiện trên. Mỗi công thức môi trường làm 10 túi.

Đặt các mẫu chồi chuối vào các túi môi trường với mật độ 5 chồi/túi. Các túi nuôi cấy này sau đó được đặt lên các giàn nuôi cấy mô, với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 25±2°C, độ ẩm trung bình 55-60%. Thu nhận các chỉ tiêu như tổng số rễ/cây, chiều dài rễ, chiều dài thân, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá, hàm lượng diệp lục, khối lượng tươi sau 4 tuần. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

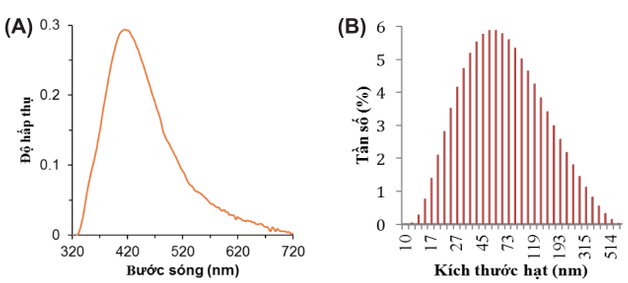
Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của hạt nano bạc chitosan lên cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ex vitro ngoài vườn ươm: Cây *in vitro* hoàn chỉnh sau khi thu các chỉ tiêu (đối với mẫu trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm và mẫu đối chứng) được đưa ra vườn ươm trồng trên giá thể xơ dừa và trấu hun với tỷ lệ 1/1. Tưới nước giữ ẩm cho cây 2 lần/ngày. Tiếp tục đánh giá tác động của AgCS bổ sung trong môi trường ở giai đoạn trước lên sự phát triển của cây con thông qua các chỉ tiêu như tổng số rễ/cây, số rễ mới, chiều dài rễ mới, chiều dài thân, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi sau 4 tuần.

Phương pháp phân tích và xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thô bằng phần mềm Microsoft Excel, sau đó phân tích kiểm định ANOVA và Duncan ở mức $p<0,05$ bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính chất hạt nano bạc

Dung dịch keo nano bạc chitosan (AgCS) có màu nâu ánh cam. Phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch keo AgCS pha loãng 10 lần có bước sóng hấp thụ cực đại λ_{max}=415 nm đặc trưng cho hạt nano bạc và độ hấp thụ cực đại đạt 0,281; tương đương với độ hấp thụ cực đại của dung dịch gốc là 2,81 (hình 1A). Hạt AgCS có kích thước thủy động lực học trung bình là 54±1 nm (hình 1B). Dung dịch keo AgCS sau khi pha loãng 10 lần có giá trị thế zeta trung bình là +30,0±1,5 mV; thể hiện hạt nano bạc mang điện tích dương và dung dịch keo AgCS có độ ổn định cao.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis (A) và phổ phân bố kích thước hạt phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (B) của dung dịch keo AgCS.

3.2. Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô thực vật của AgCS

Kết quả thí nghiệm về khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô của AgCS mà không khử trùng ở nhiệt độ và áp suất cao được trình bày ở bảng 1. Kết quả thực nghiệm cho thấy, 100% mẫu môi trường với nồng độ AgCS từ 0,5 đến 4 ppm không bị nhiễm vi sinh vật trong 4 tuần (bảng 1). Bốn tuần là thời gian cần thiết thông thường cho một giai đoạn nuôi cấy mô tế bào thực vật (vào mẫu, nhân chồi, nhân nhanh, ra rễ). Mẫu môi trường bổ sung AgCS 0,25 ppm thì tỷ lệ không nhiễm vi sinh đạt 96,7±3,3%, cao hơn mẫu đối chứng được khử trùng bằng nhiệt độ, đạt 90±10%. Mẫu môi trường không khử trùng bằng nhiệt, đồng thời không bổ sung AgCS tỷ lệ không bị nhiễm vi sinh chỉ đạt 60±10%, vì điều kiện nuôi cấy mô cũng là điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển trên môi trường giàu dinh dưỡng như MS.

So với công bố của H.T. Tung và cs (2021) [1] đã khử trùng được 100% môi trường nuôi cấy mô cây hoa cúc khi sử dụng hạt nano bạc chitosan ở nồng độ 4 ppm mà không kết hợp với dùng nhiệt (không công bố các đặc trưng về kích thước, độ hấp thụ và thế zeta của hạt nano này), thì trong công trình này hạt nano bạc chitosan ở nồng độ 0,25-0,5 ppm đã có thể khử trùng được môi trường nuôi cấy mô với tỷ lệ cao.

Ngoài ra, một số công trình kết hợp giữa khử trùng môi trường nuôi cấy mô bằng nhiệt với hạt nano bạc để khử trùng môi trường nuôi cấy. Với hạt nano bạc sử dụng chất làm bền polyvinylpyrrolidone (PVP) có kích thước trung bình 70 nm, tại nồng độ 5 ppm có thể làm giảm tỷ lệ nhiễm xuống 50% [3]. Trong khi đó, hạt nano bạc (không công bố chất làm bền) kích thước 5 nm có thể khử trùng được 88,4% môi trường khi bổ sung hạt nano bạc 3 ppm vào môi trường đã khử trùng nhiệt [2].

Bảng 1. Khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô sau 4 tuần của AgCS.

	Nồng độ AgCS bổ sung vào môi trường (ppm)	Tỷ lệ mẫu không bị nhiễm (%)
Đối chứng có khử trùng bằng nhiệt 0		90±10
Không khử trùng bằng nhiệt	0	60±10
	0,25	96,7±3,3
	0,5	100±0
	1	100±0
	2	100±0
	4	100±0

Như vậy, môi trường nuôi cấy mô bổ sung AgCS với nồng độ từ 0,5 ppm trở lên không bị nhiễm vi sinh sau 4 tuần. Đây là nồng độ thấp nhất của hạt nano bạc có thể khử trùng môi trường nuôi cấy mô MS bổ sung 30 g/l saccharose cho đến thời điểm này.

3.3. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên cây chuối nuôi cấy mô giai đoạn ra rễ

Một yếu tố quan trọng khi sử dụng hạt nano bạc trong môi trường nuôi cấy mô thực vật là cần xác định khoảng nồng độ hạt của hạt nano bạc, sao cho trong khoảng nồng độ này, hạt nano bạc có tác dụng khử trùng môi trường, đồng thời ảnh hưởng tích cực đến cây nuôi cấy mô (cây chuối *in vitro*) trong môi trường đó.

Các chỉ số sinh trưởng phát triển của cây chuối nuôi cấy trong môi trường ra rễ có bổ sung AgCS với các nồng độ từ 0,25 đến 4 ppm và không khử trùng bằng nhiệt được thu thập sau 4 tuần nuôi, so sánh với cây chuối đối chứng nuôi trong môi trường ra rễ khử trùng bằng nhiệt. Sau 4 tuần, một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây được thu thập và xử lý thống kê cho kết quả có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 2). Cây chuối trong môi trường bổ sung AgCS, với nồng độ 0,25 ppm có chiều dài rễ tăng 1,7 lần, hàm lượng diệp lục tăng 1,2 lần và khối lượng tươi tăng 1,3 lần so với cây đối chứng. Các chỉ tiêu tổng số rễ/cây, chiều dài thân, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá ở mẫu nghiên cứu và mẫu đối chứng là tương đương.

Bảng 2. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ.

	Đối chứng khử trùng bằng nhiệt	0,25 ppm	0,5 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm
Tổng số rễ/cây	6,400±0,053^{b}	6,400±0,416^{b}	3,467±0,437^{a}	3,778±0,188^{a}	3,573±0,053^{a}	3,575±0,003^{a}
Chiều dài rễ (cm)	12,433±0,220^{a}	20,960±0,421^{c}	17,420±0,240^{b}	17,840±0,175^{b}	17,789±0,033^{b}	17,761±0,010^{b}
Chiều dài thân (cm)	2,667±0,033^{b}	2,667±0,035^{b}	2,247±0,178^{a}	2,320±0,024^{a}	2,304±0,016^{a}	2,309±0,002^{a}
Số lá	3,867±0,133^{b}	4,067±0,291^{b}	3,267±0,176^{a}	3,368±0,042^{a}	3,373±0,020^{a}	3,362±0,004^{a}
Chiều dài lá (cm)	4,720±0,083^{b}	4,858±0,013^{b}	3,773±0,085^{a}	3,917±0,062^{a}	3,874±0,011^{a}	3,870±0,002^{a}
Chiều rộng lá (cm)	1,980±0,020^{c}	1,887±0,027^{b}	1,833±0,007^{a}	1,838±0,002^{a}	1,838±0,001^{a}	1,838±0,003^{a}
Hàm lượng diệp lục (SPAD)	37,687±0,079^{a}	44,313±0,569^{b}	37,800±0,510^{a}	38,647±0,473^{a}	38,279±0,104^{a}	38,245±0,008^{a}
Khối lượng tươi (g)	1,984±0,044^{b}	2,484±0,218^{c}	1,629±0,106^{a}	1,763±0,052^{ab}	1,736±0,009^{ab}	1,732±0,002^{ab}

Các chữ a, b, c trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p<0,05 theo phép thử Duncan.

Cây chuối nuôi cấy trong môi trường bổ sung AgCS với nồng độ 0,5 ppm trở lên có chiều dài rễ tăng lên 1,4 lần. Tuy nhiên, tổng số rễ/cây, chiều cao cây, số lá, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi giảm và có hàm lượng diệp lục tương đương so với mẫu đối chứng. Kết quả này cho thấy, AgCS với nồng độ 0,25 ppm có hiệu quả kích thích sinh trưởng cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ tốt hơn các nồng độ còn lại.

Hiệu quả kích thích sinh trưởng và phát triển cây chuối ở giai đoạn ra rễ của một số loại hạt nano bạc khác cũng đã được công bố trước đó. Trong môi trường bổ sung hạt nano bạc 12 ppm, có khử trùng ở 121^{o}C trong 15 phút, làm tăng số rễ 3,3 lần, chiều dài rễ 3,9 lần và hàm lượng diệp lục 1,3 lần [7]. Trong một nghiên cứu khác, hạt nano bạc nồng độ 3 ppm được bổ sung vào sau khi môi trường khử trùng bằng nhiệt làm tăng chiều cao, khối lượng tươi, số lá, số rễ và hàm lượng diệp lục [2]. Trong khi đó, hạt nano bạc chitosan mà chúng tôi sử dụng với nồng độ khá thấp (0,25 ppm) cũng làm tăng chiều dài rễ, hàm lượng diệp lục và khối lượng tươi. Điều này cho thấy, các loại hạt nano bạc khác nhau với cách thức bổ sung vào môi trường nuôi cấy khác nhau sẽ tác động không giống nhau lên các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây chuối *in vitro*. Mỗi loại hạt nano bạc với quy trình ứng dụng khác nhau sẽ có nồng độ tối ưu riêng cho sự phát triển của cây chuối.

Bên cạnh đó, cây chuối trong môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm có bộ rễ màu trắng và có rễ tơ tương tự so với cây đối chứng (hình 2). Trong khi đó, cây chuối trong môi trường bổ sung AgCS nồng độ 1, 2 và 4 ppm có ít rễ tơ hơn đối chứng, các rễ mới sinh ra nằm trong môi trường có màu đen và các rễ mới không nằm trong môi trường có màu trắng.



Hình 2. Cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ trên môi trường có bổ sung hạt nano bạc chitosan với các nồng độ 0,25-4 ppm.

Như vậy, AgCS với nồng độ 0,25 ppm bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô không những có khả năng khử trùng môi trường nuôi cấy mô đạt 96,7±3,3% mà còn có khả năng tăng một số chỉ tiêu sinh trưởng quan trọng của cây chuối *in vitro* ở giai đoạn ra rễ.

3.4. Cây chuối ex vitro giai đoạn vườn ươm

Vì cây chuối *in vitro* trong môi trường ra rễ với AgCS 0,25 và 0,5 ppm có bộ rễ trắng và một số chỉ số sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng, nên các cây này đã được lựa chọn để trồng ngoài vườn ươm (cây chuối *ex vitro*) và theo dõi một số chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển.

Kết quả cho thấy, một số chỉ tiêu như số rễ mới/cây, chiều dài rễ mới, chiều dài lá, chiều rộng lá và khối lượng tươi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cụ thể là, cây *in vitro* được ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm đều cho cây con *ex vitro* ngoài vườn ươm sinh trưởng tốt hơn so với mẫu đối chứng về tổng số rễ/cây, số rễ mới/cây, chiều dài rễ mới, chiều dài thân, chiều dài lá, chiều rộng lá và khối lượng tươi (bảng 3).

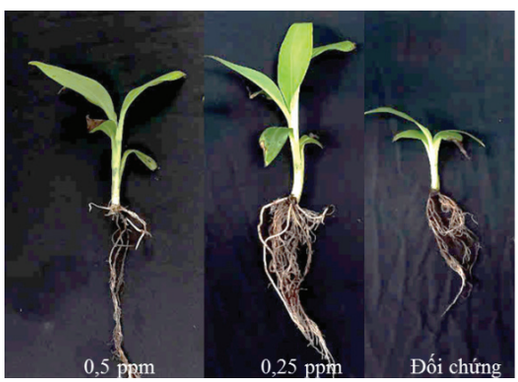
Bảng 3. Ảnh hưởng của hạt nano bạc lên một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm.

	Đối chứng khử trùng bằng nhiệt	0,25 ppm	0,5 ppm
Tổng số rễ/cây	6,50±0,50^{a}	10,00±0,50^{c}	8,50±0,25^{b}
Số rễ mới/cây	1,00±0,50^{a}	4,50±0,50^{b}	5,00±1,00^{b}
Chiều dài rễ mới (cm)	5,25±0,25^{a}	15,75±1,25^{b}	6,00±0,50^{a}
Chiều dài thân (cm)	4,50±0,50^{a}	7,75±0,25^{c}	6,25±0,75^{b}
Chiều dài lá (cm)	5,50±0,50^{a}	9,75±0,25^{b}	8,00±0,50^{b}
Chiều rộng lá (cm)	2,00±0,10^{a}	3,50±0,10^{b}	2,70±0,30^{ab}
Khối lượng tươi (g)	1,74±0,02^{a}	7,77±0,23^{c}	4,20±0,63^{b}

Các chữ a, b, c trên cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức p<0,05 theo phép thử Duncan.

Cây con *ex vitro* ngoài vườn ươm từ cây nuôi trong môi trường ra rễ có bổ sung AgCS 0,25 ppm và 0,5 ppm có tổng số rễ/cây tăng 1,5 và 1,3 lần, số rễ mới/cây tăng 4 và 5 lần, chiều dài rễ mới tăng 3 và 1,1 lần, chiều dài thân tăng 1,7 và 1,4 lần, chiều dài và chiều rộng lá tăng 1,8 và 1,4 lần, khối lượng tươi tăng 4,5 và 2,4 lần so với cây *ex vitro* đối chứng nuôi cấy trên môi trường khử trùng bằng nhiệt. Kết quả này cho thấy hiệu quả vượt trội so với công bố trước đây đã sử dụng hạt nano bạc để tưới cho cây chuối con ngoài vườn ươm [2]. Từ đây cũng có thể thấy, liệu pháp mà chúng tôi sử dụng là bổ sung nano bạc vào giai đoạn ra rễ của cây và không cần tưới bổ sung hạt nano bạc ở vườn ươm có hiệu quả tốt hơn.

Bên cạnh đó, cây con ngoài vườn ươm phát triển từ cây *in vitro* trên môi trường có bổ sung AgCS không có sự khác biệt về hình thái lá so với cây đối chứng nuôi cấy trên môi trường khử trùng bằng nhiệt (hình 3).



Hình 3. Cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm phát triển từ cây ra rễ trên các môi trường có bổ sung hạt nano bạc chitosan nồng độ 0,25 và 0,5 ppm.

Như vậy, cây chuối *ex vitro* ngoài vườn ươm phát triển từ cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgCS 0,25 và 0,5 ppm sinh trưởng và phát triển tốt với một số chỉ tiêu cao hơn ở cây đối chứng.

4. Kết luận

Sử dụng hạt nano bạc chitosan (AgCS) với nồng độ 0,25-0,5 ppm để khử trùng môi trường nuôi cấy mô có thể đạt tỷ lệ vô trùng 96,7-100% trong 4 tuần là một phương pháp đơn giản, tiết kiệm chi phí và thời gian so với phương pháp khử trùng môi trường bằng nhiệt thường quy. Cho đến hiện nay, đây cũng là nồng độ thấp nhất của hạt nano bạc có thể khử trùng tuyệt đối môi trường nuôi cấy trong 4 tuần. Không những vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung AgCS ở nồng độ 0,25-0,5 ppm còn có tác dụng kích thích sinh trưởng và phát triển của cây chuối nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ và tạo sức bật giúp cây con tăng trưởng nhanh ở giai đoạn *ex vitro* ngoài vườn ươm. Với tiềm năng kép này, có thể nghiên cứu ứng dụng hạt nano bạc chitosan trong nuôi cấy mô cây chuối với quy mô công nghiệp để giảm chi phí sản xuất cây giống và tăng chất lượng cây giống; đồng thời có thể mở rộng với các đối tượng cây nuôi cấy mô khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội theo đề tài mã số CN23.03. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong, et al. (2021), "Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, **57**, pp.897-906, DOI: 10.1007/s11627-021-10163-7.

[2] M.H. Tra, D.M. Anh, D.T. Phat, et al. (2017), "Effect of silver nanoparticles amount on inoculating banana (*Musa nana* Lour) *in vitro*", *Journal of Science of Lac Hong University*, **Special Issue**, pp.149-152 (in Vietnamese).

[3] I. Andújar, N. González, J.C.G. Ramos, et al. (2020), "Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the *in vitro* culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied", *SN Appl. Sci.*, **2**, DOI: 10.1007/s42452-020-03948-9.

[4] K. Nazir, S.W. Hassan, M.I. Khan, et al. (2023), "The use of ZnO NPs and Ag NPs along with sterilizing agents for managing contamination in banana tissue culture", *Biomass Conv. Bioref.*, DOI: 10.1007/s13399-023-04623-w.

[5] M. Hasanin, A.H. Hashem, I. Lashin, et al. (2023), "*In vitro* improvement and rooting of banana plantlets using antifungal nanocomposite based on myco-synthesized copper oxide nanoparticles and starch", *Biomass Conv. Bioref.*, **13**, pp.8865-8875, DOI: 10.1007/s13399-021-01784-4.

[6] N. Coelho, A. Romano (2022), "Impact of chitosan on plant tissue culture: Recent applications", *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, **148**, pp.1-13, DOI: 10.1007/s11240-021-02156-6.

[7] S.M. Tamimi, H.O. Silver (2023), "Nanoparticles for enhancing the efficiency of micropropagation of banana (*Musa acuminata* L.)", *Trop Life Sci. Res.*, **34(2)**, pp.161-175, DOI: 10.21315/tlsr2023.34.2.8.

[8] P. Siriporn, L. Thitikamon, B. Thanyaporn, et al. (2024), "Effect of biosynthesised silver nanoparticles as sterilant on physiological and biochemical characteristics in micropropagation of *Musa sapientum* L.", *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, **15(2)**, DOI: 10.1088/2043-6262/ad3b7d.

[9] L.T. Hien, N.T.P. Hue, L.T. Duc, et al. (2022), "Synthesis of chitosan stabilized silver nanoparticles and evaluation of the *in vitro* antibacterial activity against *Xanthomonas Oryzae* PV. oryzae causing blight disease of rice", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **38(1)**, pp.1-9, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5223.

 DOI: 10.31276/VJST.2024.2948

Đặc điểm hình thái và điều kiện sinh trưởng hệ sợi của nấm dược liệu *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. ghi nhận lần đầu tại Việt Nam

Lê Thanh Huyền[1*], Bùi Phương Anh[2], Nguyễn Khánh Linh[1, 3], Trịnh Tam Kiệt[4]

[1]Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội, 41A Phú Diễn, phường Phú Diễn, Hà Nội, Việt Nam
[2]Công ty TNHH Hương gia vị Sơn Hà, Phố Quế, phường Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam
[3]Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, Hà Nội, Việt Nam
[4]Viện Nấm và Công nghệ Sinh học, 344 Trần Hữu Dực, phường Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/9/2024; ngày chuyển phản biện 12/9/2024; ngày nhận phản biện 4/10/2024; ngày chấp nhận đăng 10/10/2024

Tóm tắt:

Nấm ăn và nấm dược liệu có ý nghĩa quan trọng trong đời sống cũng như trong nghiên cứu khoa học. *Pleurotus tuber-regium* (Syn. *Lentinus tuber-regium*), hay còn gọi là nấm Sữa hổ, là loài nấm nhiệt đới, phân hủy gỗ, có thể trồng ở nhiều loại cơ chất khác nhau. Quả thể nấm phát triển tại các khu vực có điều kiện ẩm và nhiều chất xơ. Mẫu nấm dược liệu *P. tuber-regium* được thu thập từ Khu bảo tồn thiên nhiên Thượng Tiến, tỉnh Phú Thọ, là loài nấm được ghi nhận lần đầu cho khu hệ nấm Việt Nam. Trong nghiên cứu này, các đặc điểm hình thái, điều kiện sinh trưởng hệ sợi của nấm dược liệu *P. tuber-regium* đã được phân tích. Hệ sợi của nấm dược liệu được phân lập thuần, sau đó nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy trên các môi trường khác nhau gồm potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA) và Czapek-Dox agar (Czapek) với nhiệt độ (20, 25, 30, 35°C) lên tốc độ sinh trưởng, pH (6,0-6,5-7,0). Kết quả thu được mẫu nấm dược liệu sinh trưởng và phát triển thích hợp ở môi trường PDA, ở nhiệt độ 25 *và* 30°C và pH tối ưu 6,5.

Từ khóa: **hệ sợi, nấm dược liệu *Pleurotus tuber-regium*, nhiệt độ, pH, Việt Nam.**

Chỉ số phân loại: **1.6, 3.4**

Morphological characteristics and mycelial growth conditions of the medicinal mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. first recorded in Vietnam

Thanh Huyen Le[1*], Phuong Anh Bui[2], Khanh Linh Nguyen[1, 3], Tam Kiet Trinh[4]

[1]Hanoi University of Natural Resources and Environment, 41A Phu Dien Street, Phu Dien Ward, Hanoi, Vietnam
[2]Son Ha Spice & Flavorings Co. Ltd., Que Street, Tu Son Ward, Bac Ninh Province, Vietnam
[3]Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Hanoi, Vietnam
[4]Institute of Mycology and Biotechnology, 344 Tran Huu Duc Street, Tu Liem Ward, Hanoi, Vietnam

Received 10 September 2024; revised 4 October 2024; accepted 10 October 2024

Abstract:

Edible and medicinal mushrooms are of great importance in daily life as well as in scientific research. *Pleurotus tuber-regium* (syn. *Lentinus tuber-regium*) is a tropical, wood-decaying mushroom species that can be cultivated on a wide range of substrates. Its fruiting bodies develop in environments with moist conditions and high fiber content. The specimen of the medicinal mushroom *P. tuber-regium* was collected from Thuong Tien Nature Reserve in Phu Tho province, representing the first recorded occurrence of this species in the fungal flora of Vietnam. In this study, the morphological characteristics and mycelial growth conditions of the medicinal mushroom *P. tuber-regium* were analysed. The mycelium of medicinal mushroom was aseptically isolated and purified, and then the effects of different culture conditions were investigated using various media, including potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA), and Czapek-Dox agar (Czapek), as well as different temperatures (20, 25, 30, and 35°C), and pH levels (6.0, 6.5, and 7.0). The results indicated that the medicinal mushroom samples grew and developed optimally on PDA medium at temperatures of 25-30°C and an optimal pH of 6.5.

Keywords: **mycelium, pH, *Pleurotus tuber-regium*, temperature, Vietnam.**

Classification numbers: **1.6, 3.4**

[*]Tác giả liên hệ: Email: lthuyen@hunre.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Nấm ăn và nấm dược liệu có ý nghĩa quan trọng trong đời sống cũng như trong nghiên cứu khoa học. Nấm ăn được coi là nguồn thực phẩm sạch, có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Không chỉ vậy, một số loài nấm còn có khả năng sinh hoạt chất sinh học trong ngăn ngừa và chữa trị một số bệnh như: tiểu đường, huyết áp, tim mạch, béo phì, chống ung thư, tăng cường miễn dịch. Bên cạnh đó theo A. Sharma và cs (2017) [1] là loài nấm có khả năng kháng virus, chống oxy hóa. S. Dandapat và cs (2020) [2] xác nhận là loài nấm không có độc tính hay gây độc khi thử nghiệm trên chuột đồng thời là loài nấm có khả năng làm giảm cholesterol trong máu và khi sử dụng *P. tuber-regium* có lợi cho sức khỏe và có thể ngăn ngừa các bệnh liên quan đến tăng cholesterol máu và duy trì sức khỏe sinh sản nam tốt.

Pleurotus tuber-regium (Syn. *Lentinus tuber-regium*), là loài nấm nhiệt đới, phân hủy gỗ, có thể trồng ở nhiều loại cơ chất khác nhau. Quả thể nấm phát triển tại các khu vực có điều kiện ẩm và nhiều chất xơ. Loài nấm này được phân bố các khu vực gần xích đạo như: Châu Phi, Madagascar, Ấn Độ, Sri Lanka, Đông Nam Châu Á, Papua New Guinea và phía Bắc của nước Úc theo nghiên cứu của S.I. Omoanghe và cs (2005) [3].

Hiện nay, ở Việt Nam có nhiều nghiên cứu về các nhóm nấm ăn và nấm dược liệu phục vụ cho lĩnh vực nông nghiệp và y học. Các nhóm nấm ăn và nấm dược liệu được nuôi trồng ở Việt Nam cũng như phổ biến trên thị trường rất nhiều như: Sò trắng, Sò tím, Sò vàng, Sò hồng, Đùi gà, Hải sản, Kim châm trắng, Kim châm vàng, nấm Mỡ..., nhưng chưa có nghiên cứu đến nấm Sữa hổ. Nấm *P. tuber-regium* vừa là nấm ăn vừa là nấm dược liệu, đã thu hút sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới. Có thể nói *P. tuber-regium* là một loài nấm quý hiếm và có giá trị cao về cả dinh dưỡng hay tác dụng cùng với giá trị kinh tế khá lớn. Thành phần dinh dưỡng của nấm bao gồm các chất dinh dưỡng cơ bản như protein, carbohydrate, lipid, vitamin và khoáng chất, cùng với các hợp chất sinh học đặc biệt như polysaccharide, triterpenoid và flavonoid. Hiểu rõ về thành phần dinh dưỡng này không chỉ giúp tăng cường kiến thức về giá trị dinh dưỡng của nấm mà còn mở ra cơ hội trong việc phát triển các sản phẩm chức năng và các liệu pháp điều trị bệnh mới. Chính vì vậy, đã có một vài nghiên cứu trên thế giới nghiên cứu nuôi trồng nấm này như J.A. Okhuoya và cs (1991) [4], đây chính là loài nấm có nhiều tiềm năng cho thực phẩm và dược liệu [3, 4].

Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện nay cũng chưa có công bố nào về đặc điểm sinh học và thành phần dinh dưỡng của nấm *P. tuber-regium* một cách đầy đủ và chi tiết, đặc biệt là nấm có nguồn gốc từ rừng ở Việt Nam. Bên cạnh đó, Khu bảo tồn thiên nhiên Thượng Tiến là nơi có đầy đủ các điều kiện tự nhiên cũng như hệ sinh thái rừng tự nhiên rất tốt cho các nhóm loài động thực vật phát triển đồng thời là nơi đa dạng sinh học các loài nấm ăn được và nấm dược liệu phát triển rất phong phú, là nơi lý tưởng cho sự phát triển của loại nấm *P. tuber-regium*. Với mong muốn, thông qua nghiên cứu tìm hiểu sâu hơn về loài nấm này, có thể đóng góp vào việc khai thác, nuôi trồng và sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên nấm quý báu này, đồng thời mở ra những cơ hội mới trong không chỉ trong dinh dưỡng mà còn trong lĩnh vực y học. Nghiên cứu về đặc điểm sinh học và một số điều kiện sinh trưởng và phát triển hệ sợi của *P. tuber-regium* từ khu vực này không chỉ mang lại thông tin quý giá về tính chất của loài nấm mà còn đóng góp vào việc bảo vệ và tận dụng tài nguyên thiên nhiên.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và địa điểm thu mẫu

Mẫu nấm được thu thập tại Khu bảo tồn thiên nhiên Thượng Tiến, tỉnh Phú Thọ. Khu bảo tồn có địa hình hiểm trở, nhiều suối và đồi núi. Khu vực đi khảo sát và thu mẫu là khu vực đi qua khu suối thuộc xã Mường Động. Đường đi lên khu vực đồi cao với kiểu rừng nguyên sinh, nhiều cây bụi và cây lâu năm có đường kính lớn, độ ẩm rừng 70%. Khu vực thu mẫu có vĩ độ 20.28.37,58’ và kinh độ 105.25.59,07’’, tại khu vực đỉnh đồi thu được mẫu nấm dưới gốc cây to, xung quanh có nhiều cành gỗ mục.

2.2. Phân lập nấm dược liệu P. tuber-regium

Mẫu được phân lập trên môi trường PDA, nuôi cấy hệ sợi và tách hệ sợi thuần không lẫn tạp hệ sợi nấm mốc và các vi sinh vật khác. Phân lập nhiều lần đến khi quan sát dưới kính hiển vi thấy các khuẩn lạc hệ sợi riêng rẽ và đồng nhất, chúng được cấy chuyển sang môi trường ống nghiệm để lưu giữ giống.

2.3. Đặc điểm hình thái

Đặc điểm hình thái rất quan trọng để phân loại đến chi và loài. Mẫu thu được sẽ được mô tả hình thái bên ngoài các đặc điểm cơ bản (mũ nấm, phiến nấm, cuống nấm, màu sắc...) và sấy ở 40-45^{o}C. Sau đó được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi Olympus CX21 (Olympus, Nhật Bản), chụp ảnh và mô tả đặc điểm hình thái bào tử và hệ sợi ghi nhận khi quan sát.

2.4. Ảnh hưởng các điều kiện sinh trưởng của hệ sợi nấm dược liệu

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy: nuôi hệ sợi trên các môi trường nuôi cấy khác nhau như MEA (Dextrose: 20 g/l; Malt extract 20 g/l; Pepton: 1 g/l; pH 5.5), PDA (Bột khoai tây: 200 g/l; Dextrose: 20 g/l; Agar: 20 g/l; pH 5.6),

Czapek ($NaNO_3$: 2 g/l; KH_2PO_4: 1 g/l; $MgSO_4.7H_2O$): 0,5 g/l; KCl: 0,5 g/l; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g/l; Glucose: 30 g/l; Agar: 20 g/l; pH 6,5-7,2) [5, 6].

- Ảnh hưởng của pH: Sau khi tìm điều kiện môi trường thích hợp, nấm được thử nghiệm pH tối ưu thông qua các giá trị pH 6, 6,5, 7 [7].

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Hệ sợi nấm dược liệu *P. tuber-regium* được nuôi thử nghiệm trên môi trường thích hợp ở nhiệt độ 20, 25, 30 và 35°C (không chiếu sáng) [8, 9].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả thu mẫu và phân lập mẫu dược liệu

Mẫu thu được quả thể còn tươi đang phát triển dưới gốc cây đổ. Mẫu E03TT24 thu được ở độ cao 400 m, khu vực nhiều cây bụi và cây cổ thụ lâu năm (hình 1).



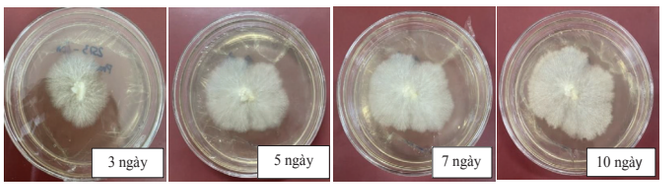
Hình 1. Nấm dược liệu *P. tuber-regium*.

Kết quả phân lập và quan sát quá trình sinh trưởng của hệ sợi ở nhiệt độ 30°C được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập hệ sợi nấm dược liệu.

Mẫu \ Sinh trưởng hệ sợi (mm)	3 ngày	5 ngày	7 ngày	10 ngày	Đặc điểm hệ sợi
E03TT24	34±0,0	46 ±0,6	53±0,0	58±0,0	Sợi mọc đều, nhanh

Bảng 1 cho thấy, sợi nấm *P. tuber-regium* có màu trắng, mọc đều, tỏa tia tròn, nhìn rõ sợi. Quan sát theo ngày cho thấy hệ sợi mọc dày dần theo thời gian nuôi cấy, bề mặt sợi mịn, xốp, tạo các tia theo đường kính hình tròn. Ở ngày nuôi cấy thứ 5, cho thấy rõ hình ảnh dạng sợi của nấm mỏng, hệ sợi lan theo các nhánh tủa giống như rễ cây theo hình tròn. Từ sau ngày nuôi cấy thứ 5 đến ngày thứ 7, kết quả cho thấy hệ sợi nấm lan thành các lớp chồng lên nhau, đường kính hệ sợi tiếp tục tăng dần. Đến ngày nuôi cấy thứ 10, xuất hiện các vòng tròn đồng tâm từ nhỏ đến lớn, đấy là các lớp sợi nấm mọc chồng lên nhau và lớn dần lên, trung tâm hệ sợi nấm dần ngả sang màu vàng. Tốc độ tăng trưởng của hệ sợi nấm *P. tuber-regium* được thể hiện trong hình 2.

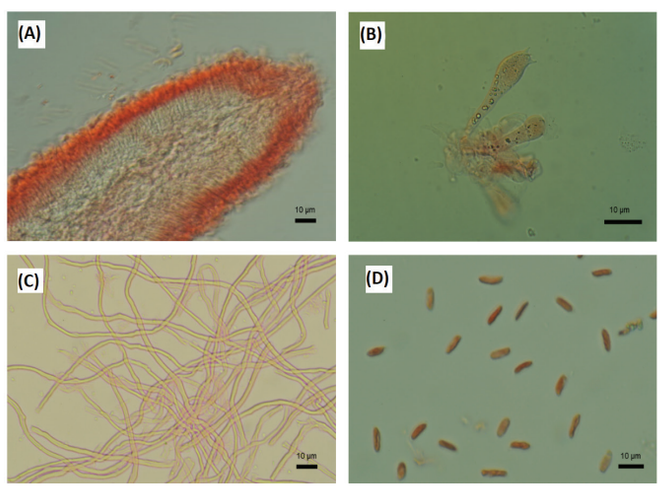


Hình 2. Kết quả sinh trưởng hệ sợi nấm.

3.2. Đặc điểm hình thái của nấm dược liệu P. tuber-regium

Quả thể nấm *P. tuber-regium* có dạng phễu lệch với tâm phiến nấm. Mũ nấm (pileus) có đường kính 20-50 mm, viền mũ nấm không đồng đều, có lông ngắn phủ bên trên mũ nấm và thưa dần khi quả thể nấm trưởng thành, có màu kem sáng, đôi khi có màu nâu sáng. Thịt nấm (context) mũ nấm có màu trắng sữa, có kích thước khoảng 5 mm. Phiến nấm (lamellae): khi còn non phiến nấm có màu nâu kem sáng, và đậm màu dần ở quả thể trưởng thành. Cuống nấm (stipe) có kích thước 20-50 mm x 5-15 mm, cuống nấm gần gốc có lớp lông nhỏ, mịn, khi còn non có màu kem sáng ở sát phiến nấm và đậm dần đến màu vàng nâu từ giữa cuống nấm đến sát chân nấm, khi trưởng thành màu sẽ dần sáng hơn. Quả thể nấm thơm mùi nấm đặc trưng, khá giống mùi nấm sò và dai chắc hơn nấm sò.

Quan sát dưới kính hiển vi bằng 2 loại thuốc thử Melzer và Công đỏ, kết quả cho thấy: hệ sợi có kích thước đường kính nhỏ, thành mỏng, sợi dài, phân nhánh đan xen. Hệ sợi có màu hơi vàng, bề mặt sợi nhẵn được cấu tạo bởi các tế bào nấm có vách tế bào mỏng. Bào tử có kích thước khá nhỏ, hình bầu dục hoặc elip dài, tròn ở hai đầu. Bào tử không bắt màu thuốc thử Melzer, có màu hơi vàng. Bào tử có một vách tế bào kép, gồm vách tế bào nguyên sinh và vách tế bào thứ cấp. Đảm có đặc điểm hình chùy dài có đầy đủ 4 cuống đính bào tử (hình 3).



Hình 3. Các đặc điểm vi thể của mẫu nấm *P. tuber-regium*. (A) Lát cắt ngang trama, **(B)** Tế bào đảm, **(C)** Hệ sợi trama, **(D)** Bào tử đảm.

Từ các đặc điểm nghiên cứu về hình thái hiển vi và các hình thái quả thể nấm (hình 1, 3) cho thấy, các đặc điểm của mẫu nấm E03TT24 có sự tương đồng với mô tả của B.A. Oso (1977) [10].

3.3. Kết quả của ảnh hưởng các điều kiện sinh trưởng của hệ sợi nấm dược liệu

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy: Hệ sợi nấm dược liệu *P. tuber-regium* được nuôi cấy trên 3 loại môi trường MEA, PDA và Czapek. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khả năng phát triển hệ sợi của *P. tuber-regium* trên môi trường MEA và PDA đều phát triển tốt hơn môi trường Czapek. Tuy nhiên hệ sợi phát triển tốt nhất là môi trường PDA, tốc độ sinh trưởng hệ sợi đạt cực đại 84 mm sau 10 ngày nuôi cấy, mật độ hệ sợi dày. Trên môi trường Czapek hệ sợi phát triển chậm, hệ sợi thưa.

Bảng 2. Sinh trưởng hệ sợi nấm *Pleurotus tuber-regium* trên các loại môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy	Đường kính hệ sợi sau 10 ngày (mm)	Đặc điểm hệ sợi
MEA	41±0,1	Sợi mọc đều, tạo tia sợi trắng
PDA	84±0,1	Sợi mọc đều, dày và tạo tia trắng
Czapek	2,0±0,0	Sợi thưa, phát triển chậm

Dựa trên kết quả thể hiện ở bảng 2, môi trường thích hợp nhóm chúng tôi lựa chọn để nghiên cứu các ảnh hưởng tiếp theo là môi trường PDA, đây cũng là môi trường được ghi nhận tốt cho sinh trưởng của nhiều loài nấm sò (*Pleurotus* spp.). Theo T.A. Krupodorova và cs (2021) [5], môi trường PDA cũng là môi trường có nguồn dinh dưỡng hữu cơ dễ hấp thụ cho hệ sợi nấm và được sử dụng nhân nuôi các loài nấm ăn và nấm dược liệu nói chung [6-10].

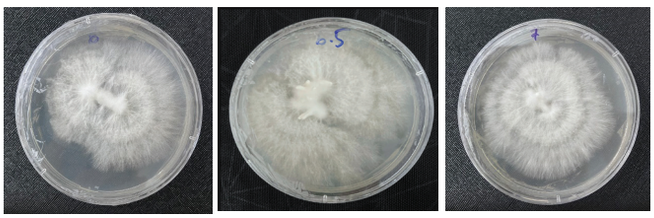
Theo nghiên cứu của U.S. Oranusi và cs (2014) [11], đã nghiên cứu thành phần môi trường thạch PCA, nutrient agar (NA) và PDA cho thấy hầu hết phát triển trên môi trường PDA và PCA. Ở nghiên cứu này nhóm nghiên cứu đã chọn nuôi cấy trên môi trường PDA và MEA cho kết quả phát triển tốt trên môi trường PDA cũng phù hợp với nghiên cứu của U.S. Oranusi và cs (2014) [11].

Ảnh hưởng của pH: Theo những báo cáo và nghiên cứu của tác giả H.T. Nguyen và cs (2020) [7] cũng như các công trình nghiên cứu khác. Chúng tôi đã lựa chọn nghiên cứu ảnh hưởng của pH đối với sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm trên dải pH từ 6-7, kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của pH đối với quá trình lan hệ sợi.

pH	Đường kính hệ sợi (mm)				Đặc điểm
	3 ngày	*5 ngày*	*7 ngày*	*10 ngày*	
6	7±0,5	33±0,5	62±0,5	80±0,5	Sợi mọc yếu
6,5	15±0,5	43±0,5	79±0,5	90±0,5	Sợi mọc đều
7	10±0,5	39±0,5	70±0,5	88±0,5	Sợi mọc trung bình

Bảng 3 cho thấy, hệ sợi nấm của loài *P. tuber-regium* phát triển tốt trong dải pH 6-7. Tuy nhiên điều kiện tối ưu nhất là môi trường có pH 6,5 cho kết quả hệ sợi mọc đều và phát triển nhỉnh hơn so với pH 6 và 7. Nghiên cứu này cũng tương đương với kết quả nghiên cứu của H. Sardar và cs (2015) [9] và H.T. Nguyen và cs (2020) [7].



Hình 4. Hệ sợi nấm nuôi trên môi trường có dải pH khác nhau.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ và pH môi trường nuôi ảnh hưởng rất lớn tới sự phát triển của sợi nấm, đặc biệt trong giai đoạn ra quả thể. Nhiệt độ trong ngày dao động từ 25 đến 35°C là một trở ngại lớn với trồng nấm ở vùng nhiệt đới. Chính vì vậy, chọn được điều kiện hệ sợi nấm *P. tuber-regium* có thể chịu được nhiệt độ cao là rất cần thiết để đảm bảo năng suất, chất lượng nấm.

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã nuôi trồng giống nấm *P. tuber-regium* trong điều kiện nhiệt độ 20-30°C đối với hệ sợi cấp 1 và 30-35°C đối với hệ sợi môi trường cấp 3 kết quả thu được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả theo dõi quá trình lan hệ sợi ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

Nhiệt độ (°C)	Đường kính hệ sợi (mm)				Đặc điểm
	3 ngày	*5 ngày*	*7 ngày*	*10 ngày*	
20°C	10±0,0	52±0,0	65±0,0	80±0,5	Sợi mọc yếu
25°C	20±0,5	63±0,5	76±0,5	90±0,5	Sợi mọc đều
30°C	18±0,5	60±0,5	75±0,5	90±0,5	Sợi mọc đều
35°C	15±0,5	58±0,5	70±0,5	85±0,5	Sợi mọc trung bình

Kết quả ở bảng 4, nhóm nghiên cứu lựa chọn được nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi nấm là 25 và 30°C. Đối với nhiệt độ 20°C hệ sợi sinh trưởng yếu. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu đối với loài Nấm sò tú cầu của tác giả T.H.T. Nguyen và cs (2023) [12]. Theo M.B. Bellettini và cs (2019) [13], hầu hết các nấm đảm đều có hệ sợi sinh trưởng ở nhiệt độ từ 20 đến 35°C, do vậy kết quả của nghiên cứu này cho thấy *P. tuber-regium* có khả năng sinh trưởng và phát triển hệ sợi dao động từ 20 đến 35°C, trong đó điều kiện tối ưu nhất là 25-30°C.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thu thập và phân lập được nấm dược liệu *P. tuber-regium* tại Khu bảo tồn thiên nhiên Thượng Tiến. Nghiên cứu đã phân tích và mô tả được đặc điểm hình thái

của nấm *P. tuber-regium*, tìm được các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của nấm dược liệu với điều kiện sinh trưởng tốt ở môi trường PDA, pH 6,5 và nhiệt độ 25-30^{o}C. Kết quả cho thấy, các hệ sợi phát triển tốt và mọc đều với các điều kiện sinh trưởng đã nghiên cứu, là cơ sở cho các nghiên cứu nuôi trồng phát triển nguồn nấm dược liệu bản địa của Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Tập đoàn VinGroup và được hỗ trợ bởi Quỹ đổi mới sáng tạo VinGroup (VINIF) trong dự án mã số VINIF.2021.DA00163. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Sharma, S. Jandaik (2017), "Oyster mushroom: Answer to human ailments", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **10(4)**, pp.24-27, DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16867.

[2] S. Dandapat, M. Kumar, R. Ranjan, et al. (2020), "Impact of mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Rumph. ex) Fr. extract on lipid profile and testosterone of rat", *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, **8(11)**, pp.2268-2276, DOI: 10.24925/turjaf.v8i11.2268-2276.2761.

[3] S.I. Omoanghe, P. Stamets, R. Vilgalys (2005), "Biology, food, medicinal, and biotechnological applications of the tropical mushroom *Pleurotus tuberregium* (Rumph.:Fr.) Singer", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **7(3)**, pp.415-416, DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v7.i3.580.

[4] J.A. Okhuoya, F.O. Okogbo (1991), "Cultivation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. on various farm wastes", *Proceedings of The Oklahoma Academy of Science*, **71**, pp.1-3.

[5] T.A. Krupodorova, V.Y. Barshteyn, A.S. Sekan (2021), "Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes", *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, **11(1)**, pp.494-531, DOI: 10.5943/cream/11/1/34.

[6] N.L. Dung (2001), *Mushroom Cultivation Technology*, **1**, Agricultural Publishing House, 132pp (in Vietnamese).

[7] H.T. Nguyen, T.T.H. Ta, H.L. Bui, et al. (2020), "Effects of temperature, pH and culture media on the growth and development of oyster mushroom strains (*Pleurotus* sp.) FH and PN20", Institute of Research and Development of High Technology, Duy Tan University; Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture (in Vietnamese).

[8] M.A.P. Jenavio, R. Siva (2022), "Effect of different culture media on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*", *International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT)*, **10(3)**, pp.1-4.

[9] H. Sardar, M.A. Ali, C.M. Ayyub, et al. (2015), "Effects of different culture media, temperature, and pH levels on the growth of wild and exotic Pleurotus species", *Pakistan Journal of Phytopathology*, **27(2)**, pp.139-145, DOI: 10.5555/20163084048.

[10] B.A. Oso (1977), "*Pleurotus tuber-regium* from Nigeria", *Mycologia*, **69(2)**, pp.271-279, DOI: 10.1080/00275514.1977.12020058.

[11] U.S. Oranusi, C.U. Ndukwe, W. Braide (2014), "Production of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing agar, chemical composition and microflora associated with sclerotium", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3(8)**, pp.115-126.

[12] T.H.T. Nguyen, H.L. Truong, T.M.M. Nguyen, et al. (2023), "Mycelial growth and fruiting body development of king oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) on different substrate sources", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **21(6)**, pp.909-919 (in Vietnamese).

[13] M.B. Bellettini, F.A. Fiorda, H.A. Maieves, et al. (2019), "Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp.", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26(4)**, pp.633-646, DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.12.005.

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi và ra rễ *in vitro* của cây lai F1 *Cymbidium aloifolium* × *Cymbidium finlaysonianum*

Phạm Phương Thu*, Trần Huyền My, Dương Thị Kim Anh

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, 32 Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hòa, tỉnh Phú Thọ, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/2/2025; ngày chuyển phản biện 24/2/2025; ngày nhận phản biện 14/3/2025; ngày chấp nhận đăng 19/3/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi và ra rễ *in vitro* của cây lai F1 (♀ *Cymbidium aloifolium* × ♂ *Cymbidium finlaysonianum*). Thí nghiệm xác định môi trường nuôi cấy thích hợp (Murashige và Skoog - MS; 1/2 MS; Knudson C - KC; Vacin và Went - VW) và tác động của cytokinin (BAP, Kinetin, TDZ), auxin (IBA, NAA, IAA) cùng than hoạt tính (0-4 g/l) đến các giai đoạn nảy mầm, nhân chồi và ra rễ. Kết quả cho thấy, môi trường MS tối ưu cho sự nảy mầm với tỷ lệ 90,37% và thời gian hình thành protocorm ngắn nhất (7-8 tuần). Giai đoạn nhân chồi đạt hiệu quả cao nhất khi bổ sung 2,0 mg/l BAP, với trung bình 4,30 chồi/mẫu, chiều dài 7,73 cm và khối lượng tươi 323,05 mg. Trong giai đoạn ra rễ, môi trường chứa 2,0 mg/l NAA và 2,0 g/l than hoạt tính cho kết quả tốt nhất với trung bình 5,20 rễ/mẫu, chiều dài 6,35 cm và khối lượng tươi 355,05 mg. Nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây lai F1, góp phần tạo ra nguồn vật liệu lai khởi đầu phong phú, làm cơ sở cho quá trình chọn lọc và phát triển các dòng lan lai triển vọng.

Từ khóa: **auxin, *Cymbidium aloifolium*, *Cymbidium finlaysonianum*, cytokinin, nhân chồi, nuôi cấy *in vitro*, ra rễ.**

Chỉ số phân loại: **1.6, 4.6**

Effects of plant growth regulators on *in vitro* shoot regeneration and rooting of an F1 hybrid between *Cymbidium aloifolium* and *Cymbidium finlaysonianum*

Phuong Thu Pham*, Huyen My Tran, Thi Kim Anh Duong

Hanoi Pedagogical University 2, 32 Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phu Tho Province, Vietnam

Received 20 February 2025; revised 14 March 2025; accepted 19 March 2025

Abstract:

This study evaluates the effects of plant growth regulators on *in vitro* shoot regeneration and root formation of the F1 hybrid (♀ *Cymbidium aloifolium* × ♂ *Cymbidium finlaysonianum*). The experiment determined the optimal culture medium (MS, 1/2 MS, KC, VW) and the influence of cytokinin (BAP, Kinetin, TDZ), auxin (IBA, NAA, IAA), and activated charcoal (0-4 g/l) on seed germination, shoot multiplication, and root formation stages. Results showed that MS medium was the most suitable for germination, achieving a 90.37% germination rate and the shortest protocorm formation time (7-8 weeks). The highest shoot multiplication efficiency was observed with 2.0 mg/l BAP, yielding an average of 4.30 shoots/explant, a shoot length of 7.73 cm, and a fresh weight of 323.05 mg. For root formation, the combination of 2.0 mg/l NAA and 2.0 g/l activated charcoal produced the best results, with an average of 5.20 roots/explant, a root length of 6.35 cm, and a fresh weight of 355.05 mg. This study provides a scientific basis for optimising the *in vitro* propagation protocol for the F1 hybrid, contributing to the generation of a diverse initial hybrid population, serving as a foundation for the selection and development of promising Cymbidium hybrid lines.

Keywords: **auxin, *Cymbidium aloifolium*, *Cymbidium finlaysonianum*, cytokinin, *in vitro* culture, rooting, shoot multiplication.**

Classification numbers: **1.6, 4.6**

Tác giả liên hệ: Email: phamphuongthu@hpu2.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Chi Địa lan (*Cymbidium*) là một trong những nhóm thực vật có giá trị kinh tế cao trong ngành công nghiệp hoa cảnh nhờ hoa lâu tàn cùng khả năng thích nghi đa dạng với các điều kiện sinh thái [1]. Tại Việt Nam, nguồn tài nguyên Địa lan bản địa đa dạng không chỉ có ý nghĩa khoa học mà còn mang tiềm năng thương mại đáng kể. Tuy nhiên, nhiều loài đang đối mặt với nguy cơ suy giảm quần thể nghiêm trọng do khai thác quá mức và thiếu giải pháp bảo tồn hiệu quả, thậm chí một số loài đứng trước nguy cơ tuyệt chủng.

Trong khi đó, thị trường trong nước ngày càng đòi hỏi các giống lan lai có "mặt hoa" độc đáo - tiêu chí quyết định giá trị thương mại. Đáng chú ý, nguồn cung giống lai mới hiện vẫn phụ thuộc lớn vào nhập khẩu, trong khi phương pháp nhân giống truyền thống (như tách chồi) không chỉ hạn chế về số lượng mà còn làm giảm đa dạng di truyền. Thách thức này đặt ra yêu cầu cấp thiết về việc kết hợp công nghệ sinh học để vừa bảo tồn nguồn gen bản địa, vừa phát triển giống lai chất lượng cao.

Trước thách thức này, nhóm nghiên cứu tại Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 đã thành công tạo quả lai F1 giữa hai loài Địa lan bản địa là *Cymbidium aloifolium* (Đoản kiếm lô hội) và *Cymbidium finlaysonianum* (Đoản kiếm filayson) - những loài có khả năng sinh trưởng mạnh và giá trị thẩm mỹ cao. Tuy nhiên, hạt lai F1 của chi *Cymbidium* thiếu nội nhũ và có phôi ở giai đoạn sớm (chưa phân hóa đầy đủ), cần cộng sinh với nấm mycorrhiza để nảy mầm trong tự nhiên [2]. Tỷ lệ nảy mầm tự nhiên của hạt lan thường rất thấp do yêu cầu khắt khe về độ ẩm, pH và điều kiện dinh dưỡng [3, 4]. Như vậy, việc thiếu sự hỗ trợ từ nấm mycorrhiza và môi trường dinh dưỡng khắt khe khiến hạt lai F1 rất khó phát triển thành cây con trong điều kiện tự nhiên, đồng nghĩa với nguy cơ có thể mất hoàn toàn nguồn vật liệu lai quý giá.

Nghiên cứu này tập trung vào việc xác định điều kiện nuôi cấy *in vitro* thích hợp nhằm kích thích sự nảy mầm của hạt lai F1, qua đó thiết lập quần thể cây con ổn định, tạo tiền đề cho quá trình đánh giá kiểu hình hoa ở giai đoạn sau. Kết quả kỳ vọng sẽ tạo ra nguồn vật liệu lai khởi đầu phong phú, làm cơ sở cho quá trình chọn lọc và phát triển các dòng lan lai triển vọng, đặc biệt là những dòng có kiểu hình hoa độc đáo, từ đó góp phần mở rộng tiềm năng ứng dụng trong tương lai.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguồn vật liệu lai tạo: Mẫu quả lai F1 thu nhận từ phép lai chủ động giữa hai loài Địa lan bản địa (cây mẹ: *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. 1799; cây bố: *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. 1833) do nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 thực hiện. Quả lai được thu hoạch sau 8 tháng thụ phấn, khi vỏ quả chuyển màu vàng nâu, bảo quản ở 4°C trước khi tách hạt.

Bốn môi trường dinh dưỡng (MS, 1/2 MS, KC, VW) được sử dụng để đánh giá khả năng nảy mầm của hạt lan.

Các chất điều hòa sinh trưởng được khảo sát gồm cytokinin (Kinetin, TDZ, BAP) và auxin (IBA, NAA, IAA). Bên cạnh đó, than hoạt tính cũng được bổ sung để đánh giá tác động đến quá trình phát triển cây *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành như sau:

Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy (MS, 1/2 MS, KC, VW) đến khả năng nảy mầm của hạt lai F1.

Thí nghiệm 2: Khảo sát tác động của nhóm cytokinin (Kinetin, TDZ, BAP) đến khả năng nhân nhanh chồi cây lai F1.

Thí nghiệm 3: Đánh giá ảnh hưởng của nhóm auxin (IBA, NAA, IAA) đến khả năng ra rễ của cây lai F1.

Thí nghiệm 4: Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của auxin với than hoạt tính để tối ưu hóa quá trình ra rễ của cây lai F1.

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) với ba lần lặp lại.

Thí nghiệm về môi trường nuôi cấy: Mỗi công thức thí nghiệm gồm 3 bình, trong đó mỗi bình được gieo một lớp hạt lan mỏng, phân bố đều trên bề mặt môi trường để đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Việc gieo rắc một lớp hạt mỏng giúp dễ dàng theo dõi tỷ lệ nảy mầm và đánh giá hiệu quả của môi trường nuôi cấy.

Các thí nghiệm còn lại: Mỗi công thức sử dụng 10 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu.

Điều kiện nuôi cấy: Phòng nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 25±1°C, độ ẩm 60-70%, cường độ chiếu sáng 2.000 lux với chế độ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối mỗi ngày.

2.4. Các chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ nảy mầm (%):

Phương pháp đo: Đếm số hạt nảy mầm (phôi vỡ vỏ và hình thành protocorm) trên tổng số hạt cấy trong mỗi bình.

Công thức: Tỷ lệ nảy mầm (%) = (Số hạt nảy mầm / Tổng số hạt cấy) × 100

- Thời gian hình thành protocorm (tuần): Ghi nhận tuần đầu tiên xuất hiện protocorm sơ cấp và thứ cấp.

- Số lượng chồi/mẫu (chồi):

Phương pháp: Đếm số chồi mới hình thành từ mỗi mẫu cấy.

Thời điểm: Kết thúc giai đoạn nhân chồi (sau 10 tuần).

- Chiều dài chồi/rễ (cm):

Phương pháp: Đo bằng thước (độ chính xác ±0,1 cm).

Thời điểm: Khi kết thúc các giai đoạn nhân chồi và ra rễ (sau 10 tuần).

- Khối lượng tươi (mg): Cân mẫu bằng cân phân tích (±0,01 mg) sau khi làm khô bề mặt bằng giấy thấm.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và Sirichai Statistics Version 7.00, với sự sai khác giữa các nghiệm thức được phân tích bằng phương pháp Duncan ($p<0,05$).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt lai F1

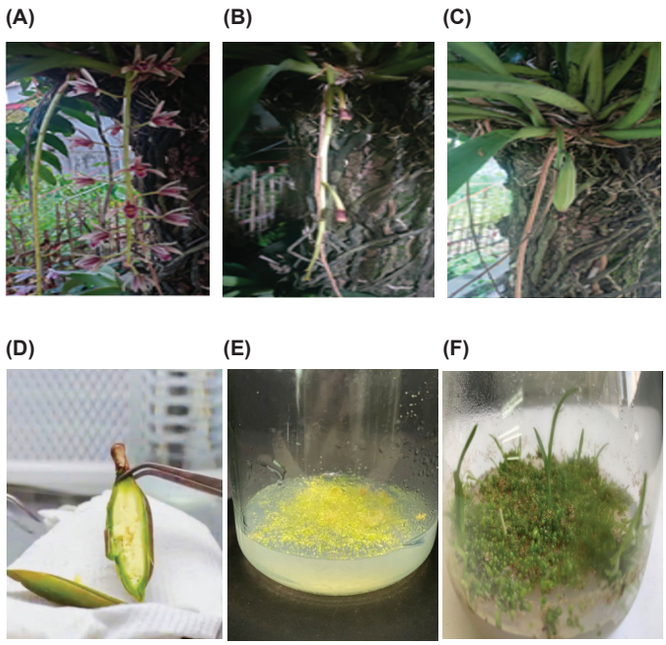
Quả lai F1 được sử dụng làm nguồn vật liệu nhân giống *in vitro*, chứa hàng triệu hạt lai với tổ hợp gen đa dạng. Thí nghiệm sử dụng bốn môi trường MS, 1/2 MS, KC, VW để đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển protocorm theo phương pháp của P. Mohanty và cs (2012) [5]. Môi trường bổ sung 3% sucrose, 5 g/l agar, pH 5,8±0,1, theo dõi trong 12 tuần.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các môi trường dinh dưỡng đến quá trình nảy mầm và phát triển phôi hạt lai F1 được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nảy mầm của hạt lai F1 giữa ♀ *Cymbidium aloifolium* và ♂ *Cymbidium finlaysonianum*.

Môi trường	Thời gian hạt bắt đầu phát triển thành phôi (tuần)	Thời gian hình thành protocorm (tuần)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
MS	3-5	7-8	90,37[a]
1/2 MS	4-6	10-12	70,32[b]
KC	5-7	10-12	62,67[c]
VW	5-7	10-12	64,59[c]
CV%			*2,05*
$LSD_{0,05}$			*2,95*

a, b, c: thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% (theo phương pháp phân tích Duncan, $p<0,05$). MS: Murashige và Skoog; KC: Knudson C; VW: Vacin và Went.



Hình 1. Quả và hạt lai F1 giữa ♀ Đoản kiếm lô hội và ♂ Đoản kiếm filayson nảy mầm và phát triển trên môi trường MS. (A) Hoa lan kiếm lô hội, để thụ phấn; **(B)** Quả lai sau 10 ngày thụ phấn chéo; **(C)** Quả lai sau 6 tháng thụ phấn chéo; **(D)** Quả lai F1 khi vào mẫu; **(E)** Protocorm sơ cấp; **(F)** Protocorm thứ cấp.

Kết quả bảng 1 và hình 1 cho thấy, môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ nảy mầm của hạt lai F1. Trong số 4 môi trường khảo sát, MS mang lại hiệu quả cao nhất với tỷ lệ nảy mầm đạt 90,37%, vượt trội so với 1/2 MS (70,32%), KC (62,67%) và VW (64,59%).

Hạt lai phát triển thành phôi nhanh nhất trên môi trường MS (3-5 tuần) và hình thành protocorm sớm nhất sau 7-8 tuần. Hiệu quả nảy mầm vượt trội của hạt lai F1 trên môi trường MS so với các môi trường khác (1/2 MS, KC, VW) được giải thích bởi công thức dinh dưỡng cân bằng, đặc biệt là nguồn nitơ và nguyên tố vi lượng có trong môi trường MS. So sánh với các nghiên cứu trước, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của P. Mohanty và cs (2012) [5] trên *Cymbidium mastersii*, trong đó môi trường MS giúp gia tăng tỷ lệ nảy mầm và rút ngắn thời gian phát triển phôi so với các môi trường khác. Đồng thời, nghiên cứu của P.P. Thu và cs (2023) [6] trên *Cymbidium wenshanense* cũng khẳng định rằng MS là môi trường tối ưu, giúp hạt lan nảy mầm nhanh hơn nhờ cung cấp đủ dinh dưỡng và duy trì độ pH ổn định.

Như vậy, MS là môi trường thích hợp giúp tăng tỷ lệ nảy mầm, rút ngắn thời gian nuôi cấy và tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của cây con.

3.2. Khảo sát tác động của nhóm cytokinin (Kinetin, TDZ, BAP) đến khả năng nhân nhanh chồi cây lai F1

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các cytokinin (Kinetin, TDZ, BAP) đến khả năng nhân nhanh chồi cây lai F1 được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng nhóm cytokinin đến khả năng nhân nhanh chồi cây lai F1 sau 10 tuần.

Cytokinins	Mg/l	Số lượng chồi/ mẫu cấy	Chiều dài chồi (cm)	Khối lượng tươi của mẫu (mg)
ĐC	0	2,4^{b}	6,9^{b}	243,20^{b}
Kinetin	1	2,73^{b}	7,05^{b}	244,60^{b}
	2	3,55^{a}	7,55^{a}	255,18^{a}
	3	2,77^{b}	6,95^{b}	246,25^{ab}
	4	2,65^{b}	6,95^{b}	244,53^{b}
CV%		*10,81*	*3,13*	*1,63*
$LSD_{0,05}$		*0,47*	*0,34*	*6,18*
ĐC	0	2,40^{b}	6,9^{ab}	244,63^{b}
TDZ	1	2,75^{b}	6,65^{b}	247,15^{b}
	2	3,55^{a}	7,30^{a}	256,68^{a}
	3	2,58^{b}	6,75^{b}	247,90^{b}
	4	2,45^{b}	6,57^{b}	246,25^{b}
CV%		*11,80*	*4,03*	*1,55*
$LSD_{0,05}$		*0,50*	*0,42*	*5,95*
ĐC	0	2,4^{c}	6,9^{b}	281,75^{b}
BAP	1	3,55^{ab}	7,1^{b}	292,13^{b}
	2	4,30^{a}	7,73^{a}	323,05^{a}
	3	3,48^{b}	7,03^{b}	286,83^{b}
	4	2,88^{bc}	6,95^{b}	280,30^{b}
CV%		*14,67*	*3,6*	*4,08*
$LSD_{0,05}$		*0,75*	*0,40*	*18,39*

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).

Kết quả bảng 2 cho thấy, tác động của 3 loại cytokinin (Kinetin, TDZ và BAP) đến quá trình nhân nhanh chồi của cây lai F1. Ở nồng độ 2,0 mg/l, Kinetin giúp số lượng chồi tăng đáng kể (3,55 chồi/mẫu) so với đối chứng (2,40 chồi/mẫu) và đạt chiều dài tối ưu 7,55 cm. Tuy nhiên, khi nồng độ tăng lên 3,0-4,0 mg/l, số lượng chồi giảm còn 2,77-2,65 chồi/mẫu, cho thấy liều cao có thể ức chế sinh trưởng. Khối lượng tươi đạt mức cao nhất (255,18 mg) ở 2,0 mg/l, sau đó giảm nhẹ, chứng minh Kinetin kích thích phát triển chồi nhưng không tạo sinh khối mạnh như BAP.

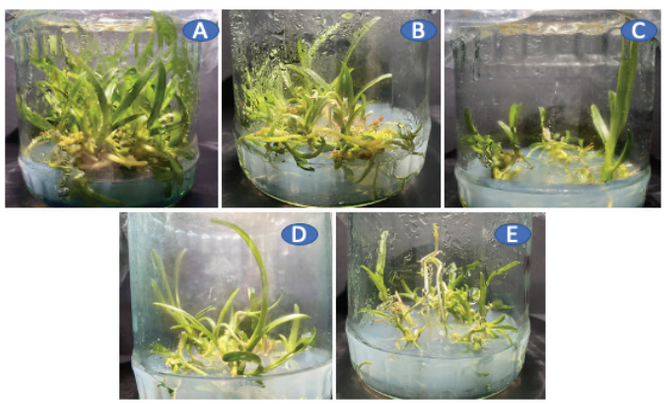
Với TDZ, ở nồng độ 2,0 mg/l, số lượng chồi đạt 3,55 chồi/mẫu, ngang bằng Kinetin nhưng thấp hơn BAP (4,30 chồi/mẫu). Chiều dài chồi đạt 7,30 cm cho thấy, TDZ có tác động tốt nhưng không vượt trội trong việc kéo dài chồi. Khi nồng độ tăng lên 3,0-4,0 mg/l, số lượng chồi giảm còn 2,58-2,45 chồi/mẫu, chiều dài chồi cũng giảm nhẹ. Khối lượng tươi cao nhất (256,68 mg) ghi nhận ở 2,0 mg/l, sau đó giảm dần, có thể do TDZ kích thích phân chia tế bào mạnh nhưng hạn chế sự kéo dài chồi khi nồng độ cao.

BAP là một cytokinin mạnh, kích thích sự phát triển của chồi bên và gia tăng hệ số nhân giống. Ở nồng độ 2,0 mg/l, số lượng chồi đạt cao nhất (4,30 chồi/mẫu), vượt trội so với Kinetin (3,55 chồi/mẫu) và TDZ (3,55 chồi/mẫu). Chiều dài chồi cũng đạt tối ưu 7,73 cm, khối lượng tươi cao nhất (323,05 mg), thể hiện khả năng tạo sinh khối mạnh. Tuy nhiên, khi nồng độ BAP tăng lên 3,0-4,0 mg/l, số lượng chồi giảm còn 3,48-2,88 chồi/mẫu, xuất hiện hiện tượng chồi cụm, hạn chế sự phát triển đồng đều.

So sánh với nghiên cứu của P. Mohanty và cs (2012) [5] trên *Cymbidium mastersii* cho thấy, dùng BAP ở 1,5-2,5 mg/l đạt hiệu quả cao nhất. Đồng thời, nghiên cứu của P.P. Thu và cs (2023) [6] trên *Cymbidium wenshanense* cũng khẳng định BAP giúp tăng hệ số nhân chồi đáng kể, trong khi TDZ có thể ức chế kéo dài chồi ở nồng độ cao. Điều này củng cố vai trò của BAP trong nhân giống *in vitro*.

Như vậy, xét trên cả 3 chỉ tiêu số lượng chồi, chiều dài chồi và khối lượng tươi, BAP 2,0 mg/l là lựa chọn phù hợp nhất để nhân nhanh chồi cây lai F1, giúp tăng hiệu suất nhân giống và đảm bảo chất lượng cây con trong quá trình nuôi cấy mô.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi cây lai F1 giữa ♀ Đoản kiếm lô hội và ♂ Đoản kiếm filayson được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi cây lai F1 giữa ♀ Đoản kiếm lô hội và ♂ Đoản kiếm filayson. (A) Chồi được tái sinh trên môi trường BAP nồng độ 2,0 mg/l; **(B)** 1,0 mg/l; **(C)** 3,0 mg/l; **(D)** 4,0 mg/l; **(E)** 0,0 mg/l.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của nhóm auxin (IBA, NAA, IAA) đến khả năng ra rễ của cây lai F1

Kết quả phân tích ảnh hưởng của các chất auxin (IBA, NAA, IAA) đến khả năng ra rễ của cây lai F1 được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhóm auxin đến khả năng ra rễ của cây lai F1 sau 10 tuần.

Auxin	Mg/l	Số lượng rễ/ mẫu cấy	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi của mẫu (mg)
ĐC	0	2,60^{b}	4,88^{b}	232,32^{bc}
IBA	1	2,65^{b}	4,50^{bc}	259,15^{b}
	2	3,20^{a}	5,45^{a}	316,02^{a}
	3	2,62^{b}	4,35^{bc}	263,60^{ab}
	4	2,28^{b}	4,25^{c}	215,75^{c}
CV%		*8,83*	*7,16*	*9,91*
$LSD_{0,05}$		*0,36*	*0,51*	*39,30*
ĐC	0	2,60^{c}	4,87^{bc}	232,32^{b}
NAA	1	3,17^{bc}	5,25^{b}	266,67^{b}
	2	4,05^{a}	6,07^{a}	346,87^{a}
	3	3,32^{b}	5,22^{b}	282,15^{b}
	4	3,02^{bc}	4,47^{c}	244,72^{b}
CV%		*11,22*	*7,80*	*11,98*
$LSD_{0,05}$		*0,55*	*0,62*	*50,71*
ĐC	0	2,60^{ab}	4,87^{ab}	232,32^{c}
IAA	1	2,30^{bc}	4,20^{bc}	249,77^{bc}
	2	2,85^{a}	5,52^{a}	294,77^{a}
	3	2,57^{ab}	4,05^{c}	267,17^{b}
	4	2,12^{c}	3,70^{c}	255,42^{bc}
CV%		*8,22*	*11,20*	*5,96*
$LSD_{0,05}$		*0,31*	*0,77*	*23,86*

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).

Kết quả bảng 3 cho thấy, tác động của IBA, NAA và IAA đến khả năng ra rễ của cây lai F1, cụ thể khi bổ sung IBA ở nồng độ 2,0 mg/l giúp rễ phát triển tốt với số lượng rễ đạt 3,20 rễ/mẫu, chiều dài 5,45 cm và khối lượng tươi 316,02 mg. Tuy nhiên, khi nồng độ tăng lên 3,0-4,0 mg/l, số lượng rễ giảm xuống còn 2,62-2,28 rễ/mẫu cho thấy IBA liều cao có thể gây ức chế sinh trưởng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của E. Epstein và cs (1993) [7], trong đó nhấn mạnh rằng, IBA có vai trò quan trọng trong kích thích rễ nhưng nếu vượt quá mức tối ưu có thể làm mất cân bằng hormone, ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình hình thành rễ.

Trong số 3 loại auxin được thử nghiệm, NAA 2,0 mg/l cho hiệu quả tốt nhất, với 4,05 rễ/mẫu, chiều dài rễ 6,07 cm và khối lượng tươi đạt 346,87 mg, cao nhất trong tất cả các công thức. Khi nồng độ NAA tăng lên 3,0 và 4,0 mg/l, số lượng rễ giảm xuống 3,32 và 3,02 rễ/mẫu, trong khi chiều dài rễ cũng giảm còn 5,22 và 4,47 cm. Như vậy, khi dùng NAA với nồng độ cao có thể gây mất cân bằng hormone, làm giảm hiệu quả tái sinh rễ, điều này tương tự với nghiên cứu của A.C. Nordström và cs (1991) [8], C.M. Fogaça và cs (2005) [9] trên *Eucalyptus* khi sử dụng NAA nồng độ cao làm gia tăng tổng hợp ethylene nội sinh, dẫn đến ức chế quá trình hình thành rễ phụ.

IAA có tác động yếu hơn so với IBA và NAA. Ở nồng độ 2,0 mg/l, số lượng rễ đạt 2,85 rễ/mẫu, chiều dài rễ 5,52 cm và khối lượng tươi 294,77 mg, thấp hơn so với NAA và IBA. Khi nồng độ IAA tăng lên 3,0 và 4,0 mg/l, số lượng rễ giảm xuống còn 2,57 và 2,12 rễ/mẫu cho thấy hiệu quả tái sinh rễ suy giảm đáng kể. Điều này phù hợp với nghiên cứu của P.J. Davies (2010) [10], trong đó chỉ ra rằng IAA dễ bị phân hủy trong môi trường nuôi cấy, khiến tác dụng kích thích rễ kém ổn định và không đạt hiệu quả cao như IBA hay NAA.

Như vậy, NAA 2,0 mg/l là công thức thích hợp để nhân rễ cây lai F1, nâng cao hiệu suất nhân giống và chất lượng cây con.

3.4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của auxin với than hoạt tính để tối ưu hóa quá trình ra rễ của cây lai F1

Kết quả thí nghiệm trên đã xác định NAA 2,0 mg/l là công thức thích hợp, giúp tăng số lượng, chiều dài rễ và khối lượng tươi của cây lai F1. Vì vậy, NAA 2,0 mg/l được kết hợp với than hoạt tính để tối ưu hóa quá trình ra rễ.

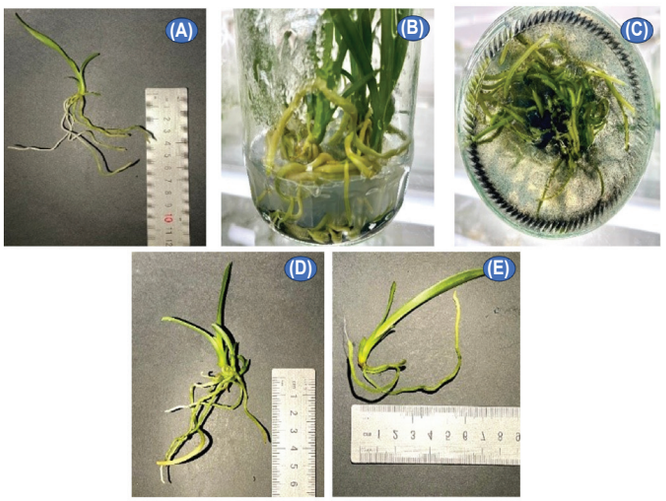
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính (AC) phối hợp với auxin đến khả năng tái sinh rễ cây lai F1 được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng phối hợp của auxin với than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ cây lai F1.

Than hoạt tính (g/l)	Số lượng rễ/mẫu cấy	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi của mẫu (mg)
0,0	4,05^{abc}	4,98^{bc}	264,52^{b}
1,0	4,40^{ab}	5,65^{b}	291,90^{b}
2,0	5,20^{a}	6,35^{a}	355,05^{a}
3,0	3,52^{bc}	5,35^{bc}	283,42^{b}
4,0	2,92^{c}	4,78^{c}	275,82^{b}
CV%	*14,58*	*7,75*	*8,07*
$LSD_{0,05}$	*0,90*	*0,64*	*36,60*

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).

Hình 3 trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của auxin kết hợp với than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ của cây lai F1.



Hình 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của auxin với than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ cây lai F1. Rễ lan ở công thức không bổ sung than hoạt tính **(A)**; bổ sung 1,0 g/l than hoạt tính **(B)**; 2,0 g/l than hoạt tính **(C)**; 3,0 g/l than hoạt tính **(D)**; 4,0 g/l than hoạt tính **(E)**.

Than hoạt tính là một thành phần quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật, giúp hấp thụ các hợp chất phenolic và chất độc [11], giảm stress ôxy hóa và bảo vệ mô nuôi cấy [12]. Đồng thời, than hoạt tính tạo môi trường tối, mô phỏng điều kiện tự nhiên, hỗ trợ hình thành rễ và hạn chế hiện tượng thủy tinh thể [12]. Trong nghiên cứu này, môi trường MS + 2,0 mg/l NAA được bổ sung than hoạt tính ở các nồng độ khác nhau (0,0-4,0 g/l) nhằm đánh giá tác động đến khả năng tái sinh rễ của cây lai F1.

Kết quả bảng 4 và hình 3 cho thấy, 2,0 g/l than hoạt tính là nồng độ thích hợp, giúp cây ra rễ tốt nhất với 5,20 rễ/mẫu, chiều dài rễ 6,35 cm và khối lượng tươi 355,05 mg, vượt trội so với đối chứng (0,0 g/l). Khi tăng lên 3,0-4,0 g/l, số lượng và chiều dài rễ giảm, có thể do than hoạt tính hấp thụ dinh dưỡng quá mức kết hợp với điều kiện ánh sáng bị hạn chế trong bình nuôi cấy, làm ảnh hưởng đến quá trình tái sinh rễ.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của K.Y. Paek và cs (1991) [13] trên *Cymbidium forrestii*, khẳng định nồng độ than hoạt tính thích hợp giúp tăng hiệu quả ra rễ. Tuy nhiên, sự khác biệt về hệ số nhân rễ có thể do khác biệt về loài. Môi trường MS + 2,0 mg/l NAA + 2,0 g/l than hoạt tính được xác định là công thức thích hợp giúp nâng cao hiệu suất nhân giống và chất lượng cây con.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện phù hợp cho quy trình nhân giống *in vitro* cây lai F1 giữa ♀ *Cymbidium aloifolium* và ♂ *Cymbidium finlaysonianum*. Cụ thể:

- Môi trường MS thể hiện hiệu quả cao nhất trong nảy mầm hạt lai F1, đạt tỷ lệ 90,37% và rút ngắn thời gian hình thành protocorm (7-8 tuần).

- BAP 2,0 mg/l là công thức tốt nhất để nhân nhanh chồi, tạo 4,30 chồi/mẫu với chiều dài 7,73 cm và sinh khối 323,05 mg, vượt trội so với các cytokinin khảo sát.

- NAA 2,0 mg/l kết hợp 2,0 g/l than hoạt tính thúc đẩy ra rễ hiệu quả, đạt 5,20 rễ/mẫu, chiều dài rễ 6,35 cm và khối lượng tươi 355,05 mg, đảm bảo chất lượng cây con.

Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học để hoàn thiện quy trình nhân giống cây lai F1, tạo nguồn vật liệu lai khởi đầu phong phú, làm cơ sở cho quá trình chọn lọc và phát triển các dòng lan lai triển vọng, đặc biệt là những dòng có kiểu hình hoa độc đáo, từ đó góp phần mở rộng tiềm năng ứng dụng trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí khoa học và công nghệ của Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 cho đề tài khoa học, mã số: HPU2.2023-UT-12. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. Arditti (2008), *Micropropagation of Orchids*, Blackwell Publishing, DOI: 10.1002/9781119187080.

[2] S. Alghamdi (2017), "Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **26**, DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.10.021.

[3] H. Jacquemyn, V. Merckx (2019), "Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants", *Journal of Ecology*, **107**, DOI: 10.1111/1365-2745.13165.

[4] Y.Y. Li, M. Boeraeve, Y.H. Cho, et al. (2021), "Mycorrhizal switching and the role of fungal abundance in seed germination in a fully mycoheterotrophic orchid, *Gastrodia confusoides*", *Front. Plant Sci.*, **12**, DOI: 10.3389/fpls.2021.775290.

[5] 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*, **2012,** DOI: 10.1093/aobpla/pls023.

[6] P.P. Thu, N.T. Tinh, T.N. Hung, et al. (2023), "A study on the bud regeneration ability of *Cymbidium wenshanense* by *in vitro* culture", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **65(5)**, pp.55-58, DOI: 10.31276/VJST.65(5).55-58.

[7] E. Epstein, J.L. Müller (1993), "Indole-3-butyric acid in plants: Occurrence, synthesis, metabolism and transport", *Physiologia Plantarum*, **88(2)**, pp.382-389, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb05513.x.

[8] A.C. Nordström, F.A. Jacobs, L. Eliasson (1991), "Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings", *Plant Physiol.*, **96(3)**, pp.856-861, DOI: 10.1104/pp.96.3.856.

[9] C.M. Fogaça, F. Neto, A.G. Role (2005), "Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of Eucalyptus species differing in recalcitrance", *Plant Growth Regulation*, **45(1)**, pp.1-10, DOI: 10.1007/s10725-004-6547-7.

[10] P.J. Davies (2010), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, Springer, 3rd Edition, DOI: 10.1007/978-1-4020-2686-7.

[11] M.J. Pan, J.V. Staden (1998), "The use of charcoal in *in vitro* culture - A review", *Plant Growth Regulation*, **26(3)**, pp.155-163, DOI: 10.1023/A:1006119015972.

[12] T.D. Thomas (2008), "The role of activated charcoal in plant tissue culture", *Biotechnology Advances*, **26(6)**, pp.618-631, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

[13] K.Y. Paek, E.C. Yeung (1991), "The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N6-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **24(2)**, pp.65-71, DOI: 10.1007/BF00039732.

Hiệu quả của chế phẩm vi khuẩn và dịch chiết từ củ gừng trong ức chế nấm *Alternaria solani* gây bệnh bạc lá sớm ở cà chua

Đỗ Quang Trung[1*], Nguyễn Trọng Trí[2]

[1]Khoa Dược, Trường Đại học Đại Nam, phường Phú Lương, Hà Nội, Việt Nam
[2]Trường Đại học Lâm nghiệp, xã Xuân Mai, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/7/2024; ngày chuyển phản biện 27/7/2024; ngày nhận phản biện 11/8/2024; ngày chấp nhận đăng 15/8/2024

Tóm tắt:

Bệnh bạc lá sớm (EB), do *Alternaria solani* gây ra, là một vấn đề nghiêm trọng trong sản xuất cà chua. Nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả sinh học của tác dụng hiệp đồng giữa chủng vi khuẩn phân giải lân PSB31 và dịch chiết từ củ gừng (GPE) kháng lại bệnh EB cà chua. Kết quả cho thấy, vi khuẩn PSB31 (được định danh là *Bacillus* sp. IMAU61039) ức chế tối đa (46,9%) sự phát triển sợi nấm *A. solani*. Trong số các tổ hợp, PSB31+GPE có tác dụng ức chế tăng trưởng sợi nấm cao nhất (65,4%) so với nhóm đối chứng. Hơn nữa, trong điều kiện vườn ươm, hạt giống được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE có tỷ lệ ức chế bệnh cao nhất (77,81%) so với nhóm đối chứng không được xử lý (72,71%) và nhóm được kiểm soát bệnh bằng hóa chất (90,23%). Đặc biệt, xử lý hạt cà chua với tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE giúp thúc đẩy sự nảy mầm của hạt và sự tăng trưởng của cây con trong quá trình lây nhiễm nấm *A. solani*. Các kết quả này cho thấy tiềm năng trong việc ứng dụng chủng PSB31 và GPE trong kháng lại bệnh do nấm *A. solani* trên cây cà chua.

Từ khóa: ***Alternaria solani*, bệnh bạc lá sớm, cao chiết gừng, cây cà chua, chế phẩm vi khuẩn.**

Chỉ số phân loại: **1.6, 4.6**

Effectiveness of bacterial inoculant and ginger extract in suppressing *Alternaria solani* causing early blight in tomato

Quang Trung Do[1*], Trong Tri Nguyen[2]

[1]Faculty of Pharmacy, Dai Nam University, Phu Luong Ward, Hanoi, Vietnam
[2]Vietnam National University of Forestry, Xuan Mai Commune, Hanoi, Vietnam

Received 24 July 2024; revised 11 August 2024; accepted 15 August 2024

Abstract:

Early blight (EB) , caused by the fungus *Alternaria solani*, represents a serious problem in tomato production. This study aimed to evaluate the effectiveness of a synergistic strategy, combining phosphorus-solubilising bacteria PSB31 with ginger extract (GPE) in inhibiting early blight. The findings showed that strain PSB31 (identified as *Bacillus* sp. IMAU61039) presented the highest level of inhibition (46.9%) against the mycelial growth of *A. solani*, the causal agent of early blight in tomato plants. Among the treatments, the combination of PSB31 and GPE exhibited the most significant inhibitory effect on the mycelial growth (65.4%) of *A. solani* compared to the control. Moreover, under greenhouse conditions, tomato seeds treated with this combination showed the highest rate of early-blight inhibition (77.81%) compared to the untreated control (72.71%) and chemical disease control (90.23%). Notably, treatment of tomato seeds with the combination of PSB31 and GPE promoted seed germination (93.54%) and seedling development under *A. solani* infection. These results indicate the potential application of strain PSB31 in combination with GPE for controlling diseases caused by *A. solani* in tomato plants.

Keywords: ***Alternaria solani*, bacterial inoculants, early blight, ginger extract, tomato plant.**

Classification numbers: **1.6, 4.6**

[*]Tác giả liên hệ: Email: trungdq@dainam.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) có giá trị kinh tế cao và được trồng ở Việt Nam. Tuy nhiên, cây cà chua đang bị đe dọa bởi nhiều loại bệnh do virus, tuyến trùng, vi khuẩn và nấm [1]. Đáng lưu ý là EB ở cây cà chua do nấm *A. solani* làm giảm đáng kể năng suất cây cà chua trên toàn thế giới, khoảng 80% [2]. Để khắc phục vấn đề này, người dân đã áp dụng các phương pháp hóa học, chủ yếu là sử dụng các loại thuốc diệt nấm đắt tiền [2, 3]. Giải pháp này có những nhược điểm chính là không phù hợp với môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng, cũng như là nguyên nhân gây ra sự phát triển tính kháng thuốc diệt nấm ở nấm *A. solani* [2, 3]. Phương pháp kiểm soát sinh học các mầm bệnh thực vật đang được các nhà khoa học quan tâm để thay thế cho phương pháp hóa học, do phương pháp này không chỉ thân thiện với môi trường, hữu ích lâu dài, kháng lại bệnh tật và không ảnh hưởng cho sức khỏe mà còn cải thiện đáng kể chất lượng và sản lượng cây cà chua [3].

Các hợp chất từ thực vật và các tác nhân kiểm soát sinh học thân thiện với môi trường, có khả năng kháng lại nhiều loại bệnh trên thực vật. Một số loài thực vật có khả năng tạo ra các hợp chất tự nhiên kháng lại hiệu quả nấm gây bệnh thực vật [2]. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã cho thấy chiết xuất thực vật cùng với vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (PGPR) là chiến lược tối ưu để quản lý và kiểm soát bệnh ở thực vật [4]. Cây Gừng (*Zingiber officinale*) là một lựa chọn thay thế phù hợp cho thuốc kháng vi khuẩn tổng hợp, do sự hiện diện của các chất hóa học như monoterpenoids, sesquiterpenoids, hợp chất phenol và các dẫn xuất của nó, aldehyde, xeton, rượu, este [5]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy hoạt động kháng nấm của chiết xuất gừng và tinh dầu gừng tương ứng kháng lại *Fusarium oxysporum* và *Colletotrichum falcatum* [6].

Tương tự, việc điều tra và đánh giá các chủng PGPR có lợi cùng với một số chiết xuất thực vật, phân compost và than sinh học (biochar) cải tiến được sử dụng để nâng cao độ phì nhiêu của đất, ngăn chặn tác nhân gây bệnh ở thực vật [2], mặc dù tất cả PGPR đều hữu ích cho việc nâng cao năng suất cây trồng và cải thiện cả về chất lượng và số lượng [7]. Hơn nữa, nấm rễ cộng sinh cũng được sử dụng rộng rãi để ngăn chặn bệnh do *A. solani* và bảo vệ cây cà chua khỏi bị thiệt hại do loài nấm này gây ra [8]. Việc sử dụng chế phẩm vi khuẩn là một công cụ hữu ích để quản lý bệnh gây chết cây [9]. PGPR có mặt trong đất nông nghiệp nhưng tiềm năng đối kháng của chúng đối với EB của cà chua vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hoạt tính kháng nấm của riêng PGPR và kết hợp với GPE kháng lại nấm *A. solani* trong điều kiện *in vitro* và thử nghiệm trong chậu vại.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị dịch chiết từ củ gừng

Củ gừng khoảng 11-12 tháng tuổi được thu mua trực tiếp tại vườn ở thôn Hoàng Trung, xã Hồng Dương, huyện Thanh Oai, Hà Nội (trước sáp nhập).

Những củ gừng tươi, vỏ mịn và ít nếp nhăn được rửa sạch, xay nhuyễn rồi sấy khô (độ ẩm 10%-15%) trong máy sấy ở 60ºC trong 72h. Máy xay hạt khô (Logkent, Nhật Bản) được sử dụng để nghiền gừng khô và bột được lọc qua rây lưới 100 Mesh (tương ứng 0,149 mm). Bột sau đó được giữ lạnh (4ºC) trong bóng tối. Chiết xuất được thực hiện bằng cách trộn 100 g bột gừng với 1000 ml nước cất vô trùng và ủ trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp dịch được lọc và ly tâm để loại bỏ kết tủa thu dịch nổi. Dịch nổi này được sử dụng làm dung dịch gốc cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Khả năng tương thích của GPE với chủng vi khuẩn PSB31

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. IMAU61039 (ký hiệu là PSB31), phân lập từ đất vùng rễ cây cà chua vụ xuân hè 2022 trồng tại Thái Bình (trước sáp nhập) có khả năng hòa tan tốt các hợp chất lân khó tan [10]. Chủng vi khuẩn được lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Đại Nam.

Khả năng tương thích của GPE với chủng vi khuẩn PSB31 đã được thử nghiệm trên môi trường LB (Luria - Bertani; tryptone: 10 g, cao nấm men: 5 g, NaCl: 5 g, nước cất vừa đủ: 1l, môi trường thạch bổ sung agar: 15 g/l) trong một thí nghiệm lặp lại. Trong thí nghiệm này, GPE được chuẩn bị với các nồng độ khác nhau (10, 15 và 20%) bằng cách pha loãng lần lượt 10, 15 và 20 ml GPE trong 100 ml nước cất vô trùng.

Chủng vi khuẩn được nuôi trong 48 giờ, cấy trải trên các đĩa có chứa môi trường LB. Ba đĩa giấy nhỏ (5 mm) được đặt cách đều nhau trên mỗi đĩa petri. Sau đó, 10 µl của 10, 15 và 20% GPE được nhỏ vào đĩa giấy lọc vô trùng bằng pipet. Tương tự, các đĩa đối chứng dương và âm được xử lý lần lượt với 10 µl streptomycin sulfate 100 ppm và dH_2O. Tất cả các đĩa được ủ ở 26±2°C trong 48 giờ và quan sát sự phát triển của các vùng ức chế xung quanh các đĩa giấy. Sự hình thành vùng ức chế cho thấy, sự không tương thích giữa GPE và chủng vi khuẩn, trong khi việc không có vùng ức chế xác nhận tính tương thích [11].

2.3 Hiệu quả kháng nấm Alternaria solani Tr1 trong điều kiện phòng thí nghiệm của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE

Nấm *A. solani* Tr1 được phân lập từ cà chua mắc bệnh bạc lá sớm ở Việt Nam, lưu giữ tại Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Đại Nam.

Phương pháp đồng nuôi cấy được thực hiện để kiểm tra hiệu quả của việc áp dụng riêng lẻ và kết hợp của chủng vi khuẩn PSB31 và GPE đối với sự phát triển sợi nấm của *A. solani* trong ống nghiệm. Các đĩa giấy lọc đã khử trùng (5 mm) được đặt lên đĩa Petri có chứa môi trường PDA (Potato Glucose Agar: potato 200 g/l, D - glucose 20 g/l, agar: 20 g/l, nước cất vừa đủ 1l). Các đĩa này được thêm 6 µl canh trường chủng vi khuẩn PSB31 (OD_{600nm}=1) hoặc GPE. Đối với các ứng dụng kết hợp, 3 µl dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn PSB31 và 3 µl GPE được đặt trên các đĩa giấy lọc đã khử trùng. Các đĩa sợi nấm đang phát triển tốt (5 mm) lấy từ đĩa giống nấm *A. solani* 7 ngày tuổi được đặt ở phía bên kia của đĩa giấy lọc. Các đĩa Petri đối chứng chỉ chứa các đĩa giấy lọc được nhúng bằng nước cất. Các đĩa thí nghiệm được giữ ở 26±2°C

trong 7 ngày. Mỗi thí nghiệm được thực hiện với ba lần lặp lại. Số liệu về % ức chế phát triển của sợi nấm từ mỗi thí nghiệm được tính theo công thức sau:

Sự ức chế phát triển của sợi nấm (%) = [(C–T)/C] x 100

trong đó: C: tăng trưởng sợi nấm ở mẫu đối chứng (cm); T: tăng trưởng sợi nấm trong điều trị (cm).

2.4. Nghiên cứu khả năng kích thích nảy mầm hạt cà chua của chủng vi khuẩn PSB31

Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn PSB31 đối với sự nảy mầm của hạt cà chua đã được nghiên cứu bằng phương pháp khăn giấy của J. Sudisha và cs (2012) [12]. Hạt cà chua giống (*Lycopersicon esculentum* F1 TN747) do Công ty TNHH thương mại Trang Nông phát triển được lưu hành trên thị trường.

Trong thí nghiệm này, năm hạt cà chua được làm sạch bề mặt bằng dung dịch NaOCl 1% trong 2 phút, sau đó rửa 3 lần trong nước cất vô trùng và để khô trên giấy lọc vô trùng. Hạt cà chua đã khử trùng bề mặt được xử lý tiếp bằng dung dịch CMC (0,1%) khử trùng làm vật liệu kết dính, sau đó ngâm trong 30 ml canh trường vi khuẩn (1×107 cfu/ml) trong 2 giờ. Trong thí nghiệm đối chứng, hạt giống được xử lý bằng nước cất vô trùng. Hạt giống đã phủ vi khuẩn (25 hạt) được đặt trên 2 lớp giấy lọc ẩm trong khay nhựa. Mỗi thí nghiệm có 3 khay. Tất cả các khay được đặt ở 28±2°C trong 15 ngày. Sau 07 ngày, tỷ lệ nảy mầm của hạt (SGP) được ghi nhận theo công thức:

Tỷ lệ nảy mầm của hạt (%)=(Số hạt nảy mầm/Tổng số hạt giống) x 100

Số liệu về số mầm và chiều dài rễ, chồi (cm) được ghi nhận 15 ngày sau khi xử lý. Chỉ số sức sống của cây con (SVI) được tính theo công thức:

SVI=(chiều dài rễ trung bình+chiều dài chồi trung bình) × % độ nảy mầm

2.5. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và GPE lên bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng cây cà chua

Thí nghiệm trong chậu được thiết kế theo phương pháp của M. Rasool và cs (2021) [13] để nghiên cứu tác động của việc áp dụng riêng lẻ và kết hợp chủng vi khuẩn PSB31 và GPE trong việc ngăn chặn tỷ lệ mắc bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng cây cà chua. Hạt cà chua được làm sạch bề mặt bằng NaOCl 1%, rửa 3 lần trong dH_2O và sấy khô bằng giấy thấm trước khi cho vi khuẩn. Hạt giống được xử lý bằng 0,1% CMC làm vật liệu kết dính, sau đó ngâm trong 30 ml huyền phù vi khuẩn PSB31 (1×107 cfu/ml) trong 2 giờ. Sau đó, 5 hạt cà chua đã phủ vi khuẩn được gieo vào chậu nhựa (10 l) chứa 8 kg hỗn hợp đất (cát: đất sét: phân chuồng với tỷ lệ 1:1:1) đã khử trùng [14]. Khi cây con được bốn tuần tuổi, đất vùng rễ được tưới bổ sung 15 ml huyền phù vi khuẩn (1×107 cfu/ml). Huyền phù bào tử nấm được chuẩn bị bằng cách cho 3 ml nước cất vô trùng vào đĩa nuôi cấy nấm *A. solani* một tuần tuổi. Lắc đều để giải phóng bào tử khỏi các sợi nấm. Huyền phù có nồng độ bào tử $1×10^6$ bào tử ml^{-1} được sử dụng cho thí nghiệm [15]. Sau 1 ngày bổ sung chủng vi khuẩn PSB31 vào đất, cây giống cà chua được phun sương huyền phù bào tử nấm *A. solani* lên lá bằng máy phun cầm tay [14]. Độ ẩm tương đối (~70%) cần thiết cho sự phát triển của bệnh EB được duy trì bằng cách phun nước cất cho cây.

Chiết xuất bột gừng (25 g/l) được chuẩn bị trong nước cất và được sử dụng dưới dạng phun qua lá trong các thí nghiệm. Những cây được phun thuốc trừ nấm Antracol 70 WP ở nồng độ 0,2% đóng vai trò là đối chứng dương, trong khi những cây được phun huyền phù bào tử nấm *A. solani* là đối chứng âm. Các chậu được đặt trong vườn ươm, với điều kiện được kiểm soát và các hoạt động nông học khác được giữ nguyên cho tất cả các nghiệm thức. Các thí nghiệm được thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các thí nghiệm bao gồm: T1=Vi khuẩn PSB31+*A. solani*; T2=GPE+*A. solani*; T3=Vi khuẩn PSB31+GPE+*A. solani*; T4=Antracol (đối chứng dương); T5=chỉ lây nhiễm nấm *A. solani* (đối chứng âm).

Số liệu về khả năng kiểm soát bệnh được ghi lại sau khi áp dụng biện pháp xử lý được ba tuần. Hiệu quả giảm bệnh được tính toán theo công thức của W.S. Abbott (1987) [16] dựa trên tỷ lệ nhiễm bệnh của hai nhóm đối tượng: nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm. Công thức cụ thể như sau:

Tỷ lệ kiểm soát bệnh (%)=[(C–T)/C] × 100

trong đó: C: tỷ lệ nhiễm bệnh trên tổng số cây trong nhóm đối chứng; T: tỷ lệ nhiễm bệnh trên tổng số cây trong nhóm thí nghiệm.

Số liệu về các đặc điểm sinh trưởng của cây (sự nảy mầm của hạt, chiều dài mầm, chiều dài rễ mầm, chỉ số sức sống, chiều dài chồi, chiều dài rễ, trọng lượng chồi tươi, trọng lượng chồi khô, trọng lượng rễ tươi và trọng lượng rễ khô) được ghi nhận 45 ngày sau khi cấy. Mức độ gây hại của bệnh và chỉ số phần trăm bệnh (PDI) được tính theo QCVN 01-38:2010/BNNPTNT như dưới đây:

$$PDI = [(n_1+3n_3+5n_5+7n_7+9n_9)/(N×K)] × 100$$

trong đó: n_1, n_3,..., n_9 lần lượt là số lá bị bệnh ở các cấp bệnh; N là tổng số lá điều tra; K là cấp bệnh cao nhất quan sát được.

2.6. Xác định hàm lượng chất diệp lục

Hàm lượng chất diệp lục (chlorophyll) và carotenoid được xác định theo phương pháp của J. Hiscox và cs (1979) [17]. Trong phương pháp này, 1 g mẫu lá cà chua tươi được cắt thành từng đoạn nhỏ, nghiền bằng chày và cối sứ trong 100 ml dung dịch axeton 80% (v/v) và sau đó lọc qua giấy lọc Whatman No. 1. Mật độ quang của dịch lọc được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 470, 649 và 665 nm. Nồng độ chlorophyll và Carotenoid trong các mẫu lá được tính toán bằng công thức của O.H. Hansen và cs (1978) [18] dưới đây:

$$\text{Chlorophyll (a)/g mẫu} = 11{,}63 \times OD_{665\ nm} - 2{,}39 \times OD_{649\ nm}$$

$$\text{Chlorophyll (b)/g mẫu} = 20{,}11 \times OD_{649\ nm} + 5{,}18 \times OD_{665\ nm}$$

$$\text{Chlorophyll (a+b)/g mẫu} = 6{,}45 \times OD_{665\ nm} + 17{,}72 \times OD_{649\ nm}$$

$$\text{Carotenoid (mg/g mẫu tươi)} = 1000 \times OD_{470nm} - 1{,}82 \times Ca - 85{,}02 \times Cb/198$$

trong đó: Ca: nồng độ chlorophyll (a); Cb: nồng độ chlorophyll (b).

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được phân tích trong Statistix 8.1 và MS Excel 365. Các thí nghiệm được tiến hành hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Các giá trị trung bình được tính toán bằng phần mềm ANOVA và kiểm tra sự khác biệt bằng cách sử dụng LSD ($p<0,05$). Phân tích tương quan được thực hiện trong MS Excel 365. Kết quả được biểu thị bằng trung bình ± độ lệch chuẩn.

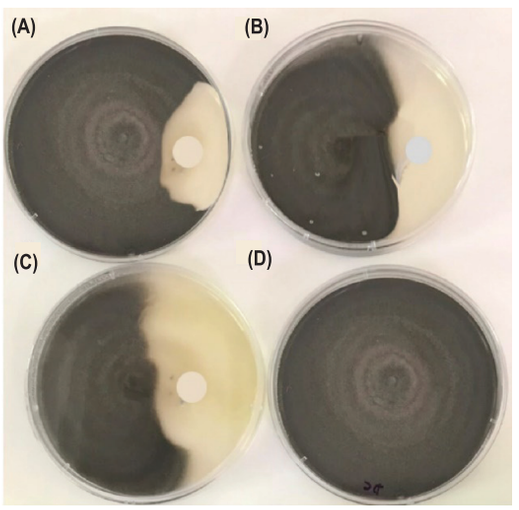
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng lên sự phát triển sợi nấm A. solani trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các kết quả thu thập được từ nghiên cứu về khả năng tương thích giữa chủng vi khuẩn PSB31 với GPE cho thấy, GPE ở các nồng độ khác nhau (10%, 15% và 20%) không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn PSB31.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của việc sử dụng riêng lẻ và kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE lên sự phát triển sợi nấm *A. solani* trong điều kiện phòng thí nghiệm được minh họa trong ảnh 1 và bảng 1. Số liệu cho thấy khả năng đối kháng cao của chủng vi khuẩn PSB31 đối với nấm *A. solani* trong điều kiện *in vitro* (tỷ lệ ức chế sự phát triển sợi nấm là 46,9%). Đặc biệt là việc áp dụng kết hợp chủng vi khuẩn PSB31 và GPE cho kết quả tốt hơn trong việc ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani*, tỷ lệ ức chế tăng trưởng sợi nấm cao nhất (65,4%) so với đối chứng không được xử lý bằng vi khuẩn và GPE. Việc áp dụng GPE riêng lẻ cũng cho thấy sự ức chế tăng trưởng sợi nấm của *A. solani* là 44,4% (bảng 1).

Chủng vi khuẩn PSB31 (định danh là chủng *Bacillus* sp. IMAU61039) được phân lập từ đất vùng rễ cây cà chua có khả năng hòa tan lân đã được thử nghiệm kháng lại nấm *A. solani*, để xác định và mô tả các chủng phân lập đối chứng sinh học có triển vọng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn PSB31 với các hoạt động phân giải lân có hoạt tính đối kháng kháng lại nấm *A. solani*. Sự



Hình 1. Ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani* trong điều kiện phòng thí nghiệm của dịch chiết từ củ gừng. (A) vi khuẩn PSB31 **(B)** và kết hợp của vi khuẩn PSB31 với dịch chiết từ củ gừng **(C)** so với đối chứng **(D).**

Bảng 1. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm *A. solani*.

Thí nghiệm	Đường kính hệ sợi nấm gây bệnh (cm)	Tỷ lệ ức chế sự phát triển của sợi nấm so với đối chứng (%)
Vi khuẩn PSB31	4,3±0,12 ^{bc}	46,9
Vi khuẩn PSB31 + Dịch chiết từ củ gừng	2,8±0,22^{ef}	65,4
Dịch chiết từ củ gừng	4,5±0,21^{b}	44,4
Đối chứng	8,1±0,31^{a}	0,0

[a]Các giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD ($p=0,01$).

ức chế tăng trưởng sợi nấm trong ống nghiệm là 46,9% so với đối chứng. Hiệu quả ức chế của loài *Pseudomonas* và *Bacillus* kháng lại nấm *A. solani* có thể là do sự tồn tại của các chất kháng sinh như surfactin, bacilloycin, zwittermycin A, pyoluteorin, pyrrolnitrin, pyocyanin, iturin và 2,4-diacetylphloroglucinol [19]. Những chất kháng sinh này có thể ức chế sự phát triển của nấm bằng cách nhắm vào các quá trình tế bào của chúng [20]. Các chất kháng sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn vùng rễ cung cấp sự thay thế bền vững và thân thiện với môi trường cho thuốc diệt nấm tổng hợp. Các hợp chất này có khả năng được tạo ra thông qua sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn trong vùng rễ, và gây kích thích sinh học đến sự phát triển của thực vật, mang lại khả năng phòng vệ, kháng lại các mầm bệnh thực vật.

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy xử lý bằng GPE đạt được sự ức chế sợi nấm 44,4%, chứng tỏ đây là hợp chất hiệu quả để kiểm soát nấm *A. solani*. Các chiết xuất từ các loài thực vật khác như *A. indica*, *A. sativum*, *P. lysterophorus* và *D. stramonium* cũng được báo cáo có khả năng ức chế nấm *A. solani* [21]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác phát hiện GPE có đặc tính kháng khuẩn phổ rộng và hoạt động như thuốc diệt nấm, bằng cách ngăn chặn sự hình thành và nảy mầm bào tử, cũng như làm biến dạng sợi nấm của các loại vi khuẩn gây bệnh thực vật khác nhau [21], chẳng hạn như *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* [22], *Alternaria alternata* [23], *Fusarium solani* [24]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự kết hợp của GPE và vi khuẩn PSB31, thể hiện hiệu quả ức chế nấm *A. solani* cao hơn so với việc chỉ sử dụng vi khuẩn PSB31 hoặc GPE. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của S. Hyder và cs [25], cho thấy sự kết hợp của chiết xuất bột gừng với vi khuẩn *Bacillus cereus* Gb-T23 và *Pseudomonas fluorescens* Ft-G43 duy trì sự ức chế nấm so với chỉ sử dụng chiết xuất bột gừng, trong khi sự kết hợp của hợp chất này với *Bacillus subtilis* Hyd-01F, Hyd-13Z và *Pseudomonas putida* St-149D, đã chứng tỏ khả năng kháng nấm tăng lên. Đặc tính kháng khuẩn và ức chế của các chất chiết xuất từ thực vật, chẳng hạn như chiết xuất bột gừng, là chủ đề của nhiều nghiên cứu chứng minh tiềm năng của chúng trong việc quản lý sâu bệnh và mầm bệnh. Một số báo cáo đã chứng minh việc sử dụng đồng thời hai tác nhân này có khả năng khai thác các tương tác hiệp đồng, hoặc bổ sung của chúng để quản lý hiệu quả các bệnh nấm trên cây trồng [26].

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của chủng vi khuẩn PSB31 đến khả năng nảy mầm và sức sống của hạt cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả cho thấy tác nhân vi khuẩn PSB31 đã cải thiện khả năng nảy mầm của hạt cà chua (86,23±2,15%) so với đối chứng (77,12±1,27%). Hơn nữa, chủng vi khuẩn PSB31 cũng cải thiện đáng kể chiều dài mầm (9,31±0,76 cm) và chiều dài rễ mầm (3,12±0,32 cm) ở cây giống cà chua so với đối chứng (chiều dài mầm và rễ mầm được ghi nhận lần lượt là 7,68±0,27 và 2,13±0,21 cm). Sự gia tăng đáng kể về chỉ số sức sống của cây con cũng được ghi nhận cho cây được xử lý với vi khuẩn PSB31 so với cây trong thí nghiệm đối chứng (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 đến các tính trạng chất lượng hạt giống cà chua trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thí nghiệm	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Chiều dài mầm (cm)	Chiều dài rễ mầm (cm)	Chỉ số sức sống của cây con
Xử lý với vi khuẩn PSB31	86,23±2,15^{b}	9,31±0,76^{b}	3,12±0,32^{b}	1071,8
Đối chứng	77,12±1,27^{a}	7,68±0,27^{a}	2,13±0,21^{a}	756,5

^{a}Các giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD (p=0,01).

Trong điều kiện *in vitro*, kết quả nghiên cứu này cho thấy hạt giống được phủ bằng vi khuẩn PSB31 tăng cường khả năng nảy mầm của hạt và các chỉ số tăng trưởng khác. Các kết quả tương tự được công bố ở cây cà chua [27] và các cây rau khác [28]. Hạt nảy mầm phụ thuộc vào điều kiện môi trường và sự cân bằng giữa tỷ lệ axit abscisic/gibberellin để thúc đẩy quá trình phá vỡ trạng thái ngủ. Theo nhiều nghiên cứu, việc sử dụng PGPR tạo điều kiện thuận lợi cho sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây con, có thể là do sự tổng hợp axit gibberellic [28]. Tuy nhiên, hạt nảy mầm rất dễ bị tổn thương trước các yếu tố sống và không sống, bao gồm cả nhiễm mầm bệnh [29]. Hơn nữa, nghiên cứu này cho thấy, việc áp dụng PGPR kết hợp với GPE làm tăng khả năng nảy mầm của hạt cà chua khi có mầm bệnh thực vật, và quản lý hiệu quả bệnh EB của cà chua trong thử nghiệm trong chậu.

3.3. Thử nghiệm chủng vi khuẩn PSB31 và chiết xuất từ củ gừng (GPE) trong việc kiểm soát bệnh bạc lá sớm (EB) và kích thích tăng trưởng thực vật

Tác dụng riêng lẻ và tổ hợp giữa chủng vi khuẩn PSB31 và GPE đối với sự nảy mầm của hạt, ức chế bệnh EB và thúc đẩy tăng trưởng ở cây cà chua được kiểm tra với sự tương tác với nấm *A. solani* Tr1 trong chậu ở điều kiện vườn ươm. Kết quả cho thấy, hạt cà chua được xử lý bằng vi khuẩn PSB31 riêng lẻ và kết hợp với GPE cho thấy các hiệu quả khác nhau trong ức chế bệnh EB và sự nảy mầm của hạt như được trình bày trong bảng 3.

Số liệu trong bảng 3 cho thấy, hạt được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE cho tỷ lệ ức chế bệnh cao nhất là 77,81%, trong khi phản ứng riêng lẻ của vi khuẩn PSB31 và GPE cho thấy tỷ lệ ức chế bệnh lần lượt là 56,71% và 50,52% và kém hiệu quả hơn đối chứng dương sử dụng thuốc Antracol (68,21%). Trong trường hợp hạt cà chua nảy mầm, chủng vi khuẩn PSB31 được thử nghiệm riêng lẻ và kết hợp với GPE đã cải thiện đáng kể khả năng nảy mầm của hạt. Tỷ lệ nảy mầm của hạt tối đa được ghi nhận trong tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE (93,54±2,25%) so với đối chứng âm (72,71±2,23%) và đối chứng dương (90,23±2,14%). Việc xử lý hạt giống riêng lẻ bằng GPE hoặc vi khuẩn PSB31 cho tỷ lệ nảy mầm của hạt lần lượt là 78,15±3,11% và 88,23±1,31% khi có sự hiện diện của nấm *A. solani*. Đáng lưu ý là tỷ lệ phần trăm bệnh là tối thiểu cũng được quan sát thấy trong thí nghiệm sử dụng vi khuẩn PSB31+GPE (13,51±1,23%), cao hơn trong đối chứng sử dụng thuốc diệt nấm Antracol (18,27±1,14%).

Bảng 3. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng ức chế bệnh bạc lá sớm và cải thiện sự phát triển của cây cà chua.

Thí nghiệm	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ mắc bệnh EB (%)	Tỷ lệ kiểm soát bệnh EB (%)
Vi khuẩn PSB31 + A. solani	88,23 ± 1,31^{bc}	24,7 ± 1,25^{bc}	56,71
Dịch chiết từ củ gừng +*A. solani*	78,15±3,11^{c}	30,31±1,25^{b}	50,52
Vi khuẩn PSB31+GPE+*A. solani*	93,54±2,25^{a}	13,51±1,23^{d}	77,81
Đối chứng dương (Antracol)	90,23±2,14^{b}	18,27±1,14^{c}	68,21
Đối chứng âm (Nước)	72,71±2,23^{d}	61,72±1,34^{a}	0,0

^{a}Các giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD (p=0,01).

Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy chủng vi khuẩn PSB31 riêng lẻ và kết hợp với GPE đều ảnh hưởng đáng kể đến các thông số tăng trưởng của cây khi có mặt của nấm gây bệnh *A. solani* (bảng 4). Trong các thí nghiệm được tiến hành, tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE giúp tăng nhiều nhất chiều dài chồi (139,57±1,27 cm), trong khi thí nghiệm chỉ sử dụng GPE giá trị tăng chiều dài chồi được ghi nhận là 111,34±1,47 cm. Trong trường hợp chiều dài rễ, tổ hợp vi khuẩn PSB31+GPE cũng giúp tăng đáng kể chiều dài rễ (22,79±1,16 cm) so với các thí nghiệm chỉ sử dụng chủng vi khuẩn hoặc GPE trong đó chiều dài rễ được ghi nhận lần lượt là 18,76±1,32 cm và 15,32±2,13 cm.

Bảng 4. Ảnh hưởng vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến khả năng tăng trưởng thực vật trong điều kiện vườn ươm.

Thí nghiệm	Chiều dài chồi (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng chồi tươi (g)	Khối lượng chồi khô (g)	Khối lượng rễ tươi (g)	Khối lượng rễ khô (g)
Vi khuẩn PSB31 + A. solani	124,21±1,35^{ab}	18,76±1,32^{bc}	209,82±2,11^{bc}	28,78±0,25^{bc}	2,76±0,15^{bc}	1,12±0,26^{b}
Dịch chiết từ củ gừng+*A. solani*	111,34±1,47^{b}	15,32±2,13^{b}	204,35±1,73^{b}	25,91±1,25^{b}	2,13±0,21^{b}	1,08±0,09^{ab}
Vi khuẩn PSB31 + dịch chiết từ củ gừng+*A. solani*	139,57±1,27^{d}	22,79±1,16^{d}	229,12±1,36^{d}	37,78±1,23^{d}	3,57±0,17^{d}	1,52±0,14^{c}
Đối chứng dương (Antracol)	131,21±2,26^{c}	20,61±1,23^{c}	214,82±1,25^{c}	35,57±2,51^{c}	3,22±0,15^{c}	1,38±0,22^{bc}
Đối chứng âm (nước)	100,81±2,15^{a}	10,28±1,34^{a}	138,23±1,78^{a}	16,83±1,23^{a}	1,78±0,12^{a}	0,86±0,05^{a}

^{a}Các giá trị trong cùng một cột có cùng (các) chữ cái không khác biệt đáng kể như đã xác định bằng thử nghiệm LSD (p=0,01).

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy trong quá trình kiểm soát nấm *A. solani*, cây cà chua được xử lý chỉ bằng chủng vi khuẩn PSB31 hoặc GPE có giảm về khối lượng của rễ và chồi (bảng 4).

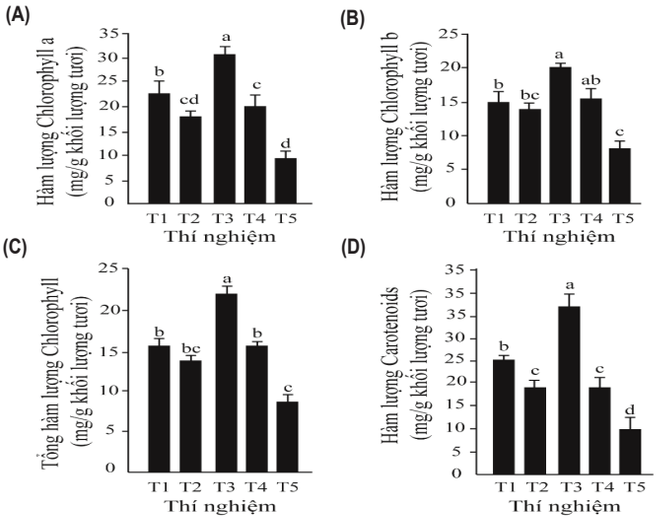
Khối lượng chồi tươi và khô tối đa (lần lượt là 229,12±1,36 và 37,78±1,23 g) được ghi nhận ở những cây cà chua được xử lý bằng cách sử dụng kết hợp vi khuẩn PSB31 và GPE với sự có mặt của *A. solani*. Xu hướng tương tự cũng được quan sát cho trường hợp khối lượng rễ tươi và khô. Tất cả các phương pháp xử lý đều cải thiện hai chỉ số này so với đối chứng âm và đối chứng dương (bảng 4). Trong đó, cây cà chua lây nhiễm nấm *A. solani* được xử lý bằng tổ hợp vi khuẩn PSB31 và GPE đã làm tăng đáng kể khối lượng rễ tươi (1,79 g) và khối lượng rễ khô (0,66 g) so với các cây bị gây nhiễm *A. solani* (đối chứng).

Ngoài ra, tỷ lệ mắc bệnh giảm được ghi nhận trong sử dụng PGPR+GPE so với xử lý bằng hóa chất cho thấy tác dụng hiệp đồng của các tác nhân kiểm soát sinh học và các sản phẩm thực vật. Các kết quả này tương tự với kết quả của P. Latha và cs [19], trong đó hỗn hợp dựa trên chiết xuất lá cây Zimmu (cây lai giữ hành tây và tỏi) và PGPR đã làm giảm 18% mức độ gây hại của bệnh so với đối chứng, đồng thời cũng cải thiện khả năng nảy mầm của hạt và năng suất quả. Một số báo cáo khác cũng cho thấy, sử dụng các tập đoàn vi sinh vật, bao gồm các PGPR thích hợp, dẫn đến giảm tỷ lệ mắc bệnh thông qua tác dụng hiệp đồng [30], bên cạnh đó, điều này có thể có lợi khi xử lý nhiều bệnh thực vật [19].

Ngoài việc kích thích khả năng phòng vệ kháng lại bệnh EB, tất cả các phương pháp xử lý còn thúc đẩy sự phát triển của cây, trong đó việc áp dụng tổ hợp vi khuẩn với GPE thu được kết quả tốt nhất về chiều dài chồi và rễ cũng như trọng lượng khô và tươi của chúng. Tuy nhiên, mặc dù việc sử dụng thuốc diệt nấm ở liều lượng khuyến nghị, giúp kiểm soát bệnh hiệu quả, nhưng lại gây ra rủi ro cho sức khỏe con người, khả năng kháng thuốc và tác động đến môi trường sẽ là những vấn đề tiềm ẩn. Sự kết hợp của các tác nhân kiểm soát sinh học với thuốc trừ sâu tổng hợp vừa có thể làm giảm nguy cơ xuất hiện tính kháng thuốc trừ sâu, vừa cải thiện khả năng kiểm soát dịch bệnh so với việc áp dụng từng tác nhân kiểm soát sinh học [31]. Nhiều nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng, sự kết hợp giữa các tác nhân phòng trừ sinh học với thuốc diệt nấm có hiệu quả hơn so với các phương pháp điều trị đơn lẻ. Ví dụ, S. Xu và cs (2022) [32] đã báo cáo rằng, việc sử dụng đồng thời difenoconazole với *B. amyloliquefaciens* đã làm tăng hiệu quả hiệp đồng của thuốc diệt nấm kháng lại bệnh héo do nấm *Fusarium*. Do đó, việc phát triển các chiến lược kiểm soát sinh học bằng PGPR cần có cả tiềm năng kiểm soát sinh học và thúc đẩy tăng trưởng để đảm bảo tính bền vững của cây trồng, chẳng hạn như cà chua.

3.4. Hàm lượng chất diệp lục

Các sắc tố quang hợp bị giảm đáng kể ở những cây bị nhiễm nấm *A. solani* (hình 2). Tất cả các phương pháp xử lý vi khuẩn riêng lẻ và kết hợp với GPE đã cải thiện đáng kể hàm lượng chất diệp lục (chlorophyll) và carotenoids. Trong trường hợp có hàm lượng chất diệp lục a, cây bị nhiễm nấm *A. solani* được xử lý với tổ hợp vi khuẩn+GPE (T3) đã làm tăng đáng kể hàm lượng chất diệp lục a (29,85 mg/g khối lượng tươi), trong khi tất cả các phương pháp xử lý khác bao gồm cả việc sử dụng vi khuẩn PSB31 (T1) và GPE (T2) cho thấy ít hiệu quả hơn trong việc tăng hàm lượng chất diệp lục a so với đối chứng dương (T4) (hình 2A). Tương tự, trong trường hợp chất diệp lục b (hình 2B), chất diệp lục tổng số (hình 2C) và carotenoid (hình 2D), cây bị nhiễm nấm *A. solani* được xử lý bằng cách kết hợp vi khuẩn PSB31 + GPE (T3) cải thiện đáng kể hàm lượng các sắc tố quang hợp so với các phương pháp xử lý khác (T1, T2 và T4). Mặt khác, các sắc tố quang hợp được quan sát thấy thấp hơn đáng kể ở những cây bị nhiễm *A. solani* (T5).



Hình 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn PSB31 và dịch chiết từ củ gừng đến hàm lượng chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), tổng số chlorophyll (C) và carotenoid (D) trong lá cây cà chua với sự có mặt của nấm *A. solani*. Các cột với các ký tự khác nhau cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) (thử nghiệm LSD). T1=Vi khuẩn PSB31+*A. solani*; T2=GPE+*A. solani*; T3=Vi khuẩn PSB31+GPE+*A. solani*; T4=Antracol (Đối chứng dương); T5=chỉ lây nhiễm nấm *A. solani* (Đối chứng âm).

Tất cả các bộ phận trên mặt đất của cây cà chua đều có thể bị EB làm hại. Do diện tích lá không đủ, sự oxy hóa tăng nhanh và sự gia tăng hoạt động của các enzyme phân hủy chất diệp lục trong điều kiện nhiễm bệnh, cây không thể hấp thụ ánh sáng, làm chậm tốc độ quang hợp [33]. Điều này được quan sát thấy trong hình 2, khi chất diệp lục (A, B) và carotenoids giảm mạnh. Tuy nhiên, những cây bị nhiễm nấm *Alternaria* được xử lý bằng PGPR đơn lẻ và kết hợp với GPE cho thấy sự gia tăng chất diệp lục A, B, tổng chất diệp lục và carotenoid so với phương pháp xử lý bằng thuốc diệt nấm (Antracol). Tương tự như vậy, Z.A. Awan và cs (2022) [34] đã báo cáo tác động tương tác của *B. subtilis* với các chất dinh dưỡng thực vật mang lại sức đề kháng ở cây cà chua bị nhiễm bệnh kháng lại EB bằng cách thay đổi hàm lượng chất diệp lục, carotenoids và phenolics. Điều này có thể là do vai trò của PGPR trong quá trình cố định N_2 cùng với xu hướng sản xuất IAA và chuyển hóa photphat [35].

4. Kết luận

Nghiên cứu này cung cấp bằng chứng cho thấy, vi khuẩn PSB31 tương thích và ức chế hiệu quả sự phát triển của nấm *A. solani*. Sự kết hợp giữa chủng PSB31 với GPE ngăn chặn bệnh EB và cải thiện sự phát triển của cây cà chua. Do đó, dựa trên các thử nghiệm *in vitro* và trong chậu, sự kết hợp của vi khuẩn PSB31 với GPE là một giải pháp thay thế đầy hứa hẹn để kiểm soát bệnh EB ở cà chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.E. Nagar, A.A. Elzaawely, N.A. Taha, et al. (2020), "The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight", *Agronomy*, **10(9)**, DOI: 10.3390/agronomy10091402.

[2] A. N. Babu, S. Jogaiah, S. Ito, et al. (2015), "Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase", *Plant Sci.*, **231**, pp.62-73, DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.11.006.

[3] V.A. Chavan, R.A. Yumlembam, K. Sewakram, et al. (2017), "Fungicide resistance in *Alternaria* leaf blight pathogen in tomato crop grown in Satara district", *J. Pharm. Phytochemistry*, **6(6)**, pp.1736-1739.

[4] M.L.P.D. Silva, F.S. Moen, M.R. Liles, et al. (2023), "Orange peel in combination with selected PGPR strains as seed treatment can improve soybean yield under field conditions", *Plant Soil.*, **491**, pp.401-420, DOI: 10.1007/s11104-023-06121-4.

[5] Y. Gao, Y. Lu, N. Zhang, et al. (2022), "Preparation, pungency and bioactivity of gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A Review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **62**, pp.1-26, DOI: 10.1080/10408398.2022.2124951

[6] P.K. Bordoh, A. Ali, M. Dickinson, et al. (2020), "Antimicrobial effect of rhizome and medicinal herb extract in controlling postharvest anthracnose of dragon fruit and their possible phytotoxicity", *Sci. Hortic.*, **265**, DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109249.

[7] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, et al. (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33(7)**, pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[8] M. Fritz, I. Jakobsen, M.F. Lyngkjær, et al. (2006), "Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*", *Mycorrhiza*, **16(6)**, pp.413-419, DOI: 10.1007/s00572-006-0051-z.

[9] H. Kaur, L.M. Nyochembeng, S.R. Mentreddy, et al. (2016), "Assessment of the antimicrobial activity of *Lentinula edodes* against *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria", *Crop. Prot.*, **89**, pp.284-288, DOI: 10.1016/j.cropro.2016.08.001.

[10] Q.T. Do, T.A. Luu, M.V. Dinh, et al. (2022), "Biocontrol of *Alternaria alternata* YZU, a causal of stem end rot disease on pitaya, with soil phosphate solubilizing bacteria", *Hue University Journal of Science: Natural Science*, **131(1B)**, pp.39-46, DOI: 10.26459/hueunijns.v131i1B.6505.

[11] R. Fukui, M. Schroth, M. Hendson, et al. (1994), "Interaction between strains of *Pseudomonads* in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil", *Phytopathol.*, **84(11)**, pp.1322-1330.

[12] J. Sudisha, S. Niranjana, S. Sukanya, et al. (2012), "Relative efficacy of strobilurin formulations in the control of downy mildew of sunflower", *J. Pest Sci.*, **83**, pp.461-470, DOI: 10.1007/s10340-010-0316-3.

[13] M. Rasool, A. Akhter, M.S. Haider et al. (2021), "Molecular and biochemical insight into biochar and *Bacillus subtilis* induced defense in tomatoes against *Alternaria solani*", *Sci. Hortic.*, **285**, DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110203.

[14] F. Naz, C.A. Rauf, N.A. Abbasi, et al. (2008), "Influence of inoculum levels of *Rhizoctonia solani* and susceptibility on new potato germplasm", *Pak. J. Bot.*, **40(5)**, pp.2199-2209.

[15] H. Zheng, J. Zhao, T. Wang, et al. (2015), "Characterization of *Alternaria* species associated with tomato foliar diseases in China", *Plant Pathol.*, **64(2)**, pp.425-433, DOI: 10.1111/ppa.12274.

[16] W.S. Abbott (1987), "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **3(2)**, pp.302-303.

[17] J. Hiscox, G. Israelstam (1979), "A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration", *Can. J. Bot.*, **57(12)**, pp.1332-1334, DOI: 10.1139/b79-163.

[18] O.H. Hansen, B. Riemann (1978), "Chlorophyll a determination: Improvements in methodology", *Oikos*, **30**, pp.438-447, DOI: 10.2307/3543338.

[19] P. Latha, T. Anand, N. Ragupathi, et al. (2009), "Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*", *Biol. Control*, **50(2)**, pp.85-93, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.03.002.

[20] D. Zhang, S. Yu, Y. Yang, et al. (2020), "Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato", *Front. Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01196.

[21] A.E. Khetabi, R. Lahlali, S. Ezrari, et al. (2022), "Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review", *Trends Food Sci. Technol.*, **120**, pp.402-417, DOI: 10.1016/j.tifs.2022.01.009

[22] K.J.J. Polo, H.L.M. Campos, C.C. Olivera, et al. (2021), "Biofungicide for the control of *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*: A laboratory study", *Chem. Eng. Trans.*, **87**, pp.517-522, DOI: 10.3303/CET2187087.

[23] H. Rizwana (2016), "Exploiting antifungal potential of ginger for the management of *Alternaria alternata*, the cause of leaf spot disease of spinach", *Mycopath.*, **13(2)**, pp.97-104.

[24] K.Y. Xi, S.J. Xiong, G. Li, et al. (2022), "Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*", *Horticulturae*, **8(11)**, DOI: 10.3390/horticulturae8110983.

[25] S. Hyder, A.S. Gondal, A. Sehar, et al. (2024), "Use of ginger extract and bacterial inoculants for the suppression of *Alternaria solani* causing early blight disease in tomato", *BMC Plant Biol.*, **24(1)**, DOI: 10.1186/s12870-024-04789-z.

[26] M. Kisiriko, M. Anastasiadi, L.A. Terry, et al. (2021), "Phenolics from medicinal and aromatic plants: Characterisation and potential as biostimulants and bioprotectants", *Molecules*, **26(21)**, DOI: 10.3390/molecules26216343.

[27] M.I.R. Conde, S.A. Ocampo, G.C. Castañeda, et al. (2018), "Effect of fluorescent *Pseudomonas* on tomato seed germination and seedling vigor", *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, **24(2)**, pp.121-131, DOI: 10.5154/r.rchsh.2017.06.023.

[28] L.A.P. García, J.S. Mata, M.F. Hernández, et al. (2023), "Plant-growth-promoting rhizobacteria improve germination and bioactive compounds in cucumber seedlings", *Agronomy*, **13(2)**, DOI: 10.3390/agronomy13020315.

[29] G.C. Castaño, J.C. Cabrera, M. Pernas, et al. (2020), "An updated overview on the regulation of seed germination", *Plants*, **9(6)**, DOI: 10.3390/plants9060703.

[30] Z. Minchev, O. Kostenko, R. Soler, et al. (2021), "Microbial consortia for effective biocontrol of root and foliar diseases in tomato", *Front Plant Sci.*, **12**, pp.1-12, DOI: 10.3389/fpls.2021.756368.

[31] U.B. Singh, A. Sahu, N. Sahu, et al. (2013), "*Arthrobotrys oligospora*-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*", *J. Appl. Microbiol.*, **114(1)**, pp.196-208, DOI: 10.1111/jam.12009.

[32] X. Xu, Y. Wang, T. Lei, et al. (2022), "Synergistic effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SDTB009 and difenoconazole on *Fusarium* wilt of tomato", *Plant Dis.*, **106(8)**, pp.2165-2171, DOI: 10.1094/PDIS-12-21-2650-RE.

[33] M.A. Albalawi, A.M. Abdelaziz, M.S. Attia, et al. (2022), "Mycosynthesis of silica nanoparticles using *Aspergillus niger*: Control of *Alternaria solani* causing early blight disease, induction of innate immunity and reducing of oxidative stress in eggplant", *Antioxidants*, **11(12)**, DOI: 10.3390/antiox11122323.

[34] Z.A. Awan, A. Shoaib, M.S. Iftikhar, et al. (2022), "Combining biocontrol agent with plant nutrients for integrated control of tomato early blight through the modulation of physio-chemical attributes and key antioxidants", *Front. Microbiol.*, **13**, DOI: 10.3389/fmicb.2022.807699.

[35] N. Mishra, S.K. Sundari (2015), "Native PGPM consortium: A beneficial solution to support plant growth in the presence of phytopathogens and residual organophosphate pesticides", *J. Bioprocess Biotech.*, **5**, DOI: 10.4172/2155-9821.1000202.

 DOI: 10.31276/VJST.2024.2956

Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc tính của thể thực khuẩn kháng *Vibrio alginolyticus*

Trương Quốc Phong[1, 2*], Vi Thị Thu Thảo[2], Nguyễn Thanh Hoà[1, 2], Ngô Thu Hường[3]

[1]Viện Khoa học và Công nghệ Sức khoẻ, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam
[2]Trường Hoá và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam
[3]Trung tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế, 135 Lò Đúc, phường Phạm Đình Hổ, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/10/2024; ngày chuyển phản biện 9/10/2024; ngày nhận phản biện 25/10/2024; ngày chấp nhận đăng 30/10/2024

Tóm tắt:

Thể thực khuẩn là một loại virus nhận biết và xâm nhiễm đặc hiệu vi khuẩn. Trong quá trình phát triển thể thực khuẩn sẽ phá huỷ tế bào chủ nên là đối tượng hấp dẫn đối với các nhà nghiên cứu trong việc phát triển giải pháp sinh học tiêu diệt đặc hiệu vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, hai nội dung chính được thực hiện là phân lập vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* và thể thực khuẩn đặc hiệu. Chủng *V. alginolyticus* M1 được phân lập từ nước đầm nuôi tôm, đồng thời một số đặc tính hình thái, sinh hoá đã được xác định. Chủng này được định danh thông qua trình tự 16S rDNA. Sử dụng chủng chủ là *V. alginolyticus* M1, bốn dòng thể thực khuẩn có hoạt tính ly giải tế bào chủ đã được phân lập từ nước bể nuôi tôm và nước thải tại chợ hải sản. Tính đặc hiệu vật chủ của các dòng thể thực khuẩn lựa chọn đã được kiểm tra và cho thấy cả bốn dòng không ly giải các chủng *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, các chủng probiotics như *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*. Trong đó, thể thực khuẩn NT1 có hoạt tính ly giải mạnh nhất, độ bền nhiệt lên đến 60°C, pH 3-10, là ứng cử viên tốt để phát triển giải pháp kiểm soát sinh học đối với bệnh do *V. alginolyticus* gây ra.

Từ khoá*: phân lập, thể thực khuẩn, *Vibrio alginolyticus.

***Chỉ số phân loại:* 1.6, 4.6**

Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Vibrio alginolyticus*

Quoc Phong Truong[1, 2*], Thi Thu Thao Vi[2], Thanh Hoa Nguyen[1, 2], Thu Huong Ngo[3]

[1]Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam
[2]School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam
[3]Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals, 135 Lo Duc Street, Pham Dinh Ho Ward, Hanoi, Vietnam

Received 7 October 2024; revised 25 October 2024; accepted 30 October 2024

Abstract:

Bacteriophage is a virus that specifically recognises and infects bacteria. During the life cycle, bacteriophage destroys the host cell, so it is an attractive agent for researchers in developing biological solutions to specifically kill bacteria. In this study, two main objectives were addressed: isolating *Vibrio alginolyticus* bacteria and specific bacteriophages. The *V. alginolyticus* M1 strain was isolated from shrimp pond water, and some morphological and biochemical characteristics were determined. This strain was identified by 16S rDNA sequencing. Using the host strain *V. alginolyticus* M1, four bacteriophage strains showing strong host cell lytic activity were isolated from shrimp tank water and seafood market wastewater. The host specificity of the selected phage isolates was tested, showing that none of the four phage isolates lysed *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 strains, and probiotic strains such as *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Among the four selected strains, bacteriophage NT1 exhibited the strongest lytic activity, thermal stability up to 60°C across a pH range of 3-10, and is a promising candidate for developing biological control solutions against diseases caused by *V. alginolyticus*.

***Keywords:* bacteriophage, isolation, *Vibrio alginolyticus*.**

***Classification numbers:* 1.6, 4.6**

[*]Tác giả liên hệ: Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Vibrio alginolyticus là loài vi khuẩn gram âm kỵ khí tuỳ tiện, ưa mặn. Loài vi khuẩn này được cho là nguyên nhân gây bệnh phân trắng ở tôm, đây là một trong những bệnh nguy hiểm, phổ biến và gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi tôm công nghiệp. Vì là tác nhân vi khuẩn gây bệnh cho tôm nên giải pháp phòng và trị bệnh bằng kháng sinh đã được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh rộng rãi, thời gian dài đã để lại những hậu quả lớn như tạo ra các quần thể vi khuẩn kháng kháng sinh, dẫn đến nguy cơ lan truyền gen kháng kháng sinh cho các loài vi khuẩn khác [1]. Việc sử dụng kháng sinh cũng có thể để lại tồn dư kháng sinh trong tôm thương phẩm, dẫn đến làm giảm chất lượng của tôm và thậm chí không thể xuất khẩu được vào các thị trường có kiểm soát nghiêm ngặt dư lượng này. Do vậy, giải pháp sinh học an toàn để phòng và trị bệnh do Vibrio gây ra luôn được quan tâm và ưu tiên nghiên cứu phát triển.

Thể thực khuẩn là một loại virus có khả năng xâm nhiễm và giết các tế bào vi khuẩn chủ. Trong tự nhiên, thể thực khuẩn rất đa dạng và có thể tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau. Thể thực khuẩn có độ bền tốt trong điều kiện nhiệt độ cao đến 60^{o}C và phổ pH rộng (pH 4-10) [2-7]. Thể thực khuẩn chỉ xâm nhiễm các tế bào chủ là vi khuẩn mà hoàn toàn không xâm nhiễm vào các tế bào nhân thực do đó đây được coi là một tác nhân sinh học an toàn cho người, vật nuôi và môi trường. Do đó, sử dụng thể thực khuẩn có thể được xem là một liệu pháp tiêu diệt vi khuẩn an toàn thay thế kháng sinh. Thể thực khuẩn có tốc độ sinh trưởng rất nhanh. Tải lượng thể thực khuẩn có thể đạt cực đại trong vòng 60-120 phút kể từ khi xâm nhiễm [2-7]. Đặc điểm này rất phù hợp để có thể sản xuất lượng lớn thể thực khuẩn phục vụ cho phát triển sản phẩm ứng dụng. Do có nhiều ưu điểm nên thể thực khuẩn đã được sử dụng để tạo một số sản phẩm ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, chăn nuôi [8], môi trường [9], thực phẩm [10-12], và y tế [13, 14].

Một số sản phẩm chứa thể thực khuẩn đã được thương mại hoá và được phép lưu hành trên các thị trường Mỹ, châu Âu, Anh, Canada. Sản phẩm Biolyse® BP và AgriPhage™ được sử dụng cho thực vật; các sản phẩm như Ecolicide®, Finalyse®, BAFACOL™, SalmoLyse®… được sử dụng để trị bệnh nhiễm khuẩn ở động vật; các sản phẩm như PhageGuard E™, ShigActive™… được sử dụng để phòng và điều trị nhiễm khuẩn cho người [15]. Điều này chứng minh rằng việc tìm kiếm các thể thực khuẩn có tính đặc hiệu cao với vi khuẩn gây bệnh để phát triển thành sản phẩm ứng dụng là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn.

Trong nghiên cứu này, vi khuẩn chủ *V. alginolyticus* đã được phân lập và xác định từ nước đầm nuôi tôm ở Hải Phòng. Thể thực khuẩn đặc hiệu *V. alginolyticus* đã được phân lập từ nước đầm nuôi tôm và nước thải của chợ hải sản ở Hà Nội. Thể thực khuẩn thu được có một số đặc tính tốt để trở thành ứng viên cho phát triển sản phẩm ứng dụng phục vụ phòng và trị bệnh do *V. alginolyticus* gây ra cho thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Mẫu và chủng giống

Mẫu nước dùng để phân lập *V. alginolyticus* là mẫu nước đầm tôm lấy tại khu vực đê biển Hải Thành, phường Tân Thành, quận Dương Kinh, Hải Phòng (trước sáp nhập). Mẫu nước dùng để phân lập thể thực khuẩn là các mẫu nước lấy từ bể chứa tôm và nước thải khu bán hải sản sống tại chợ Long Biên, Hà Nội.

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn thực phẩm. Các chủng *V. parahaemolyticus* BL, *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Hoá và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.1.2. Hoá chất và môi trường

Các hoá chất bao gồm peptone, cao nấm men, NaCl, chất chỉ thị (neutral red, phenol red), agar, $CaCl_2$, glucose, lactose… được mua từ các Hãng Merck, Himedia. Các hoá chất dùng cho sinh học phân tử như Tris-HCl, CH_3COONa, chloroform, isoamylalcohol, agarose, EDTA… được mua từ các hãng Sigma, Merck. PrimeSTAR HS DNA Polymerase PCR kit được mua từ Takara Bio (Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập Vibrio alginolyticus và xác định đặc tính

Phân lập V. alginolyticus: Mẫu nước được pha loãng liên tiếp đến 10^{-4}, 10^{-5} và 10^{-6} bằng dung dịch 0,9% NaCl vô trùng. Sau đó, 0,1 ml dịch pha loãng được cấy trải lên đĩa thạch chứa peptone 15 g/l, cao nấm men 5 g/l, lactose 4 g/l, NaCl 30 g/l, đỏ trung tính 0,01 g/l, agar 2 g/l, pH 8,8. Đĩa thạch được ủ ở 37^{o}C trong 16-18 giờ. Các khuẩn lạc đơn màu vàng, hình tròn, nhẵn sẽ được lựa chọn để tiếp tục làm sạch bằng cách cấy ria lên đĩa thạch mới. Các khuẩn lạc đơn tiếp tục được lựa chọn và cấy trải lên môi trường TCBS (0,5% cao nấm men, 1% peptone, 1% $Na_2S_2O_3$, 1% $C_6H_5Na_3O_7$, 0,5% muối mật, 2% sucrose, 1% NaCl, 0,1% $C_6H_5FeO_7$, Bromophenol blue, Thymol blue, 1,4% thạch). Sau khi ủ ở 37^{o}C trong 18 giờ, hình thái các khuẩn lạc được quan sát, các tế bào từ khuẩn lạc được nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi quang học với tổng độ phóng đại 1000X.

Đánh giá khả năng lên men glucose và lactose: Môi trường lỏng chứa peptone 10 (g/l), NaCl 30 (g/l), glucose/lactose 10 (g/l), phenol red 1,8 mg, pH 7.4 và có ống Durham được sử dụng để đánh giá khả năng lên men đường glucose và lactose. Khuẩn lạc được lựa chọn được cấy vào ống môi trường lỏng sau đó nuôi ở 37 ^{o}C trong 16-18 giờ. Khả năng lên men của vi khuẩn đối với các loại đường được đánh giá dựa vào sự đổi màu của môi trường từ đỏ sang vàng. Khả năng sinh khí của chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua ống Durham.

Xác định khả năng sinh catalase: Để xác định xem vi khuẩn có khả năng sinh catalase hay không, phương pháp phết lam kính được sử dụng. Sinh khối vi khuẩn được phết lên lam kính, sau đó nhỏ 1 giọt 3% H_2O_2 phủ lên sinh khối. Quan sát sự hình thành bọt khí trên giọt dung dịch H_2O_2.

Phương pháp PCR và giải trình tự gen 16S rDNA: Tách chiết DNA tổng số: Sinh khối vi khuẩn sau khi thu nhận từ 1 ml canh trường được hoà trong 0,5 ml đệm phá tế bào (Tris-HCl 400 mM, EDTA 60 mM, NaCl 150 mM, 1% SDS, lysozyme, pH 8,0), ủ 37°C trong 30 phút; sau đó bổ sung 0,2 ml CH_3COONa 5M và trộn đều; hỗn dịch được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu nhận phần dịch nổi; bổ sung một lượng tương đương về thể tích hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1), trộn đều, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút; thu nhận pha trên và trộn với isopropanol theo tỷ lệ 1:1 về thể tích, ủ phản ứng 30 phút trên đá; kết tủa DNA được thu nhận bằng ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút và rửa với 70% ethanol; cặn tủa DNA được làm khô và hoà tan trở lại bằng DIH_2O. Độ sạch và hàm lượng DNA được kiểm tra bằng phương pháp quang phổ.

Phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rDNA: Được thực hiện sử dụng cặp mồi phổ biến là 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) và 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). Hỗn hợp phản ứng PCR được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm PCR PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Takara Bio. Chu trình nhiệt gồm 35 chu kỳ: 98°C-8 giây, 55°C-5 giây, 72°C-90 giây.

Giải trình tự gen 16S rDNA và định loài: Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng PureLink PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Trình tự DNA được xác định bằng phương pháp Sanger bởi hãng 1st BASE (Singapore). Trình tự nucleotide của đoạn gen đích 16S rDNA được phân tích bằng phần mềm Bioedit 7.2 và nhận diện bằng công cụ BLAST trên ngân hàng NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

2.2.2. Phân lập và sàng lọc thể thực khuẩn

Làm giàu thể thực khuẩn: Lấy 30 ml mẫu nước phân tích vào ống falcon 50 ml ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 10 phút. Dịch nổi ly tâm được chuyển sang ống falcon mới và được ly tâm lần thứ hai. Sau đó, 5 ml dịch nổi ly tâm được thu vào bình tam giác đã tiệt trùng, thêm 5 ml môi trường lỏng 2X MLB (peptone 20 g/l, cao nấm men 10 g/l, NaCl 60 g/l) và 1 ml canh trường *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng OD_{600}=0,6, ủ lắc hỗn hợp trong tủ nuôi 37°C qua đêm. Sau khi ủ, hỗn hợp được chuyển vào ống falcon 15 ml và ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 10 phút ở 4°C, dịch nổi ly tâm được thu sang ống falcon mới và ly tâm lần hai. Lọc dịch nổi ly tâm qua màng lọc 0,22 µm để loại bỏ hoàn toàn vi khuẩn còn sót lại để chuẩn bị thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Kiểm tra sự có mặt của thể thực khuẩn trong mẫu: Chuẩn bị đĩa thạch hai lớp bằng cách lấy 0,1 ml canh trường *V. alginolyticus* ở pha logarit trộn đều với 5 ml môi trường LB chứa 3% NaCl 0,6% agar (ủ ở bể ổn nhiệt 55°C), sau đó đổ hỗn hợp môi trường vi khuẩn vào đĩa thạch cứng LB 3% NaCl. Nhỏ 10 µl dịch làm giàu thể thực khuẩn lên đĩa, để khô trong 15 phút. Ủ đĩa thạch ở 37 trong 18 giờ và quan sát vùng ly giải trên đĩa (nếu có).

Phân lập thể thực khuẩn: Lấy 0,1 ml canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng ủ trong 15 phút với 0,1 ml dịch làm giàu thể thực khuẩn. Bổ sung vào hỗn hợp trên 5 ml môi trường MLB 0,6% agar, đảo trộn đều và đổ ra đĩa thạch cứng MLB (1% peptone, 0,5% cao nấm men, 3% NaCl, 1,5% thạch). Ủ các đĩa thạch ở tủ nuôi 37°C trong 18 giờ. Quan sát các vệt tan trên đĩa. Dùng que cấy cắt vệt tan riêng rẽ cho vào 1 ml đệm SM, đảo trộn kỹ và ủ ở 40°C trong 30 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 8000 x g trong 5 phút, 4°C. Dịch nổi ly tâm được thu lại để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Lấy 0,1 ml dịch nổi ly tâm trộn đều với 0,1 ml canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng trong 10 ml môi trường MLB. Ủ lắc hỗn hợp ở 37°C, qua đêm. Hỗn hợp sau đó được ly tâm, thu dịch nổi và lọc qua màng 0,22 µm. Dịch lọc được bảo quản bằng cách bổ sung đệm SM theo tỷ lệ 1:1 và để ở tủ lạnh 4°C.

2.2.3. Đánh giá phổ vật chủ

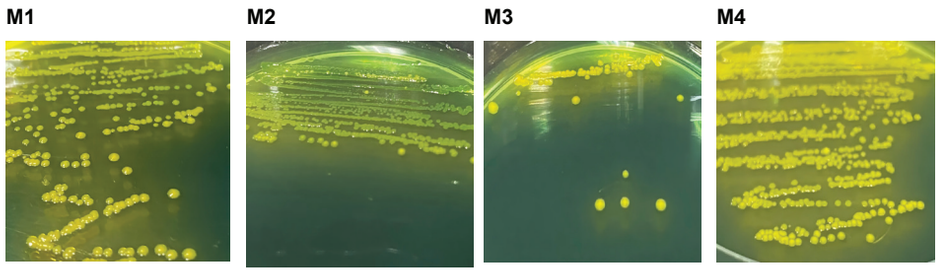
Các vật chủ được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu của thể thực khuẩn phân lập được bao gồm các chủng thuộc chi Vibrio: *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562; và các chủng probiotics: *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*. Quy trình kiểm tra khả năng xâm nhiễm của thể thực khuẩn được thực hiện như quy trình kiểm tra sự có mặt của thể thực khuẩn trong mẫu được mô tả ở trên.

2.2.4. Đánh giá hoạt tính ly giải tế bào chủ.

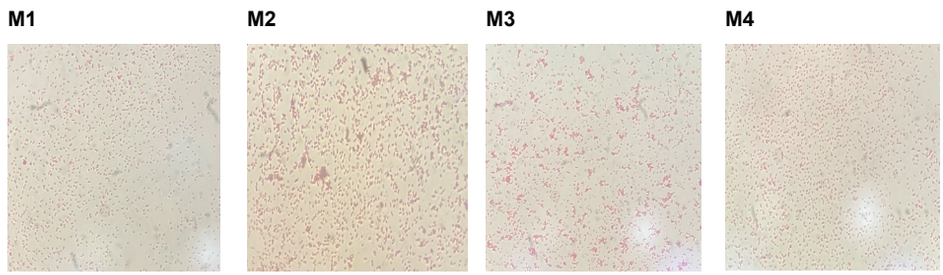
Canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* ở pha tăng trưởng được bổ sung dịch thể thực khuẩn, hỗn hợp được nuôi lắc ở ủ 37°C. Tiến hành lấy mẫu mỗi giờ 1 lần, mẫu được đo và ghi lại giá trị. Số liệu được phân tích dựa trên kết quả so sánh giá trị của mẫu kiểm chứng âm (không bổ sung thể thực khuẩn) với các mẫu thí nghiệm có bổ sung thể thực khuẩn.

2.2.5. Đánh giá độ bền của thể thực khuẩn đối với nhiệt độ và pH

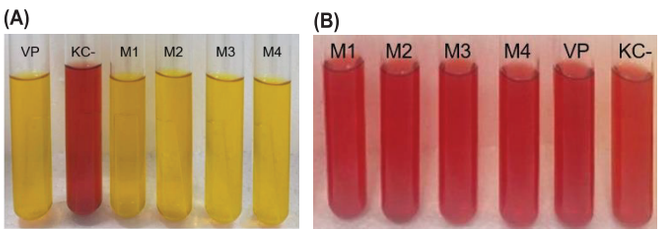
Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi A.J. Kurek và cs 2016 [16]. Độ bền nhiệt của thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách ủ dung dịch thể thực khuẩn ở các nhiệt độ -20, 4, 25, 37, 60 và 80°C trong thời gian 2 giờ. Đối với độ bền pH, thể thực khuẩn được giữ trong đệm có pH 2, 4, 6, 7, 8 và 10 trong thời gian 2 giờ. Sau khi thách thức ở các nhiệt độ và pH khác nhau, lượng thể thực khuẩn được xác định theo phương pháp thạch hai lớp. Tỷ lệ sống của thể thực khuẩn được xác định bằng cách chia hiệu giá thể thực khuẩn trong mẫu xử lý cho hiệu giá thể thực khuẩn trong mẫu kiểm chứng. Thể thực khuẩn trong điều kiện nhiệt độ 4°C và pH 7 được coi là điều kiện kiểm chứng vì hiệu giá không thay đổi so với trước xử lý.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường TCBS. M1, M2, M3, và M4 là 4 mẫu nước từ các đầm nuôi tôm.



Hình 2. Hình thái tế bào vi khuẩn. M1, M2, M3, và M4 là 4 mẫu nước từ các đầm nuôi tôm.



Hình 3. Khả năng lên men đường glucose (A) và đường lactose (B). Các chủng phân lập M1, M2, M3, và M4. VP: chủng chuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC17802. KC-: mẫu kiểm chứng âm (không bổ sung vi khuẩn).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập Vibrio alginolyticus từ nước đầm nuôi tôm

3.1.1. Phân lập trên môi trường chọn lọc

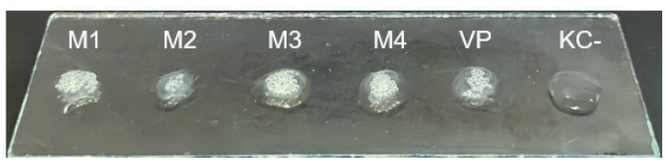
Bốn mẫu nước từ đầm nuôi tôm đã được sử dụng để phân lập *V. alginolyticus*. Mẫu nước được pha loãng theo bậc 10 và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc ở điều kiện 37°C trong 18 giờ. Bốn khuẩn lạc đơn sinh trưởng trên môi trường chọn lọc được lựa chọn và tiếp tục được cấy ria làm sạch trên môi trường chọn lọc TCBS. Kết quả cho thấy, xuất hiện các khuẩn lạc màu vàng, tròn, nhẵn trên môi trường thạch đĩa (hình 1). Sự xuất hiện khuẩn lạc mầu vàng là do khả năng lên men sucrose của vi khuẩn và sinh axit. Trong môi trường TCBS có các chất chỉ thị màu phụ thuộc pH là bromothymol blue và thymol blue, khi vi khuẩn lên men sucrose sẽ sinh axit làm giảm pH của môi trường xung quanh, từ đó làm cho chất chỉ thị màu chuyển từ màu xanh sang vàng, dẫn đến hình thành khuẩn lạc màu vàng. Nhiều nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng *V. alginolyticus* là loài vi khuẩn có khả năng lên men sucrose [17].

Tế bào vi khuẩn từ 4 mẫu nước được nhuộm Gram và kết quả cho thấy, cả 4 mẫu đều là các vi khuẩn hình que, cong nhẹ ở một đầu và là vi khuẩn Gram âm (hình 2). Đặc điểm hình thái tế bào này là phù hợp với hình thái của *V. alginolyticus*.

3.1.2. Xác định một số đặc điểm sinh hoá

Lên men đường glucose và lactose: Bốn chủng vi khuẩn được lựa chọn được lên men trong môi trường có chất chỉ thị là đỏ phenol và sử dụng nguồn carbon duy nhất là glucose. Sau khi lên men thì cả 4 canh trường nuôi cấy đều chuyển từ màu đỏ sang vàng và không có hiện tượng sinh khí khi sử dụng ống Durham. Sự chuyển màu của môi trường là do vi khuẩn này có khả năng lên men glucose sinh axit, nên làm giảm pH của môi trường, dẫn đến làm cho chất chỉ thị đỏ Phenol chuyển từ màu đỏ sang màu vàng. Tuy nhiên, khi sử dụng lactose làm nguồn carbon cho quá trình lên men thì cả 4 chủng vi khuẩn đều không làm đổi màu của môi trường. Kết quả này cho thấy, cả bốn chủng được lựa chọn đều không có khả năng lên men lactose. Trong quá trình lên men cả 4 chủng cũng không sinh khí trên môi trường có đường lactose (hình 3B). Nghiên cứu của O. Erkmen (2022) [18] đã chỉ ra rằng, các loài *Vibrio* đều có khả năng lên men glucose nhưng không lên men đường lactose và không sinh khí.

Khả năng tổng hợp catalase: Catalase là các enzyme có vai trò ngăn cản sự oxy hoá tế bào bằng cách phân giải hydrogen peroxide thành nước và oxy. Tất cả các loài, trong đó có *Vibrio,* có khả năng tổng hợp catalase [13], thì khi H_2O_2 được nhỏ vào lam kính có chứa vi khuẩn bọt khí sẽ xuất hiện. Kết quả thử nghiệm cho thấy, cả bốn chủng phân lập đều có khả năng sinh catalase. Thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp catalase cũng được thực hiện với chủng *V. parahaemolyticus* ATCC17802, kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp catalase là rõ ràng (hình 4).



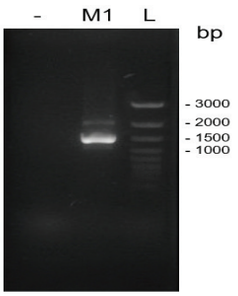
Hình 4. Khả năng sinh tổng hợp catalase. Các chủng phân lập M1, M2, M3, và M4. VP: chủng chuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802. KC-: mẫu kiểm chứng âm.

3.1.3. Định danh vi khuẩn

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy, bốn chủng phân lập được từ đầm nuôi tôm đều có đặc điểm của *V. alginolyticus* với các đặc tính như hình thành khuẩn lạc màu vàng trên môi trường TCBS, Gram âm, hình que cong, lên men glucose, không lên men lactose, không sinh khí và có hoạt tính catalase (bảng 1). Cả bốn chủng này đều có đặc tính giống nhau nên chủng M1 được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu giải trình tự 16S rDNA phục vụ cho việc định danh. DNA tổng số tách chiết từ sinh khối chủng M1 với nồng độ 448 ng/µl, tỷ lệ A260/A230 và A260/A280 đạt là 2,0 và 1,85 tương ứng được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen 16S rDNA. Kết quả cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen đích, với kích thước khoảng gần 1500 bp, phù hợp với kích thước đoạn gen đích rDNA cần khuếch đại sử dụng cặp mồi 27F/1492R (hình 5). Trình tự đoạn gen đích đã được xác định và tiến hành so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy, trình tự 16S rDNA của chủng M1 có độ tương đồng 99,47% so với chủng *V. alginolyticus* 2014V-1011 với mã số CP046772.1. Từ các kết quả thu được có thể kết luận rằng, đã phân lập được chủng *V. alginolyticus* M1 từ đầm nuôi tôm. Chủng vi khuẩn này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu phân lập các thể thực khuẩn đặc hiệu.

Bảng 1. Đặc tính của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

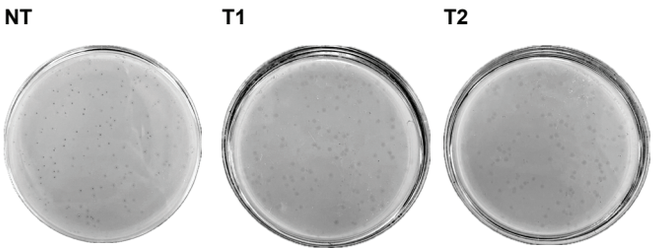
Chủng	Lên men glucose	Lên men lactose	Sinh khí	Sinh catalase
M1	+	-	-	+
M2	+	-	-	+
M3	+	-	-	+
M4	+	-	-	+
Vibrio parahaemolyticus ATCC17802	+	-	-	+
Kiểm chứng âm (KC-)	-	-	-	-



Hình 5. Ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rDNA. M1: mẫu DNA khuôn từ chủng M1; (-): mẫu kiểm chứng âm; L: thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ).

3.2. Phân lập thể thực khuẩn đặc hiệu Vibrio alginolyticus

Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 được sử dụng để phân lập các thể thực khuẩn đặc hiệu theo phương pháp thạch hai lớp. Kết quả cho thấy, xuất hiện nhiều vệt tan trên môi trường thạch hai lớp sau 18 giờ ủ ở điều kiện 37°C (hình 6). Điều đó chứng tỏ cả ba mẫu nghiên cứu đều chứa thể thực khuẩn. Một số dòng tạo vệt tan lớn được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo bao gồm NT1, NT4, T13 và T23.



Hình 6. Hình ảnh vệt tan trên thạch hai lớp. NT, T1 và T2 là các mẫu nước dùng để phân lập thể thực khuẩn.

3.3. Xác định tính đặc hiệu chủng chủ của thể thực khuẩn

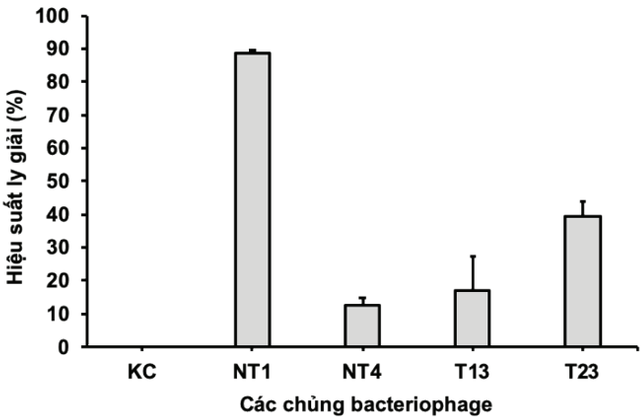
Tính đặc hiệu của thể thực khuẩn là một trong những phương diện quan trọng cần được quan tâm trong quá trình ứng dụng thể thực khuẩn. Các thể thực khuẩn có tính đặc hiệu cao luôn được quan tâm và lựa chọn vì khi các chủng này được ứng dụng nó chỉ tác động lên một/hoặc một số loài vi khuẩn chủ nhất định, mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn chủ khác, đặc biệt là các vi khuẩn có lợi. Mục tiêu của chúng tôi là tìm kiếm các thể thực khuẩn đặc hiệu *V. alginolyticus*, do đó trong nghiên cứu này bốn chủng thể thực khuẩn được thử hoạt tính ly giải với 4 loài thuộc chi Vibrio và 2 loài thuộc chi Bacillus. Kết quả cho thấy, không xuất hiện vệt tan ở các chủng thuộc chi *Vibrio* như *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 và các chủng probiotics thuộc chi Bacillus như *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* (bảng 2). Điều đó chứng tỏ các chủng thể thực khuẩn được phân lập là đặc hiệu với *V. alginolyticus*. Tính đặc hiệu của thể thực khuẩn với các loài *Vibrio* cũng đã được quan sát ở các nghiên cứu trước [3, 19]. Điểm đáng chú ý là các chủng thể thực khuẩn không xâm nhiễm các chủng probiotics thuộc chi Bacillus. Điều này cho thấy chủng thể thực khuẩn là an toàn đối với Bacillus nên có thể sử dụng cùng với các chủng probiotics này cho thuỷ sản.

Bảng 2. Phổ vật chủ đối với các chủng thể thực khuẩn.

Các chủng vi khuẩn	Các chủng thể thực khuẩn			
	NT1	*T13*	*T23*	*NT4*
V. parahaemolyticus ATCC17802	-	-	-	-
V. parahaemolyticus BL	-	-	-	-
V. cholerae ATCC 14733	-	-	-	-
V. vulnificus ATCC 27562	-	-	-	-
Bacillus licheniformis	-	-	-	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-
V. alginolyticus M1	+	+	+	+

3.4. Hoạt tính ly giải tế bào chủ của các chủng thể thực khuẩn phân lập

Hoạt tính ly giải đối với vật chủ *V. alginolyticus* M1 được thực hiện trên môi trường dịch lỏng. Kết quả cho thấy, các chủng phân lập khác nhau có hoạt tính ly giải tế bào chủ là khác nhau. Hoạt tính ly giải mạnh nhất là chủng NT1 với hiệu suất ly giải đạt 90%; tiếp theo là các chủng T23, T13 và NT4 với hiệu suất ly giải lần lượt là 39, 17 và 13% tương ứng (hình 7).

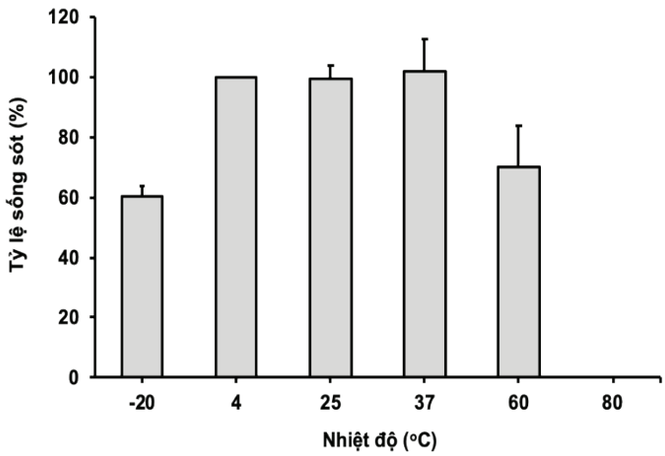


Hình 7. Hoạt tính ly giải tế bào chủ của các chủng thể thực khuẩn phân lập. KC: mẫu kiểm chứng âm canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 không bổ sung thể thực khuẩn; các mẫu NT1, NT4, T13, T23 là các mẫu canh trường vi khuẩn *V. alginolyticus* M1 có bổ sung các chủng thể thực khuẩn NT1, NT4, T13, T23 tương ứng.

Hoạt tính ly giải tế bào chủ đạt trên gần 90% cũng nhận được đối với chủng thể thực khuẩn kháng *V. parahaemolyticus* trong các nghiên cứu trước đây [3]. Các chủng thể thực khuẩn khác nhau có hoạt tính ly giải tế bào chủ *V. alginolyticus* là khác nhau cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của S. Droubogiannis và cs (2022) [20]. Từ kết quả thu được, chủng thể thực khuẩn NT1 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

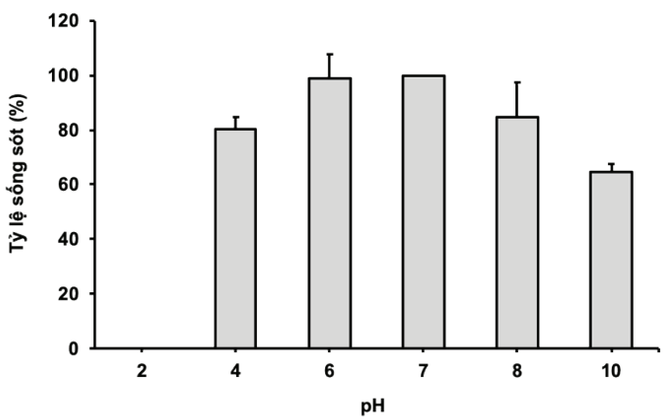
3.5. Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn phân lập

Độ bền nhiệt và pH của chủng thể thực khuẩn NT1 được đánh giá trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, chủng NT1 vẫn giữ được độ bền tương đối ở các điều kiện nhiệt độ khảo sát khác nhau 4, 25, và 37°C. Độ bền nhiệt của thể thực khuẩn này giảm đi ở điều kiện -20°C và nhiệt độ 60°C; tỷ lệ sống sót chỉ còn khoảng 60-70%. Đặc biệt, M1 bị chết hoàn toàn ở 80°C (hình 8). Kết quả này là phù hợp với kết quả nghiên cứu về *V. parahaemolyticus* phage vB_VpaP_GHSM17 trong nghiên cứu của X. Liang và cs (2022) [4]. Độ bền nhiệt của M1 giảm đi ở nhiệt độ cao trong nghiên cứu này cũng tương tự như phage VA5 trong nghiên cứu của Q. Hao và cs (2023) [6], và các chủng phage trong nghiên cứu của R. Gao và cs (2024) [7]. Tỷ lệ sống sót của phage Vp08 và Vp11 chỉ là 31,16 và 49,96%, tương ứng ở điều kiện 60°C; tất cả các thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3], đều bị bất hoạt và mất khả năng xâm nhiễm khi xử lý ở điều kiện 70°C. Thể thực khuẩn S1R3Y kháng *V. alginolytycus* phân lập từ mẫu nước thải tại chợ hải sản Đại Liên và vB_VpaP_SJSY21 kháng *V. parahaemolyticus* phân lập từ chợ hải sản Tam Á, Trung Quốc cũng bị bất hoạt hoàn toàn ở 70°C [5, 21].



Hình 8. Độ bền nhiệt của chủng thể thực khuẩn NT1 ở các nhiệt độ khác nhau: -20, 4, 25, 37, 60 và 80°C.

Đối với độ bền pH, thể thực khuẩn NT1 có khả năng chịu được trong một giải pH 4-10 (hình 9). Tỷ lệ sống sót vẫn đạt 80-100% trong khoảng pH 4-8, tỷ lệ này giảm xuống còn 64,5% ở điều kiện pH 10 và đặc biệt thể thực khuẩn NT1 bị chết hoàn toàn khi giữ ở pH 2 trong thời gian 2 giờ. Độ bền pH của thể thực khuẩn NT1 hoàn toàn phù hợp với chủng phage S1R3Y kháng *V. alginolyticus* trong nghiên cứu của Y. Ren và cs (2022) [5]. Độ bền pH là khác nhau đối với các



Hình 9. Độ bền pH của chủng thể thực khuẩn NT1 ở các điều kiện pH khác nhau: 2, 4, 6, 7, 8 và 10.

chủng phage khác nhau. Tương tự như chủng NT1 trong nghiên cứu này, các chủng thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3] đều bị bất hoạt ở pH 2, hai trong số ba chủng phage trong nghiên cứu của R. Gao và cs (2024) [7], cũng bị bất hoạt ở pH 2 này [7], trong khi đó chủng thể thực khuẩn VA5 vẫn sống sót ở pH 2 và thậm chí là pH 1 [6]. Ngược lại, các chủng thể thực khuẩn trong nghiên cứu của C.W. Tan và cs (2021) [3] có tỷ lệ sống sót gần như 100% ở pH 11, trong khi đó chủng VA5 giảm khá nhiều tại pH này. Từ các kết quả thu được trong nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây về độ bền nhiệt độ và pH của các chủng thể thực khuẩn đưa đến kết luận rằng, đối với mỗi chủng phage khác nhau đều có đặc tính về độ bền nhiệt độ và pH khác nhau, cần phải được nghiên cứu để lựa chọn ra điều kiện thích hợp cho mỗi chủng phage được phân lập.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh được chủng *V. alginolyticus* M1 từ mẫu nước đầm nuôi tôm tại Hải Phòng. Sử dụng *V. alginolyticus* M1 làm chủng chủ, chúng tôi cũng phân lập được 4 dòng thể thực khuẩn đặc hiệu. Cả bốn dòng lựa chọn đều không có hoạt tính ly giải một số chủng thuộc chi *Vibrio* như *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* BL, *V. cholerae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562 và các chủng probiotics thuộc chi *Bacillus* như *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*. Dòng thể thực khuẩn NT1 có tính bền nhiệt cao lên đến 60^{o}C và phổ pH rộng (pH 3-10), do đó được xem là ứng viên cho phát triển giải pháp sinh học thay thế kháng sinh trong phòng và trị bệnh do *V. alginolyticus* gây ra trên thuỷ sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Thitamadee, A. Prachumwat, J. Srisala, et al. (2016), "Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia", *Aquaculture*, **452**, pp.69-87, DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2015.10.028.

[2] M. Yang, Y. Liang, S. Huang, et al. (2020), "Isolation and characterisation of the novel phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*", *Front. Microbiol.*, **11**, DOI: 10.3389/FMICB.2020.00259/BIBTEX.

[3] C.W. Tan, Y. Rukayadi, H. Hasan, et al. (2021), "Isolation and characterization of six *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophages from seafood samples", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/FMICB.2021.616548/BIBTEX.

[4] X. Liang, Y. Wang, B. Hong, et al. (2022), "Isolation and characterisation of a lytic *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpaP_GHSM17 from sewage samples", *Viruses*, **14(8)**, DOI: 10.3390/V14081601.

[5] Y. Ren, L. Wang, R. Chen, et al. (2022), "Isolation and characterisation of a novel phage vB_ValP_VA-RY-3 infecting *Vibrio alginolyticus*", *Virus Res.*, **322**, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2022.198945.

[6] Q. Hao, Y. Bai, H. Zhou, et al. (2023), "Isolation and characterisation of bacteriophage VA5 against *Vibrio alginolyticus*", *Microorg.*, **11(12)**, DOI: 10.3390/MICROORGANISMS11122822.

[7] R. Gao, K. Sun, A. Abdalla, et al. (2024), "Isolation, characterisation, and preliminary application of three Vibrio phages in controlling *Vibrio alginolyticus*", *LWT*, **191**, DOI: 10.1016/J.LWT.2023.115638.

[8] J.L.V. Aguilar, G.M. Pech, I.L. Rosas, et al. (2022), "Phage therapy for crops: Concepts, experimental and bioinformatics approaches to direct its application", *Int. J. Mol. Sci.*, **24(1)**, DOI: 10.3390/IJMS24010325.

[9] P. Rogovski, R. Cadamuro, R.D. Silva, et al. (2021), "Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/FMICB.2021.793135.

[10] A. Sulakvelidze (2013), "Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens", *J. Sci. Food Agric.*, **93(13)**, pp.3137-3146, DOI: 10.1002/JSFA.6222.

[11] M. Kazi, U.S. Annapure (2023), "Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens", *J. Food Sci. Technol.*, **53(3)**, DOI: 10.1007/S13197-015-1996-8.

[12] P.C. Artawinata, S. Lorraine, D.E. Waturangi (2023), "Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria", *Sci. Rep.*, **13(1)**, DOI: 10.1038/S41598-023-36591-6.

[13] S.T. Abedon (2019), "Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **145**, pp.18-39, DOI: 10.1016/J.ADDR.2018.06.018.

[14] L.K. Harada, E. Silva, W. Campos, et al. (2018), "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art," *Microbiol. Res.*, **213(212)**, pp.38-58, DOI: 10.1016/J.MICRES.2018.04.007.

[15] Y. Huang, W. Wang, Z. Zhang, et al. (2022), "Phage products for fighting antimicrobial resistance", *Microorganisms*, **10(7)**, DOI: 10.3390/MICROORGANISMS10071324.

[16] A.J. Kurek, T. Gasior, B. Nejman, et al. (2016), "Biodiversity of bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage", *Sci. Reports*, **6(1)**, pp.1-17, DOI: 10.1038/srep34338.

[17] H. Chart (2012), "Vibrio, mobiluncus, gardnerella and spirillum: Cholera; vaginosis; rat bite fever", *Med. Microbiol.*, pp.314-323, DOI: 10.1016/B978-0-7020-4089-4.00045-7.

[18] O. Erkmen (2022), "Isolation and counting of Vibrio", *Microbiol. Anal. Foods Food Process. Environ.*, pp.253-268, DOI: 10.1016/B978-0-323-91651-6.00012-4.

[19] A. Dias, T.J. Duarte, D. Trindade, et al. (2024), "Bacteriophages to control *Vibrio alginolyticus* in live feeds prior to their administration in larviculture", *J. Appl. Microbiol.*, **135(5)**, DOI: 10.1093/JAMBIO/LXAE115.

[20] S. Droubogiannis, L. Pavlidi, M. Tsertou, et al. (2022), "Vibrio phage artemius, a novel phage infecting *Vibrio alginolyticus*", *Pathogens*, **11(8)**, DOI: 10.3390/PATHOGENS11080848.

[21] Y. Xu, J. Sun, J. Hu, et al. (2023), "Characterisation and preliminary application of a novel lytic *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage vB_VpaP_SJSY21", *Int. J. Mol. Sci.*, **24(24)**, DOI: 10.3390/IJMS242417529.

Một số thành tựu trong nghiên cứu phát triển nền tảng chip vi lưu tập trung và phát hiện protein dựa trên kênh dẫn nano và cảm biến trở kháng

Trần Như Chí[1], Huỳnh Thị Thùy Linh[1, 2], Đỗ Quang Lộc[3], Bùi Thanh Tùng[1*]

[1]Khoa Điện tử Viễn thông, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
[2]Khoa Kỹ thuật và Công nghệ, Đại học Huế, 1 Điện Biên Phủ, phường Vĩnh Ninh, TP. Huế, Việt Nam
[3]Khoa Vật lý, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/10/2024; ngày gửi phản biện 23/10/2024; ngày nhận phản biện 12/11/2024; ngày chấp nhận đăng 18/11/2024

Tóm tắt:

Những tiến bộ gần đây trong công nghệ vi lưu đã thúc đẩy sự phát triển đáng kể trong các phương pháp phát hiện protein - một kỹ thuật quan trọng trong chẩn đoán sớm và điều trị hiệu quả các bệnh lý, đặc biệt là ung thư. Sự kết hợp giữa kỹ thuật vi lưu và các công nghệ cảm biến tiên tiến không chỉ giúp giảm thể tích mẫu và thời gian phân tích, mà còn cải thiện đáng kể độ nhạy, độ chọn lọc và khả năng tích hợp của hệ thống phát hiện. Nghiên cứu này tổng quan và phân tích những tiến bộ mới trong phát triển cấu trúc vi lưu tiên tiến, tích hợp công nghệ kênh dẫn nano và cảm biến trở kháng, hướng tới nâng cao hiệu quả phát hiện protein. Nền tảng vi lưu tích hợp đề xuất sử dụng phương pháp phân cực nồng độ ion (ion concentration polarisation - ICP) dựa trên các kênh nano để tập trung protein, cùng với kỹ thuật đo phổ trở kháng điện hóa nhằm phát hiện protein đích. Phương pháp tích hợp này giúp nâng cao độ nhạy và đặc hiệu, mang lại giải pháp hiệu quả để phát hiện protein ở nồng độ thấp trong các mẫu sinh học. Thông qua việc điều khiển nồng độ ion trong kênh vi lưu và cảm biến trở kháng trên thiết bị phòng thí nghiệm trên chip, các kết quả nghiên cứu cho thấy triển vọng của một phương pháp chẩn đoán chi phí thấp, hiệu quả và dễ mở rộng, với tiềm năng ứng dụng trong các thiết bị chăm sóc sức khỏe tại chỗ.

Từ khóa: **cảm biến trở kháng, làm giàu protein, phát hiện protein, phân cực nồng độ ion, vi lưu.**

Chỉ số phân loại: **2.2, 2.6, 3.5**

Some notable achievements in research and development of microfluidic chip platforms for protein preconcentration and detection based on nanochannel techniques and impedance sensors.

Nhu Chi Tran[1], Thi Thuy Linh Huynh[1, 2], Quang Loc Do[3], Thanh Tung Bui[1*]

[1]Faculty of Electronics and Telecommunications, University of Engineering and Technology, Vietnam National University - Hanoi, 144 Xuan Thuy Street, Cau Giay Ward, Hanoi, Vietnam
[2]Faculty of Engineering and Technology, Hue University, 1 Dien Bien Phu Street, Vinh Ninh Ward, Hue City, Vietnam
[3]Faculty of Physics, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Ward, Hanoi, Vietnam

Received 21 October 2024; revised 12 November 2024; accepted 18 November 2024

Abstract:

Recent advances in microfluidic technology have significantly driven the development of protein detection methods, a critical technique for early diagnosis and effective treatment of diseases, particularly cancer. The combination of microfluidic systems with advanced sensing technologies not only reduces sample volume and analysis time but also significantly enhances the sensitivity, selectivity, and integration capability of detection systems. This study provides an overview and evaluation of recent achievements in enhancing microfluidic structures, combining nanochannel techniques with impedance sensors for protein detection. The proposed integrated microfluidic platform employs ion concentration polarisation (ICP) based on nanochannels for protein preconcentration, along with electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to detect target proteins. This integrated approach improves sensitivity and specificity, offering an efficient solution for detecting low-concentration proteins in biological samples. By controlling ion concentration within the microfluidic channel and using impedance sensors on a lab-on-chip device, the reported results demonstrate the potential of a low-cost, efficient, and scalable diagnostic method with promising applications in point-of-care devices.

Keywords: **impedance biosensor, ion concentration polarisation, microfluidics, protein detection, protein enrichment.**

Classification numbers: **2.2, 2.6, 3.5**

[*]Tác giả liên hệ: Email: tungbt@vnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

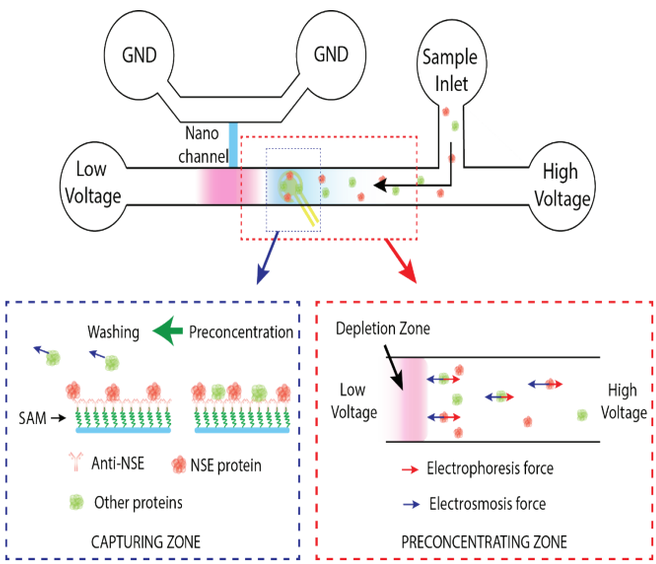
Phát hiện protein thông qua các phương pháp miễn dịch là kỹ thuật quan trọng trong việc theo dõi, chẩn đoán và điều trị các bệnh, đặc biệt là ung thư [1]. Việc chẩn đoán sớm cung cấp điều kiện tiên quyết để xác định phương pháp hiệu quả trong việc điều trị ung thư. Ung thư phổi, bao gồm ung thư phổi tế bào nhỏ (Small Cell Lung Cancer - SCLC) và ung thư phổi không tế bào nhỏ (None-Small Cell Lung Cancer - NSCLC), là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong. Phân tích protein có ưu thế vượt trội nhờ khả năng phản ánh trực tiếp các quá trình thay đổi trong tế bào và các cơ quan của cơ thể, cả bình thường và bệnh lý. Nếu xét riêng ung thư phổi, các chỉ dấu khối u thông dụng trong chẩn đoán và điều trị ung thư phổi có thể kể đến như CEA, CA 19-9, SCC, NSE và NY-ESO-1 có thể được sử dụng như một trợ giúp trong chẩn đoán mô học và tiên lượng. Xét nghiệm NSE được sử dụng để chẩn đoán, đánh giá giai đoạn bệnh và theo dõi hiệu quả điều trị ở các bệnh nhân có khối u thần kinh nội tiết (neuroendocrine tumors), hoặc là ung thư phổi tế bào nhỏ và u nguyên bào thần kinh (neuroblastoma). Enolase đặc hiệu thần kinh (NSE) được xem là dấu ấn khối u đáng tin cậy cho ung thư phổi tế bào nhỏ trong chẩn đoán sớm [2]. Mức NSE trong máu cao hơn ngưỡng cho phép là dấu hiệu quan trọng để phát hiện sớm ung thư phổi tế bào nhỏ [3]. Ở người, nồng độ NSE duy trì khoảng 12,5 µg/l và tăng cao khi mắc ung thư phổi [4].

Hiện nay, các chip vi lưu hoặc nền tảng Phòng thí nghiệm trên chip (Lab-on-a-Chip) đang được phát triển mạnh mẽ để phát hiện và phân tích các mẫu hóa học và sinh học [5, 6]. Các chip vi lưu đã được áp dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nhau, bao gồm tổng hợp hóa học, nghiên cứu proteomics, phân tích tế bào đơn, kỹ thuật mô, sàng lọc nhanh, phân tích môi trường và chẩn đoán y tế [7-9]. Trong lĩnh vực proteomics, chip vi lưu được phát triển để phát hiện và định lượng nồng độ protein, nhằm chẩn đoán và dự đoán các bệnh ung thư [10, 11]. Tập trung làm giàu protein là bước đầu tiên và quan trọng trong quy trình phát hiện protein, đặc biệt khi nồng độ protein trong mẫu sinh học thường rất thấp. Nhiều phương pháp đã được phát triển để cải thiện quá trình này. Một trong những phương pháp phổ biến là xếp chồng mẫu bằng cách khuếch đại trường, nơi mà điện trường được sử dụng để tập trung các phân tử protein vào một không gian hẹp, qua đó nâng cao khả năng phát hiện [12, 13]. Điện di đẳng thế (Isotachophoresis) là một kỹ thuật khác sử dụng gradient điện thế để tách và tập trung các phân tử protein dựa trên sự khác biệt về tính di động điện [14, 15]. Bẫy điện động (Electrokinetic Trapping) sử dụng các màng chọn lọc điện tích nano hoặc kênh vi lưu để bẫy và tập trung protein [16, 17]. Tập trung sắc ký (Chromatographic Preconcentration) sử dụng nguyên lý sắc ký để phân tách và tập trung các phân tử protein trong một cột pha tĩnh [18]. Tập trung màng lọc (Membrane Preconcentration) sử dụng màng lọc với những lỗ nhỏ để giữ lại các phân tử protein trong khi loại bỏ các thành phần không mong muốn [19]. Trong số các phương pháp tập trung làm giàu protein đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới quan tâm và phát triển, bẫy điện động dựa trên các màng chọn lọc điện tích có kích thước nano hoặc các kênh vi lưu trở nên nổi bật nhờ khả năng tập trung hiệu quả các phân tử hoặc hạt mang điện có kích thước khác nhau, cụ thể là protein trong các môi trường đệm sinh học hoặc mẫu chất lỏng của cơ thể [20, 21]. Cơ chế này dựa trên hiện tượng điện di, trong đó các phân tử protein mang điện di chuyển dưới tác động của một trường điện, và bị bắt giữ trong một vùng có điện trường mạnh. Phương pháp này có thể tập trung protein ở mức độ cao, ngay cả khi nồng độ ban đầu rất thấp, nhờ vào khả năng tạo ra miền nghèo ion trong cấu trúc nano, nơi mà các protein được tập trung và chuẩn bị cho quá trình phát hiện tiếp theo.

Sau khi các protein đã được tập trung, việc phát hiện và định lượng nồng độ protein có trong mẫu xét nghiệm là bước quan trọng tiếp theo. Cảm biến sinh học điện hóa đã trở thành công cụ chính trong việc này, đặc biệt trong chẩn đoán bệnh và các thiết bị điểm chăm sóc (POC) với khả năng tiểu hình hóa và tính tích hợp cao [22, 23]. Cảm biến điện hóa là loại cảm biến sử dụng bộ chuyển đổi điện hóa để chuyển đổi các sự kiện sinh hóa thành tín hiệu điện. Những phản ứng sinh hóa có thể liên quan đến phản ứng enzyme-substrate hoặc tương tác kháng nguyên - kháng thể [24, 25]. Để phát triển cảm biến điện hóa, bề mặt điện cực thường được biến đổi bằng cách sử dụng các hóa chất khác nhau nhằm cố định các phân tử sinh học như enzyme hoặc kháng thể [26, 27]. Những phản ứng sinh hóa này sau đó có thể được nhận diện thông qua các kỹ thuật đo điện hóa phổ biến như quét thế vòng (CV), phổ trở kháng điện hóa (EIS) và voltammetry sóng vuông (SWV) [28, 29]. Hiện nay, phần lớn các cảm biến sinh học, đặc biệt là cảm biến miễn dịch, sử dụng enzyme, kháng thể, axit nucleic để nhận diện các chất phân tích và phân tử sinh học, với tín hiệu thu được được chuyển đổi thành tín hiệu điện hoặc quang học để đo lường [30, 31]. Cảm biến sinh học điện hóa là một kỹ thuật cảm biến hiện đại, dựa trên sự nhận diện đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, mang lại nhiều lợi ích nhờ vào độ đặc hiệu cao, độ nhạy tốt và khả năng tích hợp hiệu quả [2, 32]. Nhiều nghiên cứu đã áp dụng các kỹ thuật đo lường điện hóa để phát triển các phương pháp phát hiện dấu ấn sinh học nhanh chóng và tiết kiệm chi phí, bao gồm việc sử dụng vật liệu nanocomposite và phương pháp quang khắc, nhờ vào độ nhạy, độ tin cậy và tính đa chức năng của chúng [32, 33]. Tuy nhiên, những phương pháp này thường yêu cầu nhiều thời gian để hoàn thành quá trình biến đổi bề mặt với nhiều bước và lớp chức năng hóa, dẫn đến hạn chế trong việc ứng dụng tiện lợi cho các thiết bị chẩn đoán. Nghiên cứu này thực hiện tổng quan và đánh giá một số thành tựu gần đây trong việc phát triển hướng tiếp cận mới cho việc

chế tạo cảm biến miễn dịch phát hiện protein, dựa trên việc sử dụng điện cực và lớp tự sắp xếp (SAM) được tích hợp cùng với cấu trúc tập trung làm giàu protein. Phương pháp này giúp giảm chi phí và đơn giản hóa quy trình xét nghiệm phát hiện và đo lường định lượng protein.

Nền tảng cấu trúc được đề xuất trong nghiên cứu này là một hệ thống vi lưu tích hợp, bao gồm các hệ thống tập trung làm giàu và cảm biến phát hiện nồng độ protein, cho phép đánh giá, phân tích và định lượng nồng độ protein trong mẫu xét nghiệm. Hình 1 minh họa nền tảng cấu trúc làm giàu và cảm biến protein. Trong hệ thống này, mẫu protein được đưa vào qua lối vào mẫu (Sample Inlet). Dựa trên cấu trúc tạo miền nghèo ion của kênh dẫn nano và hiện tượng điện thẩm, các protein trong mẫu sẽ được thao tác di chuyển hướng tới khu vực cảm biến vi điện cực. Tại đây, miền nghèo ion sẽ bẫy các protein ngay trên bề mặt điện cực cảm biến, nơi đã được chức năng hóa và cố định với kháng thể đặc hiệu cho protein đích. Khi các protein đích di chuyển đến, chúng sẽ bắt cặp đặc hiệu với kháng thể trên bề mặt điện cực. Sau quá trình rửa trôi, các protein không đặc hiệu sẽ được loại bỏ khỏi khu vực điện cực, và khi đó, phép đo trở kháng sẽ cung cấp kết quả tương ứng với nồng độ protein đích đã bắt cặp trên bề mặt điện cực. Hệ thống tập trung và cảm biến miễn dịch mới này hứa hẹn cung cấp một nền tảng chẩn đoán chi phí thấp, nhạy bén và thuận tiện tại điểm chăm sóc trong thực hành lâm sàng.



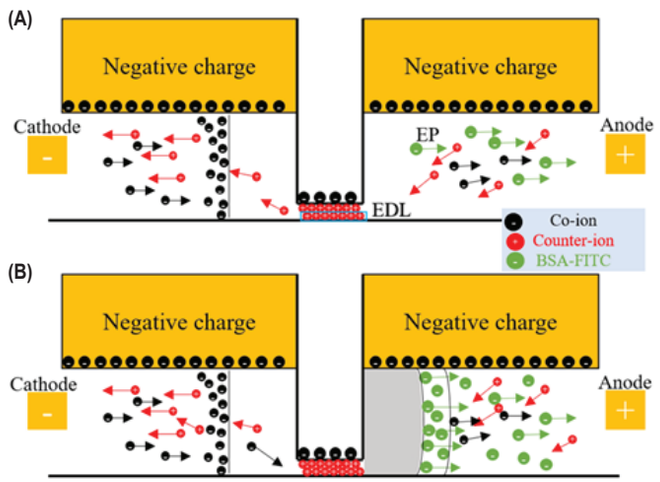
Chú thích:
Low voltage: điện áp thấp; High voltage: điện áp cao; Nano channel: kênh nano; Sample inlet: lối mẫu vào; Washing: rửa; Preconcentration: tập trung; Depletion zone: vùng nghèo; Other proteins: protein khác; Electrophoresis force: lực điện di; Electrosmosis force: lực điện thẩm; Capturing zone: vùng bắt giữ; Preconcentration zone: vùng tập trung

Hình 1. Sơ đồ nguyên lý thiết bị vi lưu đề xuất tích hợp cấu trúc tập trung làm giàu và phát hiện protein.

2. Nguyên lý và thiết kế

2.1. Nguyên lý tập trung làm giàu protein dựa trên phân cực nồng độ ion

Do nồng độ protein trong mẫu dao động từ fM đến µM, thể tích mẫu cần thiết cho mỗi lần kiểm tra thường khá lớn. Để giảm lượng mẫu tiêu thụ, cần sử dụng đến các cấu trúc, hệ thống tập trung và làm giàu protein tại các khu vực cảm biến. Y.C. Wang và cs (2005) [34] sự đã phát triển một thiết bị tập trung protein dựa trên cơ chế bẫy điện động học, sử dụng bộ lọc nano và đạt được hệ số tập trung cao đến 10^6-10^8 lần trong 10^4 giây. Các kỹ thuật khác để tập trung protein ở nồng độ cực thấp, bao gồm tăng cường mẫu theo trường điện, điện di đẳng thế, điện di tiêu điểm đẳng điện, bộ lọc nano và màng xốp nano, cũng đã được phát triển, mặc dù các kỹ thuật này có quy trình khá phức tạp [35]. Đặc biệt trong đó, phương pháp sử dụng bộ lọc nano để làm giàu protein dựa trên hiệu ứng ICP đã được đề xuất nghiên cứu và phát triển, hứa hẹn sẽ trở thành công cụ đơn giản, hiệu quả cao cho việc tập trung làm giàu protein trước khi thực hiện cảm biến phát hiện, đặc biệt là khả năng tích hợp cùng với các cấu trúc vi lưu, hướng tới khả năng phát triển các thiết bị chăm sóc điểm [36].



Chú thích:
Negative charge: tích điện âm; Cathode: cực âm; Anode: Cực dương; Co-ion: ion âm; Counter-ion: ion dương; EDL: lớp điện kép

Hình 2. Nguyên lý của hiệu ứng phân cực nồng độ ion (ICP) thông qua màng chọn lọc ion: (A) Sự hình thành lớp điện kép (EDL) tại thành của kênh nano; **(B)** Sự tích tụ protein bị ảnh hưởng bởi dòng điện thẩm (EOF).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất việc sử dụng hiệu ứng ICP của kênh dẫn nano để thực hiện việc tập trung protein dựa trên dòng dịch chuyển điện thẩm và dòng dịch chuyển điện di khi được áp điện trường ngoài vào cấu trúc kênh dẫn. Dòng chảy điện thẩm được gây ra bởi bề mặt của kênh dựa trên các hiệu ứng tạo ra bởi các sự phân bố điện tích giữa thành kênh và dung dịch. Ở khu vực thành kênh

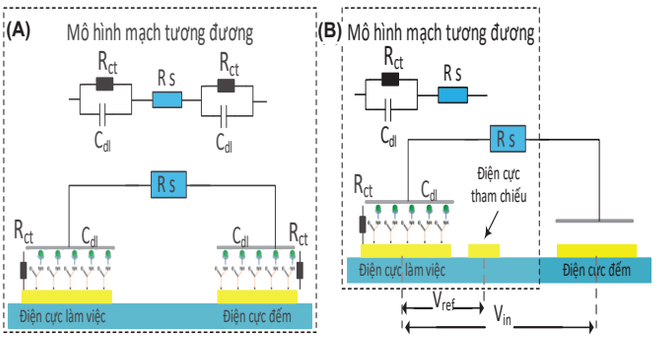
các lớp ion tự do với mật độ lớn hơn kéo theo các ion trái dấu di chuyển khi dòng chảy điện di xảy ra. Dòng chảy điện thẩm đạt được hiệu suất cao khi kích thước của vi kênh giảm xuống dẫn đến vùng ảnh hưởng của phân bố điện tích giữa hai lớp tăng lên đáng kể trong kênh. Hiệu ứng trên đã được sử dụng trong xét nghiệm sắc ký khi mà dòng chảy điện thẩm trong ống mao dẫn kéo các ion khác nhau với tốc độ khác nhau dẫn đến hệ quả là khi độ dài của ống đủ lớn thì các loại ion khác nhau bị phân tách [37, 38]. Hình 2 mô tả nguyên lý hình thành miền nghèo dựa trên cấu trúc kênh dẫn nano.

Trong nỗ lực phát triển và tối ưu hóa hiệu năng tập trung làm giàu protein, nghiên cứu của C.T. Nhu và cs (2022, 2023a) [39, 40] đã nghiên cứu đề xuất và thử nghiệm cấu trúc lưỡng cổng sử dụng màng chọn lọc ion để tạo ra các khu vực tập trung protein. Cấu trúc tập trung mà nhóm nghiên cứu đề xuất bao gồm ba kênh: một kênh chính để làm giàu protein và hai kênh đệm để ổn định vùng nghèo, vùng này đối xứng với kênh chính. Kênh chính được kết nối với các kênh đệm bằng một kênh nano làm cầu nối. Nafion, một màng chọn lọc cation mang điện tích âm trên bề mặt, đã được sử dụng trong cấu trúc này. Khi vùng nghèo được tạo ra, chênh lệch điện áp được áp dụng giữa hai đầu vào để tập trung protein thông qua lực cân bằng giữa dòng điện di do gradient điện trường và dòng điện thẩm [41].

2.2. Nguyên lý cảm biến phát hiện nồng độ protein sử dụng kỹ thuật cảm biến trở kháng

Đánh giá về cấu hình điện cực sử dụng trong cảm biến trở kháng phát hiện nồng độ protein: Phương pháp đo điện hóa hiện đang được xem là một kỹ thuật triển vọng nhờ khả năng phát hiện các phản ứng điện hóa trên bề mặt điện cực, điều này là rất quan trọng trong hầu hết các thiết bị cảm biến sinh học, đặc biệt là trong việc phát hiện các phân tử sinh học. Cả hai phương pháp đo vòng tuần hoàn (CV) và phổ trở kháng điện hóa (EIS) đều được coi là kỹ thuật không phá hủy, vì các liên kết trên bề mặt điện cực vẫn ổn định và bền vững trong suốt quá trình đo lường. Điều này giúp bề mặt điện cực không bị ảnh hưởng bởi các phép đo này. Trong nghiên cứu của C.T. Nhu và cs (2024) [42], nhóm nghiên cứu đã triển khai, so sánh và đánh giá hiệu quả trong đo lường của hai phương pháp này cụ thể ứng với hai cấu hình điện cực gồm cấu hình 2 điện cực và cấu hình 3 điện cực [42].

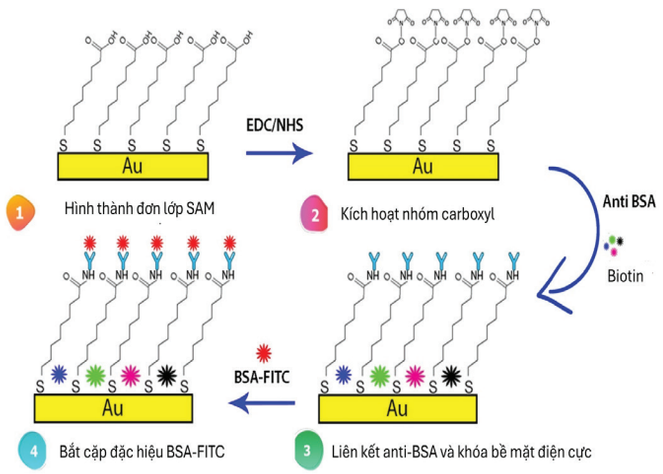
Các cảm biến sinh học dựa trên cấu hình 2 điện cực và 3 điện cực có thể được mô hình hóa bằng mạch Randles, như minh họa trong Hình 3. Trong cấu hình 2 điện cực (hình 3A), đo trở kháng giữa điện cực làm việc và điện cực đối được thực hiện trên một dải tần số rộng để phân tích các thay đổi về trở kháng liên quan đến sự tương tác sinh hóa trên bề mặt điện cực. Mô hình mạch Randles cho cảm biến 2 điện cực bao gồm điện dung lớp kép (C_{dl}) và điện trở truyền điện tích (R_{ct}) nối song song. Thêm vào đó là điện trở dung dịch (R_s) nối tiếp với mạch song song này. Do R_s thường lớn hơn nhiều so với trở kháng bề mặt, sự thay đổi trong tổng trở kháng chủ yếu bị ảnh hưởng bởi R_s, dẫn đến độ nhạy thấp của cảm biến so với cấu hình 3 điện cực cũng được xét tới trong cùng nghiên cứu.



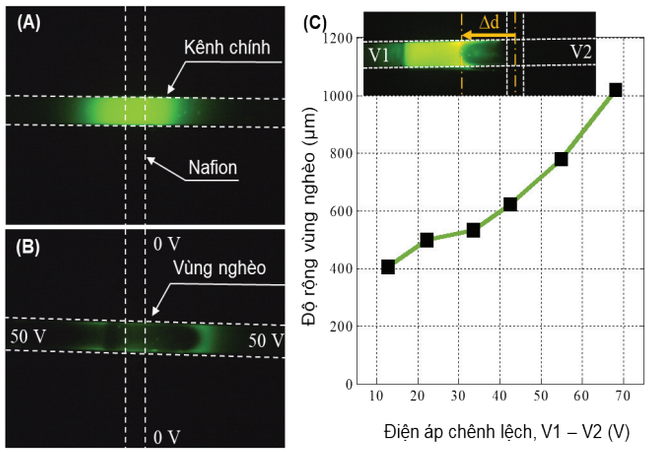
Hình 3. Mô hình của các cấu hình điện cực sử dụng trong cảm biến sinh học: (A) Mô hình 2 điện cực; **(B)** Mô hình 3 điện cực [42].

Ngược lại, cảm biến sinh học với cấu hình 3-điện cực (hình 3B) bao gồm một điện cực tham chiếu có điện thế ổn định, cho phép duy trì điện áp không đổi (V_{ref}) giữa điện cực tham chiếu và điện cực làm việc. Điều này giúp tối thiểu hóa ảnh hưởng của điện trở dung dịch (R_s), làm cho R_s gần như bằng 0 trong mô hình, và do đó, tổng trở kháng đo được chủ yếu phản ánh trở kháng bề mặt trên điện cực làm việc. Kết quả là độ nhạy của cảm biến được cải thiện rõ rệt. Trong cấu hình này, tổng trở kháng (Z) được tính toán bằng cách cộng điện trở bề mặt ($Z_{surface}$) và điện trở dung dịch (R_s), nhưng vì R_s gần như bằng 0 nên Z chủ yếu phản ánh trở kháng bề mặt. Trở kháng bề mặt được phân tích từ điện dung lớp kép (Z_{Cdl}) và điện trở truyền điện tích (R_{ct}), với Z_{Cdl} được tính dựa trên tần số góc của tín hiệu kích thích vào cảm biến sinh học.

Phương pháp biến tính bề mặt sử dụng cho các cấu trúc cảm biến sinh học cho phép đo trở kháng: Quá trình chức năng hóa bề mặt điện cực sử dụng cho các phép đo trở kháng về cơ bản được chia thành bốn bước chính: (1) hình thành lớp đơn phân tử tự sắp xếp, (2) kích hoạt nhóm carboxyl, (3) cố định kháng thể và khóa bề mặt, và (4) bắt cặp với kháng nguyên đích. Trong nghiên cứu của mình, C.T. Nhu và cs (2024) [42] đã thực hiện quá trình chức năng hóa bề mặt dựa trên cấu trúc điện cực vàng, sử dụng dung dịch 11 - MUA để cấu thành nên đơn lớp tự lắp ghép, và sử dụng cặp kháng nguyên - kháng thể để thử nghiệm đánh giá hiệu quả nghiên cứu là cặp Anti-BSA và BSA-FITC (hình 4). Kết quả được đánh giá thông qua phương pháp trở kháng và phương pháp quang là phương pháp đối chứng.



Hình 4. Quy trình biến tính bề mặt điện cực và khóa bề mặt để bắt cặp với protein đích trong cảm biến miễn dịch [42].



Hình 5. Kết quả của chế độ tập trung: (A) Cấu trúc ban đầu không áp dụng điện áp; **(B)** Chip vi lưu được áp dụng điện áp 50 V ở hai đầu của kênh mẫu và 0 V ở hai đầu của các kênh đệm, sau 60 giây; **(C)** Sự phụ thuộc của kích thước vùng nghèo vào sự chênh lệch điện áp giữa hai đầu của kênh chính trong cấu trúc tập trung lưỡng cổng [39].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phát triển nền tảng tập trung protein trên chip

Trong nghiên cứu của C.T. Nhu và cs (2022) [39], chip vi lưu tập trung protein hoạt động theo hai chế độ chính bao gồm chế độ làm nghèo và chế độ làm giàu protein. Trong chế độ đầu tiên, các kênh siêu nhỏ và kênh chính được lấp đầy bằng dung dịch đệm và dung dịch protein-FITC IgG tương ứng, trong khi các kênh phụ chứa dung dịch PBS 1X. Hỗn hợp dung dịch protein-FITC IgG và PBS 1X với tỷ lệ 1:1 được bơm vào kênh chính. Sau khi chuẩn bị, cấu trúc kênh dẫn vi lưu được quan sát dưới kính hiển vi và kết nối với nguồn điện qua các điện cực kim loại. Ban đầu, hình ảnh huỳnh quang cho thấy sự phân bố đồng đều của các phân tử protein trong kênh chính (hình 5A). Khi áp dụng điện áp 50 V cho kênh chính và 0 V cho các kênh đệm, các phân tử protein di chuyển về hai đầu của kênh chính do lực điện di mao quản. Tại vùng nghèo của kênh chính, nơi mà màng Nafion thực hiện nhiệm vụ kết nối điện giữa các kênh phụ và kênh chính, hiện tượng tối dần xuất hiện do các phân tử protein bị đẩy ra khỏi khu vực này (hình 5B). Kết quả cho thấy, vùng nghèo hình thành ở cả hai bên của kênh chính nhờ cấu trúc cổng đôi, mang lại hiệu quả tập trung đáng kể.

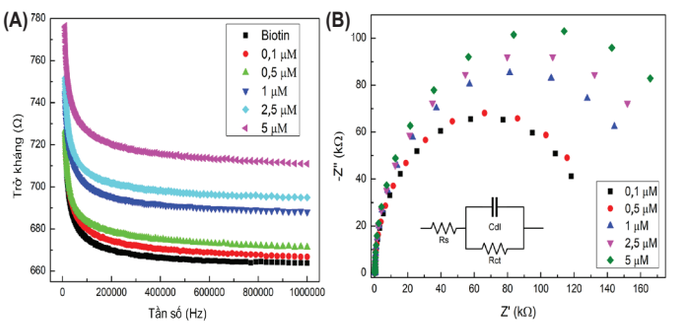
Một thiết lập tương tự đã được thực hiện để khảo sát chế độ thứ hai trong nghiên cứu này là chế độ tập trung, với sự điều chỉnh quan trọng là thay đổi điện áp của kênh chính để tạo ra sự chênh lệch điện áp giữa hai đầu của kênh chính, được ký hiệu là V_1-V_2. Tham số này đóng vai trò quan trọng trong các thí nghiệm tập trung vì nó xác định mối quan hệ giữa yếu tố tập trung (cường độ huỳnh quang) và kích thước của vùng nghèo (Δd) với sự chênh lệch điện áp. Trong các thí nghiệm, kết quả cho thấy, việc giữ cố định điện thế V_2 ở mức 25 V và thay đổi V_1 để tạo ra các mức chênh lệch điện áp khác nhau dẫn tới sự chênh lệch điện áp tăng lên. Kết quả là kích thước của vùng nghèo cũng tăng đáng kể, từ 300 lên hơn 1000 μm khi chênh lệch điện áp thay đổi từ 11 lên 68 V (hình 5C). Điều này có thể được giải thích là do sự gia tăng chênh lệch điện áp dẫn đến lực điện di mao quản mạnh hơn, làm cho protein-FITC và các ion di chuyển gần hơn đến kho chứa có điện áp cao hơn (V_1) và xa hơn khỏi màng chọn lọc ion. Bên cạnh đó, cường độ huỳnh quang của các hình ảnh thu được đã được chúng tôi thực hiện đo bằng phần mềm ImageJ bằng cách xét các cửa sổ giống nhau trong các hình ảnh. Kết quả cho thấy, cường độ huỳnh quang của vùng tập trung tăng gần gấp 3 lần khi chênh lệch điện áp thay đổi từ 0 lên 150 V. Sự gia tăng chênh lệch điện áp tạo ra dòng điện di, chống lại sự mở rộng của vùng nghèo và dẫn đến việc các protein di chuyển về phía vùng nghèo, giữ chúng tại đó. Cuối cùng, lực điện di và lực điện di mao quản đạt trạng thái cân bằng, tạo ra một vùng tập trung protein ổn định tại khoảng cách Δd từ vị trí màng Nafion trong kênh dẫn chính. Mặc dù cường độ huỳnh quang tỷ lệ thuận với sự chênh lệch điện áp, việc áp dụng điện áp quá cao có thể gây ảnh hưởng không tốt đến hoạt động của protein và sự ổn định của vùng tập trung.

3.2. Phát triển nền tảng cảm biến miễn dịch phát hiện protein

Đánh giá cấu hình cảm biến trở kháng 2-3 điện cực: Trong nghiên cứu của C.T. Nhu và cs (2024) [42] đã được công bố năm 2024 với nội dung khảo sát, đánh giá hai cấu hình điện cực cảm biến trở kháng gồm cấu hình 2 điện cực và cấu hình 3 điện cực cho thấy khả năng ứng dụng và tích

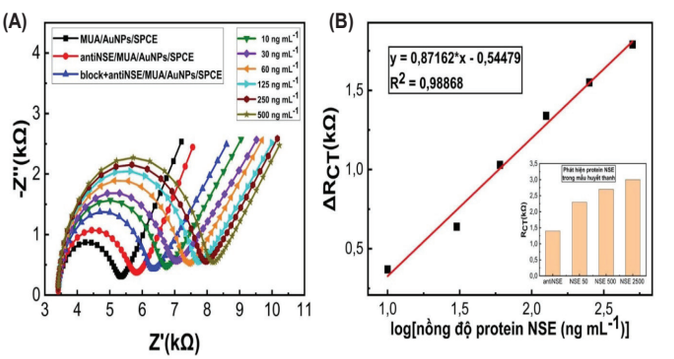
hợp của cả 2 cấu hình này trong các cấu trúc cảm biến sinh học cho các hệ vi lưu. Trong cấu hình 2 điện cực, kết quả đo phổ trở kháng đã được báo cáo ứng với các nồng độ khác nhau của protein BSA trên bề mặt điện cực vàng, với tín hiệu kích thích biên độ 50 mV và dải tần số từ 10 kHz đến 1 MHz. Khi nồng độ BSA tăng, trở kháng tương ứng cũng tăng, với giá trị lớn nhất ở nồng độ 5 mM, đạt 780 Ω tại tần số 10 kHz và giảm xuống dưới 720 Ω tại 1 MHz (hình 6). Đặc biệt, ở nồng độ BSA thấp hơn, sự giảm trở kháng diễn ra với độ dốc lớn hơn. Kết quả này giải thích rằng, trong mô hình 2 điện cực, tổng trở kháng được xác định bởi trở kháng bề mặt và điện trở dung dịch, với điện trở dung dịch giữ nguyên.

Trong khi đó, khi thực hiện đo phổ trở kháng điện hóa (EIS) trên cấu hình 3 - điện cực, kết quả cho thấy, khả năng đo chính xác trở kháng bề mặt do sự gần kề giữa điện cực tham chiếu và điện cực làm việc. Sử dụng mô hình mạch Randles để khớp với dữ liệu trở kháng, trở kháng bề mặt tỷ lệ thuận với nồng độ BSA, điện trở dung dịch nhỏ hơn nhiều so với trở kháng bề mặt ở tần số thấp. Phần mềm PSTrace 5.9 đã được sử dụng để tính toán R_{ct} cho thấy, khi nồng độ BSA tăng từ 0,1 lên 5 mM, sự thay đổi trong R_{ct} từ 13,22 đến 20,69 kΩ, với độ nhạy 7,2 kΩ/mM trong khoảng này (hình 6). Kết quả thực nghiệm được báo cáo đã chứng minh hiệu suất của cả hai cấu hình cảm biến trong việc phát hiện protein. Cảm biến 2 - điện cực thể hiện sự gia tăng tổng trở kháng khi nồng độ BSA tăng, với độ nhạy 12 Ω/mM ở tần số 300 kHz. Tuy nhiên, do không có điện cực tham chiếu, chi tiết tham số điện của trở kháng bề mặt không thể được khảo sát và đánh giá chính xác trong cấu hình 2 - điện cực.



Hình 6. Biểu đồ Bode tương ứng với sự thay đổi nồng độ protein từ 0,1 đến 5 mM trong việc bắt cặp và phát hiện BSA-FITC trên điện cực vàng (A); biểu đồ Nyquist của các nồng độ BSA bằng 0,1, 0,5, 1, 2,5 và 5 mM dựa trên mô hình mạch Randles (B) [42].

Thử nghiệm phát triển bề mặt cảm biến: Trong báo cáo kết quả nghiên cứu của L.H.T. Thuy và cs (2023) [43], nhóm nghiên cứu đã đề xuất và thử nghiệm quy trình chuẩn bị cảm biến miễn dịch được tiến hành sử dụng 11-MUA cho đơn lớp tự lắp ghép và protein NSE là đối tượng đích (hình 7). Kết quả phân tích trở kháng điện hóa (EIS) được minh họa trong hình 7 cho thấy, sự thay đổi điện trở chuyển giao điện tích (R_{ct}) qua từng bước chế tạo của cảm biến miễn dịch. Khi lớp hạt nano vàng (AuNPs) được phủ lên bề mặt các điện cực carbon, R_{ct} giảm xuống, cho thấy sự cải thiện đáng kể về khả năng dẫn điện của điện cực. Tuy nhiên, khi các phân tử 11-MUA được cố định để tạo thành đơn lớp tự sắp xếp (SAM) trên bề mặt, R_{ct} tăng lên đến 1,6 kΩ do độ dẫn điện thấp của SAM gây cản trở quá trình chuyển giao điện tích giữa điện cực và dung dịch. Tiếp theo, sau khi kích hoạt nhóm carboxyl của SAM và cố định kháng thể chống NSE, R_{ct} tăng thêm, đạt mức 2,0 kΩ, và sau khi chặn các vị trí không đặc hiệu bằng protein BSA, R_{ct} tiếp tục tăng lên 2,7 kΩ. Sự tăng này phản ánh sự thành công trong quá trình cố định từng lớp vật liệu lên bề mặt điện cực, làm tăng trở kháng và cản trở quá trình trao đổi electron giữa điện cực và dung dịch. Khi tiếp xúc với các nồng độ protein NSE khác nhau, R_{ct} tiếp tục tăng từ 3,1 đến 4,5 kΩ, tương ứng với các nồng độ từ 10 đến 500 ng/ml, chỉ ra sự hình thành các phức hợp miễn dịch ổn định và cản trở quá trình dẫn điện do lớp protein kỵ nước. Mối quan hệ tuyến tính giữa sự thay đổi R_{ct} và logarithm của nồng độ NSE được biểu diễn bằng phương trình ΔR_{ct}=0,87162×logNSE-0,54479, với hệ số tương quan cao, đạt 0,98868. Giới hạn phát hiện (LOD) của cảm biến được báo cáo là 3,19 ng/ml, cho thấy khả năng phát hiện NSE ở nồng độ rất thấp, với độ chính xác cao.

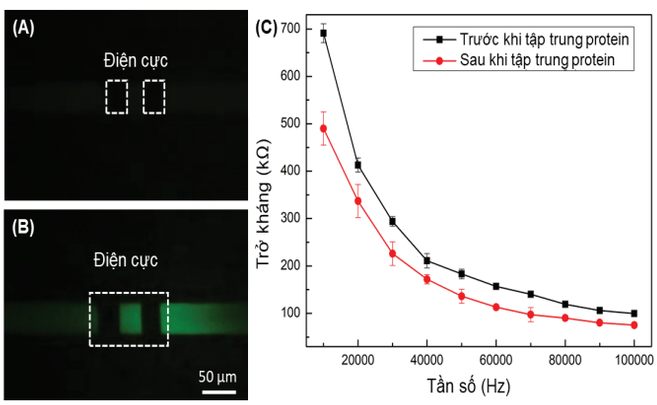


Hình 7. Biểu đồ phổ trở kháng điện hóa (EIS) của (A) quá trình biến đổi bề mặt điện cực và quá trình thử nghiệm với các nồng độ khác nhau của protein NSE; (B) Δ R_{ct} theo nồng độ protein NSE [43].

Kết quả thí nghiệm trên mẫu huyết thanh cũng xác nhận khả năng phát hiện NSE trong các điều kiện thực tế, với sự thay đổi rõ rệt trong biểu đồ EIS tương ứng với các nồng độ protein khác nhau. Các mẫu NSE chuẩn với nồng độ 50, 500 và 2,500 ng/ml được pha loãng trong mẫu huyết thanh. Điện cực đã được chức năng hóa ban đầu có giá trị R_{ct} là 1,4 kΩ. Hình chèn trên hình 7B cho thấy, sự thay đổi trong biểu đồ EIS theo các nồng độ khác nhau của protein NSE trong mẫu huyết thanh. Các giá trị R_{ct} được ghi nhận trong báo cáo lần lượt là 2,3, 2,7 và 3,0 kΩ tương ứng với nồng độ được thử nghiệm. Điều này chứng tỏ cảm biến miễn dịch dựa trên cấu trúc SAM/AuNPs/SPCE là một công cụ chẩn đoán tiềm năng cho các ứng dụng y sinh.

3.3. Nền tảng chip vi lưu tích hợp cấu trúc tập trung và phát hiện protein

Trong báo cáo của C.T. Nhu và cs (2023a) [40], bộ tập trung và các điện cực cảm biến trở kháng được chế tạo bằng cách sử dụng kỹ thuật quang khắc mềm và quy trình đúc, với quá trình chế tạo điện cực được thực hiện qua 6 bước chi tiết như minh họa trong hình 8A [44]. Sự thay đổi trở kháng trong vùng tập trung protein đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng dung dịch protein BSA-FITC với nồng độ ban đầu là 5 µM. Ban đầu, kênh mẫu được đổ đầy dung dịch này, với màu sắc của kênh mẫu và khu vực điện cực khá tối do nồng độ protein thấp, như minh họa trong hình 8A. Sau khi áp dụng điện thế vào hai đầu của các vi kênh, các phân tử protein đã di chuyển và tập trung tại khu vực điện cực cảm biến, kết quả là sự gia tăng đáng kể của tín hiệu huỳnh quang tại khu vực điện cực, như thể hiện trong hình 8B.



Hình 8. Sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang của khu vực điện cực trước và sau khi tập trung protein trong kênh mẫu [44].

Trở kháng giữa hai điện cực được đo trước và sau quá trình tập trung protein, và kết quả cho thấy trở kháng đã giảm đáng kể sau khi protein tập trung tại khu vực cảm biến. Hình 8C minh họa rõ ràng hai đường cong trở kháng tách biệt trong khoảng tần số từ 10 đến 100 kHz. Đặc biệt, trở kháng ở dải tần số cao thấp hơn và ổn định hơn so với dải tần số thấp. Những thay đổi này có thể được giải thích bằng mô hình Randles đơn giản hóa, như mô tả trong hình 8C, trong đó R_S đại diện cho điện trở của dung dịch protein, còn R_{ct} và C_{dl} lần lượt là điện trở chuyển giao điện tích và điện dung lớp kép giữa bề mặt điện cực vàng và dung dịch protein. Ở tần số thấp, trở kháng của lớp điện dung kép cao, dẫn đến tổng trở kháng cao, trong khi ở tần số cao, ảnh hưởng của C_{dl} giảm dần, dẫn đến tổng trở kháng thấp hơn. Trong quá trình tập trung, các phân tử protein với vai trò là ion âm, cùng với các anion từ dung dịch đệm, đã di chuyển về phía khu vực điện cực. Sự gia tăng mật độ ion tại khu vực này đã góp phần làm tăng độ dẫn điện của dung dịch xung quanh điện cực, dẫn đến giảm điện trở dung dịch R_S. Ở tần số cao, tổng trở kháng chủ yếu phụ thuộc vào điện trở của dung dịch. Với các kết quả đạt được, vị trí của vùng tập trung protein có thể được nhận diện thông qua các phép đo trở kháng thực hiện trên các điện cực tích hợp trong kênh.

4. Kết luận

Một số thành tựu về nền tảng chip vi lưu làm giàu và phát hiện protein được công bố trong các báo cáo gần đây đã chứng minh tiềm năng của nền tảng vi lưu tiên tiến, tích hợp kỹ thuật ICP qua kênh nano và cảm biến trở kháng để phát hiện protein với độ nhạy cao. Thông qua việc tối ưu hóa cấu trúc tập trung nhờ hiệu ứng ICP và sử dụng cấu hình cảm biến trở kháng ba điện cực, các nghiên cứu gần đây đã đạt được cải thiện đáng kể về giới hạn phát hiện và độ chính xác trong phát hiện các dấu ấn sinh học protein. Phương pháp tích hợp này, đã được thử nghiệm trên các nồng độ protein khác nhau và xác thực bằng kỹ thuật phổ trở kháng điện hóa, hứa hẹn cho các ứng dụng chẩn đoán nhanh chóng và chi phí thấp trong lâm sàng. Kết quả nghiên cứu hỗ trợ khả năng ứng dụng nền tảng này vào các thiết bị chẩn đoán tại chỗ, cung cấp giải pháp dễ mở rộng cho việc phát hiện và theo dõi bệnh sớm, đặc biệt trong lĩnh vực ung thư. Hướng phát triển trong tương lai được xác định tập trung vào khả năng đo đồng thời nhiều dấu ấn sinh học và tiểu hình hóa thiết bị, tạo tiền đề cho các công cụ chẩn đoán linh hoạt và độ nhạy cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] T.V. Quoc, V.N. Ngoc, T.T. Bui, et al. (2019), "High-frequency interdigitated array electrode-based capacitive biosensor for protein detection", *Biochip Journal*, **13(4)**, pp.403-415, DOI: 10.1007/s13206-019-3412-3.

[2] J. Han, Y. Zhuo, Y.Q. Chai, et al. (2012), "Novel electrochemical catalysis as signal amplified strategy for label-free detection of neuron-specific enolase", *Biosensors and Bioelectronics*, **31(1)**, pp.399-405, DOI: 10.1016/j.bios.2011.10.055.

[3] K. Sadrjavadi, M. Taran, A. Fattahi, et al. (2022), "A microelectrode system for simple measurement of neuron specific enolase with photolithography technique", *Microchemical Journal*, **182(3)**, DOI: 10.1016/j.microc.2022.107889.

[4] D. Carney, D. Ihde, M. Cohen, et al. (1982), "Serum neuron-specific enolase: A marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer", *The Lancet*, **319(8272)**, pp.583-585, DOI: 10.1016/S0140-6736(82)91748-2.

[5] L. Gervais, N.D. Rooij, E. Delamarche (2011), "Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics", *Advanced Materials*, **23(24)**, DOI: 10.1002/adma.201100464.

[6] X. Ou, P. Chen, X. Huang, et al. (2020), "Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis", *Journal of Separation Science*, **43(1)**, pp.258-270, DOI: 10.1002/jssc.201900758.

[7] C.W. Chi, A.R. Ahmed, Z.D. Korkut, et al. (2016), "Microfluidic cell chips for high-throughput drug screening", *Bioanalysis*, **8(9)**, pp.921-937, DOI: 10.4155/bio-2016-0028.

[8] R. Pol, F. Céspedes, D. Gabriel, et al. (2017), "Microfluidic lab-on-a-chip platforms for environmental monitoring", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **95**, pp.62-68, DOI: 10.1016/j.trac.2017.08.001.

[9] K.S. Elvira, X.C. Solvas, R.C.R. Wootton, et al. (2013), "The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis", *Nature Chemistry*, **5(11)**, pp.905-915, DOI: 10.1038/nchem.1753.

[10] Q. Guo, L. Zhang, J. Liu, et al. (2021), "Multifunctional microfluidic chip for cancer diagnosis and treatment", *Nanotheranostics*, **5(1)**, pp.73-89, DOI: 10.7150/ntno.49614.

[11] J.L.G. Cordero, S.J. Maerkl (2020), "Microfluidic systems for cancer diagnostics", *Current Opinion in Biotechnology*, **65**, pp.37-44, DOI: 10.1016/j.copbio.2019.11.022.

[12] B. Ma, Y.Z. Song, J.C. Niu, et al. (2016), "Highly efficient sample stacking by enhanced field amplification on a simple paper device", *Lab on a Chip*, **16(18)**, pp.3460-3465, DOI: 10.1039/C6LC00633G.

[13] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago (2003), "Thousandfold signal increase using field-amplified sample stacking for on-chip electrophoresis", *Electrophoresis*, **24(19-20)**, pp.3476-3483, DOI: 10.1002/elps.200305611.

[14] P. Gebauer, Z. Malá, P. Boček (2011), "Recent progress in analytical capillary isotachophoresis", *Electrophoresis*, **32(1)**, pp.83-89, DOI: 10.1002/elps.201000304.

[15] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago (2006), "On-chip millionfold sample stacking using transient isotachophoresis", *Analytical Chemistry*, **78(7)**, pp.2319-2327, DOI: 10.1021/ac051659w.

[16] Y. Chen, H.F. Wu, T.G. Amstislavskaya, et al. (2016), "A simple electrokinetic protein preconcentrator utilising nano-interstices", *Biomicrofluidics*, **10(2)**, DOI: 10.1063/1.4946768.

[17] K. Liao, M. Tsegaye, V. Chaurey, et al. (2012), "Nano-constriction device for rapid protein preconcentration in physiological media through a balance of electrokinetic forces", *Electrophoresis*, **33(13)**, pp.1958-1966, DOI: 10.1002/elps.201100707.

[18] S. Gautam, K.C. Loh (2012), "Immobilization of hydrophobic peptidic ligands to hydrophilic chromatographic matrix: A preconcentration approach", *Analytical Biochemistry*, **423(2)**, pp.202-209, DOI: 10.1016/j.ab.2012.01.020.

[19] M. Kim, T. Kim (2013), "Integration of nanoporous membranes into microfluidic devices: Electrokinetic bio-sample pre-concentration", *The Analyst*, **138(20)**, DOI: 10.1039/c3an00965c.

[20] H.F. Wu, T.G. Amstislavskaya, P.H. Chen, et al. (2016), "Preconcentration-enhanced immunosensing for whole human cancer cell lysate based on a nanofluidic preconcentrator", *BioChip Journal*, **10(3)**, pp.159-166, DOI: 10.1007/s13206-016-0203-y.

[21] C.H. Chang, R.J. Yang (2016), "Enhanced sample preconcentration in microfluidic chip using graphene oxide-Nafion membrane", *Microfluidics and Nanofluidics*, **20(12)**, DOI: 10.1007/s10404-016-1835-x.

[22] E.T.S.G.D. Silva, D.E.P. Souto, J.T.C. Barragan, et al. (2017), "Electrochemical biosensors in point-of-care devices: Recent advances and future trends", *ChemElectroChem*, **4(4)**, pp.778-794, DOI: 10.1002/celc.201600758.

[23] L.G. Gálvez, R.D. Caño, I.M. Luque, et al. (2022), "Electrochemiluminescent nanostructured DNA biosensor for SARS-CoV-2 detection", *Talanta*, **240**, DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123203.

[24] I.H. Cho, D.H. Kim, S. Park (2020), "Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis", *Biomaterials Research*, **24(1)**, DOI: 10.1186/s40824-019-0181-y.

[25] H. Zheng, X. Ma, L. Chen, et al. (2013), "Label-free electrochemical impedance biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA", *Analytical Methods*, **5(19)**, DOI: 10.1039/c3ay40972d.

[26] Z. Wang, Z. Dai (2015), "Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: An overview", *Nanoscale*, **7(15)**, pp.6420-6431, DOI: 10.1039/C5NR00585J.

[27] S.K. Krishnan, E. Singh, P. Singh, et al. (2019), "A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors", *RSC Advances*, **9(16)**, pp.8778-8881, DOI: 10.1039/C8RA09577A.

[28] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, et al. (2008), "Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures", *Sensors*, **8(3)**, pp.1400-1458, DOI: 10.3390/s80314000.

[29] X. Du, Z. Zhang, X. Zheng, et al. (2020), "An electrochemical biosensor for the detection of epithelial-mesenchymal transition", *Nature Communications*, **11(1)**, DOI: 10.1038/s41467-019-14037-w.

[30] E.J. Sin, Y.S. Moon, Y.K. Lee, et al. (2012), "Surface modification of aluminum oxide for biosensing application", *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, **24(2)**, pp.111-116, DOI: 10.4015/S1016237212500093.

[31] S. Pandey (2022), "Advance nanomaterials for biosensors", *Biosensors*, **12(4)**, DOI: 10.3390/bios12040219.

[32] C. Fan, B. Jiang, W. Shi, et al. (2022), "Tri-channel electrochemical immunobiosensor for combined detections of multiple exosome biomarkers of lung cancer", *Biosensors*, **12(7)**, DOI: 10.3390/bios12070435.

[33] C. Karaman, Ö.S. Bölükbaşı, B.B. Yola, et al. (2022), "Electrochemical neuron-specific enolase (NSE) immunosensor based on $CoFe_2O_4$@Ag nanocomposite and AuNPs@MoS_2/rGO", *Analytica Chimica Acta*, **1200**, DOI: 10.1016/j.aca.2022.339609.

[34] Y.C. Wang, A.L. Stevens, J. Han (2005), "Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter", *Analytical Chemistry*, **77(14)**, pp.4293-4299, DOI: 10.1021/ac050321z.

[35] C. Jen, T.G. Amstislavskaya, C. Kuo, et al. (2014), "Protein preconcentration using nanofractures generated by nanoparticle-assisted electric breakdown at junction gaps", *PLOS ONE*, **9(7)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0102050.

[36] Q. Pu, J. Yun, H. Temkin, et al. (2004), "Ion-enrichment and ion-depletion effect of nanochannel structures", *Nano Letters*, **4(6)**, pp.1099-1103, DOI: 10.1021/nl0494811.

[37] J. Lichtenberg, E. Verpoorte, N.F.D. Rooij (2001), "Sample preconcentration by field amplification stacking for microchip-based capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, **22(2)**, pp.258-271, DOI: 10.1002/1522-2683(200101)22:2<258::AID-ELPS258>3.0.CO;2-4.

[38] J.A. Wells, H. Swerdlow (2003), "Fluidic preconcentrator device for capillary electrophoresis of proteins", *Analytical Chemistry*, **75(19)**, pp.5207-5212, DOI: 10.1021/ac0300892.

[39] C.T. Nhu, P.N. Dang, H.T. Thanh, et al. (2022), "A protein preconcentration platform utilizing dual gate structure and ion-selective membrane", *2022 IEEE 9th International Conference on Communications and Electronics (ICCE)*, pp.195-198, DOI: 10.1109/ICCE55644.2022.9852029.

[40] C.T. Nhu, P.N. Dang, L.D. Quang, et al. (2023a), "Development of a microfluidic chip for protein preconcentration using dual gate structure and nanomembrane", *Microsystem Technologies*, **29(12)**, pp.1757-1767, DOI: 10.1007/s00542-023-05565-z.

[41] S.H. Ko, Y.A. Song, S.J. Kim, et al. (2012), "Nanofluidic preconcentration device in a straight microchannel using ion concentration polarisation", *Lab on a Chip*, **12(21)**, pp.4472-4482, DOI: 10.1039/c2lc21238b.

[42] C.T. Nhu, T. Vu Quoc, L.D. Quang, et al. (2024), "Comparison of faradaic and non-faradaic impedance biosensors using 2-electrode and 3-electrode configurations for the determination of bovine serum albumin (BSA)", *Analytical Letters*, **57(17)**, pp.2959-2971, DOI: 10.1080/00032719.2024.2307464.

[43] L.H.T. Thuy, P.N. Dang, C.T. Nhu, et al. (2023), "Novel electrochemical immunosensing structure based on a functionalized carbon electrode with 11-MUA for NSE protein detection", *2023 1st International Conference on Health Science and Technology*, pp.1-4, DOI: 10.1109/ICHST59286.2023.10565337.

[44] C.T. Nhu, L.D. Quang, C.P. Jen, et al. (2023a), "A novel approach to detect protein utilizing the microfluidic pre-concentrator based on the impedance measurement method", *2023 1st International Conference on Health Science and Technology*, pp.1-5, DOI: 10.1109/ICHST59286.2023.10565376.

Tổng hợp và phân tích đặc tính màng chitosan/cellulose triacetate ứng dụng làm màng bọc thực phẩm

Trương Thị Cẩm Trang[1], Lê Thị Anh Phương[2], Nguyễn Đăng Khoa[3*]

[1]Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam
[2]Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ phát thải âm, Đại học Kyushu, 744 Motooka, quận Nishi-ku, tỉnh Fukuoka, Nhật Bản
[3]Khoa Môi trường, Trường Đại học Văn Lang, 69/68 Đặng Thuỳ Trâm, phường Bình Lợi Trung, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/3/2025; ngày chuyển phản biện 10/3/2025; ngày nhận phản biện 27/3/2025; ngày chấp nhận đăng 23/4/2025

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, cellulose được chiết xuất từ vỏ ngô và dùng để điều chế dẫn xuất vật liệu cellulose triacetate (CTA) có độ acetyl hoá khoảng 40% và độ thay thế (DS) khoảng 2,5. Sau đó, CTA được sử dụng với tỷ lệ thay đổi từ 0,1 đến 0,5 trong dung dịch chitosan (CTS) để tổng hợp màng CTS-CTA. Đặc tính của vật liệu sinh học này được xác định thông qua phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR), kính hiển vi điện tử quét (SEM) và các thí nghiệm xác định độ ẩm, độ truyền quang học, độ hòa tan trong nước và độ bền kéo. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ truyền quang học và độ bền kéo đạt giá trị cao nhất ở tỷ lệ khối lượng CTS-CTA là 1,6/0,3. Đối với độ ẩm và độ hòa tan trong nước, tỷ lệ 1,6/0,5 cho kết quả tốt nhất so với các tỷ lệ khác. Nhìn chung, mẫu màng composite 1,6/0,3 được xem là tỷ lệ đáp ứng cho hầu hết tất cả các tiêu chí, đồng thời khả năng phân hủy sinh học của vật liệu trong môi trường đất đạt 32,7% sau 15 ngày.

Từ khoá: **cellulose triacetate, chitosan, màng bọc thực phẩm, phân huỷ sinh học, vỏ ngô.**

Chỉ số phân loại: **2.4, 2.7, 2.10**

Preparation and properties of chitosan/cellulose triacetate membrane for food packaging

Thi Cam Trang Truong[1], Thi Phuong Anh Le[2], Dang Khoa Nguyen[3*]

[1]Faculty of Environment, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,
227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam
[2]Research Center for Negative Emissions Technologies, Kyushu University, 744 Motooka Street, Nishi-ku Ward, Fukuoka Province, Japan
[3]Faculty of Environment, School of Technology, Van Lang University, 69/68 Dang Thuy Tram Street, Binh Loi Trung Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 7 March 2025; revised 27 March 2025; accepted 23 April 2025

Abstract:

In this study, cellulose was isolated from corn husks and used to synthesise cellulose triacetate (CTA) derivatives with an acetylation degree of approximately 40% and a substitution degree (DS) of around 2.5. Subsequently, CTA was utilised in varying proportions, ranging from 0.1 to 0.5, in a chitosan (CTS) solution to synthesise CTS-CTA membranes. The characteristics of this bio-based material were evaluated using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Scanning electron microscopy (SEM), and several experiments including moisture content, optical transmittance, water solubility, and tensile strength. The results indicated that the optical transmittance and tensile strength were gained at a CTS-CTA mass ratio of 1.6/0.3. In terms of moisture content and water solubility, the ratio of 1.6/0.5 yielded the best results compared to other ratios. Overall, the composite membrane with a ratio of 1.6/0.3 was identified as the most suitable across all criteria, with a biodegradation rate in soil reaching 32.7% after 15 days.

Keywords: **biodegradation, cellulose triacetate, chitosan, corn husks, food packaging.**

Classification numbers: **2.4, 2.7, 2.10**

[*]Tác giả liên hệ: Email: khoa.nd@vlu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Nhựa được biết đến là một trong những vật liệu được sản xuất từ các nguồn nguyên nhiên liệu hóa thạch và đã trở thành một phần không thể thiếu trong cuộc sống hiện đại [1]. Sản lượng nhựa toàn cầu đạt 390,7 triệu tấn vào năm 2021 và dự báo sẽ tăng gấp đôi trong vòng hai thập kỷ tới [2, 3]. Tuy nhiên, đặc tính không phân hủy sinh học của nhựa đã gây ra những thách thức môi trường nghiêm trọng [4]. Theo báo cáo cho thấy, có khoảng 80% nhựa không được tái chế và dễ dàng được tích tụ trong rác thải đô thị [5]. Việc thải bỏ không đúng cách càng góp phần vào sự nóng lên toàn cầu thông qua việc thiêu hủy nhựa thải và ô nhiễm đại dương qua rò rỉ ra môi trường biển. Nghiên cứu của R. Geyer và cs (2017) [6] cho thấy, có khoảng 6.300 triệu tấn rác thải nhựa đã được tạo ra vào năm 2015 và khối lượng rác thải nhựa có mặt trong các bãi chôn lấp hoặc môi trường tự nhiên được ước tính khoảng 12.000 triệu tấn vào năm 2050. Đáng lo ngại, tổng khối lượng rác nhựa sẽ vượt xa trọng lượng của tất cả các loài cá tôm ở mọi đại dương trong những thập kỷ tới [7]. Những thách thức này nhấn mạnh sự cần thiết phải có các giải pháp thay thế bền vững cho nhựa truyền thống.

Nhựa phân hủy sinh học, bao gồm nhựa sinh học được sản xuất từ các nguồn tài nguyên tái tạo, đã thu hút sự chú ý trong việc thay thế một phần các loại nhựa tổng hợp [8]. Nhựa sinh học mang lại nhiều lợi ích như giảm phát thải carbon, giảm chi phí năng lượng trong sản xuất và hạn chế ô nhiễm. Mặc dù, sản xuất nhựa sinh học hiện tại chỉ chiếm một phần nhỏ trong sản lượng nhựa toàn cầu (2,41 triệu tấn vào năm 2021, chiếm 0,62%), tuy nhiên, ngành này đang phát triển ổn định nhờ nhu cầu ngày càng tăng và các quy định ngày càng nghiêm ngặt đối với ngành sản xuất nhựa truyền thống [9]. Dự báo sản xuất nhựa sinh học sẽ đạt 7,59 triệu tấn vào năm 2026, vượt qua 2% sản lượng nhựa toàn cầu [10]. Hơn nữa, nhựa sinh học cho phép các phương pháp xử lý cuối vòng đời thân thiện với môi trường như phân hủy sinh học và phân huỷ kỵ khí, giúp thúc đẩy sự chuyển đổi sang nền kinh tế tuần hoàn [11]. Các polymer tổng hợp, mặc dù có chi phí thấp và thành phần ổn định, nhưng thường gặp vấn đề về tính tương thích sinh học kém và sự độc hại tiềm tàng của các sản phẩm phân hủy [12]. Trong số các polymer sinh học, polysaccharide như cellulose, chitin và dẫn xuất CTS là những vật liệu tự nhiên dồi dào, chi phí thấp và có khả năng phân hủy sinh học cao. Những polymer này có chứa các nhóm chức amine ($–NH_2$) và hydroxyl (–OH), giúp tăng tính tương thích sinh học và có giá trị trong nhiều ứng dụng [13, 14].

Chitosan là một polysaccharide đã deacetyl hóa của chitin, trong đó nhóm ($–NH_2$) thay thế nhóm ($–COCH_3$) ở vị trí C-2. CTS bao gồm các liên kết D-glucozamine được liên kết bởi β(1-4)-glicozit nên có thể gọi là poly β(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucose hoặc poly β(1-4)-D-glucosamine [15]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, CTS là một trong những vật liệu sinh học có độ phổ biến trong rất nhiều lĩnh vực [16]. Ví dụ, CTS có tính kháng khuẩn cao, đặc biệt có lợi trong bao bì thực phẩm, vì có thể ức chế sự phát triển của vi sinh vật, từ đó bảo toàn chất lượng và an toàn thực phẩm [17]. Không giống như bao bì nhựa thông thường, màng làm từ CTS có khả năng phân hủy sinh học, mang đến giải pháp thay thế bền vững hơn thông qua việc có thể tăng cường đáng kể tốc độ phân hủy, giảm tác động đến môi trường [18]. Thêm vào đó, màng CTS có các đặc tính cơ học phù hợp để có thể trở thành lựa chọn thay thế khả thi cho bao bì nhựa truyền thống [19].

Cellulose là thành phần cấu trúc của thành tế bào thực vật và đóng vai trò quan trọng trong việc gia cường sinh học [20]. Các vật liệu composite tổng hợp từ cellulose và CTS cho thấy tiềm năng với các đặc tính nổi trội như độ bền cơ học, tính kháng khuẩn, tính tương thích sinh học và khả năng định hình tốt [21]. Những vật liệu này cũng có thể được tổng hợp ở nhiều dạng khác nhau như sợi nano, màng nano và hạt nano, với các ứng dụng trong nông nghiệp, bao bì thực phẩm, khoa học y sinh và xử lý nước. Ví dụ, composite chitosan-cellulose có khả năng hấp phụ kim loại nặng, thuốc nhuộm có trong nước [22]. Vì vậy, điều này mở ra tiềm năng phát triển các vật liệu bền vững như màng composite giữa CTS và cellulose. Trong số các dẫn xuất của cellulose, cellulose acetate (CA) cho thấy là ứng cử viên tiềm năng và được sử dụng trong các loại màng composite [23-25]. Đa phần hiện giờ màng CTS/CA đã được nghiên cứu khá rộng rãi [26-28], chỉ còn hạn chế ở các dẫn xuất khác của chính CA. Do đó, nghiên cứu này tập trung vào việc điều chế CTA với độ acetyl tốt hơn CA và thể hiện các đặc tính nổi trội hơn, khiến nó phù hợp cho nhiều ứng dụng khác nhau.

Thông qua quá trình acetyl hóa, nhóm chức acetyl được đính kết vào các phân tử cellulose, giúp tăng cường khả năng hòa tan trong dung môi hữu cơ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tổng hợp thành nhiều dạng khác nhau [29]. Quá trình acetyl hóa cellulose còn làm giảm tính ưa nước và do đó, khả năng chống ẩm của vật liệu được cải thiện đáng kể [30]. Mức độ acetyl hóa cao trong CTA giúp tăng cường độ bền kéo, cải thiện tính linh hoạt và độ ổn định so với cellulose thông thường. Những đặc tính nổi trội này giúp CTA phù hợp với các ứng dụng yêu cầu vật liệu chắc chắn và bền bỉ [31]. Hiện nay, các nghiên cứu liên quan đến màng CTS/CTA còn khá hạn chế. Đơn cử như màng composite này có chứa 70% CTA trong dung dịch axit formic có độ bền kéo đạt 54,2 MPa và khả năng loại bỏ nitrate trong nước khá tốt [32]. Do đó, nghiên cứu này nhằm phát triển màng CTS phối trộn với hàm lượng CTA thấp có khả năng phân hủy sinh học, thân thiện với môi trường để tạo ra giải pháp thay thế bền vững cho nhựa truyền thống. Bằng cách tận dụng các sản phẩm phụ từ ngành thủy sản và nông nghiệp của Việt Nam, nghiên cứu sẽ làm nổi bật tiềm năng của những tài nguyên tái tạo này như các vật liệu sinh học có giá trị. Thêm vào đó, các đặc tính hoá lý và khả năng phân hủy sinh học của màng composite có thể giúp xác định tính khả thi của vật liệu trong các ứng dụng thực tiễn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vỏ ngô được thu gom tại các nhà máy chế biến nông sản tại TP Hồ Chí Minh. Các hóa chất dùng trong tách chiết cellulose, điều chế CTA và tổng hợp màng composite như axit sulfuric (H_2SO_4), axit acetic (CH_3COOH) được cung cấp bởi Công ty TNHH Thuốc thử hóa chất Xilong, Trung Quốc. Anhydric acetic ($(CH_3CO)_2O$) và CTS (độ deacetyl hoá 80%) được mua từ LAXOPEG, Ấn Độ. Tất cả các loại hoá chất được sử dụng trực tiếp sau khi mua về.

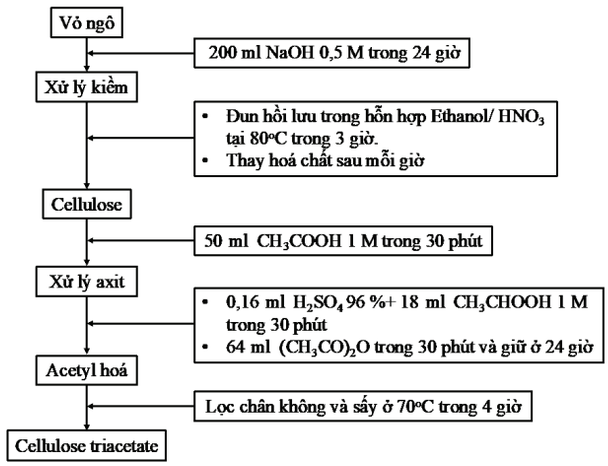
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết tách cellulose từ vỏ ngô và điều chế cellulose triacetate

Đầu tiên, vỏ ngô thu thập được rửa nhiều lần, cắt nhỏ và sấy ở 80°C trong 24 giờ. Tiếp theo, 10 g vỏ ngô đã qua xử lý được ngâm trong 200 ml dung dịch NaOH 0,5 M. Sau 24 giờ, vỏ ngô được lấy ra và rửa bằng nước cất tới giá trị pH trung tính để loại bỏ dung dịch NaOH. Sau đó, vỏ ngô xử lý bằng kiềm được cho vào bình chứa hỗn hợp dung dịch có chứa ethanol và HNO_3 (tỷ lệ thể tích (vol%) 4:1). Công đoạn này diễn ra tại 80°C trong 3 giờ và hoá chất được thay mới mỗi giờ để đảm bảo hiệu quả trong quá trình đun hồi lưu. Sau đó, vỏ ngô được lọc và rửa cho đến khi pH trung tính. Sản phẩm sau đó được sấy ở 105°C trong 24 giờ trong tủ sấy và làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm để thu được cellulose. Đối với quá trình điều chế CTA, 2 g cellulose được thêm vào 50 ml dung dịch axit acetic và hỗn hợp này được khuấy liên tục trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp đó, hỗn hợp gồm 0,16 ml axit sulfuric và 18 ml axit acetic được thêm vào và tiếp tục khuấy trong 30 phút. Mặt khác, 64,0 ml acetic anhydride được bổ sung vào và khuấy trong nửa giờ và giữ trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng để phản ứng diễn ra. Cuối cùng, hỗn hợp này được lọc chân không và chất rắn thu được sẽ sấy ở 70°C trong 4 giờ. Hình 1 minh họa quy trình chiết xuất cellulose từ vỏ ngô và điều chế cellulose triacetate. Hiệu suất quá trình tổng hợp CTA được tính theo công thức (1).

$$H\ (\%) = m_1/m_0 \times 100 \quad (1)$$

trong đó: m_0 là khối lượng cellulose (g) và m_1 là khối lượng của CTA (g).



Hình 1. Quy trình chiết tách cellulose từ vỏ ngô và điều chế cellulose triacetate.

Tỷ lệ acetyl hóa và DS được tính theo nghiên cứu của H.M. Shaikh và cs (2022) [33]. Cho 0,5 g CTA vừa tổng hợp và 25 ml dung dịch ethanol 75% vào bình erlen dung tích 250 ml, sau đó đun ở 60°C trong 30 phút. Tiếp đến, 25 ml dung dịch NaOH 0,49 N được thêm vào mỗi mẫu và tiếp tục đun ở 60°C trong 30 phút. Các bình được đậy kín và để ở nhiệt độ phòng với khuấy liên tục trong 72 giờ. Mẫu đối chứng cũng được chuẩn bị theo cách tương tự. Dung dịch HCl 0,5 N được sử dụng để chuẩn độ lượng kiềm dư trong mẫu và mẫu đối chứng với dung dịch phenolphthalein làm chỉ thị. Sự mất màu hồng cho thấy quá trình trung hòa kiềm đã hoàn tất. Sau đó, lượng axit dư nhẹ được chuẩn độ ngược lại với dung dịch NaOH cho đến khi xuất hiện điểm cuối với chỉ thị phenolphthalein. Giá trị DS và phần trăm acetyl hóa (Acetyl percentage - AP) được tính toán bằng các công thức (2) và (3):

$$DS = \frac{3{,}82 \times \%\ AP}{102{,}4 - \%\ AP} \quad (2)$$

$$AP\ (\%) = \frac{[(NaOH_{iv} + NaOH_{lv}) \times NaOH_M - HCl_V \times HCl_M] \times 43{,}1}{W} \quad (3)$$

trong đó: iv là thể tích ban đầu của dung dịch NaOH (ml); lv là thể tích sau cùng của dung dịch NaOH (ml); M là nồng độ mol của dung dịch NaOH, HCl (N); v là thể tích của dung dịch HCl (ml), W là khối lượng mẫu (g).

2.2.2. Tổng hợp màng composite chitosan-cellulose triacetate

Đầu tiên, dung dịch CTS 2% và CTA 2% được chuẩn bị trong 100 ml dung dịch axit acetic 2%. Sau đó, lần lượt từng dung dịch này được lọc qua rây để loại bỏ các phần tử không hoà tan. Trong nghiên cứu này, dung dịch CTS được sử dụng làm chất nền tạo màng sinh học và được cố định ở một tỷ lệ nhất định là 1,6 g. Trong khi đó, dung dịch CTA được thêm vào ở các tỷ lệ từ 0,1 đến 0,5 g trong hỗn hợp màng composite CTS-CTA. Hỗn hợp dung dịch tại các tỷ lệ phối trộn khác nhau sẽ khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 60 phút để đảm bảo tạo thành một hỗn hợp dung dịch đồng nhất. Dung dịch thu được sau đó được lọc để loại bỏ các tạp chất không tan, đổ vào khuôn nhựa (40×10×10 mm^3) và để khô trong không khí trong vòng từ 4 đến 5 ngày. Màng composite sau đó được lấy ra khỏi khuôn, rửa với nước cất để loại bỏ phụ gia axit acetic và sấy ở 60°C trong 4 giờ. Các mẫu màng composite này được phân tích và đánh giá đặc tính. Màng composite được ký hiệu dựa trên tỷ lệ phối trộn CTA trong hỗn hợp màng sau cùng (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ phối trộn chitosan và cellulose triacetate.

STT	Mẫu	Dung dịch CTS 2% (g)	Dung dịch CTA 2% (g)
1	0,1CTA	1,6	0,1
2	0,2CTA		0,2
3	0,3CTA		0,3
4	0,4CTA		0,4
5	0,5CTA		0,5

2.2.3. Phân tích đặc tính của màng composite

Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) được sử dụng để xác định vật liệu chưa biết, chất lượng và tính đồng nhất của mẫu cũng như định lượng thành phần của hỗn hợp và thường được ghi ở vùng hồng ngoại trung tâm (4000 đến 400 cm^{-1}), với độ phân giải 4 cm^{-1} ở chế độ hấp thụ từ 8 đến 128 lần quét ở nhiệt độ phòng. Các mẫu vật liệu cellulose, CTA và màng composite được đo tại Phòng Thí nghiệm Kỹ thuật Vật liệu Môi trường và Bền vững Sinh học, Khoa Khoa học và Kỹ thuật Vật liệu, Đại học Công nghệ Nagaoka, Nhật Bản.

Kính hiển vi điện tử quét (SEM) dùng để phân tích cấu trúc hình thái bề mặt vật liệu (JSM - 5300LV). Các mẫu màng composite tại các tỷ lệ phối trộn khác nhau được phủ một lớp vàng mỏng (701MC, Quick Cool Coater) và đo ở các độ phóng đại khác nhau với điện áp gia tốc 30 kV tại Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng.

Độ ngậm nước bão hoà của màng sinh học được thực hiện bằng cách cân mẫu khô có khối lượng xác định. Sau đó, các mẫu vật liệu có kích thước 20×10 mm^2 được nhúng vào nước cất và xác định lại khối lượng tại các khoảng thời gian từ 1 đến 24 giờ để đảm bảo chúng đạt tới điều kiện bão hoà. Hàm lượng nước được tính theo công thức (4).

$$\text{Độ ngậm nước bão hoà (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad (4)$$

trong đó: m_0 là khối lượng ban đầu (g) và m_1 là khối lượng sau khi ngâm trong nước (g).

Thí nghiệm về độ ẩm được tiến hành bằng cách cân khối lượng ban đầu của đĩa petri và mẫu màng. Đầu tiên, màng composite (20×10 mm^2) được đặt vào bình chứa tại 25°C và 28% độ ẩm. Sau đó, màng được lấy ra và sấy khô ở 105°C cho đến khi khối lượng không đổi. Độ ẩm được tính bằng công thức (5).

$$\text{Độ ẩm (\%)} = \frac{m_0 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (5)$$

trong đó: m_0 là khối lượng ban đầu của màng (g) và m_1 là khối lượng sau khi sấy khô (g).

Độ truyền quang (T) là tỷ lệ giữa tỷ lệ ánh sáng truyền qua mẫu (P) với lượng ánh sáng ban đầu chiếu lên mẫu (ánh sáng tới, P_0) và là tiêu chí quan trọng để xác định chất lượng của màng tổng hợp tại các tỷ lệ phối trộn khác nhau [34]. Theo đó, màng composite (20×10 mm^2) được đo quang ở bước sóng 660 nm bằng máy quang phổ UV-VIS, sau đó tính theo công thức (6).

$$A = -\log(T) = -\log(P/P_0) \quad (6)$$

Độ bền kéo của màng nhựa sinh học minh họa tính chất cơ lý đối với ứng dụng đóng gói thực phẩm và được thực hiện bằng thiết bị QC-528M1F của Ometech theo tiêu chuẩn ASTM D638 -14 - Kiểm tra độ bền kéo của nhựa [35] tại Chi cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng TP Hồ Chí Minh. Công thức (7) tính toán độ bền kéo.

$$\text{Độ bền kéo} \left(\frac{N}{mm^2}\right) = \frac{\text{Lực tối đa } (N)}{\text{Tiết diện ngang } (mm^2)} \quad (7)$$

2.2.4. Thí nghiệm khả năng phân huỷ

Để xác định khả năng phân hủy của màng composite trong môi trường đất vườn tự nhiên, thực hiện bằng cách đặt composite (20×10 mm^2) vào hộp có kích thước 50×50×50 mm^3 chứa 200 g đất tại 26°C và 56% độ ẩm [34]. Màng composite sau đó lấy hộp ra và so sánh khối lượng, hình dạng và màu sắc của mẫu vật liệu được quan sát mỗi ngày trong khoảng 15 ngày. Sau các khoảng thời gian khác nhau, màng composite được lấy ra khỏi đất và rửa sạch bằng nước cất để loại bỏ đất bám xung quanh và sau đó sấy khô đến khối lượng màng composite không đổi tại 105°C. Công thức xác định khả năng phân huỷ sinh học của màng theo công thức:

$$\text{Khả năng phân huỷ sinh học (\%)} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (8)$$

trong đó: m_0 là khối lượng ban đầu của màng (g) và m_1 là khối lượng sau khi quan sát tại các khoảng thời gian khác nhau (g).

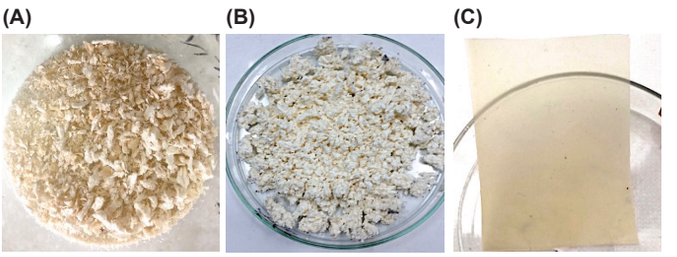
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm đánh giá đặc tính hoá lý và khả năng phân huỷ sinh học của màng composite từ CTS và CTA được thực hiện lặp lại 3 lần để tính toán giá trị trung bình và biểu diễn độ lệch chuẩn đi kèm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chiết xuất cellulose từ vỏ ngô và tổng hợp cellulose triacetate

Trong nghiên cứu này, cellulose chiết xuất từ vỏ ngô có màu vàng nhạt, xốp và có thể dễ dàng nghiền nát như hình 2A, với hiệu suất chiết xuất đạt 28,1%. Trong quá trình chiết xuất, các thành phần khác của vỏ ngô như lignin và hemicellulose đã được loại bỏ, dẫn đến sự mất trọng lượng so với vỏ ngô ban đầu. Hình 2B mô tả CTA thu được từ quá trình acetyl hóa cellulose với axit acetic và anhydride acetic với axit sulfuric làm chất xúc tác với hiệu suất đạt khoảng 35%. Giá trị thay thế DS của mẫu này làm tăng CTA khoảng 2,5 và %AP là 40,2%. Thêm vào đó, màng composite từ CTS và CTA (CTS/CTA) được tổng hợp thành công với độ bền nhất định, màu vàng ngà, không có bọt khí và không có vết bẩn (hình 2C). Các màng composite này sẽ được sử dụng để đánh giá sự ảnh hưởng của CTA lên các đặc tính hoá lý của vật liệu.

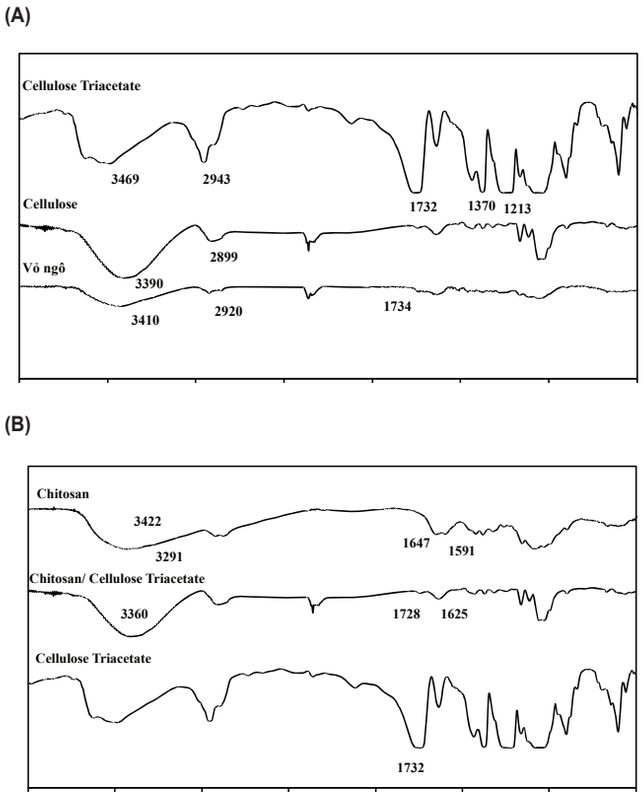


Hình 2. (A) Cellulose chiết xuất từ vỏ ngô, (B) Cellulose triacetate, (C) Màng 0,3CTA.

3.2. Đặc tính của màng chitosan - cellulose triacetate

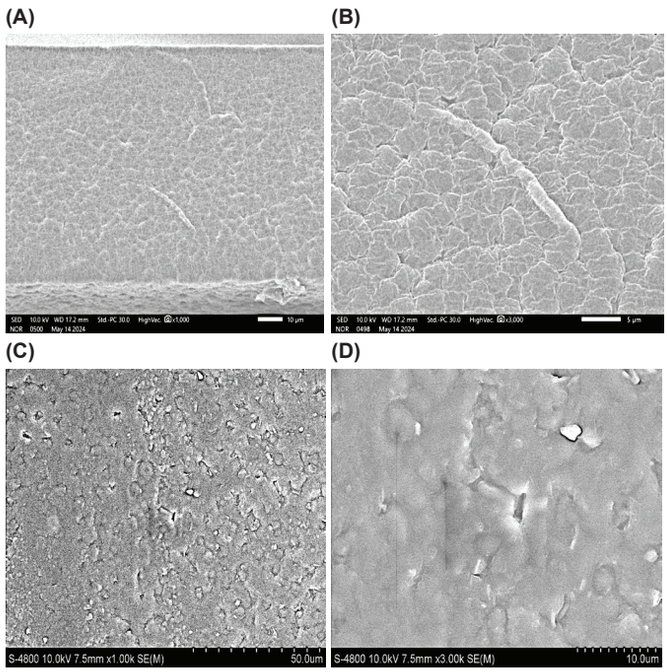
Kết quả phổ FT-IR của cellulose chiết xuất từ vỏ ngô (hình 3A) cho thấy, cường độ liên kết -C=O đặc trưng cho thành phần lignin tại bước sóng 1734 cm^{-1} đã giảm sau quá trình chiết xuất [36]. Tại số sóng 3410 và 2892 cm^{-1} thể hiện sự có mặt của liên kết -O-H và -C-H trong cấu trúc của vỏ ngô. Trong khi đó, số sóng này dịch chuyển sang số sóng thấp hơn tại 3390 và 2899 cm^{-1} tương ứng với liên kết -O-H và -C-H trong trường hợp cellulose. Điều này cho thấy, các nhóm chức này có tham gia vào quá trình xử lý bằng các hoá chất. Thêm vào đó, phổ FT-IR của cellulose và CTA có sự thay đổi rõ rệt, phản ánh quá trình acetyl hóa thành công. Đầu tiên, cường độ của liên kết hydroxyl (-O-H) trong cấu trúc cellulose kèm theo sự dịch chuyển số sóng tương ứng lên 3469 cm^{-1}, cho thấy nhóm -O-H đã được thay thế bởi các nhóm acetyl (CH_3CO-) của CTA. Điều này được chứng minh bởi sự gia tăng các liên kết

-C=O trong liên kết kéo dãn của nhóm acetyl tại số sóng 1732 cm^{-1}. Thêm vào đó, sự có mặt của liên kết -C-H bẻ cong trong cấu trúc CH_3 của nhóm acetyl tại số sóng 1370 cm^{-1}. Cuối cùng, liên kết -C-O kéo dãn của nhóm acetyl tại số sóng 1213 cm^{-1} [33]. Kết quả này chứng minh, CTA đã được tổng hợp thành công từ cellulose. Hình 3B cho thấy, phổ FT-IR của CTS, CTA và màng composite CTS/CTA đại diện là mẫu 0,3CTA. Trong trường hợp mẫu CTS, các liên kết đặc trưng như -O-H và -N-H được quan sát lần lượt tại số sóng 3422 và 3291 cm^{-1}. Liên quan đến liên kết amine, các đỉnh tại số sóng 1647 và 1591 cm^{-1} lần lượt thể hiện cho sự có mặt của amine bậc 1 và bậc 2 [37]. Đối với màng CTS/CTA, liên kết -O-H được tìm thấy ở số sóng thấp hơn là 3360 cm^{-1} cũng như cường độ liên kết -N-H của CTS không quan sát được. Sự tương tác của các nhóm chức giữa CTS và CTA được thể hiện qua cường độ liên kết -C=O trong cấu trúc CTA giảm dần và sự dịch chuyển từ 1732 cm^{-1} đối với CTA về 1728 cm^{-1} đối với mẫu CTS/CTA. Thêm vào đó, liên kết amine trong cấu trúc CTS chỉ được quan sát tại số sóng 1625 cm^{-1}. Từ những kết quả trên có thể chứng minh sự tương tác giữa các nhóm chức trong cấu trúc hoá học của CTS và CTA trong màng 0,3CTA.



Hình 3. Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của cellulose chiết xuất từ (A) vỏ ngô, cellulose và cellulose triacetate và (B) chitosan, màng 0,3CTA.

Hình 4 thể hiện cấu trúc hình thái bề mặt của màng CTS và màng composite 0,3CTA tại độ phóng đại ×1000 và ×3000. Có thể thấy, bề mặt của màng CTS tương đối bằng phẳng và có cấu trúc khá đồng nhất (hình 4A, B). Khi có sự tham gia của CTA trong thành phần vật liệu, bề mặt của màng CTS/CTA tương ứng được quan sát có cấu trúc gồ ghề hơn, cũng như có sự xuất hiện của các hạt CTA li ti trên bề mặt. Kết quả từ phổ FT-IR cho thấy, sự tương tác giữa cellulose và CTA trong thành phần màng 0,3CTA có thể củng cố cấu trúc, giúp cho màng CTS/CTA khá ổn định. Điều này có thể dẫn đến sự ảnh hưởng đáng kể đến các đặc tính hoá lý liên quan đến độ ẩm và khả năng hấp thụ nước của màng.



Hình 4. Hình kính hiển vi điện tử quét của màng chitosan (A, B) và màng 0,3CTA (C, D) tại các độ phân giải: ×1000 và ×3000.

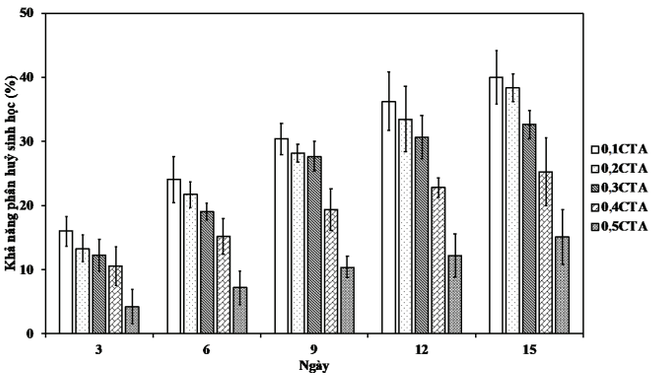
Các kết quả liên quan đến đặc tính của màng composite với các tỷ lệ phối trộn khác nhau được trình bày trong bảng 2. Có thể thấy, khi tăng lượng CTA trong màng CTS, độ ngậm nước bão hoà của các màng CTS/CTA giảm tương ứng. Giá trị này giảm từ 50% của mẫu 0,1CTA xuống còn 20% trong mẫu 0,3CTA và thấp nhất là 7,5% tương ứng với mẫu 0,5CTA. Kết quả này được giải thích là do sự thay thế các nhóm hydroxyl trên mạch chính cellulose bằng các nhóm acetyl, giúp CTA là dẫn xuất có khả năng kháng nước [38]. Thêm vào đó, sự có mặt của các phân tử CTA giúp cấu trúc của màng composite trở nên dày đặc hơn, hạn chế khả năng xâm nhập của các phân tử nước vào bên trong cấu trúc của vật liệu màng composite. Giá trị độ ẩm giảm được quan sát có cùng xu hướng với độ ngậm nước bão hoà. Một lần nữa, sự xuất hiện của CTA có trong cấu trúc polymer của màng composite làm giảm các lỗ rỗng trong cấu trúc màng và tăng khả năng kháng nước. Có thể thấy, giá trị độ ẩm của các mẫu có sự thay đổi không đáng kể (khoảng 3,5%) khi hàm lượng CTA thêm vào từ 0,1 đến 0,3 g tương ứng với màng 0,1CTA và 0,3CTA. Tuy nhiên, khi hàm lượng này tăng lên 0,5 g thì giá trị độ ẩm giảm xuống còn 2,4% đối với mẫu composite 0,5CTA. Trong ứng dụng đóng gói, tiêu chuẩn truyền sáng rất quan trọng để đảm bảo chất lượng và độ an toàn của sản phẩm. Trong nghiên cứu này, khả năng truyền sáng quang học giảm dần khi tỷ lệ CTA tăng lên, do CTA có khả năng gia tăng độ trong suốt của

vật liệu [39]. CTA được biết đến với độ trong suốt quang học tuyệt vời và duy trì đặc tính này ngay cả trong điều kiện độ ẩm thay đổi. Khả năng chống ẩm này làm cho nó đặc biệt phù hợp với các ứng dụng đòi hỏi khả năng truyền ánh sáng ổn định theo thời gian [40]. Ở tỷ lệ phối trộn 1,6/0,3 tương ứng với mẫu 0,3CTA, khả năng truyền quang của vật liệu giảm xuống gần như đạt điểm bão hòa. Điều này đặc biệt quan trọng do khả năng truyền sáng quang học đại diện cho tính ngăn chặn ánh sáng của màng và kháng oxy hóa lipid gây ra bởi tia UV trong thực phẩm [41]. Độ bền kéo là một chỉ số để đánh giá độ bền cơ học của vật liệu, rất quan trọng trong các ứng dụng làm bao bì sinh học. Độ bền kéo của vật liệu giảm khi tăng hàm lượng CTA tương ứng. Điều này được giải thích sự bổ sung CTA quá mức có thể làm giảm sự tương tác giữa các nhóm chức có mặt trong cấu trúc của màng CTS/CTA, dẫn đến sự phối trộn kém hiệu quả do mất cân bằng về mặt khối lượng. CTS có liên kết hydro mạnh và tính chất cơ học nội tại, việc thêm nhiều CTA có thể phá vỡ các tương tác này, làm suy yếu tính toàn vẹn về mặt cấu trúc của màng. Nếu CTS không tương tác với CTA thông qua liên kết hydro hoặc các lực khác, vật liệu composite thu được có thể có độ kết dính yếu hơn, khiến nó dễ bị đứt gãy hơn.

Bảng 2. Đặc tính của màng chitosan/cellulose triacetate.

STT	Mẫu	Độ ngậm nước bão hoà (%)	Độ ẩm (%)	Độ truyền quang (%)	Độ bền kéo (N/mm^2)
1	0,1CTA	53±2,1	3,7±0,3	42±1,1	7,5±0,3
2	0,2CTA	35±3,2	3,6±0,2	24±3,5	6,8±0,5
3	0,3CTA	20±2,5	3,5±0,2	6,0±1,3	5,9±0,2
4	0,4CTA	15±3,3	3,1±0,1	4,4±0,5	3,2±0,5
5	0,5CTA	7,3±1,2	2,4±0,2	3,9±0,4	2,7±0,2

Màng phân hủy sinh học ngày càng được khám phá như là giải pháp thay thế bền vững cho vật liệu nhựa thông thường trong các ứng dụng đóng gói. Những màng có nguồn gốc từ polymer tự nhiên hoặc được tổng hợp để phân hủy trong điều kiện môi trường bình thường như đất, nhằm mục đích giảm thiểu chất thải dai dẳng liên quan đến nhựa truyền thống. Hình 5 mô tả khả năng phân huỷ sinh học của các mẫu màng composite với nhiều tỷ lệ phối trộn khác nhau giữa CTS và CTA. Kết quả cho thấy, sự phối trộn CTA tăng dẫn đến giảm khả năng phân huỷ sinh học của màng composite. Ví dụ, giá trị này đạt khoảng 40% tương ứng với mẫu 0,1CTA và giảm dần xuống 32,7% cho mẫu 0,3CTA và 15,1% trong trường hợp mẫu 0,5CTA. Nếu hàm lượng CTA thấp, màng vẫn có thể phân hủy tương đối nhanh do khả năng phân hủy sinh học của chitosan [34]. Khi tỷ lệ CTA tăng lên, khả năng phân hủy sinh học của màng composite có thể giảm vì khả năng chống lại sự phân hủy của vi khuẩn của CTA có thể chiếm ưu thế. Màng composite có thể mất nhiều thời gian hơn để phân hủy vì sự hiện diện của CTA có thể tạo thành rào cản đối với khả năng tiếp cận của vi khuẩn đối với thành phần CTS dễ phân hủy sinh học hơn [42]. Thêm vào đó, tính phân huỷ sinh học tăng dần qua các khoảng thời gian từ 3 đến 15 ngày. Nhìn chung, màng CTS/CTA cho khả năng dễ dàng phân huỷ trong môi trường đất tự nhiên.



Hình 5. Khả năng phân huỷ sinh học trong đất của màng chitosan/cellulose triacetate.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, cellulose đã được chiết xuất thành công với hiệu suất đạt 28,1% và CTA được tổng hợp với %AP đạt 40% và DS khoảng 2,5. Các vật liệu màng composite được tổng hợp thành công khi tỷ lệ phối trộn CTA tăng dần từ 0,1 đến 0,5 g trong dung dịch CTS. Màng composite CTS/CTA có khả năng phân hủy sinh học, góp phần mở ra triển vọng phát triển cho các nghiên cứu khác về kết hợp CTS với các vật liệu thiên nhiên khác. Điều này mở đường cho các nghiên cứu tận dụng nguồn phế thải nông nghiệp, đặc biệt là các nguồn giàu cellulose và chitin, để thay thế nhiên liệu sinh học và các loại polymer không phân hủy sinh học hiện có trên thị trường. Ngoài ra, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần đánh giá %AP và DS có thể gây ảnh hưởng tới đặc tính của vật liệu chứa CTA cũng như các ứng dụng liên quan đến màng bọc thực phẩm. Thêm nữa, việc đánh giá khả năng kháng khuẩn của màng composite dựa trên các hàm lượng phối trộn CTA cũng cần đánh giá thêm. Do đó, các nghiên cứu chuyên sâu liên quan đến độc tính sinh học cũng như khả năng bảo quản thực phẩm cũng được thực hiện trên nhiều loại đối tượng cụ thể hơn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.L. Andrady, M.A. Neal (2009), "Applications and societal benefits of plastics", *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, **364(1526)**, pp.1977-1984, DOI: 10.1098/rstb.2008.0304.

[2] G. Lamichhane, A. Acharya, R. Marahatha, et al. (2023), "Microplastics in environment: Global concern, challenges, and controlling measures", *International Journal of Environmental Science and Technology*, **20(4)**, pp.4673-4694, DOI: 10.1007/s13762-022-04261-1.

[3] M. Shen, B. Song, G. Zeng, et al. (2020), "Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?", *Environmental Pollution*, **263**, DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114469.

[4] O.A. Alabi, K.I. Ologbonjaye, O. Awosolu, et al. (2019), "Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: A review", *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, **5(1)**, DOI: 10.23937/2572-4061.1510021.

[5] N. Evode, S.A. Qamar, M. Bilal, et al. (2021), "Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability", *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, **4**, DOI: 10.1016/j.cscee.2021.100142.

[6] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law (2017), "Production, use, and fate of all plastics ever made", *Science Advances*, **3(7)**, DOI: 10.1126/sciadv.1700782.

[7] World Economic Forum (2016), *The New Plastics Economy: Rethinking The Future of Plastics*, 36pp.

[8] J. Boonniteewanich, S. Pitivut, S. Tongjoy, et al. (2014), "Evaluation of carbon footprint of bioplastic straw compared to petroleum based straw products", *Energy Procedia*, **56**, pp.518-524, DOI: 10.1016/j.egypro.2014.07.187.

[9] R. Narayan (2011), "Carbon footprint of bioplastics using biocarbon content analysis and life-cycle assessment", *MRS Bulletin*, **36(9)**, pp.716-721, DOI: 10.1557/mrs.2011.210.

[10] K. Jõgi, R. Bhat (2020), "Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **18**, DOI: 10.1016/j.scp.2020.100326.

[11] N. Kawashima, T. Yagi, K. Kojima (2019), "How do bioplastics and fossil-based plastics play in a circular economy?", *Macromolecular Materials and Engineering*, **304(9)**, DOI: 10.1002/mame.201900383.

[12] J.L. Shamshina, O. Zavgorodnya, H. Choudhary, et al. (2018), "In search of stronger/cheaper chitin nanofibers through electrospinning of chitin-cellulose composites using an ionic liquid platform", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **6(11)**, pp.14713-14722, DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b03269.

[13] D. Klemm, H.P. Schmauder, T. Heinze (2005), "Cellulose", *Biopolymers Online: Biology • Chemistry • Biotechnology • Applications*, DOI: 10.1002/3527600035.bpol6010.

[14] M.B. Galia, S. Follonier, M. Pusnik, et al. (2017), "2 - Natural polymers: A source of inspiration", *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing, pp.31-64, DOI: 10.1016/B978-0-08-100262-9.00002-1.

[15] T.T.C. Trang, K.D. Nguyen (2025), "Chitosan and its biomass composites in applications", *Building a Low-Carbon Society Through Applied Environmental Materials Science*, IGI Global: Hershey, pp.169-202, DOI: 10.4018/979-8-3693-0003-9.ch007.

[16] D. Alemu, E. Getachew, A.K. Mondal (2023), "Study on the physicochemical properties of chitosan and their applications in the biomedical sector", *International Journal of Polymer Science*, DOI: 10.1155/2023/5025341.

[17] A. Jiang, R. Patel, B. Padhan, et al. (2023), "Chitosan based biodegradable composite for antibacterial food packaging application", *Polymers*, **15**, DOI: 10.3390/polym15102235.

[18] N. Wrońska, N. Katir, M.N. Lange, et al. (2023), "Biodegradable chitosan-based films as an alternative to plastic packaging", *Foods*, **12**, DOI: 10.3390/foods12183519.

[19] S. Sharma, S. Kohli, A. Singh, et al. (2025), "Chitosan-based films for food packaging applications", *Functional Nanomaterials and Nanocomposites for Biodegradable Food Packaging*, Springer Nature, pp.151-170, DOI: 10.1007/978-981-97-9084-5_7.

[20] M. Poulicek, M.F.V. Foucart, C. Jeuniaux (1986), "Chitinoproteic complexes and mineralization in mollusk skeletal structures", *Chitin in Nature and Technology*, Springer, pp.7-12, DOI: 10.1007/978-1-4613-2167-5_2.

[21] L.A. Utracki (1999), "Polymer blends: Fundamentals", *Polypropylene: An A-Z Reference*, Springer, pp.601-605, DOI: 10.1007/978-94-011-4421-6_81.

[22] A.E.Q. Sauceda, H.P. Carlos, S.G.S. Ayerdi, et al. (2014), "Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: Interaction and possible effect after ingestion", *Food & Function*, **5(6)**, pp.1063-1072, DOI: 10.1039/c4fo00073k.

[23] F. Li, P. Fei, B. Cheng, et al. (2019), "Synthesis, characterization and excellent antibacterial property of cellulose acetate reverse osmosis membrane via a two-step reaction", *Carbohydrate Polymers*, **216**, pp.312-321, DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.04.026.

[24] N.R. Aswathy, A.K. Palai, A. Ramadoss, et al. (2020), "Fabrication of cellulose acetate-chitosan based flexible 3D scaffold-like porous membrane for supercapacitor applications with PVA gel electrolyt", *Cellulose*, **27(7)**, pp.3871-3887, DOI: 10.1007/s10570-020-03030-y.

[25] H. Zhou, H. Tong, J. Lu, et al. (2021), "Preparation of bio-based cellulose acetate/chitosan composite film with oxygen and water resistant properties", *Carbohydrate Polymers*, **270**, DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118381.

[26] S. Gopi, A. Pius, R. Kargl, et al. (2019), "Fabrication of cellulose acetate/chitosan blend films as efficient adsorbent for anionic water pollutants", *Polymer Bulletin*, **76(3)**, pp.1557-1571, DOI: 10.1007/s00289-018-2467-y.

[27] R.R. Aquino, M.S. Tolentino, S.C.S. Amen, et al. (2018), "Preparation of cellulose acetate blended with chitosan nanostructured membrane via electrospinning for Cd^{2+} adsorption in artificial wastewater", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **191(1)**, DOI: 10.1088/1755-1315/191/1/012137.

[28] A. Kramar, T. Luxbacher, N.M. Far, et al. (2023), "Active cellulose acetate/chitosan composite films prepared using solution blow spinning: Structure and electrokinetic properties", *Polymers*, **15**, DOI: 10.3390/polym15153276.

[29] M.D. Islam, F.J. Uddin, T.U. Rashid, et al. (2023), "Cellulose acetate-based membrane for wastewater treatment - A state-of-the-art review", *Materials Advances*, **4(18)**, pp.4054-4102, DOI: 10.1039/D3MA00255A.

[30] M. Simon, R. Fulchiron, F. Gouanvé (2022), "Water sorption and mechanical properties of cellulosic derivative fibers", *Polymers*, **14**, DOI: 10.3390/polym14142836.

[31] X. Wang, X. Wang, P. Xiao, et al. (2016), "High water permeable free-standing cellulose triacetate/graphene oxide membrane with enhanced antibiofouling and mechanical properties for forward osmosis", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **508**, pp.327-335, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.08.077.

[32] K. Eo, D. Hwang, K. Lee, et al. (2018), "Nitrate permeability of semi-permeable membranes prepared from binary blends of cellulose triacetate and chitosan", *Polymer Engineering & Science*, **58(2)**, pp.192-197, DOI: 10.1002/pen.24546.

[33] H.M. Shaikh, A. Anis, A.M. Poulose, et al. (2022), "Synthesis and characterization of cellulose triacetate obtained from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) trunk mesh-derived cellulose", *Molecules*, **27**, DOI: 10.3390/molecules27041434.

[34] K.D. Nguyen, D.N.D. Phung, T.T.T. Nguyen, et al. (2025), "Colorimetric chitosan/polyvinyl alcohol composite membrane incorporated with anthocyanins as pH indicator for monitoring fish freshness", *Journal of Applied Polymer Science*, **142(2)**, 10.1002/app.56333.

[35] ASTM International (2014), *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*, ASTM D638-14.

[36] A. Boonmahitthisud, L. Nakajima, K.D. Nguyen, et al. (2016), "Composite effect of silica nanoparticle on the mechanical properties of cellulose-based hydrogels derived from cottonseed hulls", *Journal of Applied Polymer Science*, **134(10)**, DOI: 10.1002/app.44557.

[37] K.D. Nguyen (2022), "Preparation and characterization of chitin hydrogel composited with halloysite clay solution via phase inversion", *Cellulose Chem. Technol.*, **56(9-10)**, pp.1071-1080.

[38] F. Mikaeili, P.I. Gouma (2018), "Super water-repellent cellulose acetate mats", *Scientific Reports*, **8(1)**, DOI: 10.1038/s41598-018-30693-2.

[39] X. Sun, M. Bourham, D.G. Barrett, et al. (2021), "Transparent and high barrier plasma functionalized acrylic coated cellulose triacetate films", *Progress in Organic Coatings*, **150**, DOI: 10.1016/j.porgcoat.2020.105988.

[40] M.E.A. Manaf, M. Tsuji, S. Nobukawa, et al. (2011), "Effect of moisture on the orientation birefringence of cellulose esters", *Polymers*, **3**, pp.955-966, DOI: 10.3390/polym3020955.

[41] K. Marsh, B. Bugusu (2007), "Food packaging - Roles, materials, and environmental issues", *Journal of Food Science*, **72(3)**, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x.

[42] W. Luo, M. Xie, F.I. Hai, et al. (2016), "Biodegradation of cellulose triacetate and polyamide forward osmosis membranes in an activated sludge bioreactor: Observations and implications", *Journal of Membrane Science*, **510**, pp.284-292, DOI: 10.1016/j.memsci.2016.02.066.

 DOI: 10.31276/VJST.2024.2900

Vai trò của GO trong tăng cường hoạt tính xúc tác của vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO cho cảm biến đo màu

Phạm Thị Hiền, Ngô Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Thị Đào, Vũ Thị Hương Mai, Tô Đạo Cường, Ngô Xuân Đinh, Hoàng Văn Tuấn*

Viện Nghiên cứu Nano, Trường Đại học Phenikaa, phường Dương Nội, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/8/2024; ngày chuyển phản biện 6/9/2024; ngày nhận phản biện 20/9/2024; ngày chấp nhận đăng 25/9/2024

Tóm tắt:

Graphene ôxít (GO) với diện tích bề mặt riêng lớn và độ linh động điện tích cao được biết đến như một vật liệu nano chức năng quan trọng, đặc biệt trong phát triển các loại vật liệu xúc tác mới. Trong nghiên cứu này, vật liệu tổ hợp MnO_2-GO được tổng hợp nhằm đánh giá vai trò của GO trong việc tăng cường hoạt tính xúc tác của MnO_2. Kết quả cho thấy, sự hiện diện của GO không chỉ giúp các hạt nano MnO_2 phân bố đồng đều hơn mà còn làm tăng đáng kể diện tích bề mặt hoạt hóa (1,162 lần) và tốc độ chuyển điện tích qua bề mặt điện cực (2,5 lần) so với MnO_2. Trong khảo sát phản ứng oxy hóa cơ chất 3,3,5,5-tetramethylbenzidine (TMB), vật liệu MnO_2-GO thể hiện cường độ hấp thụ tại 450 nm cao gấp 5,82 lần so với MnO_2, kèm theo sự thay đổi màu sắc rõ rệt từ xanh lam sang vàng. Sự gia tăng này chứng tỏ GO đóng vai trò trung gian hiệu quả trong quá trình truyền electron, giúp tăng khả năng xúc tác của vật liệu. Các kết quả thu được cho thấy vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO hứa hẹn là ứng cử viên tiềm năng cho ứng dụng cảm biến đo màu.

Từ khóa: **đo màu, graphene ôxít, MnO_2, nanozyme, xúc tác.**

Chỉ số phân loại: **2.5, 2.9**

Assessing the role of GO in enhancing the catalytic activity of MnO_2-GO nanomaterials in colorimetric sensors

Thi Hien Pham, Thi Quynh Trang Ngo, Thi Dao Nguyen, Thi Huong Mai Vu, Dao Cuong To, Xuan Dinh Ngo, Van Tuan Hoang*

Phenikaa University Nano Institute (PHENA), Phenikaa University, Duong Noi Ward, Hanoi, Vietnam

Received 30 August 2024; revised 20 September 2024; accepted 25 September 2024

Abstract:

Graphene oxide (GO) has been regarded as an important component in functional materials, particularly for developing a variety of catalysts due to its large specific surface area and high charge mobility. In this article, MnO_2-GO nanomaterial was successfully synthesised using a chemical method to investigate the impact of GO on its catalytic activity. The results demonstrated that the presence of GO not only facilitated the uniform dispersion of MnO_2 nanoparticles on its surface but also significantly increased the electrochemically active surface area (by 1.162-fold) and the charge transfer rate (by 2.5-fold) compared to pure MnO_2. The results of catalytic activity evaluation, assessed through the oxidation of 3,3,5,5-tetramethylbenzidine (TMB), revealed that the MnO_2-GO nanomaterial exhibited much higher catalytic efficiency. Specifically, the absorbance peak at 450 nm for the MnO_2-GO-TMB system was 5.82 times higher than that of MnO_2-TMB system, accompanied by a distinct color change from blue to yellow, which was easily observable by the naked eye. The obtained results suggest that the MnO_2-GO nanomaterial is a promising candidate for colorimetric sensor applications.

Keywords: **catalysis, colorimetric, graphene oxide, MnO_2, nanozymes.**

Classification numbers: **2.5, 2.9**

Tác giả liên hệ: Email: tuan.hoangvan@phenikaa-uni.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, với sự gia tăng nhu cầu vật liệu thông minh cho nhiều ứng dụng liên ngành dẫn đến sự phát triển một cách mạnh mẽ trong lĩnh vực nghiên cứu về vật liệu mới và công nghệ nano. Vật liệu nano ôxít kim loại chuyển tiếp như MnO_2, SnO_2 hay WO_3 đã nhận được sự quan tâm đáng kể trong những năm gần đây do chúng có nhiều đặc tính quý báu có liên quan đến sự thay đổi cấu trúc lớp, bề mặt và hứa hẹn tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như quang điện tử, xúc tác, y sinh và năng lượng [1, 2].

Trong số các vật liệu trên, MnO_2 đã và đang nhận được sự quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu trong những năm gần đây do sở hữu nhiều đặc tính ưu việt. Về mặt cấu trúc, MnO_2 có thể tồn tại ở nhiều hình dạng cấu trúc nano khác nhau như dạng thanh, dạng hạt, dạng dây, dạng tấm (2D)… [1]. Một trong những đặc tính độc đáo của vật liệu MnO_2 đó là hoạt tính xúc tác mạnh giống như một enzyme tự nhiên. MnO_2 có khả năng kết hợp với một số cơ chất như TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine), OPD (o-phenylenediamine), DAB (diazoaminobenzene) để tạo ra một phản ứng màu [3-5]. Do vậy vật liệu nano MnO_2 được gọi là một "enzyme nhân tạo hay "nanozyme". Dựa vào thuộc tính thú vị này, vật liệu MnO_2 2D đã được một số nhóm nghiên cứu báo cáo về khả năng ứng dụng cho cảm biến đo màu nhằm phát hiện nhiều chất ô nhiễm như ion kim loại nặng, các chất hữu cơ khối lượng phân tử nhỏ [6, 7]. Trong kỹ thuật cảm biến này, MnO_2 được sử dụng để oxy hóa dung dịch TMB không màu thành dung dịch có màu xanh lục, xanh lam hoặc vàng với các bước sóng và giá trị hấp thụ khác nhau. Sự có mặt của các chất ô nhiễm trong phản ứng oxy hóa TMB dẫn đến sự thay đổi về vị trí, cường độ đỉnh hấp thụ và màu sắc của dung dịch là những tín hiệu nhận biết của cảm biến. Tuy nhiên, hoạt tính xúc tác của MnO_2 cũng được đánh giá là bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố liên quan đến môi trường phản ứng. Do vậy, việc ổn định và nâng cao hoạt tính xúc tác của MnO_2 là một trong những vấn đề rất quan trọng nhằm khai thác tốt tiềm năng ứng dụng của dạng vật liệu này.

Bên cạnh một số giải pháp liên quan đến công nghệ chế tạo, việc tổ hợp MnO_2 với một vật liệu khác như graphene ôxít (GO) cũng là một trong những hướng nghiên cứu thu hút được sự quan tâm của nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới. GO được biết đến là một vật liệu nano có cấu trúc hai chiều sở hữu nhiều đặc tính khác biệt như diện tích bề mặt lớn, cấu trúc điện tử linh động, khả năng tương tác tốt với các phân tử sinh học, hóa học [8] đã được phát triển ứng dụng rộng rãi trong cảm biến nano nhằm phát hiện và theo dõi tồn dư các loại thuốc, hóa chất độc hại trong thực phẩm, nông nghiệp. J. Gao và cs (2021) [9] đã kết hợp MnO_2 với GO trong cấu trúc nano tổ hợp để chế tạo cảm biến nano điện hóa nhằm phát hiện tryptophan, một tiền chất quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp chất kích thích tăng trưởng ở thực vật. Hiện nay, các nghiên cứu trong và ngoài nước nhằm khai thác tiềm năng ứng dụng của hệ vật liệu nano tổ hợp kết hợp giữa MnO_2 và graphene hoặc GO chủ yếu tập trung cho siêu tụ, hấp phụ hoặc cảm biến điện hóa. Các nghiên cứu liên quan đến ứng dụng vật liệu nano tổ hợp này cho cảm biến đo màu còn hạn chế.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào khảo sát khả năng ứng dụng của hệ vật liệu MnO_2-GO trong cảm biến đo màu. MnO_2-GO được chế tạo theo quy trình đơn giản ở điều kiện nhiệt độ phòng trên cơ sở nền GO được tổng hợp theo phương pháp điện hóa từ nguồn điện cực graphite. Phản ứng oxy hóa TMB (không màu) thành oxTMB (có màu) được sử dụng để đánh giá hoạt tính xúc tác của MnO_2-GO. Sự tác động qua lại hay hiệu ứng hiệp đồng giữa GO và MnO_2 đến sự tăng cường hoạt tính xúc tác của MnO_2-GO được đưa ra và thảo luận chi tiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất và thiết bị

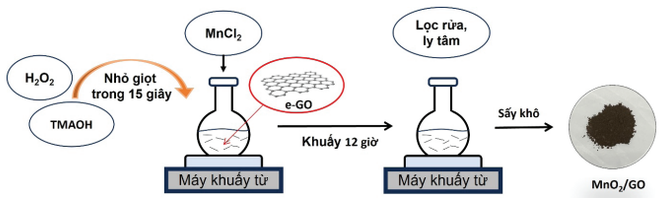
Điện cực graphit (dạng thanh, chiều dài 8 cm, đường kính 5 mm, Trung Quốc), K_2CO_3 (dạng bột, 99,5%, Hàn Quốc). Bộ cấp nguồn đa năng (Model: ST8008-6K Lucas Nuelle/Đức). Máy khuấy từ gia nhiệt (Model: C-MAG HS7 IKA/Malaysia). Nước cất 2 lần sử dụng cho thực nghiệm được chuẩn bị từ hệ thống Milli-Q® system (18,2 MΩ cm tại 25°C).

Hóa chất cấp phân tích (AR) được sử dụng bao gồm: Manganese clorua ($MnCl_2$, Sigma Aldrich, 99%), Tetrametylamoni hydroxit (TMAOH) (Sigma Aldrich, 99%), 3,3,5,5-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma Aldrich 98%), Hydrogen peoxit (H_2O_2, Aladin, 30%).

Dung dịch đệm phốt phát (PBS, pH 4,0) được chuẩn bị từ các muối NaCl, KCl, $Na_2HPO_4.12H_2O$ và KH_2PO_4 (Merck KGaA, Đức, >99%). Độ pH của dung dịch PBS được điều chỉnh bằng axit H_3PO_4 (0,1 M) và bazơ NaOH (2 M).

2.2. Tổng hợp vật liệu nano MnO_2-GO

MnO_2-GO được tổng hợp ở điều kiện nhiệt độ phòng bằng phương pháp oxy hóa (hình 1). Đầu tiên, GO (1 mg/ml) được tổng hợp theo phương pháp điện hóa (e-GO) như đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây [10]. Tiếp theo, sử dụng 2 ml H_2O_2 30% và 12 ml TMAOH được nhỏ giọt đồng thời vào hỗn hợp gồm dung dịch gồm 10 ml GO và 10 ml $MnCl_2$ trong điều kiện có khuấy từ. Dung dịch màu vàng nhạt sẽ chuyển dần thành màu nâu đen cho thấy sự hình thành của MnO_2 do ion Mn^{2+} bị oxy hóa thành Mn^{4+} bởi H_2O_2 trong sự có mặt của TMAOH. Tiếp tục quá trình khuấy trong khoảng thời gian 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, kết tủa hình thành được đem ly tâm, lọc rửa nhiều lần với nước cất và sấy khô ở 60°C trong thời gian 5 giờ để thu MnO_2-GO.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp vật liệu nano MnO_2-GO.

2.3. Phương pháp phân tích đặc trưng cấu trúc của vật liệu

Vật liệu sau khi chế tạo được phân tích đặc trưng cấu trúc bằng các phương pháp: đo phổ hấp thụ nguyên tử khả kiến (UV-Vis), phép đo nhiệt trọng lượng (TGA), đo quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), đo quang phổ Raman và phân tích hiển vi điện tử quét (SEM).

2.4. Phương pháp phân tích đặc trưng điện hóa của vật liệu

Kỹ thuật quét thế vòng tuần hoàn (CV) và đo phổ tổng trở (EIS) được sử dụng để xác định diện tích bề mặt hoạt hóa và khả năng chuyển điện tích của vật liệu MnO_2-GO. Quá trình quét CV được tiến hành trong khoảng đo từ -0,3 đến 0,6 V với tốc độ quét 50 mVs^{-1}. Quá trình đo EIS được thực hiện trong khoảng tần số từ 0,01 đến 50.000 Hz với E_{ac}=0,01 V, E_{dc}=0,15 V. Các phép đo điện hóa được thực hiện trên hệ điện hóa Palmsens4 (PS Trace, PalmSens, Hà Lan).

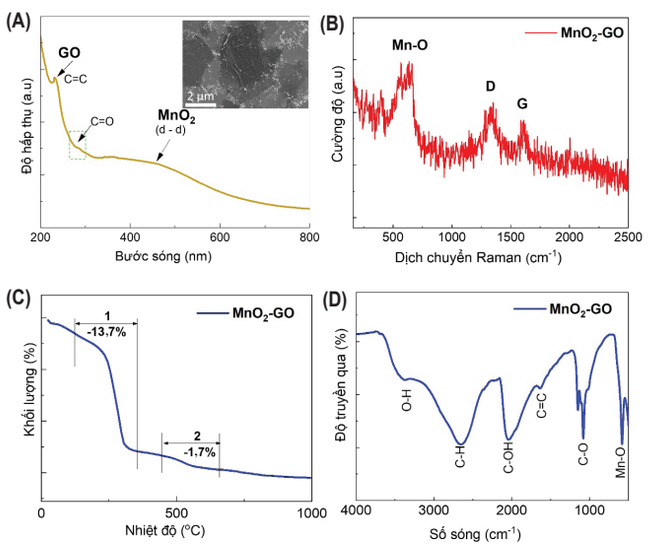
2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính xúc tác của vật liệu

Hoạt tính xúc tác của vật liệu được đánh giá dựa vào phản ứng giữa enzyme (MnO_2 hoặc MnO_2-GO) với cơ chất 3,3,5,5-Tetramethylbenzidine (TMB) trong môi trường axít. Đầu tiên, 1200 µl dung dịch MnO_2 hoặc MnO_2-GO với các nồng độ khác nhau được thêm vào 2000 µl dung dịch đệm PBS pH 4,0. Sau đó, 400 µl dung dịch TMB 690 µM được thêm vào hỗn hợp và lắc đều trong 5 phút để phản ứng được xảy ra hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng sau đó được đo phổ hấp thụ UV-Vis để xác định sự thay đổi các đỉnh hấp thụ đặc trưng của các chất trong quá trình phản ứng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân tích đặc trưng cấu trúc của vật liệu

Các đặc trưng cấu trúc của vật liệu được nghiên cứu sử dụng các phương pháp phân tích phổ UV-Vis, Raman, TGA, FTIR và ảnh SEM. Như kết quả chỉ ra trong hình 2, có thể quan sát thấy phổ hấp thụ của MnO_2-GO (hình 2A) đo được trong dải từ 200 đến 800 nm, có các đỉnh hấp thụ đặc trưng ở 230, 270 và 410 nm. Đỉnh hấp thụ tại bước sóng 410 nm được quy cho các chuyển đổi d-d của các ion Mn trong vật liệu MnO_2. Sự hiện diện của đỉnh 230 nm rất rõ ràng cho thấy sự dịch chuyển điện tử từ π lên π* của liên kết đôi C=C trong cấu trúc vòng thơm. Ngoài ra, một đỉnh với cường độ thấp xuất hiện ở vùng bước sóng 270 nm đại diện cho sự dịch chuyển điện tử từ n lên π* của liên kết C=O. Bên cạnh đó, kết quả phân tích ảnh vi cấu trúc SEM trong hình chèn hình 2A cho thấy sự phân bố đồng đều của các hạt nano MnO_2 trên bề mặt vật liệu GO dạng tấm.



Hình 2. (A) Phổ UV-Vis (hình chèn: ảnh SEM), (B) phổ Raman, (C) phổ TGA và (D) phổ FTIR của vật liệu MnO_2-GO.

Hình 2B hiển thị phổ Raman của vật liệu MnO_2-GO. Có thể thấy, có 2 đỉnh cường độ cao trong khoảng 567 và 643 cm^{-1} do các dao động Mn-O đối xứng [11], 2 đỉnh khác nằm ở khoảng 1330 và 1595 cm^{-1} lần lượt đại diện cho đỉnh D gây ra bởi các khiếm khuyết cấu trúc trong graphene và đỉnh G liên quan đến sự tán xạ bậc nhất của các phonon E_{2g} trong lai hóa sp^2 [12].

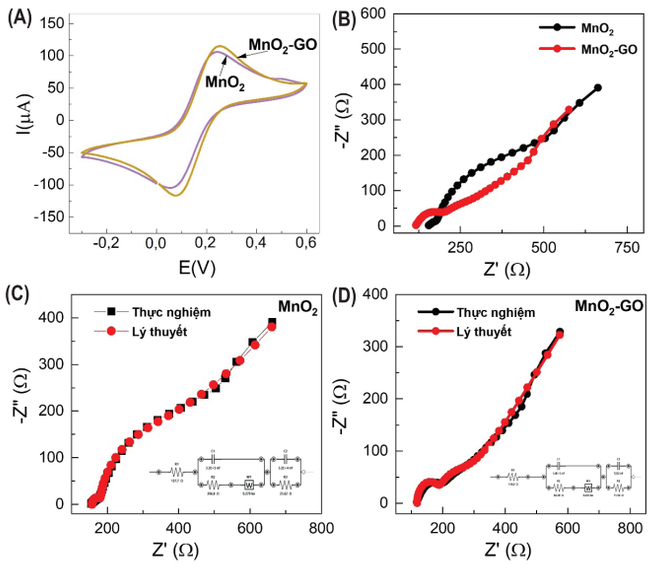
Đường cong nhiệt trọng lượng TGA của mẫu MnO_2-GO được thể hiện như hình 2C. Có thể thấy rằng, vật liệu MnO_2-GO có 2 bước thay đổi khối lượng mẫu, ở khoảng nhiệt độ 250°C, vật liệu xảy ra quá trình bay hơi nước bị hấp phụ và sự phân hủy nhiệt của các nhóm chức như carboxyl, hydroxyl, epoxy, nitrogen dioxide. Tỷ lệ giảm trọng lượng của vật liệu ở bước thay đổi này lên tới 13,7% được cho là do sự không ổn định của GO ở nhiệt độ cao và do sự thay đổi pha xảy ra ở MnO_2. Vật liệu MnO_2-GO xuất hiện thêm một bước giảm khối 1,7% khoảng trên 400°C có thể là do quá trình đốt cháy carbon và bước chuyển pha tiếp theo của MnO_2 [13].

Các nhóm chức trong MnO_2-GO được phân tích bằng quang phổ FTIR. Phổ FTIR của MnO_2-GO cho thấy sự xuất hiện các dao động đặc trưng cho các liên kết của nhóm chức. Một đỉnh xuất hiện tại 3430 cm^{-1} tương ứng với dao động kéo giãn O-H của nhóm hydroxyl. Dao động tại vị trí 2848, 2360, 1627, 1080 và 1150 cm^{-1} lần lượt được gán cho các nhóm C-H, nhóm C=O=C dao động kéo dài trong carbonic, nhóm C=C, nhóm C-O và nhóm C-O-C trong cấu trúc vòng thơm của mạng nền GO. Ngoài ra, còn có sự xuất hiện của đỉnh 515 cm^{-1} là dao động kéo giãn Mn-O đối xứng trong bát diện MnO_6 của MnO_2 [14].

Từ các kết quả phân tích trên cho thấy, vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO đã được chế tạo thành công sử dụng quy trình đơn giản ở nhiệt độ phòng. Nano MnO_2 được liên kết và phân bố đồng đều trên bề mặt của tấm GO. Vai trò của GO trong cấu trúc nano tổ hợp sẽ được phân tích và đánh giá chi tiết hơn trong phần tiếp theo thông qua việc đánh giá khả năng chuyển điện tích và diện tích bề mặt hoạt hóa của vật liệu.

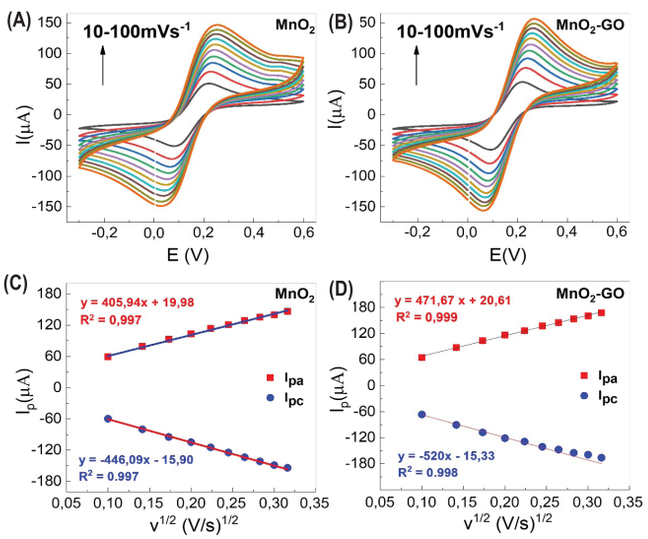
3.2. Phân tích đặc trưng bề mặt hoạt động của vật liệu

Để đánh giá được các đặc tính quan trọng của vật liệu như diện tích bề mặt hoạt hóa, khả năng chuyển điện tích, chúng tôi sử dụng các kỹ thuật CV và EIS. Hình 3A trình bày kết quả thu được từ kỹ thuật quét thế vòng tuần hoàn đối với các điện cực được biến tính với vật liệu MnO_2 và MnO_2-GO trong dung dịch 0,1 KCl có chứa 5,0 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Có thể quan sát thấy một cặp đỉnh oxy hóa khử sắc nét đặc trưng cho quá trình oxy hóa khử thuận nghịch của các ion $Fe(CN_6)^{3-}$/ $Fe(CN_6)^{4-}$ trong đường cong CV của cả hai điện cực. Kết quả cho thấy, điện cực biến tính với MnO_2-GO thể hiện các cường độ dòng điện cực đại cao hơn so với điện cực chỉ biến tính với MnO_2. Kết quả này có thể là do đóng góp của GO trong việc cải thiện diện tích hoạt hóa bề mặt của tổ hợp vật liệu. Bên cạnh đó, điện cực phủ MnO_2-GO cũng cho độ tách đỉnh (ΔE_p) nhỏ hơn điện cực phủ MnO_2. Kết quả này gợi ý rằng, tốc độ chuyển điện tích qua bề mặt điện cực phủ MnO_2-GO là cao hơn so với trường hợp chỉ có MnO_2.



Hình 3. Đường cong CV (A) và biểu đồ Nyquist (B, C, D) của các điện cực đã biến tính với các vật liệu nano MnO_2 và MnO_2-GO.

Hình 3B, 3C và 3D thể hiện các kết quả thu được từ kỹ thuật EIS hiển thị dưới dạng biểu đồ Nyquist. Với cả hai điện cực, EIS bao gồm hai hình bán nguyệt ở vùng tần số cao và tần số trung bình và đường gần thẳng ở vùng tần số thấp [15]. Phần hình bán nguyệt quan sát thấy ở vùng tần số cao phù hợp với quá trình giới hạn chuyển điện tích và hình bán nguyệt ở vùng tần số trung bình tương ứng với quá trình đóng góp của quá trình truyền khối của các loài oxy hóa khử qua lớp xốp của vật liệu nano biến tính. Phần tuyến tính được thấy ở vùng tần số thấp tương ứng với quá trình truyền khối của các loài oxy hóa khử đến bề mặt điện cực. Từ kết quả thu được, chúng tôi tiến hành xác định các thông số sử dụng phần mềm fit mạch tương. Các giá trị R_{ct} (điện trở chuyển điện tích) của MnO_2 và MnO_2-GO được tính toán lần lượt là 206 và 82 Ω. Việc bổ sung GO vào vật liệu đã làm giảm R_{ct} do GO đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc truyền tải điện tích bề mặt của vật liệu. Ngoài ra, việc kết hợp các cấu trúc 2D-2D (GO, tấm nano MnO_2) đã tạo ra cấu trúc xốp giúp các loài oxy hóa khử có thể dịch chuyển đến và tiếp cập các vị trí hoạt hóa trên bề mặt vật liệu và tham gia phản ứng, do đó dẫn đến cải thiện độ ổn định theo chu kỳ với khả năng khuếch tán nhanh các loài oxy hóa khử. Ngoài ra, GO cung cấp nhiều vị trí hoạt động cho tương tác ion dẫn đến tăng cường khả năng lưu trữ điện tích [16]. Kết quả thu được từ kỹ thuật EIS phù hợp với các kết quả thu được từ kỹ thuật CV.



Hình 4. Đường cong CV (A, B) và sự phụ thuộc tuyến tính (C, D) của điện cực MnO_2 và MnO_2-GO với sự thay đổi tốc độ quét từ 10 đến 100 mVs^{-1}.

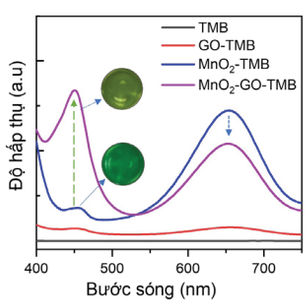
Hình 4A và 4B hiển thị đường cong CV được ghi lại cho các điện cực trong dung dịch 0,1 M KCl chứa 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ với các tốc độ quét khác nhau từ 10 đến 100 mVs^{-1}. Có thể thấy rằng, dòng điện cực đại (I_{pa} và I_{pc}) đều tăng khi tăng tốc độ quét từ 10 đến 100 mVs^{-1}. Sự phụ thuộc tuyến tính quan sát được giữa dòng điện cực đại với căn bậc hai của tốc độ quét (hình 4C, 4D) cho thấy quá trình điện hóa xảy ra trên bề mặt điện cực được kiểm soát bởi quá trình khuếch tán. Bên cạnh đó, chúng ta cũng có thể tính toán diện tích hoạt hóa bề mặt (A) của các điện cực theo phương trình Randles-Sevcik:

$$I_p = \pm 2,69 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} A v^{1/2} C$$

trong đó, I_p là cường độ dòng điện đỉnh oxy hóa hoặc khử, n là số electron tham gia phản ứng oxy hóa khử, D là hệ số khuếch tán của các ion $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, v là tốc độ quét, A là diện tích hoạt hóa, C là nồng độ của các loài oxy hóa khử $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Kết quả tính toán cho thấy, diện tích hoạt hóa bề mặt của điện cực phủ MnO_2-GO vào khoảng 0,138 cm^2 lớn hơn gấp 1,162 lần so với diện tích diện tích hoạt hóa bề mặt của điện cực phủ MnO_2 (0,118 cm^2). Điều này chứng tỏ rằng sự kết hợp GO và MnO_2 đã tạo ra sự gia tăng diện tích bề mặt hoạt hóa của vật liệu, giúp tăng cường hoạt tính xúc tác của hệ vật liệu.

3.3. Đánh giá hoạt tính xúc tác của vật liệu

Từ các kết quả phân tích cấu trúc và đánh giá đặc trưng bề mặt hoạt động của vật liệu, chúng tôi tiến đánh giá hoạt tính xúc tác của vật liệu đối với quá trình oxy hóa khử TMB. MnO_2 được biết đến là nanozyme có hoạt tính bắt chước oxidase có khả năng biến đổi TMB thành oxTMB. Với vai trò là chất xúc tác trong môi trường axit, MnO_2 thúc đẩy quá trình oxy hóa TMB mà không cần H_2O_2. TMB không màu và không có đỉnh hấp thụ đặc trưng bị oxy hóa thành sản phẩm có màu từ xanh lam (sản phẩm bậc 1) đến vàng (sản phẩm cuối cùng). Phổ hấp thụ UV-Vis thu được trong quá trình oxy hóa TMB của vật liệu MnO_2 và MnO_2-GO được trình bày ở hình 5.

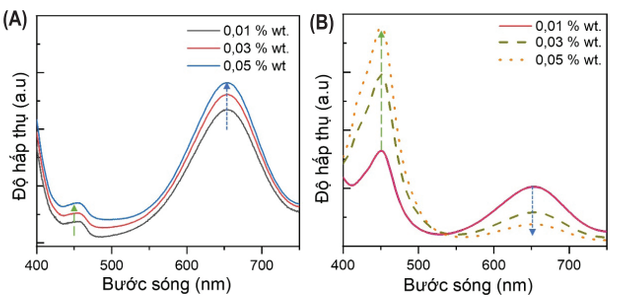


Hình 5. Phổ hấp thụ UV-Vis của các vật liệu trong quá trình oxy hóa TMB.

Có thể xác nhận từ phổ UV-Vis rằng, TMB ban đầu không có đỉnh hấp thụ đặc trưng ở bất kì bước sóng nào trong khoảng 400-800 nm. Sản phẩm oxTMB có đỉnh các hấp thụ tại bước sóng 450 và 650

nm tương ứng giải thích cho sự biến đổi màu sắc của dung dịch. Có thể so sánh thấy, vật liệu tổ hợp MnO_2-GO có khả năng xúc tác quá trình này hiệu quả hơn so với vật liệu MnO_2 cùng một nồng độ. Sự xuất hiện của GO đã góp phần làm tăng diện tích bề mặt của vật liệu nano MnO_2, tăng truyền tải điện tích, từ đó giúp cho quá trình tương tác giữa MnO_2 với cơ chất TMB và sản phẩm oxy hóa bậc 1 của nó được tăng cường (phức hợp diimine-diamine) để tạo thành oxTMB dạng oxy hóa hoàn toàn (diimine). Điều này thể hiện ở sự giảm xuống của đỉnh đặc trưng 650 nm và sự tăng cường ở đỉnh 450 nm (5,82 lần), tương ứng với sự thay đổi màu sắc từ màu xanh lam (MnO_2, A_{450}=0,28 a.u) sang màu vàng (MnO_2-GO, A_{450}=1,63 a.u).

Phổ hấp thụ cũng cho thấy rằng, tỷ lệ khối lượng tiền chất đầu vào ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác của vật liệu được thể hiện trong hình 6. Đối với vật liệu không có GO, việc tăng hàm lượng chất đầu vào sẽ làm tăng sự hấp thụ thể hiện ở cả 2 đỉnh 450 và 650 nm. Lượng chất đầu vào tăng lên đã tăng nhanh sự tương tác với cơ chất, tạo ra đồng thời sản phẩm oxTMB bậc 1 và oxTMB hoàn toàn. Tuy nhiên, vật liệu MnO_2-GO với những cải thiện nhờ sự có mặt của GO như đã phân tích ở trên, đã làm cho vật liệu tổ hợp có khả năng tương tác mạnh mẽ với TMB và oxTMB bậc 1 để tạo ra sản phẩm ở dạng oxy hóa hoàn toàn. Quan sát cường độ đỉnh hấp thụ cho thấy sự giảm mạnh ở đỉnh 650 nm và tăng vọt ở đỉnh 450 nm của vật liệu MnO_2-GO ở cùng khối lượng đầu vào với vật liệu MnO_2 đơn lẻ. Với các kết quả rõ rệt trong việc thúc đẩy và tăng cường hoạt tính xúc tác của GO cho thấy, vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO là ứng cử viên tiềm năng ứng dụng cho cảm biến đo màu.



Hình 6. Ảnh hưởng của khối lượng vật liệu đến hoạt tính xúc tác phân hủy TMB của (A) MnO_2 và (B) MnO_2-GO.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo thành công vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO bằng phương pháp oxy hóa ở nhiệt độ phòng. Kết quả phân tích UV-Vis, Raman, TGA, FTIR và SEM cho thấy, các tấm nano MnO_2 đã được gắn thành công lên trên bề mặt của tấm GO để tạo thành vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO. Quá trình đánh giá đặc tính điện hóa và hoạt tính xúc tác thông qua phép đo CV, EIS và UV-Vis đã cho thấy tác dụng tăng cường diện tích bề mặt hoạt hóa (1,162 lần) và khả năng xúc tác phân hủy TMB (5,82 lần) của vật liệu tổ hợp MnO_2-GO so với MnO_2. Màu sắc của dung dịch thay đổi từ màu xanh lam sang màu vàng và có thể dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Sự tăng cường được lý giải là do sự có mặt của GO vừa đóng vai trò làm tăng diện tích bề mặt hoạt động của mẫu và vừa là tác nhân cung cấp electron cho các phản ứng xúc tác phân hủy cơ chất. Các kết quả thu được cho thấy, vật liệu nano MnO_2-GO là một ứng cử viên đầy triển vọng cho các ứng dụng về cảm biến đo màu. Tuy nhiên, tùy thuộc vào từng đối tượng phát hiện cụ thể, ảnh hưởng của các điều kiện như pH dung dịch, thời gian, tỷ phần giữa MnO_2 và GO đến hiệu suất của cảm biến đo màu là những điều kiện cần được tối ưu hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số NCUD.01-2022.02. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] B. Ding, P. Zheng, P. Ma, et al. (2020), "Manganese oxide nanomaterials: Synthesis, properties, and theranostic applications", *Adv. Mater.*, **32(10)**, DOI: 10.1002/adma.201905823.

[2] Lichchhavi, A. Kanwade, P.M. Shirage (2022), "A review on the synergy of transition metal oxide nanostructured materials: Effective and coherent choice for supercapacitor electrodes", *J. Energy Storage*, **55**, DOI: 10.1016/J.EST.2022.105692.

[3] X. An, R. Chen, Q. Chen, et al. (2021), "A MnO_2 nanosheet-assisted ratiometric fluorescence probe based on carbon quantum dots and o-phenylenediamine for determination of 6-mercaptopurine", *Microchimica Acta*, **188**, pp.1-9, DOI: 10.1007/s00604-021-04802-4.

[4] S.R.H. Jangi, M. Akhond, G. Absalan (2020), "A field-applicable colorimetric assay for notorious explosive triacetone triperoxide through nanozyme-catalyzed irreversible oxidation of 3, 3′-diaminobenzidine", *Microchim. Acta*, **187(8)**, DOI: 10.1007/S00604-020-04409-1.

[5] X. Liu, Q. Wang, H. Zhao, et al. (2012), "BSA-templated MnO_2 nanoparticles as both peroxidase and oxidase mimics", *Analyst*, **137(19)**, pp.4552-4558, DOI: 10.1039/C2AN35700C.

[6] X.L. Zhang, C. Zheng, S.S. Guo, et al. (2014), "Turn-on fluorescence sensor for intracellular imaging of glutathione using g-C_3N_4 nanosheet-MnO_2 sandwich nanocomposite", *Anal. Chem.*, **86(7)**, pp.3426-3434, DOI: 10.1021/AC500336F.

[7] W. Huang, Y. Deng, Y. He (2017), "Visual colorimetric sensor array for discrimination of antioxidants in serum using MnO_2 nanosheets triggered multicolor chromogenic system", *Biosens. Bioelectron.*, **91**, pp.89-94, DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.028.

[8] E.M. Narváe, A. Merkoçi (2019), "Graphene oxide as an optical biosensing platform: A progress report", *Adv. Mater.*, **31(6)**, DOI: 10.1002/ADMA.201805043.

[9] J. Gao, H. Li, M. Li, et al. (2021), "Polydopamine/graphene/MnO_2 composite-based electrochemical sensor for *in situ* determination of free tryptophan in plants", *Analytica Chimica Acta*, **1145,** pp.103-113, DOI: 10.1016/j.aca.2020.11.008.

[10] D.T.N. Nga, N.L.N. Trang, V.T. Hoang, et al. (2022), "Elucidating the roles of oxygen functional groups and defect density of electrochemically exfoliated GO on the kinetic parameters towards furazolidone detection", *RSC Advances*, **12(43)**, pp.27855-27867, DOI: 10.1039/d2ra04147b.

[11] S. Zhang, X. Zhuang, D. Chen, et al. (2019), "Simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine using MnO_2 nanosheets and ionic liquid-functionalized graphene combined with a permeation-selective polydopamine membrane", *Microchimica Acta*, **186**, pp.1-10, DOI: 10.1007/s00604-019-3577-4.

[12] Z.S. Wu, W. Ren, D.W. Wang, et al. (2010), "High-energy MnO_2 nanowire/graphene and graphene asymmetric electrochemical capacitors", *ACS Nano*, **4(10)**, pp.5835-5842, DOI: 10.1021/nn101754k.

[13] M. Karbak, O. Boujibar, S. Lahmar, et al. (2023), "Nanometric MnO_2 and MnO_2-graphene oxide materials enabled by a solvent-assisted synthesis and their application in asymmetric supercapacitors", *Energy Technology*, **11(2)**, DOI: 10.1002/ente.202201243.

[14] T.S. Munonde, A. Nqombolo, S. Hobongwana, et al. (2023), "Removal of methylene blue using MnO_2@rGO nanocomposite from textile wastewater: Isotherms, kinetics and thermodynamics studies", *Heliyon*, **9(4)**, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e15502.

[15] M. Mylarappa, M. Lakshmi, V.V. Mahesh, et al. (2016), "A facile hydrothermal recovery of nano sealed MnO_2 particle from waste batteries: An advanced material for electrochemical and environmental applications", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **149(1)**, DOI: 10.1088/1757-899X/149/1/012178.

Giá trị cắt lớp vi tính đa dãy trong đánh giá tình trạng xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater

Nguyễn Thành Khiêm[1*], Trần Thị Thúy[2], Đoàn Văn Hoan[2], Đỗ Hải Đăng[3], Nguyễn Hàm Hội[1]

[1]Bệnh viện Bạch Mai, 78 Giải Phóng, phường Kim Liên, Hà Nội, Việt Nam
[2]Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Kim Liên, Hà Nội, Việt Nam
[3]Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, 40 Tràng Thi, phường Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 28/11/2024; ngày chuyển phản biện 3/12/2024; ngày nhận phản biện 31/12/2024; ngày chấp nhận đăng 13/1/2025

Tóm tắt:

Đánh giá tương quan giữa khối u và mạch máu là một thông số quan trọng để xác định khả năng cắt bỏ các khối u vùng đầu tụy. Mục tiêu: Đánh giá giá trị cắt lớp vi tính đa dãy trong đánh giá xâm lấn mạch máu một số khối u vùng đầu tụy. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 44 bệnh nhân u vùng đầu tụy được phẫu thuật tại Khoa Phẫu thuật Tiêu hóa - Gan mật tụy (nay thuộc Trung tâm Phẫu thuật Tiêu hóa) và được chụp cắt lớp vi tính đa dãy tại Trung tâm Điện quang, Bệnh viện Bạch Mai trong thời gian từ 6/2020 đến 6/2022. Kết quả nghiên cứu: Tuổi trung bình là 59,66±10,11; 68,2% thuộc nhóm tuổi 50-70 tuổi; tỷ lệ nam/nữ là 1,31/1. Đa số bệnh nhân có u đầu tụy với 22 trường hợp (chiếm 50%). 40,9% bệnh nhân có u 2-4 cm, kích thước trung bình là 3,09±1,96 cm; 56,8% u ngấm thuốc kém. Vai trò góc tiếp xúc và biến dạng mạch trong đánh giá xâm lấn mạch máu có độ nhạy lần lượt là 100 và 99,5%. Độ nhạy của cắt lớp vi tính trong xác định xâm lấn mạch máu nói chung là 83,3%. Độ chính xác của cắt lớp vi tính trong đánh giá xâm lấn mạch máu là 98,2%. Kết luận: Chụp cắt lớp vi tính đa dãy là phương tiện tin cậy để đánh giá tình trạng xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater.

Từ khóa: **cắt lớp vi tính, u vùng đầu tụy, xâm lấn mạch.**

Chỉ số phân loại: **2.6, 3.2, 3.5**

The value of multi-slice computed tomography in evaluating vascular invasion of periampullary tumours

Thanh Khiem Nguyen[1*], Thi Thuy Tran[2], Van Hoan Doan[2], Hai Dang Do[3], Ham Hoi Nguyen[1]

[1]Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Kim Lien Ward, Hanoi, Vietnam
[2]Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Kim Lien Ward, Hanoi, Vietnam
[3]VietDuc University Hospital, 40 Trang Thi Street, Hoan Kiem Ward, Hanoi, Vietnam

Received 28 November 2024; revised 31 December 2024; accepted 13 January 2025

Abstract:

Determining the relationship between the tumor and blood vessels is an important parameter for performing radical resection in periampullary tumours. Objective: To evaluate the effectiveness of multi-slice computed tomography (CT) in assessing vascular invasion of periampullary tumours. Subjects and methods: 44 patients with periampullary tumours were operated on at the Department of Gastrointestinal and HepatoBiliaryPancreatic Surgery (now under the Centre of Digestive Surgery) and had multi-slice CT scans at the Radiology Centre, Bach Mai Hospital from June 2020 to June 2022. Results: The mean age was 59.66±10.11 years; 68.2% of these patients belonged to the 50-70 age group; the male-to-female ratio was 1.31:1. Half of the patients had pancreatic head tumours. 40.9% of patients had tumours measuring from 2 to 4 cm in size, with a mean tumour size of 3.09±1.96 cm; 56.8% of tumours were hypodense. The role of contact angle and vessel deformation in assessing vascular invasion showed sensitivities of 100% and 99.5%, respectively. The sensitivity of CT in determining vascular invasion in general was 83.3%. The accuracy of CT in assessing vascular invasion was 98.2%. Conclusion: Multi-slice CT is a reliable means to evaluate the vascular invasion of periampullary cancer.

Keywords: **multi-slice computed tomography, periampullary cancer, vascular invasion.**

Classification numbers: **2.6, 3.2, 3.5**

[*]Tác giả liên hệ: Email: nguyenthanhkhiemvd@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Ung thư vùng quanh bóng Vater là một trong những loại ung thư có tiên lượng xấu [1]. Tỷ lệ sống sau 5 năm cao nhất là ung thư tá tràng (49%), sau đó đến ung thư bóng Vater (45%), ung thư đoạn thấp ống mật chủ (27%) và thấp nhất là ung thư đầu tụy (18%) [2]. Mặc dù những khối u này có nguồn gốc khác nhau, nhưng do cấu trúc giải phẫu phức tạp và rất gần nhau, vì vậy triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng khá giống nhau và có một phương pháp phẫu thuật chung [3]. Ở những bệnh nhân mắc u quanh bóng Vater, phẫu thuật mang lại cơ hội tốt nhất trong điều trị và kéo dài thời gian sống [4]. Chẩn đoán chính xác giai đoạn trước phẫu thuật là rất quan trọng [5]. Đánh giá tương quan giữa khối u và mạch máu là một thông số quan trọng để xác định khả năng cắt bỏ [6]. Do đó, các mạch máu lớn quanh đầu tụy phải được phân tích một cách cẩn thận, đặc biệt qua cắt lớp vi tính trước phẫu thuật nhằm có chiến lược phù hợp nhất cho bệnh nhân. Tại Việt Nam, chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá về xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater, đặc biệt là các nghiên cứu có đối chứng với kết quả phẫu thuật và giải phẫu bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá giá trị cắt lớp vi tính đa dãy trong đánh giá tình trạng xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu được tiến hành với bệnh nhân được phẫu thuật cắt khối tá tụy do khối u quanh bóng Vater tại Khoa Phẫu thuật Tiêu hóa - Gan mật tụy (nay thuộc Trung tâm Phẫu thuật Tiêu hóa) và được chụp cắt lớp vi tính đa dãy tại Trung tâm Điện quang, Bệnh viện Bạch Mai trong thời gian từ 6/2020 đến 6/2022.

Tiêu chuẩn lựa chọn:

+ Những trường hợp u vùng đầu tụy (bao gồm u đầu tụy, u bóng Vater, u phần thấp ống mật chủ, u tá tràng) được chụp cắt lớp vi tính đa dãy trước mổ, có hình ảnh trên Hệ thống Lưu trữ và Truyền tải hình ảnh (PACS).

+ Được tiến hành phẫu thuật tại Bệnh viện Bạch Mai, có kết quả giải phẫu bệnh là ung thư (biểu mô tuyến, thần kinh nội tiết…).

+ Biên bản phẫu thuật và kết quả giải phẫu bệnh được mô tả rõ ràng, đầy đủ các thông tin nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Bệnh nhân không được chụp cắt lớp vi tính hoặc chụp cắt lớp vi tính không đảm bảo yêu cầu kỹ thuật.

+ Không đầy đủ hồ sơ bệnh án hoặc hồ sơ bệnh án ghi chép không rõ ràng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

Công cụ nghiên cứu: Máy chụp cắt lớp vi tính 128 dãy Siemens SOMATOM của Hãng Siemen tại Trung tâm Điện quang, Bệnh viện Bạch Mai và hệ thống PACS Mineva. Các pha: chụp không tiêm thuốc cản quang. Pha động mạch ở 25-30 giây. Nhu mô tuyến tụy ở 40-50 giây, pha tĩnh mạch cửa ở 65-70 giây. Tái tạo hình ảnh: tái tạo mặt phẳng Axial, mặt phẳng Coronal, mặt phẳng Sagittal. Tái tạo theo tỷ trọng tối đa (MIP), tái tạo đa bình diện MPR3D để đánh giá mạch máu.

2.3. Biến số nghiên cứu

- Tuổi, giới, đặc điểm u trên cắt lớp vi tính: kích thước, bờ, tỷ trọng, ngấm thuốc; đặc điểm mô bệnh học của khối u.

- Giá trị của các dấu hiệu trên cắt lớp vi tính trong đánh giá xâm lấn mạch máu (5 mạch máu được đánh giá: động mạch mạc treo tràng trên, động mạch thân tạng, động mạch gan, tĩnh mạch mạc treo tràng trên, tĩnh mạch cửa).

+ Giá trị chẩn đoán của góc tiếp xúc giữa mạch máu và khối u: ≤180 độ, >180 độ. Nếu khối u tiếp xúc ≤180 độ với mạch máu được coi là không có dấu hiệu xâm lấn, nếu góc này >180 độ được coi là xâm lấn mạch trên cắt lớp vi tính.

+ Giá trị chẩn đoán của biến dạng, tắc hẹp mạch máu.

+ Tiêu chuẩn xâm lấn: Khi kết quả giải phẫu bệnh xác định u xâm lấn vào các lớp của thành mạch máu.

- Giá trị chẩn đoán xâm lấn mạch máu (cả động mạch và tĩnh mạch) trên cắt lớp vi tính.

+ Xử lý số liệu: Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0. So sánh các đại lượng bằng test Fisher, các giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính, giá trị dự báo âm tính, độ chính xác được tính theo công thức.

+ Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu được sự chấp thuận của Trường Đại học Y Hà Nội và Bệnh viện Bạch Mai.

3. Kết quả nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm		N (n=44)	Tỷ lệ (%)
Tuổi	<50	7	15,9
	50-70	30	68,2
	≥70	7	15,9
Giới	Nam	25	56,8
	Nữ	19	43,2
Giải phẫu bệnh	U đầu tụy	22	50
	U phần thấp ống mật chủ	7	15,9
	U bóng Vater	13	29,6
	U tá tràng	2	4,5
Kích thước u trên cắt lớp vi tính	≤2 cm	16	36,4
	2-4 cm	18	40,9
	>4 cm	10	22,7
Bờ u	Rõ	14	31,8
	Không rõ	30	68,2
Tỷ trọng	Tăng	0	0
	Giảm	26	59,1
	Đồng tỷ trọng	18	40,9
Ngấm thuốc	>20 HU	9	20,5
	10-20 HU	10	22,7
	<10 HU	25	56,8
Kiểu ngấm thuốc	Không đều	35	79,5
	Đều	9	20,5

Kết quả bảng 1 cho thấy, 40,9% bệnh nhân có u 2-4 cm, kích thước trung bình là 3,09±1,96 cm, chủ yếu có bờ không rõ (68,2%). Phần lớn các bệnh nhân có u ngấm thuốc kém và không đều.

Bảng 2. Giá trị chẩn đoán của cắt lớp vi tính trong đánh giá xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater.

	Phẫu thuật - Giải phẫu bệnh		Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	GTCĐ dương tính (%)	GTCĐ âm tính (%)	Độ chính xác (%)
	Không xâm lấn	*Có xâm lấn*					
Biến dạng, hẹp tắc mạch (đánh giá 5 mạch máu: 3 động mạch và 2 tĩnh mạch)							
Biến dạng, hẹp tắc mạch	1	10	55,6	99,5	90,9	96,2	95,9
Không biến dạng, hẹp tắc	201	8					
Động mạch (đánh giá 3 động mạch)							
Không xâm lấn	129	0	100	100	-	-	100
Có xâm lấn	0	3					
Tĩnh mạch (đánh giá 2 tĩnh mạch)							
Không xâm lấn	72	3	80	98,6	92,3	96	95,5
Có xâm lấn	1	12					
Chung động và tĩnh mạch (đánh giá 5 mạch máu: 3 động mạch và 2 tĩnh mạch)							
Không xâm lấn	201	3	83,3	99,5	93,8	98,5	98,2
Có xâm lấn	1	15					

GTCĐ: Giá trị chẩn đoán.

Kết quả bảng 2 cho thấy, độ nhạy của cắt lớp vi tính trong xác định xâm lấn động mạch, tĩnh mạch và mạch máu lần lượt là 100, 80 và 83,3%. Độ đặc hiệu của cắt lớp vi tính trong đánh giá xâm lấn động mạch, tĩnh mạch và chung cho cả động mạch - tĩnh mạch tương ứng là 100; 98,6 và 99,5%.

4. Bàn luận

Tuổi trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu này là 59,66±10,11 (bảng 1), tương đồng với nghiên cứu của tác giả D.T. My (2020) [7] là 54,3±9,4 tuổi. Nam giới chiếm ưu thế so với nữ giới, điều này có thể giải thích do nam giới có nhiều yếu tố nguy cơ hơn như hút thuốc lá, uống rượu… Các bệnh nhân trong nghiên cứu đa số có kích thước u ≤4 cm. Tuy nhiên theo nhiều tác giả thì phương pháp điều trị không phụ thuộc vào kích thước khối u lớn hay nhỏ mà phụ thuộc vào mức độ xâm lấn các tạng xung quanh và mạch máu quanh vùng đầu tụy. Các khối u quanh bóng Vater có bờ không rõ chiếm tỷ lệ 68,2%, thấp hơn trong nghiên cứu của D.H. Lan (2005) [8] (81,9%). Sau khi tiêm thuốc cản quang phần lớn các khối u quanh bóng Vater ngấm thuốc mức độ kém 56,8%; vừa 22,7%; mạnh 20,5%. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của D.H. Lan (2005) [8] lần lượt là 43,1; 36,2 và 4,2%. Nguyên nhân là do các khối u quanh bóng Vater có thành phần chủ yếu là tổ chức xơ và mô liên kết, tổ chức viêm cấp và mạn, thành phần hoại tử, ít gặp u vùng đầu tụy có vôi hóa, chảy máu trong u. Giãn ống mật chủ và ống tụy chính tạo thành dấu hiệu ống đôi là dấu hiệu hay gặp. Tỷ lệ giãn cả ống mật chủ và ống tụy chính trong nghiên cứu là 52,3%, chỉ giãn ống mật chủ 27,3%; chỉ giãn ống tụy chính 11,4%. Theo J.H. Kim và cs (2002) [9], tỷ lệ giãn ống mật chủ và ống tụy chính chiếm 52%. Về mặt mô bệnh học, các khối u quanh bóng Vater chủ yếu là ung thư biểu mô tuyến nên ngấm thuốc kém đến vừa sau tiêm.

Góc tiếp xúc giữa u và mạch máu là một thông số quan trọng để đánh giá xâm lấn mạch máu. Giá trị góc tiếp xúc có mối tương quan với phẫu thuật, góc tiếp xúc càng cao thì khả năng càng lớn khối u xâm lấn mạch máu. Theo kết quả nghiên cứu của D.S. Lu và cs (1997) [10], góc tiếp xúc của u với mạch máu trên 180 độ sử dụng để đánh giá xâm lấn mạch có độ nhạy 84%, độ đặc hiệu 98%, giá trị chẩn đoán dương tính 95%, giá trị chẩn đoán âm tính 93%, độ chính xác 94%. Ngưỡng tiếp xúc này được hầu hết các tác giả chấp nhận và sử dụng [11-13]. Trong nghiên cứu của N.T. Dung và cs (2022) [14], giá trị độ nhạy là 83,3%, độ đặc hiệu 99,4%, giá trị chẩn đoán dương tính 96,8%, giá trị chẩn đoán âm tính 96,3%, độ chính xác 96,4%. Tuy nhiên, cũng có thể do phản ứng viêm do khối u đầu tụy gây ra [15]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng có kết quả tương tự, khi khối u tiếp xúc với mạch máu trên 180 độ thì độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán dương tính, giá trị chẩn đoán âm tính và độ chính xác trong xác định xâm lấn mạch máu lần lượt là 83,3; 99,5; 93,8; 98,5 và 98,2% tương ứng (bảng 2).

Về hình ảnh biến dạng, hẹp tắc mạch, T.J. Hough và cs (1999) [16] đã mô tả hình ảnh giọt nước ở tĩnh mạch mạc treo tràng trên như một chỉ số đáng tin cậy. Mạch bị hẹp tắc có nguy cơ bị xâm lấn cao. Nhưng thận trọng là điều cần thiết đặc biệt là đối với tĩnh mạch, do ảnh hưởng của khối u mà không có sự hiện diện của xâm lấn mạch máu [12]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, độ nhạy và độ đặc hiệu của dấu hiệu tắc hẹp mạch máu trong xâm lấn mạch máu nói chung (cả động mạch và tĩnh mạch) là 55,6 và 99,5% (bảng 2). Nghiên cứu của H. Li và cs (2005) [17] cũng cho kết quả tương tự với độ nhạy và độ đặc hiệu cho tính chất biến dạng mạch máu là 63 và 100% đối với tĩnh mạch; 45 và 99% đối với động mạch (bảng 3). Như vậy, các nghiên cứu đều cho thấy độ nhạy khá thấp nếu chỉ sử dụng tính chất biến dạng, hẹp tắc mạch máu tuy độ đặc hiệu đều rất cao.

Bảng 3. Giá trị cắt lớp vi tính trong đánh giá xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater trong y văn.

Tác giả	Mạch máu	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	Giá trị dự đoán dương tính (%)	Giá trị dự đoán âm tính (%)	Độ chính xác (%)
Nghiên cứu này	Mạch máu	83,33	99,5	93,75	95,53	98,18
	Tĩnh mạch	80	98,63	92,31	96	95,45
	Động mạch	100	100			100
[14]	Mạch máu	88,9	96,9	86,5	97,5	95,9
	Tĩnh mạch	100	91,8	77,3	100	93,6
	Động mạch	78,9	100	100	96,1	96,6
[10]	Mạch máu	84	98	95	93	94
[13]	Mạch máu	46	99	-	-	-
[17]	Động mạch	79	99	-	-	-
	Tĩnh mạch	92	100			
[19]	Tĩnh mạch	97,6	60	61,2	97,5	-
[12]	Động mạch	63	93	71	90	86
	Tĩnh mạch	92	91	86	95	92

Theo L. Lepanto và cs (2002) [12], với xâm lấn động mạch, độ nhạy là 63%, độ đặc hiệu là 93%, giá trị chẩn đoán dương tính là 71%, giá trị chẩn đoán âm tính là 90%, độ chính xác 86%. Theo H. Li và cs (2005) [17], độ nhạy và độ đặc hiệu cho chẩn đoán xâm lấn động mạch lần lượt là 79 và 99%. Trong nghiên cứu của

N.T. Dung và cs (2022) [14], độ nhạy là 78,9%, độ đặc hiệu 100%, giá trị chẩn đoán dương 100%, giá trị chẩn đoán âm 96,1% và độ chính xác 96,6% (bảng 3). Nghiên cứu của chúng tôi, với hạn chế của cỡ mẫu và số bệnh nhân có xâm lấn động mạch, chưa đánh được chính xác giá trị của xâm lấn động mạch dựa trên góc tiếp xúc của khối u với động mạch, đây là điểm hạn chế trong nghiên cứu (bảng 2).

Thành tĩnh mạch thường mỏng, yếu hơn và không có lớp cơ trong thành mạch như động mạch nên tĩnh mạch khi bị bao quanh hoặc bị thâm nhiễm thành tĩnh mạch thường trở nên không đều và hẹp lòng mạch, dòng chảy trong tĩnh mạch chậm nên khi bị xâm lấn thường tạo thành huyết khối và gây tắc mạch. Kết quả nghiên cứu của L. Lepanto và cs (2022) [12], độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao, lần lượt là 92 và 91%, giá trị chẩn đoán dương tính 86%, giá trị chẩn đoán âm tính 95%, độ chính xác 92%. Kết quả trong nghiên cứu của H. Li và cs (2005) [17] có độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao, lần lượt là 92 và 100% khi kết hợp cả góc tiếp xúc và tính chất biến dạng thành mạch là tiêu chuẩn (bảng 3). Nghiên cứu của chúng tôi cũng có độ đặc hiệu cao tuy nhiên độ nhạy của góc tiếp xúc trên 180 độ trong chẩn đoán xâm lấn tĩnh mạch là 80%, thấp hơn so với các nghiên cứu trên.

Đánh giá xâm lấn mạch máu bằng cộng hưởng từ (MRI) cũng rất có giá trị. MRI có độ nhạy khoảng 71% và độ chính xác 97% theo A. Jajodia và cs (2023) [18]. Siêu âm nội soi (EUS) cung cấp hình ảnh trực tiếp của tuyến tụy thông qua lòng ống tiêu hóa. EUS chính xác hơn cắt lớp vi tính trong việc phát hiện xâm lấn tĩnh mạch cửa; tuy nhiên, đánh giá xâm lấn động mạch khó khăn hơn bằng EUS với độ nhạy 50-100%, độ đặc hiệu 58-100% [4].

5. Kết luận

Chụp cắt lớp vi tính đa dãy là phương tiện tin cậy có độ chính xác cao trong đánh giá tình trạng xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater. Giá trị cắt lớp vi tính trong chẩn đoán xâm lấn động mạch với độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác đều là 100%, trong chẩn đoán xâm lấn tĩnh mạch lần lượt là 80; 98,63; và 95,45%; trong chẩn đoán xâm lấn mạch máu lần lượt là 83,33; 99,5 và 98,18%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Verma, S. Shukla, N. Verma (2015), "Diagnosis, preoperative evaluation, and assessment of resectability of pancreatic and periampullary cancer", *The Indian Journal of Surgery*, **77(5)**, pp.362-370, DOI: 10.1007/s12262-015-1370-0.

[2] J. He, N. Ahuja, M.A. Makary, et al. (2014), "2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: Trends over three decades", *HPB: The Official Journal of The International Hepato Pancreato Biliary Association*, **16(1)**, pp.83-90, DOI: 10.1111/hpb.12078.

[3] J.M. Sarmiento, D.M. Nagomey, M.G. Sarr, et al. (2021), "Periampullary cancers: Are there differences?", *The Surgical Clinics of North America*, **81(3)**, pp.543-555, DOI: 10.1016/s0039-6109(05)70142-0.

[4] N.C. Buchs, M. Chilcott, P.A. Poletti, et al. (2010), "Vascular invasion in pancreatic cancer: Imaging modalities, preoperative diagnosis and surgical management", *World Journal of Gastroenterology*, **16(7)**, pp.818-831, DOI: 10.3748/wjg.v16.i7.818.

[5] A. Soriano, A. Castells, C. Ayuso, et al. (2004), "Preoperative staging and tumor resectability assessment of pancreatic cancer: Prospective study comparing endoscopic ultrasonography, helical computed tomography, magnetic resonance imaging, and angiography", *The American Journal of Gastroenterology*, **99(3)**, pp.492-501, DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.04087.x.

[6] N.A. Ahmad, M.L. Kochman, J.D. Lewis, et al. (2001), "Endosonography is superior to angiography in the preoperative assessment of vascular involvement among patients with pancreatic carcinoma", *J. Clin. Gastroenterol.*, **32(1)**, pp.54-58, DOI: 10.1097/00004836-200101000-00013.

[7] D.T. My (2020), *A Study on The Application of Pancreaticoduodenectomy with Radical Lymphadenectomy in The Treatment of Pancreatic Head Cancer*, Ph.D. Dissertation, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City (in Vietnamese).

[8] D.H. Lan (2005), *A Study on Imaging Characteristics and The Diagnostic Value of Computed Tomography in Pancreatic Head Tumors*, Ph.D. Dissertation, Hanoi Medical University (in Vietnamese).

[9] J.H. Kim, M.J. Kim, J.J. Chung, et al. (2002), "Differential diagnosis of periampullary carcinomas at MR imaging", *RadioGraphics*, **22(6)**, DOI: 10.1148/rg.226025060.

[10] D.S. Lu, H.A. Reber, R.M. Krasny, et al. (1997), "Local staging of pancreatic cancer: Criteria for unresectability of major vessels as revealed by pancreatic-phase, thin-section helical CT", *AJR American Journal of Roentgenology*, **168(6)**, pp.1439-1443, DOI: 10.2214/ajr.168.6.9168704.

[11] K.M. Horton, E.K. Fishman (2002), "Multidetector CT angiography of pancreatic carcinoma: Part I, evaluation of arterial involvement", *AJR American Journal of Roentgenology*, **178(4)**, pp.827-831, DOI: 10.2214/ajr.178.4.1780827.

[12] L. Lepanto, Y. Arzoumanian, D. Gianfelice, et al. (2002), "Helical CT with CT angiography in assessing periampullary neoplasms: Identification of vascular invasion", *Radiology*, **222(2)**, pp.347-352, DOI: 10.1148/radiol.2222010203.

[13] M.E. O'Malley, G.W. Boland, B.J. Wood, et al. (1999), "Adenocarcinoma of the head of the pancreas: Determination of surgical unresectability with thin-section pancreatic-phase helical CT", *AJR American Journal of Roentgenology*, **173(6)**, 1513-1518, DOI: 10.2214/ajr.173.6.10584794.

[14] T.D. Nguyen, V.P. Le, N.H. Pham (2022), "Value of multidetector ct in preoperative assessment of the vascular invasion in pancreatic adenocarcinoma", *Vietnamese Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, **31**, pp.23-28, DOI: 10.55046/vjrnm.31.524.2018 (in Vietnamese).

[15] L.E. Harrison, M.F. Brennan (1998), "Portal vein resection for pancreatic adenocarcinoma", *Surgical Oncology Clinics of North America*, **7(1)**, pp.165-181, DOI: 10.1007/s00508-016-1024-7.

[16] T.J. Hough, V. Raptopoulos, B. Siewert, et al. (1999), "Teardrop superior mesenteric vein: CT sign for unresectable carcinoma of the pancreas", *AJR American Journal of Roentgenology*, **173(6)**, pp.1509-1512, DOI: 10.2214/ajr.173.6.10584793.

[17] H. Li, M.S. Zeng, K.R. Zhou, et al. (2005), "Pancreatic adenocarcinoma: The different CT criteria for peripancreatic major arterial and venous invasion", *Journal of Computer Assisted Tomography*, **29(2)**, pp.170-175, DOI: 10.1097/01.rct.0000155060.73107.83.

[18] A. Jajodia, A. Wang, M. Alabousi, et al. (2023), "MRI vs. CT for pancreatic adenocarcinoma vascular invasion: Comparative diagnostic test accuracy systematic review and meta-analysis", *European Radiology*, **33(10)**, pp.6883-6891, DOI: 10.1007/s00330-023-09659-0.

[19] K. Teramura, T. Noji, T. Nakamura, et al. (2016), "Preoperative diagnosis of portal vein invasion in pancreatic head cancer: Appropriate indications for concomitant portal vein resection", *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, **23(10)**, pp.643-649, DOI: 10.1002/jhbp.387.

Xây dựng khung hỗ trợ lựa chọn các giải pháp xử lý chất thải cho ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên MFA (Material flow analysis) kết hợp LCA (Life cycle assessment)

Tiền Hải Lý[1*], Nguyễn Thị Kiều[1], Nguyễn Thanh Tùng[2], Trần Trung Kiên[2]

[1]Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Bạc Liêu, 178 Võ Thị Sáu, phường Bạc Liêu, tỉnh Cà Mau, Việt Nam
[2]Viện Môi trường và Tài nguyên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, đường Nguyễn Du, phường Đông Hoà, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/12/2024; ngày chuyển phản biện 15/12/2024; ngày nhận phản biện 2/1/2025; ngày chấp nhận đăng 8/1/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá hiện trạng phát thải và đề xuất giải pháp xử lý chất thải cho ao nuôi tôm siêu thâm canh. Từ đó, xây dựng khung hỗ trợ chọn lựa giải pháp xử lý chất thải trong ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên phương pháp phân tích dòng vật chất (Material flow analysis - MFA) kết hợp với phương pháp đánh giá vòng đời (Life cycle assessment - LCA). Phương pháp MFA được áp dụng để phân tích, đánh giá luồng vật liệu và chất thải trong quá trình sản xuất tôm, từ khâu nuôi đến xử lý chất thải. Trong khi LCA giúp định lượng tác động của các giải pháp đề xuất đến môi trường và hệ sinh thái. Kết quả đã lựa chọn và trình bày các giải pháp xử lý chất thải trong mô hình sinh thái tích hợp cho ao nuôi tôm siêu thâm canh. Lượng phát thải khí nhà kính đạt 24.600 kg CO_2 eq, lượng axit hóa đạt 219,5 kg SO_2 eq, phú dưỡng đạt 315 kg PO_4 eq, sử dụng năng lượng tích lũy CEU=307,5 GJ và năng suất sơ cấp ròng BRU đạt 303.500 kg C thải ra môi trường trong hoạt động nuôi tôm.

Từ khóa: **đánh giá vòng đời, nuôi tôm siêu thâm canh, phân tích dòng vật chất, xử lý chất thải.**

Chỉ số phân loại: **2.7, 4.5**

Develop a supporting framework for selecting waste treatment solutions for super-intensive shrimp farming based on the combination of material flow analysis and life cycle assessment

Hai Ly Tien[1*], Thi Kieu Nguyen[1], Thanh Tung Nguyen[2], Trung Kien Tran[2]

[1]College of Agriculture, Bac Lieu University, 178 Vo Thi Sau Street, Bac Lieu Ward, Ca Mau Province, Vietnam
[2]Institute of Resources and Environment, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Nguyen Du Street, Dong Hoa Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 8 December 2024; revised 2 January 2025; accepted 8 January 2025

Abstract:

This study aims to assess the current status of emissions and to propose waste treatment solutions for super-intensive shrimp ponds. Then, a framework to support the selection of waste treatment solutions in super-intensive shrimp ponds was developed based on the material flow analysis (MFA) method combined with life cycle assessment (LCA). The MFA method was applied to analyse and evaluate the flow of materials and waste in shrimp production, from farming to waste treatment. Meanwhile, LCA was used to quantify the impacts of the proposed solutions on the environment and ecosystems. The results identified and demonstrated waste treatment solutions within an integrated ecological model for super-intensive shrimp ponds. Greenhouse gas emissions reached 24,600 kg CO_2 eq, acidification reached 219.5 kg SO_2 eq, eutrophication reached 315 kg PO_4 eq, cumulative energy use (CEU) was 307.5 GJ, and net primary productivity (BRU) reached 303,500 kg C released into the environment from shrimp farming activities.

Keywords: **life cycle assessment, material flow analysis, super-intensive shrimp farming, waste treatment.**

Classification numbers: **2.7, 4.5**

[*]Tác giả liên hệ: Email: thly@blu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, hoạt động nuôi tôm thẻ chân trắng tại các tỉnh thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long được triển khai theo hai hình thức là nuôi thâm canh và siêu thâm canh. Tuy nhiên, nghề nuôi tôm đang gặp phải nhiều khó khăn khi phải đối mặt với các vấn đề về nguồn nước ô nhiễm và biến đổi khí hậu. Nhiệt độ tăng cao và lượng mưa bất thường không theo quy luật là những điều kiện bất lợi đối với hoạt động nuôi tôm [1, 2]. Thức ăn là yếu tố gây ô nhiễm chính trong nuôi tôm thâm canh, việc quản lý thức ăn phù hợp đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa thức ăn đầu vào, giảm thiểu tác động xấu đến hệ thống nuôi và giảm tải lượng chất dinh dưỡng trong nước thải [3]. Trong mô hình nuôi tôm thâm canh, khoảng 22% lượng nitơ được chuyển hóa vào cơ thể tôm, 14% tích tụ trầm tích, 57% thất thoát ra môi trường và chỉ có khoảng 3% lượng nitơ có thể bay hơi vào không khí dưới dạng ammonia [4]. Hệ thống nuôi thủy sản tuần hoàn (RAS) đang là xu hướng của hoạt động nuôi tôm siêu thâm canh, giúp tái sử dụng nguồn nước trong quá trình nuôi các loài thủy sản nước ngọt, cá biển và tôm thẻ chân trắng [5, 6]. Phương pháp LCA được sử dụng để phân tích lượng khí thải carbon của các trang trại nuôi tôm. Kết quả nghiên cứu đã ước tính lượng khí thải carbon trong toàn bộ vòng đời của tôm thẻ chân trắng là 6,9389 $kgCO_2$ e/kg, 23,98%, nguyên liệu gián tiếp (1,4782 $kgCO_2$ e/kg, 21,62%), xử lý chất thải (0,7783 $kgCO_2$ e/kg, 11,40%), khả năng vận chuyển và chất làm lạnh (0,7524 $kgCO_2$ e/kg, 11,01%). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của S.Z. Kamal và cs (2022) [7] cũng chứng minh rằng, lượng phát thải của chuỗi giá trị ngành hàng tôm có thể được giảm thiểu bằng cách áp dụng các giải pháp xử lý nước thải và sử dụng các công nghệ tiết kiệm năng lượng. Nghiên cứu đã sử dụng phương pháp MFA kết hợp với LCA để đánh giá các chất độc hại trong chất thải điện tử và tác động môi trường tiềm ẩn của chúng. Nghiên cứu của P. Kidde và cs (2013) [8] sử dụng phương pháp MFA kết hợp LCA với lý thuyết tiện ích đa thuộc tính để đánh giá các kịch bản cuối vòng đời đối với vật liệu Polyethylene Terephthalate (PET) ở thành phố Tunja chỉ ra rằng, tái chế là giải pháp tốt nhất để tối ưu hóa việc xử lý chất thải PET theo hướng thân thiện môi trường. Trong các nghiên cứu trước, phương pháp MFA và LCA được sử dụng riêng lẻ hoặc được kết hợp để đánh giá các tác động đến môi trường trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu kết hợp MFA và LCA trong việc hỗ trợ lựa chọn các giải pháp xử lý chất thải hiệu quả cho ao nuôi tôm siêu thâm canh.

Nghiên cứu này sẽ tổng hợp các ưu điểm của các công nghệ xử lý chất thải có khả năng ứng dụng cho ao nuôi tôm siêu thâm canh, từ đó đưa ra khung hỗ trợ lựa chọn các giải pháp xử lý chất thải theo hướng không phát thải và phù hợp với các điều kiện tự nhiên sẵn có của đối tượng nghiên cứu điển hình. Khung hỗ trợ lựa chọn giải pháp xử lý chất thải cho ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên MFA kết hợp LCA trong hệ thống tuần hoàn khép kín, từ đó đề xuất mô hình sinh thái khép kín cho ao nuôi tôm hướng đến không phát thải và sử dụng hợp lý tài nguyên.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu dòng tuần hoàn vật chất và năng lượng ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên MFA kết hợp LCA. Nghiên cứu được thực hiện trên địa bàn huyện Đầm Dơi, tỉnh Cà Mau (trước sáp nhập) từ tháng 12/2023 đến tháng 4/2024.

2.1. Phương pháp khảo sát thực địa, thu thập dữ liệu thứ cấp và sơ cấp

Các dữ liệu thứ cấp sẽ được thu thập tại các cơ quan quản lý chuyên ngành của địa phương, chủ yếu là Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và Sở Tài nguyên và Môi trường tỉnh Cà Mau (trước sáp nhập). Điều tra khảo sát thông tin sơ bộ 20 hộ nuôi tôm thâm canh và 20 hộ nuôi tôm siêu thâm canh theo sự hướng dẫn của cán bộ quản lý chuyên ngành tại huyện Đầm Dơi, tỉnh Cà Mau nhằm đánh giá chung về hiện trạng phát thải, quy trình nuôi, bố trí mặt bằng khu nuôi, các phương pháp xử lý chất thải hiện có. Sau đó, lựa chọn 1 hộ dân nuôi tôm siêu thâm canh điển hình để phân tích chi tiết các dòng vật chất và năng lượng. Dữ liệu này là cơ sở để tính toán và đề xuất mô hình xử lý chất thải hướng đến tuần hoàn vật chất và năng lượng ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên MFA kết hợp LCA.

2.2. Phương pháp lấy mẫu và phân tích mẫu

Bước 1: Xác định vị trí lấy mẫu

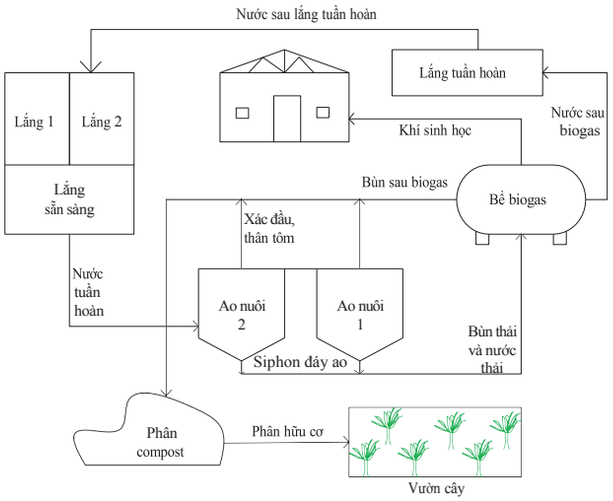
Mẫu nước thải được lấy tại cống xả của các ao nuôi thâm canh và siêu thâm canh khi thay nước và siphon định kỳ (1 tuần/lần trong 3 tuần). Mỗi ao nuôi lấy nước ở 5 vị trí (4 vị trí cách bờ khoảng 2,5 m và cách đều nhau, vị trí thứ 5 lấy giữa ao), bao gồm ao nuôi chính và ao thải. Bảo quản và vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm trong ngày.

Bước 2: Phương pháp phân tích mẫu

Chỉ tiêu pH đo tại hiện trường tuân theo quy trình kỹ thuật của TCVN 6492:2011, nhu cầu oxy hóa học (COD) được phân tích theo phương pháp TCVN 6491:1999, nhu cầu oxy sinh hóa (BOD_5) được đo theo chuẩn phân tích nước và nước thải (SMEWW) 5210 B:2017, amoni (NH_4^+ tính theo N) được đo theo phương pháp SMEWW 4500-NH_3 F:2017, chỉ tiêu tổng chất rắn lơ lửng (TSS) được phân tích theo SMEWW 2540 D:2017, chỉ tiêu coliform được phân tích theo phương pháp thử SMEWW 9221 B:2017 [9].

2.3. Mô tả mô hình sinh thái khép kín

Mô hình sinh thái khép kín cùng các giải pháp xử lý chất thải hướng đến tuần hoàn dinh dưỡng cho hoạt động nuôi tôm siêu thâm canh được mô tả trong hình 1.



Hình 1. Mô hình sinh thái tích hợp cho trại nuôi tôm khép kín.

Nước thải từ ao nuôi tôm sau khi siphon sẽ được lọc để tách chất thải rắn bằng túi lưới. Chất thải rắn từ quá trình nuôi tôm bao gồm: vỏ tôm, thức ăn thừa, phân tôm. Phân tôm có kích cỡ nhỏ hơn mắt lưới nên lọt qua túi lưới và được lắng ở hồ lắng 1; phần nước tiếp tục chảy tràn qua hồ lắng 2, sau đó chảy tràn ra ao sẵn sàng. Lượng nước này có thể được tuần hoàn ngược trở lại ao nuôi. Bùn lắng sau biogas sau thời gian thu hồi khí sinh học có thể làm nguyên liệu hữu cơ ủ phân compost để sử dụng và trồng rau sạch, tuy nhiên lượng bùn này cần phải được giảm độ mặn trước khi sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình ủ.

2.4. Mô tả mô hình nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh

Hình thức nuôi hoàn toàn bằng thức ăn bên ngoài, thả giống với mật độ cao (tôm sú ≥20 PL/m^2; tôm thẻ chân trắng ≥60 PL/m^2), giúp chủ động trong quản lý hệ thống nuôi (thay nước, sục khí...) [9].

Nuôi tôm nước lợ siêu thâm canh là nuôi trong ao đất lót bạt nilong hoặc trong hệ thống bể hoàn chỉnh nuôi theo công nghệ biofloc, thả giống nhân tạo giai đoạn 1 với mật độ rất cao 1.000-3.000 con/m^2, giai đoạn 2 thả mật độ nuôi 100-300 con/m^2, năng suất đạt 34-40 tấn/ha/vụ đối với tôm chân trắng, đòi hỏi kỹ thuật cao, có khả năng kiểm soát môi trường và cho ăn tự động bằng thức ăn viên chất lượng cao [10].

2.5. Phương pháp phân tích dòng vật chất

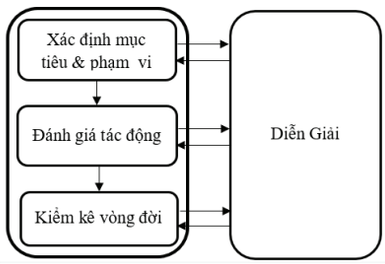
Công thức cân bằng MFA được tính như sau [11]:

$$\sum_{i=1}^{j} \dot{m}_i = \sum_{i=1}^{k} \dot{m}_i + \Delta S$$

trong đó: j là số lượng đầu vào; k là số lượng đầu ra; i là dòng vật chất có trong mô hình ở thứ tự i; $\dot{m}_i$ là dòng vật chất được tính toán; ΔS là sự tích lũy của dòng vật chất.

Dữ liệu có thể chia thành các nhóm chính theo định lượng hoạt động có ảnh hưởng đến phát thải chất ô nhiễm và nồng độ của chất ô nhiễm cụ thể trong môi trường. Cân bằng khối lượng phải được thực hiện đối với mỗi quá trình của hệ thống và với tổng dòng nguyên liệu. Trước khi phần mềm được áp dụng để giải các phương trình cân bằng khối lượng, quy trình MFA cần được thực hiện lặp đi lặp lại, trong đó lưu lượng và nồng độ được điều chỉnh thủ công để làm cho hệ thống nhất quán nhất.

2.6. Phương pháp phân tích đánh giá vòng đời



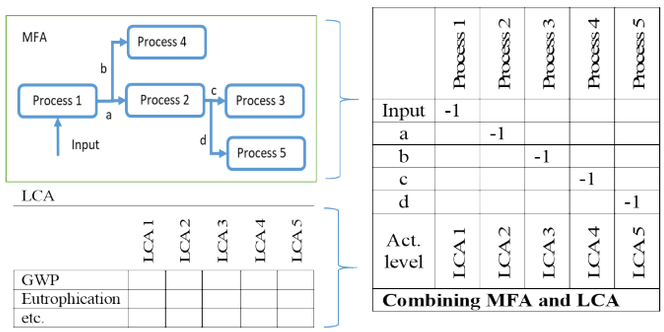
Hình 2. Quy trình đánh giá vòng đời.

Đánh giá vòng đời còn được gọi là phân tích "từ đầu đến cuối", theo dõi tác động môi trường của sản phẩm từ việc tạo ra nguyên liệu thô đến chế tạo, sử dụng sản phẩm và cuối cùng là thải bỏ hoặc tái sử dụng sản phẩm. Quy trình LCA bao gồm việc kiểm kê vòng đời (LCI) của tất cả các yếu tố đầu vào để tạo ra sản phẩm và tất cả các đầu ra hoặc chất thải của quá trình sản xuất, sử dụng và thải bỏ sản phẩm. Quy trình LCA, được mô tả trong mô hình 2, thường bao gồm bốn bước: mục tiêu và phạm vi, kiểm kê vòng đời, đánh giá tác động vòng đời và diễn giải.

Sử dụng công cụ đánh giá vòng đời có thể giúp xác định nhãn sinh thái tốt hơn, đồng thời đảm bảo việc sản xuất và chứng nhận sản phẩm trong tương lai. Một nghiên cứu LCA có thể xử lý tác động môi trường của các đầu vào khác nhau được sử dụng trong hệ thống nuôi tôm và những lựa chọn hiện có để giảm tác động môi trường.

2.7. Mô hình kết hợp phương pháp phân tích dòng vật chất (MFA) và đánh giá vòng đời

Trình tự và phương pháp nghiên cứu được thể hiện như hình 3:



Hình 3. Mô hình kết hợp phương pháp phân tích dòng vật chất và đánh giá vòng đời.

Đầu tiên, mô hình MFA được xây dựng, bước đầu phân tích đầu vào của hệ thống (input), sau đó phân phối đến các quá trình (process) tiếp theo trong quy trình xử lý (dòng a đến dòng d) và các sản phẩm thứ cấp. Tiếp đó, các mô-đun LCA cho toàn bộ quy trình được mô hình hóa và tính toán chỉ số ưu tiên của các tác động (khả năng ấm lên toàn cầu, phú dưỡng hóa và độc sinh thái). Sau đó, MFA được chuyển thành ma trận công nghệ với giải pháp - quy trình - chất thải/sản phẩm, tất cả các hệ số chuyển giao của các quy trình (số dương) và các quy trình hấp thụ các luồng ("-1" trong ma trận). Nhân đầu vào của mỗi quá trình (process) với hệ số chuyển đổi tương ứng để thu được chỉ số đánh giá hoạt động của toàn bộ quy trình. Các tác động môi trường đối với dòng chảy riêng lẻ và hệ thống tổng thể có thể được tính toán bằng cách nhân các mức hoạt động với các mô-đun LCA. Sự thay thế đạt được thông qua tái chế cũng được tích hợp trong cấu trúc quy trình nuôi và được mô hình hóa bằng cách sử dụng phương pháp tiếp cận tải trọng dinh dưỡng.

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Excel 2021 được sử dụng để tổng hợp và xử lý các số liệu điều tra và phân tích chất lượng mẫu nước và bùn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chất lượng nước thải của các ao nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh

Kết quả điều tra ghi nhận chất lượng nước thải từ 20 hộ nuôi tôm theo hình thức nuôi thâm canh và siêu thâm canh tại tỉnh Cà Mau cho thấy, hiện trạng ô nhiễm môi trường do hoạt động nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh nói riêng ở tỉnh Cà Mau có xu hướng bị ô nhiễm bởi các thành phần chất hữu cơ được thể hiện qua các thông số: BOD_5, COD, DO, $N\text{-}NO_2$, $N\text{-}NH_4^+$, $P\text{-}PO_4^{3-}$, tổng coliform. Kết quả cho thấy, các thông số này có khuynh hướng tiệm cận với ngưỡng trên theo QCVN 43:2017/BTNMT [12].

Bảng 1. Thông số chất lượng nước thải nuôi tôm.

STT	Chỉ số	Đơn vị	Nước thải nuôi tôm thâm canh (n=20)	Nước thải nuôi tôm siêu thâm canh (n=20)	QCVN 43:2017/ BTNMT [12]
1	pH	-	7,1-8,3	7,4-8,5	5,5-9
2	BOD_5	mg/l	34±7	26±5	50
3	COD	mg/l	38±3	41±12	150
4	TSS	mg/l	40±5	64±12,7	100
5	Amoni (NH_4^+ tính theo N)	mg/l	0,55±0,11	0,6±0,33	10
6	Tổng coliform	MPN/100 ml	$2,5x10^3$-$3x10^3$	$2,6x10^3$	≤5.000

BOD_5: nhu cầu oxy sinh hoá; COD: nhu cầu oxy hoá học; TSS: tổng chất rắn lơ lửng.

Kết quả bảng 1 cho thấy, nước thải nuôi tôm có thể tác động đến môi trường khi thải ra sông rạch. Hoạt động nuôi tôm siêu thâm canh được kiểm soát tốt hơn hoạt động nuôi tôm thâm canh, do đó, chất lượng nước thải nuôi tôm siêu thâm canh không tăng cao so với QCVN 43:2017/BTNMT [12]. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của V.Q. Lam và cs (2020) [13] tại nước sông các khu vực nuôi trồng thủy sản (bao gồm cả nuôi tôm) thành phố Hội An (trước sáp nhập), BOD_5 dao động từ 2,1 đến 9,7 mg/l, cao hơn QCVN 43:2017/BTNMT [12], TSS cũng vượt giới hạn cho phép, trong khi COD vượt giới hạn cho phép từ 1,07 đến 1,4 lần [12].

Kết quả trên tương đồng với kết quả phân tích chất lượng nước thải của ao nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh tại các huyện trên địa bàn tỉnh Bạc Liêu do H.T.H. Vy (2020) [14] thực hiện. Kết quả cho thấy, không có sự chênh lệch nhiều giữa giá trị pH của nước thải nuôi tôm thâm canh và siêu thâm canh. Riêng nồng độ BOD_5 trong nước thải nuôi tôm thâm canh cao hơn nước thải nuôi tôm siêu thâm canh khoảng 1,5 lần và đều vượt xa giới hạn cho phép. Các giá trị pH này đều nằm trong khoảng cho phép so với TCVN 13656:2023 [9] và là các giá trị pH thích hợp để nuôi tôm thẻ chân trắng (pH 7,5-8,5). Theo kết quả điều tra của nghiên cứu này, hiện nay tỉnh Cà Mau còn có đến 20 hộ trên địa bàn tỉnh chưa có biện pháp thu gom, xử lý nước thải nên nguy cơ gây ra ô nhiễm môi trường trong hệ thống kênh, rạch, sông ngòi là rất cao.

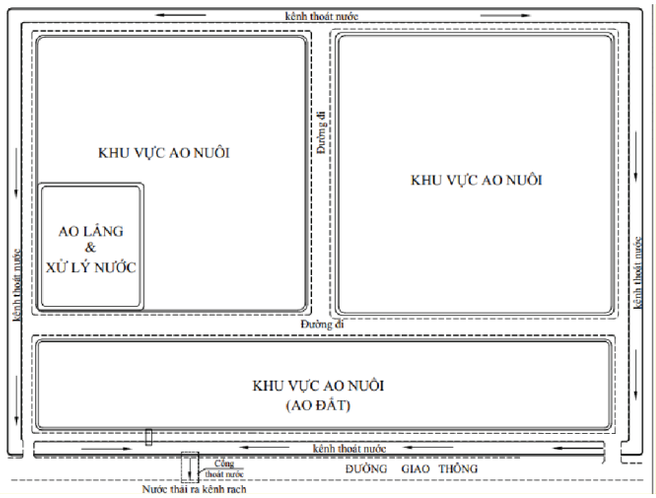
3.2. Đề xuất mô hình thí điểm và áp dụng khung lựa chọn giải pháp xử lý

Đề xuất mô hình thí điểm điển hình tại hộ Mạch Đồng Khởi, xã Tạ An Khương Nam, huyện Đầm Dơi, tỉnh Cà Mau với quy mô 2,5 ha, có các công trình được bố trí như hình 4.



Hình 4. Hệ thống thoát nước ao nuôi tôm tại khu vực nghiên cứu.

Sơ đồ bố trí mặt bằng của hộ nuôi tôm điển hình được thể hiện trong hình 5:



Hình 5. Sơ đồ bố trí mặt bằng tổng thể của hộ nuôi tôm điển hình.

Bước 1: Xác định thông số kỹ thuật của ao nuôi tôm: Các thông số sẵn có của ao nuôi tôm được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Thông số kỹ thuật cao của ao nuôi tôm hộ dân.

STT	Thông số nhập liệu	Đơn vị	Số lượng	Ghi chú
1	Nhập diện tích ao	m^2	1.600	
2	Nhập mật độ nuôi	Con/m^2	500	
3	Mật độ ươm	Con/m^2	2.000	
4	Chiều cao mặt nước (H)	m	1,2	[15]
5	Phân bón	kg	3	
6	TCCA 90%	kg	5,88	

TCCA: Trichloroisocyanuric acid.

Bước 2: Cân bằng vật chất: Các hoạt động trong quá trình nuôi tôm theo hướng tuần hoàn vật chất, bao gồm các dòng vật chất đầu vào và đầu ra được tính toán dựa trên kết quả nhập liệu đầu vào (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả cân bằng vật chất hộ nuôi.

Công đoạn	Nguyên liệu vào		Dòng thải	
	Loại	*Số lượng*	*Loại*	*Số lượng*
	Nước (m^3)	2.496		198,8
	Vôi (kg)	24		
Chuẩn bị	Phân bón (kg)	3		
	Hóa chất (kg)	5,88		
	Nước (m^2)	480	Nước thải (m^3)	480
Ươm	Thức ăn (kg)	49,85	Xác tôm (kg)	6,86
	Tôm (kg)	2,4	Bùn thải (kg)	54,10
	Nước (m^3)	2.016	Nước thải (m^3)	2.016
Nuôi và thu hoạch	Thức ăn (kg)	1234,5	Chất thải hữu cơ (kg)	944,79
	Tôm (kg)	137,14	Xác tôm (kg)	2750

Quá trình cân bằng vật chất cho thấy, thức ăn cho tôm là nguồn dinh dưỡng duy nhất được đưa vào hệ thống và nguồn nước nuôi tôm nên có tác động trực tiếp đến chất lượng của nguồn nước nuôi tôm. Vì thức ăn cho mô hình nuôi tôm công nghệ cao đã được định lượng tốt nên các chất dinh dưỡng, chất rắn và chất thải carbon trong mô hình nuôi tôm siêu thâm canh có thể được tính toán dựa trên nguồn thức ăn đưa vào. Ở giai đoạn tôm ươm, lượng thức ăn tương đối thấp (49,85 kg) nhưng đến giai đoạn nuôi và thu hoạch, lượng thức ăn này có thể lên đến 1.234,5 kg. Việc tối ưu hóa thiết kế hệ thống có thể nâng cao tính sẵn có của chất dinh dưỡng và carbon cũng như tăng năng suất và sản lượng dự kiến. Quá trình nuôi sẽ phát sinh ra các loại chất thải như: nước thải ao nuôi; chất thải rắn (xác tôm chết, vỏ, phân tôm, thức ăn thừa); bùn đáy ao.

Bước 3: Lựa chọn giải pháp dựa trên khối lượng chất thải phát sinh: Xác định hiệu quả xử lý của các giải pháp (bảng 4).

Bảng 4. Hiệu quả của các giải pháp xử lý.

Cụm giải pháp	Tên giải pháp	Hiệu suất xử lý (%)	Giới hạn hoặc N, P đầu vào có thể xử lý	
			Tổng N (mg/l)	*Tổng P (mg/l)*
	Chất thải rắn nuôi tôm làm phân bón cho Caulerpa đậu lăng	48,0	112	32
	Xử lý bùn trong các lò phản ứng kỵ khí ngược dòng (UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket)	70	83,8	30,8
GP3 (Bùn thải sau siphon)	Tăng cường quá trình phân hủy kỵ khí để xử lý bùn	75	132	16
	Quản lý bùn trong ao nuôi tôm	67	2560	1480
	Xử lý nước thải bằng hồ nuôi cá đuối kết hợp với bãi lọc đứng nhân tạo	38	1,4	1,1
	Ứng dụng công nghệ biofloc	89	14	7
GP4 (giải pháp khác) năng lượng	Giải pháp thay thế điện mặt trời và gió cho cung cấp năng lượng tái tạo	51	-	-
	Thiết kế hệ thống máy bơm nước DC chạy bằng năng lượng mặt trời (SWPS - Solar Water Pumping Systems)	63,7	-	-
	Giải pháp phát thải carbon xanh	70	67	18

Bảng 4 phân loại các nhóm giải pháp xử lý chất thải nuôi tôm, trong đó có các giải pháp cụ thể được tính theo giới hạn hoặc N, P đầu vào có thể xử lý. Đây là một trong những tiêu chí đánh giá, giúp lựa chọn những giải pháp phù hợp trong quá trình triển khai các giải pháp xử lý chất thải trong mô hình nuôi tôm đạt hiệu quả tốt hơn.

Đánh giá tác động vòng đời (LCIA - Life cycle impact assessment) mô tả các tác động môi trường dựa trên kết quả kiểm kê vòng đời (LCI). Các loại tác động môi trường sau đây đã được xem xét: sử dụng tài nguyên sinh học (BRU, năng suất sơ cấp ròng được đo bằng carbon), sử dụng năng lượng tích lũy (CEU), nóng lên toàn cầu (GW), axit hóa (Acd) và phú dưỡng (Eut) (bảng 5).

Bảng 5. Đánh giá tác động vòng đời của 1 tấn tôm trọng lượng sống.

LCIA/LCA	Axit hoá (kg SO_2 eq)	Phú dưỡng (kg PO_4 eq)	Nóng lên toàn cầu (kg CO_2 eq)	Năng lượng tích luỹ (GJ)	Năng suất sơ cấp ròng (tấn)
Sản xuất giống	1,15	0,23	188	2,72	0
Cơ sở hạ tầng khu nuôi	0,25	0,02	64,5	2,66	0
Sản xuất thức ăn	15,8	6,3	210	28,3	60.700
Sử dụng điện	25,2	1,04	2,450	23,2	0
Clo	0,24	0,02	48,4	0,94	0
Đá vôi ($CaCO_3$)	0,03	0,004	5,41	0,12	0
Vôi nung (CaO)	0,55	0,03	270	1,32	0
Nước thải khu nuôi	0	55,3	0	0	0
Vận chuyển con giống	0,21	0,03	56,4	1,02	0
Vận chuyển thức ăn	0,42	0,07	59,5	0,87	0
Vận chuyển khác	0,17	0,03	24,5	0,36	0
Tổng (±SD)	43,9±4,2	63±11	5280±510	61,5±6,1	60.700±390

Tính trung bình các hệ thống nuôi thâm canh (15%) và bán thâm canh (85%), sản lượng 1 tấn tôm sống cần 61,5±6,1 GJ năng lượng, cũng như 60.700±390 tấn năng suất sơ cấp ròng và tạo ra 43,9±4,2 kg SO_2 tương đương, 63±11 kg PO_4 tương đương và 5280±510 tấn CO_2 tương đương.

Hệ số phát thải cho thấy mức độ tài nguyên và năng lượng cần thiết để sản xuất một tấn tôm sống (bảng 6).

Bảng 6. Các tác động vòng đời đến môi trường sống của các hộ dân.

LCIA/LCA	Acd (kg SO_2 eq)	Eut (kg PO_4 eq)	GW (kg CO_2 eq)	CEU (GJ)	BRU (kg C)
Hệ số phát thải	43,9	63	5.280	61,5	60.700
Phát thải hộ dân	219,5	315	24.600	307,5	303.500

BRU: tài nguyên sinh học; CEU: sử dụng năng lượng tích lũy, GW: nóng lên toàn cầu; Acd: axit hóa; Eut: phú dưỡng (Eut).

Sau khi thực hiện LCIA, chỉ số nóng lên toàn cầu (GW) của phát thải hộ dân đạt 24.600 kg CO_2 eq, lượng axit hóa đạt 219,5 kg SO_2 eq, phú dưỡng đạt 315 kg PO_4 eq, sử dụng năng lượng tích lũy CEU=307,5 GJ và năng suất sơ cấp ròng BRU đạt 303.500 kg C.

Hệ số phát thải của hộ dân có mức hệ số cao cho thấy, quy trình sản xuất không hiệu quả và cần được cải tiến. Trung bình một hệ thống nuôi tôm thâm canh khi sản xuất được 1 tấn tôm sẽ cần tiêu hao năng lượng khoảng 38,3±4,3 GJ, tạo ra 23,1±2,6 kg SO_2eq, 36,9±4,3 kg PO_4eq và 3,1±0,4 tấn CO_2eq [12]. Hệ số phát thải khí CO_2, SO_2, và PO_4 cũng là những yếu tố quan trọng cần được theo dõi.

Chất lượng nước thải từ ao xử lý nước thải trước khi thải ra môi trường bên ngoài được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Chất lượng nước thải sau khi được xử lý.

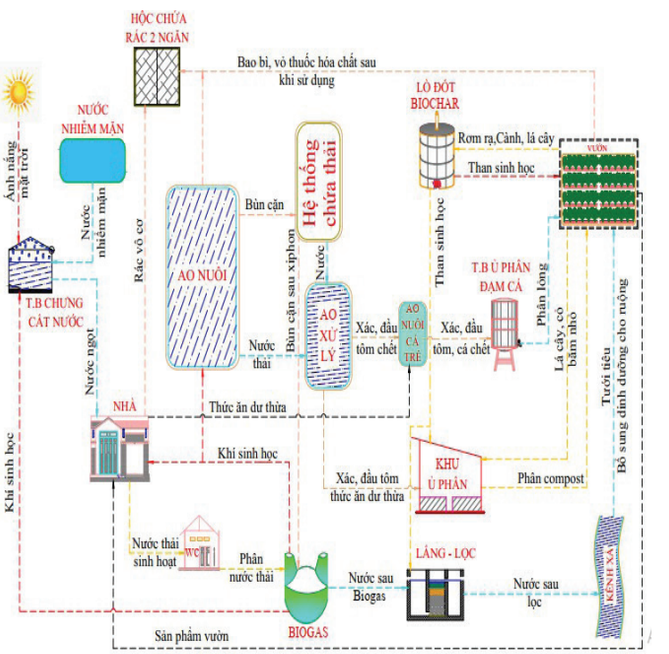
STT	Thông số phân tích	Đơn vị	Kết quả	LOD	QCVN 43:2017/BTNMT [12]
1	pH	-	6,71	1-14	5,5-9
2	COD	mg/l	142	2	150
3	BOD_5	mg/l	3,4	0,5	50
4	TSS	mg/l	16	2	100
5	Tổng coliform	CFU/100 ml	$4,3.10^3$	1	5.000

LOD: giới hạn phát hiện; BOD_5: nhu cầu oxy sinh hoá; COD: nhu cầu oxy hoá học; TSS: tổng chất rắn lơ lửng.

Kết quả phân tích so sánh với QCVN 43:2017/BTNMT [12] cho thấy, đa số các thông số ô nhiễm trong nước thải ao nuôi ở mô hình đều đạt quy chuẩn cho phép.

Bước 4: Xây dựng mô hình nuôi tôm siêu thâm canh xử lý tuần hoàn nước và vật chất dinh dưỡng.

Hình 6 là mô hình sinh kế sinh thái tích hợp cho hộ dân cư nông thôn vùng mặn được thực hiện cho đối tượng có sinh kế chính là nuôi tôm siêu thâm canh. Trong quá trình nuôi tôm siêu thâm canh thì chất thải phát sinh chủ yếu là nước thải, bùn thải sau quá trình siphon và đầu (vỏ) tôm chết cùng một số loại chất thải sinh hoạt khác. Các loại chất thải này được xử lý theo định hướng tuần hoàn dòng vật chất và năng lượng thông qua các giải pháp



Hình 6. Đề xuất mô hình nuôi tôm siêu thâm canh.

được tích hợp vào mô hình. Bùn thải sau quá trình siphon được đưa vào biogas, thông qua quá trình phân hủy kỵ khí thu hồi được khí sinh học, lượng khí sinh học này được sử dụng cho mục đích sinh hoạt của hộ gia đình thay thế nhiên liệu nấu nướng. Nước thải từ quá trình nuôi tôm chứa các chất ô nhiễm được đưa ra ao xử lý. Tại đây, các chế phẩm vi sinh được bổ sung vào ao giúp đẩy nhanh quá trình phân hủy các chất hữu cơ có trong nước. Bên cạnh đó, thực vật thủy sinh bản địa cũng được trồng trong ao giúp cải thiện chất lượng nước trước khi thải ra kênh tiếp nhận. Đầu (vỏ) tôm được định hướng làm nguyên liệu cho quá trình ủ phân hữu cơ, đầu (vỏ) tôm chết chứa một lượng dinh dưỡng phù hợp sản xuất phân bón cải tạo đất tại khu vực. Thiết bị chưng cất nước ngọt cũng được sử dụng cho khu vực để tận dụng lượng nhiệt từ mặt trời nhằm thu hồi nước ngọt phục vụ cho sinh hoạt cơ bản của hộ dân. Một giải pháp nữa được thiết kế để thu hồi sinh khối thực vật của địa phương là sản xuất than sinh học quy mô hộ gia đình. Các loài thực vật này chủ yếu là thực vật khu vực vùng mặn, than sinh học này thường được phối trộn cùng với phân hữu cơ (đầu, vỏ tôm chết) để cải tạo đất của khu vực, giúp hộ dân có thể trồng được các loại rau ăn lá cho gia đình.

4. Kết luận

Nghiên cứu đánh giá và dự báo diễn biến chất lượng và tác động môi trường, các giải pháp ngăn ngừa và xử lý ô nhiễm nước thải tại một số ao nuôi tôm tập trung. Dựa trên kết quả phân tích, khung hỗ trợ có thể đề xuất các hướng đi và biện pháp cụ thể để cải thiện quản lý và xử lý chất thải trong ao nuôi tôm siêu thâm canh.

Kết quả phát thải hộ dân sau khi thực hiện LCIA cho thấy, lượng phát thải khí nhà kính đạt 24.600 $kgCO_2$ eq, lượng axit hóa đạt 219,5 $kgSO_2$ eq, phú dưỡng đạt 315 $kgPO_4$ eq, sử dụng năng lượng tích lũy CEU=307,5 GJ và năng suất sơ cấp ròng BRU đạt 303.500 kg C. Hệ số phát thải của hộ dân cao, điều đó chỉ ra rằng, quy trình sản xuất không hiệu quả và cần được cải tiến. Hệ số phát thải khí CO_2, SO_2, và PO_4 cũng là những yếu tố quan trọng cần được theo dõi. Bản thân giai đoạn nuôi dưỡng là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng phú dưỡng, chiếm đất và phụ thuộc vào nước. Tuy nhiên, thức ăn là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng axit hóa và sử dụng ròng trong sản xuất sơ cấp trong tất cả các hệ thống. Năng suất và tỷ lệ trao đổi nguồn cấp dữ liệu là xác định hệ thống hiệu quả nhất theo quan điểm bảo vệ môi trường.

Khung hỗ trợ cung cấp cho các nhà quản lý và người nuôi tôm một công cụ hữu ích để lựa chọn và triển khai các giải pháp xử lý chất thải tối ưu. Các loại dòng thải có thể được tận dụng làm nguồn cung cấp đầu vào cho các quy trình khác nhau trong hệ thống: bùn thải có thể tận dụng để sản xuất khí sinh học bằng phương pháp biogas, bùn lắng sau biogas sau thời gian thu hồi khí sinh học có thể làm nguyên liệu hữu cơ ủ phân compost... Hệ thống này có thể hỗ trợ đắc lực trong việc đạt được các mục tiêu kinh tế, môi trường và bền vững.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài "Nghiên cứu đề xuất mô hình sinh kế bền vững theo định hướng kinh tế tuần hoàn nhằm thích ứng với các điều kiện tự nhiên bất lợi (mặn, phèn, biến đổi khí hậu) cho người dân nông thôn trên địa bàn tỉnh Cà Mau" (mã số 02/HĐ-SKHCN) do Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Cà Mau quản lý. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.P. Kam, M.C. Badjeck, L. Teh, et al. (2012), *Autonomous Adaptation to Climate Change by Shrimp and Catfish Farmers in Vietnam's Mekong River Delta*, World Fish, 24pp.

[2] T.P.M. Le, V.N. Duong, N.H. Tran, et al. (2016), "Evaluation of impacts and solutions to deal with the climate change in the improved extensive culture system in the Mekong delta", *CTU Journal of Science*, **42**, pp.28-39 (in Vietnamese).

[3] T.N.A. Nguyen, H.V. Nguyen, M.L. Lam, et al. (2019), "Effects of different feeding rates on water quality, growth and feed efficiency of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) co-cultured with red seaweed (*Gracilaria tenuistipitata*), *CTU Journal of Science*, **55(3)**, pp.111-122 (in Vietnamese).

[4] C. Jackson, N. Preston, P.J. Thompson, et al. (2003), "Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm", *Aquaculture*, **218(1-4)**, pp.397-411, DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00014-0.

[5] C.I.M. Martins, E.H. Eding, M.C.J Verdegem, et al. (2010), "New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability", *Aquacultural Engineering*, **43(3)**, pp.83-93, DOI: 10.1016/j.aquaeng.2010.09.002.

[6] G. Suantika, M.L. Situmorang, A. Nurfathurahmi, et al. (2018), "Application of indoor recirculation aquaculture system for white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grow out super-intensive culture at low salinity conditions", *Journal of Aquaculture Research and Development*, **9(4)**, 6pp, DOI: 10.4172/2155-9546.1000530.

[7] S.Z. Kamal, M. Koyama, F. Syukri, et al. (2022), "Effect of enzymatic pre-treatment on thermophilic composting of shrimp pond sludge to improve ammonia recovery", *Environmental Research*, **204**, 30pp, DOI: 10.1016/j.envres.2021.112299.

[8] P. Kiddee, R. Naidu, M.H. Wong (2013), "Electronic waste management approaches: An overview", *Waste Management*, **33(5)**, pp.1237-1250, DOI: 10.1016/j.wasman.2013.01.006.

[9] Ministry of Science and Technology (2023), *TCVN 13656:2023 on Water for Aquaculture - Water Quality for Intensive Culture of Black Tiger Shrimp, White Leg Shrimp* (in Vietnamese).

[10] A.X. Le (2017), *TCKT 03-01:2017/BNNPTNT (Issued Under Decision No. 502/QĐ-TCTSKHCN & HTQT On 3 May 2017), by The Director General of The Directorate of Fisheries, Outlines The Technical Process for Super-Intensive Two-Stage White-Leg Shrimp (Litopenaeus Vannamei) Farming with Minimal Water Exchange Using Truc Anh Technology*, 12pp (in Vietnamese).

[11] D. Laner, H. Rechberger (2016), "Special types of life cycle assessment", *Material Flow Analysis,* Springer Nature, pp.293-332.

[12] Ministry of Natural Resources and Environment (2017), *QCVN 43:2017/BTNMT on National Technical Regulation on Sediment Quality,* 7pp (in Vietnamese).

[13] V.Q. Lam, T.T. Chat (2020), "Warning of organic pollution in shrimp farming areas in Hoian city", *Dalat University Journal of Science,* **42**, pp.65-75.

[14] H.T.H. Vy (2020), *Research on The Effective Treatment of Wastewater from Intensive and Super-Intensive Shrimp Farming at The Household Scale Towards Waste Reuse in Bac Lieu Province*, Master's Thesis, Institute for Environment and Natural Resources (in Vietnamese).

[15] The Directorate of Fisheries (2014), *QCVN 02-19:2014/BNNPTNT on National Technical Regulation on Brackish Water Shrimp Culture Farm - Conditions for Veterinary Hygiene, Environmental Protection and Food Safety,* 10pp (in Vietnamese).

 DOI: 10.31276/VJST.68(1).76-80

Ảnh hưởng của tuổi và mùa vụ đến testosterone của cừu Phan Rang nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Chăn nuôi gia súc lớn

Nguyễn Thị Thu Hiền*

Viện Công nghệ xanh và bền vững, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ơn, phường Phú Lợi, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/3/2024; ngày chuyển phản biện 9/3/2024; ngày nhận phản biện 14/4/2024; ngày chấp nhận đăng 20/4/2024

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này là theo dõi nồng độ testosterone của cừu Phan Rang đực theo mùa và theo độ tuổi. Nghiên cứu được thực hiện trên 20 con cừu Phan Rang đực được cai sữa lúc 2 tháng tuổi và 30 cừu đực trưởng thành (10 con 2 tuổi, 10 con 3 tuổi và 10 con 4 tuổi ở thời điểm bắt đầu theo dõi). Máu được lấy ở tĩnh mạch cổ mỗi tháng một lần, huyết thanh được thu nhận và xác định nồng độ testosterone bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang, với hệ thống máy miễn dịch Cobas E601. Kết quả đã xác định được nồng độ testosterone huyết thanh ở cừu dưới 12 tháng trung bình dao động từ 0,53 đến 11,50 ng/ml và tăng dần theo tháng tuổi, có độ ổn định từ tháng tuổi thứ 9. Nồng độ hormone testosterone của cừu Phan Rang đực thay đổi rõ rệt theo mùa, mùa mưa cao hơn mùa khô. Nồng độ testosterone huyết tương thấp nhất là 4,12±0,73 ng/ml (ở cừu 4 tuổi, vào tháng 2) và cao nhất 12,25±2,27 ng/ml (ở cừu 2 tuổi, vào tháng 11). Những phát hiện của nghiên cứu này góp phần hướng tới việc khai thác và hỗ trợ sinh sản ở cừu Phan Rang hợp lý.

Từ khóa: **cừu Phan Rang, điện hoá phát quang, mùa, sinh sản, testosterone.**

Chỉ số phân loại: **4.2, 4.6**

Effects of age and season on testosterone of Phan Rang sheep raised at the Ruminant Research and Development Centre

Thi Thu Hien Nguyen*

Institute of Green and Sustainable Technology, Thu Dau Mot University, 6 Tran Van On Street, Phu Loi Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 7 March 2024; revised 14 April 2024; accepted 20 April 2024

Abstract:

The purpose of this study was to monitor serum testosterone concentrations in male Phan Rang sheep according to season and age. The study was conducted on 20 male Phan Rang sheep weaned at two months of age and 30 adult male sheep (10 two-year-old sheep, 10 three-year-old sheep and 10 four-year-old sheep at the beginning of the monitoring period). Blood samples were taken from the jugular vein once a month, serum was collected, and testosterone concentrations were determined by electrochemiluminescence using the Cobas E601 immunoassay system. The results showed that the average serum testosterone concentration in sheep under 12 months ranged from 0.53 to 11.50 ng/ml and gradually increased with each month of age, with stability from the ninth month of age. Serum testosterone concentrations in male Phan Rang sheep varied significantly with season, with higher levels observed during the rainy season than during the dry season. The lowest plasma testosterone concentration was 4.12±0.73 ng/ml (in four-year-old sheep, in February), while the highest was 12.25±2.27 ng/ml (in two-year-old sheep, in November). The findings of this study contribute to the rational utilisation and reproductive support of Phan Rang sheep.

Keywords: **electrochemiluminescence, Phan Rang sheep, reproduction, season, testosterone.**

Classification numbers: **4.2, 4.6**

Email: hienntt@tdmu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Testosterone là androgen có vai trò chính trong việc biểu hiện các đặc điểm hình thái và hành vi tính dục khác nhau ở động vật có vú, được coi là chất chiếm ưu thế trong việc thể hiện hành vi và duy trì ham muốn tính dục ở giống đực [1]. Do đó, sự biến đổi mức testosterone ở từng giống vật nuôi cần được hiểu đầy đủ, không chỉ quan trọng từ khía cạnh lựa chọn con đực chất lượng mà còn để xác định tỷ lệ đực và cái tốt nhất để giao phối trong chăn nuôi đàn gia súc, chọn mùa vụ thích hợp để ghép đôi hoặc thu nhận tinh dịch hiệu quả.

Mức độ hormone sinh dục bị ảnh hưởng bởi biến đổi khí hậu, có ảnh hưởng lớn đến chuỗi sự kiện sinh lý liên quan đến chu kỳ tính dục [2]. Testosterone là hormone chịu trách nhiệm cho sự sinh tinh và hành vi tính dục đực, do đó kiểu tiết testosterone theo mùa có thể hạn chế hiệu quả sinh sản của gia súc đực trong một số khoảng thời gian trong năm [1]. Mức testosterone có mối tương quan tích cực và đáng kể với khả năng vận động và khả năng di chuyển tiến triển của tinh trùng [3].

Cừu là loại gia súc sớm thành thục về sinh dục, 5 tháng tuổi đã có biểu hiện phối giống và thường được sử dụng phối giống lúc 10 tháng tuổi [4]. Cừu đực biểu hiện sự biến động theo mùa trong hành vi tính dục, hoạt động nội tiết, tạo giao tử cũng như khối lượng tinh hoàn và lượng tinh trùng. Ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, cừu bản địa bị hạn chế hoạt động tính dục trong những tháng mùa hè [5]. Nhiệt độ môi trường cao gây suy giảm chức năng sinh sản ở cừu. Hiệu ứng nhiệt trầm trọng hơn khi stress nhiệt đi kèm với độ ẩm môi trường cao. Động dục ở cừu chủ yếu đặc trưng theo mùa, điều này là liên quan đến nhiều yếu tố di truyền và điều kiện bên ngoài [2]. Thời gian chiếu sáng hàng ngày và các chu kỳ nhiệt độ môi trường là những yếu tố ảnh hưởng nổi bật nhất trong khu vực cận nhiệt đới. Trong khi đó, chu kỳ về lượng mưa và nhiệt độ là các biến quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của cừu ở khu vực nhiệt đới, hoạt động sinh dục của cừu cao vào cuối mùa hè và mùa thu, thấp vào cuối mùa đông và mùa xuân [5].

Cừu Phan Rang là giống cừu bản địa có số lượng lớn nhất trong tổng số đàn cừu của nước ta. Chăn nuôi cừu tập trung chủ yếu ở Nam Trung Bộ [4]. Theo T.V. Ngo (2014) [4], mùa vụ có ảnh hưởng đến sinh sản ở cừu qua các chỉ tiêu số con sơ sinh, số con đực sơ sinh, số con cái sơ sinh, tỷ lệ cai sữa, khối lượng sơ sinh, khối lượng cai sữa, thời gian động dục lại, khoảng cách lứa đẻ và số lứa/năm. Cừu đẻ vụ thu đông có số con sơ sinh cao hơn số con sơ sinh của cừu đẻ vụ hè thu (1,3 so với 1,1 con). Tương tự, số con cái sơ sinh của cừu đẻ vụ thu đông cũng cao hơn số con cái sơ sinh của cừu đẻ vụ hè thu.

Việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học của các giống vật nuôi bản địa, trong đó có các thông số về các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá máu cũng như hormone sinh sản là cần thiết trong chăm sóc sức khoẻ và quản lý sinh sản đàn vật nuôi có hiệu quả. Ở Việt Nam, gần đây đã có một số nghiên cứu về hormone sinh sản của gia súc bản địa. Hàm lượng estradiol, progesterone của dê Bách Thảo và dê Boer trong giai đoạn mang thai và theo chu kỳ động dục [6, 7], sự thay đổi testosterone theo mùa của dê Bách Thảo [8] đã được công bố. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, ở dê Bách Thảo, một giống dê bản địa của Việt Nam có mức độ testosterone trong huyết tương thay đổi qua các tháng trong năm, có tính thời vụ rõ ràng, với hàm lượng testosterone cao vào mùa mưa và thấp hơn vào mùa khô [8]. Ở cừu Phan Rang, các nghiên cứu đã công bố có liên quan đến đặc điểm sinh học, các chỉ tiêu sinh sản của cừu cái [9], ảnh hưởng của mùa vụ đến các chỉ tiêu sinh sản của cừu cái [4]. Gần đây, các đánh giá về ảnh hưởng của thức ăn ủ chua lên các chỉ tiêu sinh trưởng, sinh lý máu của cừu Phan Rang được thực hiện [10, 11]. Tuy nhiên, sự biến động hormone sinh sản của giống cừu này trong điều kiện nuôi vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Do đó, nghiên cứu này nhằm đánh giá hàm lượng testosterone huyết tương bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang (ECLIA) ở giống cừu Phan Rang theo độ tuổi và theo mùa vụ, làm tham chiếu trong các nghiên cứu và có ý nghĩa trong việc quản lý sinh sản và phối giống được hiệu quả hơn.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển chăn nuôi gia súc lớn, phường Bến Cát, TP. Hồ Chí Minh.

Đặc điểm khí hậu khu vực nghiên cứu: Tỉnh có khí hậu nhiệt đới gió mùa ổn định, nắng nóng và mưa nhiều, độ ẩm khá cao, trong năm phân chia thành hai mùa rõ rệt: Mùa mưa thường bắt đầu từ tháng 5 kéo dài đến tháng 12 dương lịch, mùa khô từ tháng 11 năm trước đến tháng 6 năm sau. Nhiệt độ trung bình hàng năm 26-27^{o}C, độ ẩm trung bình 76-80%, cao nhất là 86% (vào tháng 9) và thấp nhất là 66% (vào tháng 2), lượng mưa trung bình 1.800-2.000 mm.

Nghiên cứu được tiến hành trong giai đoạn tháng 1/2020 đến tháng 8/2023.

2.2. Động vật thí nghiệm

Theo dõi testosterone theo độ tuổi: 20 con cừu Phan Rang đực được cai sữa lúc 2 tháng tuổi, động vật được đưa vào nghiên cứu và thử nghiệm được hoàn thành khi cừu được 12 tháng tuổi.

Theo dõi ảnh hưởng của mùa vụ lên hàm lượng testosterone của cừu đực trưởng thành: nghiên cứu được tiến hành trên 30 cừu trưởng thành (10 con 2 tuổi, 10 con 3 tuổi và 10 con 4 tuổi ở thời điểm bắt đầu theo dõi).

Tất cả cừu được chọn đều khoẻ mạnh dựa trên theo dõi lâm sàng, lịch sử cá thể đã biết, mỗi cá thể được xác định bằng số thẻ tai. Nghiên cứu thực hiện đảm bảo các yêu cầu được nêu trong quy định quốc tế và quốc gia về phúc lợi động vật.

2.3. Thức ăn, nước uống, vệ sinh chuồng trại

Cừu được nuôi bán thâm canh, nuôi chung cừu đực với cừu cái trong một chuồng lớn, mật độ 2 m^2/con. Cừu được bố trí vào các chuồng riêng theo từng lứa tuổi được nghiên cứu trong thời gian theo dõi. Chuồng thiết kế kiểu nhà sàn, sàn gỗ cách nền ximăng 1 m, mặt sàn có các khe hở để phân rơi xuống đất, mái che bằng tôn ximăng. Đàn cừu được chăn thả vào ban ngày và cho ăn một ngày 2 lần, gồm 1 bữa sáng (6-8 giờ) và 1 bữa chiều (5-6 giờ), gồm cám tổng hợp (De Heus, 0,5-0,8 kg cám/con ngày), lá cây, cỏ voi xanh và rơm khô (ăn tự do theo nhu cầu). Mỗi ô chuồng có máng thức ăn thô, máng thức ăn tinh và máng nước uống, được dọn sạch và thay mới hằng ngày.

Hai tuần sát trùng chuồng trại 1 lần bằng dung dịch Bestaquam-SR pha với nước máy theo tỉ lệ 1/400. Việc tiêm phòng, tẩy giun cho đàn cừu được thực hiện theo lịch trình của trung tâm.

2.4. Quy trình thu và xử lý mẫu

Thu mẫu: Cừu được lấy mẫu máu vào 8 giờ sáng, mỗi tháng 1 lần vào ngày 10-15 hàng tháng, liên tục trong 12 tháng. Lấy 2 ml máu tĩnh mạch cổ, cho vào ống chống đông (EDTA-K_2), lắc nhẹ, bảo quản và chuyển đến phòng thí nghiệm (trong vòng 2 giờ), tiến hành ly tâm. Mẫu được ly tâm trong 15 phút, 1.000 vòng/phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, thu 1 ml huyết tương chiết vào lọ eppendorf 1,5 ml bảo quản mẫu ở nhiệt độ 2-8°C (1 tuần) hoặc -20°C (6 tháng), chỉ đông lạnh 1 lần. Quy trình xử lý mẫu theo hướng dẫn của Roche Diagnostics: Package insert Testosterone.

Xét nghiệm: Mẫu huyết thanh được rã đông một lần ở nhiệt độ phòng (20-25°C), mẫu được phân tích trong vòng 2 giờ sau rã đông và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm. Lượng testosterone được xác định bằng phương pháp xét nghiệm điện hóa phát quang, với hệ thống máy miễn dịch Cobas E601 (Roche Diagnostics, Thuỵ Sỹ). Quy trình xét nghiệm theo hướng dẫn của bộ KIT testosterone (Roche, Đức).

2.5. Xử lý số liệu

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình (Mean±SD). Hàm lượng hormone cực đại (đỉnh-peak) được xác định là những giá trị lớn hơn trung bình của tất cả các giá trị còn lại từ nhóm nghiên cứu. Phân tích ANOVA và Post hoc test với Tukey-Kramer test để đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm ($p<0,05$). Các tham số thống kê được xử lý bằng phần mềm MS-Excel 2020.

3. Kết quả

3.1. Sự thay đổi testosterone theo độ tuổi

Kết quả về sự thay đổi của testosterone ở cừu Phan Rang đực 2-12 tháng tuổi được trình bày trong bảng 1. Kết quả cho thấy, ở tháng tuổi thứ 4, cừu có hàm lượng testosterone tăng khác biệt (2,12 ng/ml) so với hai tháng tuổi trước đó (0,53-0,86 ng/ml). Tiếp theo, hàm lượng testosterone tăng dần theo các tháng tuổi và có sự khác biệt giữa các tháng từ tháng 4 đến tháng 9 ($p<0,05$), sau đó có độ ổn định ở tháng tuổi thứ 9 đến tháng 12 (10,57-11,50 ng/ml). Điều đáng chú ý là, cân nặng của cừu ở các tháng tuổi 9-12 tháng có sự khác biệt rõ ràng, nhưng hàm lượng testosterone giữa các tháng này sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.2. Sự thay đổi testosterone ở cừu đực trưởng thành theo tháng trong năm

Kết quả về sự thay đổi của hàm lượng testosterone huyết thanh của Cừu Phan Rang ở các tuổi 2, 3 và 4 trong thời gian một năm được trình bày trong bảng 2. Mức độ trung bình của testosterone ở cừu Phan Rang tuổi 2, 3 và 4 qua các tháng của một năm bắt đầu từ tháng 1 đến tháng 12 có xu hướng thấp hơn ở các tháng đầu năm (tháng 1 đến tháng 5), cao hơn ở các tháng giữa và cuối năm (tháng 6 đến tháng 11). Kết quả này cũng được thể hiện tương ứng trong hình 1. Xét về các giá trị này, ở cả ba nhóm tuổi tháng 11 có mức cao nhất (ở các lứa tuổi 2, 3 và 4 lần lượt là: 12,25±2,27, 11,31±2,35 và 9,34±1,56 ng/ml), tháng 2 có mức thấp nhất (ở các lứa tuổi 2, 3 và 4 lần lượt là: 4,71±0,75, 4,67±0,59 và 4,12±0,73 ng/ml), sự chênh lệch so với các tháng khác là có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). So sánh giữa ba nhóm tuổi, giá trị testosterone ở lứa tuổi 4 có xu hướng thấp hơn hai nhóm tuổi còn lại ($p<0,05$), lứa tuổi 2 và 3 hàm lượng testosterone ở hầu hết các tháng sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 1. Hàm lượng testosterone của cừu Phan Rang theo tháng tuổi (n=20).

Tháng tuổi	Khối lượng cơ thể (kg)	Hàm lượng testosterone (ng/ml)		
	Mean±SD	*Mean±SD*	*Min*	*Max*
2	10,03^{a}±0,27	0,53^{a}±0,32	0,22	0,89
3	12,35^{b}±0,32	0,86^{a}±0,65	0,56	1,25
4	14,12^{c}±0,37	2,12^{b}±0,87	1,33	3,41
5	15,61^{d}±0,45	3,55^{c}±1,23	2,11	4,86
6	17,21^{e}±0,67	5,85^{d}±2,02	4,23	7,52
7	19,33^{f}±0,63	8,10^{e}±2,07	5,89	10,16
8	21,75^{g}±0,71	8,21^{f}±2,43	6,03	10,98
9	23,31^{h}±0,65	10,57^{g}±2,45	7,55	12,45
10	25,47^{k}±0,78	11,31^{g}±3,52	7,58	13,26
11	27,21^{l}±0,75	11,35^{g}±3,67	7,64	13,38
12	29,18^{m}±0,62	11,50^{g}±2,21	7,28	13,61

Các giá trị Mean mang chữ cái (a, b, c, d…) khác nhau trong cùng cột có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Min, Max là các giá trị thấp nhất và cao nhất của hàm lượng testosterone ở tất cả các mẫu được phân tích của cừu cùng tháng tuổi.

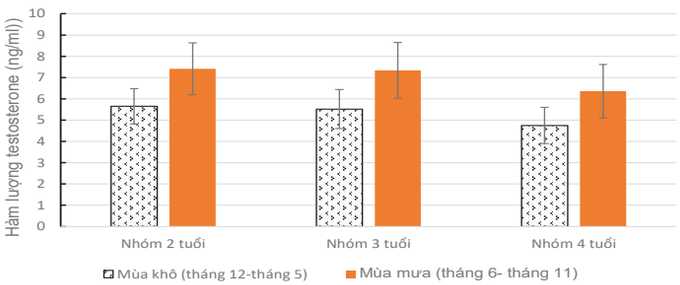
Bảng 2. Hàm lượng testosterone của cừu Phan Rang theo độ tuổi trong 12 tháng (n=30).

Tháng	Hàm lượng testosterone (ng/ml) (Mean±SD)				
	Nhóm 2 tuổi	*Nhóm 3 tuổi*	*Nhóm 4 tuổi*	*Min*	*Max*
1	5,81^{a}±0,63	5,68^{a}±0,65	4,81^{b}±0,46	3,71	8,62
2	4,71±0,75	4,67±0,59	4,12±0,73	3,52	7,94
3	5,52±0,61	5,68±0,68	5,45±0,81	3,75	9,82
4	5,67^{a}±0,82	5,75^{a}±0,72	4,62^{b}±0,68	3,78	8,67
5	5,58^{a}±0,86	6,38^{b}±1,06	5,51^{a}±0,95	4,28	9,03
6	6,83^{a}±1,22	7,36^{b}±1,25	6,58^{a}±0,94	4,45	9,75
7	7,46±1,07	7,66±1,16	7,37±1,33	4,27	10,12
8	8,33±2,03	9,08±2,18	8,14±1,08	5,51	11,07
9	10,72^{a}±2,41	10,62^{a}±2,37	8,96^{b}±2,15	6,75	13,56
10	11,21^{a}±2,32	10,84^{a}±2,29	9,21^{b}±1,76	6,91	12,78
11	12,25^{a}±2,27	11,31^{a}±2,35	9,34^{b}±1,56	6,38	13,88
12	6,53^{a}±1,81	5,82^{a}±1,13	4,86^{b}±1,39	3,84	7,13

Các giá trị Mean mang chữ cái (a, b, c) khác nhau trong cùng hàng có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Min, Max là các giá trị thấp nhất và cao nhất của hàm lượng testosterone ở tất cả các mẫu được phân tích trong cùng tháng thu mẫu.

3.3. Sự thay đổi testosterone ở cừu Phan Rang theo mùa

Hình 1 cho thấy, những phát hiện về sự thay đổi theo mùa của hormone testosterone ở cừu Phan Rang theo 3 nhóm tuổi 2, 3 và 4. Nồng độ hormone testosterone trung bình của cừu Phan Rang vào mùa khô (tháng 12 năm trước đến tháng 5 năm sau) ở các tuổi 2, 3 và 4 lần lượt là (5,65, 5,52, 4,75 ng/ml) và mùa mưa (tháng 6 đến tháng 11) theo ba nhóm tuổi này lần lượt là (7,41, 7,34, 6,36 ng/ml). Cũng có thể thấy từ hình 1 rằng, ở cả 3 nhóm tuổi 2, 3 và 4, nồng độ hormone testosterone của cừu Phan Rang ở mùa mưa cao hơn so với mùa khô, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).



Hình 1. Sự thay đổi của hormone testosterone ở cừu Phan Rang theo mùa.

4. Bàn luận

Cừu Phan Rang đực thành thục sinh dục lúc 160 ngày, tuổi phối giống 2-6 năm tuổi [4]. Trong các nghiên cứu của chúng tôi, xu hướng tăng hàm lượng testosterone ở động vật theo độ tuổi 2-12 tháng, trong đó sự thay đổi giữa các tháng tuổi 4 đến 9 đều có khác biệt thống kê ($p<0,05$). Bảng 2 cho thấy, cừu 4 tuổi có testosterone thấp hơn 2 lứa tuổi còn lại. Theo T.V. Ngo (2014) [4], thời điểm thành thục sinh dục ở cừu đực Phan Rang được báo cáo là từ 4,5 đến 5 tháng tuổi, có biểu hiện sinh dục lúc 5 tháng tuổi, nhưng thường được sử dụng cho giao phối vào thời điểm 10-12 tháng tuổi. Điều quan trọng là những dữ liệu ở bảng 1 được lấy theo độ tuổi và không quan tâm đến mùa vụ, các giá trị được tính trung bình ngẫu nhiên không phụ thuộc vào thời gian nghiên cứu trong năm. Chúng tôi kết luận rằng, hàm lượng testosterone của cừu Phan Rang đạt giá trị cao và ổn định ở tháng tuổi thứ 9 trở đi, do đó, chọn cừu đực ở lứa tuổi này cho phối giống lần đầu là phù hợp.

Mối liên hệ cơ bản giữa môi trường và sinh sản được thiết lập khiến các loài sinh sản trong khoảng thời gian tối ưu nhất trong năm [5]. Ở cừu, hoạt động sinh sản diễn ra theo mùa, với sự khởi đầu của chu kỳ động dục được kích hoạt trong quá trình chuyển sang chu kỳ sáng ngắn ngày và bị ức chế khi độ dài ngày tăng lên [1]. Mặc dù cơ chế chính xác của quá trình sinh sản theo mùa này vẫn chưa được hiểu đầy đủ, nhưng rõ ràng "nhịp điệu" được các tế bào thần kinh phát hiện trong não, sau đó kiểm soát chức năng sinh sản. Những thay đổi trong chu kỳ sáng cung cấp sự thể hiện thời gian tuần hoàn và sự thay đổi độ dài ngày này được tuyến tùng cảm nhận và chuyển thành tín hiệu sinh lý của việc thúc đẩy các tế bào thần kinh vùng dưới đồi giải phóng gonadotropin (GnRH) trong não, kích thích các tuyến sinh dục tuyến yên tổng hợp và tiết ra hormone luteinizing (LH) và LH kích thích tế bào kẽ trong tinh hoàn sản xuất testosterone [2]. Trong mùa không sinh sản, hormone giải phóng gonadotropin (GnRH) và sự bài tiết gonadotropin bị giảm, do đó ảnh hưởng đến sự sản xuất testosterone [1].

Khu vực nghiên cứu có mùa khô kéo dài từ tháng 12 năm trước đến tháng 5 năm sau, mùa mưa từ tháng 6 đến tháng 11. Do đó, cừu Phan Rang được nuôi dưỡng tại đây cũng có các chỉ tiêu sinh trưởng, sinh sản bị ảnh hưởng theo mùa. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự thay đổi đáng kể theo mùa về mức độ testosterone ở tất cả các độ tuổi ở cừu Phan Rang. Những kết quả này phù hợp với nghiên cứu của J.A. Abecia và cs (2012) [2], nghiên cứu đã ghi nhận rằng sinh sản có tính mùa vụ, đây là một hiện tượng bị ảnh hưởng chủ yếu bởi sự thay đổi chu kỳ ánh sáng hằng năm, trong đó mùa sinh sản và mùa không sinh sản được xác định rõ ràng ở các loài theo mùa của khí hậu. Các kết quả hiện tại cũng phù hợp với kết quả của J.N. Ngcobo và cs (2023) [12], các tác giả đã ghi nhận sự thay đổi theo mùa của nội tiết tố ở các giống cừu khác nhau giữa các mùa khác nhau. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu về ảnh hưởng của mùa vụ lên các chỉ tiêu sinh sản của cừu đực đã được báo cáo [1, 13]. Sự thay đổi theo mùa trong đặc điểm tinh dịch đã được quan sát. Khối lượng tinh dịch, nồng độ tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống, tinh trùng bất thường và khả năng di chuyển của tinh trùng thay đổi theo từng giống theo mùa. Sự thay đổi độ dài ngày ảnh hưởng đến hoạt động của tinh hoàn bằng cách điều chỉnh sự giải phóng GnRH và do đó làm thay đổi sự giải phóng gonadotropin, do đó ảnh hưởng đến hoạt động của tinh hoàn trong sản xuất testosterone và tinh trùng [1]. Theo dõi theo mùa cho thấy, lượng xuất tinh cao vào mùa sinh sản và giảm đi vào mùa không sinh sản. Những phát hiện này phù hợp với những kết quả được báo cáo trước đây về sự thay đổi theo mùa về lượng tinh dịch và nồng độ tinh trùng của cừu đực [13]. Phản ứng này có thể do các yếu tố khác nhau gây ra, bao gồm sự sẵn có của các chất dinh dưỡng thiết yếu trong các mùa khác nhau và sự thay đổi theo mùa của nội tiết tố [2]. Trong nghiên cứu này, testosterone cao đáng kể ($p<0,05$) vào mùa mưa và thấp vào mùa khô ở tất cả các độ tuổi. Những kết quả này phù hợp với kết quả của M. Gündoğan (2007) [14], nhiệt độ mùa hè cao cũng ảnh hưởng xấu đến khả năng sống của tinh trùng, lượng tinh trùng bất thường giảm vừa phải trong mùa sinh sản (mùa thu) so với mùa không sinh sản ở cừu đực Daglic. Tỷ lệ tinh trùng sống giảm và tỷ lệ tinh trùng bất thường tăng trong mùa không sinh sản có thể liên quan đến việc giảm số lượng ống sinh tinh và tăng quá trình thoái hóa [13]. Ánh sáng được coi là yếu tố chiếm ưu thế, điều chỉnh quá trình sinh sản của cừu ở các vùng khí hậu ôn đới [15]. Ngoài ra, độ ẩm không khí đã được báo cáo là có vai trò đối với hoạt động sinh sản của cừu [3]. Nhiệt độ và ẩm độ môi trường sống là yếu tố tác động có thể ảnh hưởng đến mùa sinh sản của cừu [1, 13]. Trong năm, vào các thời điểm nhiệt độ và ẩm độ khá ôn hòa và thức ăn tương đối tốt cừu thường xuất hiện động dục [3]. Do đó, giả thuyết về vai trò chính của sự thay đổi ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm theo mùa đã ảnh hưởng đối với nồng độ testosterone của cừu Phan Rang là phù hợp.

Theo T.V. Ngo (2014) [4], ở các chỉ tiêu sinh sản ở cừu Phan Rang bị ảnh hưởng bởi mùa vụ phối giống và mùa vụ đẻ. Trong đó, cừu đẻ vụ thu đông có số con sơ sinh cao hơn số con sơ sinh của cừu đẻ vụ hè thu (1,3 so với 1,1 con). Đã có báo cáo cho rằng, nồng độ testosterone có liên quan đáng kể đến khả năng sinh sản của các giống được kiểm tra [14]. Như vậy, rõ ràng, hàm lượng testosterone ở cừu đực thay đổi theo mùa, mùa mưa cao hơn mùa khô, có những ảnh hưởng nhất định đến hiệu quả sinh sản của đàn cừu nhưng chưa được nghiên cứu và thảo luận trước đây. Trong khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, cừu bản địa bị hạn chế hoạt động sinh dục trong những

tháng mùa hè. Nhiệt độ môi trường cao gây suy giảm chức năng sinh sản ở cừu, khi stress nhiệt đi kèm với độ ẩm môi trường cao [13]. Stress nhiệt gây ra một loạt các thay đổi mạnh mẽ trong chức năng sinh học ở động vật, trong đó bao gồm giảm lượng thức ăn và hiệu quả sử dụng thức ăn, rối loạn trong chuyển hóa nước, protein, năng lượng và khoáng, rối loạn trong tiết xuất hormone [2]. Khả năng sinh sản của cừu đực trong quá trình giao phối đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao tỷ lệ thụ thai của cừu cái [1]. Nhiệt độ cao làm tăng nhiệt độ cơ thể, tăng nhiệt độ da bìu; làm giảm kích thước, khối lượng các cơ quan sinh dục của cừu đực, giảm chất lượng tinh trùng; tinh trùng có thể bị chết, bị kỳ hình, vận động yếu. Tuy nhiên, nếu cừu đực được bảo vệ đúng cách, cải thiện môi trường xung quanh và hạn chế được bức xạ mặt trời, sẽ không bị suy giảm ham muốn tình dục và chất lượng tinh dịch ngay cả trong mùa hè và các tháng mùa mưa [1, 2].

Khi so sánh với kết quả nghiên cứu đã công bố trên các giống cừu khác, dữ liệu testosterone của cừu Phan Rang thấp hơn đực bản địa Nam Phi; mức testosterone trong mùa thu (22,04±1,94 ng/ml), mùa xuân (16,41±2,00 ng/ml) và mùa hè (14,38±2,04 ng/ml) và mùa đông (20,22±2,00 ng/ml) [12] hoặc cao hơn so với cừu Chios có testosterone (1,95 ng/ml), cừu Karagouniko (1,55 ng/ml) [16]. Nồng độ testosterone khác nhau giữa các giống cừu, có thể được giải thích bằng tiềm năng di truyền khác nhau của chúng, đồng thời cũng lưu ý rằng đặc điểm di truyền cho khả năng phản ứng khác nhau với ánh sáng, nhiệt độ đã được chứng minh [3]. Tuy nhiên, xét về sự thay đổi theo mùa thì kết quả của các nghiên cứu này có sự tương đồng. Nghiên cứu về testosterone ở dê Bách Thảo trong điều kiện nuôi tại Bình Dương cũ cũng cho thấy có sự thay đổi theo mùa, mùa mưa có hàm lượng cao hơn mùa khô [8]. Đây là báo cáo đầu tiên về testosterone ở cừu Phan Rang bằng cách sử dụng nghiên cứu mô hình theo mùa, kết quả cho thấy testosterone tăng lên vào mùa mưa, điều quan trọng là đây cũng là mùa sinh sản của cừu Phan Rang [4]. Do đó, sự thay đổi theo mùa biểu hiện qua sự phản hồi của testosterone là dấu hiệu khá rõ ràng cho sinh sản theo mùa. Thật thú vị khi lưu ý rằng, hàm lượng testosterone có xu hướng thấp hơn ở cừu 4 tuổi so với cừu 2 và 3 tuổi (bảng 2). Tuy nhiên, sự suy giảm testosterone theo tuổi vẫn chưa rõ ràng, liệu những thay đổi này có phải là đặc trưng đối với cừu Phan Rang thì cần có những nghiên cứu tiếp để theo dõi ở cừu các lứa tuổi lớn hơn nhằm quyết định lựa chọn nhóm tuổi sinh sản phù hợp nhất.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã làm sáng tỏ một phần sinh lý sinh sản của cừu đực Phan Rang, bổ sung thêm kiến thức để hướng tới việc khai thác sinh sản ở cừu đực hợp lý hơn. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, mức testosterone trong huyết tương ở cừu Phan Rang thay đổi theo độ tuổi và qua các tháng trong năm; có tính thời vụ rõ ràng, với hàm lượng testosterone cao vào mùa mưa và thấp hơn vào mùa khô. Có thể gợi ý rằng, mô hình nhân giống phù hợp khi cừu đực đạt 9 tháng tuổi, vào mùa mưa cừu đực cho hiệu quả nhân giống tốt hơn. Cần tiếp tục có những nghiên cứu về testosterone của cừu Phan Rang ở những lứa tuổi lớn hơn, về hormone sinh sản trên cừu cái và các các giống cừu khác đang nuôi ở Việt Nam; đặc biệt đánh giá ảnh hưởng của biến đổi khí hậu và chế độ nuôi dưỡng lên các chỉ số này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H.A.Z. Hany, A.A. Saeed, A.A.S. Ayman (2020), "Effects of season and breed on the reproductive performance of sheep", *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, **35(2)**, pp.149-154, DOI: 10.12750/JARB.35.2.149.

[2] J.A. Abecia, A.G. Bulnes (2012), "Hormonal control of reproduction in small ruminants", *Animal Reproduction Science*, **130**, pp.173-179, DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.011.

[3] A. Magomet, V. Vladimir, M. Marina, et al. (2022), "Seasonal changes in testis size, testosterone levels and sperm production quality in meat rams", *Reproduction in Domestic Animals*, **57(10)**, pp.1125-1135, DOI: 10.1111/rda.14183.

[4] T.V. Ngo (2014), *Research on Growth, Reproduction, Meat Production and Some Solutions to Improve Meat Productivity of Phan Rang Sheep*, Doctoral Thesis in Agriculture, Institute of Animal Husbandry (in Vietnamese).

[5] L. Qun, R. Alexandra, C.J. Iain, et al. (2012), "Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: Possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor", *Neuroendocrinology*, **96(3)**, pp.212-221, DOI: 10.1159/000335998.

[6] T.T.H. Nguyen, T.B. Nguyen (2022), "Monitoring the estradiol and progesterone content of Bach Thao goats and Boer goats during pregnancy", *National Biotechnology Conference 2022*, Natural Science and Technology Publishing House, Hanoi, pp.768-773 (in Vietnamese).

[7] T.T.H. Nguyen (2023a), "Assessment of estradiol and progesterone content of Bach Thao goats and Boer goats according to estrous cycle", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **65(12)**, pp.52-55 (in Vietnamese).

[8] T.T.H. Nguyen (2023b), "Seasonal changes in testosterone of Bach Thao goats", *National Biotechnology Science Conference 2023*, Natural Science and Technology Publishing House, pp.1229-1234 (in Vietnamese).

[9] H.V. Nguyen, T.M. Nguyen, T.H. Le, et al. (2023), "Situation of husbandry, growth and reproduction of Phan Rang sheep raised in households in Ninh Thuan province", *Science and Technology of Livestock*, **295**, pp.25-31 (in Vietnamese).

[10] T.D. Nguyen, T.B.T. Ngo, T.M. Le, et al. (2021), "Survey on growth indicators of Phan Rang sheep when using silage", *Scientific Journal of Thu Dau Mot University*, **2(51)**, pp.40-47 (in Vietnamese).

[11] P.B. Nguyen, T.D. Nguyen, T.T.H. Nguyen (2023), "Blood physiological indicators of Phan Rang sheep when using silage", *National Biotechnology Science Conference*, pp.1246-1251 (in Vietnamese).

[12] J.N. Ngcobo, T.L. Nedambale, T.J. Mpofu, et al. (2023), "Seasonal variations in semen quality, testosterone levels, and scrotal size following dietary flaxseed oil and ascorbic acid in South African indigenous rams", *Animals*, **13(7)**, DOI: 10.3390/ani13071213.

[13] S.S.M. Suhair, M.A. Abdalla (2010), "Effects of level of feeding and season on thermoregulation and semen characteristics in desert rams (*Ovis aries*)", *Global Veterinaria*, **4**, pp.207-215, DOI: 10.5829/idosi.ajn.2012.1.2.71100.

[14] M. Gündoğan (2007), "Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds", *Small Ruminant Research*, **67**, pp.312-316, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.11.005.

[15] M. Chentouf, J.L. Bister, B. Boulanouar (2011), "Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats", *Small Ruminant Research*, **98**, pp.185-188, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2011.03.037.

[16] M. Aristidis, C.S. Aikaterini, S. George (2022), "Effect of seasonally changing aerial environment on testosterone in Karagouniko and Chios sheep", *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, **10**, DOI: 10.31893/jabb.22005.

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 thuỷ (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 (Số 115 Trần Duy Hưng, phường Yên Hòa, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khcnvn@mst.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 khoá 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.

Phần 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 theo 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.

PHỤ LỤC (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

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.

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 thuỷ 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 68 - Number 1 - January 2026

Phát triển mô hình nhận dạng tiếng nói dân tộc thiểu số Hrê, Co sang tiếng Việt dạng văn bản sử dụng trí tuệ nhân tạo.
Nguyễn Thành Việt, Trần Duy Linh

1 **Developing a speech recognition model of Hre and Co ethnic minority languages into Vietnamese text using artificial intelligence.**
Thanh Viet Nguyen, Duy Linh Tran

Nghiên cứu phát triển hệ thống học lập trình trực tuyến tích hợp công cụ phản hồi và chấm điểm tự động.
Tống Văn Trường

8 **Developing and evaluating an online programming learning platform with integrated automated assessment for university students.**
Van Truong Tong

Khử trùng môi trường nuôi cấy mô và kích thích sinh trưởng cây chuối ở giai đoạn ra rễ và vườn ươm bằng hạt nano bạc chitosan nồng độ thấp.
Vũ Thị Huyền, Lê Thị Hiên

15 **Sterilising of tissue culture media and growth stimulation of banana seedlings at rooting and *ex vitro* nursery stages using chitosan silver nanoparticles at low concentration.**
Thi Huyen Vu, Thi Hien Le

Đặc điểm hình thái và điều kiện sinh trưởng hệ sợi của nấm dược liệu *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. ghi nhận lần đầu tại Việt Nam.
Lê Thanh Huyền, Bùi Phương Anh, Nguyễn Khánh Linh, Trịnh Tam Kiệt

20 **Morphological characteristics and mycelial growth conditions of the medicinal mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. first recorded in Vietnam.**
Thanh Huyen Le, Phuong Anh Bui, Khanh Linh Nguyen, Tam Kiet Trinh

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi và ra rễ *in vitro* của cây lai F1 *Cymbidium aloifolium* × *Cymbidium finlaysonianum*.
Phạm Phương Thu, Trần Huyền My, Dương Thị Kim Anh

25 **Effects of plant growth regulators on *in vitro* shoot regeneration and rooting of an F1 hybrid between *Cymbidium aloifolium* and *Cymbidium finlaysonianum*.**
Phuong Thu Pham, Huyen My Tran, Thi Kim Anh Duong

Hiệu quả của chế phẩm vi khuẩn và dịch chiết từ củ gừng trong ức chế nấm *Alternaria solani* gây bệnh bạc lá sớm ở cà chua.
Đỗ Quang Trung, Nguyễn Trọng Trí

31 **Effectiveness of bacterial inoculant and ginger extract in suppressing *Alternaria solani* causing early blight in tomato.**
Quang Trung Do, Trong Tri Nguyen

Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc tính của thể thực khuẩn kháng *Vibrio alginolyticus*.
Trương Quốc Phong, Vi Thị Thu Thảo, Nguyễn Thanh Hoà, Ngô Thu Hường

38 **Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Vibrio alginolyticus*.**
Quoc Phong Truong, Thi Thu Thao Vi, Thanh Hoa Nguyen, Thu Huong Ngo

Một số thành tựu trong nghiên cứu phát triển nền tảng chip vi lưu tập trung và phát hiện protein dựa trên kênh dẫn nano và cảm biến trở kháng.
Trần Như Chí, Huỳnh Thị Thùy Linh, Đỗ Quang Lộc, Bùi Thanh Tùng

45 **Some notable achievements in research and development of microfluidic chip platforms for protein preconcentration and detection based on nanochannel techniques and impedance sensors.**
Nhu Chi Tran, Thi Thuy Linh Huynh, Quang Loc Do, Thanh Tung Bui

Tổng hợp và phân tích đặc tính màng chitosan/cellulose triacetate ứng dụng làm màng bọc thực phẩm.
Trương Thị Cẩm Trang, Lê Thị Anh Phương, Nguyễn Đăng Khoa

53 **Preparation and properties of chitosan/cellulose triacetate membrane for food packaging.**
Trang Thi Cam Truong, Anh Phuong Le Thi, Khoa Dang Nguyen

Vai trò của GO trong tăng cường hoạt tính xúc tác của vật liệu nano tổ hợp MnO_2-GO cho cảm biến đo màu.
Phạm Thị Hiền, Ngô Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Thị Đào, Vũ Thị Hương Mai, Tô Đạo Cường, Ngô Xuân Đinh, Hoàng Văn Tuấn

60 **Assessing the role of GO in enhancing the catalytic activity of MnO_2-GO nanomaterials in colorimetric sensors.**
Thi Hien Pham, Thi Quynh Trang Ngo, Thi Dao Nguyen, Thi Huong Mai Vu, Dao Cuong To, Xuan Dinh Ngo, Van Tuan Hoang

Giá trị cắt lớp vi tính đa dãy trong đánh giá tình trạng xâm lấn mạch máu của khối u quanh bóng Vater.
Nguyễn Thành Khiêm, Trần Thị Thúy, Đoàn Văn Hoan, Đỗ Hải Đăng, Nguyễn Hàm Hội

65 **The value of multi-slice computed tomography in evaluating vascular invasion of periampullary tumours.**
Thanh Khiem Nguyen, Thi Thuy Tran, Van Hoan Doan, Hai Dang Do, Ham Hoi Nguyen

Xây dựng khung hỗ trợ lựa chọn các giải pháp xử lý chất thải cho ao nuôi tôm siêu thâm canh dựa trên MFA (Material flow analysis) kết hợp LCA (Life cycle assessment).
Tiền Hải Lý, Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Thanh Tùng, Trần Trung Kiên

69 **Develop a supporting framework for selecting waste treatment solutions for supper-intensive shrimp farming based on the combination of material flow analysis and life cycle assessment.**
Hai Ly Tien, Thi Kieu Nguyen, Thanh Tung Nguyen, Trung Kien Tran

Ảnh hưởng của tuổi và mùa vụ đến testosterone của cừu Phan Rang nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Chăn nuôi gia súc lớn.
Nguyễn Thị Thu Hiền

76 **Effects of age and season on testosterone of Phan Rang sheep raised at the Ruminant Research and Development Centre.**
Thi Thu Hien Nguyen