

p-ISSN 1859-4794 * e-ISSN 2615-9929



TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 64 - Số 9 - Tháng 9 năm 2022

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mỏ - Địa chất
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiêm - Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trần Hữu Phúc - Hội đồng GS Nhà nước
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP PHỤ TRÁCH

Nguyễn Thị Hương Giang

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TẠP CHÍ ĐIỆN TỬ

Vũ Văn Hưng

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi
Vu Minh Giang - VNU, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - VNU, Hanoi
Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi
Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi

EXECUTIVE DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Nguyen Thi Huong Giang

DEPUTY EDITOR

Nguyen Thi Hai Hang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF E-JOURNAL BOARD

Vu Van Hung

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Đinh Thị Luận

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

Tiêu chuẩn chẩn đoán y học cổ truyền của Covid-19 bằng mô hình cây tiềm ẩn

Trần Thị Hồng Ngải*, Hoàng Thúy Hồng, Nguyễn Trường Nam

Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, 2 Trần Phú, phường Mộ Lao, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/6/2022; ngày chuyển phản biện 27/6/2022; ngày nhận phản biện 22/7/2022; ngày chấp nhận đăng 28/7/2022

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Hiện tại, hướng dẫn của Bộ Y tế cũng như nhiều công bố đã chứng minh y học cổ truyền (YHCT) có vai trò lớn trong việc kiểm soát Covid-19, đặc biệt là bệnh ở mức độ nhẹ. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về phân thể YHCT của bệnh này nhằm tạo sự đồng nhất trong chẩn đoán và điều trị. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng tiêu chuẩn chẩn đoán các thể lâm sàng của Covid-19 mức độ nhẹ bằng mô hình cây tiềm ẩn (Latent tree models - LTMs). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Giai đoạn 1: Khảo sát tài liệu y văn kinh điển, sách giáo khoa và chuyên khảo về YHCT, từ đó lập phiếu khảo sát các triệu chứng ở bệnh nhân (BN) Covid-19 mức độ nhẹ. Giai đoạn 2: Lựa chọn và khảo sát BN Covid-19 mức độ nhẹ, thỏa mãn tiêu chuẩn chọn BN. Phiếu khảo sát có 65 câu hỏi về các triệu chứng YHCT được dùng để khảo sát 438 BN phù hợp tiêu chuẩn lựa chọn tại Bệnh viện YHCT TP Hồ Chí Minh, thông tin bệnh được xử lý bằng LTMs. **Kết quả:** Nghiên cứu y văn cho thấy có 10 tài liệu (5 tác phẩm kinh điển, 5 giáo trình) có nội dung liên quan đến Covid-19. Sau khi mô hình hóa, 21 biến tiềm ẩn (từ Y0 đến Y20) được thành lập, mỗi biến tiềm ẩn đại diện cho tập hợp các biến quan sát là các triệu chứng. Tuân theo biện chứng vệ - khí - dinh - huyết, phân loại và tổng hợp ra 2 thể lâm sàng YHCT là bệnh tại vệ phận và bệnh tại khí phận. **Kết luận:** Qua phân tích LTMs ghi nhận 2 bệnh cảnh Covid-19 theo YHCT là bệnh tại vệ phận và bệnh tại khí phận.

Từ khóa: Covid-19 mức độ nhẹ, mô hình cây tiềm ẩn (LTMs), vệ - khí - dinh - huyết.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Covid-19 bùng phát từ năm 2019 đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ thống y tế và chăm sóc sức khỏe trên toàn thế giới. Dịch bệnh trước mắt tuy đã được khống chế và bệnh cảnh diễn biến có chiều hướng giảm nhẹ, tuy nhiên các biến thể của Covid-19 không ngừng xuất hiện với tần suất lây nhiễm và tỷ lệ tái nhiễm ngày càng tăng cao. Đồng thời, hiểu biết về bệnh lý Covid-19 cũng như các chứng hậu Covid-19 còn hạn chế, tiên lượng bệnh phức tạp, nguy cơ kéo dài [1]. Trong y văn cổ truyền từ lâu đã ghi lại lịch sử các dịch bệnh cũng như lý luận và phương thuốc điều trị mang lại hiệu quả [2]. Việc tiếp cận bệnh cảnh Covid-19 dưới góc nhìn của YHCT là một hướng đi đúng đắn và cần thiết. Với các biểu hiện của Covid-19, YHCT xếp bệnh lý này vào phạm trù “dịch bệnh”, bệnh nguyên là do cảm thụ khí dịch lệ mà phát bệnh, tính truyền nhiễm rất mạnh, diễn biến nhanh chóng, phù hợp với đặc thù của dịch bệnh được miêu tả trong *Ôn dịch luận*, đó là “dịch bệnh cảm khí lệ của thiên địa... khí ấy tới, vô luận lão thiếu mạnh yếu, người tiếp xúc khắc bị bệnh”, nguyên nhân gây bệnh là một loại vật chất đặc biệt, không phải khí phong, hàn, thử, thấp tà, mà là “cảm phải một loại khí khác biệt ở khoảng trời đất”, nhận thấy nguyên nhân phát bệnh là do “dị khí”, còn gọi là “dịch khí” [3]. LTMs, một mô hình được ứng dụng nhiều trong phân loại các thể bệnh của YHCT đã và đang được sử dụng nhiều trong

các nghiên cứu có giá trị [4]. Nhằm phát huy vai trò của YHCT trong điều trị chứng bệnh Covid-19, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: Khảo sát phân thể YHCT của BN Covid-19 mức độ nhẹ bằng LTMs.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Tài liệu YHCT: Tập hợp các tài liệu là sách kinh điển, sách tham khảo hay các hướng dẫn YHCT của Bộ Y tế có nội dung gần tương đương hoặc liên quan đến nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh, chứng trạng và chứng hậu của Covid-19.

Bệnh nhân:

- Tiêu chuẩn lựa chọn: BN được chẩn đoán xác định Covid-19 mức độ nhẹ theo Quyết định số 3416/QĐ-BYT ngày 14/7/2021 của Bộ Y tế [5], chưa điều trị, chấp nhận tham gia nghiên cứu.

- Tiêu chuẩn loại trừ: BN Covid-19 mức độ trung bình trở lên, BN không có khả năng giao tiếp, không đồng ý tham gia nghiên cứu, BN chuyển nặng hoặc đang điều trị các bệnh nền phức tạp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu y văn: Từ tháng 3/2021 đến tháng 5/2021.

*Tác giả liên hệ: Email: ngaiydw72@yahoo.com

Diagnostic traditional medicine criteria of Covid-19 by using a latent tree model

Thi Hong Ngai Tran*, Thuy Hong Hoang,
Truong Nam Nguyen

Vietnam University of Traditional Medicine,
2 Tran Phu Street, Mo Lao Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 22 June 2022; revised 22 July 2022; accepted 28 July 2022

Abstract:

Objectives: Until now, the guideline of the Vietnam Ministry of Health and several pieces of research have confirmed the effectiveness of traditional medicine in managing Covid-19, especially for mild levels. However, the research on differentiating traditional medicine disease patterns of Covid-19 to systemise diagnosis and treatment has not been implemented. Thence, this study aimed to establish diagnostic criteria for mild clinical forms of Covid-19 using latent tree models (LTMs). **Materials and methods:** Stage 1: Conduct studies on classic medical documents, textbooks and monographs on traditional medicine, to make questionnaires to observe symptoms in Covid-19 patients at a mild stage. Stage 2: Choosing and investigating Covid-19 patients at a mild stage by inclusion criteria. A 65-question survey was used to investigate 438 patients at Ho Chi Minh city Traditional Medicine Hospital, then included data were analysed by using the latent tree model. **Results:** Literature review exhibited 10 documents (5 classic medical documents, 5 textbooks) with content related to Covid-19. After modelling, 21 latent variables (Y0 to Y20) were established, referring to the groups of included symptom variables. According to ve - khi - dinh - huyet diagnosis theory, 2 traditional medical disease patterns are matching with the literature: the Ve-area disease pattern and the Khi-area disease pattern. **Conclusions:** The latent tree model analysis pointed out 2 traditional medical disease patterns of Covid-19 at a mild stage, including the Ve-area disease pattern and Khi-area disease pattern.

Keywords: latent tree model, mild Covid-19 symptoms, ve - khi - dinh - huyet.

Classification number: 3.1

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang có phân tích.

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 5/2021 đến tháng 12/2021.

Cỡ mẫu: đây là nghiên cứu cắt ngang nên chúng tôi chọn công thức ước tính cỡ mẫu theo ước lượng một tỷ lệ trong nghiên cứu với độ chính xác tuyệt đối:

$$N = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 P(1-P)}{d^2}$$

với $\alpha=0,05$, $Z_{1-\alpha/2}=1,96$, $d=0,05$ (độ chính xác tuyệt đối), chọn $p=0,5$ theo số liệu tham khảo ước tính được cỡ mẫu $N=385$, với khoảng 5% BN có thể bị loại trừ hoặc từ bỏ nghiên cứu ước tính $N=405$ BN.

2.3. Phương pháp lấy mẫu

Lấy mẫu thuận tiện trong thời gian nghiên cứu cho đến khi đủ 405 BN tại Bệnh viện YHCT TP Hồ Chí Minh.

Các bước tiến hành: Dựa trên phân loại chứng trạng của bệnh vệ - khí - dinh - huyết trong *Ôn bệnh điều biện*, giáo trình YHCT, chẩn đoán học trung y thiết kế bảng câu hỏi nghiên cứu trên lâm sàng.

Khảo sát trên lâm sàng:

Bước 1: thu thập và xử lý số liệu.

Bước 2: phân tích LTMs.

Bước 3: giải thích LTMs, dựa trên lý luận YHCT để gọi tên biến tiềm ẩn.

Bước 4: gộp các biến tiềm ẩn và biến quan sát cùng biểu hiện thông tin của một chứng hậu YHCT.

Bước 5: sử dụng quy tắc phân loại (Building rules) để thiết lập quy tắc biện chứng.

2.4. Phương pháp thống kê

Nhập liệu bằng Excel, tính tần số xuất hiện, tỷ lệ % cho biến số định tính, trung bình và độ lệch chuẩn cho biến số định lượng.

Dùng phần mềm Lantern 4.3 xây dựng LTMs thu được các biến tiềm ẩn, bằng lý luận YHCT gọi tên các biến tiềm ẩn này thành các chứng hậu YHCT liên quan. Dữ liệu là các triệu chứng lâm sàng của BN được đánh dấu “1” tương ứng có triệu chứng, “0” tương ứng là không có triệu chứng.

2.5. Y đức

Nghiên cứu được thông qua bởi Hội đồng Y đức Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam theo Quyết định số 190/HVYDHCT ngày 29/3/2021.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả khảo sát y văn

Có 10 y văn được lựa chọn cho nghiên cứu, trong đó có 5 sách kinh điển, 5 sách giáo trình và tham khảo gồm: *Nội kinh*,

Thương hàn luận, Ôn bệnh, Hải thượng y tông tâm lĩnh, Tuệ Tĩnh toàn tập và 3 giáo trình: Y lý YHCT (Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, Trường Đại học Y Hà Nội, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh), Chứng hậu YHCT, Chứng trạng YHCT.

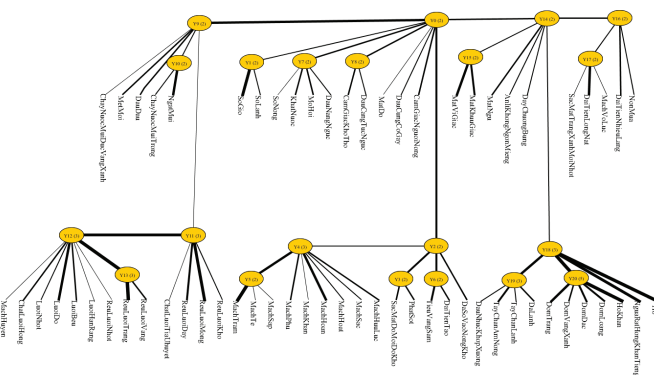
Có 108 triệu chứng tổng hợp được có liên quan đến Covid-19 chủ yếu nằm trong hội chứng bệnh vệ - dinh - khí - huyết, sau khi họp nhóm cùng các chuyên gia và bác sỹ điều trị trực tiếp tại bệnh viện cũng như chiếu theo những hướng dẫn của Bộ Y tế, một phiếu khảo sát gồm 65 câu hỏi đã được lập ra để tiến hành nghiên cứu lâm sàng.

3.2. Kết quả khảo sát trên lâm sàng

Đặc điểm chung của BN: Nghiên cứu trên 438 BN, với tuổi trung bình $42,56 \pm 15,27$ (min=16, max=90), trong đó nhóm 30-49 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất, nữ nhiều hơn nam (63 và 37%). BN không có bệnh lý kèm theo chiếm 80,6%, còn lại số ít là tăng huyết áp, rối loạn chuyển hóa... Các BN chủ yếu đã tiêm vắc xin phòng Covid-19 mũi 1 và 2, chỉ có 12,6% BN chưa tiêm vắc xin.

Kết quả phân tích triệu chứng lâm sàng bằng LTMs: Có 438 hồ sơ bệnh án của BN được chẩn đoán mắc Covid-19, mỗi bệnh án ghi nhận thông tin 65 triệu chứng (biến quan sát) có liên quan đến BN mắc Covid-19 thể nhẹ và không triệu chứng, trong đó triệu chứng mạch hồng đại không xuất hiện và số liệu không bao gồm chẩn đoán YHCT. Các biến quan sát được phân thành 2 trạng thái: có xuất hiện giá trị là 1 và không xuất hiện giá trị là 0.

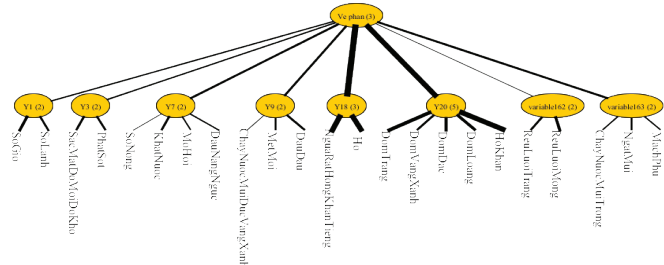
Kết quả phân tích trên 64 chứng trạng được 21 biến tiềm ẩn từ Y0 đến Y20 (hình 1), mỗi biến tiềm ẩn đại diện cho tập hợp các biến quan sát là các triệu chứng của BN. Mỗi biến tiềm ẩn có quan hệ với nhiều biến quan sát và các biến quan sát nói lên thông tin của biến tiềm ẩn có quan hệ trực tiếp với nó được thể hiện bằng đường nối (hình 1), độ đậm nhạt của đường nối thể hiện mức độ tương quan mạnh hay yếu của biến quan sát với biến tiềm ẩn mà nó trực thuộc. Chữ số trong ngoặc đơn đi kèm mỗi biến tiềm ẩn biểu thị số trạng thái của biến tiềm ẩn đó, thông thường biến tiềm ẩn mang 2 trạng thái s0 và s1, có những biến tồn tại trạng thái thứ 3 mang giá trị s2. Các biến tiềm ẩn có thể biểu thị tính đồng hiện hoặc loại trừ lẫn nhau của các triệu chứng lâm sàng. Biến đồng hiện bao gồm: Y0, Y1, Y2, Y6, Y7, Y8, Y9, Y12, Y13, Y14, Y15, Y19, biến loại trừ bao gồm: Y4, Y5, Y11, Y12, Y13, Y19, Y20.



Hình 1. Mô hình cây tiềm ẩn phân nhóm triệu chứng Covid-19.

3.3. Phân thể YHCT

Bệnh chứng của phần vệ phạm: Bệnh ở vệ phạm bao gồm các triệu chứng: phát sốt, sợ lạnh, có mồ hôi hoặc không, đau đầu, mệt mỏi, ngạt mũi, ho có đờm của biến tiềm ẩn Y1, Y3, Y7, Y9, Y18, Y20 và rêu lưỡi trắng, mỏng, mạch phù (Y4) (hình 2).



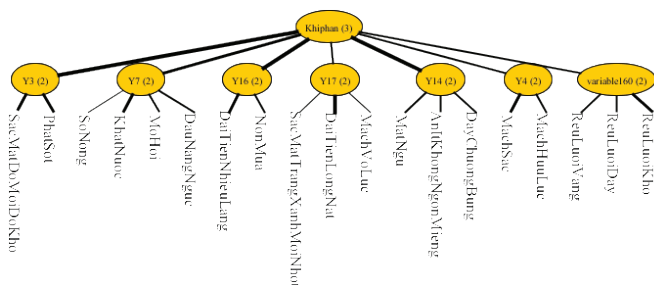
Hình 2. Mô hình triệu chứng thuộc phần vệ.

Bảng 1. Thông tin triệu chứng thuộc phần vệ.

Vệ phạm (Max CMI=95%)	s0=0,34	s1=0,47	s2=0,19
Ngứa rất họng khản tiếng	0	0,46	0,82
Ho	0	0,61	0,15
Ho khan	0	0,56	0,38
Đờm trắng	0,03	0,34	0,44
Ngạt mũi	0,38	0,42	0,84
Đờm loãng	0,01	0,23	0,31
Khát nước	0,17	0,24	0,63
Phát sốt	0,18	0,12	0,52
Mệt mỏi	0,54	0,69	0,95
Đau đầu	0,3	0,46	0,77
Sợ gió	0,17	0,14	0,52

Với max CMI=95%, biến tiềm ẩn biểu hiện các triệu chứng bệnh tại vệ phạm tồn tại 3 trạng thái s0, s1 và s2 lần lượt chiếm tỷ lệ 34, 47 và 19% quần thể quan sát, tần suất xuất hiện các triệu chứng ở trạng thái s1 và s2 đa số cao hơn so với các triệu chứng ở trạng thái s0 (bảng 1). Với những triệu chứng có tần suất xuất hiện trên 50% là những triệu chứng chính như: ho khan hoặc ho, mệt mỏi của nhóm BN s1; phát sốt, sợ gió, mệt mỏi, ngạt mũi, đau đầu, ngứa rất họng khản tiếng, khát nước của nhóm BN s2 và các triệu chứng phụ là đờm trắng, loãng, rêu lưỡi trắng mỏng.

Bệnh chứng của khí phạm: Bệnh ở khí phạm bao gồm các triệu chứng phát sốt, không sợ lạnh lại sợ nóng, đổ mồ hôi, khát nước, mạch sắc, rêu lưỡi vàng dày (hình 3). Có thể kèm trong ngực phiền muộn, nôn nao, muốn mửa hoặc bụng trướng đầy mà đau, đại tiện bí kết, hoặc ỉa lỏng, nói nhảm, sốt cơn, tiểu tiện đỏ gắt của biến tiềm ẩn Y3, Y7, Y16, Y17, Y14 và rêu lưỡi vàng, dày, khô, mạch sắc, hữu lực (Y4).



Hình 3. Mô hình triệu chứng thuộc phần khí.

Bảng 2. Thông tin triệu chứng thuộc phần khí.

Khí phận (max CMI=95%)	s0=0,69	s1=0,2	s2=0,11
Sắc mặt đỏ, môi đỏ khô	0,16	0,17	1
Phát sốt	0,14	0,14	0,87
Đại tiện nhiều lần	0	0,35	0,1
Đại tiện lỏng nát	0,04	0,5	0,17
Mất ngủ	0,1	0,53	0,36
Khát nước	0,18	0,44	0,73
Ăn ít không ngon miệng	0,23	0,65	0,49
Đầy trướng bụng	0,02	0,29	0,19
Ra mồ hôi	0,16	0,36	0,58
Nôn mửa	0,01	0,2	0,07

Với max CMI=95%, biến tiềm ẩn biểu hiện các triệu chứng bệnh tại khí phận tồn tại 3 trạng thái s0, s1 và s2, tần suất xuất hiện các triệu chứng ở trạng thái s2 và s1 đa số cao hơn rõ ràng so với các triệu chứng ở trạng thái s0 (bảng 2). Nhóm trạng thái s2=11% biểu hiện chứng hậu bệnh tại khí phận với những triệu chứng chính như: sắc mặt đỏ, môi đỏ khô, phát sốt, khát nước, ra mồ hôi. Nhóm trạng thái s1=20% biểu hiện triệu chứng chính là ăn không ngon miệng, đi ngoài lỏng nát, mất ngủ và các triệu chứng phụ như đi ngoài nhiều lần, đầy trướng bụng, nôn mửa.

3.4. Bàn luận

Diệp Thiên Sỹ là y gia trứ danh đời Thanh, người đặt nền móng cho phái ôn nhiệt học trong “Lâm chứng chi nam y án”, ông đã thêm vào đông ôn, phục ôn, thử phong, uế tât, dịch bệnh, phong ôn, phát sa (lên sởi)... đều thuộc ôn bệnh luận, ôn dịch. Các bệnh tật tuy rối rắm phức tạp, nhưng dị bệnh đồng trị, phương pháp biện chứng lâm sàng cơ bản lấy vệ - khí - dinh - huyết làm chủ [1]. Đây là cơ sở làm cho YHCT với nghĩa rộng của biện chứng phòng trị ôn bệnh hình thành hệ thống lý luận đặc biệt tương đối hoàn thiện, cũng khiến cho lâm sàng biện chứng luận trị ngoại cảm nhiệt tính của YHCT càng phù hợp với phân kỳ hoặc phân giai đoạn điều trị của bệnh truyền nhiễm cận đại [1].

Bệnh cảnh của BN Covid-19 trong nghiên cứu cho thấy, BN có biểu hiện bệnh tại vệ phận chiếm 66% và khí phận chiếm 31%, do nghiên cứu lựa chọn BN ở mức độ nhẹ và không có

triệu chứng nên không có BN mang triệu chứng của tà phạm dinh huyết. Với bệnh cảnh tại vệ phận chia thành 2 nhóm, nhóm 19% BN ở trạng thái s2 với triệu chứng chính là phát sốt, sợ gió, mệt mỏi, ngạt mũi, đau đầu, ngứa rất họng khản tiếng, khát nước là biểu hiện của bệnh phong ôn mới phát, tà xâm nhập vào phần biểu, vệ khí bị uất, mất chức năng mở đóng nên thấy phát sốt, hơi sợ gió, có thể có mồ hôi. Vệ khí thông với phế, vệ khí uất trở, thì phế không tuyên thông nên ho, ngứa rất họng, khản tiếng. Pháp chữa nên dùng tân để giải biểu, lương để thăng nhiệt với phương đại biểu là ngân kiều tán (ôn bệnh điều kiện). Cùng biểu hiện của bệnh tại vệ phận nhóm 47% bệnh nhân ở trạng thái s1 có biểu hiện triệu chứng chính là ho khan hoặc ho, mệt mỏi là biểu hiện bệnh phong ôn mới bắt đầu, phong tà xâm phạm vào phế làm phế khí không tuyên thông nên chứng ho là chính còn các phát sốt khát nước ít xuất hiện hơn.

Có 31% bệnh nhân biểu hiện bệnh tại khí phận cũng chia làm 2 nhóm. Nhóm trạng thái s2=11% biểu hiện chứng hậu bệnh tại khí phận với những triệu chứng chính như: sắc mặt đỏ môi đỏ khô, phát sốt, khát nước, ra mồ hôi là những biểu hiện của dương minh nhiệt thịnh. Dương minh đi lên trên vinh nhuận ở mặt má, dương minh nhiệt thịnh bốc mạnh mà sắc mặt đỏ, phát sốt, nhiệt là dương tà tính thăng mở bức ra nhiều mồ hôi mà hao tổn tân dịch nên khát nước. Bệnh tại khí phận nhóm trạng thái s1=20% với biểu hiện chính là ăn không ngon miệng, đi ngoài lỏng nát, mất ngủ và các triệu chứng phụ như đi ngoài nhiều lần, đầy trướng bụng, nôn mửa. Do phế - đại trường có quan hệ biểu lý nên dư nhiệt chưa giải từ phế theo xuống đại trường nên đi ngoài lỏng nát, đi nhiều lần, vị khí nghịch ngược mà bụng đầy chướng, nôn mửa.

4. Kết luận

Trong 438 BN Covid-19 thu thập trong nghiên cứu này, theo học thuyết vệ - khí - dinh - huyết, bệnh xuất hiện ở vệ phận 66% và khí phận 31%. Các tác giả đã xây dựng được tiêu chuẩn chẩn đoán YHCT cho mức độ nhẹ của Covid-19 dựa trên LTMs.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.J. Hemmer, M. Löbermann, E.C. Reisinger (2021), “Covid-19: Epidemiology and mutations: An update”, *Radiologe*, **61(10)**, pp.880-887, DOI: 10.1007/s00117-021-00909-0.
- [2] Vietnam Institute of Traditional Medicine (1996), Theory of traditional medicine, Medical Publishing House, pp.225-254 (in Vietnamese).
- [3] T. Thuy, N.N. Kim (2005), *Pestilence*, Medical Publishing House, 256pp (in Vietnamese).
- [4] N.L. Zhang, S. Yuan, T. Chen, et al. (2008), “Latent tree models and diagnosis in traditional Chinese medicine”, *Artif. Intell. Med.*, **42(3)**, pp.229-245, DOI: 10.1016/j.artmed.2007.10.004.
- [5] Ministry of Health (2021), *Decision No. 3416/QĐ-BYT Dated July 14, 2021 Promulgating Guidelines for Diagnosis and Treatment of Covid-19* (in Vietnamese).

Nuôi cấy virus EV71 trong hệ thống lắc cho sản xuất vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng

Nguyễn Thị Yến Nhi^{1,2}, Nguyễn Thị Hạnh Lan¹, Hoàng Ngọc Khánh Quỳnh¹,
Lê Thị Liên¹, Lê Hà Tầm Dương¹, Cao Thị Bảo Vân^{1,3*}

¹Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, 167 Pasteur, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Công nghệ Y dược Vạn Cao, 7 đường C22, phường 12, quận Tân Bình, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/4/2022; ngày chuyển phản biện 5/4/2022; ngày nhận phản biện 4/5/2022; ngày chấp nhận đăng 9/5/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm thiết lập hệ thống nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero trong hệ thống nuôi cấy lắc (Wave bioreactor) sử dụng các giá mang vi thể để sản xuất vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng (TCM) do virus EV71 gây ra. Kết quả khảo sát 2 loại giá mang vi thể là Cytodex 1 và Cytodex 3 cho thấy, Cytodex 1 cho hiệu quả tốt hơn khi sử dụng để nuôi cấy tế bào Vero trong điều kiện huyền phù. Sự kết hợp với Cytodex 1 trên hệ thống Wave bioreactor cho hiệu suất nuôi cấy tế bào Vero đạt trên 3×10^6 tế bào/ml. Liều gây nhiễm tối ưu của virus EV71 trên tế bào Vero được xác định là 0,0001 TCID₅₀ (50% Tissue culture infectious dose)/ml. Quy trình nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero đã thiết lập thích hợp cho việc ứng dụng sản xuất vắc xin với hiệu giá virus 10^8 TCID₅₀/ml vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm.

Từ khóa: Cytodex 1; EV71; vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng; Vero cell; Wave bioreactor.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

Bệnh TCM là một bệnh truyền nhiễm phổ biến ở trẻ em, nhất là trẻ dưới 5 tuổi tại khu vực châu Á Thái Bình Dương. Ước tính mỗi năm có khoảng 1 triệu ca mắc bệnh TCM trong khu vực [1]. Dấu hiệu nhận biết thường là xuất hiện những nốt mụn nước trên da trong khoang miệng, lòng bàn tay và bàn chân, ở móng hoặc quanh hậu môn. Bệnh có thể diễn biến nặng và gây biến chứng nguy hiểm như viêm não, màng não, viêm cơ tim, phù phổi cấp dẫn đến tử vong [2]. Cho đến nay bệnh vẫn chưa có thuốc điều trị, vắc xin đang là cách thức tốt nhất để kiểm soát dịch bệnh. Vắc xin phòng bệnh TCM toàn phần bất hoạt được phát triển trên tế bào Vero đã được nghiên cứu tại một số nước như Singapore, Hàn Quốc và Trung Quốc, tuy nhiên chúng sử dụng được lựa chọn và đánh giá trên các chủng đang lưu hành tại từng quốc gia [3] và hiệu quả bảo vệ của chúng đối với các chủng lưu hành tại Việt Nam hầu như chưa được ghi nhận. Trong quy trình sản xuất vắc xin toàn phần bất hoạt, việc thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào và virus đạt năng suất cao phục vụ sản xuất kháng nguyên là một khâu quan trọng góp phần tiết kiệm thời gian, chi phí, tăng hiệu quả sản xuất. Việc sử dụng các hệ thống nuôi cấy huyền phù bioreactor kết hợp các giá mang vi thể (microcarrier) là giải pháp tăng năng suất được áp dụng rộng rãi hiện nay trong các công nghệ sản xuất vắc xin dựa trên nuôi cấy tế bào [4]. Với mong muốn phát triển vắc xin toàn phần bất hoạt phòng bệnh TCM do EV71 dựa trên chủng lưu hành tại Việt Nam, trong phạm vi nghiên

cứ này, các tác giả thực hiện nghiên cứu thiết lập quy trình nuôi cấy virus EV71 trên tế bào Vero trong hệ thống Wave bioreactor kết hợp giá mang vi thể nhằm phục vụ việc sản xuất kháng nguyên EV71 cho vắc xin TCM do EV71 gây ra.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng virus EV71/B5 sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ mẫu bệnh phẩm được gửi đến Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, được phân lập, định danh và trải qua quá trình thích ứng và chọn lọc trên tế bào Vero cũng như đánh giá để chọn làm chủng ứng cử cho vắc xin TCM.

Tế bào: Dòng tế bào Vero (ECAAC No.88020401) được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cung cấp cho sản xuất vắc xin (ống tế bào mang tên W.H.O. VERO SEED LOT 10-87).

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Khoa Vi sinh Miễn dịch, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh trong thời gian từ năm 2014 đến năm 2018.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy tế bào Vero trong bình khuấy (Spinner flask) kết hợp giá mang vi thể: Các giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3 sau khi được xử lý theo hướng dẫn của nhà sản xuất được sử dụng trong bình khuấy thể tích 1 l với nồng độ 2 g/l trong 0,5 l môi trường. Tế bào Vero chuẩn bị trong các chai nuôi cấy chữ T được chuyển vào bình nuôi cấy ở mật

*Tác giả liên hệ: Email: vancao.pasteur@gmail.com

Culture of EV71 virus in wave bioreactor system for production of hand, foot and mouth disease vaccine

Thi Yen Nhi Nguyen^{1,2}, Thi Hanh Lan Nguyen¹,
Ngoc Khanh Quynh Hoang¹, Thi Lien Le¹,
Ha Tam Duong Le¹, Thi Bao Van Cao^{1,3*}

¹Pasteur Institute in Ho Chi Minh City,

167 Pasteur Street, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

²University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Vanco Medipharma Technology Institute,

7 C22 Street, Ward 12, Tan Binh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 April 2022; revised 4 May 2022; accepted 9 May 2022

Abstract:

The study was carried out to establish an EV71 virus culture system on Vero cells in a shake culture system (Wave bioreactor) incorporating microcarriers for the production of hand, foot and mouth (HFMD) vaccine caused by the EV71 virus. The results of the investigation of 2 types of microcarriers (Cytodex 1 and Cytodex 3), showed that Cytodex 1 gave better efficiency when culturing Vero cells in suspension conditions. The combination with Cytodex 1 on the Wave bioreactor system gave Vero cell culture efficiency of over 3×10^6 cells/ml. The optimal infectious dose of EV71 virus on Vero cells was determined to be 0.0001 TCID₅₀/ml. The optimisation of EV71 virus culture conditions on the Wave bioreactor system has obtained suitable results for the production of vaccine with virus titres 10^8 TCID₅₀/ml on the fifth day after infection. The procedure of production of EV71 virus on Vero cell in Wave bioreactor system was applicable in vaccine production with virus titres 10^8 TCID₅₀/ml on the fifth day after infection.

Keywords: Cytodex 1, EV71, HFMD vaccine, Vero cell, Wave bioreactor.

Classification number: 3.3

độ $1,5 \times 10^4$ - $2,0 \times 10^4$ tế bào/cm² trong môi trường DMEM 10% huyết thanh bào thai bê (FBS), ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, tốc độ khuấy 40 vòng/phút.

Để xác định số lượng tế bào nhân lên trên các giá mang vi thể, phương pháp đếm nhân tế bào thường được sử dụng. Tế bào được xử lý bằng môi trường nhược trương có chất nhuộm để giải phóng nhân. Mẫu huyền phù từ bình nuôi cấy được ly tâm, huyền phù cận giá mang vi thể trong dung dịch nhuộm nhân gồm acid citric 0,1 M có chứa tím tinh thể 0,1%, ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau đó, thực hiện đếm nhân tế bào trên buồng đếm hồng cầu.

Nuôi cấy tế bào Vero trong hệ thống Wave bioreactor kết hợp Cytodex 1: Hạt Cytodex được sử dụng trong hệ thống Wave bioreactor 20/50 EHT với mật độ là 5 g/l. Giá mang vi thể được ổn định trong DMEM 10% FBS ở điều kiện lắc 11 vòng/phút, góc lắc 5°, 37°C từ 1 đến 2 giờ trước khi thêm tế bào dùng nuôi cấy tế bào Vero trong các chai nuôi cấy chữ T chuẩn bị trước cấy vào bioreactor với mật độ $2,0 \times 10^4$ tế bào/cm². Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện lắc không liên tục: giai đoạn tế bào bám trên giá mang (tốc độ lắc 16 vòng/phút, góc lắc 5°, thời gian 2 phút; sau đó dừng trong 18 phút, các bước này lặp lại trong vòng 6 giờ); giai đoạn bắt đầu tăng sinh trong 24 giờ tiếp theo hệ thống được duy trì trong điều kiện tốc độ lắc 11 vòng/phút, góc lắc 4°; cuối cùng là giai đoạn tăng sinh ổn định với tốc độ lắc 12 vòng/phút, góc lắc 6° [5].

Gây nhiễm virus EV71: Trong thí nghiệm khảo sát liều gây nhiễm, virus EV71 được gây nhiễm trên chai nuôi cấy chữ T khi tế bào một lớp phủ 90% bề mặt nuôi cấy. Dung dịch virus được pha loãng theo các liều gây nhiễm đã khảo sát và cho hấp phụ trên bề mặt tế bào trong vòng 30 phút, sau đó bổ sung môi trường DMEM 2% FBS, ủ ở 37°C và 5% CO₂. Thu hoạch virus khi tế bào bị hủy hoại hoàn toàn và cất giữ ở -80°C.

Với hệ thống Wave bioreactor, khi tế bào phủ 90% bề mặt hạt Cytodex, virus EV71 được bổ sung vào dịch huyền phù tế bào đang nuôi cấy với liều gây nhiễm phù hợp trong điều kiện lắc liên tục. Điều kiện nuôi cấy trong môi trường DMEM 2% FBS, ở 37°C và 5% CO₂.

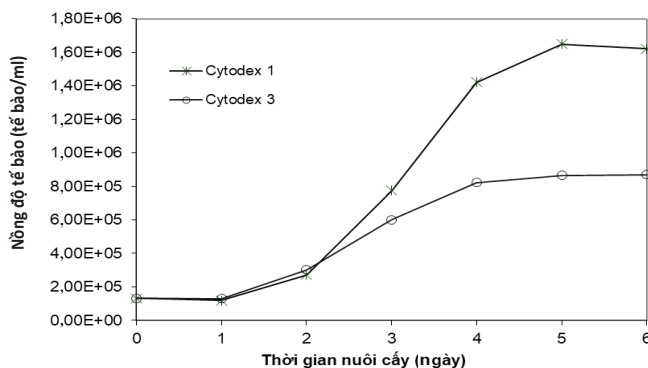
Xác định hiệu giá virus: Hiệu giá virus được xác định bằng TCID₅₀. Tế bào Vero được nuôi cấy trên phiến 96 giếng với mật độ 2×10^4 tế bào/giếng trong 24 giờ, sau đó được gây nhiễm với một dãy nồng độ virus 10^{-1} - 10^{-10} EV71 pha loãng trong môi trường DMEM có bổ sung 5% FBS, ủ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂. Kết quả được ghi nhận sau 5 ngày gây nhiễm. Giá trị TCID₅₀ được xác định theo phương pháp Reed - Muench.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. So sánh hiệu quả nuôi cấy tế bào Vero trên 2 loại giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3

Nhằm lựa chọn một loại giá mang vi thể cho hiệu suất nuôi cấy tế bào cao nhất, nhóm tác giả chọn đánh giá 2 loại hạt là Cytodex 1 và Cytodex 3 nuôi cấy trong bình khuấy spinner nuôi cấy. Cytodex 1 được tạo thành bằng việc thay thế một mạng lưới dextran liên kết chéo bởi một nhóm N,N-diethylaminoethyl mang điện tích dương. Trong khi đó, Cytodex 3 được phủ một lớp mỏng collagen biến tính lên mạng lưới dextran liên kết chéo hỗ trợ rất tốt cho sự bám dính và phát triển các dòng tế bào trong điều kiện nuôi cấy không bổ sung protein [6].

Đường cong tăng trưởng cho thấy, thời gian pha ở 2 loại hạt tương tự nhau, kéo dài khoảng 24 giờ. Sự phát triển trên Cytodex 3 đạt cực đại ở mức $8,7 \times 10^5$ tế bào/ml và sớm đi vào pha ổn định hơn so với hạt Cytodex 1 (hình 1). Nồng độ tế bào cao nhất trên Cytodex 1 đạt $1,65 \times 10^6$ tế bào/ml sau 5 ngày nuôi cấy. Sự khác nhau về hiệu quả nuôi cấy đạt được trên 2 loại hạt được lý giải bởi diện tích bề mặt nuôi cấy của 2 loại hạt này khác nhau với cùng một khối lượng hạt ($4400 \text{ cm}^2/\text{g}$ với Cytodex 1 và $2700 \text{ cm}^2/\text{g}$ với Cytodex 3) trong cùng một thể tích môi trường và mật độ tế bào ban đầu. Như vậy, với tổng diện tích nuôi cấy nhỏ hơn ở Cytodex 3, mật độ tế bào sẽ sớm đi vào pha ổn định và suy tàn do đạt đến mật độ phủ hoàn toàn.



Hình 1. Sự phát triển của tế bào Vero trên 2 loại giá mang vi thể Cytodex 1 và Cytodex 3.

Trong các hệ thống bình khuấy spinner nuôi cấy, hạt Cytodex 1 thường được cấy với mật độ tối đa 5 g/l môi trường và đạt được năng suất tế bào xấp xỉ 2×10^6 tế bào/ml trong 4 hoặc 5 ngày nuôi cấy [7], tương đương với năng suất của chúng tôi đạt được trong khi nghiên cứu này sử dụng mật độ hạt thấp hơn là 2 g/l.

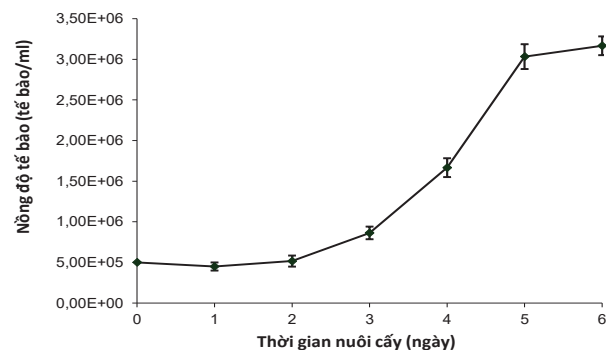
3.2. Nuôi cấy tế bào Vero trên hệ thống wave bioreactor với giá thể Cytodex 1

Với những ưu thế của nuôi cấy tế bào trên giá mang vi thể trong hệ thống huyền phù, khảo sát việc sử dụng 2 loại giá mang vi thể là Cytodex 1 và Cytodex 3 trên hệ thống

bình khuấy cho thấy hạt Cytodex 1 có hiệu quả nuôi cấy cao hơn với mật độ tế bào cao hơn trong một đơn vị thể tích. Dựa vào đó, nhóm nghiên cứu tiếp tục khảo sát việc nuôi cấy tế bào Vero trên hệ thống nuôi cấy lắc nhằm tăng thể tích nuôi cấy và chủ động trong khâu kiểm soát các điều kiện nuôi cấy.

Tế bào Vero được cấy vào với mật độ 5×10^5 tế bào/ml. Ngày thứ 1 và 2 sau nuôi cấy, mật độ tế bào có xu hướng giảm do tỷ lệ bám dính trên các giá mang vi thể không đạt 100% và đây là giai đoạn tế bào chưa tăng sinh nhiều. Ngày thứ 3 đến 5 sau nuôi cấy là giai đoạn tăng trưởng pha log, sau 5 ngày nuôi cấy (hình 2), tế bào phủ đều giá mang vi thể và đạt mật độ trung bình đạt $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml, sau đó sự phát triển của tế bào có xu hướng tăng trưởng chậm lại và giảm do đã đạt mức độ phủ kín bề mặt giá mang vi thể.

Hạt Cytodex thường được sử dụng với mật độ 0,5-5 g/l, nếu có sự bổ sung môi trường thích hợp, kiểm soát không khí và pH có thể sử dụng nhiều hơn 5 g/l [8]. Trong nghiên cứu này, với hệ thống Wave bioreactor, chúng tôi sử dụng mật độ hạt 5 g/l và đạt mật độ tế bào trung bình $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml, tương đương với nghiên cứu sử dụng hệ thống lắc Wave bioreactor tương tự trước đây [9].

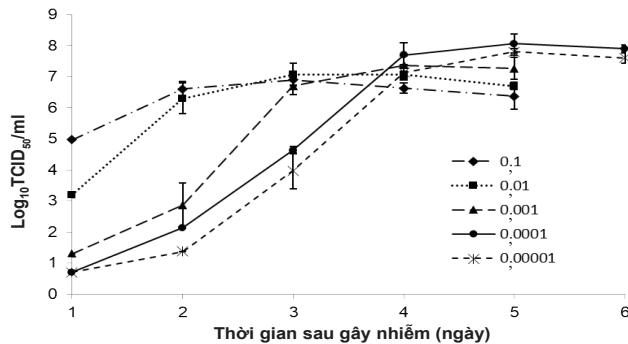


Hình 2. Mật độ tế bào trên hệ thống Wave bioreactor.

3.3. Khảo sát liều gây nhiễm tối ưu và thời gian thu hoạch virus

Liều gây nhiễm của virus là số virus cần đưa vào trên tổng số tế bào, cần khảo sát để xác định liều gây nhiễm tối ưu nhằm đạt được hiệu quả lây cao nhất, hay nói cách khác là thu được lượng virus cao nhất phục vụ cho việc sản xuất kháng nguyên. Ở đây chúng tôi khảo sát các liều gây nhiễm 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 và 0,00001 TCID₅₀/tế bào trên chai nuôi cấy chữ T. Kết quả khảo sát cho thấy, tại liều gây nhiễm 0,1 và 0,01 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus tăng rất nhanh vào ngày thứ 1 sau gây nhiễm và đạt cực đại vào ngày thứ 2-3 sau gây nhiễm với hiệu giá trung bình đạt khoảng 7 TCID₅₀/ml. Với liều gây nhiễm 0,001 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus đạt tăng chậm hơn, sau ngày thứ 3 hiệu giá virus mới đạt cao nhất tại mức khoảng 7 TCID₅₀/ml. Với các liều gây nhiễm 0,0001 và 0,00001 TCID₅₀/tế bào, hiệu giá virus tăng chậm nhất, sau 5 ngày nuôi cấy hiệu giá đạt cao nhất

với trung bình khoảng 10^8 TCID₅₀/ml và giảm dần những ngày sau đó. Hiệu giá virus đạt được sau nuôi cấy liều gây nhiễm 0,00001 và 0,0001 TCID₅₀/tế bào không có khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên, đường cong tăng trưởng của virus sau gây nhiễm ở liều gây nhiễm 0,00001 thấp hơn so với liều 0,0001 TCID₅₀/tế bào (hình 3) thể hiện xu hướng giảm dần của sự tăng trưởng nên chúng tôi chọn liều gây nhiễm 0,0001 TCID₅₀/ml để trên hệ thống nuôi cấy sản xuất kháng nguyên.



Hình 3. Sự nhân lên của virus với các liều gây nhiễm khác nhau.

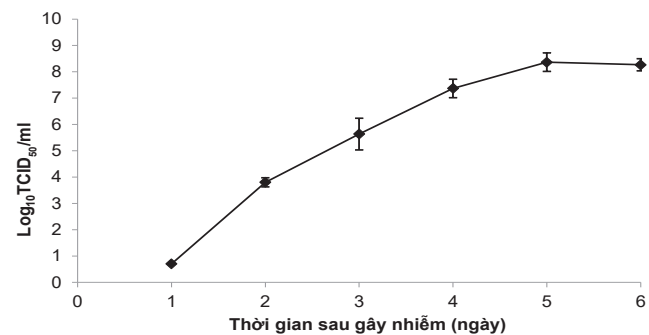
Kết quả này cũng được ghi nhận bởi nhiều nghiên cứu trước đây, không chỉ với virus EV71 mà còn với những virus khác sau quá trình thích nghi trên dòng tế bào nuôi cấy như virus cúm [10, 11]. Nguyên nhân được lý giải là khi được gây nhiễm với liều gây nhiễm cao, ngay lập tức các virus được cấy vào sẽ xâm nhập toàn bộ các tế bào trong chai nuôi cấy dẫn đến hiệu giá tăng lên rất nhanh, tuy nhiên khi toàn bộ tế bào bị xâm nhập và phá hủy nhanh chóng, chúng sẽ không thể tiếp tục nhân lên thêm trong bình nuôi cấy làm các virus vừa sinh ra không còn tế bào để xâm nhập dẫn đến việc mặc dù tăng sinh rất nhanh nhưng hiệu giá virus không cao. Với những liều gây nhiễm đủ nhỏ 10^{-5} - 10^{-6} TCID₅₀/tế bào, khi mới bắt đầu được gây nhiễm, chỉ một lượng nhỏ các tế bào bị xâm nhập, các tế bào khỏe mạnh còn lại sẽ tiếp tục tăng sinh lấp vào khoảng trống của các tế bào đã chết, nhờ đó mà các thế hệ virus về sau vẫn còn tế bào để xâm

nhập nhiều vòng đời hơn dẫn đến hiệu suất tăng sinh cao hay virus sẽ đạt hiệu giá cao hơn.

3.4. Khảo sát thời điểm thu hoạch virus trên hệ thống Wave bioreactor

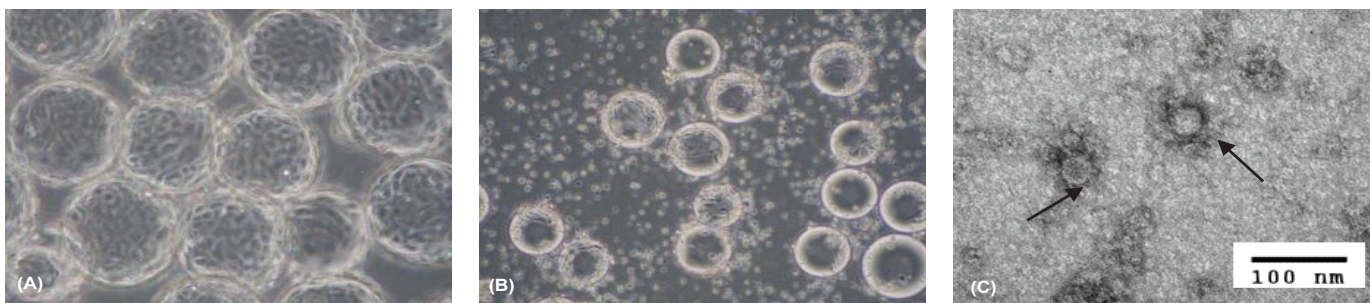
Thông thường trên các hệ thống nuôi cấy không huyền phù như chai chữ T hay chai xoay, virus sẽ được thu hoạch khi các tế bào đã bị xâm nhập và phá hủy hoàn toàn. Tuy nhiên trên các hệ thống nuôi cấy huyền phù, việc quan sát tế bào không thuận tiện nên cần xác định thời gian thu mẫu tối ưu để chủ động và chuẩn hoá các khâu của quy trình. Với liều gây nhiễm tối ưu đã được xác định ở trên là 0,0001 TCID₅₀/tế bào, chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian thu mẫu cho sản lượng virus cao nhất trong nuôi cấy trên hệ thống lắc Wave bioreactor.

Kết quả khảo sát hiệu giá virus theo thời gian trên hệ thống Wave bioreactor cho thấy, sau 2 ngày nuôi cấy virus đạt hiệu giá 10^3 - 10^4 TCID₅₀/ml và tiếp tục tăng cho đến ngày thứ 5 đạt hiệu giá cao nhất $\sim 10^8$ TCID₅₀/ml, sau đó hiệu giá virus ổn định và có xu hướng giảm (hình 4).



Hình 4. Thời gian nhân lên của virus trên hệ thống Wave bioreactor.

Như vậy, chúng tôi chọn mốc thời thời thu hoạch virus là vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm, khi hầu hết các tế bào đã bị virus hủy hoại (hình 5). Trong nghiên cứu của J.Y. Chang và cs (2012) [12], virus EV71 được nuôi cấy trên tế bào Vero trong hệ thống chai xoay với liều gây nhiễm 10^{-5} TCID₅₀/tế



Hình 5. Sự hủy hoại bào sau gây nhiễm virus. (A) Tế bào Vero trên các hạt microcarrier tại thời điểm gây nhiễm virus; (B) Tế bào Vero bị virus xâm nhập và hủy hoại sau 5 ngày nuôi cấy; (C) Hình ảnh virus EV71 trong dịch nuôi cấy được chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (vị trí mũi tên).

bào, hiệu giá virus cũng được ghi nhận tăng nhanh từ ngày ngày thứ 2 và đạt được cao nhất vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm với khoảng $3-5 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

4. Kết luận

Từ việc khảo sát hiệu quả nuôi cấy trên các loại giá mang vi thể khác nhau, chúng tôi đã chọn được hạt Cytodex 1 và ứng dụng vào hệ thống nuôi cấy Wave bioreactor. Trên hệ thống này, năng suất tế bào Vero đạt được cao nhất là $3,2 \times 10^6$ tế bào/ml. Liều gây nhiễm tối ưu được xác định là 0,0001 TCID₅₀/ml, hiệu giá virus EV71 trên hệ thống Wave bioreactor đạt $\sim 10^8$ TCID₅₀/ml sau 5 ngày nuôi cấy. Hiệu quả này có thể ứng dụng trong việc sản xuất kháng nguyên cho vắc xin EV71.

LỜI CẢM ƠN

Chúng sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Phòng Xét nghiệm virus đường ruột, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. Zhao, F. Jiang, L. Zhong, et al. (2016), "Age patterns and transmission characteristics of hand, foot and mouth disease in China", *BMC Infect. Dis.*, **16**(1), DOI: 10.1186/s12879-016-2008-y.

[2] P. Chong, C.C. Liu, Y.H. Chow, et al. (2015), "Review of enterovirus 71 vaccines", *Clin. Infect. Dis.*, **60**(5), pp.797-803, DOI: 10.1093/cid/ciu852.

[3] M.L. Li, S.R. Shih, B.S. Tolbert, et al. (2021), "Enterovirus A71 vaccines", *Vaccines*, **9**(3), DOI: 10.3390/vaccines9030199.

[4] S. Kiesslich, A.A. Kamen, "Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines", *Biotechnol. Adv.*, **44**, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107608.

[5] H.T.K. Chi (2013), *Research on the Process of Culturing and Obtaining Enterovirus Type 71 Using Vero Cells*, Master's thesis, VNU-HCM University of Science (in Vietnamese).

[6] K. Wierzbowski, A. Kuźmińska, M. Pilarek (2021), "Intensification of chondrocytes proliferation by microcarriers and wave-induced mixing: Reynolds number influence on CP5 cells growth", *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, **166**, DOI: 10.1016/j.cep.2021.108472.

[7] Y.F. Tseng, A.Y.C. Hu, M.L. Huang, et al. (2011), "Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: Implications for pandemic preparedness", *PLOS ONE*, **6**(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0024057.

[8] G. Blüml (2007), "Microcarrier cell culture technology", *Animal Cell Biotechnology*, **24**, pp.149-178, DOI: 10.1007/978-1-59745-399-8_5.

[9] J. Yang, P. Guertin, G. Jia, et al. (2019), "Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors", *AMB Express*, **9**(1), DOI: 10.1186/s13568-019-0794-5.

[10] A. Abdoli, H. Soleimanjahi, M.T. Kheiri, et al. (2013), "Determining influenza virus shedding at different time points in Madin-Darby canine kidney cell line", *Cell*, **15**(2), pp.130-135.

[11] G. Gränicher, J. Coronel, A. Pralow, et al. (2019), "Efficient influenza A virus production in high cell density using the novel porcine suspension cell line PBG.PK2.1", *Vaccine*, **37**(47), pp.7019-7028, DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.04.030.

[12] J.Y. Chang, C.P. Chang, H.H.P. Tsai, et al. (2012), "Selection and characterization of vaccine strain for Enterovirus 71 vaccine development", *Vaccine*, **30**(4), pp.703-711, DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.11.087.

Tổng hợp và thử hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế con đường quorum sensing

Trương Thanh Tùng^{1,2*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa, phố Nguyễn Trác, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu tiên tiến Phenikaa, Trường Đại học Phenikaa, 167 Hoàng Ngân, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/1/2022; ngày chuyển phản biện 20/1/2022; ngày nhận phản biện 14/2/2022; ngày chấp nhận đăng 18/2/2022

Tóm tắt:

Quorum sensing (QS) là định nghĩa mô tả một quá trình trao đổi thông tin qua lại lẫn nhau của vi khuẩn. Bằng cách ức chế quá trình này, các chất hoá học có thể cắt đứt quá trình trao đổi “thông tin” giữa các vi khuẩn với nhau. Từ đó ngăn chặn các phản ứng quá mức của vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn cộng sinh trên cơ thể người, như quá trình sản sinh các độc tố, hình thành cấu trúc biofilm hoặc các cơ chế gây bệnh khác. Trong nghiên cứu này, tác giả tiến hành tổng hợp, thử hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế QS và đã tổng hợp thành công 5 dẫn chất bằng phương pháp vi sóng. Kết quả thử nghiệm hoạt tính cho thấy, chất 2 và 5 ức chế trung bình hoạt động của QS so với chất chuẩn 4-Nitropyridine-1-oxide (4NPO) với giá trị IC_{50} tương ứng là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$. Kết quả của nghiên cứu mở ra một khung chất mới cho phát triển thuốc trong tương lai.

Từ khóa: benzothiazol-2-thiol, kháng khuẩn, QS, trực khuẩn mủ xanh, vi sóng.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Lạm dụng kháng sinh và sự ra tăng của vi khuẩn kháng kháng sinh là một vấn đề nghiêm trọng trên lâm sàng tại Việt Nam và trên thế giới. Do đó, nghiên cứu tìm kiếm các thuốc thay thế kháng sinh, không kháng chéo với kháng sinh là rất cấp bách hiện nay [1].

Vi khuẩn sử dụng con đường QS để giao tiếp qua lại lẫn nhau. Thông qua quá trình này, vi khuẩn sản sinh ra các phân tử hoá học “thông tin” nhằm truyền đạt cho nhau những thay đổi về môi trường xung quanh như sự có mặt của các chất dinh dưỡng, sự yếu đi của vật chủ, hoặc các tác nhân gây hại [2]. Ngoài ra, thông qua cơ chế QS, các vi khuẩn có thể tập hợp lại với nhau hình thành các cấu trúc biofilm gây khó khăn cho việc điều trị [2, 3]. Khi hệ miễn dịch của con người yếu đi, các vi khuẩn sống cộng sinh trên cơ thể trao đổi “thông tin” này cho nhau thông qua cơ chế QS, từ đó tăng sinh và gây ra quá trình nhiễm khuẩn trên người. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc ức chế con đường QS sẽ cắt đứt quá trình liên lạc của vi khuẩn, từ đó ức chế quá trình tăng sinh của vi khuẩn gây bệnh. Quan trọng hơn, các chất ức chế QS không gây độc tính trực tiếp lên vi khuẩn (không kháng khuẩn), do đó việc đề kháng của vi khuẩn với các chất sẽ khó hơn các kháng sinh truyền thống [4-6].

Hiện nay, các nhà khoa học trên thế giới đang tập trung nghiên cứu các hợp chất mới hướng ức chế con đường QS. Tiêu biểu như các chất có cấu trúc tương tự như chất dẫn truyền QS mang khung lacton [7], chất có nguồn gốc tự nhiên như acid fusaric [8], chất có nguồn gốc là thuốc như aspirin [9]. Việc

phát hiện và sử dụng các chất ức chế QS như một biện pháp điều trị độc lập, hoặc kết hợp với kháng sinh đang mở ra một con đường điều trị mới cho các bệnh nhân đa kháng thuốc [10].

Trực khuẩn mủ xanh (vi khuẩn gram âm *Pseudomonas aeruginosa*) là một trong những vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên người như nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới, nhiễm khuẩn tiết niệu, viêm màng não, viêm màng trong tim. Hiện nay, vi khuẩn này có khả năng kháng kháng sinh truyền thống mạnh và nằm trong danh mục ưu tiên nghiên cứu phương pháp điều trị mới của Tổ chức Y tế thế giới [11]. Do đó, phát triển các thuốc kháng khuẩn mới với cơ chế mới trên trực khuẩn mủ xanh sẽ đem lại lợi ích cho bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo quá trình tổng hợp và thử kết quả hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế QS của vi khuẩn gram âm *P. aeruginosa*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Hoá chất được mua từ các nhà cung cấp bao gồm Sigma Aldrich (Singapore), Alfa Aesar (Hàn Quốc), dung môi Deajung Hàn Quốc với độ tinh khiết trên 98% và được sử dụng trực tiếp không tinh chế thêm. Phản ứng được tiến hành trên thiết bị phản ứng vi sóng WBFY-205 (Keda Machinery and Instrument Equipment Co. Ltd.), được theo dõi bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (SKLM) sử dụng bản mỏng Merck Kieselgel 60F₂₅₄ (Singapore) và quan sát dưới đèn UV hoặc hiện màu bằng kỹ thuật dung dịch thuốc thử KMnO₄ (Trung Quốc), ninhydrin (Trung Quốc). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker Avance 400/500 MHz với chất chuẩn nội

*Email: tung.truongthanh@phenikaa-uni.edu.vn

Synthesis and biological evaluation of some benzothiazole-2-thiol derivatives as potent quorum sensing inhibitors

Thanh Tung Truong^{1, 2*}

¹Faculty of Pharmacy, Phenikaa University,

Nguyen Trac Street, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

²Phenikaa Institute for Advanced Study, Phenikaa University,

167 Hoang Ngan Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 14 January 2022; revised 14 February 2022; accepted 18 February 2022

Abstract:

QS is a well-known mechanism of bacteria cell-to-cell communication. By inhibiting the quorum sensing pathway, compounds can prevent the aggressive activity of bacteria, including virulence production, biofilm formation, and other pathogenesis. Herein, the authors reported the synthesis and biological evaluation of several benzothiazole-2-thiols toward quorum sensing activities. As a result, five compounds are successfully synthesised using microwave methodology in good yields. In terms of bioactivity, compounds 2, 5 showed moderated quorum sensing inhibitory activity with IC_{50} of 212.03 ± 2.17 and 198.11 ± 3.48 $\mu\text{g/ml}$, respectively, in comparison to that of reference compound 4NPO. This research provides a novel template for future drug discovery and development.

Keywords: antibacterial, benzothiazole-2-thiol, microwave, *Pseudomonas aeruginosa*, QS.

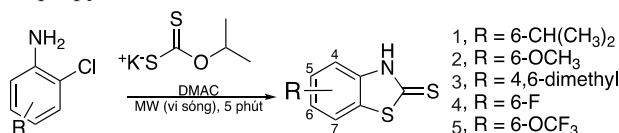
Classification number: 3.4

TMS. Phổ khối được đo trên máy LC-TOF/MS Agilent theo phương pháp ion hoá phun mù điện tử (ESI), tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Kết quả thử hoạt tính được tiến hành với sự hỗ trợ của Bệnh viện Đại học Copenhagen, Đan Mạch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp các chất được thực hiện một bước bằng phản ứng đóng vòng của các dẫn chất 2-chloro-anilin và muối kali O-isopropylxanthic acid theo sơ đồ ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp các dẫn chất benzothiazol-2-thiol.

Thử hoạt tính kháng khuẩn: Vi khuẩn được sử dụng là *P. aeruginosa* ATCC27853 được mua từ ATCC, Manassas, Hoa Kỳ. Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp Broth microdilution [12]. Các chất được thử nồng độ tới 512 $\mu\text{g/ml}$.

Hoạt tính ức chế QS: Thử nghiệm hoạt tính ức chế QS được tiến hành theo phương pháp đã được công bố trước đây [12, 13]. Đoạn gen mã hoá QS *lasB-gfp* của *P. aeruginosa* được sử dụng để nghiên cứu. Tế bào được nuôi ở nhiệt độ 37°C (tốc độ lắc 180 rpm) trong 20 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được pha loãng tới điểm OD450 là 0,1. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng. 4NPO được sử dụng làm chất chứng dương. Dung môi dimethylsulfoxid (DMSO) được sử dụng là chứng âm. Các chất tổng hợp được và chất chứng 4NPO được đưa vào các môi trường có chứa vi khuẩn trong đĩa 96 giếng. Giá trị về phát triển của vi khuẩn và tín hiệu huỳnh quang của protein tín hiệu được ghi lại (GFP - Green fluorescent protein). Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 34°C và đo mỗi 15 phút. Giá trị đo quang được tiến hành ở bước sóng 485 và 535 nm.

Phương pháp tổng hợp chung: Cho vào 10 ml bình phản ứng một hỗn hợp bao gồm dẫn chất tương ứng của 2-chloro-anilin (100 mg), muối kali O-isopropylxanthic (PIX) với tỷ lệ mol 1:2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 8 ml dung môi dimethylacetamid (DMAC). Hỗn hợp phản ứng sau đó được đun nóng trong 5 phút ở 150°C bằng thiết bị vi sóng (750 W, hấp thụ cao). Tiếp đến làm lạnh hỗn hợp phản ứng tới nhiệt độ phòng và thêm vào 10 ml nước cất. Hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh tới pH khoảng 3-4 bằng dung dịch acid HCl loãng (nồng độ 1 M). Cuối cùng, để yên hỗn hợp trong 30 phút tại nhiệt độ phòng cho kết tủa tạo thành. Tủa được lọc và rửa lại 3 lần với nước cất, làm khô ở 60°C trong tủ sấy thu được sản phẩm tinh khiết.

2.3. Xác định cấu trúc

Các chất được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ, phổ khối, kết quả cụ thể như sau:

Chất 1-6-isopropylbenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong acetone nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 76%. Nhiệt độ nóng chảy 256°C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,57 (br, 1H, H-benzothiazol), 7,27 (br, 2H, H- benzothiazol), 2,94 (m, 1H, CH), 1,23 (dd, J=8,6 Hz, J=1,6 Hz, 6H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 189,6, 145,2, 140,4, 130,2, 126,1, 119,5, 112,8, 33,7 và 24,4. HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ tính toán: 210,0411, tìm thấy: 210,0413.

Chất 2-6-methoxybenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong acetone nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 82%. Nhiệt độ nóng chảy 252°C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13,6 (s, 1H, NH), 7,32 (br, 1H, H-benzothiazol), 7,24 (br, 1H, H-benzothiazol), 6,98 (br, 1H, H-benzothiazol), 3,76 (br, 3H, OCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 188,8, 157,1, 135,7, 131,2, 115,2, 113,5, 106,3 và 56,2. HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ tính toán: 198,0047, tìm thấy 198,0048.

Chất 3-4,6-dimethylbenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong acetone nóng thu được bột tinh khiết mà không

cần tinh chế thêm. Hiệu suất 90%. Nhiệt độ nóng chảy 259°C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 13,5 (s, 1H, NH), 7,27 (s, 1H, H-benzothiazol), 6,99 (s, 1H, H-benzothiazol), 2,39 (s, 3H, 4- CH_3), 2,29 (s, 3H, 6- CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 189,9, 138,6, 134,1, 129,7, 129,6, 122,7, 119,2, 21,0 và 17,9. HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 196,0253, tìm thấy: 196,0255.

Chất 4-6-Fluorobenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong aceton nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 90%. Nhiệt độ nóng chảy 275°C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 13,8 (s, 1H, NH), 7,61 (dd, $J=8,5$ Hz, $J=2,6$ Hz, H-benzothiazol), 7,27 (dd, $J=8,9$ Hz, $J=4,7$ Hz, H-benzothiazol), 7,21-7,24 (td, $J=2,6$ Hz, $J=2,6$ Hz, H-benzothiazol). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 190,4, 159,6 (d, $J=242,0$ Hz), 138,4, 131,2 (d, $J=11,0$ Hz), 115,2 (d, $J=24,4$ Hz), 113,8 (d, $J=9,0$ Hz), 109,3 (d, $J=27,4$ Hz). HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 185,9847, tìm thấy: 185,9847.

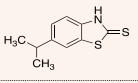
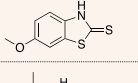
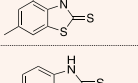
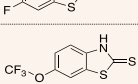
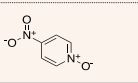
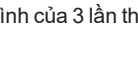
Chất 5-6-(trifluoromethoxy)benzo[d]thiazol-2-thiol (13): Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong aceton nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 67%. Nhiệt độ nóng chảy 273°C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 7,85 (d, $J=2,2$ Hz, 1H, H-benzothiazol), 7,39 (q, $J=8,9$ Hz, $J=8,8$ Hz, 2H, H-benzothiazol). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 191,2, 145,2, 140,9, 131,3, 121,8, 121,1, 115,6 và 113,8. HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 251,9763, tìm thấy: 251,9764.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

Kết quả các chất thử hoạt tính kháng khuẩn và ức chế QS được trình bày ở bảng 1.

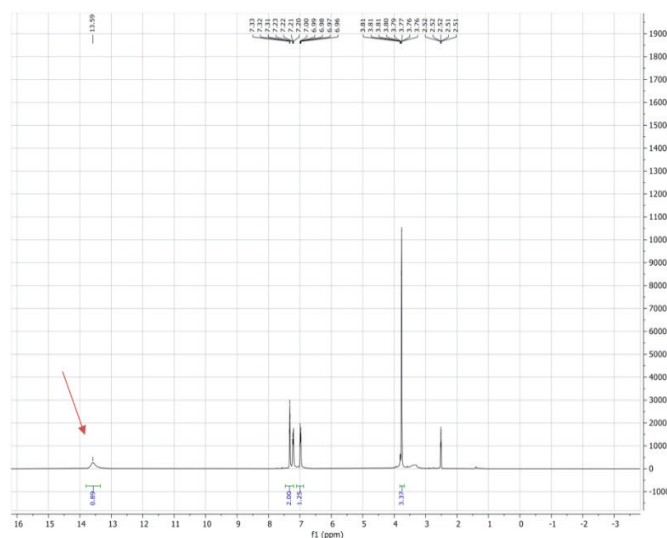
Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn và ức chế QS của các chất 1-5.

Chất	Công thức hoá học	MW	Hoạt tính kháng khuẩn	Hoạt tính ức chế QS
			MIC* ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)*
1		209,3	212,31±2,98	>300
2		197,3	>512	212,03±2,17
3		195,3	>512	>300
4		185,2	146,10±3,41	150,04±4,79
5		251,2	>512	198,11±3,48
4-NPO**		140,1	***	18,20±1,22

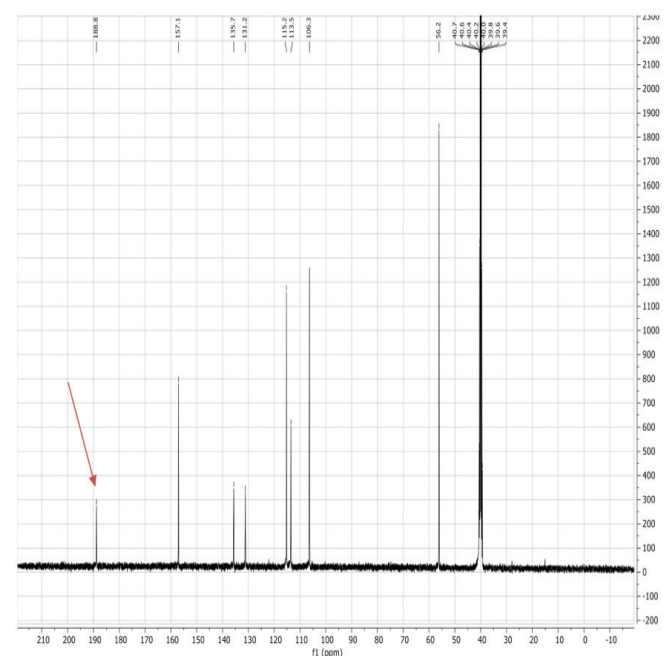
*: trung bình của 3 lần thử $p<0,05$; **: chất chứng dương; ***: không thử.

3.2. Bàn luận

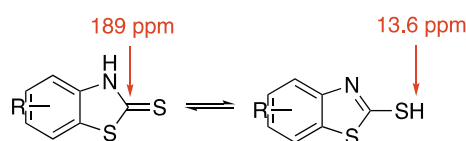
Các chất đã được tổng hợp thành công với hiệu suất tốt sử dụng hệ thống vi sóng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (đại diện chất 2) cho thấy giá trị peak đơn ở 13,6 ppm tương ứng với nhóm SH (hình 2). Tuy nhiên trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (hình 3), chất 2 cho thấy peak giá trị 189 ppm tương ứng với carbon trong nhóm $\text{C}=\text{S}$. Điều này cho thấy tồn tại quá trình chuyển hoá qua lại giữa hai dạng enol-keton của vòng benzothiazol ở dạng hoà tan (hình 4).



Hình 2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 2 với giá trị SH ở 13,6 ppm (mũi tên).



Hình 3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất 2 với giá trị carbon $\text{C}=\text{S}$ ở 189 ppm (mũi tên).



Hình 4. Hai dạng chuyển hoá qua lại keton-enol của sản phẩm trong dung dịch.

Về khả năng kháng khuẩn, các chất 1 và 4 có giá trị kháng khuẩn yếu với MIC tương ứng là $212,31 \pm 2,98$ và $146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó các chất 2, 3 và 5 không cho thấy tác dụng kháng khuẩn trong khoảng nồng độ dưới 512 $\mu\text{g/ml}$. Để thể hiện hoạt tính ức chế QS, các chất cần không gây nên sự ức chế phát triển của vi khuẩn trong khoảng nồng độ thử. Nếu chất có tác dụng “kìm khuẩn” hoặc “diệt khuẩn” đều làm giảm số lượng vi khuẩn, kéo theo giảm nồng độ của tín hiệu QS được sản sinh ra trong môi trường. Trong trường hợp này chất có khả năng ức chế QS là do tác dụng diệt khuẩn gây ra và không có ý nghĩa khoa học [2-6]. Kết quả thử hoạt tính ức chế QS cho thấy chất 1 và 3 không thể hiện hoạt tính ở nồng độ dưới 300 $\mu\text{g/ml}$. Chất 4 cho giá trị ức chế QS là $150,04 \pm 4,79$ $\mu\text{g/ml}$, tuy nhiên giá trị này tương đương với nồng độ kháng khuẩn của chất 4 (MIC = $146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$), do đó sự giảm hoạt động của QS gây ra là do khả năng ức chế phát triển vi khuẩn của chất 4. Tóm lại, chất 4 chỉ thể hiện khả năng kháng khuẩn mà không thể hiện khả năng ức chế QS.

Chất 2 và 5 không thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và có giá trị IC_{50} ức chế hoạt động QS tương ứng là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$. Do đó, chất 2 và 5 thể hiện rõ ràng khả năng ức chế con đường giao tiếp QS của vi khuẩn mà không tác động trực tiếp lên hoạt động bình thường của chúng. Nhìn chung, chất 2 và 5 thể hiện hoạt tính yếu hơn so với chất chuẩn 4NPO (IC_{50} là $18,20 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$). Tuy nhiên về mặt nghiên cứu phát triển thuốc mới, chất 2 và 5 là hai khung chất tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển các thuốc hướng ức chế QS trong tương lai. Về mặt liên quan cấu trúc và tác dụng sinh học, hai chất hoạt tính 2, 5 có nhóm thế dạng ethe với nguyên tử oxy gắn trực tiếp với vòng benzothiazol. Điều này không có ở các chất còn lại. Do đó, nguyên tử oxy có thể đóng vai trò quan trọng cho hoạt tính của vòng. Các nghiên cứu chuyên sâu phát triển thuốc mới cần lưu ý phát triển theo hướng giữ nguyên nguyên tố oxy này.

4. Kết luận

Chúng tôi đã tổng hợp thành công 5 dẫn chất benzothiazol-2-thiol bằng phương pháp vi sóng với hiệu suất tốt. Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ. Kết quả cho thấy có sự chuyển dạng enol-keton ở dạng hoà tan của các chất. Trước khi thử nghiệm hoạt tính ức chế QS, các chất được tiến hành thử khả năng kháng trực khuẩn mủ xanh (*P. aeruginosa*). Kết quả cho thấy, chất 1 và 4 ức chế hoạt động của vi khuẩn với MIC tương ứng là $212,31 \pm 2,98$ và

$146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$. Các chất còn lại không ảnh hưởng tới sự phát triển của vi khuẩn. Kết quả thử hoạt tính ức chế QS cho thấy, chất 2 và 5 thể hiện rõ khả năng ức chế với IC_{50} là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$ mà không ảnh hưởng tới vi khuẩn. Mặc dù kết quả ức chế QS yếu hơn so với chất chuẩn dương 4NPO (IC_{50} là $18,20 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$), kết quả của nghiên cứu cho thấy vòng benzothiazol-2-thiol có tiềm năng cho phát triển các chất ức chế mạnh hơn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ministry of Health (2021), “Drug resistance”, <https://amr.moh.gov.vn/category/khang-thuoc/>, accessed 9 February 2021 (in Vietnamese).
- [2] T.T. Tung, H.L. Xuan (2021), “‘Left-hand strategy’ for the design, synthesis and discovery of novel triazole-mercaptobenzothiazole hybrid compounds as potent quorum sensing inhibitors and anti-biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*”, *New Journal of Chemistry*, **45**(46), pp.21631-21637, DOI: 10.1039/D1NJ04436B.
- [3] T. Defoirdt, G. Brackman, T. Coenye (2013), “Quorum sensing inhibitors: How strong is the evidence?”, *Trends Microbiology*, **21**(12), pp.619-624, DOI: 10.1016/j.tim.2013.09.006.
- [4] P. Krzyzek (2019), “Challenges and limitations of anti-quorum sensing therapies”, *Front. Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.02473.
- [5] C.D. Sifri (2008), “Quorum sensing: Bacteria talk sense”, *Clinical Infectious Diseases*, **47**(8), pp.1070-1076, DOI: 10.1086/592072.
- [6] S.T. Rutherford, B.L. Bassler (2012), “Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**(11), DOI: 10.1101/cshperspect.a012427.
- [7] A. Muras, P. Otero-Casal, V. Blanc, et al. (2020), “Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in the oral cavity: A paradigm revisited”, *Scientific Reports*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-66704-4.
- [8] T.T. Tung, T.H. Jakobsen, T.T. Dao, et al. (2016), “Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **126**, pp.1011-1020, DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.11.044.
- [9] S.A. El-Mowafy, K.H.A.E. Galil, S.M. El-Messery, et al. (2014), “Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microbial Pathogenesis*, **74**, pp.25-32, DOI: 10.1016/j.micpath.2014.07.008.
- [10] Q. Jiang, J. Chen, C. Yang, et al. (2019), “Quorum sensing: A prospective therapeutic target for bacterial diseases”, *Biomed Res. Int.*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/2015978.
- [11] World Health Organization (2021), “WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed”, <https://who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, accessed 15 November 2021.
- [12] T. Bjarnsholt, M. van Gennip, T.H. Jakobsen, et al. (2010), “*In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect”, *Nat. Protoc.*, **5**(2), pp.282-293, DOI: 10.1038/nprot.2009.205.
- [13] M. Hentzer, K. Riedel, T.B. Rasmussen, et al. (2002), “Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound”, *Microbiology*, **148**(1), pp.87-102, DOI: 10.1099/00221287-148-1-87.

Kết quả xác định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu tại Hải Dương và Hà Nam

Trần Thị Lan, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Hương, Đặng Văn Hùng*

Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, phường Tràng Tiễn, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/11/2021; ngày chuyển phản biện 29/11/2021; ngày nhận phản biện 28/12/2021; ngày chấp nhận đăng 31/12/2021

Tóm tắt:

Tổng số 6 mẫu kim ngân hoa được thu thập ở các địa điểm thuộc TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam. Kết quả giám định tên khoa học của 6 mẫu thu thập cho thấy, có 4 mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng., 1 mẫu thuộc loài *L. confusa* DC. và 1 mẫu thuộc loài *L. japonica* Thunb.. Hàm lượng acid clorogenic của các mẫu thu thập biến động từ 0,011 đến 0,304%. Trong đó, mẫu thuộc loài *L. japonica* Thunb. có hàm lượng acid clorogenic cao nhất (0,304%), tiếp đến là *L. confusa* DC. (0,055%), các mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. có hàm lượng acid clorogenic trong khoảng 0,011-0,021%. Việc giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic giúp nhận diện các loài kim ngân hoa hiện đang có ở 2 tỉnh Hải Dương và Hà Nam, chọn ra được loài có chất lượng dược liệu (hàm lượng acid clorogenic) cao để trồng trong sản xuất.

Từ khóa: acid clorogenic, kim ngân hoa.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Chi *Lonicera* - kim ngân hoa trên thế giới có khoảng 180 loài, phân bố ở vùng Bắc Phi, châu Âu, Bắc Mỹ và châu Á. Ở Việt Nam, có 11 loài *Lonicera* phân bố tự nhiên từ miền Bắc cho tới Tây Nguyên.

Trên thế giới nhiều loài thuộc chi *Lonicera* được sử dụng làm thuốc để chữa các bệnh mụn nhọt, mẩn ngứa, dị ứng, viêm gan... Trong đó, loài kim ngân hoa (*L. japonica* Thunb.) là cây thuốc quan trọng đã được sử dụng hàng ngàn năm ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc... để điều trị viêm gan, biến chứng gan, cúm, vết thương và ung thư [1]. Kim ngân hoa là vị thuốc chủ đạo trong nhiều bài thuốc cổ phương như Ngân tiêu tán, Ngũ vị tiêu độc ẩm, Tiên phương hoạt mệnh ẩm. Y học hiện đại cũng đã có nhiều nghiên cứu chứng minh các tác dụng sinh học của kim ngân hoa như kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, kháng virus... [2, 3].

Do có giá trị y học cao nên kim ngân hoa đã được khai thác từ lâu và đến nay đang dần cạn kiệt trong tự nhiên, vì vậy việc đưa loài cây này vào gây trồng và nhân rộng để đáp ứng nhu cầu về dược liệu là cần thiết.

Hiện nay, người dân chủ yếu thu thập kim ngân hoa từ tự nhiên hoặc mua ở các đại lý cây giống về trồng mà chưa xác định rõ tên khoa học cũng như chất lượng dược liệu của nguồn giống. Do đó, việc giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng hoạt chất chính (acid clorogenic) của các mẫu kim ngân hoa là cần thiết để có cơ sở lựa chọn giống cây phù hợp khi trồng sản xuất dược liệu. Phạm vi

của nghiên cứu này tập trung xác định tên khoa học kết hợp phân tích các mẫu kim ngân hoa thu tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Tổng số 6 mẫu kim ngân hoa thu thập ở các điểm sinh thái khác nhau ở TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương và huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam được sử dụng để giám định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid clorogenic (bảng 1).

Bảng 1. Ký hiệu và nơi thu thập các mẫu kim ngân hoa trong thí nghiệm.

TT	Ký hiệu	Nơi thu thập
1	KN 01	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
2	KN 02	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
3	KN 03	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
4	KN 04	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương
5	KN 05	Sao Đỏ, Chí Linh, Hải Dương
6	KN 06	Thanh Tâm, Thanh Liêm, Hà Nam

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực vật:

- Thu thập mẫu ngoài thực địa: mẫu phục vụ phân tích thẩm định tên khoa học là mẫu tươi thu từ cây đang mọc hoặc trồng ngoài thực địa, mẫu là những đoạn cành lá mang hoa/quả có chiều dài 20-40 cm [4].

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

Results of the chlorogenic acid content assessment and scientific name identification of collected *Lonicera* samples in Hai Duong and Ha Nam provinces

Thi Lan Tran, Quynh Nga Nguyen,
Thi Phuong Nguyen, Thi Huong Nguyen, Van Hung Dang*

National Institute of Medicinal Materials,
3B Quang Trung Street, Trang Tien Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 24 November 2021; revised 28 December 2021; accepted 31 December 2021

Abstract:

A total of 6 *Lonicera* samples were collected in different ecological areas in Chi Linh town, Hai Duong province and Thanh Liem commune, Ha Nam province. The result of scientific name identification of 6 collected samples showed that 4 samples are *Lonicera macrantha* (D. Don) Spreng. species, 1 sample is *L. confusa* DC. species, and 1 sample is *L. japonica* Thunb. species. Chlorogenic acid contents of all collected samples are from 0.011 to 0.304%. Results also showed that the acid chlorogenic content of *L. japonica* Thunb. species is highest (0.304%), followed by *L. confusa* DC. species (0.055%). The chlorogenic acid contents of *L. macrantha* (D. Don) Spreng. are from 0.011-0.021%. These studies will help to identify *Lonicera* species currently in Hai Duong and Ha Nam provinces and select high-quality species (chlorogenic acid content) for plant production.

Keywords: chlorogenic acid, *Lonicera*.

Classification number: 3.4

- Phân tích mẫu và giám định tên khoa học: Các mẫu sau khi thu thập về được đánh mã số từ KN 01 đến KN 06 và gửi đến Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu để phân tích, giám định tên khoa học và mô tả hình thái theo các bước sau:

+ Phân tích đặc điểm hình thái của các bộ phận sinh dưỡng, đặc biệt là các bộ phận sinh sản (hoa và quả). Trong phân tích, sử dụng kính lúp để quan sát và máy ảnh để chụp ảnh các bộ phận của mẫu.

+ Giám định/định tên khoa học: Sử dụng phương pháp so sánh hình thái, đối chiếu với khóa phân loại và bản mô tả trong các thực vật chí: *Cây cỏ Việt Nam* (2000) và *Thực vật chí Trung Quốc - Flora of China* (2005) để xác định tên khoa học cho loài [1, 5].

+ Đối chiếu mẫu nghiên cứu với bộ mẫu lưu tại Phòng tiêu bản của Viện Dược liệu.

+ Mô tả hình thái theo nguyên tắc đi từ tổng thể bên ngoài đến chi tiết bên trong, từ lớn đến nhỏ. Mô tả mẫu ở dạng sống, thân, lá và hoa.

Phân tích hàm lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu thập: Mẫu phục vụ phân tích hàm lượng acid chlorogenic được thu và đánh mã số cùng với mẫu phục vụ thẩm định tên khoa học, các mẫu thu về được sấy khô và gửi phân tích ở Viện Dược liệu.

Định tính acid chlorogenic: Định tính acid chlorogenic bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (theo chuyên luận Kim ngân hoa, Dược điển Việt Nam V) [6], cùng các bước thực hiện như sau:

- Bản mỏng: Silica gel 60 F254.

- Dung môi khai triển: Butyl acetal - acid formic - nước (7:2,5:2,5).

- Dung dịch thử: Lấy 0,2 g bột dược liệu thêm 10 ml methanol (thuốc thử - TT) chiết siêu âm trong 20 phút, để nguội, lọc. Bóc hơi dịch lọc trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cặn trong 2 ml ethanol (TT) được dung dịch thử.

- Dung dịch chất đối chiếu: Hòa tan acid chlorogenic chuẩn trong ethanol (TT) để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

- Dung dịch dược liệu đối chiếu: Lấy 0,2 g bột kim ngân hoa (mẫu chuẩn), chiết như mô tả ở phần dung dịch thử.

- TT: Hỗn hợp dung dịch acid oxalic/acid boric 10%, tỷ lệ 2:1.

- Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai sắc ký, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng, phun hỗn hợp dung dịch acid oxalic/acid boric 10% (TT) tỷ lệ 2:1, sấy bản mỏng ở nhiệt độ 120°C trong 5 phút. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm trước và sau khi phun TT. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có các vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch dược liệu đối chiếu hoặc có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch chất đối chiếu.

Định lượng acid chlorogenic: Acid chlorogenic được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng [6], với các bước thực hiện như sau:

- Pha động: Acetonitril - dung dịch acid phosphoric 0,4% (13:87).

- Dung dịch chuẩn: Hòa tan acid chlorogenic chuẩn trong methanol 50% (TT) để được dung dịch có nồng độ 0,15 mg/ml.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g bột dược

liệu (qua rây số 355) vào bình nón nút mài dung tích 100 ml, thêm chính xác 50,0 ml methanol 50% (TT), đầy nắp, cân xác định khối lượng. Chiết siêu âm trong 30 phút, để nguội, cân lại và bổ sung khối lượng mất đi bằng methanol 50% (TT) nếu cần, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

- Điều kiện sắc ký: Cột Ascentis C18 (5 μ m $\times$ 250 $\times$ 4,6 mm).

- Detector quang phổ tử ngoại: Đo ở bước sóng 327 nm.

- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 10 μ l.

- Cách tiến hành:

+ Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn và ghi sắc ký đồ. Số đĩa lý thuyết của cột tính theo pic của acid chlorogenic không được ít hơn 1000.

+ Tiến hành sắc ký dung dịch thử và ghi sắc ký đồ. Tính hàm lượng acid chlorogenic trong dược liệu dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của acid chlorogenic chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân tích, thẩm định tên khoa học của các mẫu thu thập

Sử dụng máy ảnh và kính lúp để quan sát và phân tích đặc điểm của các bộ phận: thân, lá, lá bắc, hoa, quả.

Sau khi phân tích các mẫu kim ngân hoa, tham khảo các tài liệu hiện có, kết hợp đối chiếu với tiêu bản của chi *Lonicera* đang lưu giữ tại Khoa Tài nguyên Dược liệu (có số hiệu 1826, 5008, 7649), đã xác định được tên khoa học của 6 mẫu kim ngân hoa thu thập (KN 01, KN 02, KN 03, KN 04, KN 05, KN 06). Tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh của từng mẫu như sau:

- Mẫu KN 01, KN 02, KN 03 và KN 04 đều thuộc cùng 1 loài, có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: kim ngân hoa to, kim ngân lông.

Tên khoa học: *L. macrantha* (D. Don) Spreng..

Tên đồng danh (synonym): *Caprifolium macranthum* (D. Don) Spreng..

Mô tả cây: dây leo bằng thân quấn, phân cành nhiều. Thân và cành già hóa gỗ nhiều; vỏ thân già màu nâu có thể bong ra; thân có lông cứng xen lẫn lông tuyến rải rác. Lá mọc đối, phiến bầu dục, dài 4-11 cm, rộng 3-4,5 cm, mặt dưới lá có lông cứng và lông tuyến rải rác. Cụm hoa ở nách lá, dạng xim co, có cuống mang 2-3 hoa; lá bắc hình mác hoặc dài, hoa to màu vàng, đài có 5 răng nhỏ, tràng cao 5-6 cm, môi trên 4 thùy, môi dưới 1 thùy, mặt ngoài ống tràng có lông tuyến rải rác; bầu 3 ô. Quả mọng 7-8 mm, màu đen (hình 1).



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 01



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 02



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 03



L. macrantha (D. Don) Spreng. KN 04



L. confusa DC. KN 05



L. japonica Thunb. KN 06

Hình 1. 6 mẫu kim ngân hoa thu thập tại Hải Dương và Hà Nam.

Mẫu nghiên cứu: Địa điểm thu mẫu là Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương, ngày thu mẫu: 24/3/2021, người thu mẫu: Nguyễn Quỳnh Nga, số hiệu mẫu: KN 01, KN 02, KN 03 và KN 04.

- Mẫu KN-05 có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: Kim ngân núi, kim ngân rỏi, kim ngân lẫn, sơn ngân hoa.

Tên khoa học: *L. confusa* DC..

Tên đồng danh: *L. confusa* var. *glabrocalyx* R.H. Miao & X.J. Liu.

Mô tả cây: Cây leo bằng thân quấn, phân cành. Thân và cành già hóa gỗ nhiều; cành non lúc đầu có lông, sau hơi đỏ. Lá mọc đối, cuống hơi dẹt, có rãnh ở mặt trên; phiến lá hình trái xoan - mũi mác, dài 2-8 cm, rộng 1-4 cm; gốc tròn hay hình nêm, chóp phiến nhọn; nhẵn ở mặt trên, có lông mịn ở mặt dưới; lá già xẻ thùy không đều. Cụm hoa mọc ở nách lá gần ngọn, thành xim hai hoa; lá bắc hình mác hoặc dải. Hoa trắng sau chuyển sang vàng. Đài ngắn, có 5 răng, dài 3-4 cm, mặt ngoài nhẵn, mặt trong có lông; tràng hình ống, đôi khi ống tràng hơi cong. Nhị 5, đính ở ống tràng, thò ra khỏi ống tràng. Bầu nhẵn hoặc có lông. Quả hình cầu, màu đen (hình 1).

- Mẫu KN-06 có tên Việt Nam, tên khoa học và tên đồng danh như sau:

Tên Việt Nam: kim ngân hoa, nhẵn đông, kim ngân nhạt.

Tên khoa học: *L. japonica* Thunb..

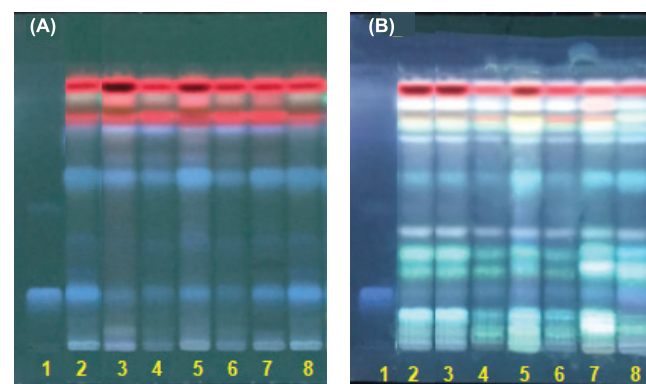
Tên đồng danh: *L. brachypoda* Siebold..

Mô tả cây: Cây leo bằng thân quấn, phân cành nhiều. Thân và thân già hóa gỗ nhiều; cành non có lông đơn ngắn và tuyến có cuống, sau nhẵn, màu hơi đỏ có vân. Lá mọc đối, hơi dày, hình trứng thuôn, dài 4-7 cm, rộng 2-4 cm, gốc tròn, đầu nhọn, mặt trên có lông thưa, mặt dưới có lông dày; cuống lá dài 5-6 mm, có lông. Hoa mọc từng đôi một ở các nách lá gần ngọn; lá bắc dạng lá hình trứng đến elip. Khi mới nở, cánh hoa màu trắng, sau chuyển sang vàng nhạt, mùi thơm nhẹ; đài 5 răng mảnh, có lông; tràng hoa có phần dưới hợp thành ống, phần trên chia làm 2 môi, môi dưới 4 thùy bằng nhau, môi trên 1 thùy; nhị 5, thò ra ngoài cánh hoa. Quả hình cầu hoặc hình trứng, dài khoảng 5 mm, màu đen khi chín (hình 1).

3.2. Kết quả phân tích hàm lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa

Kết quả định tính acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thể hiện ở hình 2. Kết quả quan sát bản mỏng dưới ánh

sáng tử ngoại ở bước sóng 365 nm, trước và sau khi phun thuốc thử cho thấy: sắc ký đồ của mẫu thử có độ đậm nhạt khác nhau nhưng đều có vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của dược liệu kim ngân của loài *L. caulis cum folium* đối chiếu và có một vết cùng màu sắc và giá trị R_f với vết của acid chlorogenic đối chiếu. Như vậy, các mẫu kim ngân hoa phân tích của các mẫu thu thập tại Hải Dương và Hà Nam đều có vết của acid chlorogenic.



Hình 2A. Sắc ký đồ TLC định tính kim ngân hoa. Hình ảnh quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 365 nm trước khi phun TT. Hình 2B. Sắc ký đồ TLC định tính kim ngân hoa. Hình ảnh quan sát dưới đèn tử ngoại bước sóng 365 nm sau khi phun TT.

Hình 2. Kết quả định tính acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa.

Ghi chú: vết 1: chuẩn acid chlorogenic; vết 2: kim ngân cuống của loài *L. caulis cum folium* đối chiếu (mẫu chuẩn); vết 3-8: các mẫu kim ngân hoa kiểm nghiệm (mẫu KN 01 đến KN 06).

Hàm lượng acid chlorogenic là một trong những chỉ tiêu chính để đánh giá chất lượng dược liệu của các loài kim ngân hoa. Chỉ tiêu này cao chứng tỏ chất lượng dược liệu tốt và ngược lại. Kết quả định lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu thập được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng acid chlorogenic trong các mẫu kim ngân hoa kiểm nghiệm.

STT	Ký hiệu mẫu	Nơi thu thập	Tên khoa học	Hàm lượng acid chlorogenic (%)	Ghi chú
1	KN 01	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,011	Hàm lượng % acid chlorogenic được tính theo mẫu khô kiệt
2	KN 02	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,012	
3	KN 03	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,021	
4	KN 04	Hoàng Hoa Thám, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. macrantha</i> (D. Don) Spreng.	0,011	
5	KN 05	Sao Đỏ, Chí Linh, Hải Dương	<i>L. confusa</i> DC.	0,055	
6	KN 06	Thanh Tâm, Thanh Liêm, Hải Dương	<i>L. japonica</i> Thunb.	0,304	

Kết quả định lượng acid chlorogenic của các mẫu thu thập cho thấy: Hàm lượng acid chlorogenic biến động khá lớn giữa các loài, mẫu KN 06 thuộc loài *L. japonica* có hàm lượng acid chlorogenic cao nhất (0,304%), tiếp đến là mẫu

KN 05 thuộc loài *L. confusa* DC. (0,055%). Các mẫu khác thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. có hàm lượng acid clorogenic trong khoảng 0,011-0,021%.

Dược điển Việt Nam V có chuyên luận kim ngân cuộng, tuy nhiên chưa có chỉ tiêu định lượng hoạt chất. *Dược điển Trung Quốc 2015* có chuyên luận kim ngân cuộng cho loài *L. japonica* Thunb. quy định hàm lượng acid clorogenic không được thấp hơn 0,1%. Như vậy chỉ có mẫu KN 06 đạt yêu cầu.

4. Kết luận

Trong 5 mẫu thu thập tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương có 4 mẫu thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng., 1 mẫu thuộc loài *L. confusa* DC. chưa ghi nhận sự có mặt của loài kim ngân hoa - *L. japonica* Thunb. ở các điểm thu thập tại TP Chí Linh, tỉnh Hải Dương. Mẫu thu thập tại huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam thuộc loài *L. japonica* Thunb..

Mẫu KN 06 thuộc loài *L. japonica* Thunb. có chất lượng dược liệu (cuộng và lá) cao nhất trong 6 mẫu thu thập (hàm

lượng acid clorogenic đạt 0,304%), đạt theo Dược điển Trung Quốc 2015. Các mẫu khác thuộc loài *L. macrantha* (D. Don) Spreng. (KN 01-KN 04) và *L. confusa* DC. (KN 05) có hàm lượng acid clorogenic đạt 0,011-0,055%, đều thấp hơn so với tiêu chuẩn (theo Dược điển Trung Quốc 2015).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Floras, https://efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10159, accessed 20 September 2021.
- [2] D.H. Bich, D.Q. Chung, B.X. Chuong, et al (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Science and Technics Publishing House, **II**, 1252pp (in Vietnamese).
- [3] L.J. Wang (2010), “The study progress of *Lonicera japonica*”, *Medical Information*, **8**, pp.2293-2296 (in Chinese).
- [4] N.N. Thin (2007), *Plant Research Methods*, Vietnam National University Press, Hanoi, 166pp (in Vietnamese).
- [5] P.H. Ho (2000), *Vietnamese Plants*, Tre Publishing House, **III**, 1018pp (in Vietnamese).
- [6] Ministry of Health (2017), “*Caulis cum folium Lonicerae*”, *Vietnam Pharmacopoeia V*, pp.1221-1222 (in Vietnamese).

Thành phần loài cây thuốc chữa bệnh ngoài da theo kinh nghiệm của cộng đồng dân tộc Thái ở Khu bảo tồn thiên nhiên Mường La, tỉnh Sơn La

Vũ Thị Liên*, Li Phô Xạ Nạ Xay, Quảng Văn Tuấn, Lò Văn Sung, Vũ Đức Toàn

Trường Đại học Tây Bắc, đường Chu Văn An, tổ 2, phường Quyết Tâm, TP Sơn La, tỉnh Sơn La, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/5/2022; ngày chuyển phản biện 30/5/2022; ngày nhận phản biện 24/6/2022; ngày chấp nhận đăng 29/6/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá thành phần loài và giá trị sử dụng của cây thuốc chữa bệnh ngoài da theo kinh nghiệm của dân tộc Thái tại Khu bảo tồn thiên nhiên (KBTTN) Mường La, tỉnh Sơn La. Phương pháp nghiên cứu thực vật học truyền thống được sử dụng trong nghiên cứu này từ tháng 1/2021 đến tháng 1/2022. Kết quả thu được 121 loài cây thuốc, 111 chi, 56 họ thuộc 3 ngành thực vật bậc cao có mạch. Tính đa dạng của các loài cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da còn thể hiện đầy đủ 5 dạng sống với phổ dạng sống là: SB = 66,12Ph + 10,74Hm + 9,09Ch + 8,26Th + 5,79Cr. Các loài cây thuốc được dân tộc Thái sử dụng khác nhau để điều trị 11 nhóm bệnh, trong đó cây thuốc chữa bệnh về mụn nhọt, lở ngứa, viêm da cơ địa, gỏi leo (zona)... chiếm tỷ lệ cao nhất là 86 loài (71,07%). Trong các bộ phận được sử dụng làm thuốc thì lá được sử dụng nhiều nhất, chiếm 67,77%. Thân cũng được sử dụng khá lớn với 35 loài. Đã xác định được 2 loài cây thuốc (chiếm 1,65%) có nguy cơ bị đe dọa được ghi trong Sách đỏ Việt Nam (2007) và 2 loài trong Nghị định 84/2021/NĐ-CP của Chính phủ.

Từ khóa: bệnh ngoài da, cây thuốc, khu bảo tồn thiên nhiên, Mường La, Sơn La, Thái.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

KBTTN Mường La có tổng diện tích gần 17.000 ha, trong đó diện tích rừng là hơn 12.400 ha thuộc địa giới hành chính 3 xã Ngọc Chiến, Hua Trai và Năm Păm của huyện Mường La, tỉnh Sơn La. Nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, có tính đa dạng sinh học cao. KBTTN Mường La bảo tồn được nguồn gen nhiều loài động thực vật quý hiếm, đồng thời lưu giữ những tập quán quý báu và giàu tính nhân văn của 4 dân tộc anh em cùng chung sống (Thái, Mông, La Ha, Kháng) [1]. Qua nhiều thế hệ sống dựa vào rừng, các cộng đồng cư dân KBTTN Mường La đã tích lũy được nhiều tri thức và kinh nghiệm quý giúp họ tồn tại và thích nghi với các điều kiện bất lợi của tự nhiên. Điển hình như cộng đồng dân tộc Thái ở KBTTN Mường La đã tạo cho mình một kho tàng tri thức về sử dụng thực vật làm thuốc. Do có địa hình phức tạp, đường giao thông đi lại rất khó khăn, điều kiện kinh tế kém phát triển nên cuộc sống của người dân còn gặp nhiều thiếu thốn và không đủ tiền để đến các cơ sở y tế khám chữa bệnh. Để thích nghi, cộng đồng dân tộc Thái đã không ngừng tìm tòi tích lũy riêng cho mình các tri thức và kinh nghiệm sử dụng thực vật để phòng và chữa bệnh ngoài da. Đây chính là nguồn tri thức bản địa vô cùng quý báu cần khai thác, bảo tồn và phát triển. Vì vậy, nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam về cây thuốc cũng như kinh nghiệm dân gian đã được thực hiện và mang lại giá trị khoa học và thực tiễn như: nghiên cứu việc sử dụng cây thuốc truyền thống để kiểm soát bệnh nấm candida và các bệnh nhiễm trùng liên quan ở Venda, Nam Phi [2]; nghiên cứu điều tra thực vật dân tộc được sử dụng trong y học dân

gian ở các vùng Constantine và Mila (Đông Bắc Algeria [3]; khảo sát dân tộc học về các cây thuốc được các thầy lang sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường ở vùng Taza của Maroc [4]; nghiên cứu về đa dạng cây thuốc được đồng bào dân tộc Thái sử dụng chữa bệnh đường tiêu hóa tại xã Chiềng Bôm thuộc khu rừng đặc dụng Cópia huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La [5]; nghiên cứu về đa dạng thành phần loài cây thuốc của đồng bào dân tộc Thái ở xã Xuân Thái và Bình Lương thuộc vùng đệm Vườn quốc gia Bến En, tỉnh Thanh Hóa [6]... Kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của các dân tộc là tiềm năng để sản xuất các loại thuốc đặc hiệu mới. Mặt khác, những hoạt chất sinh học và cơ sở khoa học của các bài thuốc được dân tộc Thái sử dụng chữa bệnh ngoài da chưa được nghiên cứu, chứng minh bằng con đường khoa học. Vì vậy việc tìm hiểu về cây thuốc chữa bệnh ngoài da theo kinh nghiệm của dân tộc Thái tại KBTTN Mường La, tỉnh Sơn La là một việc làm có ý nghĩa quan trọng, góp phần bảo tồn tri thức thực vật học dân tộc.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các loài thực vật và kinh nghiệm sử dụng thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da của dân Thái tại KBTTN Mường La, tỉnh Sơn La.

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2021 đến tháng 1/2022 tại 7 bản: Đông Khít (xã Hua Trai), Ít, Bâu, Piêng (xã Năm Păm), Kê, Đông Xông, Lướt (xã Ngọc Chiến) thuộc KBTTN Mường La, tỉnh Sơn La.

*Tác giả liên hệ: Email: luocvang2018@utb.edu.vn

The composition of medicinal plants used for the treatment of skin diseases by the Thai ethnic minority at Muong La nature reserve, Son La province

Thi Lien Vu*, Pho Xa Na Xay Li, Van Tuan Quang, Van Sung Lo, Duc Toan Vu

Tay Bac University, Chu Van An Street, Group 2, Quyet Tam Ward, Son La City, Son La Province, Vietnam

Received 26 May 2022; revised 24 June 2022; accepted 29 June 2022

Abstract:

This research aimed to evaluate the composition and use-value of medicinal plants for skin disease treatments according to the Thai ethnic minority's experiences at Muong La nature reserve, Son La province. The research was carried out under a traditional botanical method from January 2021 to January 2022. The results showed that there were 121 species of medicinal plants belonging to 111 genera and 56 families of 3 vascular plant divisions. The diversity of medicinal plants for the treatment of skin diseases with survival spectrum was determined as $SB = 66.12Ph + 10.74Hm + 9.09Ch + 8.26Th + 5.79Cr$. The medicinal plants used by Thai ethnic people for treatments of 11 skin disease groups, including boils, itchy sores, nine meters (nine cheeks), atopic dermatitis, zona... accounted for the highest rate of 86 species (71.07%). Leaves were the most used part of plants for skin disease treatment accounting for 67.77%, followed by trunk parts with 35 species. Two medicinal species (1.65%) at risk of being threatened were identified in Vietnam Red Data Book (2007) and 2 species in the Governmental Decree No. 84/2021/ND-CP.

Keywords: medicinal plants, Muong La, nature reserve, skin disease, Son La, Thai ethnic minority.

Classification number: 3.4

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp kế thừa tài liệu: Kế thừa những kinh nghiệm sử dụng cây thuốc của các ông lang, bà mẹ dân tộc Thái và các tài liệu nghiên cứu có liên quan đến đề tài, có chọn lọc.

Phương pháp nghiên cứu thực vật: Phương pháp lập tuyến điều tra, thu và bảo quản mẫu thực vật được thực hiện theo N.N. Thin (2008) [7]. Cụ thể, lập tuyến điều tra dựa vào kết quả điều tra sơ bộ và dựa vào bản đồ địa hình, bản đồ hiện trạng sử dụng đất của khu vực nghiên cứu, gồm 7 tuyến điều tra (tổng chiều dài là 50,5 km), mở rộng phạm vi điều tra trên mỗi tuyến về 2 bên khoảng 20 m. Các tuyến

này phân bố đi qua các sinh cảnh khác nhau của khu vực nghiên cứu. Ngoài ra, còn điều tra bổ sung tại vườn nhà người dân và thu mẫu tiêu bản tại thực địa. Trên mỗi tuyến thu thập, ghi lại đặc điểm hình thái, thống kê, chụp ảnh mẫu, sử dụng GPS để xác định tọa độ địa lý, độ cao phân bố các loài cây thuốc... Việc điều tra tại các tuyến có người dân địa phương tham gia và được ghi vào mẫu phiếu điều tra với các thông tin như tên địa phương, tên khoa học, tên phổ thông, dạng sống, sinh cảnh, kinh nghiệm, công dụng, bộ phận sử dụng, mùa thu hái, cách chế biến, phương pháp sử dụng, nơi thu hái mùa thu hái các loài cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da.

Phương pháp phân tích và phân loại mẫu: Xác định tên khoa học các loài thực vật bằng phương pháp hình thái so sánh theo các tài liệu: *Danh lục các loài Thực vật Việt Nam* của Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội [8] và của N.T. Ban (2003, 2005) [9], *Cây cỏ Việt Nam* của P.H. Ho (2000-2003) [10], *Từ điển cây thuốc Việt Nam* của V.V. Chi (2012) [11], *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam* của D.T. Loi (2005) [12]. Xác định phổ dạng sống sử dụng thang phân chia dạng sống của C. Raunkiaer (1934) [13], có bổ sung của N.N. Thin (2004) [14]. Mẫu vật được lưu giữ tại Phòng Bảo tàng, Trường Đại học Tây Bắc. Phân nhóm công dụng của các loài thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da chủ yếu dựa vào kinh nghiệm thực tế của dân tộc Thái tại khu vực nghiên cứu và tài liệu [11, 12, 15]. Danh lục các loài cây thuốc sắp xếp theo R.K. Brummitt (1992) [16].

Phương pháp điều tra phỏng vấn: Theo các phương pháp nghiên cứu thực vật dân tộc học gồm: phương pháp đánh giá nhanh nông thôn; phương pháp đánh giá nông thôn có sự tham gia của người dân [17]. Có tổng số 210 người cung cấp thông tin (người thu hái và gây trồng, thầy lang, người tiêu dùng và buôn bán) trong độ tuổi 25-88 đã trả lời phỏng vấn.

Đánh giá mức độ nguy cấp của các loài cây thuốc: theo *Sách đỏ Việt Nam phần II - Thực vật* (2007) [18] và Nghị định 84/2021/CP-NĐ [19]. Thống kê, xử lý và tính toán các số liệu điều tra, phiếu phỏng vấn bằng phần mềm Excel.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sự phân bố các bậc taxon của nguồn tài nguyên cây thuốc được dân tộc Thái sử dụng chữa bệnh ngoài da

Về bậc ngành: Kết quả điều tra đã xác định được 121 loài cây thuốc, 111 chi, 56 họ thuộc 3 ngành: Thông đất (Lycopodiophyta), Dương xỉ (Polypodiophyta) và Ngọc lan (Magnoliophyta) được dân tộc Thái sử dụng để chữa bệnh ngoài da tại KBTTN Mường La (bảng 1). Từ dữ liệu bảng 1 cho thấy, phần lớn các taxon tập trung trong ngành Ngọc lan với 116 loài, chiếm 95,87% tổng số loài, 106 chi, chiếm 95,50% tổng số chi và 52 họ, chiếm 92,86% tổng số họ

và thấp nhất là ngành Thông đất với 1 loài, chiếm 0,83% tổng số loài, 1 chi, chiếm 0,90% tổng số chi và 1 họ, chiếm 1,79% tổng số họ. Như vậy, các taxon chủ yếu tập trung ở ngành Ngọc lan với số họ, chi và loài chiếm trên 90%, điều này hoàn toàn hợp lý so với sự tiến hóa của thực vật bởi vì Ngọc lan là ngành chiếm ưu thế của thực vật bậc cao có mạch.

Bảng 1. Số loài cây thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng ở khu vực nghiên cứu.

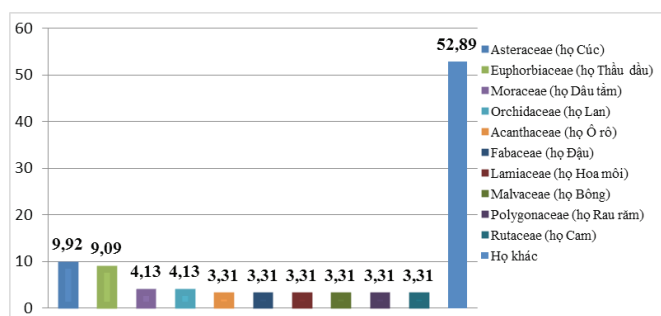
TT	Ngành thực vật	Họ		Chi		Loài	
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Lycopodiophyta (ngành Thông đất)	1	1,79	1	0,90	1	0,83
2	Polypodiophyta (ngành Dương xỉ)	3	5,36	4	3,60	4	3,31
3	Magnoliophyta (ngành Ngọc lan)	52	92,86	106	95,50	116	95,87
	Dicotyledones (lớp Hai lá mầm) - D	45	86,54	92	86,79	102	87,93
	Monocotyledones (lớp Một lá mầm) - M	7	13,46	14	13,21	14	12,07
	Tỷ lệ D/M	6,43		6,57		7,29	
Tổng		56	100	111	100	121	100

Các chỉ tiêu về cấu trúc hệ thống của thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng như sau: chỉ số đa dạng họ là 2,16, tức là trung bình mỗi họ có 2 loài; chỉ số đa dạng chi là 1,09, tức trung bình mỗi chi có 1 loài; số chi trung bình của mỗi họ là 1,98, tức trung bình mỗi họ có 2 chi được dân tộc Thái sử dụng làm thuốc chữa bệnh ngoài da (bảng 1). Sự phân bố không đều nhau của các taxon không chỉ được thể hiện giữa các ngành mà còn được thể hiện giữa các taxon lớp trong ngành Ngọc lan. Thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng có tỷ trọng lớp Hai lá mầm (Dicotyledones) với số lượng các taxon chiếm ưu thế là 86,54% tổng số họ, 86,79% số chi và 87,93% số loài của ngành; lớp Một lá mầm (Monocotyledones) với 7 họ (chiếm 13,46%), 14 chi (chiếm 13,21%) và 14 loài (chiếm 12,07%). Tỷ lệ lớp Dicotyledones (D) trên lớp Monocotyledones (M) là 6,43, 6,57 và 7,29, nghĩa là có 6 họ của lớp Dicotyledones thì có 1 họ lớp Monocotyledones; có gần 7 chi Dicotyledones thì có 1 chi của lớp Monocotyledones; có 7 loài của lớp Dicotyledones thì có 1 loài của lớp Monocotyledones. Qua bảng 1 thấy rằng, thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng ở khu vực nghiên cứu có tỷ trọng của lớp Hai lá mầm cao hơn so với lớp Một lá mầm. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu về đa dạng thành phần loài cây thuốc của đồng bào dân tộc Thái ở xã Xuân Thái và Bình Lương thuộc vùng đệm Vườn quốc gia Bến En, tỉnh Thanh Hóa [6]; đa dạng cây thuốc được đồng bào Dân tộc Thái sử dụng chữa bệnh đường tiêu hóa tại xã Chiềng Bôm thuộc khu rừng đặc dụng Cópia huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La

[5]; đa dạng nguồn tài nguyên cây thuốc được cộng đồng dân tộc Khơ Mú sử dụng tại rừng đặc dụng, phòng hộ Sốp Cộp, tỉnh Sơn La [20].

Sự phân bố bậc dưới ngành: Sự phân bố ở bậc dưới ngành về cấp độ họ và chi cụ thể như sau:

- Về họ: kết quả ở hình 1 cho thấy, trong số 56 họ thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da theo kinh nghiệm của dân tộc Thái sử dụng ở KBTN Mường La, một số họ có nhiều loài cây thuốc như: Cúc (Asteraceae) có số loài nhiều nhất với 12 loài, chiếm 9,92% tổng số loài. Tiếp đến là Thầu dầu (Euphorbiaceae) với 11 loài, chiếm 9,09% tổng số loài. Hai họ Đậu tằm (Moraceae) và Lan (Orchidaceae) với 5 loài, chiếm 4,13% tổng số loài. Các họ: Ô rô (Acanthaceae), Đậu (Fabaceae), Hoa môi (Lamiaceae), Bông (Malvaceae), Rau răm (Polygonaceae) và Cam (Rutaceae) cùng có 4 loài, chiếm 3,31% tổng số loài. Các họ còn lại có ít hơn 4 loài, chiếm 52,89% tổng số loài.



Hình 1. Các họ thực vật được sử dụng giàu loài nhất.

- Về chi: trong số 111 chi làm thuốc chữa bệnh ngoài da tại khu vực nghiên cứu có 9 chi có nhiều loài là: Rau răm (*Polygonum*) với 3 loài, chiếm 2,48% tổng số thực vật làm thuốc, tiếp theo là Muồng (*Cassia*), Mò (*Clerodendrum*), Thóc lép (*Desmodium*), Mần tưới (*Eupatorium*), Đại kích (*Euphorbia*), Sung (*Ficus*), Diệp hạ châu (*Phyllanthus*) và Hồ tiêu (*Piper*) cùng có 2 loài, chiếm 1,65%. Các chi còn lại dưới 2 loài, chiếm 84,32% tổng số loài.

3.2. Dạng sống của cây thuốc chữa bệnh ngoài da

Trên cơ sở số loài điều tra đã xác định được 121 loài thực vật có giá trị chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng, nghiên cứu tiến hành phân tích dạng sống theo hệ thống của C. Raunkiaer (1934) [13] và N.N. Thín (2004) [14] để tính toán phổ dạng sống cho khu vực nghiên cứu. Việc phân tích tính đa dạng về dạng sống của các loài thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng cho thấy tiềm năng của nguồn nguyên liệu tại địa phương. Từ đó đưa ra các chính sách và biện pháp phù hợp cho quá trình khai thác và sử dụng có hiệu quả nguồn tài nguyên này. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Dạng sống cây thuốc chữa bệnh ngoài da tại khu vực nghiên cứu.

TT	Dạng sống	Ký hiệu	Số loài	Tỷ lệ (%)	SB
1	Nhóm cây chồi trên	Ph	80	66,12	66,12
1.1	Cây bụi	Na	22	27,50	
1.2	Cây chồi trên nhỡ	Me	16	20,0	
1.3	Cây thảo sống lâu năm	Hp	15	18,75	
1.4	Dây leo sống lâu năm	Lp	13	16,25	
1.5	Cây chồi trên nhỏ	Mi	10	12,50	
1.6	Cây bì sinh sống lâu năm	Ep	3	3,75	
1.7	Cây chồi trên to	Mg	1	1,25	
2	Nhóm cây chồi nửa ẩn	Hm	13	10,74	10,74
3	Nhóm cây chồi sát đất	Ch	11	9,09	9,09
4	Nhóm cây chồi một năm	Th	10	8,26	8,26
5	Nhóm cây chồi ẩn	Cr	7	5,79	5,79
Tổng			121	100	100

Trong tổng số 121 loài thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da tại khu vực nghiên cứu, nhóm cây chồi trên (Ph) chiếm ưu thế hơn hẳn so với các nhóm còn lại với 80 loài, chiếm 66,12% tổng số loài cây làm thuốc. Tiếp đó, nhóm cây chồi nửa ẩn (Hm) với 13 loài, chiếm 10,74%; nhóm cây chồi sát đất (Ch) với 11 loài, chiếm 9,09%; nhóm cây chồi một năm (Th) với 10 loài, chiếm 8,26% và thấp nhất là nhóm cây chồi ẩn (Cr) với 7 loài, chiếm 5,79%. Như vậy, phân tích về dạng sống của các loài thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng ở KBTTN Mường La là: $SB = 66,12Ph + 10,74Hm + 9,09Ch + 8,26Th + 5,79Cr$.

Kết quả bảng 2 cho thấy, dân tộc Thái sử dụng thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da tại KBTTN Mường La chủ yếu sử dụng cây chồi trên bụi (Na) với 22 loài, chiếm 27,50% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph); nhóm cây chồi trên nhỡ (Me) với 16 loài, chiếm 20,0% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph); nhóm cây thảo sống lâu năm (Hp) với 15 loài, chiếm 18,75% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph); dây leo sống lâu năm (Lp) với 13 loài, chiếm 16,25% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph); nhóm chồi trên nhỏ (Mi) với 10 loài, chiếm 12,50% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph); cây bì sinh sống lâu năm (Ep) có 3 loài, chiếm 3,75% và thấp nhất là cây chồi trên to (Mg) có 1 loài, chiếm 1,25% tổng số cây trong nhóm chồi trên (Ph). Phổ dạng sống của nhóm cây chồi trên như sau: $(Ph) = 27,50Na + 20,0Me + 18,75Hp + 16,25Lp + 12,50Mi + 3,75Ep + 1,25Mg$.

3.3. Tần suất sử dụng của các bộ phận cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da

Nghiên cứu nắm rõ về các bộ phận làm thuốc không chỉ cho thấy tính phong phú và đa dạng trong khả năng chữa bệnh của các bộ phận đó, mà còn có ý nghĩa bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu có hiệu quả. Đồng thời, việc nghiên cứu các bộ phận sử dụng làm thuốc còn có giá trị đánh giá được tính bền vững trong khai thác và sử dụng tài nguyên cây thuốc của dân tộc Thái tại khu vực nghiên cứu.

Bảng 3. Tần suất sử dụng của các bộ phận cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da.

TT	Bộ phận sử dụng	Số lượng loài	Tỷ lệ (%)
1	Lá	82	67,77
2	Thân	35	28,93
3	Cả cây	13	10,74
4	Rễ	13	10,74
5	Vỏ thân	11	9,09
6	Quả	7	5,79
7	Hạt	4	3,31
8	Nhựa	1	0,83
9	Hoa	1	0,83
10	Vỏ rễ	1	0,83

Ghi chú: một loài có thể sử dụng trong một số nhóm với công dụng khác nhau.

Kết quả bảng 3 cho thấy, lá là bộ phận được sử dụng nhiều nhất và thông dụng nhất với 82 loài, chiếm 67,77% trong tổng số loài thu được. Có thể nói, lá cây làm thuốc khá đa dạng cả về cách sử dụng lẫn công dụng, việc sử dụng này thuận tiện trong việc thu hái và ít có ảnh hưởng tới sinh trưởng tái sinh của cây thuốc so với việc khai thác các bộ phận khác của cây. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu về bộ phận làm thuốc chữa bệnh tiêu hóa của dân tộc Thái xã Chiềng Bôm thuộc khu rừng đặc dụng Cópia huyện Thuận Châu, tỉnh Sơn La [5], dân tộc Khơ Mú sử dụng tại rừng đặc dụng, phòng hộ Sốp Cộp, tỉnh Sơn La [20]. Một số nghiên cứu về cây thuốc được tiến hành ở trên thế giới cũng cho thấy, lá được sử dụng nhiều hơn các phần khác của cây [4, 21], việc sử dụng lá làm giảm mức độ của mối đe dọa đối với các loài thực vật làm thuốc. Tiếp theo là bộ phận thân với 35 loài, chiếm 28,93%; cả cây và bộ phận rễ cũng có 13 loài, chiếm 10,74%; vỏ thân với 11 loài, chiếm 9,09%; sử dụng quả với 7 loài, chiếm 5,79%; bộ phận hạt với 4 loài chiếm 3,31%. Các bộ phận sử dụng còn lại như: nhựa, hoa và vỏ rễ được sử dụng với tần suất thấp nhưng tác dụng chữa bệnh rất hiệu quả. Sự phân bố không đồng đều trong các bộ phận sử dụng làm thuốc là do đặc tính về thời vụ, do tích lũy kinh nghiệm chữa bệnh ngoài da của dân tộc Thái.

3.4. Sự phân bố về sinh cảnh sống

Kết quả bảng 4 cho thấy, cây thuốc phân bố ở sinh cảnh rừng chiếm tỷ lệ cao nhất (54 loài, chiếm 44,63%), đây cũng là môi trường thuận lợi cho nhiều cây thuốc sinh trưởng và phát triển, kế tiếp là ở sinh cảnh vườn nhà với 32 loài, chiếm 26,45%. Việc đem cây thuốc về trồng ở vườn nhà là một việc làm cần thiết, vừa có thể sử dụng ngay khi cần lại vừa có tác dụng bảo tồn và duy trì nguồn gen cây thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng. Đây là tiền đề cho việc đầu tư trồng cây thuốc theo quy mô hộ gia đình. Sinh cảnh ven đường chiếm tỷ lệ 23,14% (với 28 loài) đây là những cây ưa sáng; sinh cảnh thâm cò chiếm tỷ lệ 19,83% (với 24 loài); nương rẫy chiếm tỷ lệ 19,01% (với 23 loài), sinh cảnh thâm cây bụi chiếm tỷ lệ 17,36% (với 21 loài) và thấp nhất là sinh cảnh ruộng, khe nước ẩm, ven suối chiếm tỷ lệ 9,92% (với 12 loài).

Bảng 4. Sự phân bố cây thuốc theo sinh cảnh sống.

TT	Tên sinh cảnh sống	Ký hiệu	Số loài	Tỷ lệ (%)
1	Rừng thứ sinh	RTS	54	44,63
2	Vườn nhà	VN	32	26,45
3	Ven đường	VĐ	28	23,14
4	Thâm cò	TC	24	19,83
5	Nương rẫy	NR	23	19,01
6	Thâm cây bụi	TCB	21	17,36
7	Ruộng, khe nước ẩm, ven suối	R, Khn, Vs	12	9,92

Ghi chú: có những loài phân bố ở cả 2-3 sinh cảnh.

3.5. Giá trị sử dụng của các loài cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da

Kết quả bảng 5 cho thấy, số lượng các loài cây thuốc chữa nhóm bệnh ngoài da về mụn nhọt lở ngứa, viêm da cơ địa, ghẻ leo (xona)... có số lượng nhiều nhất với 86 loài, chiếm 71,07% thuộc 44 họ và 81 chi. Nhóm chữa bệnh về bỏng với 23 loài, chiếm 19,01% thuộc 21 họ và 23 chi. Nhóm chữa bệnh về dị ứng và ngứa bộ phận sinh dục ngoài, lậu cùng có 9 loài, chiếm 7,44%. Bệnh hôi nách, hôi chân, nứt nẻ chân tay với 7 loài, chiếm 5,79%, thuộc 4 họ và 4 chi. Nhóm chữa bệnh vàng da, sởi và ra mồ hôi tay, chân, chốc lở ngoài da trẻ em cùng có 3 loài, chiếm 2,48%. Nhóm chữa bệnh thủy đậu có 2 loài, chiếm 1,65% thuộc 2 họ và 2 chi và thấp nhất là chữa bệnh về u với 1 loài, chiếm 0,83%, thuộc 1 họ và 1 chi. Mỗi loại cây thuốc sẽ có những cách chế biến khác nhau tùy thuộc vào cách chữa của từng ông lang, bà mẹ và tùy thuộc vào tình trạng của người bệnh.

Bảng 5. Giá trị sử dụng của các loài cây làm thuốc chữa bệnh ngoài da.

TT	Các nhóm bệnh	Số lượng loài	Tỷ lệ (%)
1	Mụn nhọt lở ngứa, chín mé, viêm da cơ địa, ghẻ leo (zona), hắc lao, vẩy nến, nước ăn chân, ghẻ...	86	71,07
2	Bỏng	23	19,01
3	Dị ứng	9	7,44
4	Ngứa bộ phận sinh dục ngoài, lậu	9	7,44
5	Hôi nách, hôi chân, nứt nẻ chân tay	7	5,79
6	Vàng da	3	2,48
7	Chốc lở ngoài da trẻ em	3	2,48
8	Sởi	3	2,48
9	Ra mồ hôi tay, chân	3	2,48
10	Thủy đậu	2	1,65
11	U	1	0,83

Nguồn: điều tra thực tế năm 2021, 2022 tại KBTTN Mường La.

Kết quả điều tra đã ghi nhận được 2 loài cây thuốc quý hiếm là Hạc vĩ (*Dendrobium aphyllum*) xếp ở thứ hạng VU (sắp nguy cấp) và Lan một lá (*Nervilia fordii*) xếp ở thứ hạng EN (nguy cấp) trong *Sách đỏ Việt Nam* (2007) [18] và có 2 loài trong Nghị định 84/2021/NĐ-CP của Chính phủ thuộc nhóm IIA [19].

4. Kết luận

Kết quả điều tra các loài cây thuốc chữa bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng ở KBTTN Mường La, tỉnh Sơn La đã ghi nhận được 121 loài thuộc 111 chi, 56 họ. Ngành Ngọc lan đa dạng nhất, chiếm 95,87% tổng số loài, 95,50% tổng số chi và 92,86% tổng số họ. Đã lập được phổ dạng sống của các loài thực vật làm thuốc chữa bệnh ngoài da là: SB = 66,12Ph + 10,74Hm + 9,09Ch + 8,26Th + 5,79Cr. Sử dụng các bộ phận để làm thuốc bao gồm: lá là bộ phận sử dụng nhiều và thông dụng nhất với 82 loài, bộ phận thân với 35 loài, cả cây và bộ phận rễ cùng có 13 loài, vỏ thân với 11 loài, quả với 7 loài, bộ phận hạt với 4 loài và thấp nhất bộ phận hoa, vỏ rễ và nhựa cùng có 1 loài. Đã thống kê được 11 nhóm bệnh ngoài da được dân tộc Thái sử dụng cây thuốc để chữa trị bệnh. Số lượng loài cây thuốc chữa bệnh ngoài da thuộc diện cần bảo tồn ở khu vực nghiên cứu có 2 loài, chiếm 1,65% tổng số loài.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của Dự án “Các loài cây bản địa của Việt Nam để cải thiện sinh kế” mã số FST.2020.134. Xin bày tỏ lòng biết ơn tới

Ban Giám đốc, cán bộ KBTTN Mường La, tỉnh Sơn La đã tạo điều kiện thuận lợi trong quá trình nghiên cứu. Cảm ơn người dân địa phương, các thầy thuốc dân tộc Thái xã Hua Trai, Nậm Păm, Ngọc Chiến huyện Mường La, tỉnh Sơn La và sinh viên Lò Thị Thu Lệ K59 Trường Đại học Tây Bắc đã tham gia phỏng vấn, khảo sát thực địa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Management Board of Muong La Nature Reserve, Son La Province (2020), *Explanation and Sustainable Forest Management Plan of Muong La Nature Reserve for the Period 2021-2030* (in Vietnamese).
- [2] N.A. Masevhe, L.J. McGaw, J.N. Eloff (2015), "The traditional use of plants to manage candidiasis and related infections in Venda, South Africa", *J. Ethnopharmacol.*, **168**, pp.364-372, DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.046.
- [3] R. Ouelbani, S. Bensari, T.N. Mouas, et al. (2016), "Ethnobotanical investigations on plants used in the traditional treatment of diabetes and mila (North-East of Algeria)", *J. Ethnopharmacol.*, **194**, pp.196-218, DOI: 10.1016/j.jep.2016.08.016.
- [4] M. Barkaoui, A. Katiri, H. Boubaker, et al. (2017), "Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco", *J. Ethnopharmacol.*, **198**, pp.338-350, DOI: 10.1016/j.jep.2017.01.023.
- [5] V.T. Lien (2015), "Diversity of medicinal plants used by Thai ethnic people to treat gastrointestinal diseases in Chiang Bom commune, Copia special-use forest, Thuan Chau district, Son La province", *Proceedings of the Scientific Conference on Biodiversity and Biologically Active Substances*, pp.191-197 (in Vietnamese).
- [6] D.V. Tac, T.M. Hoi (2017), "Diversity of medicinal plant species composition of Thai ethnic people in Xuan Thai and Binh Luong communes in the buffer zone of Ben En National Park, Thanh Hoa province", *Scientific Conference the 7th National Study on Ecology and Biological Resources*, pp.1428-1433 (in Vietnamese).
- [7] N.N. Thin (2007), *Plant Research Methods*, Vietnam National University Press, 166pp (in Vietnamese).
- [8] VNU - Central Institute for Natural Resources and Environmental Studies (2001), *Checklist of Plant Species of Vietnam*, Agricultural Publishing House, 1248pp (in Vietnamese).
- [9] N.T. Ban (2003, 2005), *Checklist of Plant Species of Vietnam*, Agricultural Publishing House, (2-3), 2496pp (in Vietnamese).
- [10] P.H. Ho (2000-2003), *Vietnamese Plants*, Tre Publishing House, (1-2-3), 2618pp (in Vietnamese).
- [11] V.V. Chi (2012), *Dictionary of Vietnamese Medicinal Plants*, Medical Publishing House, (1-2), 3216pp (in Vietnamese).
- [12] D.T. Loi (2005), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Science and Technics Publishing House, 1-2, 1294pp (in Vietnamese).
- [13] C. Raunkiaer (1934), *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography Being the Collected Papers of C. Raunkiaer*, Oxford University Press, 632pp.
- [14] N.N. Thin (2004), *Diversity of Genetic Resources and Plant Resources*, Vietnam National University Press, Hanoi, 222pp (in Vietnamese).
- [15] T.D. Ly (1995), *1900 Types of Useful Plants in Vietnam*, The Gioi Publishers, 544pp (in Vietnamese).
- [16] R.K. Brummitt (1992), *Vascular Plant Families and Genera*, Royal Botanic Gardens, 804pp.
- [17] G.J. Martin (2002), *Ethnobotany*, Agriculture Publishing House, 363pp (in Vietnamese).
- [18] Vietnam Ministry of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (2007), *Vietnam Red Data Book - Part II: Plants*, Publishing House for Science and Technology, 610pp (in Vietnamese).
- [19] Government of Vietnam (2021), *Decree 84/2021/CP-ND Dated September 22, 2021 on Management of Endangered, Precious and Rare Forest Plants and Animals and Implementation of the Convention on International Trade in Animal Species Endangered Wild Animals and Plants* (in Vietnamese).
- [20] V.T. Lien, S. A Dau, L.V. Nghia (2021), "Diversity of medicinal plants resources to be used by the Kho Mu community in special use forest, Sop Cop district, Son La province", *VNU - Journal of Science*, **37(2)**, pp.46-59, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5119 (in Vietnamese).
- [21] A. Asase, A.A. Oteng-Yeboah, G.T. Odamtten, et al. (2005), "Ethnobotanical study of some ghanaian anti-malarial plants", *J. Ethnopharmacol.*, **99(2)**, pp.273-279, DOI: 10.1016/j.jep.2005.02.020.

Kết hợp điện di ion với các kỹ thuật xâm lấn tối thiểu làm tăng hiệu quả vận chuyển thuốc qua da

Nguyễn Thị Hồng Đức, Võ Quốc Anh*, Lý Công Thành, Nguyễn Anh Vũ

Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/3/2022; ngày chuyển phản biện 11/3/2022; ngày nhận phản biện 4/4/2022; ngày chấp nhận đăng 7/4/2022

Tóm tắt:

Kỹ thuật đưa thuốc chủ động bằng điện di ion đã chứng minh được khả năng làm tăng đáng kể hấp thu thuốc qua da của nhiều dược chất, đặc biệt đối với các phân tử lớn. Mặc dù vậy, kỹ thuật này vẫn còn bộc lộ những hạn chế trong việc phân phối thuốc đạt nồng độ điều trị đối với nhiều dược chất có liều cao, các protein và tiểu phân nano. Việc kết hợp điện di ion với các biện pháp không xâm lấn hoặc phá vỡ có kiểm soát cấu trúc lớp sừng nhằm làm tăng hơn nữa khả năng đưa thuốc qua da là giải pháp tiềm năng mở rộng phạm vi ứng dụng của thuốc qua da cho nhiều dược chất và hệ mang thuốc. Bài báo tổng quan cơ chế tác dụng và kết quả của các nghiên cứu ứng dụng giải pháp kết hợp điện di ion với các phương pháp xâm lấn tối thiểu để đưa thuốc qua da, gồm: tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện, tác nhân hóa học, mẫn vi kim, siêu âm tần số thấp và áp từ trường.

Từ khóa: điện di ion, đưa thuốc chủ động qua da, tăng vận chuyển thuốc qua da, xâm lấn tối thiểu.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Trong một thập kỷ gần đây, các nghiên cứu đưa thuốc qua da được phát triển mạnh mẽ do những ưu điểm vượt trội của đường đưa thuốc này như không xâm lấn, tránh lây nhiễm, bệnh nhân có thể tự điều trị, tính tuân thủ phác đồ điều trị cao. Tuy nhiên, hạn chế lớn nhất của đường đưa thuốc này là khó đưa thuốc đủ liều điều trị và phạm vi áp dụng hạn chế, chỉ áp dụng được cho một số dược chất có tính chất lý hóa đặc biệt, trong đó lớp sừng là hàng rào chính ngăn cản sự hấp thu thuốc. Việc sử dụng tác nhân hóa học làm tăng tính thấm hoặc điều chỉnh đặc tính lý hóa của thuốc là 2 cách tiếp cận truyền thống để cải thiện khả năng thẩm qua da của dược chất. Tuy nhiên trong nhiều trường hợp, hiệu quả của phương pháp này không được như mong đợi, đặc biệt là với loại thuốc thân nước và các phân tử lớn. Kỹ thuật điện di ion được biết đến như một phương pháp đưa thuốc chủ động, không xâm lấn đã chứng tỏ được tiềm năng trong việc vận chuyển nhiều loại dược chất không thể thẩm qua da bằng cơ chế khuếch tán thụ động. Phương pháp đã được chứng minh có khả năng đưa thuốc hiệu quả với nhiều dược chất và một số protein/peptide. Tuy nhiên, điện di thuốc vẫn còn hạn chế đối với các thuốc có liều điều trị cao, các protein có trọng lượng phân tử lớn và tiểu phân nano. Giải pháp kết hợp kỹ thuật điện di thuốc với các phương pháp xâm lấn tối thiểu là hướng đi mới nhằm cải thiện hơn nữa khả năng đưa thuốc qua da để có thể áp dụng cho các thuốc có liều điều trị cao, các protein phân tử lượng lớn và các hệ mang thuốc dạng tiểu phân nano. Những kết quả nghiên cứu đạt được cho thấy tiềm năng lớn của việc kết hợp điện di thuốc với các kỹ thuật tăng tính thấm khác trong việc tạo ra các hệ điều trị qua da áp dụng cho phổ rộng các dược chất và protein trong điều trị nhiều bệnh toàn thân.

2. Phương pháp thu thập tài liệu

Tất cả các tài liệu được dùng để viết bài tổng quan này được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu điện tử Pubmed, ScienceDirect và Google Scholar đến tháng 6/2021 với các từ khóa “iontophoresis”, “conjugation technique”, “minimally invasive”, “absorption across skin”, “bioavailability enhancement”, “absorption enhancement” và “transdermal enhancement”. Các bài nghiên cứu được xem xét chi tiết nội dung để kiểm tra tính phù hợp với lĩnh vực tổng quan. Nếu có nhiều nghiên cứu gần giống nhau thì nghiên cứu đầy đủ, tiêu biểu nhất được lựa chọn.

3. Giới thiệu về điện di ion

Da là cơ quan lớn nhất của cơ thể đóng vai trò như một rào cản vật lý và hàng rào miễn dịch thực hiện chức năng bảo vệ ngăn cản sự mất nước cũng như sự xâm nhập của các tác nhân bên ngoài [1]. Da là đường đưa thuốc tiềm năng nhưng cũng là rào cản lớn của quá trình hấp thu thuốc, chủ yếu đến từ sự bảo vệ của lớp sừng. Về mặt cấu trúc, lớp sừng là lớp ngoài cùng của biểu bì, được hình thành bởi các tế bào chứa keratin trên nền lipid có chứa ceramide, cholesterol và axit béo tạo nên kiểu cấu trúc “gạch - vữa”. Lớp sừng có cấu trúc đặc khít, tỷ trọng lớn (xấp xỉ 1,4 g/cm³), có tính chất kỵ nước, điểm đẳng điện tại pH 4-4,5 và do đó tích điện âm ở điều kiện pH sinh lý. Các thuốc bôi trên da điều trị các bệnh trong da và toàn thân trước tiên phải thẩm được qua lớp sừng [1].

Các dạng thuốc ngoài da chủ yếu đưa thuốc bằng cơ chế khuếch tán thụ động, dựa trên sự chênh lệch gradient nồng độ của thuốc trên và trong da. Khả năng thẩm dược chất vào trong da thường rất thấp, chỉ giới hạn ở các chất phân

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

Conjugation of iontophoresis and minimally invasive techniques to improve transdermal drug delivery

Thi Hong Duc Nguyen, Quoc Anh Vo*,
Cong Thanh Ly, Anh Vu Nguyen

Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong Street, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 7 March 2022; revised 4 April 2022; accepted 7 April 2022

Abstract:

Iontophoresis is an active drug delivery technique that has been demonstrated to significantly enhance the transdermal permeability of numerous active pharmaceutical ingredients (APIs), especially with hydrophilic drugs and large molecules. However, the technique poses limitations in delivering medications reaching therapeutic concentrations of high-dose drugs, proteins, and nanoparticles. Conjugation of iontophoresis with minimally invasive delivery techniques for further improving transdermal absorption is a potential approach to those limitations. Succinylcholine possesses great potential to widen the application range of topical dosage forms to various APIs and drug carrier systems. This article aimed to review the fundamental as well as results of studies applying the approach of combining iontophoresis with minimally invasive drug delivery techniques, namely electroporation, chemical enhancers, low-frequency ultrasound, microneedle arrays, and magnetophoresis.

Keywords: active transdermal delivery, iontophoresis, minimally invasive, transdermal enhancement.

Classification number: 3.5

từ nhỏ và có đặc tính lý hóa đặc biệt. Đối với phần lớn dược chất, khuếch tán thụ động không đủ để đưa thuốc đạt nồng độ điều trị, khó kiểm soát tốc độ và mức độ hấp thu. Nhiều phương pháp vật lý và hóa học khác nhau đã được nghiên cứu áp dụng nhằm tăng tính thấm, thay đổi cấu trúc của lớp sừng hoặc tạo động lực vận chuyển thuốc vào trong hoặc qua da. Trong đó, kỹ thuật điện di ion đã chứng minh được khả năng làm tăng hiệu quả và kiểm soát việc đưa thuốc vào trong da đối với nhiều loại dược chất [2].

Điện di ion được ứng dụng như một kỹ thuật đưa thuốc chủ động, không xâm lấn vào trong hoặc qua da, trong đó động lực vận chuyển thuốc là dòng điện một chiều được tạo ra khi áp một hiệu điện thế phù hợp lên da. Điện di ion làm tăng khả năng vận chuyển thuốc thông qua 3 cơ chế: dẫn điện, thẩm thấu điện và khuếch tán thụ động. Kỹ thuật điện di ion tăng vận chuyển thuốc qua da không chỉ các phân tử thuốc ion hóa mà cả các thuốc không ion hóa và các hoạt chất ít thân dầu [3].

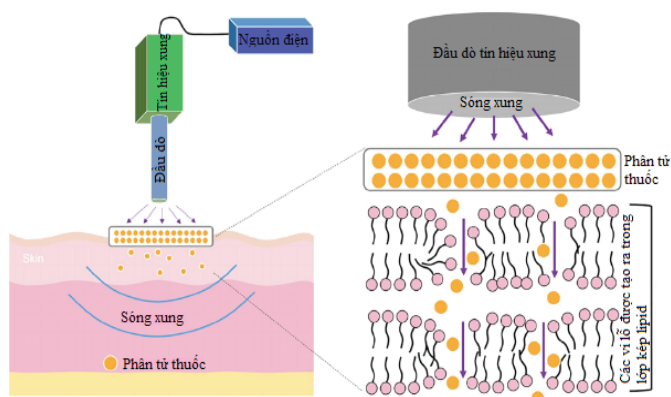
Các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng cho thấy, kỹ thuật điện di ion có thể được ứng dụng hiệu quả trong chẩn đoán và điều trị chứng đau nửa đầu, bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư da, tim mạch hay nghiên cứu vắc xin [4]. Bên cạnh đó, kỹ thuật đạt hiệu quả dẫn thuốc tốt với các dược chất có phân tử lượng thấp, có khả năng ion hóa và tan tốt trong nước. Kỹ thuật này có thể ứng dụng để đưa thuốc phát huy tác dụng tại chỗ hoặc toàn thân. Ngoài ra, kỹ thuật điện di ion cũng đã được chứng minh là một giải pháp hiệu quả để vận chuyển qua da các thuốc protein/peptide, các chất thân nước, các phân tử lớn [4].

4. Kết hợp kỹ thuật điện di ion với các phương pháp xâm lấn tối thiểu

Mặc dù kỹ thuật điện di ion đã được chứng minh có thể vận chuyển qua da các thuốc phân tử nhỏ và một số protein/peptide nhưng ứng dụng của kỹ thuật này vẫn rất hạn chế đối với các dược chất có liều điều trị cao và các protein có trọng lượng phân tử lớn. Để đưa thuốc qua da bằng điện di đạt được nồng độ điều trị, có thể phải dùng dòng điện mạnh trong khoảng thời gian dài, trên một diện tích da đủ rộng, điều đó tiềm ẩn những tác dụng bất lợi, rủi ro và ảnh hưởng đến sự tuân thủ phác đồ điều trị của người bệnh. Việc kết hợp điện di ion với các biện pháp xâm lấn tối thiểu, thay đổi có kiểm soát cấu trúc của lớp sừng là giải pháp có thể làm tăng hơn nữa hiệu quả vận chuyển thuốc mà vẫn giữ được các ưu điểm của thuốc dùng qua da. Sự kết hợp này làm giảm sự cản trở của biểu bì da đối với việc di chuyển của dược chất qua da. Nhờ đó, thuốc được vận chuyển dễ dàng hơn và hiệu quả hơn, không chỉ bằng cơ chế dẫn điện mà cả cơ chế khuếch tán thụ động. Tuy có sự thay đổi cấu trúc của biểu bì nhưng chỉ là các thay đổi nhỏ và nhanh chóng hồi phục sau khi ngừng tác động các tác nhân gây ra sự biến đổi.

4.1. Kết hợp điện di thuốc với tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện

Tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện là kỹ thuật sử dụng điện áp lớn (10-1000 V) trong thời gian rất ngắn (từ vài micro giây đến vài mili giây). Dưới tác dụng của điện trường mạnh tính lưỡng cực của các phân tử lipid trong lớp sừng bị thay đổi và có sự sắp xếp lại tạo nên các vi mao quản trong lớp sừng. Cơ chế tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện được mô hình hóa ở hình 1. Bên cạnh đó, xung điện còn có tác dụng làm tăng linh độ điện, khả năng khuếch tán và độ dẫn điện của các phân tử [5, 6]. Kết quả là dòng thuốc được vận chuyển vào bên trong da tăng đáng kể. Độ dài xung và cường độ xung là 2 yếu tố quyết định đến sự tạo vi kênh trong lớp sừng. Khi dùng việc áp điện thế lớn, các vi kênh vẫn tồn tại trong một thời gian giúp tăng dòng vận chuyển điện tích, dòng thẩm thấu điện cũng như khả năng khuếch tán thuốc qua lớp sừng.



Hình 1. Cơ chế đưa thuốc bằng xung điện [1].

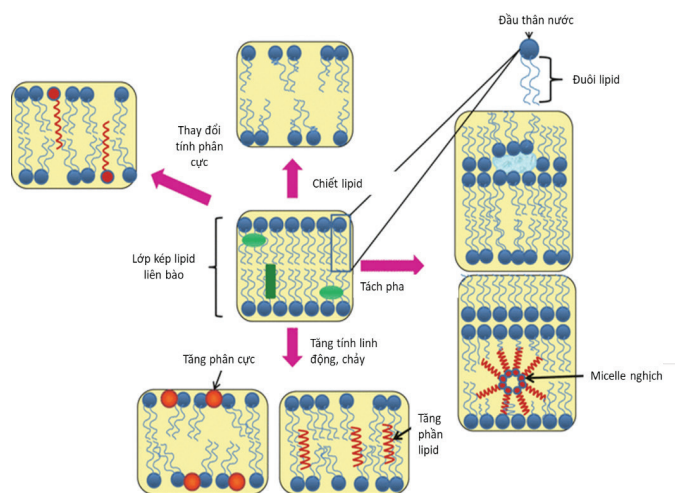
Tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện có ưu điểm là thuốc tác dụng nhanh, vận chuyển được các thuốc có trọng lượng phân tử lớn, tổn thương da nhẹ hoặc không đáng kể. Kết hợp tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện và điện di ion làm tăng cường hơn nữa vận chuyển thuốc qua da, đồng thời cho phép phân phối nhanh và kiểm soát chính xác liều lượng. Tuy nhiên, trong một số trường hợp tác dụng kết hợp 2 kỹ thuật này cho kết quả thấp hơn so với sử dụng đơn lẻ từng kỹ thuật [7]. Một số nghiên cứu điển hình ứng dụng kết hợp tạo kênh dẫn thuốc bằng xung điện và điện di ion được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ứng dụng kết hợp điện di ion với điện xung tạo kênh.

Ứng dụng	Dược chất	Đưa thuốc qua mô	Điều kiện tiên hành	Tóm tắt kết quả
Điều trị bệnh tiểu đường	Insulin	Da chuột	150 V, 300 V (10 ms), 10 xung, 0,4 mA/cm ² , 60 (120) phút	Nồng độ insulin/huyết tương tăng 12,2, 3, 23 và 53% khi dùng điện di, xung điện, hoặc kết hợp ở 150 và 300 V (tương ứng) [6]
Điều trị ung thư	5-fluorouracil	In vitro da chuột	300 V (200 ms), 20 xung (1 xung/30 giây), 0,5 mA/cm ² , 3 giờ	Độ thấm 5-fluorouracil tăng so với khuếch tán thụ động, lên đến 31,41 µg/cm ² .h. Cao hơn so với chỉ dùng điện di hoặc điện xung [8]
Điều trị tăng canxi huyết	Calcitonin	In vitro da người	500 V (200 ms), 15 xung (1 xung/phút), 5 mA/cm ² , 4 giờ	Thông lượng vận chuyển calcitonin là 1247 ng/cm ² .h khi dùng điện di ion và tăng lên đến 2586 ng/cm ² .h khi kết hợp với xung điện [7]
	Hormone tuyến cận giáp (PTH)			Kết hợp xung điện tăng đưa thuốc gấp 17 lần so với điện di. Hấp thu PTH/24 giờ khi sử dụng điện di là 0,54 µg/cm ² và lên đến 4,8 µg/cm ² khi kết hợp với xung điện [7]
Điều trị bệnh tim mạch	Timolol	Da bụng người	400 V (10 ms), 10 xung, 0,5 mA/cm ² , 9 giờ	Thông lượng vận chuyển Timolol là 3, 40, 240 và 150 µg/cm ² .h tương ứng khuếch tán thụ động, xung điện, điện di ion, giải pháp kết hợp. Tích lũy thuốc ở 21 giờ là 640 và 483 µg/cm ² tương ứng khi sử dụng điện di và giải pháp kết hợp [9]
	Atenolol		400 V (10 ms), 10 xung, 0,25 mA/cm ² , 3 giờ	Thông lượng vận chuyển Atenolol cao hơn khi kết hợp 2 kỹ thuật. Thuốc tích lũy ở 20 giờ là 1.089 và 2.459 µg/cm ² tương ứng khi sử dụng điện di và giải pháp kết hợp [9]

4.2. Kết hợp điện di thuốc với các tác nhân hóa học tăng tính thấm

Các chất tăng khả năng thấm qua da hoạt động dựa trên nhiều cơ chế khác nhau làm thay đổi cấu trúc hoặc các tính chất của da. Các chất tăng khả năng thấm qua da có thể làm thay đổi cấu trúc lipid kép liên bào, chiết lipid ra khỏi da tạo nên các kênh khuếch tán thuốc, tăng tính linh động của lipid kép trong lớp sừng, tăng tính thân nước của tế bào sừng, hoặc thay đổi thành phần protein trong da [10]. Một số chất tăng hấp thu thuốc qua da còn có thể thúc đẩy tạo ra trạng thái siêu bão hòa của dược chất và cải thiện sự phân bố thuốc trong da [11]. Cơ chế tăng tính thấm qua da bằng tác nhân hóa học được mô hình hóa ở hình 2. Các hóa chất tăng tính thấm dùng trong dược phẩm phải đáp ứng được yêu cầu là trơ, ít độc hại, ít gây dị ứng, phản ứng nhanh và các chức năng hàng da phải phục hồi nhanh chóng sau khi hóa chất được loại bỏ [12]. Các chất làm tăng tính thấm dược chất qua da được dùng phổ biến thường thuộc các nhóm chất sau: sulfoxides, azone, pyrrolidone, acid béo, alcohol, chất điện hoạt, ureas, terpenes.



Hình 2. Cơ chế tăng tính thấm qua da bằng các tác nhân hóa học [13].

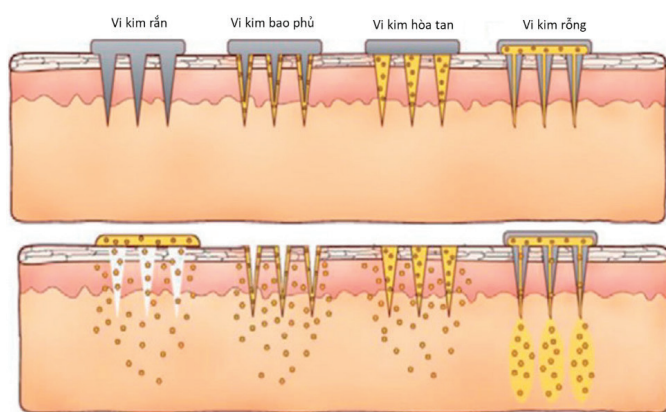
Việc sử dụng các tác nhân hóa học tăng tính thấm có thể làm giảm sự cản trở khuếch tán thuốc của lớp sừng, giảm điện trở của da và có thể tạo ra các kênh dẫn thuốc. Do vậy, nếu da đã được tăng tính thấm trước bằng các tác nhân hóa học, khi áp lên da một điện thế, dược chất sẽ di chuyển qua da dễ dàng hơn, với tốc độ lớn hơn, dẫn đến tăng thông lượng vận chuyển thuốc qua da [14]. Sự kết hợp 2 kỹ thuật này một mặt có thể làm giảm lượng dùng cần thiết của các tác nhân hóa học; mặt khác có thể rút ngắn được thời gian, điện thế áp dụng và diện tích da tiếp xúc với điện cực. Điều đó có thể làm tăng tính an toàn cũng như khả năng kiểm soát chủ động việc đưa thuốc qua da. Một số nghiên cứu đại diện ứng dụng giải pháp kết hợp tác nhân hóa học với điện di ion được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ứng dụng kết hợp kỹ thuật điện di ion với tác nhân hóa học.

Ứng dụng	Hoạt chất	Đưa thuốc qua mô	Tác nhân hóa học	Tóm tắt kết quả
Kiểm soát đi tiểu	Tolterodine tartrate	Da thô	Nerolidol	Thông lượng vận chuyển tăng 1,75 lần so với điện di đơn thuần. Cải thiện khả năng kiểm soát đi tiểu [15]
Giảm đau, kháng viêm	Kali diclofenac	Da lợn	Geraniol	Thông lượng vận chuyển tăng 4,75 lần so với điện di đơn thuần [16]
			l-menthol	Thông lượng vận chuyển tăng 4,49 lần so với điện di đơn thuần [16]
			Thymol	Thông lượng vận chuyển tăng 4,33 lần so với điện di đơn thuần [16]
Ngăn ngừa và điều trị HIV/AIDS	Zidovudine	Da chuột	Geraniol	Hiệu quả chống viêm tăng gấp 2 lần so với điện di đơn thuần [16]
			Propylene glycol	Thông lượng điện di tăng 5-7 lần so với điện di đơn thuần [14]
Điều trị tăng huyết áp và đau thắt ngực	Bisoprolol hemifumarate	Ex vivo da chuột	Axit oleic	Thông lượng điện di tăng 11-15 lần so với điện di đơn thuần [14]
			Cellosolve	Thông lượng vận chuyển tăng 1,5 lần so với điện di đơn thuần. C_{max} gấp 1,9 lần, T_{max} giảm 0,7 lần, sinh khả dụng đạt 201,44% so với viên nén [17]

4.3. Kết hợp điện di thuốc với các màng vi kim

Đưa thuốc qua da bằng màng vi kim là kỹ thuật đưa thuốc với sự xâm lấn tối thiểu nhờ phá vỡ có kiểm soát lớp sừng của biểu bì, qua đó tạo ra các kênh rất nhỏ dẫn thuốc vào trong da. Màng vi kim được tạo thành từ nhiều cấu trúc 3 chiều chứa được chất, có hình kim kích thước từ vài chục tới dưới 1.000 μm . Chúng có thể xuyên qua lớp sừng của biểu bì đến lớp hạ bì nhưng không tiếp xúc với dây thần kinh hoặc mạch máu. Do đó, sử dụng màng vi kim ít đau, thoải mái hơn so với tiêm dưới da và đặc biệt là an toàn sinh học [18]. Khi điều trị bằng các màng vi kim, thuốc khuếch tán hoặc vận chuyển trực tiếp từ các đầu kim vào trong da mà không cần thẩm qua lớp sừng, nhờ đó loại bỏ được hàng rào ngăn cản sự hấp thu thuốc qua da. Cơ chế tác dụng của màng vi kim được mô hình hóa ở hình 3.



Hình 3. Cơ chế tác dụng của các màng vi kim [19].

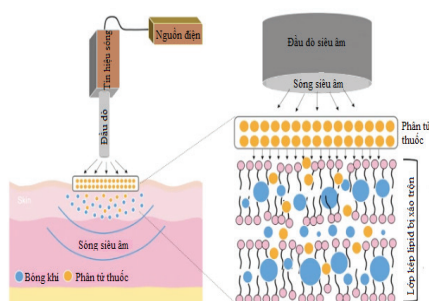
Có nhiều loại vi kim được nghiên cứu ứng dụng trong việc phân phối thuốc qua da như vi kim hòa tan, vi kim chứa tiểu phân mang thuốc, vi kim tách rời, vi kim rỗng, vi kim tạo gel... [20] và có thể chia làm 2 nhóm: màng vi kim rắn và vi kim rỗng. Vi kim rắn có cấu trúc đặc khít, thuốc được bao bên ngoài hay phân bố đều trong cấu trúc vi kim. Khi điều trị, được chất hòa tan giải phóng từ vi kim và khuếch tán vào trong da. Vi kim rỗng có cấu trúc bên trong rỗng như tên gọi của nó. Khi điều trị, thuốc có thể được đưa vào trong da liên tục từ bên ngoài thông qua cấu trúc rỗng của vi kim bằng các cơ chế khác nhau, như dùng áp suất đẩy thuốc, khuếch tán, hay dùng dòng điện dẫn thuốc. Kỹ thuật này cho phép đưa thuốc được nhiều hơn và có khả năng kiểm soát tốt được liều lượng và tốc độ đưa thuốc [21]. Một số nghiên cứu đại diện ứng dụng màng vi kim để tăng vận chuyển thuốc qua da được tóm tắt ở bảng 3.

Bảng 3. Ứng dụng kết hợp kỹ thuật điện di ion với các màng vi kim.

Sản phẩm/ ứng dụng	Hoạt chất	Đưa thuốc qua mô	Điều kiện tiến hành	Tóm tắt kết quả
Tappy Tok Tok/cải thiện vóc dáng	Hormone tăng trưởng tái tổ hợp (rhGH)	Da chuột	20 vi kim trên bề mặt được xếp hình tròn. Vi kim dài 750, đường kính 130 μm , 2 lỗ châm/giấy, lực châm không đổi; 0,5 mA/cm ² , 4 giờ	Tích lũy thuốc lần lượt tăng 2 và 7 lần so với điện di và màng vi kim. Thông lượng vận chuyển thuốc là 1,86, 2,02 và 11,75 ng.cm ⁻² .h ⁻¹ tương ứng khi sử dụng điện di, màng vi kim và kết hợp 2 kỹ thuật [22]
Miếng dán thẩm thấu qua da IDPMAP/ điều trị tiểu đường	Insulin	In vivo da chuột	138 vi kim được xếp hình nón. Vi kim dài 800, đường kính 400 μm , khoảng cách giữa 2 vi kim liên kế là 1 mm; 1 mA, 12 giờ	Khả năng thẩm qua da tăng 99%, độc tính không đáng kể, tương thích sinh học tốt, không kích ứng da. Tác dụng hạ đường huyết mạnh, duy trì ổn định đường huyết thấp hơn 2,7 lần so với tiêm dưới da và 1,7 lần so với chỉ sử dụng điện di [23]
Điều trị chống đông máu	Dẫn chất huỳnh quang của dextrans	In vitro da chuột	Màng 9 vi kim cao 400, rộng 200 μm , đầu nhọn góc 28°, 1,6 kg/cm ² trong 10 giây; 0,3 mA/cm ² , 5 giờ	Được chất không thẩm qua khi điện di. Kết hợp với màng vi kim có thể vận chuyển được phân tử có trọng lượng 200 kDa vào trong da. Lượng tích lũy qua da lớn, thời gian trễ dài lên đến 2,82 giờ [24]
Theo dõi, điều hòa đường huyết	Insulin	Da người	Điện cực Ag/AgCl. Màng vi kim 4,3 cm ² x 32 kim/cm ² . Vi kim cao 600, rộng 400 μm . Điện thế điều khiển bằng cơ chế feedback	Theo dõi nồng độ glucose trong máu và phân phối insulin theo nhu cầu để kiểm soát liên tục, tự động đường huyết bằng cơ chế feedback. Theo dõi và điều khiển bằng Apps trên điện thoại thông minh [25]
Điều trị đau nửa đầu	Sumatriptan	Gottingen minipigs	Điện cực Ag/AgCl, dòng điện 100, 300 và 500 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ trong 6 giờ; màng 600 vi kim/ 0,785 cm ² ; vi kim hòa tan với cốt PVP	Không định lượng được được chất khi dùng điện di. Kết hợp điện di và màng vi kim tăng đến trên 2 lần thông lượng vận chuyển thuốc và không có thời gian trễ. Kỹ thuật kết hợp có thể đưa thuốc đạt nồng độ điều trị tương đương với trị liệu tiêm dưới da [26]
Kiểm soát đường huyết trong điều trị tiểu đường	Insulin ở dạng tiểu phân nano mang thuốc, tích điện dương	Thỏ New Zealand	Điện cực Ag/AgCl, dòng điện 1,2,3 mA. Màng vi kim 15x15 cao 600, rộng 200 μm	Phối hợp điện di với màng vi kim tăng khả năng đưa thuốc trên 4 lần so với điện di và trên 2 lần so với màng vi kim. Hiệu quả kiểm soát đường huyết tốt, an toàn với nguồn điện yếu lấy từ điện thoại. Tốc độ đưa thuốc đáp ứng tốt với việc bật và tắt dòng điện [27]

4.4. Kết hợp điện di ion với sóng siêu âm tần số thấp

Phương pháp này sử dụng sóng siêu âm ở tần số 20-100 kHz làm thay đổi cấu trúc lớp kép lipid của lớp sừng. Khi tiếp xúc với sóng siêu âm, các khoang trống và bóng khí được tạo ra gây xáo trộn lớp kép lipid của lớp sừng. Sóng siêu âm hoạt động theo 2 cơ chế là hiệu ứng nhiệt và tạo khoang trống. Khi áp dụng siêu âm, nhiệt độ tại vùng da tiếp xúc tăng lên do hấp thụ năng lượng sóng siêu âm, nhờ đó làm tăng tính linh động của da và tăng thông lượng khuếch tán thuốc vào da. Cơ chế tạo khoang trống là hiện tượng hình thành - phá vỡ và dao động của các bóng khí dưới tác dụng của sóng siêu âm tạo nên các kênh dẫn thuốc, làm giảm sự cản trở của lớp sừng đối với sự khuếch tán, vận chuyển thuốc [28, 29]. Đây cũng là cơ chế chính của việc tăng tính thấm của da bằng siêu âm. Cơ chế vận chuyển thuốc khi sử dụng sóng siêu âm được mô hình hóa trong hình 4.



Hình 4. Cơ chế đưa thuốc bằng sóng siêu âm [1].

Sự kết hợp giữa kỹ thuật điện di ion với siêu âm tần số thấp giúp tăng cường vận chuyển thuốc qua da gấp nhiều lần so với áp dụng đơn lẻ từng phương pháp. Siêu âm làm giảm sự cản trở hấp thụ và vận chuyển thuốc của da, tạo điều kiện cho dòng vận chuyển thuốc bằng điện di nhanh hơn và hiệu quả hơn. Một số ứng dụng về sự vận chuyển thuốc qua da kết hợp 2 phương pháp này được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Ứng dụng kết hợp kỹ thuật điện di ion với sóng siêu âm.

Ứng dụng	Dược chất	Đưa thuốc qua mô	Điều kiện tiến hành	Tóm tắt kết quả
Dưỡng da	Axit glutamic	Da lưng lợn	280 (350) kHz, 500 mW/m ² , 100, 150, 200 µA/cm ² , 24 giờ	Lượng thuốc thấm qua da sau 24 giờ tăng dần theo thứ tự: dùng siêu âm, điện di, kết hợp siêu âm và điện di. Sự kết hợp 2 kỹ thuật này cho khả năng thấm cao nhất lên đến 240% ở 350 kHz so với nhóm đối chứng [30]
Điều trị tăng nhãn áp	Mannitol	In vitro da chuột	20 kHz, 1,1 W/m ² , 1 phút; 0,4 mA/cm ² , 4 giờ	Thông lượng vận chuyển thuốc khi điện di là 3 ng/cm ² .h. Giá trị này phản bổ rộng, đạt đến 800 ng/cm ² .h khi sử dụng siêu âm tần số thấp và đạt 2046 ng/cm ² .h khi kết hợp siêu âm với điện di [31]
Giảm đau, hạ sốt	Dendrimer-ketoprofen	Ex vivo và in vivo da chuột	7-8 W/cm ² , 30 phút; 0,38 mA/cm ²	Khả năng hòa tan trong nước ≥5 lần so với Ketoprofen đơn thuần (58,54 µg/ml). Lượng Dendrimer Ketoprofen thấm qua da cao, lớn hơn 7 lần so với Ketoprofen đơn thuần [32]

4.5. Kết hợp điện di ion với từ trường

Tạo ra từ trường phù hợp có thể giúp vận chuyển thuốc chủ động qua da [33]. Từ trường ứng dụng trong đưa thuốc thường được tạo ra bởi nam châm vĩnh cửu có cường độ từ trường nằm trong khoảng 10⁻²-5.10⁻² mT. Các phân tử được chất có thể được vận chuyển qua hàng rào hấp thụ đồng thời bằng 2 cơ chế: dẫn từ và thẩm thấu từ. Cơ chế dẫn từ (magnetorepulsion) dựa trên hiện tượng chuyển động có hướng của các hạt nhiễm từ trong điện từ trường. Từ trường áp lên da sẽ đẩy các phân tử/tiểu phân thuốc có mang từ tính hoặc bị nhiễm từ vào da. Cơ chế thứ 2 xảy ra do sự thẩm thấu từ (magnetohydrokinesis) tạo ra các dòng chất lỏng di chuyển hướng vào trong da dưới tác động của từ trường [34]. Kết quả là sự vận chuyển nước được tăng cường kéo theo sự vận chuyển các chất hòa tan cũng được tăng cường.

Sự kết hợp của liệu pháp điện trường, từ trường và điện di ion giúp nâng cao hiệu quả trong điều trị bằng điện hóa trị liệu cho một vùng trên da. Sự kết hợp này tạo ra hiệu ứng điện hóa trị liệu được gọi là “điện truyền dịch”. Ứng dụng đầu tiên được đưa ra là hệ thống phân phối thuốc qua da bằng thiết bị quần điện di động. Thuốc và các chất điện giải được hấp thụ nhanh chóng trên khắp da khi một điện từ trường được áp dụng trên thiết bị này [35]. Phát minh của [35] được tiếp tục phát triển một hệ thống cung cấp thuốc tự động qua da bằng miếng dán thẩm thấu. Miếng dán này có thể vận chuyển được các thuốc có trọng lượng phân tử lớn một cách hiệu quả đến đúng vị trí cần điều trị.

5. Kết luận

Sự kết hợp kỹ thuật điện di ion với các phương pháp phá vỡ có kiểm soát lớp sừng đã được nghiên cứu rộng rãi trong những năm gần đây. Sự kết hợp này tạo ra tác dụng hợp đồng trong tăng hiệu quả đưa thuốc qua da bằng cách làm giảm sự cản trở của lớp sừng và vận chuyển thuốc chủ động bằng dòng điện, trong khi vẫn giữ được các ưu điểm của đường dùng thuốc qua da. Kỹ thuật phối hợp này có thể giúp đưa thuốc qua da đạt nồng độ điều trị đối với các thuốc có liều điều trị cao, trọng lượng phân tử lớn, các protein/peptid và các hoạt chất thân nước. Những tiến bộ đạt được trong sự phát triển của thiết bị điện từ, công nghệ bảo chế và vật liệu mở ra nhiều ứng dụng của điện di ion trong điều trị bệnh trên lâm sàng. Điều này góp phần thúc đẩy sự phát triển của việc ứng dụng công nghệ hiện đại vào phát triển các bào chế mới hiệu quả hơn, an toàn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Ramadon, M.T.C. McCrudden, A.J. Courtenay, et al. (2021), “Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: Current trends and applications”, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **12**(4), pp.758-791, DOI: 10.1007/s13346-021-00909-6.
- [2] K. Ita (2016a), “Transdermal iontophoretic drug delivery: Advances and challenges”, *J. Drug Target.*, **24**(5), pp.386-391, DOI: 10.3109/1061186X.2015.1090442.
- [3] D.T.H. Nguyen, Q.A. Vo (2021a), “The mechanism of action and kinetics of drug delivery using iontophoresis technique applied in increasing drug delivery through the skin”, *Hanoi National University of Education Journal of Science*, **2**, pp.16-27.

- [4] N.T.H. Duc, V.Q. Anh (2021b), "Enhancement of drug delivery across the skin barrier using iontophoresis technique: Pros, cons, and novel findings from representative studies", *Vietnam Journal of Science and Technology B - MOST*, **63**(9), pp.39-43, DOI: 10.31276/VJST.63(9).39-43 (in Vietnamese).
- [5] M.L. Yarmush, A. Golberg, G.Serša, et al. (2014), "Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **16**, pp.295-320, DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.
- [6] K. Ita (2016b), "Perspectives on transdermal electroporation", *Pharmaceutics*, **8**(1), DOI: 10.3390/pharmaceutics8010009.
- [7] B.M. Medi, B. Layek, J. Singh (2017), "Electroporation for dermal and transdermal drug delivery", *Percutaneous Penetration Enhanc. Phys. Methods Penetration Enhanc.*, Springer, pp.105-122, DOI: 10.1007/978-3-662-53273-7_7.
- [8] J.Y. Fang, C.F. Hung, Y.P. Fang, et al. (2004), "Transdermal iontophoresis of 5-fluorouracil combined with electroporation and laser treatment", *Int. J. Pharm.*, **270**(1-2), pp.241-249, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.10.025.
- [9] B. Ghosh, D. Iyer, A.B. Nair, et al. (2012), "Prospects of iontophoresis in cardiovascular drug delivery", *J. Basic Clin. Pharm.*, **4**(1), pp.25-30, DOI: 10.4103/0976-0105.109407.
- [10] M.N. Anurova, N.B. Demina, E.O. Bakhrushina (2021), "Permeability enhancers in transdermal delivery system technology (review)", *Pharm. Chem. J.*, **54**(11), pp.1162-1169, DOI: 10.1007/s11094-021-02336-w.
- [11] A. Kováčik, M. Kopečná, K. Vávrová (2020), "Permeation enhancers in transdermal drug delivery: Benefits and limitations", *Expert Opin. Drug Deliv.*, **17**(2), pp.145-155, DOI: 10.1080/17425247.2020.1713087.
- [12] A.C. Williams, B.W. Barry (2012), "Penetration enhancers", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, pp.128-137, DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.032.
- [13] H. Benson (2005), "Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques", *Curr. Drug Deliv.*, **2**(1), pp.23-33, DOI: 10.2174/1567201052772915.
- [14] X. Ning, R.Z. Seeni, C. Xu (2019), "Iontophoresis enhanced transdermal drug delivery", *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*, Wiley, **12**, DOI: 10.1002/9783527814633.ch12.
- [15] D. Prasanthi, P.K. Lakshmi (2013), "Synergistic effect of iontophoresis and chemical enhancers on transdermal permeation of tolterodine tartrate for the treatment of overactive bladder", *Int. Braz. J. Urol.*, **39**(1), pp.63-75, DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2013.01.09.
- [16] S. Arunkumar, H.N. Shivakumar, S.N. Murthy (2018), "Effect of terpenes on transdermal iontophoretic delivery of diclofenac potassium under constant voltage", *Pharm. Dev. Technol.*, **23**(8), pp.806-814, DOI: 10.1080/10837450.2017.1369110.
- [17] M.H. Teaima, M.A.A. Mohamed, R.T.A. El Rehem, et al. (2021), "Enhanced transdermal delivery of bisoprolol hemifumarate via combined effect of iontophoresis and chemical enhancers: Ex vivo permeation/ in vivo pharmacokinetic studies", *Pharmaceutics*, **13**(5), DOI: 10.3390/pharmaceutics13050682.
- [18] A.M. Helmy (2021), "Overview of recent advancements in the iontophoretic drug delivery to various tissues and organs", *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **61**, DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102332.
- [19] S. Darvishha, S. Amiri (2019), "(Trans) dermal insulin delivery based on polymeric systems", *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, **68**(18), pp.1118-1132, DOI: 10.1080/00914037.2018.1534113.
- [20] L.K. Vora, K. Moffatt, I.A. Tekko, et al. (2021), "Microneedle array systems for long-acting drug delivery", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **159**, pp.44-76, DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.12.006.
- [21] S. Dharadhar, A. Majumdar, S. Dhoble, et al. (2019), "Microneedles for transdermal drug delivery: A systematic review", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **45**(2), pp.188-201, DOI: 10.1080/03639045.2018.1539497.
- [22] G. Noh, T. Keum, J.E. Seo, et al. (2018), "Iontophoretic transdermal delivery of human growth hormone (HGH) and the combination effect of a new type microneedle, Tappy Tok Tok®", *Pharmaceutics*, **10**(3), DOI: 10.3390/pharmaceutics10030153.
- [23] Y. Li, J. Yang, Y. Zheng, et al. (2021), "Iontophoresis-driven porous microneedle array patch for active transdermal drug delivery", *Acta Biomater.*, **121**, pp.349-358, DOI: 10.1016/j.actbio.2020.12.023.
- [24] X.M. Wu, H. Todo, K. Sugibayashi (2007), "Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis", *J. Control. Release*, **118**(2), pp.189-195, DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.12.017.
- [25] X. Li, X. Huang, J. Mo, et al. (2021), "A fully integrated closed-loop system based on mesoporous microneedles-iontophoresis for diabetes treatment", *Adv. Sci.*, **8**(16), pp.1-15, DOI: 10.1002/adv.202100827.
- [26] J.P. Ronnander, L. Simon, A. Koch (2019), "Transdermal delivery of sumatriptan succinate using iontophoresis and dissolving microneedles", *J. Pharm. Sci.*, **108**(11), pp.3649-3656, DOI: 10.1016/j.xphs.2019.07.020.
- [27] J. Yang, Y. Li, R. Ye, et al. (2020), "Smartphone-powered iontophoresis-microneedle array patch for controlled transdermal delivery", *Microsystems Nanoeng.*, **6**(1), DOI: 10.1038/s41378-020-00224-z.
- [28] B.E. Polat, D. Hart, R. Langer, et al. (2011), "Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends", *J. Control. Release*, **152**(3), pp.330-348, DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.006.
- [29] A. Azagury, L. Khoury, G. Enden, et al. (2014), "Ultrasound mediated transdermal drug delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **72**, pp.127-143, DOI: 10.1016/j.addr.2014.01.007.
- [30] J. Park, H. Lee, G.S. Lim, et al. (2019), "Enhanced transdermal drug delivery by sonophoresis and simultaneous application of sonophoresis and iontophoresis", *AAPS PharmSciTech*, **20**(3), DOI: 10.1208/s12249-019-1309-z.
- [31] S. Tokumoto, N. Higo, H. Todo, et al. (2016), "Effect of combination of low-frequency sonophoresis or electroporation with iontophoresis on the mannitol flux or electroosmosis through excised skin", *Biol. Pharm. Bull.*, **39**(7), pp.1206-1210, DOI: 10.1248/bpb.b15-00696.
- [32] A.R. Hegde, P.V. Rewatkar, J. Manikkath, et al. (2017), "Peptide dendrimer-conjugates of ketoprofen: Synthesis and ex vivo and in vivo evaluations of passive diffusion, sonophoresis and iontophoresis for skin delivery", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, pp.237-249, DOI: 10.1016/j.ejps.2017.03.009.
- [33] S.M. Mirvakili, R. Langer (2021), "Wireless on-demand drug delivery", *Nat. Electron.*, **4**(7), pp.464-477, DOI: 10.1038/s41928-021-00614-9.
- [34] S.N. Murty, S.M. Sammeta, C. Bower (2010), "Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design", *J. Control. Release*, **148**(2), pp.197-203, DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.015.
- [35] Google Patents (2021), "Electrophoretic cuff apparatus drug delivery system", <https://patents.google.com/patent/US5983134A/en>, accessed 15 January 2022.

Xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột từ bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Hữu Mai Linh¹, Phạm Ngọc Thạc², Huỳnh Trần Quốc Dũng², Võ Thanh Hóa³,
Phan Thanh Dũng¹, Nguyễn Đức Hạnh^{1*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bệnh viện Y học Cổ truyền TP Hồ Chí Minh, 179 Nam Kỳ Khởi Nghĩa, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Y, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, đường Hải Thượng Lãn Ông, phường Đông Hòa, TP Dĩ An, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/7/2022; ngày chuyển phản biện 11/7/2022; ngày nhận phản biện 25/7/2022; ngày chấp nhận đăng 29/7/2022

Tóm tắt:

Bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung (gọi là BT) gồm 13 vị thuốc đã được chứng minh có tác dụng giảm đau, kháng viêm trên động vật và đã được phát triển thành dạng thuốc bột. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng phương pháp định lượng acid asperulosidic, chất điểm chỉ trong thuốc bột BT, bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các điều kiện xử lý mẫu thử và điều kiện HPLC định lượng được nghiên cứu lựa chọn. Quy trình định lượng đã được thẩm định theo hướng dẫn của Hội đồng quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật đối với dược phẩm dùng cho người (ICH) về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Methanol được chọn làm dung môi để chuẩn bị mẫu thử và tỷ lệ giữa thuốc bột BT và methanol là 300:25 (mg/ml). Điều kiện HPLC được chọn để định lượng acid asperulosidic gồm cột C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 μm), bước sóng phát hiện 236 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút và thể tích tiêm 10 μl. Pha động là hỗn hợp của acetonitril và H₃PO₄ 0,1% với tỷ lệ 9,5:90,5 (tt/tt). Phương pháp định lượng cho thấy sự tương quan tuyến tính cao giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic ($r^2=0,9987$). Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của độ chính xác trung gian là 1,24%. Tỷ lệ phục hồi trong khoảng 91,22-99,76%. Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đáp ứng các yêu cầu thẩm định và có thể được áp dụng để xây dựng tiêu chuẩn và theo dõi chất lượng của thuốc bột BT.

Từ khóa: acid asperulosidic, bài thuốc thoái hóa cột sống, định lượng, HPLC, thuốc bột.

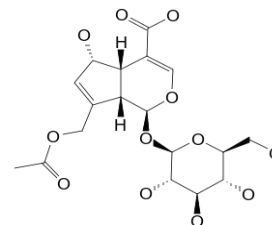
Chỉ số phân loại: 3.5

1. Đặt vấn đề

Bài thuốc thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung gồm 13 dược liệu (Mã đề, Cối xay, Cỏ tranh, Dây măng bát, Râu mèo, Ý dĩ, Cỏ xước, Nhàu, Đùng đỉnh, Mía dò, Rau bợ, Mướp gai, Đinh lăng lá xẻ) đã được chứng minh có tác dụng giảm đau và kháng viêm trên chuột [1]. Bài thuốc đã được nghiên cứu điều chế thành công dưới dạng cao khô và xây dựng phương pháp định tính và định lượng các chất điểm chỉ [2, 3]. Với mục tiêu tạo thuận tiện cho người sử dụng, cao khô BT đã được tiếp tục nghiên cứu phát triển thành dạng thuốc bột BT, sử dụng các tá dược cải thiện tính trơn chảy gồm maltodextrin và dextrose với tỷ lệ cao khô trong thuốc bột là 30%.

Acid asperulosidic (hình 1) là chất điểm chỉ quan trọng của cao khô BT [2, 3]. Vì vậy, việc nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột từ BT để kiểm soát chất lượng và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở sản phẩm thuốc bột BT là nghiên cứu mang tính cấp thiết. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic thuốc bột từ BT bằng phương pháp HPLC.

*Tác giả liên hệ: Email: duchanh@ump.edu.vn



Hình 1. Cấu trúc hóa học của acid asperulosidic.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Thuốc bột BT, acid asperulosidic (hàm lượng 97,41%) được cung cấp bởi Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh. CHCl₃ và H₂SO₄ đạt tiêu chuẩn phân tích (Trung Quốc). Methanol và H₃PO₄ đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck, Đức). Acetonitril (Scharlau, Tây Ban Nha) và nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát quy trình xử lý mẫu: Sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) để khảo sát chọn dung môi chiết xuất acid asperulosidic trong BT với điều kiện khảo sát như sau:

Development of an HPLC method for asperulosidic acid quantification in the powder prepared from the spinal degeneration remedy of physician

Nguyen Thien Chung

Huu Mai Linh Nguyen¹, Ngoc Thac Pham²,
Tran Quoc Dung Huynh², Thanh Hoa Vo³,
Thanh Dung Phan¹, Duc Hanh Nguyen^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Traditional Medicine Hospital - Ho Chi Minh City,

179 Nam Ky Khoi Nghia Street, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

³School of Medicine, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

Hai Thuong Lan Ong Street, Dong Hoa Ward, Di An City, Binh Duong Province, Vietnam

Received 7 July 2022; revised 25 July 2022; accepted 29 July 2022

Abstract:

Nguyen Thien Chung's remedy which consists of 13 medicinal herbs had been demonstrated its analgesic and anti-inflammatory effects on animal experiments. This remedy has further been developed into powder form. This study was conducted to develop a method to quantify asperulosidic acid, the important marker in BT powder, by high-performance liquid chromatography (HPLC). Sample processing conditions and quantitative HPLC conditions were screened. The HPLC method was validated according to the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines for system suitability, specificity, linearity, precision and accuracy. Methanol was chosen as the solvent for sample preparation and the ratio between BT powder and methanol was 300:25 (mg/ml). The selected HPLC conditions included a C18 Shimpack GIST column (250×4.6 mm, 5 μm), a detection wavelength of 236 nm, a column temperature of 30°C, a flow rate of 1 ml/min, and an injection volume of 10 μl. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.1% H₃PO₄ with a ratio of 9.5:90.5 (v/v). The quantitative method showed a good linear correlation between the peak area and the concentration of asperulosidic acid ($r^2=0.9987$). The Relative standard deviation (RSD) value of the intermediate precision was 1.24%. The recovery was found in a range of 91.22-99.76%. The HPLC method for asperulosidic acid quantification in BT powder met the validation requirements and could be applied to standardise and evaluate the quality of BT powder.

Keywords: asperulosidic acid, HPLC, powder, quantitation, the spinal degeneration remedy.

Classification number: 3.5

- Dung dịch đối chiếu gốc: Cân 3 mg chất chuẩn acid asperulosidic, cho vào bình định mức 10 ml. Thêm 9 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều.

- Dung dịch đối chiếu: Cho 1 ml dung dịch đối chiếu gốc vào bình định mức 10 ml, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Dung dịch acid asperulosidic đối chiếu có nồng độ 30 μg/ml trong methanol.

- Dung dịch thử: Cân 500 mg thuốc bột BT, cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 20 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc. Tiến hành tương tự với các dung môi ethanol, acetonitril và nước.

Triển khai SKLM với hệ dung môi triển khai CH₃Cl - MeOH - H₂O (60:40:10, lớp dưới) và phát hiện bằng thuốc thử H₂SO₄ 10% trong ethanol (sấy ở 105°C). Chọn dung môi chiết được nhiều acid asperulosidic nhất để chuẩn bị mẫu thử.

Khảo sát chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử: Dùng dung môi chiết xuất được chọn để khảo sát và chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành thực nghiệm với 2 tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi như sau:

- Tỷ lệ 1: Cân chính xác 300 mg thuốc bột BT và chiết với 25 ml dung môi được chọn.

- Tỷ lệ 2: Cân chính xác 300 mg thuốc bột BT và chiết với 50 ml dung môi được chọn.

Chiết xuất bằng phương pháp siêu âm trong 30 phút, chuẩn bị 3 mẫu thử riêng biệt cho mỗi tỷ lệ. Kiểm tra hiệu suất chiết acid asperulosidic của 2 tỷ lệ khảo sát bằng phương pháp HPLC theo điều kiện sắc ký được chọn. Chọn tỷ lệ có thể tích dung môi chiết thấp và chiết được tối đa chất điểm chỉ acid asperulosidic.

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Sử dụng hệ thống sắc ký Shimadzu LC-2030C 3D plus, detector PDA (Nhật Bản), cột sắc ký C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 μm) và tiền cột HQ105C18 (10×4,6 mm, 5 μm) (Thermo Scientific, Mỹ), nhiệt độ cột 30°C, bước sóng phát hiện 236 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μl. Thăm dò một số chương trình pha động (bảng 1). Chọn điều kiện HPLC sao cho pic acid asperulosidic tách hoàn toàn khỏi các pic tạp trong mẫu thử và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

Bảng 1. Pha động khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

Điều kiện pha động	% acetonitril	% dung dịch H ₃ PO ₄ 0,1%
I	10	90
II	9,5	90,5

Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT được thẩm định theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [4].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Khảo sát dung môi chiết xuất acid asperulosidic trong mẫu thử: Kết quả SKLM phân tích thành phần dịch chiết thuốc bột BT khi chiết xuất bằng 4 dung môi khác nhau (nước, methanol, acetonitril, ethanol 96%) được trình bày ở hình 2.



Hình 2. SKLM khảo sát thành phần các dịch chiết thuốc bột BT. ACN: dịch chiết acetonitril; Et: dịch chiết ethanol 96%; Me: dịch chiết methanol; N: dịch chiết nước; Asp: dung dịch acid asperulosidic đối chiếu.

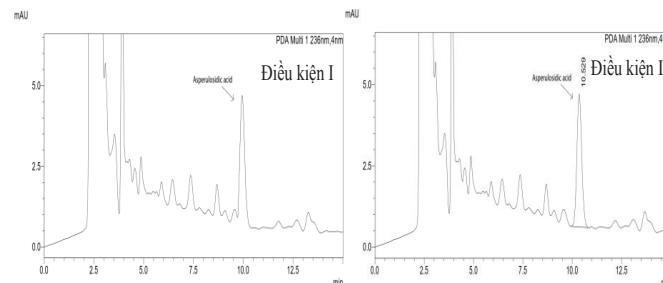
Kết quả SKLM cho thấy, ethanol 96%, methanol và nước đều chiết được acid asperulosidic. Acetonitril hầu như không chiết được chất điểm chỉ acid asperulosidic. Methanol là dung môi cho vết acid asperulosidic trong thành phần dịch chiết đậm nhất, chứng tỏ methanol là dung môi chiết được nhiều acid asperulosidic nhất. Vì vậy, methanol được chọn làm dung môi chiết xuất acid asperulosidic từ thuốc bột BT để điều chế mẫu thử.

Khảo sát chọn tỷ lệ thuốc bột BT và dung môi chuẩn bị mẫu thử: Bảng 2 trình bày hàm lượng acid asperulosidic xác định được với 2 tỷ lệ thuốc bột BT và methanol khảo sát. Phân tích thống kê cho thấy, lượng acid asperulosidic chiết được với 2 tỷ lệ khảo sát khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, với cùng một lượng thuốc bột BT, khi tăng gấp đôi lượng dung môi methanol chiết xuất, lượng acid asperulosidic chiết được không tăng thêm. Vậy, dung môi methanol với tỷ lệ thuốc bột BT và methanol (300:25) được chọn làm điều kiện chiết xuất acid asperulosidic trong phương pháp chuẩn bị mẫu thử định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

Bảng 2. Hàm lượng acid asperulosidic xác định được với 2 tỷ lệ thuốc bột BT:methanol khảo sát.

Tỷ lệ thuốc bột BT và methanol (mg/ml)	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%; kl/kl)
300:25	0,0967±0,0004
300:50	0,0962±0,0010

Khảo sát điều kiện HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT: Kết quả HPLC khảo sát các chương trình pha động định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích mẫu thử thuốc bột BT với các chương trình pha động khảo sát.

Kết quả hình 3 cho thấy, điều kiện sắc ký I không tách được pic acid asperulosidic. Điều kiện sắc ký II cho pic acid asperulosidic trên sắc ký đồ đạt yêu cầu đối với pic định lượng trong phương pháp phân tích HPLC. Vì vậy, điều kiện sắc ký II được chọn để định lượng acid asperulosidic trong mẫu thử thuốc bột BT.

3.2. Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT

Mẫu chuẩn: Cân 1 mg acid asperulosidic chuẩn vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml methanol, siêu âm 15 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 μ m.

Mẫu thử: Cân 300 mg thuốc bột BT cho vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 μ m.

Điều kiện HPLC: Máy HPLC Shimadzu LC-2030C 3D Plus, detector PDA (Nhật Bản), cột C18 Shimpack GIST (250×4,6 mm, 5 μ m), bước sóng phát hiện 236 nm, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μ l. Pha động gồm acetonitril và dung dịch H_3PO_4 0,1% với tỷ lệ 9,5:90,5.

Hàm lượng acid asperulosidic (%) trong thuốc bột BT được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{S_t \times C \times 25}{S_c \times m_t} \times a \times 100$$

trong đó: S_t , S_c : diện tích pic acid asperulosidic của mẫu thử và mẫu chuẩn; C: nồng độ dung dịch acid asperulosidic chuẩn (mg/ml); m_t : khối lượng cân của mẫu thử (đã trừ độ ẩm) (mg); a: hàm lượng của acid asperulosidic chuẩn.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT

Tính tương thích hệ thống: Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách cân 300 mg thuốc bột BT vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt

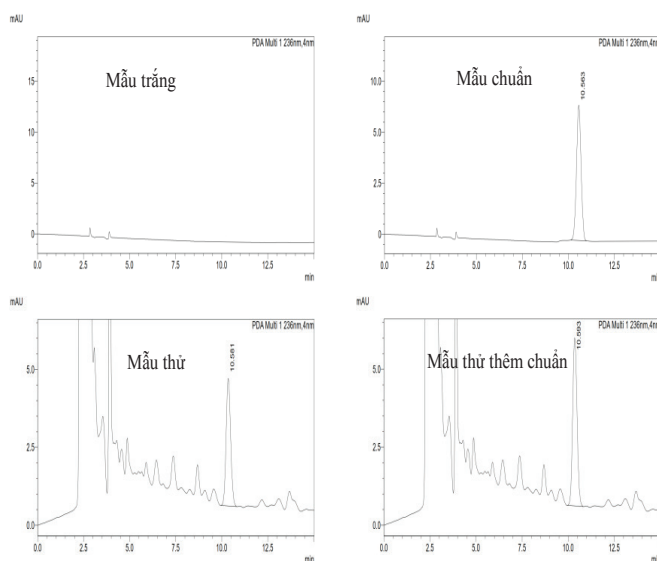
độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,22 μm .

Cân bằng cột bằng pha động ít nhất 15 phút. Tiêm 6 lần liên tiếp cùng một mẫu dung dịch thử. Kết quả bảng 3 cho thấy, các thông số thời gian lưu, diện tích pic có $\text{RSD} \leq 2\%$. Hệ số bất đối, độ phân giải, số đĩa lý thuyết đạt yêu cầu phân tích. Như vậy, phương pháp HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 3. Tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT.

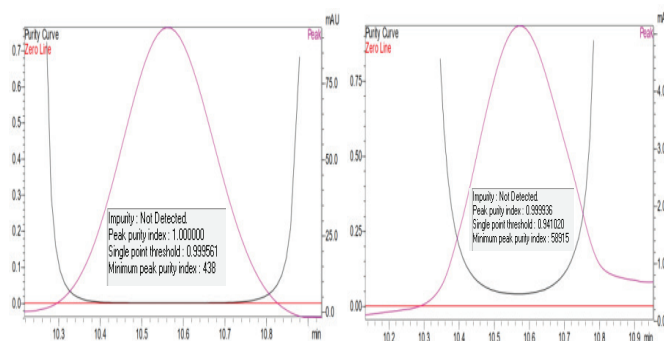
TT	t_r (phút)	S (mAU.s)	Độ phân giải R_{S1}	Độ phân giải R_{S2}	Hệ số bất đối N	N
1	10,565	90853	1,705	1,674	0,992	8027
2	10,482	91126	1,712	1,642	0,986	8113
3	10,338	92709	1,723	1,682	0,977	7954
4	10,417	91011	1,694	1,655	0,954	8239
5	10,526	89532	1,704	1,679	1,003	8412
6	10,493	91665	1,718	1,643	0,995	8125
TB	10,470	91149,33	1,709	1,663	0,985	8145
% RSD	0,78	1,14				
Yêu cầu phân tích	$\text{RSD} < 2\%$	$\text{RSD} < 2\%$	$R_s \geq 1,5$	$R_s \geq 1,5$	$0,8 \leq A_s \leq 1,2$	

Tính đặc hiệu: Hình 4 cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn (khoảng 10,47 phút). Sắc ký đồ của mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic acid asperulosidic trong mẫu chuẩn. Khi thêm chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích pic acid asperulosidic trong mẫu thử tăng.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC khảo sát tính đặc hiệu của quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (t_r của acid asperulosidic là 10,47 phút).

Độ tinh khiết pic của acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử đạt yêu cầu (hình 5).

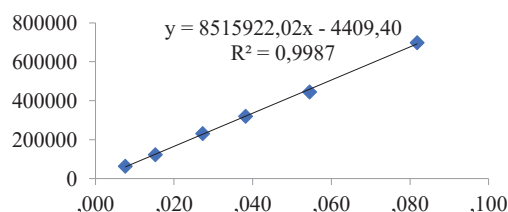


Hình 5. Độ tinh khiết pic của acid asperulosidic trong mẫu chuẩn và mẫu thử.

Tính tuyến tính: Chuẩn bị dung dịch đối chiếu gốc bằng cách cân 5,6 mg chất chuẩn acid asperulosidic, cho vào bình định mức 5 ml. Thêm 4 ml methanol, siêu âm trong 15 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Dung dịch đối chiếu gốc có nồng độ 1,0910 mg/ml. Pha loãng dung dịch đối chiếu gốc trong bình định mức 10 ml bằng methanol thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,0076, 0,0153, 0,0273, 0,0382, 0,0545, 0,0818 mg/ml. Kết quả khảo sát mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic được trình bày trong bảng 4 và hình 6.

Bảng 4. Tương quan giữa diện tích pic và nồng độ acid asperulosidic.

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic
0,0076	64942
0,0153	122115
0,0273	233180
0,0382	321569
0,0545	445127
0,0818	700516



Hình 6. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic acid asperulosidic.

Độ chính xác: Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách cân chính xác khoảng 300 mg thuốc bột BT vào bình định mức 25 ml. Thêm 23 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua

màng lọc 0,22 μ m. Tiến hành chuẩn bị tương tự 5 mẫu dung dịch thử còn lại.

Tiến hành phân tích 6 mẫu dung dịch thử ở cùng một điều kiện trong ngày 1 và 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng.

TT	Ngày 1			Ngày 2		
	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%)	Khối lượng cân (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT (%)
1	300,2	93125	0,0994	300,4	91509	0,0976
2	301,7	91245	0,0969	302,1	92156	0,0978
3	302,8	90448	0,0957	303,2	90237	0,0954
4	298,5	89973	0,0965	298,9	92285	0,0990
5	301,6	92162	0,0979	301,8	91937	0,0976
6	300,5	91125	0,0971	300,8	90264	0,0962
Trung bình			0,0972			0,0973
RSD (%)			1,30			1,31

Kết quả thống kê: $F_{\text{tn}} = 1,003 < F_{0,05} = 5,050 \rightarrow$ Sự khác biệt kết quả thu được giữa 2 ngày khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Kết quả thống kê độ chính xác trong ngày (độ lặp lại) cũng như ở các ngày phân tích khác nhau (độ chính xác trung gian) cho thấy, hàm lượng trung bình của acid asperulosidic trong thuốc bột BT là 0,0973%, giá trị $RSD < 2\%$, $F_{\text{tn}} < F_{0,05}$, chứng tỏ phương pháp HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT có độ chính xác cao.

Giới hạn phát hiện và định lượng: Tiến hành phân tích mẫu chuẩn acid asperulosidic ở nồng độ 40 μ g/ml, sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu của acid asperulosidic ở nồng độ 0,008 μ g/ml (bảng 6). Tại nồng độ 0,08 μ g/ml ghi nhận tín hiệu $S/N=3$ nên 0,08 μ g/ml là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp. Giới hạn định lượng (LOQ) $= 3 \times LOD = 3 \times 0,08 = 0,24$ μ g/ml [5].

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD.

Nồng độ chuẩn (μ g/ml)	40	10	2	0,4	0,08	0,008
Diện tích pic	340259	85076	14956	2837	786	Không có tín hiệu

Độ đúng: Thêm chất chuẩn acid asperulosidic vào mẫu thử ở các mức 80, 100 và 120% so với nồng độ acid asperulosidic định lượng. Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng.

Mức nồng độ thêm vào	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng chuẩn thu hồi (mg)	Tỷ lệ hồi phục (%)	Giá trị trung bình
80%	0,22	0,2081	94,58	TB = 93,83% RSD = 2,47%
		0,2105	95,68	
		0,2007	91,22	
100%	0,26	0,2581	99,28	TB = 97,67% RSD = 2,44%
		0,2468	94,94	
		0,2568	98,79	
120%	0,32	0,3192	99,76	TB = 97,89% RSD = 1,9%
		0,3132	97,86	
		0,3074	96,05	

TB: trung bình.

Kết quả bảng 5 cho thấy, hàm lượng trung bình của acid asperulosidic trong thuốc bột BT khoảng 0,0973% (kl/kl). Theo yêu cầu về độ hồi phục và RSD tương ứng với nồng độ chất phân tích, tỷ lệ hồi phục cho phép của phương pháp định lượng acid asperulosidic trong khoảng 90-107% và $RSD < 5,3\%$ [4]. Kết quả bảng 7 cho thấy, quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đạt yêu cầu về độ đúng.

4. Kết luận

Quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT gồm quy trình xử lý mẫu thử và quy trình HPLC định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột BT đã được nghiên cứu xây dựng thành công. Quy trình định lượng đã được thẩm định đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đặc hiệu. Độ chính xác trung gian ($RSD=1,24\%$) và độ đúng của phương pháp định lượng (trong khoảng 91,22-99,76%) đạt yêu cầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.C. Sang, N.L.T. Tuyen, N.T.K. Oanh, et al. (2020), "Survey of acute toxicity and analgesic and anti-inflammatory effects of medicine by herbalist Nguyen Thien Chung, An Giang province", *Journal of Pharmacology*, **60(529)**, pp.84-88 (in Vietnamese).
- [2] P.N. Thac, N.D. Hanh, N.H.M. Linh, et al (2021), "Developing a qualitative method for some main medicinal herbs in extracts from herbal medicine to support the treatment of spinal degeneration by herbalist Nguyen Thien Chung", *Journal of Pharmacology*, **17(3)**, pp.83-90.
- [3] P.N. Thac, N.D. Hanh, N.H.M. Linh, et al. (2020), "Developing a process for quantifying asperulosidic acid in extracts from herbal medicine Nguyen Thien Chung's degenerative spine medicine using the HPLC method", *Journal of Pharmacology*, **6(10)**, pp.83-89.
- [4] L. Huber (2007), *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Taylor & Francis, 2nd ed., 303pp.
- [5] ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva.

Xây dựng quy trình kỹ thuật ươm và chăm sóc cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giai đoạn sau *in vitro*

Nguyễn Thị Mai¹, Trương Hồng¹, Nguyễn Hắc Hiên², Ninh Thị Thảo^{3*}

¹Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, 53 Nguyễn Lương Bằng, xã Hòa Thắng, TP Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

²Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Đắk Lắk, 11 Hùng Vương, phường Tự An, TP Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam

³Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, phố Ngõ Xuân Quảng, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/9/2021; ngày chuyển phản biện 6/9/2021; ngày nhận phản biện 4/10/2021; ngày chấp nhận đăng 8/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả cho thấy, việc huấn luyện cây hồ tiêu *in vitro* bằng cách đặt bình nuôi cây đầy kín nắp trong vườn ươm 2 tuần đã làm tăng tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây. Các cây *in vitro* cần phải đạt khối lượng 0,7-0,9 g trước khi được trồng vào bầu ươm cây chứa giá thể với tỷ lệ đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun là 5:2:2:1. Bón phân NPK nồng độ 0,2% xen kẽ với phân bón lá Nupe 0,2% định kỳ 2 tuần/lần giúp cây hồ tiêu sinh trưởng tốt và đạt tiêu chuẩn xuất vườn sau khoảng 5 tháng. Kết quả nghiên cứu đã thiết lập được quy trình kỹ thuật ươm và chăm sóc cây giống hồ tiêu sau giai đoạn *in vitro*, góp phần hoàn thiện quy trình sản xuất cây giống hồ tiêu bằng phương pháp vi nhân giống.

Từ khoá: hồ tiêu, *in vitro*, *Piper nigrum* L., Vĩnh Linh, vườn ươm.

Chỉ số phân loại: 4.1

1. Đặt vấn đề

Chiếm hơn 40% về sản lượng và gần 60% thị phần xuất khẩu hồ tiêu của thế giới, Việt Nam luôn giữ vị thế số một thế giới về sản xuất và xuất khẩu hồ tiêu [1]. Cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) hay còn gọi là cây tiêu thuộc họ hồ tiêu (Piperaceae), là cây trồng chủ lực của nước ta, với diện tích khoảng hơn 130 nghìn ha, tập trung chủ yếu ở vùng Đông Nam Bộ và Tây Nguyên do điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng phù hợp. Mặc dù có lợi thế lớn so với nhiều nước sản xuất hồ tiêu trên thế giới, nhưng sản xuất hồ tiêu hiện nay ở nước ta chưa thật sự bền vững do nhiều nguyên nhân, trong đó chất lượng cây giống không đảm bảo là một trong những yếu tố gây nhiều trở ngại.

Trong tự nhiên, cây hồ tiêu có thể được nhân giống bằng hạt hoặc giâm hom từ cành thân, cành lươn và cành quả. Các phương pháp nhân giống truyền thống này thường có hệ số nhân giống thấp, thời gian dài, phụ thuộc vào điều kiện thời tiết, cây giống có thể mang các mầm bệnh và không đồng nhất về mặt di truyền nếu nhân bằng hạt [2]. Để khắc phục các hạn chế này, phương pháp nhân giống *in vitro* là một giải pháp hiệu quả vì cho hệ số nhân giống cao, cây giống tạo ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình và có thể sản xuất được ở quy mô lớn [3]. Nghiên cứu đầu tiên về nhân giống *in vitro* cây hồ tiêu được công bố vào năm 1984, sử dụng vật liệu ban đầu gồm chồi nách, lá, cuống lá và đoạn thân [4]. Từ đó đến nay, đã có nhiều báo cáo việc sản xuất thành công cây hồ tiêu *in vitro* từ các nguồn vật liệu khác nhau [5-10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về kỹ thuật trồng và chăm sóc cây hồ tiêu *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm lại rất hạn chế với chỉ hai báo cáo duy nhất. Cụ thể, V.M. Verma (2019) [11] thực hiện thí nghiệm chuyển cây hồ

tiêu *in vitro* giống Sri Lanka ra trồng ở điều kiện vườn ươm trên giá thể đất trộn với vermiculite (tỷ lệ 1:1) cho tỷ lệ cây sống đạt 68%. X. Meng và cs (2021) [2] sử dụng đất bùn, đất cát, xơ dừa (tỷ lệ tương ứng 1:1:2) làm giá thể tiếp nhận cây hồ tiêu *in vitro* với tỷ lệ cây sống đạt 89,6% [2]. Cũng theo 2 nghiên cứu này, các cây hồ tiêu *in vitro* cần được ươm trong nhà lưới 7-10 tháng mới đạt tiêu chuẩn xuất vườn [2, 11].

Những năm gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình nhân nhanh *in vitro* cây hồ tiêu Vĩnh Linh giai đoạn phòng thí nghiệm, cho hệ số nhân giống cao, các cây con *in vitro* sinh trưởng, phát triển tốt, sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền [10]. Để hoàn thiện quy trình sản xuất cây giống hồ tiêu bằng phương pháp nhân giống *in vitro*, cần thiết phải xác định được các điều kiện ươm và chăm sóc cây ở giai đoạn vườn ươm. Các cây *in vitro* khi chuyển từ môi trường vô trùng với đầy đủ các điều kiện phát triển tối ưu sang môi trường tự nhiên có nhiều biến động về điều kiện sống, dễ làm cây mất nước, héo khô, cho tỷ lệ cây sống thấp, cây sinh trưởng phát triển kém [12]. Mặt khác, thời gian sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm trước khi xuất vườn khá dài [2, 11], nên nhu cầu dinh dưỡng của cây là rất cao. Do vậy, các yếu tố như tiêu chuẩn cây *in vitro*, biện pháp huấn luyện cây trước khi đưa ra trồng ở vườn ươm, giá thể trồng cây và bổ sung dinh dưỡng cho cây thông qua phân bón phải được khảo sát. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình kỹ thuật sau giai đoạn *in vitro* cho cây hồ tiêu Vĩnh Linh, góp phần hoàn thiện quy trình vi nhân giống cây hồ tiêu chất lượng cao.

*Tác giả liên hệ: Email: ntthao@vnua.edu.vn

Establishment of an acclimatization protocol for pepper (*Piper nigrum* L.) plantlets post-*in vitro* stage

Thi Mai Nguyen¹, Hong Truong¹, Hac Hien Nguyen²,
Thi Thao Ninh^{3*}

¹Western Highlands Agriculture and Forestry Science Institute,
53 Nguyen Luong Bang Street, Hoa Thang Commune,
Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province, Vietnam

²Dak Lak Crop Production and Plant Production Branch,
11 Hung Vuong Street, Tu An Ward, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province, Vietnam

³Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,
Ngo Xuan Quang Street, Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 1 September 2021; revised 4 October 2021; accepted 8 October 2021

Abstract:

This study was conducted with the aim of determining the factors that affect the growth and development of *in vitro*-derived pepper plantlets variety Vinh Linh in greenhouse. The results indicated that gradual adaptation of *in vitro* plantlets to *ex vitro* environment by placing enclosed plantlets-containing culture vessels in greenhouse for 2 weeks improved the survival and growth of pepper plantlets upon transfer to acclimatization substrate. The plantlets were required to reach the weight of 0.7-0.9 g before transplanting into nursery bags containing substrate that was red soil:cow dung:coconut husk:rice husk (5:2:2:1). Alternative application of NPK 0.2% and foliar fertilizer Nupe 0.2% every 2 weeks positively affected plant growth and the plants were ready for transplanting into the field after about 5 months. The research results establish an acclimatization protocol for pepper plantlets post-*in vitro* stage that helps to complete the protocol for pepper production using micropropagation method.

Keywords: greenhouse, *in vitro*, pepper, *Piper nigrum* L., Vinh Linh.

Classification number: 4.1

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Cây hồ tiêu Vinh Linh *in vitro* sinh trưởng phát triển tốt, có chiều cao 3,5-5,5 cm, 3-5 lá, bộ rễ khoẻ mạnh và có nhiều hơn 4 rễ.

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 6/2019 đến tháng 12/2020 tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

2.2. Điều kiện thí nghiệm và kỹ thuật chăm sóc

Các thí nghiệm được tiến hành trong nhà lưới có mái che mưa hoàn toàn và lưới đen giảm 50% cường độ ánh sáng, nhiệt độ dao động trong khoảng 27-30°C, độ ẩm 55-60%.

Ngoài yếu tố thí nghiệm, các kỹ thuật chăm sóc như tưới nước hay phòng trừ sâu bệnh được thực hiện giống nhau ở tất cả các nghiệm thức. Để giữ ẩm và cung cấp dinh dưỡng cho cây sau khi chuyển ra trồng ở vườn ươm, phương pháp tưới nước phun sương được áp dụng 2 lần/ngày, phân bón lá Nupe 0,2% được bổ sung sau 2 tuần trồng khi cây đã bén rễ và bón định kỳ 2 tuần/lần để bổ sung các chất dinh dưỡng thiết yếu cho cây.

2.3. Phương pháp

Chuẩn bị giá thể: Giá thể được sử dụng có thành phần gồm đất đỏ bazan phối trộn với xơ dừa, trấu hun và phân bò hoai mục ở các tỷ lệ khác nhau. Đất đỏ bazan được hấp khử trùng ở điều kiện 121°C, 1 atm, 30 phút. Giá thể trước khi sử dụng được xử lý nấm bệnh bằng thuốc Aliette (Aliette Fosetyl Aluminium 800 WG), liều dùng 0,3 kg/m³ giá thể, đảm bảo độ ẩm 55-60%, sau đó phủ nilon và ủ trong 30 ngày nhằm hạn chế nguồn bệnh.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố, lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 cây. Cụ thể như sau:

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá được huấn luyện để thích nghi với điều kiện tự nhiên bằng cách chuyển bình nuôi cây đầy kín nắp ra nhà lưới và để trong 0, 7, 14, 21 và 30 ngày. Cây con *in vitro* sau đó được rửa sạch agar dưới vòi nước chảy, loại bỏ lá già và trồng vào khay ươm cây kích thước 40×60 cm, có 70 lỗ, đường kính lỗ 5 cm, chiều sâu lỗ 5 cm. Giá thể sử dụng gồm đất đỏ bazan, xơ dừa theo tỷ lệ 1:1. Đánh giá thí nghiệm sau 4 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng cây đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 3,5-5,5 cm và 3-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được rửa sạch agar, thấm khô bằng giấy thấm và cân khối lượng để chia thành 3 nhóm: 0,4-0,6 g/cây, 0,7-0,9 g/cây và 1,0-1,2 g/cây. Các cây hồ tiêu *in vitro* sau đó được trồng vào khay ươm cây có thông số và chứa loại giá thể tương tự với thí nghiệm trước. Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được trồng vào túi bầu ươm cây có kích thước 12×22 cm chứa giá thể với 5 nghiệm thức khác nhau gồm: đất đỏ bazan, đất đỏ bazan:phân bò tỷ lệ 1:1, đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa tỷ lệ 7:2:1, đất đỏ bazan:phân bò:trấu hun tỷ lệ 7:2:1, đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun tỷ lệ 5:2:2:1. Đánh giá thí nghiệm sau 8 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ cây sống sót (%), chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) và chiều dài rễ (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm: Cây giống hồ tiêu *in vitro* có chiều cao 4,5-5,5 cm và 4-5 lá sau huấn luyện trong nhà lưới 14 ngày được trồng vào túi bầu ươm cây có kích thước 12×22 cm chứa giá thể với tỷ lệ đất đỏ bazan:phân bò:xơ dừa:trấu hun là 5:2:2:1. Bổ sung phân bón lá Nupe 0,2% sau khi trồng 2 tuần và bổ sung phân bón rễ NPK (NPK đầu trâu 16:16:8) sau trồng 4 tuần. 4 nồng độ NPK được khảo sát gồm 0,1, 0,2, 0,3 và 0,4%. Phân bón Nupe 0,2% và NPK được bổ sung xen kẽ, 2 tuần bón một loại phân. Ở nghiệm thức đối chứng, phân bón Nupe 0,2% được sử dụng thay thế phân bón NPK. Đánh giá thí nghiệm sau 20 tuần trồng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm chiều cao cây gia tăng (cm), số lá mới, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), chiều dài rễ (cm), hàm lượng chất diệp lục (CCI - Chlorophyll content index), khối lượng tươi (g) và khối lượng khô (g).

Tính kết quả:

Chiều cao gia tăng và số lá mới: là hiệu số của chiều cao/số lá của cây đo đếm tại thời điểm kết thúc thí nghiệm và chiều cao/số lá của cây đo đếm tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm.

Chiều dài lá: được đo từ đầu mút của lá đến phần tiếp giáp với cuống lá; chiều rộng lá được đo tại điểm lá có chiều rộng lớn nhất ở tất cả các lá hoàn chỉnh thứ 2 tính từ ngọn xuống.

Chiều dài rễ: được đo từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chóp rễ dài nhất.

Hàm lượng diệp lục tổng số trong lá: được đo bằng máy CCM-200 plus. Đo ở lá thứ 2 từ ngọn xuống, đo tại 5 điểm khác nhau trên lá, sau đó lấy giá trị trung bình.

Khối lượng tươi của cây: được xác định bằng cách cân trọng lượng toàn bộ cây sau khi đã loại bỏ hoàn toàn môi trường hoặc giá thể dưới vòi nước và thấm khô bằng giấy thấm.

Khối lượng khô của cây: được xác định sau khi mẫu cây được sấy ở nhiệt độ 105°C cho đến khi khối lượng không đổi.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và SAS 9.0.

4. Kết quả và bàn luận

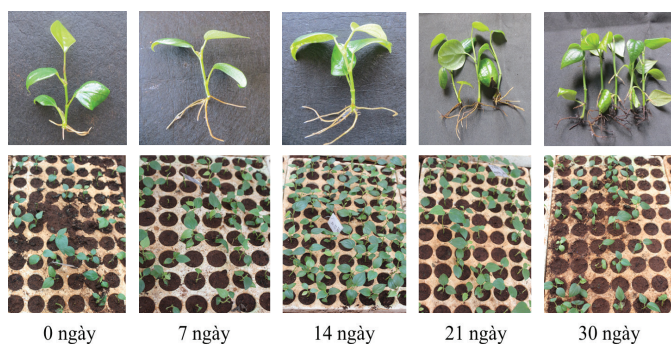
4.1. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây *in vitro* trong điều kiện vườn ươm đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây

Tạo điều kiện cho cây nuôi cấy mô làm quen dần với môi trường tự nhiên bên ngoài trước khi tách khỏi điều kiện *in vitro*, giúp cây cứng cáp, khỏe mạnh thông qua giai đoạn huấn luyện có ý nghĩa với rất nhiều đối tượng cây trồng [13-16]. Kết quả bảng 1 cho thấy, huấn luyện cây trong vườn ươm đã cho hiệu quả tích cực đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*. Cụ thể, cây hồ tiêu *in vitro* trồng trực tiếp vào giá thể không qua giai đoạn huấn luyện sau 4 tuần cho tỷ lệ sống (32,8%), chiều cao cây gia tăng (0,2 cm) và số lá mới (1,03) thấp, chiều dài (2,37 cm) và chiều rộng lá (1,53 cm) nhỏ, rễ ngắn (2,91 cm). Tỷ lệ cây sống (91,97%) và các chỉ tiêu tăng trưởng đạt cao nhất ghi nhận được ở nghiệm thức huấn luyện cây trong 14 ngày (bảng 1). Ở nghiệm thức huấn luyện cây trong 7 ngày hoặc trong thời gian dài (21-30 ngày) cho tỷ lệ cây sống (42,60-72,93%), chiều cao cây gia tăng (0,33-0,56 cm) và chiều dài rễ (3,64-4,28 cm) thấp hơn so với nghiệm thức huấn luyện cây trong 14 ngày mặc dù vẫn cho kết quả tốt hơn đối chứng. Nguyên nhân có thể là do thời gian 7 ngày chưa đủ để cây thích ứng với điều kiện tự nhiên, trong khi đó quan sát thực tế cho thấy, các cây *in vitro* ở các nghiệm thức huấn luyện trong 21-30 ngày có bộ rễ bị nâu hoặc đen, nhiều rễ tơ bị chết, các lá vàng xuất hiện ở phần gốc cây (hình 1). Điều này có thể giải thích là do để đạt tiêu chuẩn đưa ra ngoài điều kiện vườn ươm, các cây hồ tiêu *in vitro* đã được duy trì trên môi trường ra rễ 45-60 ngày [10], việc kéo dài thời gian huấn luyện thêm 21-30 ngày làm nguồn dinh dưỡng trong bình nuôi cây bị cạn kiệt, ảnh hưởng đến chất lượng bộ rễ và sinh trưởng của cây. Hiện tượng kéo dài thời gian nuôi cấy *in vitro* trên môi trường ra rễ trước khi đưa ra thích nghi ngoài vườn ươm gây ảnh hưởng không tốt đến tỷ lệ cây sống cũng được quan sát ở một số cây khác như ba kích [17], bách bộ [18].

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần trồng.

Thời gian huấn luyện (ngày)	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
0	32,80 ^c	0,20 ^c	1,03 ^a	2,37 ^c	1,53 ^c	2,91 ^c
7	64,93 ^c	0,47 ^c	1,07 ^a	3,47 ^b	2,37 ^b	4,28 ^b
14	91,97 ^a	0,87 ^a	1,17 ^a	4,73 ^a	2,87 ^a	5,44 ^a
21	72,93 ^b	0,56 ^b	1,03 ^a	3,77 ^b	2,39 ^b	3,97 ^b
30	42,60 ^d	0,33 ^d	1,03 ^a	3,43 ^b	2,33 ^b	3,64 ^b
CV (%)	4,18	7,02	8,64	7,50	5,16	6,80

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$; CV: hệ số biến thiên.



Hình 1. Cây hồ tiêu *in vitro* sau thời gian huấn luyện (hàng trên) và trong vườn ươm sau 4 tuần trồng (hàng dưới) tương ứng với các khoảng thời gian huấn luyện khác nhau.

Như vậy, thời gian huấn luyện cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm thích hợp nhất là 14 ngày. Tương tự với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ sống của keo lá tràm *in vitro* tăng đáng kể nếu cây con trong bình nuôi được huấn luyện ở vườn ươm trong 14 ngày [13]. Trong khi đó, cây nguru tất *in vitro* yêu cầu 10 ngày [14], lan hoàng thảo kền yêu cầu 7 ngày [15] và gừng cần 4 ngày [16] huấn luyện ở vườn ươm để nâng cao tỷ lệ sống cũng như tăng khả năng sinh trưởng của cây. Có thể thấy, mỗi một đối tượng cây trồng khác nhau yêu cầu thời gian huấn luyện trong vườn ươm là hoàn toàn khác nhau.

4.2. Ảnh hưởng của khối lượng cây hồ tiêu *in vitro* đến khả năng sinh trưởng của cây giai đoạn vườn ươm

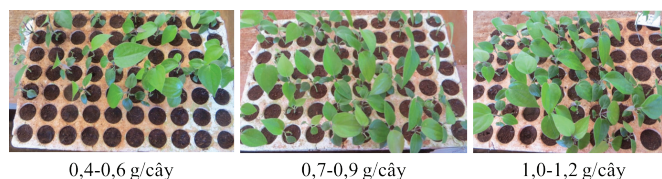
Theo lý thuyết, các cây *in vitro* hoàn chỉnh, có đầy đủ thân, lá và rễ đều có thể đưa ra trồng ở vườn ươm [19]. Song trên thực tế, nếu đưa cây *in vitro* chưa đạt đủ các tiêu chuẩn cụ thể ra trồng, cây sinh trưởng yếu ngay từ giai đoạn đầu và không thể phục hồi để sinh trưởng tốt ở các giai đoạn sau. Bên cạnh chiều cao, số lá và rễ thì khối lượng cây là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tiêu chuẩn của cây *in vitro* trước khi đưa ra trồng ở vườn ươm.

Kết quả theo dõi sau 6 tuần trồng được trình bày ở bảng 2 cho thấy, tỷ lệ cây sống và tốc độ sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* tăng tỷ lệ thuận với khối lượng ban đầu. Các cây có khối lượng nhỏ (0,4-0,6 g/cây), khi trồng ra vườn ươm cho tỷ lệ sống sót (76,30%), chiều cao cây gia tăng (0,43 cm), số lá mới (1,23 lá) và chiều dài rễ (4,03 cm) đạt được thấp nhất. Kết quả bảng 2 và hình 2 cho thấy, 2 chỉ tiêu phản ánh diện tích lá (liên quan trực tiếp đến quá trình quang hợp và sự tích lũy chất hữu cơ trong cây) là chiều dài và chiều rộng lá ở các cây hồ tiêu có khối lượng ban đầu 0,4-0,6 g/cây (tương ứng đạt 2,53 và 1,23 cm) cũng thấp hơn so với các cây có khối lượng lớn (0,7-1,2 g/cây), tương ứng đạt 3,13-3,33 và 2,23-2,47 cm. Những cây hồ tiêu *in vitro* có khối lượng 0,7-0,9 g/cây khi trồng ở vườn ươm cho tỷ lệ sống cao (90,37%), các chỉ tiêu sinh trưởng tốt, nhưng sự sai khác không có ý nghĩa thống kê so với những cây có khối lượng lớn hơn (1,0-1,2 g/cây).

Bảng 2. Ảnh hưởng của khối lượng cây đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm sau 6 tuần trồng.

Khối lượng cây (g/cây)	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
0,4-0,6	76,30 ^c	0,43 ^c	1,23 ^b	2,53 ^b	1,23 ^b	4,03 ^b
0,7-0,9	90,37 ^a	0,87 ^b	1,90 ^a	3,13 ^a	2,23 ^a	6,87 ^a
1,0-1,2	91,13 ^a	1,00 ^a	2,03 ^a	3,33 ^a	2,47 ^a	7,10 ^a
CV (%)	5,98	5,32	7,48	10,12	8,12	5,71

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$; CV: hệ số biến thiên.



Hình 2. Cây hồ tiêu *in vitro* sinh trưởng sau 6 tuần trên giá thể đất và xơ dừa (tỷ lệ 1:1) tương ứng với khối lượng cây ban đầu khác nhau.

Nghiên cứu của L.T.T. Hang (2015) [20] trên cây hoa chuông cho thấy, khối lượng cây giống *in vitro* ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây trong giai đoạn vườn ươm và khối lượng cây tối thiểu cần phải đạt được là 0,6-0,9 g/cây. Để đảm bảo cho cây hồ tiêu *in vitro* thích nghi và sinh trưởng tốt ở giai đoạn vườn ươm, đồng thời rút ngắn thời gian nuôi cây trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đề xuất lựa chọn các cây giống hồ tiêu *in vitro* có khối lượng 0,7-0,9 g/cây, tương ứng với chiều cao cây khoảng 4,5-5,5 cm, có 4-5 lá và ≥ 4 rễ/cây, cây sinh trưởng mạnh, thân mập, lá dày và xanh.

4.3. Ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro*

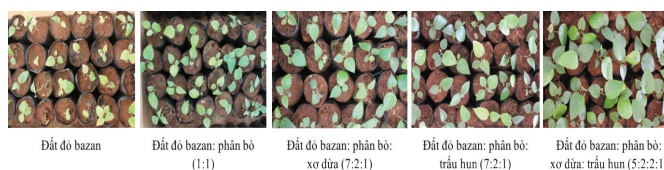
Giá thể không chỉ giúp cây bám rễ, đứng vững mà còn tích trữ nước và chất dinh dưỡng để cung cấp cho cây, đồng thời còn ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống cũng như sự tăng trưởng của cây. Do vậy, xác định được giá thể tiếp nhận cây thích hợp có ý nghĩa quyết định đến thành công của quy trình nhân giống *in vitro*. Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của một số giá thể bầu ươm cây đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro*. Các nghiệm thức giá thể được lựa chọn khảo sát trong thí nghiệm này thỏa mãn các tiêu chí đảm bảo độ thông thoáng và chứa lượng chất dinh dưỡng nhất định, cho tỷ lệ cây sống cao, sinh trưởng tốt, đồng thời có giá thành rẻ để tối ưu hiệu quả kinh tế.

Kết quả sau 8 tuần theo dõi cho thấy, khi sử dụng giá thể bầu ươm cây với thành phần 100% đất đỏ bazan cho tỷ lệ cây hồ tiêu *in vitro* sống (43,81%) cũng như các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây là thấp nhất (bảng 3). Bổ sung các thành phần chất độn bầu như phân bò, xơ dừa, trấu hun đã làm tăng tỷ lệ sống của cây hồ tiêu *in vitro* (64,53-86,72%), đồng thời sự gia tăng về chiều cao, số lá, chiều dài và chiều rộng lá, chiều dài rễ cũng cao hơn. Trong các giá thể khảo sát, giá thể bầu ươm gồm đất đỏ bazan, phân bò, xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 5:2:2:1) cho tỷ lệ cây sống (86,72%), chiều cao cây gia tăng (2,93 cm), số lá mới (2,59 lá/cây), chiều dài lá (5,4 cm), chiều rộng lá (3,25 cm) và chiều dài rễ (8,95 cm) đạt cao nhất. Mặt khác, các cây trồng trên giá thể này phát triển tốt, cây cao, lá to, dày và có màu xanh đậm (hình 3). Điều này có thể giải thích là do xơ dừa và trấu hun tạo nên độ thông thoáng cho giá thể, giúp cây hút nước và dinh dưỡng thuận lợi, phân bò hoại mục bổ sung độ mùn và dinh dưỡng trong khi trấu hun giúp cây hạn chế được nấm bệnh.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể bầu ươm đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* sau 8 tuần trồng.

Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)
Đất đỏ bazan	43,81 ^d	0,42 ^d	1,07 ^c	3,27 ^b	1,16 ^c	5,37 ^c
Đất đỏ bazan: phân bò (1:1)	64,53 ^c	1,82 ^c	2,37 ^b	5,23 ^a	2,89 ^b	7,37 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: xơ dừa (7:2:1)	77,67 ^b	1,96 ^b	2,46 ^b	5,31 ^a	3,21 ^a	7,95 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: trấu hun (7:2:1)	75,00 ^b	1,88 ^{bc}	2,42 ^b	5,23 ^a	3,21 ^a	7,79 ^b
Đất đỏ bazan: phân bò: xơ dừa: trấu hun (5:2:2:1)	86,72 ^a	2,93 ^a	2,59 ^a	5,40 ^a	3,25 ^a	8,95 ^a
CV (%)	4,98	3,62	5,17	3,89	5,30	4,68

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$.



Hình 3. Cây hồ tiêu *in vitro* trên các giá thể khác nhau trong bầu ươm sau 8 tuần.

Đã có một số nghiên cứu khảo sát loại giá thể phù hợp để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trên thế giới. V.M. Verma (2019) [11] sử dụng giá thể đất đã khử trùng trộn với vermiculite theo tỷ lệ 1:1 để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trong vườn ươm có nhiệt độ dao động 26-28°C, độ ẩm 50-55%. Tuy nhiên, tỷ lệ cây sống sót ghi nhận sau 10 tuần trồng chỉ đạt 68%. Trong khi đó, theo nghiên cứu của X. Meng và cs (2021) [2], giá thể thích hợp nhất để trồng cây hồ tiêu *in vitro* là đất bùn, đất cát, xơ dừa (tỷ lệ 1:1:2) cho tỷ lệ cây sống đạt cao nhất là 89,6% khi được trồng ở vườn ươm với nhiệt độ 28-33°C, độ ẩm 95-99% [2]. Trong 5 loại giá thể khảo sát trong nghiên cứu này, giá thể gồm đất, phân bò, xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 5:2:2:1) là phù hợp nhất để trồng cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm.

4.4. Ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm

Thời gian sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm trước khi xuất vườn khá dài, nên nhu cầu dinh dưỡng của cây là rất cao. Phân Nupe phát triển bởi Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên là một sản phẩm phân bón lá chuyên dùng cho cây hồ tiêu; tuy nhiên, theo quan sát của chúng tôi trong quá trình trồng và chăm sóc cây hồ tiêu, nếu chỉ sử dụng phân bón lá Nupe thì cây sinh trưởng, phát triển chậm, lá có màu xanh nhạt và có những biểu hiện của thiếu dinh dưỡng khoáng đa lượng. Để hạn chế vấn đề này, bổ sung dinh dưỡng đa lượng thêm cho cây hồ tiêu ở giai đoạn vườn ươm thông qua phân bón rễ là cần thiết.

Kết quả sau 20 tuần theo dõi cho thấy, bổ sung phân bón NPK (16:16:8) có hiệu quả rõ rệt đến khả năng sinh trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm. Khi chỉ sử dụng phân bón lá Nupe 0,2%, cây tăng thêm chiều cao 7,96 cm và 4,23 lá mới, chiều dài và chiều rộng lá đạt tương ứng 4,1 và 3,5 cm, chiều dài rễ đạt 9,07 cm. Bổ sung phân bón NPK đã làm tăng đáng kể các chỉ số về tăng trưởng của cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm. Cụ thể, chiều cao cây tăng thêm dao động 9,67-17,60 cm, số lá mới đạt 3,87-5,93 lá, chiều dài và chiều rộng lá lần lượt đạt 8,67-11,2 và 5,90-7,77 cm, chiều dài rễ là 16,81-19,73 cm. Các chỉ tiêu tăng trưởng đạt cao nhất ở nghiệm thức bón phân NPK 0,2 và 0,3% (bảng 4).

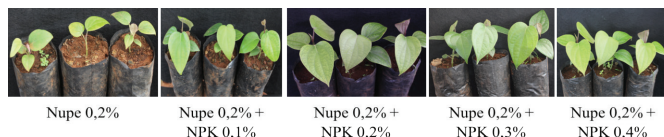
Bảng 4. Ảnh hưởng của phân bón NPK đến khả năng sinh trưởng của cây giống hồ tiêu *in vitro* giai đoạn vườn ươm sau 20 tuần trồng.

Phân bón	Chiều cao cây gia tăng (cm)	Số lá mới (lá)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Hàm lượng diệp lục (CCI)	Khối lượng tươi (g/cây)	Khối lượng khô (g/cây)
Nupe 0,2% (đối chứng)	7,96 ^d	4,23 ^c	4,10 ^c	3,50 ^c	9,07 ^c	16,42 ^d	3,44 ^d	0,25 ^d
NPK 0,1%	10,84 ^b	5,00 ^b	10,70 ^a	6,07 ^b	17,23 ^b	41,40 ^b	7,65 ^{bc}	0,60 ^b
Nupe 0,2%	17,60 ^a	5,93 ^a	11,20 ^a	7,77 ^a	19,73 ^a	45,93 ^a	8,50 ^a	0,72 ^a
NPK 0,3%	16,93 ^a	5,90 ^a	10,87 ^a	7,47 ^a	18,32 ^a	44,42 ^a	8,30 ^{ab}	0,69 ^a
NPK 0,4%	9,67 ^c	3,87 ^c	8,67 ^b	5,90 ^b	16,81 ^b	29,80 ^c	7,47 ^c	0,51 ^c
CV (%)	2,89	4,08	5,67	9,02	7,60	3,81	5,78	4,69

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác nhau giữa các nghiệm thức, $p < 0,05$.

Hàm lượng diệp lục là một trong những chỉ tiêu quyết định lớn đến khả năng quang hợp của cây trồng. Số liệu bảng 4 cho thấy, chỉ số hàm lượng chất diệp lục ghi nhận ở lá cây hồ tiêu được bón bổ sung phân NPK cao gấp 1,8-2,8 lần so với nghiệm thức đối chứng chỉ bón phân Nupe 0,2%. Trong các nghiệm thức bón phân NPK, chỉ số hàm lượng chất diệp lục trong lá cây hồ tiêu đạt cao nhất ở nghiệm thức bón NPK 0,2 và 0,3% (tương ứng 45,93 và 44,92), theo sau là nghiệm thức bón NPK 0,1% (41,40) và thấp nhất là nghiệm thức bón NPK 0,4% (29,80). Mặt khác, hai chỉ tiêu phản ánh khả năng tích lũy hợp chất hữu cơ gồm khối lượng tươi và khối lượng khô của cây hồ tiêu khi được bón bổ sung NPK cao hơn so với đối chứng cũng phản ánh đúng sự tăng trưởng của cây và hàm lượng chất diệp lục trong lá. Cụ thể, nghiệm thức bón bổ sung NPK 0,2 và 0,3% cho khối lượng tươi (8,50 và 8,30 g/cây) và khối lượng khô (0,72 và 0,69 g/cây) đạt được cao nhất, trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng, hai chỉ số này đạt được thấp nhất, tương ứng 3,44 và 0,25 g/cây (bảng 4).

Về mặt hình thái, cây hồ tiêu ở nghiệm thức đối chứng sinh trưởng chậm, cây nhỏ, lá bé, mỏng, có màu xanh nhạt hoặc hơi vàng, trong khi đó, cây hồ tiêu ở các nghiệm thức bổ sung NPK sinh trưởng mạnh, cây lớn, lá to, dày và có màu xanh đậm (hình 4).



Hình 4. Cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm khi được bón NPK ở các nồng độ khác nhau sau 12 tuần.

Nhìn chung, việc bón bổ sung NPK cho cây hồ tiêu *in vitro* trong bầu ươm có tác dụng tích cực đến sự sinh trưởng của cây, tuy nhiên tốc độ tăng trưởng của cây phụ thuộc vào nồng độ NPK sử dụng. Trong 4 nồng độ NPK khảo sát,

nồng độ cho hiệu quả cao nhất đối với sự trưởng của cây hồ tiêu là 0,2-0,3%, thấp hơn (0,1%) hay cao hơn (0,4%) đều cho hiệu quả kém hơn. Điều này có thể là do bón phân NPK ở nồng độ thấp (0,1%) chưa đủ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của cây, trong khi đó bổ sung quá nhiều NPK (0,4%) làm nồng độ dịch đất cao hơn nồng độ dịch bào, kết quả cây không hút được nước bằng cơ chế thẩm thấu, gây ảnh hưởng tiêu cực đến sinh trưởng của cây.

Do các chỉ tiêu tăng trưởng của cây hồ tiêu giữa nghiệm thức bón phân NPK 0,2 và 0,3% không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê nên để tiết kiệm chi phí, chúng tôi đề xuất chế độ bón phân cho cây hồ tiêu *in vitro* là sử dụng phân bón lá Nupe 0,2% xen kẽ với NPK 0,2%. Với chế độ bón phân này, cây hồ tiêu *in vitro* sau khi trồng trong bầu ươm 5 tháng sẽ đạt các chỉ tiêu về sinh trưởng có thể xuất vườn như chiều cao ≥ 20 cm, có 8-10 lá, lá to và có màu xanh đậm, cây sinh trưởng khỏe mạnh (hình 5).



Hình 5. Cây hồ tiêu Vĩnh Linh nguồn gốc nuôi cấy mô trong bầu ươm trước khi xuất vườn.

5. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đề xuất quy trình kỹ thuật trồng cây hồ tiêu Vĩnh Linh *in vitro* giai đoạn vườn ươm như sau:

- Tiêu chuẩn cây giống hồ tiêu *in vitro* khi đưa ra vườn ươm đạt khối lượng tươi 0,7-0,9 g/cây, tương ứng với chiều cao 4,5-5,5 cm, 4-5 lá/cây, ≥ 4 rễ/cây, cây sinh trưởng mạnh, thân mập, lá dày và xanh.

- Huấn luyện cây *in vitro* làm quen với môi trường tự nhiên bằng cách đặt bình cây trong nhà lưới 14 ngày giúp cây đạt tỷ lệ sống cao nhất (91,97%) và sinh trưởng tốt.

- Giá thể bầu ươm cây hồ tiêu *in vitro* thích hợp nhất là đất đỏ bazan, phân bò, xơ dừa và trấu hun theo (tỷ lệ 5:2:2:1), cây sống đạt 86,72% và sinh trưởng tốt.

- Sử dụng phân bón rễ NPK (16:16:8) 0,2% xen kẽ với phân bón lá Nupe 0,2%, định kỳ 2 tuần/lần là chế độ bón phân thích hợp nhất cho cây hồ tiêu *in vitro* trồng trong bầu ươm.

- Cây hồ tiêu nguồn gốc nuôi cấy mô sau khi trồng 5 tháng trong bầu ươm sẽ đạt tiêu chuẩn xuất vườn như sau: cây có chiều cao ≥ 20 cm, 8-10 lá, lá to, xanh đậm, cây sinh trưởng khỏe mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Hiep (2021), "Pepper market report for the second quarter of 2021", *VietnamBiz*, <https://mediacdn.vietnambiz.vn/171464876016439296/2022/1/26/bao-cao-thi-truong-ho-tieu-nam-2021-16431913548701959763039.pdf>, accessed 20 July 2021 (in Vietnamese).
- [2] X. Meng, Y. Wang, A.G. Watson (2021), "In vitro derived black pepper plants used to establish a plantation", *Journal of Horticulture*, **9**(4), pp.1-6.
- [3] P.K. Gupta, R. Timmis, A.F. Mascarenhas (1991), "Field performance of micropropagated forestry species", *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **27**, pp.159-164, DOI: 10.1007/BF02632210.
- [4] V.H. Mathews, P.S. Rao (1984), "In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum*)", *Current Science*, **53**(4), pp.183-186.
- [5] J. Philip, D. Joseph, G.S. Triggs, et al. (1992), "Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures", *Plant Cell Reports*, **12**, pp.41-44, DOI: 10.1007/BF00232421.
- [6] A.P.G.B. Chandrasekara, Y.M.H.B. Yapabandara, P.A. Weerasinghe (2011), *In vitro propagation of locally selected black pepper (Piper nigrum L.)*, Proceeding of the Undergraduate Research Symposium, Rajarata University of Sri Lanka.
- [7] L. Hussain, S. Naz, H. Nazir, et al. (2011), "Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan", *Pakistan Journal of Botany*, **43**(2), pp.1069-1078.
- [8] K.N. Babu, M. Divakaran, G. Yamuna, et al. (2016), "Protocols for improvement of black pepper (*Piper nigrum* L.) utilizing biotechnological tools", *Methods in Molecular Biology*, **1391**, pp.367-385, DOI: 10.1007/978-1-4939-3332-7_26.
- [9] S. Khan, T.A. Banu, M. Islam, et al. (2017), "In vitro regeneration of *Piper nigrum* L.", *Bangladesh Journal of Botany*, **46**(2), pp.789-793.
- [10] N.T. Mai, N.T.T. Ngoc, T.T.H. Anh, et al. (2020), "Building of propagation procedure for free disease black pepper by tissue culture", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **3**(112), pp.9-14 (in Vietnamese).
- [11] V.M. Verma (2019), "Black pepper: Health benefits, in vitro multiplication, and commercial cultivation", *Medicinal Plants*, pp.111-127, DOI: 10.1007/978-3-030-31269-5_5.
- [12] B.N. Hazarika (2003), "Acclimatization of tissue-cultured plants", *Current Science Association*, **85**(12), pp.1704-1712.
- [13] N.V. Viet, T.V. Ha, K.T. Ha, et al. (2019), "Application of in vitro culture techniques in propagating some strains of acacia melaleuca leaves (*Acacia auriculiformis*)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.25-32 (in Vietnamese).
- [14] T.T. Thoi, N.T.H. Gam, L.T. Man (2019), "Research on in vitro propagation of burdock tree (*Achyranthes bidentate* Blume)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.19-24 (in Vietnamese).
- [15] N.V. Viet (2017), "Applying in vitro culture techniques in propagating royal trumpet orchids (*Dendrobium lituiflorum* Lindley)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.39-45 (in Vietnamese).
- [16] T.T. Duong, L.K. Tuong, P.T. Hanh (2019), "Research on in vitro plant care techniques for ginger variety G10 in nurseries", *Journal of Forestry Science and Technology*, **2**(99), pp.22-27 (in Vietnamese).
- [17] H.T. The, N.T.P. Thao, N.T. Thao, et al. (2013) "Process of in vitro propagation of Tricot plant (*Morinda officenalis* How)", *Journal of Science and Development*, **11**(3), pp.285-292 (in Vietnamese).
- [18] J. Palee, S. Dheeranupattana, A. Jatisatienr, et al. (2012), "Influence of plantlet age and different soilless culture on acclimatization of *Stemona curtisii* Hook.f.", *Asian Journal of Plant Sciences*, **11**(6), pp.294-299, DOI: 10.3923/ajps.2012.294.299.
- [19] U. Sharma, V. Kataria, N.S. Shekhawat (2017), "In vitro propagation, ex vitro rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: A leguminous tree with medicinal values", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **23**(4), pp.969-977, DOI: 10.1007/s12298-017-0459-2.
- [20] L.T.T. Hang (2015), *Research on In Vitro Breeding Techniques and Planting of Bellflower (Sinningia Speciosa) in Thua Thien Hue Province*, Doctoral thesis in agriculture, Hue University of Agriculture and Forestry, Hue University (in Vietnamese).

Ảnh hưởng của tưới nước trong mùa khô đến sản lượng lá cây *Trichanthera gigantea*

Trần Thị Hoan*, Từ Trung Kiên

Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/3/2022; ngày chuyển phản biện 25/3/2022; ngày nhận phản biện 12/4/2022; ngày chấp nhận đăng 18/4/2022

Tóm tắt:

Thí nghiệm được thực hiện tại Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên từ năm 2019 đến 2020 nhằm xác định ảnh hưởng của tưới nước trong mùa khô đến sản lượng lá cây thức ăn xanh *Trichanthera gigantea* (chè đại). Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức (NT1, NT2, NT3, NT4) tương ứng với 4 mức tưới nước (0, 40, 80 và 120 m³/ha/lúa cắt) và được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên (mỗi NT được lặp lại 5 lần). Mật độ trồng, phân bón và các yếu tố khác giống nhau đối với cả 4 NT. Kết quả cho thấy, sản lượng vật chất khô (VCK) và protein thô lá của các NT có tưới nước đều cao hơn đối chứng (không tưới nước). Sản lượng VCK từ NT1 đến NT4 tương ứng là 2,410, 2,934, 3,292 và 3,594 tấn/ha/mùa khô, nếu quy ước sản lượng của NT1 là 100% thì của NT2, NT3 và NT4 tương ứng là 121,7, 136,6 và 149,1%. Sản lượng protein thô từ NT1 đến NT4 tăng tương ứng từ 0,618 (100%) lên 0,922 (149,2%) tấn/ha/mùa khô. Sản lượng VCK và protein thô của NT2, NT3 và NT4 sai khác rõ rệt so với NT1, còn NT4 sai khác rõ rệt so với NT2 và NT3. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tưới nước trong mùa khô có ảnh hưởng rõ rệt đến sản lượng lá cây thức ăn xanh *T. gigantea* và nên tưới với mức 120 m³/ha/lúa cắt.

Từ khóa: mùa khô, sản lượng lá, *Trichanthera gigantea*, tưới nước.

Chỉ số phân loại: 4.2

1. Đặt vấn đề

Miền Bắc Việt Nam có hai mùa rõ rệt, đó là mùa mưa và mùa khô. Mùa mưa khoảng từ tháng 4 đến tháng 9, lượng mưa khoảng trên dưới 1500 mm, mùa khô khoảng từ tháng 10 năm trước đến tháng 3 năm sau, lượng mưa khoảng trên dưới 400 mm. Lượng mưa cùng với nhiệt độ trong mùa khô thấp làm cho năng suất cây thức ăn xanh thấp. Sản lượng cây thức ăn xanh trong mùa mưa chiếm khoảng 70-80%, còn trong mùa khô chỉ khoảng 20-30% so với sản lượng cả năm [1]. Tưới nước là một trong các biện pháp nâng cao năng suất cây thức ăn xanh trong mùa khô có hiệu quả nhất. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tưới nước có ảnh hưởng tốt đến sản lượng và chất lượng đồng cỏ và cây thức ăn xanh [2-7]. Tùy thuộc vào nhu cầu nước ít hay nhiều, cây thức ăn xanh được chia thành loại có nhu cầu nước thấp và loại có nhu cầu nước cao. Các giống cây thức ăn xanh lá nhỏ (keo giậu, chùm ngây, cỏ Stylo...) thường có nhu cầu nước thấp hơn các giống cây lá to (chè đại, cỏ Guatemala, cỏ voi...). Ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau, cây thức ăn xanh có nhu cầu nước khác nhau; giai đoạn nảy mầm sau cắt và giai đoạn phát triển cành, nhánh, lá (20-30 ngày sau cắt) nhu cầu nước cao hơn các giai đoạn khác [1]. Bởi vậy, nghiên cứu tưới nước cho cây thức ăn xanh là cần thiết, kết quả nghiên cứu sẽ góp phần nâng cao năng suất cây thức ăn xanh.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là cây thức ăn xanh *T. gigantea* (chè đại). Nghiên cứu được thực hiện tại Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên từ năm 2019 đến 2020.

Tổng lượng mưa trung bình trong mùa khô tại địa bàn nghiên cứu (tỉnh Thái Nguyên) là 364,9 mm, lượng mưa trung bình tháng thấp nhất là 11,7 mm. Nhiệt độ trung bình/tháng của các tháng mùa khô dao động 17,0-25,5°C, nhiệt độ thấp nhất 7,4°C. Độ ẩm không khí trung bình/tháng của các tháng mùa khô dao động 71-85%, độ ẩm thấp nhất 25% [8]. Trên cơ sở kết quả phân tích thành phần hóa học đất và theo phân loại đất của [9] thì đất thí nghiệm thuộc loại có độ màu mỡ trung bình.

Thí nghiệm gồm 4 mức tưới nước tương ứng với 4 NT, cụ thể: NT1 là 0, NT2 40, NT3 80 và NT4 120 m³/ha/lúa cắt trong mùa khô. Lượng nước tưới của mỗi NT được chia thành hai phần để tưới thành hai lần ở các thời điểm sau cắt 2 và 25 ngày. Mỗi lần tưới, lượng nước lại được chia thành 3 phần để tưới trong 3 ngày liên tục, dùng vòi nước phun trực tiếp vào gốc cây, không để nước tràn ra ngoài ô thí nghiệm. Mỗi NT có diện tích 23,4 m², lặp lại 5 lần (5 ô thí nghiệm), bố trí thí nghiệm theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Các yếu tố khác như: mật độ trồng, phân bón, chiều

*Tác giả liên hệ: Email: tranthihoan@tuaf.edu.vn

Effect of irrigation during the dry season on leaf yield of *Trichanthera gigantea*

Thi Hoan Tran*, Trung Kien Tu

Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine,
Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Quyet Thang Commune,
Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 21 March 2021; revised 12 April 2022; accepted 18 April 2022

Abstract:

The experiment was conducted at Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry from 2019 to 2020 to determine the effect of irrigation on the leaf yield of *Trichanthera gigantea* green fodder in the dry season. The experiment consisted of 4 independent variables (NT1, NT2, NT3, NT4), corresponding to 4 different irrigation levels (0, 40, 80, and 120 m³/ha/harvest) and designed in a completely randomised block with 5 replicates. Plantation density, fertilizer application, and other factors were similar among the four variables. The results showed that the dry matter and crude protein yields of leaves of the irrigated experiments were higher than that of the control (without watering). The dry matter yields of leaves in NT1 to NT4 were 2.410, 2.934, 3.292, and 3.594 tons/ha/dry season, respectively. If the yield of NT1 was considered as 100% then that of NT2, NT3, and NT4 was 121.7, 136.6, and 149.1%, respectively. The protein yields of NT1 to NT4 grew up from 0.618 tons (100%) to 0.922 tons/ha/dry season (149.2%). Dry matter and crude protein yields of NT2, NT3, and NT4 were significantly different from NT1; that of NT4 was significantly different compared to that of NT2 and NT3. Research results have shown that irrigation in the dry season has a significant effect on leaf yield of *Trichanthera gigantea* green fodder and should be irrigated at 120 m³/ha/harvest.

Keywords: dry season, irrigation, leaf yield, *Trichanthera gigantea*.

Classification number: 4.2

cao cắt, khoảng cách cắt được đảm bảo đồng đều đối với cả 4 NT.

Các chỉ tiêu gồm: năng suất và sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK và protein của lá *T. gigantea* trong mùa khô. Phương pháp xác định các chỉ tiêu như sau:

Năng suất sinh khối (kg/ha/lúa cắt) được xác định bằng cách: cắt toàn bộ 5 ô thí nghiệm (5 lần nhắc lại), cân khối lượng sinh khối của từng ô và quy ra năng suất 1 m² và 1 ha. Năng suất sinh khối trung bình của NT được tính từ năng suất của 5 ô thí nghiệm.

Năng suất lá tươi (kg/ha/lúa cắt) được xác định bằng cách: lấy ngẫu nhiên 10 kg sinh khối từ mỗi ô của một NT (10 kg x 5 ô/NT=50 kg), tách lá ra khỏi cuống, cân lá và tính tỷ lệ lá/sinh khối. Tỷ lệ lá/sinh khối trung bình của mỗi NT được tính từ tỷ lệ này của 5 ô thí nghiệm. Năng suất lá = Năng suất sinh khối x tỷ lệ lá/sinh khối.

Năng suất VCK (kg/ha/lúa cắt) được xác định bằng cách lấy 5 mẫu lá của 5 ô thí nghiệm của mỗi NT, sấy khô sau đó tính tỷ lệ VCK trung bình trong lá từ 5 mẫu này. Năng suất VCK = Năng suất lá tươi x Tỷ lệ VCK trong lá tươi.

Sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK (tấn/ha/mùa vụ hoặc năm) được tính bằng cách: nhân năng suất (sinh khối, lá tươi, VCK) trung bình/lúa với số lần cắt trong một mùa vụ (mùa khô, mùa mưa) hoặc trong một năm. Sản lượng protein được tính bằng cách phân tích tỷ lệ protein thô trong VCK của lá, sau đó nhân sản lượng VCK với tỷ lệ này.

VCK của lá xác định theo [10]. Protein của lá xác định theo [11].

Xử lý thống kê theo [12] bằng phần mềm Minitab phiên bản 18.1.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Năng suất sinh khối *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô

Tuy mùa khô kéo dài 6 tháng nhưng lúa thu hoạch cuối cùng của mùa mưa thường vào trung tuần tháng 10, việc đốn cây và bón phân đầu năm thường được thực hiện vào đầu tháng 3 năm sau, thời gian còn lại chỉ khoảng 130-140 ngày, do đó mỗi mùa khô chỉ thu hoạch được 2 lứa. Năng suất sinh khối của các lứa thu hoạch (kg/ha/lúa) được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Năng suất sinh khối *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô (kg/ha/lúa).

Mùa khô	Lúa	NT1 (0 m ³)	NT2 (40 m ³)	NT3 (80 m ³)	NT4 (120 m ³)	SEM	P
MK I	1	13956 ^d	16756 ^c	18860 ^b	20501 ^a	1771	0,000
	2	9690 ^d	11720 ^c	13216 ^b	14422 ^a	1492	0,000
	$\bar{X}_1$	11823 ^d	14238 ^c	16038 ^b	17461 ^a	1626	0,000
MK II	1	13524 ^d	16608 ^c	18522 ^b	20272 ^a	1725	0,000
	2	9342 ^d	11528 ^c	12910 ^b	14158 ^a	1563	0,000
	$\bar{X}_2$	11433 ^d	14068 ^c	15716 ^b	17215 ^a	1587	0,000
TB 2 MK	X	11628 ^d	14153 ^c	15877 ^b	17338 ^a	1605	0,000

Ghi chú: MK: mùa khô; TB 2 MK: trung bình 2 mùa khô; $X=(X_1+X_2)/2$; các giá trị trong cùng hàng ngang đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức với $p<0,001$.

Kết quả bảng 1 cho thấy, năng suất sinh khối của lúa thứ nhất cao hơn lúa thứ hai ở cả 2 mùa khô, nguyên nhân: lúa thứ nhất nằm ở nửa đầu mùa khô, lượng mưa và nhiệt độ còn khá cao, trong lúc lúa thứ hai nằm ở nửa cuối mùa khô (tháng 1, 2), nhiệt độ và lượng mưa thấp nhất trong năm. Vì vậy, tác động của nước tưới đến năng suất sinh khối ở lúa thứ hai cao hơn so với lúa thứ nhất. Cụ thể: tăng năng suất sinh khối của NT2, NT3 và NT4 so với NT1 (đối chứng) tính trung bình của hai lúa thứ nhất là 21,4, 36,0 và 48,4%, còn trung bình của hai lúa thứ hai là 22,2, 37,3 và 50,2%.

Năng suất sinh khối trung bình/lúa của hai mùa khô đạt được cao nhất ở mức tưới cao nhất (17.338 kg/ha/lúa), nhưng so với năng suất lúa cuối cùng của mùa mưa cũng chỉ bằng khoảng 70% (so với 24.826 kg/ha/lúa [13]). Điều này chứng tỏ ngoài nước thì các yếu tố khác như độ ẩm và nhiệt độ thấp trong mùa khô cũng ảnh hưởng lớn đến năng suất cây thức ăn xanh.

Năng suất sinh khối của các lúa cũng như trung bình của cả 2 mùa khô đều có cùng một xu hướng là tăng theo chiều tăng của lượng nước tưới với sự sai khác rất rõ rệt ($p<0,001$). Điều này chứng tỏ, cây *T. gigantea* có nhu cầu nước khá cao, ngay cả ở mức tưới nước cao nhất, năng suất vẫn cao hơn rõ rệt so với mức nước tưới thấp hơn liền kề ($p<0,001$). Tuy nhiên, mức độ tăng năng suất sinh khối giữa các mức nước tưới có sự khác nhau. Cụ thể, năng suất sinh khối trung bình 2 mùa khô của NT2 cao hơn NT1 là 21,7%; NT3 cao hơn NT2 là 12,2%; NT4 cao hơn NT3 là 9,2%. Như vậy, lượng nước tưới tăng thì hiệu quả làm tăng năng suất sinh khối giảm, quy luật này cần được lưu ý khi tưới nước cho cây thức ăn xanh *T. gigantea*.

Các kết quả nghiên cứu trước đây đều cho thấy tưới nước có ảnh hưởng tốt đến năng suất chất xanh; mức nước tưới khác nhau, phương pháp tưới khác nhau có tác động khác nhau đến sản lượng chất xanh [6, 7, 14-17].

3.2. Năng suất lá tươi và VCK của *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô

Tỷ lệ lá tươi/sinh khối và tỷ lệ VCK trong lá tươi ít có sự chênh lệch giữa các NT và biến thiên không theo quy luật. Bởi vậy, tỷ lệ lá tươi/sinh khối trung bình là 63,12% và tỷ lệ VCK trong lá tươi trung bình là 16,42% được sử dụng để tính năng suất lá tươi và VCK cho tất cả các NT. Trên cơ sở cách tính đã được trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu, năng suất lá tươi và VCK trung bình (kg/ha/lúa cắt) của mùa khô thứ nhất, thứ hai và của trung bình 2 mùa khô đã được tính và trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Năng suất lá tươi và VCK *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô (kg/ha/lúa).

Mùa khô	Năng suất trung bình/lúa	NT1 (0 m ³)	NT2 (40 m ³)	NT3 (80 m ³)	NT4 (120 m ³)	SEM	P
Năng suất lá tươi							
MK I	$\bar{X}_1$	7463 ^d	8988 ^c	10123 ^b	11021 ^a	1395	0,000
MK II	$\bar{X}_2$	7217 ^d	8880 ^c	9920 ^b	10866 ^a	1370	0,000
TB 2 MK	$\bar{X}$	7340 ^d	8934 ^c	10022 ^b	10944 ^a	1382	0,000
Năng suất VCK							
MK I	$\bar{X}_1$	1225 ^d	1476 ^c	1662 ^b	1810 ^a	164	0,000
MK II	$\bar{X}_2$	1185 ^d	1458 ^c	1629 ^b	1784 ^a	160	0,000
TB 2 MK	$\bar{X}$	1205 ^d	1467 ^c	1646 ^b	1797 ^a	162	0,000

Ghi chú: các giá trị trong cùng hàng ngang đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức với $p<0,001$.

Kết quả bảng 2 cho thấy, năng suất lá tươi và VCK cũng có diễn biến tương tự như năng suất sinh khối, đó là các NT tưới nước đều có năng suất lá tươi và VCK cao hơn đối chứng (không tưới nước) và tăng lượng nước tưới thì hai chỉ tiêu này cũng tăng lên. Năng suất lá tươi và VCK trung bình của các NT ở mùa khô thứ nhất, thứ hai và trung bình hai mùa khô đều sai khác nhau rất rõ rệt ($p<0,001$).

3.3. Sản lượng của *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô

Sản lượng (sinh khối, lá tươi, VCK) trung bình/mùa khô được tính bằng cách lấy năng suất (sinh khối, lá tươi, VCK) trung bình của 2 mùa khô (bảng 1 và 2) nhân với 2 (2 lúa cắt/mùa khô), kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sản lượng *T. gigantea* được tưới nước trong mùa khô (tấn/ha).

Sản lượng	NT1 (0 m ³)	NT2 (40 m ³)	NT3 (80 m ³)	NT4 (120 m ³)	SEM	P
Sinh khối	23,256 ^d	28,306 ^c	31,754 ^b	34,676 ^a	2,211	0,000
Lá tươi	14,680 ^d	17,868 ^c	20,044 ^b	21,888 ^a	1,764	0,000
VCK	2,410 ^d	2,934 ^c	3,292 ^b	3,594 ^a	0,125	0,000
Protein thô	0,618 ^d	0,753 ^c	0,844 ^b	0,922 ^a	0,032	0,000

Ghi chú: tỷ lệ protein/VCK là 25,65%; sản lượng protein = sản lượng VCK x 25,65%. Các giá trị trong cùng hàng ngang đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức với p<0,001.

Kết quả bảng 3 cho thấy, sản lượng sinh khối, lá tươi, VCK và protein thô trong mùa khô của các NT có tưới nước lớn hơn với sự sai khác rõ rệt so với NT1; NT4 sai khác rõ rệt so với NT2 và NT3 (p<0,001). Tăng mức nước tưới từ 0 (NT1) lên 120 m³/lúa (NT4) trong mùa khô đã làm tăng sản lượng sinh khối thêm 11,420 tấn, tăng sản lượng lá tươi thêm 7,208 tấn/ha/mùa khô, làm tăng sản lượng VCK lên 1,184 tấn và sản lượng protein thô tăng lên 0,304 tấn/ha/mùa khô. Như vậy, tăng lượng nước tưới thì sản lượng cũng tăng theo và mức nước tưới cao nhất đã đạt được sản lượng cao nhất.

Liên quan đến vấn đề này, một số nghiên cứu cũng đã khẳng định rằng, tưới nước một cách thích hợp (mức nước tưới, phương pháp tưới, thời điểm tưới... thích hợp) đã làm tăng sản lượng cây thức ăn xanh [2, 6, 7, 15, 16].

4.5. Sự thay đổi sản lượng của *T. gigantea* theo mùa khi được tưới nước

Tưới nước làm tăng sản lượng của cây thức ăn xanh trong mùa khô, đồng thời còn làm thay đổi tỷ lệ sản lượng của mùa khô so với sản lượng cả năm (bảng 4).

Bảng 4. Tỷ lệ sản lượng VCK theo mùa của các NT.

Năm/mùa	NT1 (0 m ³)		NT2 (40 m ³)		NT3 (80 m ³)		NT4 (120 m ³)	
	Sản lượng (tấn)	%	Sản lượng (tấn)	%	Sản lượng (tấn)	%	Sản lượng (tấn)	%
Mưa	10,119	80,8	10,119	77,5	10,119	75,5	10,119	73,8
Khô	2,410	19,2	2,934	22,5	3,292	24,5	3,594	26,2
Cả năm	12,529	100	13,053	100	13,411	100	13,713	100

Kết quả bảng 4 cho thấy, nếu không tưới nước, tỷ lệ sản lượng VCK của *T. gigantea* trong mùa mưa là 80,8% và mùa khô là 19,2% so với sản lượng cả năm. Nhưng khi tưới nước ở mức 120 m³ thì tỷ lệ sản lượng VCK trong mùa khô là 26,2% so với cả năm (tăng 7%). Điều này rất có ý nghĩa đối với việc giải quyết thức ăn xanh cho gia súc trong mùa khô.

4.5. Hiệu lực tăng sản lượng VCK và protein thô của các mức nước tưới

Hiệu lực tăng sản lượng VCK và protein thô của các mức nước tưới được tính bằng cách lấy sản lượng VCK, protein thô trong mùa khô của NT2, NT3, NT4 trừ đi các sản lượng này tương ứng của NT1, sau đó chia cho số lượng m³ nước tưới của mỗi NT trong mùa khô (bảng 5).

Bảng 5. Hiệu lực sản xuất của các mức nước tưới trong mùa khô.

Chỉ tiêu	Đơn vị	NT2	NT3	NT4	SEM	P
VCK tăng thêm	kg/ha/MK	524 ^c	882 ^b	1184 ^a	26,006	0,000
Protein thô tăng thêm	kg/ha/MK	135 ^c	226 ^b	304 ^a	6,671	0,000
Lượng nước tưới	m ³ /ha/MK	80	160	240	-	-
Hiệu lực sản xuất VCK	kg/m ³	6,55 ^a	5,51 ^b	4,93 ^c	0,198	0,000
Hiệu lực sản xuất protein	kg/m ³	1,69 ^a	1,41 ^b	1,27 ^c	0,062	0,000

Ghi chú: các giá trị trong cùng hàng ngang đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức với p<0,001.

Tưới nước trong mùa khô cho *T. gigantea* ở các mức 40, 80 và 120 m³/lúa đã làm tăng thêm 524, 882 và 1.184 kg VCK và tăng 135, 226 và 304 kg protein thô/ha/mùa khô (2 lúa cắt) so với không tưới nước. Lượng VCK và protein thô tăng thêm của các NT sai khác nhau rất rõ rệt (p<0,001). Như vậy, tăng mức nước tưới đã làm tăng thêm rõ rệt sản lượng VCK và protein thô.

Tuy nhiên, khi lượng nước tưới tăng lên, hiệu lực làm tăng VCK và protein thô của 1 m³ nước giảm. Cụ thể, tăng mức nước tưới từ 40 lên 120 m³/ha/lúa thì hiệu lực sản xuất VCK giảm từ 6,55 xuống 4,93 kg/m³ nước và hiệu lực sản xuất protein thô giảm từ 1,69 xuống 1,27 kg/m³ nước (p<0,001). Điều này cần được lưu ý khi tưới nước cho *T. gigantea* trong mùa khô.

4. Kết luận

Tưới nước trong mùa khô có ảnh hưởng rõ rệt đến sản lượng VCK và protein của lá cây thức ăn xanh *T. gigantea*, nên áp dụng mức nước tưới 120 m³ nước/lúa cắt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.Q. Hien, N.K. Quac, T.T. Nhung (2002), *Curriculum Grasslands and Fodder Crops*, Agricultural Publisher, 116pp (in Vietnamese).
- [2] A. Blum (2009), "Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress", *Fild. Crops Res.*, **112**(2-3), pp.119-123, DOI: 10.1016/j.fcr.2009.03.009.
- [3] A. Al Sogeer, N.S. Al Ghumaiz (2012), "Studies on forage yield and feeding value for some grasses species under different irrigation treatment in Al-Qasium Region", *Journal of Agricultural and Veterinary Qasium University*, **5**(1), pp.3-16.

- [4] P. Garofalo, M. Rinadil (2013), "Water - use efficiency of irrigated biomass sorghum in mediterranean environment", *Spanish Journal of Agricultural Research*, **11**(4), pp.1153-1169, DOI: 10.5424/sjar/2013114-4147.
- [5] A.A. Kandil, A.E. Sharief (2016), "Productivity of some forage grasses under foliar sprinkler irrigation and foliar application of potassium nitrate under salinity stress", *Inter. J. of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*, **8**(5), pp.39-59.
- [6] K.B. Atroosh, et al. (2018), "Yield and irrigation water productivity of three varieties of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) in the southern coastal plains of Yemen", *Journal of Agricultural Science*, **10**, pp.114-129, DOI: 10.5539/jas.v10n1p114.
- [7] T.Q. Hien, M.A. Khoa, T.Q. Trung (2020), "Effects of irrigation water levels in the dry season on leaf yield of *Moringa oleifera*", *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, **7**, pp.60-66 (in Vietnamese).
- [8] Thai Nguyen Provincial Hydrometeorological Monitoring Station (2021), *Hydrometeorological Data 2018-2020* (in Vietnamese).
- [9] N.N. Nong (1999), *Agrochemistry Textbook*, Agricultural Publisher, 183pp (in Vietnamese).
- [10] Vietnam Ministry of Science and Technology (2018), *TCVN: 4326:2001 (ISO 6496:1999) - Pet Food, Method for Determining Moisture* (in Vietnamese).
- [11] Vietnam Ministry of Science and Technology (2018), *TCVN: 4328-1:2007 (ISO 5983-1:2005) - Pet food, Method for Determining Nitrogen and Protein* (in Vietnamese).
- [12] Đ.T.N. Oanh, H.V. Phu (2012), *Textbook of Field Experiment Methods*, Agricultural Publisher, 212pp (in Vietnamese).
- [13] T.T. Kien, N.T. Cuc, T.T. Hoan, et al. (2018), "Determining the appropriate level of nitrogen fertilization for green food plant *Trichanthera gigantea* in the first year", *Journal of Animal Husbandry Science and Technics*, **236**, pp.78-83 (in Vietnamese).
- [14] F.R. Lamm, K.R. Harmon, A.A. Aboukheira, et al. (2011), "Subsurface drip irrigation of Alfalfa", *Proceedings of the 2001 Irrigation Association Technical Conference*.
- [15] O.K. Koech, R.N. Kinuthia, G.N. Karuku, et al. (2016), "Irrigation levels affects biomass yield and morphometric characteristics of range grasses in arid rangelands of Kenga", *Springer Plus*, **5**, DOI: 10.1186/s40064-016-3309-8.
- [16] N. Mazahrih, H. Al-Wahaibi, S. Al-Farsi, et al. (2016), "Yield and water productivity of buffel and rhodes grasses under different irrigation water regimes using the sprinkler line-sources system", *Grassland Science*, **62**(2), pp.112-118, DOI: 10.1111/grs.12120.
- [17] M. Suganthi, A. Elango, S.T. Selvan (2019), "Influence of different date of irrigation on growth and yield of cumbu napier hybrid grass", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **8**(8), pp.2944-2947, DOI: 10.20546/ijcmas.2019.808.338.

Đặc điểm hình thái loài cá nhói mình tròn *Strongylura leiura* (Bleeker, 1850) ở vùng biển ven bờ huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh

Đinh Công Khánh^{1,2}, Trần Trung Can², Võ Thị Mộng Thu², Nguyễn Phú Hoà^{1*}, Thái Ngọc Trí^{3,4}

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Chi cục Thủy sản TP Hồ Chí Minh, 126GH Phan Đăng Lưu, phường 3, quận Phú Nhuận, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 9/621 xa lộ Hà Nội, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/11/2021; ngày chuyển phản biện 1/12/2021; ngày nhận phản biện 24/12/2021; ngày chấp nhận đăng 29/12/2021

Tóm tắt:

Loài cá nhói mình tròn *Strongylura leiura* (Bleeker, 1850) phân bố ở vùng biển ven bờ huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh, có tên địa phương “cá xương xanh”. Kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái của 70 mẫu cá thể cho thấy, cá nhói mình tròn có chiều dài 410-1.060 mm (trung bình 741,71 mm), khối lượng 90-2.600 g (trung bình 618,73 g), có 17-24 tia vây lưng, 22-29 tia vây hậu môn, 12-19 tia vây ngực; vây bụng nhỏ, ở thấp có 9-13 tia; vây đường bên có 192-427 vây nhỏ cho thấy sự tăng trưởng của loài cá này ở vùng biển ven bờ Cần Giờ với các hệ số tăng trưởng b nằm trong khoảng 3,431-3,501, giá trị R^2 dao động trong khoảng 0,875-0,926. Kết quả nghiên cứu về hình thái cấu tạo ngoài của cơ thể cá nhói mình tròn có thể giúp phân biệt được cá thể đực và cá thể cái của loài này dựa vào hình thái ngoài của cơ quan sinh dục. Đối với cá thể đực, gai sinh dục có màu hồng nhạt; đối với cá thể cái không có gai sinh dục, có lỗ sinh dục tròn và có màu hồng nhạt. Cá cái khi thành thực sinh dục vào giai đoạn cuối III-IV có lỗ sinh dục lớn và có màu hồng đậm.

Từ khóa: cá nhói mình tròn, Cần Giờ, đặc điểm hình thái, *Strongylura leiura*.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Nguồn lợi cá ở vùng biển ven bờ huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh không chỉ có vai trò quan trọng đối với cộng đồng ngư dân mà còn có giá trị khoa học và hệ sinh thái thủy vực như: mất xích thức ăn trong hệ sinh thái vùng cửa sông ven biển, bãi bồi, rừng ngập mặn... Nguồn lợi cá ở vùng cửa sông ven biển Cần Giờ phong phú và đa dạng, nhiều loài có giá trị kinh tế cao, trở thành đặc sản được ưa chuộng, đóng góp nhất định vào sản lượng và kinh tế nghề khai thác ở vùng biển ven bờ, trong đó có loài cá nhói mình tròn *S. leiura*.

S. leiura thuộc họ cá nhói (Belonidae), bộ cá kim (Beloniformes), có nhiều tên gọi khác nhau như: cá xương xanh hoặc xanh xương (khu vực Cần Giờ), cá nhói mình tròn, cá nhói đuôi không chấm hoặc cá chia vôi (khu vực Đà Nẵng). Cá nhói mình tròn là một trong những nguồn lợi thủy sản cá sống nổi quan trọng về mặt thương mại, được khai thác trên toàn cầu do thịt cá thơm ngon [1]. Trên thế giới, họ Belonidae có 10 giống với 34 loài [2]. Các loài thuộc họ Belonidae phân bố trên toàn thế giới, ở các vùng biển ôn đới và nhiệt đới. Trong đó, có 9 loài thuộc 5 giống phân bố ở vùng biển Ấn Độ Dương [3]. Các đặc điểm hình thái của cá *S. leiura* được thu thập từ bờ biển Odisha với một số thông tin, dữ liệu của 4 mẫu, với kích thước từ 382-465 mm [1].

Cá nhói mình tròn phân bố ở cả vùng biển và nước ngọt của các vùng nhiệt đới và ôn đới [3], sống ở ven biển và cửa sông [3].

Ấu trùng và con non được tìm thấy trong rừng ngập mặn [4], con non chủ yếu săn mồi các loài cá sống nổi nhỏ và động vật giáp xác [5]. Cá đẻ trứng dính lên các giá thể trong nước [6].

Ngư cụ dùng để đánh bắt cá nhói mình tròn là lưới rê. Hiện nay, nhu cầu tiêu thụ cá đang rất cao ở cả thị trường trong và ngoài nước do chất lượng và hương vị thịt thơm ngon [7]. Các công trình nghiên cứu về đặc điểm hình thái loài cá nhói mình tròn ở Việt Nam còn hạn chế, có ít thông tin và cỡ mẫu nghiên cứu trong phân tích định loại còn khiêm tốn. Trên thế giới và trong nước chưa có các công trình nghiên cứu về đặc điểm sinh học của loài này. Cho đến nay, các công trình nghiên cứu về cá nhói mình tròn chưa có nhiều. Phần lớn tập trung vào phân loại, phân bố, mô tả hình thái ngoài và mùa vụ di cư của chúng [8-10].

Ở Việt Nam, loài cá nhói mình tròn được ghi nhận phân bố ở vịnh Bắc Bộ, sống ở vùng biển và vùng nước lợ ven bờ, thường kết thành đàn nhỏ, bơi lội ở các tầng nước giữa và nước mặt. Chiều dài của mẫu lớn nhất là 620 mm, trung bình là 460 mm. Một số đặc điểm phân loại được mô tả gồm: vây lưng (D) 18; vây hậu môn (A) 22; vây ngực (P) 12; vây bụng V6; vây đuôi C15; số vây đường bên L1 205; xương que mang B14 [8].

Vùng biển Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh có chiều dài 23 km, có nguồn lợi thủy sản phong phú và đa dạng. Các công trình nghiên cứu về nguồn lợi thủy sản, đa dạng sinh học ở Cần Giờ trước đây của một số tác giả [11-14], tập trung nghiên cứu về thành phần loài, đa dạng, xác định các loài có giá trị, kinh tế,

*Tác giả liên hệ: Email: phuhoa@hcmuaf.edu.vn

The morphological characteristics of banded needlefish *Strongylura leiura* (Bleeker, 1850) dwelling in the coastal water of Can Gio district, Ho Chi Minh city

Cong Khanh Dinh^{1,2}, Trung Can Tran², Thi Mong Thu Vo², Phu Hoa Nguyen^{1*}, Ngoc Tri Thai^{3,4}

¹Faculty of Fisheries, Nong Lam University - Ho Chi Minh City, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City Fisheries Department,

126GH Phan Dang Luu Street, Ward 3, Phu Nhuan District, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), 9/621 Hanoi Highway, Linh Trung Ward, Thu Duc District, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Graduate University of Science and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 25 November 2021; revised 24 December 2021; accepted 29 December 2021

Abstract:

The banded needlefish (*Strongylura leiura*) dwells in the coastal waters of Can Gio district, Ho Chi Minh city, with the local name “blue-bone fish”. Study results on the morphological characteristics of 70 individuals showed that the total length and weight of fish varied from 410 to 1,060 mm (average 741.71 mm), 90-2,600 gr (average 618.73 gr), respectively. There were 17-24 dorsal fin rays, 22-29 anal fin rays, 12-19 pectoral fin rays, and small and low pelvic fins with 9-13 rays. The lateral scales with 192-427 small scales indicated the growth of this fish in the coastal waters of Can Gio, with the growth value b ranging from 3.431-3.501 and R^2 values ranging from 0.875-0.926. The research on the external structure of the banded needlefish can help distinguish male and female individuals of this species based on the external morphology of the sex organs. There was a pink urogenital papilla on male. In female, there was a single round pink urogenital pore without a genital papilla. When the gonad of matured female came to the stage III to stage IV, this genital pore was widened and pink.

Keywords: Can Gio, morphological characteristic, *Strongylura leiura*, the banded needlefish.

Classification number: 4.5

ý nghĩa khoa học. Loài cá nhói mình tròn được ghi nhận trong các công trình nghiên cứu ở trên về phân bố và là loài có giá trị kinh tế đối với nghề khai thác ở vùng biển ven bờ Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh.

Kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái và phân bố của loài cá nhói mình tròn ở vùng biển ven bờ Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh nhằm cung cấp, đóng góp và bổ sung các dẫn liệu về đặc điểm phân loại, hình thái cấu tạo ngoài, vùng phân bố và tiềm năng..., làm cơ sở khoa học cho công tác quản lý, khai thác và sử dụng bền vững nguồn lợi thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết bị và hóa chất

Kính lúp Bausch&Lomb, kính lúp soi nổi Olympus SZ-PT 60, thước kẹp điện tử Mitutoyo, bộ thiết bị giải phẫu cá. Formaldehyde 40% và Ethanol 99% (Merck), nước chưng cất.

2.2. Ngoài thực địa

Thực hiện 5 đợt khảo sát thực địa thu mẫu từ tháng 9/2020 đến tháng 5/2021 ở vùng biển ven bờ Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh. Các đợt thu mẫu được thực hiện kết hợp với ngư dân trong quá trình đánh bắt. Ngư cụ sử dụng chủ yếu là lưới rê.

Các mẫu cá thu thập được xử lý và định hình bằng formaldehyde 10%, lưu giữ trong thùng kín trong suốt quá trình thực địa.

Điều tra, phỏng vấn, thu thập thông tin ở các cơ quan quản lý địa phương và các ngư dân hoạt động nghề khai thác tự nhiên ở các xã Long Hoà, Thạnh An và thị trấn Cần Thạnh.

Sử dụng thiết bị GPS map 64s xác định tọa độ các điểm thu mẫu trong quá trình khảo sát. Sử dụng máy chụp hình Nikon D90 ghi lại các sinh cảnh và hình ảnh mẫu vật trong quá trình thu mẫu.

Tất cả dữ liệu thu thập và nhật ký thực địa, được lưu trữ trong máy tính xách tay.

2.3. Trong phòng thí nghiệm

Mẫu sau khi đem về phòng thí nghiệm được xử lý, thay thế hoá chất và loại bỏ formaldehyde, sau đó mẫu được lưu giữ trong dung dịch cồn (EtOH) 70% trước khi phân tích. Các mẫu vật sau khi phân tích được bảo quản và lưu giữ trong EtOH 70% tại Phòng Thí nghiệm cá (FishLab), Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

Định loại xác định tên khoa học của loài dựa vào đặc điểm cấu tạo hình thái ngoài gồm: số lượng tia vây lưng (Dorsal - D), vây ngực (Pectoral - P), vây bụng (Ventral - V), vây hậu môn (Anal - A), vây đuôi (Caudal - C); trong đó số La Mã biểu thị tia gai cứng, chữ số Ả Rập biểu thị tia mềm phân nhánh hoặc tia đơn. Vây đường bên (Lateral line, Ll), chiều dài toàn bộ (L_{ab}), chiều dài theo Smith ($L_{c(ac)}$), chiều dài bỏ vây đuôi (L_0), màu sắc khi cá còn sống (mẫu tươi)...

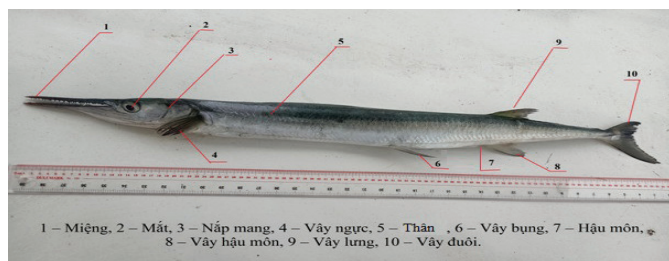
Tất cả mẫu vật thu thập được xử lý, phân tích xác định tên khoa học và sắp xếp các bậc phân loại bộ (Order), họ (Family), giống (Genus), loài (Species) theo [15] và bản cập nhật 2021 [16]. Tham khảo các tài liệu chính về các khu hệ cá vùng lân cận [17].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm phân loại, hình thái cấu tạo ngoài loài cá nhói mình tròn

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cá có thân thon, tròn dài từ sau đầu đến cuối gốc vây hậu môn, từ sau gốc vây hậu môn hai

bên thân thon dẹp dần đến cuống đuôi. Lúc cá còn sống (mẫu tươi), mặt trên của đầu và mặt lưng đến 1/3 mặt bên của thân có màu xanh ngọc sáng; 2/3 mặt bên của thân và mặt bụng có màu trắng sáng. Ở giữa hai bên thân có một sọc to rộng, màu xanh lục thẫm pha lẫn ánh bạc trắng sáng, chạy dọc thân từ sau nắp mang đến cuống đuôi, sọc này mở rộng dần từ sau vây bụng về phía cuống đuôi (hình 1).

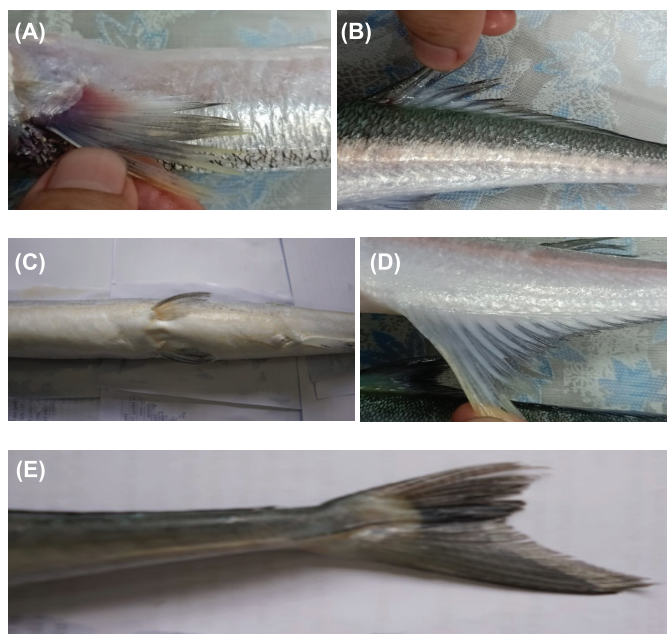


Hình 1. Cá nhúi mình tròn.

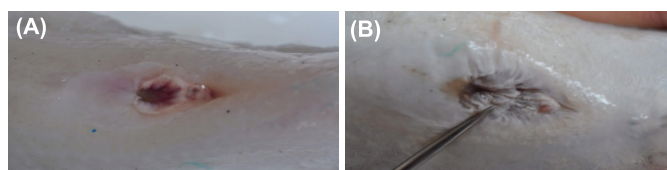
Vây ngực dài, nhọn, tương đối hẹp có màu xám đen, 1/3 gốc vây ngực có các sắc tố đen dạng chấm li ti, rìa vây ngực có màu vàng sáng. Vây lưng có màu xám nhạt, rìa vây lưng có màu vàng cam sáng. Khởi điểm vây lưng ở sau khởi điểm vây hậu môn. Vây bụng nhỏ, có màu trắng pha lẫn màu xám nhạt, rìa vây bụng màu vàng sáng. Vây hậu môn rộng hơn vây lưng, khởi điểm ở gần gốc vây bụng, màu trắng nhạt pha lẫn màu xám, 1/3 gốc vây hậu môn có màu vàng nghệ sáng. Phần gốc của vây lưng và vây hậu môn có phủ vảy. Vây đuôi có màu xám đen nhạt, rìa vây đuôi có màu vàng cam sáng. Thùy dưới vây đuôi dài hơn thùy trên. Hậu môn nằm ngay trước khởi điểm gốc vây hậu môn. Lỗ niệu sinh dục nằm ngay sau hậu môn. Cá cái khi thành thực sinh dục vào cuối giai đoạn III và đầu giai đoạn IV, có lỗ sinh dục lớn và có màu hồng đậm. Toàn thân phủ vảy tròn nhỏ, vảy mềm và mỏng. Phần đầu của vảy (các rìa của vảy) có màu xanh ngọc sáng nhạt. Đường bên liên tục và có phân nhánh về phía dưới gốc vây ngực, chạy dọc thân gần sát với mặt bụng, đi qua phía trên vây bụng, vây hậu môn và kết thúc trước cuống đuôi. Kết quả này trùng khớp với mô tả cơ quan đường bên của cá họ Belontiidae trong tài liệu của T. Nakabo (2002) [18]. Cá có đầu dài, mõm nhọn, dạng hình trụ. Mắt nằm hai bên đầu, to tròn nhưng không đều, ổ mắt hơi dẹp theo hướng dọc thân (hình 2, 3).

Miệng cá rộng, hàm trên và hàm dưới của cá rất dài và nhọn dần về phần đầu của 2 hàm. Phần chóp đầu của 2 hàm dạng sụn, chưa hóa xương hoàn toàn, mềm rất dễ gãy. Chiều dài của 2 hàm bằng 1/4 chiều dài của chiều dài thân. Hàm dưới dài hơn hàm trên, dao động 10-20 mm. Trên mỗi hàm có một hàng răng, răng nhọn và sắc, các răng có các sắc tố màu xanh ngọc sáng.

Do cấu tạo của cơ quan bắt mồi và cơ quan tiêu hóa có liên quan chặt chẽ đến tính ăn của cá, nên việc khảo sát cơ



Hình 2. Vây ngực (A), vây lưng (B), vây bụng (C), vây hậu môn (D) và vây đuôi (E) cá nhúi mình tròn.



Hình 3. Hậu môn và cơ quan sinh dục của cá nhúi mình tròn. (A) Hậu môn và cơ quan sinh dục cái; (B) Hậu môn và cơ quan sinh dục đực.

quan bắt mồi và cơ quan tiêu hóa của cá cho phép dự toán tính ăn của cá. Hình dạng, vị trí và kích thước của miệng nói lên tính ăn của cá [19]. Miệng cá nhúi mình tròn rất rộng, cho thấy cá nhúi mình tròn có thể ăn những con mồi có kích thước lớn, khe miệng rộng, nằm ngang, 2 hàm đều kéo dài. Điều này cho thấy miệng cá nhúi mình tròn có khả năng cắn ngang mồi sau đó nuốt thức ăn vào thực quản.

Cá có 4 đôi cung mang, dạng hình que. Tơ mang gắn vào xương cung mang, ngọn hướng về xoang miệng hầu của cá để có thể cản và giữ lại những vật cứng theo nước vào miệng cá.

Mẫu bảo quản trong dung dịch EtOH 70% có màu trắng sáng. Các vây có màu xám nhạt. Vây có các chấm sắc tố màu đen nhỏ li ti, màu xanh ngọc ở phần đầu của vây nhạt màu và mất dần theo thời gian bảo quản mẫu. Màu xanh ngọc trên cơ thể cá nhạt dần từ sau 4 đến 5 tháng sau khi bảo quản trong dung dịch EtOH 70%. Các chỉ tiêu hình thái của cá nhúi mình tròn trưởng thành được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đơn vị đo của cá nhúi mình tròn trưởng thành.

Các chỉ tiêu hình thái	Tối thiểu	Tối đa	Trung bình
Các số đo hình thái			
Chiều dài toàn bộ (mm) (Lab)	410	1060	754,71
Chiều dài bỏ vây đuôi (Lo)	370	970	688,54
Chiều dài mõm (an)	59,21	133,28	100,19
Chiều dài mõm đến cuối nắp mang (am)	122,31	259,00	181,18
Chiều dài đầu T (ao)	55,72	103,36	71,77
Đường kính ở mắt O (np)	12,42	26,55	16,39
Khoảng cách giữa hai ở mắt (OO)	17,41	53,31	24,13
Chiều cao thân trước vây bụng H (gh)	28,81	72,75	41,30
Khoảng cách từ mõm đến gốc vây lưng (aq)	363	699	482,33
Khoảng cách từ điểm sau gốc vây lưng đến cuống đuôi (sd)	19,98	39,44	27,21
Chiều dài gốc vây lưng (qs)	75,86	183,63	93,41
Chiều cao lớn nhất của vây lưng (tu)	34,99	80,12	46,39
Chiều cao lớn nhất của vây hậu môn (ej)	47,71	90,27	57,69
Chiều dài vây ngực (vz)	42,85	84,23	53,79
Chiều dài vây bụng (zzl)	29,34	84,17	40,60
Khoảng cách giữa khởi điểm gốc vây ngực đến gốc vây bụng (vz)	33,11	271	170,27
Khoảng cách giữa khởi điểm gốc vây ngực đến gốc vây hậu môn (pa)	205,84	436	275,90
Khoảng cách giữa khởi điểm gốc vây ngực đến khởi điểm gốc vây lưng (pd)	233,00	433,00	298,83
Khoảng cách giữa khởi điểm gốc vây bụng đến gốc vây hậu môn (va)	69,46	162,71	93,18
Khoảng cách giữa khởi điểm vây lưng đến khởi điểm gốc vây hậu môn (da)	37,90	69,53	49,87
Khoảng cách giữa khởi điểm vây lưng đến khởi điểm gốc vây bụng (dv)	99,89	180,82	123,85
Tỷ lệ một số chỉ tiêu hình thái			
Tỷ lệ cao thân so với chiều dài bỏ vây đuôi (H/Lo)	0,08	0,08	0,06
Tỷ lệ giữa chiều dài đầu với chiều dài bỏ vây đuôi (T/Lo)	0,15	0,11	0,10
Tỷ lệ giữa đường kính ở mắt với chiều dài đầu (O/T)	0,22	0,26	0,23
Tỷ lệ giữa khoảng cách hai ở mắt với chiều dài đầu (OO/T)	0,31	0,52	0,34
Tỷ lệ giữa chiều cao lớn nhất của vây lưng với vây hậu môn (tu/ej)	0,73	0,89	0,80
Tỷ lệ giữa chiều dài vây ngực với vây bụng (vz/zzl)	1,46	1,00	1,32

Kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, phân loại trên 70 mẫu cá nhúi mình tròn cho thấy, số tia vây lưng (D=17-24), tia vây ngực (P=12-19), tia vây bụng (V=9-13), tia vây đuôi (C=20-22) và tia vây hậu môn (A=22-29), số vây đường bên (Ll=192-427) cao hơn so với các công bố của [8, 9]. Kết quả nghiên cứu đóng góp trong việc bổ sung cơ sở dữ liệu trong phân loại, hình thái học và vùng phân bố của loài cá này.

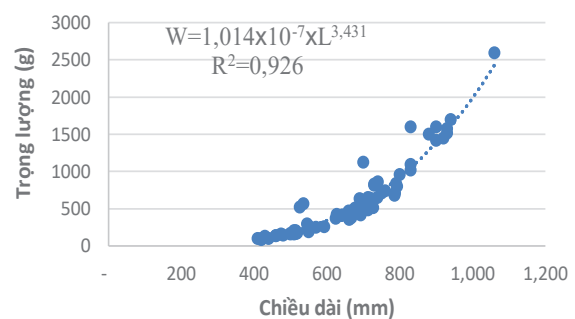
Các mô tả về đặc điểm cấu tạo hình thái ngoài loài cá nhúi mình tròn được mô tả trên mẫu tươi sống (n=70). Các phân tích, đánh giá mối tương quan về chiều dài và trọng lượng của nhóm theo giới tính (đực/cái) nhằm làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về sinh trưởng phát triển cá thể, quần thể hướng đến nghiên cứu sinh sản nhân tạo phục vụ nghề nuôi trồng thủy sản đối với loài cá này trong tương lai.

3.2. Mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng của cá nhúi mình tròn

Tăng trưởng là sự gia tăng về kích thước và khối lượng cá theo thời gian thông qua quá trình trao đổi chất. Tăng trưởng của cá thường không đều và chịu chi phối rất lớn bởi yếu tố dinh dưỡng, sinh thái, sinh lý... [20]. Quá trình tăng trưởng thể hiện đặc trưng theo từng loài cá, sự gia tăng về chiều dài và khối lượng của cá được thể hiện bởi mối tương quan hồi quy theo phương trình của [21].

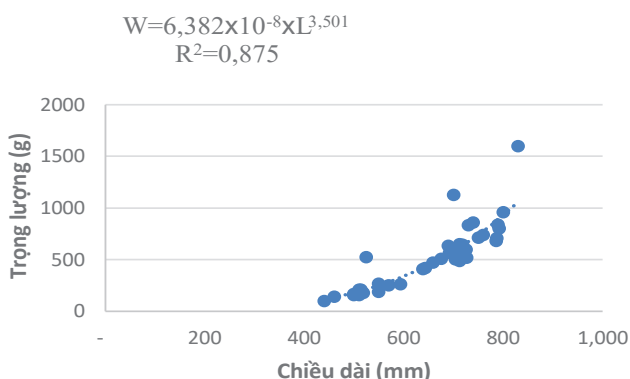
Kết quả phân tích mối tương quan giữa chiều dài (L, mm) và khối lượng (W, g) của 70 cá thể loài cá nhúi mình tròn cho thấy, tăng trưởng về kích thước và khối lượng của cá không đồng đều theo giai đoạn sống của cá; ở giai đoạn đầu đời của cá thì cá tăng trưởng nhanh về chiều dài so với tăng về khối lượng; giai đoạn cá đạt được kích thước nhất định (giai đoạn trưởng thành) và chuyển sang trạng thái thành thực sinh dục thì tăng trưởng chiều dài chậm lại và tăng trưởng về khối lượng nhanh. Như vậy, tăng trưởng của cá nhúi mình tròn cũng phù hợp với nhận định của M.D. Yen và cs (1992) [22] là “đa số loài cá tăng nhanh về chiều dài ở giai đoạn đầu của đời sống có ý nghĩa thích nghi rất lớn nhằm vượt khỏi sự chèn ép của kẻ thù, sau đó quá trình tăng trưởng giữa chiều dài và khối lượng diễn ra song song cho đến khi cá lớn gần đạt thành thực lần đầu tiên thì chủ yếu tăng nhanh về khối lượng, sau khi cá đạt được trạng thái thành thực sinh sản thì tốc độ tăng trưởng về khối lượng giảm đi và ngược lại”. Dựa vào kết quả phân tích mối tương quan giữa chiều dài và khối lượng của 70 mẫu cá nhúi mình tròn thu được ngoài tự nhiên cho thấy sự sinh trưởng của cá nhúi mình tròn tuân thủ theo quy luật sinh trưởng chung của các loài cá nhiệt đới.

Phương trình tương quan giữa chiều dài và khối lượng cá nhúi mình tròn có quan hệ hồi quy rất chặt chẽ theo phương trình $W=1,014 \times 10^{-7} \times L^{3,431}$, với hệ số xác định $R^2=0,926$ (hình 4), trong đó với W=khối lượng, L=chiều dài. Phương trình tương quan cho thấy mối tương quan này là tương quan thuận giữa chiều dài và khối lượng với hệ số tăng trưởng $b=3,431$ và hệ số điều kiện $W=1,014 \times 10^{-7} \times L^{3,431}$.

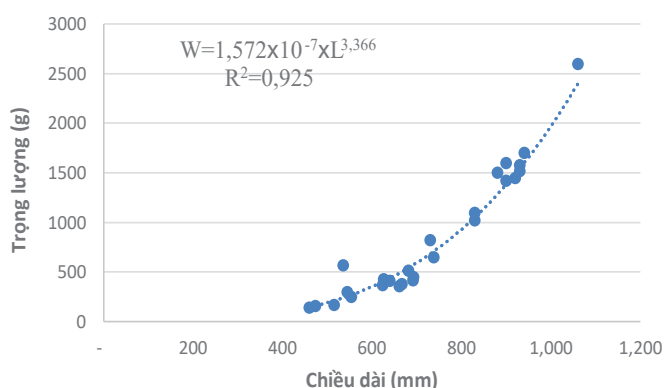


Hình 4. Tương quan giữa chiều dài tổng và khối lượng cá nhúi mình tròn.

Qua phân tích tương quan hồi quy giữa chiều dài và khối lượng của 39 cá thể cái và 26 cá thể đực. Kết quả cho thấy, phương trình tương quan giữa chiều dài và khối lượng cá cái có quan hệ hồi quy chặt chẽ theo phương trình $W=6,382 \times 10^{-8} \times L^{3,501}$ với hệ số xác định $R^2=0,875$ ($n=39$, L từ 440 đến 830 mm, W 100-1.600 g/con) (hình 5). Phương trình tương quan cho thấy đây là mối tương quan thuận giữa chiều dài và khối lượng cá nhái mình tròn cái với hệ tăng trưởng $b=3,501$ và hệ số điều kiện $a=6,382 \times 10^{-8}$. Kết quả phân tích trên 26 mẫu cá đực (L 460-1.066 mm, W 140-2.600 g) cho thấy, chiều dài và khối lượng ở cá thể đực cũng tương quan thuận và thể hiện quan hệ hồi quy rất chặt chẽ với phương trình $W=1,572 \times 10^{-7} \times L^{3,366}$ với hệ số xác định $R^2=0,925$, hệ số tăng trưởng $b=3,366$ và hằng số điều kiện $a=1,572 \times 10^{-7}$ (hình 6). Qua phân tích các thông số tăng trưởng của cá đực và cá cái cho thấy hệ số tăng trưởng của cá cái và cá đực không khác biệt có ý nghĩa ($p>0,05$).



Hình 5. Tương quan giữa chiều dài và khối lượng của cá nhái mình tròn cái.



Hình 6. Tương quan giữa chiều dài và khối lượng của cá nhái mình tròn đực.

Kết quả phân tích thể hiện ở hình 5 và 6 cho thấy, chiều dài và khối lượng của cá cái và cá đực trong giai đoạn chưa thành thục tương tự nhau. Tuy nhiên, cá cái khi thành thục sinh dục mức tích lũy dinh dưỡng cao hơn để phát triển buồng

trứng. Theo G.V. Nikolsky (1963) [20], trước khi cá chín muồi sinh dục thì cá tăng trưởng liên tục nên khối lượng, chiều dài tốc độ tăng nhanh, nhưng đến thời kỳ chín muồi sinh dục cá phải sử dụng năng lượng cơ thể tạo ra các sản phẩm sinh dục nên sự tăng trưởng chiều dài chậm lại và đôi khi có loài còn ngừng hẳn. Đặc điểm tăng trưởng của cá được thể hiện thông qua tham số tăng trưởng b (tăng trưởng đồng bộ khi $b=3$, tăng trưởng ưu thế trọng lượng hơn chiều dài khi $b>3$, tăng trưởng ưu thế chiều dài hơn trọng lượng khi $b<3$) [23].

Qua đường cong tăng trưởng thể hiện mối tương quan giữa chiều dài và trọng lượng cá cho thấy các điểm thể hiện cho từng cặp chiều dài và trọng lượng cá không cùng nằm hoàn toàn trên đường cong lý thuyết, mà nằm xung quanh đường cong lý thuyết, có điểm nằm gần, có những điểm nằm xa. Trong tự nhiên các cá thể trong quần thể sinh trưởng không đồng đều nhau, sự tăng trưởng cá phụ thuộc vào nhiều yếu tố như môi trường, sức khỏe, thức ăn... [24]. Qua đó cho thấy kết quả nghiên cứu này phù hợp với quy luật sinh trưởng và phát triển của cá.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã thu thập phân tích, định loại mô tả hình thái cấu tạo ngoài trên 70 mẫu tươi sống của loài cá nhái mình tròn *S. leiura* (39 cá thể cái, 26 cá thể đực, 5 cá thể không phân biệt được đực cái). Các mẫu có chiều dài 410-1.060 mm (trung bình 741,71 mm), trọng lượng 90-2.600 g (trung bình 618,73 g). Cá nhái mình tròn có từ 17 đến 24 tia vây lưng, 22-29 tia vây hậu môn, 12 đến 19 tia vây ngực; vây bụng nhỏ, ở thấp có 9 đến 13 tia; vây đường bên có 192-427 vây nhỏ. Kết quả phân tích tương quan giữa chiều dài và trọng lượng cho thấy, sự tăng trưởng của loài cá nhái mình tròn *S. leiura* ở vùng biển ven bờ Cần Giờ có các hệ số tăng trưởng b nằm trong khoảng 3,431 đến 3,501 và giá trị R^2 dao động từ 0,875 đến 0,926.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này được hỗ trợ một phần kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu đánh giá hiện trạng, đề xuất giải pháp quản lý nguồn lợi thủy sản và xây dựng mô hình đồng quản lý nghề cá ven bờ huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh”. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Sở KH&CN, Quỹ Phát triển KH&CN, Viện Sinh học Nhiệt đới, Chi cục Thủy sản TP Hồ Chí Minh, UBND huyện Cần Giờ, Bộ chỉ huy Bộ đội Biên phòng TP Hồ Chí Minh, các Đoàn Biên phòng ở Cần Giờ, ThS Võ Văn Phẳng và bà con ngư dân ở vùng nghiên cứu đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.K. Roul, E.M. Abdussamad, P. Rohit, et al. (2019), "New distributional record of flat needlefish *Ablennes hians* (Valenciennes, 1846) (Beloniformes: Belonidae) in the North-Eastern Indian Ocean with taxonomic details", *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, **35**, pp.43-47, DOI: 10.1007/s41208-018-0082-1.
- [2] B.B. Collette (2003) "Family Belonidae Bonaparte 1832 - needlefishes", *Proceedings of the California Academy of Sciences, Annotated Checklists of Fishes*, **16**, pp.1-22.
- [3] R. Froese, D. Pauly (2017), *Fish Base. World Wide Web Electronic Publication*, www.fishbase.org, accessed 8 August 2021.
- [4] M.J.P. Jeyaseelan, M. Vannucci, N. Ramanathan (1998), *Manual of Fish Eggs and Larvae from Asian Mangrove Waters*, United Nations Educational, 193pp.
- [5] B.B. Collette (1984), "Belonidae", *Western Indian Ocean: Fishing Area 51*, FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes, <https://www.fao.org/3/ad468e/ad468e00.htm>, accessed 8 August 2021.
- [6] C.M. Breder, D.E. Rosen (1966), *Modes of Reproduction in Fishes*, T.F.H. Publications, 941pp.
- [7] S.K. Roul, T.B. Retheesh, U. Ganga, et al. (2017), "Length-weight relationships of five needlefish species from Kerala waters, south-west coast of India", *Journal of Applied Ichthyology*, **34(1)**, pp.190-192, DOI: 10.1111/jai.13527.
- [8] N.K. Huong, T.S. Ky (2007), *Fauna of Vietnam 20 - Sea Fish*, Science and Technics Publishing House, 327pp (in Vietnamese).
- [9] N.K. Huong (1993), *Vietnamese Sea Fish*, **2**, Science and Technics Publishing House, 182pp (in Vietnamese).
- [10] H.M. Sang (2018), *Assess the current situation and Propose Solutions to Appropriately Use Aquatic Resources in Mangrove Areas in Can Gio District, Ho Chi Minh City*, Institute of Oceanography (in Vietnamese).
- [11] T.N. Tri (2008), *Data on Fish Species Composition and Current Status of Fisheries in the Lower Coastal Estuary of Can Gio District, Ho Chi Minh City*, Agricultural Publisher (in Vietnamese).
- [12] T.X. Tam, N.T.N. Han (2015), "Research on species composition and fish distribution characteristics in Can Gio mangrove ecosystem, Ho Chi Minh City", *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, **2(67)**, pp.133-148, DOI: 10.54607/hcmue.js.0.2(67).621(2015) (in Vietnamese).
- [13] N.T. An (1995), *Research on Biological Productivity and Biological Resources in Coastal Waters of Can Gio District*, Institute of Oceanography, 130pp (in Vietnamese).
- [14] L.D. Tuan (2002), *Can Gio Mangrove Biosphere Reserve*, Agricultural Publisher, 331pp (in Vietnamese).
- [15] W.N. Eschmeyer, J. Fong, R. Fricke, et al. (2021), "Eschmeyer's catalog of fishes", *California Academy of Science*, <https://calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>, accessed 8 August 2021.
- [16] California Academy of Sciences (2021), "Eschmeyer's catalog of fishes", <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>, accessed 8 August 2021.
- [17] The Vietnam MAB National Committee (2000), *Valuation of the Mangrove Ecosystem Cangio Mangrove Biosphere Reserve*, A Final report UNESCO/MAB Project.
- [18] T. Nakabo (2002), *Fishes of Japan: With Pictorial Keys to the Species*, Tokai University Press, **2**, 1749pp.
- [19] P. Castro, M.E. Hunber (2003), *Marine Biology*, McGraw-Hill, 468pp.
- [20] G.V. Nikolsky (1963), *The Ecology of Fishes*, Science and Technics Publishing House, 352pp (in Vietnamese).
- [21] S.P. Biswas (1993), *Manual of Methods in Fish Biology*, South Asian Publishers, 157pp.
- [22] M.D. Yen, N.V. Trong, N.V. Thien, et al. (1992), *Identifying Southern Freshwater Fish Species*, Science and Technics Publishing House, 351pp (in Vietnamese).
- [23] R. Froese, D. Pauly (2014), "FishBase. World wide web electronic publication", <https://scienceopen.com/document?vid=dc419213-0ca3-48cc-901c-2934ecf4441e>, accessed 8 August 2021.
- [24] N.V. Kiem (2004), *Technical Textbook on Fish Seed Production*, Can Tho University, 75pp (in Vietnamese).

Quan trắc môi trường và bệnh vùng nuôi trồng thủy sản khu vực phía Bắc

Nguyễn Hữu Nghĩa*, Phan Trọng Bình, Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Nguyễn Thị Nguyễn, Lê Thị Mây, Phạm Thị Thanh

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1, phường Đình Bảng, TP Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/9/2021; ngày chuyển phản biện 17/9/2021; ngày nhận phản biện 12/10/2021; ngày chấp nhận đăng 18/10/2021

Tóm tắt:

Nuôi trồng thủy sản (NTTS) đang đối mặt với thách thức dịch bệnh và ô nhiễm môi trường. Quan trắc môi trường và bệnh vùng NTTS nhằm đáp ứng kịp thời yêu cầu chỉ đạo và điều hành sản xuất, đưa ra các biện pháp kỹ thuật hỗ trợ người nuôi. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2020 đến tháng 10/2020 bao gồm 13 điểm tại nguồn nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ ở các tỉnh Nam Định, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế; 11 điểm vùng nuôi ngao/nuhyễn thể tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa và Quảng Ninh; 11 điểm vùng nuôi cá lồng tại các tỉnh Hòa Bình, Yên Bái và Hải Dương với 23 đợt quan trắc khu vực nguồn nước cấp cho tôm nước lợ, 7 đợt cho các khu vực nuôi cá rô phi, cá nuôi lồng nước ngọt và khu vực nuôi nuhyễn thể. Kết quả cho thấy, độ kiềm, NH_4 , NO_2 , Vibrio tổng số và Vp_{AHPND} nguồn nước cấp cho vùng nuôi tôm nước lợ có số mẫu nằm ngoài giới hạn cho phép (GHCP) lần lượt là 12,37, 25,08, 16,67, 3,68 và 0,67%. Độ mặn, NH_4 , NO_2 và Vibrio tổng số khu vực nuôi nuhyễn thể có tỷ lệ mẫu ngoài GHCP lần lượt là 23,38, 33,77, 32,50 và 3,9%. COD và NO_2 khu vực nuôi cá rô phi và cá lồng nước ngọt có số mẫu vượt ngưỡng lần lượt là 29,87 và 22,08%. Khuyến cáo và cảnh báo kịp thời giúp cơ sở nuôi giảm thiểu những thiệt hại do ô nhiễm môi trường và bệnh gây ra.

Từ khóa: bệnh, cảnh báo, môi trường, nuôi trồng thủy sản, quan trắc.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Mở đầu

NTTS có những đóng quan trọng trong nền kinh tế, tuy nhiên ngành cũng đang phải đối mặt với nhiều thách thức liên quan đến dịch bệnh, ô nhiễm môi trường. Để đáp ứng kịp thời yêu cầu chỉ đạo và điều hành sản xuất trong NTTS, Tổng cục Thủy sản đã giao Viện Nghiên cứu NTTS 1 thực hiện quan trắc môi trường nuôi một số đối tượng thủy sản chủ lực ở khu vực miền Bắc. Kết quả quan trắc sử dụng để cảnh báo và khuyến cáo những yếu tố môi trường bất lợi cho đối tượng nuôi và sự có mặt của tác nhân gây bệnh trên đối tượng thủy sản nuôi, giúp người nuôi có biện pháp phòng tránh kịp thời và đáp ứng yêu cầu chỉ đạo và điều hành sản xuất của cơ quan quản lý.

Nhiệm vụ được thực hiện hàng năm, kể từ năm 2015 đến nay. Năm 2020, nhiệm vụ triển khai tại 12 tỉnh với các đối tượng nuôi được quan trắc là tôm nước lợ, ngao, hào, cá rô phi, cá lồng. Nhiệm vụ đã quan trắc và cảnh báo kịp thời các thông số quan trắc nằm ngoài GHCP hỗ trợ cơ quan quản lý và cơ sở nuôi trong chỉ đạo, quản lý và sản xuất. Một số quy luật được rút ra như sau, tháng 4 là thời kỳ chuyển mùa, chênh lệch nhiệt độ ngày đêm cao. Giai đoạn này ngao nuôi bị yếu sau quá trình sinh sản nên thường xảy ra hiện tượng ngao chết hàng loạt. Tháng 5-7 hàng năm thường xuất hiện các đợt nắng nóng, nắng nóng gay gắt, các đợt mưa đầu mùa, thường xuất hiện bệnh đốm trắng, hoại tử gan tụy cấp trên tôm, bệnh do TiLV (Tilapia lake virus), bệnh do vi khuẩn trên cá rô phi và nuhyễn thể nuôi

bị nhiễm vi khuẩn với tỷ lệ cao. Tháng 8-10 là mùa mưa bão, lũ làm biến động đột ngột các yếu tố môi trường, mang theo vật chất hữu cơ từ trên bờ xuống hồ, ao, bãi nuôi, các thông số môi trường như COD, NO_2 , H_2S và Vibrio tổng số thường vượt ngưỡng, loài nuôi bị căng thẳng, giảm sức đề kháng do thay đổi môi trường đột ngột.

Kết quả nghiên cứu này tổng hợp và phân tích những kết quả quan trắc định kỳ tại 35 điểm, bao gồm 13 điểm tại nguồn nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ tại các tỉnh Nam Định, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên - Huế; 11 điểm tại vùng nuôi ngao/nuhyễn thể tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa và Quảng Ninh; 11 điểm tại vùng nuôi cá lồng tại các tỉnh Hòa Bình, Yên Bái và Hải Dương thuộc nhiệm vụ “Quan trắc, cảnh báo và giám sát môi trường vùng NTTS tại một số tỉnh trọng điểm khu vực phía Bắc năm 2020”.

2. Phương pháp

2.1. Lựa chọn địa điểm

Điểm quan trắc môi trường thuộc vùng nuôi thủy sản tập trung, đại diện về diện tích, sản lượng, thường xảy ra dịch bệnh hoặc có nguy cơ ô nhiễm môi trường; vùng quan trắc phải phục vụ lợi ích cho cộng đồng. Điểm quan trắc thuộc các sông hoặc nguồn nước cấp trực tiếp vào vùng nuôi; có tính ổn định và đại diện cho toàn vùng; xác định được tọa độ và đánh dấu trên bản đồ. Các điểm quan trắc không trùng lặp với các chương

*Tác giả liên hệ: Email: nghia@ria1.org

Environmental and disease monitoring in the northern aquaculture area

Huu Nghia Nguyen*, Trong Binh Phan,
Thi Hanh Nguyen, Thi Minh Nguyet Nguyen,
Thi My Hanh Truong, Duc Binh Nguyen,
Thai Giang Pham, Thi Nguyen Nguyen,
Thi May Le, Thi Thanh Pham

Research Institute for Aquaculture No. 1,
Dinh Bang Ward, Tu Son City, Bac Ninh Province, Vietnam

Received 13 September 2021; revised 12 October 2021; accepted 18 October 2021

Abstract:

Aquaculture is facing many challenges related to diseases and environmental pollution. Environmental and disease monitoring in aquaculture is to help authorities in planning and management, and to provide technical measures to support farmers. The study was carried out from January to October 2020, including 13 sites of supply water of brackish water shrimp farming areas of Nam Dinh, Nghe An, Ha Tinh, Quang Binh, Quang Tri, and Thua Thien Hue; 11 sites of clam/mollusc farming areas of Thai Binh, Thanh Hoa, and Quang Ninh; 11 sites of cage aquaculture of Hoa Binh, Yen Bai, and Hai Duong, with 23 monitoring times of the inlet water for brackish shrimp, 7 monitoring times for tilapia and freshwater cage culture. Alkalinity, ammonia, nitrite, total *Vibrio*, and Vp_{AHPND} values in shrimp farming water were higher than Vietnam's environmental standard, valued at 12.37, 25.08, 16.67, 3.68, and 0.67% respectively. Salinity, ammonia, nitrite values, and total *Vibrio* in the mollusc farming water were higher than Vietnam's environmental standard, which were 23.38, 33.77, 32.50, and 3.9%, respectively. Chemical oxygen demand and nitrite in the tilapia and freshwater cage farming water were higher than Vietnam's environmental standard, which were 29.87 and 22.08%, respectively. Timely recommendations and warnings helped farmers minimise the damage caused by environmental pollution and diseases.

Keywords: aquaculture, disease, environment, monitoring, warning.

Classification number: 4.5

trình quan trắc môi trường khác của Trung ương và địa phương. Các điểm quan trắc bao gồm: i) Nuôi tôm nước lợ: Quất Lâm, Hải Chính (Nam Định), Quỳnh Bảng, Quỳnh Liên (Nghệ An), Xuân Phổ, Hộ Độ, Kỳ Hà (Hà Tĩnh), Võ Ninh, Quảng Thuận (Quảng Bình), Trung Hải, Hiền Thành (Quảng Trị), Thuận An, Lăng Cô (Thừa Thiên Huế); ii) Nuôi nhuyễn thể: Đông Xá, thị trấn Vân Đồn, Hạ Long (Quảng Ninh), Gò Nổi, Nẹ, Cồn Thủ, Khu 3, cống tám cửa, cống lân 1 (Thái Bình), Hải Lộc 1, Hải

Lộc 2 (Thanh Hóa); iii) Nuôi cá rô phi, cá lồng: TP Hải Dương, Nam Sách, Đoàn kết 1, Đoàn kết 2, Đoàn kết 3 (Hải Dương), Sơn Thủy, Thung Nai, phường Thái Bình (Hòa Bình), Hán Đà, Mông Sơn, Phúc Ninh (Yên Bái).

2.2. Thông số và tần suất quan trắc

Nước nguồn cấp nuôi tôm quan trắc các thông số: nhiệt độ, pH, độ mặn, độ kiềm, NO_2 , NH_4 , tổng sulfide, TSS, PO_4 , COD, tảo độc, *Vibrio* tổng số, Vp_{AHPND} với tần suất 2 lần/tháng trong 10 tháng. Nước vùng nuôi nhuyễn thể quan trắc các thông số: nhiệt độ, pH, độ mặn, NO_2 , NH_4 , tổng sulfide, mật độ tảo độc, *Vibrio* tổng số, vi khuẩn, *Perkinsus*, Herpes virus, với tần suất 1 lần/tháng trong 7 tháng. Nước vùng nuôi cá lồng, rô phi quan trắc các thông số: nhiệt độ, pH, DO, NO_2 , NH_4 , PO_4 , tổng sulfide, COD, tảo độc, *Streptococcus* tổng số, vi khuẩn, TiLV với tần suất 1 lần/tháng trong 7 tháng.

2.3. Phương pháp thu và bảo quản mẫu

Thu mẫu nước nguồn cấp các khu vực nuôi tôm nước lợ theo TCVN 6663-6:2018 - Hướng dẫn lấy mẫu nước sông và suối. Thu mẫu nước trong ao nuôi tôm cá theo TCVN 5994:1995 - Hướng dẫn lấy mẫu lấy mẫu ở hồ ao tự nhiên và nhân tạo. Thu mẫu nước biển cấp cho các khu vực nuôi tôm trên cát theo TCVN 5998:1995 - Hướng dẫn lấy mẫu nước biển. Thu mẫu bùn theo TCVN 6663-13:2015 - Hướng dẫn lấy mẫu bùn. Thu mẫu trầm tích biển theo TCVN 6663-19:2015 - Hướng dẫn lấy mẫu trầm tích biển. Bảo quản mẫu nước theo TCVN 6663-3:2016 - Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu nước. Bảo quản và xử lý mẫu trầm tích theo TCVN 6663-15:2004 - Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu bùn và trầm tích. Thu, bảo quản và xử lý mẫu tôm, cá và nhuyễn thể được thực hiện theo Quy trình thu mẫu số hiệu QT 7.3, ISO/IEC 17025:2017 ban hành ngày 15/9/2018 của Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc. Thu mẫu *Perkinsus* theo TCVN 8710-11:2015 - Bệnh do *Perkinsus olseni* ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ.

2.4. Phương pháp phân tích mẫu

Nhiệt độ, DO, pH đo bằng máy YSI Pro 1020, Mỹ. Độ mặn đo bằng khúc xạ kế. Độ kiềm: SMEWW 2320 B:2011. NO_2 : SMEWW 4500- NO_2 B:2011. NH_4 : SMEWW 4500- NH_3 F:2011. Tổng sulfide: SMEWW 4500-S2- D:2011. TSS: TCVN 6625:2000 (ISO 11923:1997). PO_4 : SMEWW 4500-P E:2011. COD: SMEWW 5220 C:2011. Mật độ tảo độc: SMEWW 10200 F:2011. *Vibrio* tổng số: Buller (2004), Vp_{AHPND} trong nước: TCVN 8710-19:2019. TiLV: Nested-PCR. Phân lập, định danh vi khuẩn: Kit API-20E, API-20 Strep. *Perkinsus* spp: OIE, 2017.

2.5. Phương pháp đánh giá và cảnh báo

Nhiệm vụ căn cứ vào các quy chuẩn quốc gia đã được ban hành để đánh giá cho từng thông số quan trắc. Các quy chuẩn quốc gia được áp dụng để đánh giá bao gồm: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về cơ sở nuôi tôm nước lợ - điều kiện bảo đảm vệ sinh thú y, bảo vệ môi trường và an toàn thực phẩm (QCVN

02-19:2014/BNNPTNT). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia cơ sở nuôi cá lồng/bè nước ngọt - Điều kiện để đảm bảo an toàn thực phẩm và bảo vệ môi trường (QCVN 02-22:2015/BNNPTNT). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước mặt (QCVN 08-MT:2015/BTNMT). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng nước biển (QCVN 10-MT:2015/BTNMT). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về cơ sở nuôi cá rô phi - Yêu cầu kỹ thuật đảm bảo vệ sinh thú y, bảo vệ môi trường và an toàn thực phẩm (QCVN 02-26:2017/BNNPTNT). Phụ lục 8 - Tiêu chuẩn đánh giá với môi trường nước nuôi, lưu giữ động vật thủy sản (28 TCN 101:1997).

2.6. Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu quan trắc được tổng hợp theo thời gian và không gian. Về thời gian, số liệu được tổng hợp theo đợt quan trắc hoặc tháng, năm. Về không gian số liệu được tổng hợp theo điểm quan trắc hoặc xã, huyện, tỉnh tùy theo mức độ chi tiết hoặc mức độ tổng thể theo yêu cầu. Dữ liệu được xử lý và phân tích thống kê mô tả bằng công cụ Pivot Table của phần mềm Excel.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Quan trắc nguồn nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ

Nhiệt độ nước tại các điểm quan trắc kênh cấp vùng nuôi tôm nước lợ dao động trong khoảng 19,7-32,4°C, trung bình là 26,7±3,7°C. Độ pH dao động trong khoảng 6,94-8,52, trung bình 7,9±0,29. DO nằm trong khoảng 2-7,56 mg/l, trung bình 5,47±0,72 mg/l. Độ mặn dao động trong khoảng 0-38‰, trung bình 20,57±9,5‰. Độ kiềm dao động trong khoảng 18-254 mg/l, trung bình 101,67±33,55 mg/l. NH_4 dao động trong khoảng 0-2,52 mg/l, trung bình 0,24±0,23 mg/l. PO_4 dao động trong khoảng 0-0,44 mg/l, trung bình 0,04±0,06 mg/l. NO_2 dao động trong khoảng 0-1,09 mg/l, trung bình 0,03±0,07 mg/l. COD dao động trong khoảng 0,08-8 mg/l, trung bình 2,56±1,53 mg/l. TSS dao động trong khoảng 3,3-26,5 mg/l, trung bình 25,86±23,16 mg/l. Diễn biến giá trị các chỉ tiêu trong các tháng quan trắc được thể hiện ở hình 1.

Tại Nam Định, số mẫu NH_4 , NO_2 , PO_4 và TSS nằm ngoài GHCP lần lượt là 41,3, 34,8, 15,2 và 10,9%, có 1 mẫu dương tính với Vp_{AHPND} . Tại Nghệ An, số mẫu NH_4 , NO_2 và TSS nằm ngoài GHCP lần lượt là 65,2, 56,5 và 23,9%, có 1 mẫu *Vibrio* tổng số vượt GHCP. Tại Hà Tĩnh, độ kiềm và NH_4 vượt GHCP lần lượt là 14,9 và 11,1%, còn lại nằm ngoài GHCP dưới 10% và trong GHCP. Tại Quảng Bình, độ mặn và độ kiềm là 2 thông số có tỷ lệ mẫu ngoài GHCP lần lượt là 22,2 và 18,5%; NH_4 tại Võ Ninh vượt GHCP vào tháng 1, 9 và 10; *Vibrio* tổng số tại Quảng Thuận vượt GHCP vào tháng 6, độ mặn tại cả 2 điểm thấp hơn GHCP vào tháng 1, 9, 10, xuất hiện Vp_{AHPND} tại Quảng Thuận vào tháng 7 và 8. Tại Quảng Trị, độ kiềm, độ mặn và NH_4 có tỷ lệ mẫu nằm ngoài GHCP trên 20%, các thông số TSS, *Vibrio* tổng số và NO_2 có tỷ lệ mẫu ngoài GHCP lần lượt là 7,4, 5,6 và 1,9%; độ kiềm và độ mặn thấp hơn GHCP trong tháng 10, NH_4 vượt ngưỡng GHCP ở Hiền Thành, *Vibrio* tổng số vượt GHCP vào tháng 5 tại Trung Hải và Hiền Thành



Hình 1. Kết quả quan trắc nhiệt độ, pH, DO, độ mặn, độ kiềm, NH_4 , PO_4 , NO_2 , COD, TSS nguồn cấp nuôi tôm nước lợ (tổng hợp theo tỉnh thực hiện quan trắc).

và tháng 6 ở Hiền Thành. Tại Thừa Thiên, Hué, độ mặn và độ kiềm có tỷ lệ mẫu nằm ngoài GHCP là 20,4%, *Vibrio* tổng số và NO_2 là 7,4%, NH_4 5,6% và nhiệt độ là 3,7%. Điểm Thuận An thời điểm tháng 1, 2 và 10 có độ kiềm thấp (33-46 mg/l); tháng 3, 7 và 9 có NO_2 cao hơn GHCP 1,7-3,1 lần và tháng 3 và tháng 8 có NH_4 cao hơn GHCP. Điểm quan trắc Lăng Cô có độ mặn vượt GHCP tháng 1, 7 và 9, *Vibrio* tổng số vượt GHCP tháng 2 và 7 [1].

Hàm lượng NH_4 phù hợp cho ao nuôi tôm là 0,2-2,0 mg/l [2, 3]. Theo J. Whetstone và cs (2002) [4], nồng độ NO_2 trong các ao nuôi tôm nhỏ hơn 0,23 mg/l được xem là an toàn. Theo C.E. Boyd và cs (1998) [2], chất lượng nước cho nuôi thủy sản có hàm lượng $\text{NO}_2 < 0,5$ mg/l được xem là tốt và từ 0,5 đến 2 mg/l được xem là trung bình. Hàm lượng TSS năm 2020 nhìn

chung có giá trị tương đương so với giá trị trung bình các năm 2015-2020; năm 2020, hàm lượng TSS ở Nghệ An có giá trị trung bình cao hơn 1,89 lần so với năm trước [1]. Hàm lượng TSS trung bình có xu hướng tăng lên từ tháng 5 đến tháng 7 hàng năm, thời gian này thường có mưa lớn ở miền Bắc, nên phù sa hay các chất hữu cơ lơ lửng được giải phóng vào nguồn nước, kênh, sông. Tương tự với Quảng Bình, Quảng Trị vào tháng 10 và 11. Trong các thủy vực nước lợ giá trị kiểm tổng nằm trong khoảng 75-125 mg/l [2]. Theo E.A. Ganesh và cs (2010) [5], mật độ *Vibrio* trong NTTS nên ở mức $<10^3$ CFU/ml. Mật độ vi khuẩn *Vibrio* trong nguồn nước vượt 10^3 CFU/ml có nhiều khả năng gây bệnh cho tôm nuôi, do mật độ vi khuẩn cao.

3.2. Quan trắc vùng nuôi nhuyễn thể tập trung

Nhiệt độ nước tại các điểm quan trắc vùng nuôi nhuyễn thể dao động trong khoảng 26,20-33,20°C, trung bình là $30,03 \pm 2,02^\circ\text{C}$. Độ pH dao động trong khoảng 7,5-8,3, trung bình $7,91 \pm 0,17$. Độ mặn dao động trong khoảng 0-33‰, trung bình $16,25 \pm 11,49\text{‰}$. Độ kiềm dao động trong khoảng 62-180 mg/l, trung bình $103,02 \pm 15,83$ mg/l. NH_4 dao động trong khoảng 0-0,89 mg/l, trung bình $0,26 \pm 0,18$ mg/l. NO_2 dao động

trong khoảng 0-0,13 mg/l, trung bình $0,04 \pm 0,03$ mg/l. H_2S dao động trong khoảng 0-0,007 mg/l, trung bình $0,001 \pm 0,0014$ mg/l. *Vibrio* tổng số dao động trong khoảng 0-1300 CFU/ml, trung bình 239 ± 303 mg/l. Diễn biến giá trị các chỉ tiêu trong các tháng quan trắc được thể hiện ở hình 2.

Hàm lượng NH_4 cao vượt GHCP vào tháng 5 và 7; hàm lượng NO_2 vượt GHCP vào tháng 5. Mật độ *Vibrio* tổng số trong nước vượt GHCP vào tháng 7, 9 và 10. Tại vùng nuôi ngao Thái Bình, nhiệt độ nước, pH, độ kiềm, tổng sulfide, mật độ tảo độc, *Vibrio* tổng số nằm trong GHCP. Độ mặn biến động lớn với 50% tổng số mẫu nằm ngoài GHCP, do vùng nuôi chịu ảnh hưởng lớn bởi nguồn nước ngọt từ cửa sông. NH_4 cao vượt GHCP từ 1,1 đến 2,34 lần. NO_2 có 47,6% số mẫu quan trắc vượt GHCP. NH_4 và NO_2 cao cho thấy môi trường vùng nuôi bị ảnh hưởng bởi chất hữu cơ, nguồn gốc có thể từ bên ngoài hay từ yếu tố nội tại bởi sự phân hủy ngao chết. Tại vùng nuôi ngao Thanh Hóa, nhiệt độ, độ pH, độ kiềm, tổng sulfide, mật độ tảo độc, *Vibrio* tổng số nằm trong GHCP. Độ mặn thấp nhất 6‰ và có sự biến động lớn do ảnh hưởng của nguồn nước ngọt từ nội địa. NH_4 vượt GHCP vào tháng 5 do vùng nuôi chịu tác động bởi các yếu tố ô nhiễm trong nội địa đổ ra biển. NO_2 cao vượt GHCP vào tháng 7, 8 và 9.

Hầu nuôi tại Quảng Ninh bị nhiễm ký sinh trùng *Perkinsus* vào tháng 5, 6 và 8 với tần suất bắt gặp 1/9-4/9 mẫu, cường độ nhiễm 1-5 bào tử/g. Hầu nuôi cũng bị nhiễm 7 loài vi khuẩn *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. mytili*, *V. cholerae*) với tần suất bắt gặp 1/9-9/9 mẫu. Ngao nuôi tại Thái Bình nhiễm 1 trong 3 loài vi khuẩn thuộc giống *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. Alginolyticus*, *V. vulnificus*) với tần suất bắt gặp 5/12-11/12 mẫu trong tháng 5, 6 và 9. Phát hiện *Perkinsus* vào tháng 6 và 9 nhưng cường độ nhiễm chưa tới giới hạn cảnh báo. Ngao nuôi tại Thanh Hóa bị nhiễm 4 loài vi khuẩn thuộc giống *Vibrio* ở các tháng 6, 7 và 9, với tần suất nhiễm 1/6-4/6 mẫu. Tháng 7 là thời điểm nhiễm *V. parahaemolyticus* cao nhất với tỷ lệ nhiễm là 66,67%.

Vibrio spp. là nhóm vi khuẩn phổ biến, được tìm thấy ở hầu hết các thủy vực với hơn 100 loài khác nhau, trong đó một số loài gây chết hầu giai đoạn nhỏ và động vật 2 mảnh vỏ thương phẩm như *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. Aestuariamus*, *V. harvey*, *V. neptunius* [6]. Theo N.T. Hien và T.T.N. Minh (2012) [7], *Vibrio* spp. là một trong những nguyên nhân gây chết hàng loạt ngẫu nhiên xảy ra năm 2010. Ngao bị nhiễm *Perkinsus olseni* nặng thường bị hoại tử mô mang, màng áo, tuyến tiêu hóa, cơ khép vỏ và tuyến sinh dục [8, 9]. Ngoài ra, ngao còn có các biểu hiện như sinh trưởng chậm, tốc độ khép vỏ chậm hoặc mất khả năng khép vỏ, giảm khả năng sinh sản và chết hàng loạt cao. Tỷ lệ nhiễm *Perkinsus* của ngẫu nhiên lựa *Paphia undulata* tại Kiên Giang và Bà Rịa - Vũng Tàu đạt cao vào các tháng thu mẫu (67,5-100%). Cường độ nhiễm cao vào tháng 1 (956.996 bào tử/g thịt ngao), trong khi đó chỉ ở mức nhẹ vào tháng 3 (29.140 bào tử/g) và 5 (10.957 bào tử/g) [10]. Nghiên cứu trên ngao Bến Tre *Meretrix lyrata* năm 2018 cho thấy, tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng *Perkinsus* spp. là 35% và cường



Hình 2. Kết quả quan trắc nhiệt độ, pH, độ mặn, độ kiềm, NH_4 , NO_2 , H_2S , *Vibrio* tổng số vùng nuôi nhuyễn thể tập trung (tổng hợp theo tình thực hiện quan trắc).

độ nhiễm là 1,62-1.283,33 bào tử/g [11]. *Perkinsus* spp. cũng đã được ghi nhận nhiễm trên ngao Bến Tre nuôi ở Cần Giờ với tỷ lệ nhiễm 55-100% và cường độ là 35.000-42.000 bào tử/g, đây cũng là thời điểm ghi nhận tỷ lệ ngao chết cao (50-93%) [12]. Như vậy có thể nhận thấy cường độ nhiễm là yếu tố quan trọng làm ngao chết.

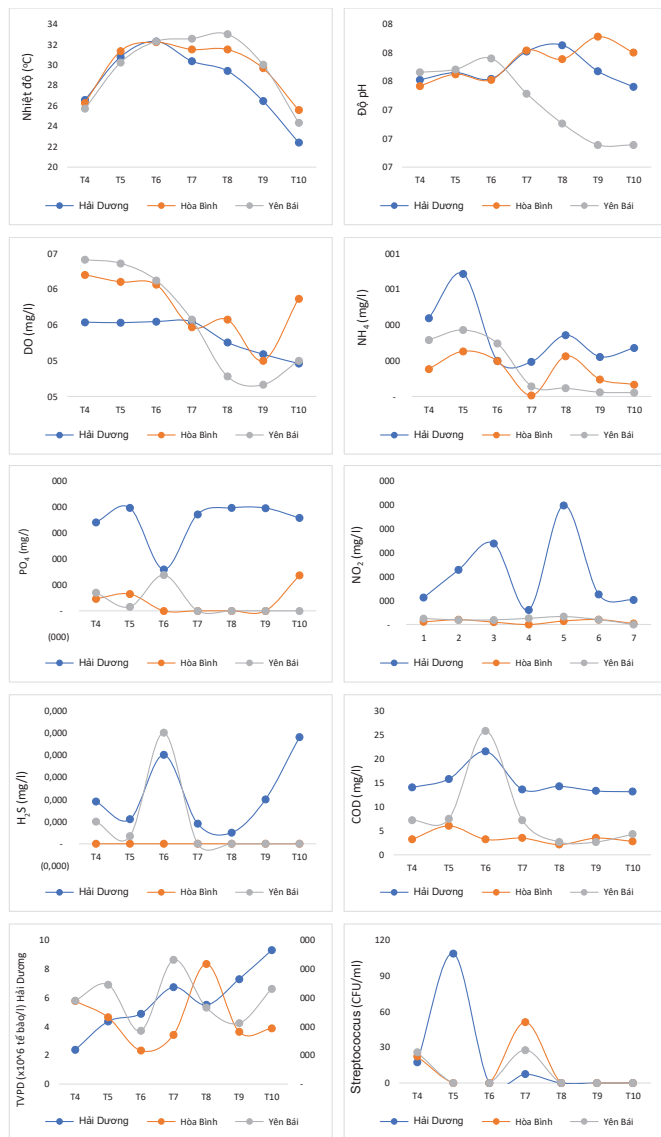
3.3. Quan trắc vùng nuôi cá rô phi và cá lồng trên sông

Nhiệt độ nước tại các điểm quan trắc kênh cấp vùng nuôi tôm nước lợ dao động trong khoảng 22-33°C, trung bình là 29,09±3,09°C. Độ pH dao động trong khoảng 7-8,6, trung bình 7,75±0,34. DO nằm trong khoảng 4-6,5 mg/l, trung bình 5,53±0,57 mg/l. NH_4 dao động trong khoảng 0-1,23 mg/l, trung bình 0,24±0,25 mg/l. PO_4 dao động trong khoảng 0-0,22 mg/l, trung bình 0,04±0,05 mg/l. NO_2 dao động trong khoảng

0-0,79 mg/l, trung bình 0,05±0,12 mg/l. H_2S dao động trong khoảng 0-0,04 mg/l, trung bình 0,002±0,006 mg/l. COD dao động trong khoảng 1,6-28 mg/l, trung bình 10,03±8,64 mg/l. Thực vật phù dưỡng (TVPD) dao động trong khoảng 3.950-32.130.000 tế bào/l, trung bình 2.648.524±6.581.508 tế bào/l. *Streptococcus* tổng số dao động trong khoảng 0-340 CFU/ml, trung bình 14±46 CFU/ml. Diễn biến giá trị các chỉ tiêu trong các tháng quan trắc thể hiện ở hình 3.

Tại vùng nuôi cá lồng trên sông Hải Dương, nhiệt độ nước, pH, PO_4 , sulfide đều có giá trị phù hợp cho NTTS. Hàm lượng NH_4 và NO_2 và tảo độc hại không phát hiện trong vùng nuôi Hải Dương. *Streptococcus* spp. trong nước đều có mật độ thấp dưới ngưỡng cảnh báo, không ảnh hưởng xấu đến môi trường nước và cá nuôi. DO các đợt quan trắc đều có giá trị lớn hơn ngưỡng 4,0 mg/l. COD vào tháng 6 cao hơn GHCP. COD cao gây ảnh hưởng xấu tới chất lượng nước, nguyên nhân chủ yếu do nguồn nước sông chịu ảnh hưởng của các nguồn thải từ đầu nguồn kết hợp với ảnh hưởng chất thải nội tại của số lượng lồng bè nuôi rất lớn khu vực điểm quan trắc. Tại vùng nuôi cá rô phi trong ao ở Hải Dương, các thông số nhiệt độ nước, DO, pH, NH_4 , PO_4 , H_2S đều có giá trị trong GHCP. Có 85,71% tổng số mẫu có COD trong ao nuôi cá rô phi cao vượt GHCP. NO_2 cao hơn GHCP vào tháng 4, 5, 9 và 10. Phát hiện loài tảo độc *Microcystis aeruginosa* trong ao nuôi cá rô phi vào tháng 9 và 10 với mật độ trung bình $1,7\pm1,9\times10^6$ tế bào/l. Mật độ tảo độc cao có thể gây thiếu oxy hòa tan trong nước, ảnh hưởng đến cá nuôi khi xuất hiện hiện tượng tảo nở hoa. Tại vùng nuôi cá lồng trên hồ chứa tại Hòa Bình nhiệt độ nước, DO, pH, COD, NH_4 , PO_4 , sulfide, NO_2 đều có giá trị phù hợp cho NTTS. *Streptococcus* spp. trong các đợt quan trắc tháng 4 và 7 có giá trị dao động trong khoảng $0-9,0\times10^1$ cfu/ml. Tại vùng nuôi cá lồng trên hồ chứa tại Yên Bái, nhiệt độ nước, DO, pH, COD, NH_4 , PO_4 , sulfide, NO_2 đều có giá trị phù hợp cho môi trường NTTS. Mật độ *Streptococcus* spp. trong nước các đợt quan trắc tháng 4 và 7 có giá trị dao động trong khoảng $0-7,7\times10^1$ cfu/ml. Không phát hiện TiLV trong các mẫu cá đã phân tích. Vi khuẩn *S. agalactiae* gặp ở tháng 7 với tần suất 33,3% số mẫu kiểm tra.

Cá rô phi có thể tồn tại với hàm lượng DO dưới 2,3 mg/l. Trong ao phú dưỡng, tảo nở hoa có thể làm giảm nồng độ oxy xuống mức 0,3 mg/l nhưng cá rô phi không chết. Cá lớn chịu đựng kém hơn cá giống do nhu cầu trao đổi chất [13], trong ao nuôi rô phi hiện tượng DO giảm dần, NO_2 , N-NH_3 , PO_4 tăng dần sẽ diễn ra từ đầu đến cuối vụ nuôi vì sinh khối cá và lượng thức ăn tăng dần, trong khi đó N-NO_3 và pH gần như không thay đổi. D.M. Daudpota và cs (2016) [14] khuyến cáo nên cho cá rô phi con ăn 4 lần/ngày vì tốc độ tăng trưởng, tỷ lệ chuyển đổi thức ăn tăng đáng kể ở nhóm cá cho ăn 4 lần/ngày so với nhóm cho ăn 1-2 lần/ngày. Cho ăn nhiều lần trong ngày cũng là phương pháp duy trì DO ổn định, vì cá không phải hoạt động mạnh trong một khoảng thời gian ngắn và giảm được lượng thức ăn thừa lắng xuống đáy, là nguồn chất hữu cơ sử dụng DO để phân hủy. COD cao thể hiện ao nuôi bị ô nhiễm hữu cơ,



Hình 3. Kết quả quan trắc nhiệt độ, pH, DO, NH_4 , NO_2 , PO_4 , H_2S , COD, TVPD, *Streptococcus* tổng số vùng nuôi cá rô phi và cá lồng trên sông (tổng hợp theo tỉnh thực hiện quan trắc).

quá trình sinh hóa phân hủy các chất hữu cơ sẽ làm giảm lượng DO trong nước. Sự ô nhiễm hữu cơ cũng là điều kiện thuận lợi cho quần thể TVPD trong ao nuôi phát triển mạnh, gây thiếu hụt DO về đêm và sáng sớm. Nhiệm vụ đã cảnh báo các cơ sở nuôi các biện pháp làm giảm chất hữu cơ và tăng cường quạt khí về đêm và sáng sớm. Tại Việt Nam, năm 2009 vi khuẩn *S. agalactiae* được xác định là nguyên nhân gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi ở các tỉnh Bắc Ninh, Bắc Giang, Hải Dương, Hà Nội [15]. Nhiễm *Streptococcus* spp. ở cá có thể gây ra tỷ lệ chết cao (>50%) trong khoảng thời gian 3-7 ngày. Triệu chứng lâm sàng cá nhiễm bệnh là bơi không định hướng, xoắn ốc hoặc quay. Để phòng bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp., chúng ta cần duy trì chất lượng nước tốt, cung cấp dinh dưỡng hợp lý, giữ môi trường sạch sẽ và thả riêng cá mới trước khi thả bù thêm vào ao cá cũ. Bệnh cũng có thể phòng bằng vắc xin. Khi cá nhiễm bệnh cơ sở nuôi cần tham vấn ý kiến chuyên môn để xử lý bằng loại kháng sinh phù hợp [16].

4. Kết luận

Năm 2020, nhiệm vụ “Quan trắc, cảnh báo và giám sát môi trường vùng NTTS tại một số tỉnh trọng điểm khu vực phía Bắc” đã thực hiện quan trắc định kỳ tại 35 điểm, bao gồm 13 điểm tại nguồn nước cấp vùng nuôi tôm nước lợ tại các tỉnh Nam Định, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị và Thừa Thiên Huế; 11 điểm tại vùng nuôi ngao/nuhuynh thể tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa và Quảng Ninh; 11 điểm tại vùng nuôi cá lồng tại các tỉnh Hòa Bình, Yên Bái và Hải Dương.

Kết quả quan trắc nguồn nước cấp nuôi tôm nước lợ cho thấy, 93% tổng số mẫu quan trắc nằm trong GHCP, 7% tổng số mẫu vượt ngưỡng bao gồm NH_4 , NO_2 và TSS ở Nam Định; NH_4 , NO_2 , TSS, *Vibrio* tổng số, độ mặn và độ kiềm ở Nghệ An; độ kiềm, độ mặn, NH_4 , NO_2 , *Vibrio* tổng số và độ kiềm ở Hà Tĩnh; NH_4 , *Vibrio* tổng số và độ mặn ở Quảng Bình; độ kiềm, độ mặn, NH_4 , *Vibrio* tổng số ở Quảng Trị; độ kiềm, NO_2 , NH_4 , độ mặn, *Vibrio* tổng số ở Thừa Thiên Huế.

Kết quả quan trắc vùng nuôi nuhuynh thể cho thấy, 88% tổng số mẫu quan trắc nằm trong GHCP, 12% tổng số mẫu vượt ngưỡng bao gồm NH_4 , NO_2 , *Vibrio* tổng số, ký sinh trùng *Perkinsus* spp., *Vibrio* spp. (7 loài) tại vùng nuôi hàu Quảng Ninh; độ mặn, NH_4 , NO_2 , *Vibrio* trên hàu, *Perkinsus* spp. tại vùng nuôi ngao Thái Bình; độ mặn, NH_4 , NO_2 (trong nước), *Perkinsus* spp., *Vibrio* spp. (trên ngao) tại vùng nuôi ngao Thanh Hóa.

Kết quả quan trắc vùng nuôi cá rô phi và cá lồng trên sông cho thấy, 92% tổng số mẫu quan trắc nằm trong GHCP, 8% tổng số mẫu vượt ngưỡng bao gồm các thông số nhiệt độ, pH, NH_4 , PO_4 , NO_2 , H_2S , COD tại Hải Dương và COD tại Yên Bái.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Tổng cục Thủy sản đã phân bổ kinh phí, chỉ đạo, giám sát thực hiện nhiệm vụ; Viện Nghiên cứu NTTS 1 đã tạo điều kiện thuận lợi để triển khai,

kiểm tra chất lượng thực hiện nhiệm vụ; các Chi cục Thủy sản, cơ quan quản lý tại các tỉnh; các cơ sở NTTS nơi thực hiện quan trắc đã phối hợp thực hiện nhiệm vụ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Hữu Nghĩa và cs (2020), *Quan trắc, cảnh báo và giám sát môi trường vùng nuôi trồng thủy sản tại một số tỉnh trọng điểm khu vực phía Bắc*, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
- [2] C.E. Boyd (1998), *Water Quality for Pond Aquaculture*, International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 37pp.
- [3] N.A. Tuan, N.T. Phuong, D.T.H. Oanh, et al. (2003), *Managing Shrimp Health in Ponds*, Agricultural Publisher, 152pp (in Vietnamese).
- [4] J. Whetstone, G.D. Treece, C.L. Browdy, et al. (2002), *Opportunities and Constraints in Marine Shrimp Farming*, <https://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-2600-Opportunities-and-Constraints-in-Marine-Shrimp-Farming.pdf>, accessed 25 July 2021.
- [5] E.A. Ganesh, S. Das, K. Chandrasekar, et al. (2010), “Monitoring of total Heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond”, *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2(1)**, pp.48-52.
- [6] R. Beaz-Hidalgo, S. Balboa, J.L. Romalde, et al. (2010), “Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs”, *Environmental Microbiology Reports*, **2(1)**, pp.34-43, DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x.
- [7] N.T. Hien, T.T.N. Minh (2012), *Results of Research on Some Common Pathogens on Clam Meretrix Sp. in the Coastal Area of Hai Phong*, Research Institute for Aquaculture No1 (in Vietnamese).
- [8] R.A. Elston, C.F. Dungan, T.R. Meyers, et al. (2004), “*Perkinsus* sp. infection risk for Manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America”, *Journal of Shellfish Research*, **23(1)**, pp.101-105.
- [9] T. Pretto, M. Zambon, M. Civettini, et al. (2014), “Massive mortality in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in the lagoon of venice, caused by *Perkinsus olseni*”, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **34(2)**, pp.43-53.
- [10] N.T.T. Thao (2008), “Infection of parasite *Perkinsus* sp. in soft clam *Paphia undulata* at Kien Giang & Baria-Vungtau provinces”, *CTU Journal of Science*, **1**, pp.222-230 (in Vietnamese).
- [11] N.T. Ha, N.T.T. Thuy, T.T. Dung (2018), “Study on pathogens in white clams (*Meretrix lyrata*) at Ben Tre province”, *CTU Journal of Science*, **54**, pp.76-82, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2018.039 (in Vietnamese).
- [12] N.V. Hao, N.T.T. Thuy, T.T. Tuoi, et al. (2011), “Occurrence of *Perkinsus* sp. in asiatic hard clam (*Meretrix Lyrata*) in the coastal of Can Gio district - Ho Chi Minh City”, *National Fisheries Science Conference* (in Vietnamese).
- [13] A.H. Al-Harbi, A.Q. Siddiqui (2000), “Effects of tilapia stocking densities on fish growth and water quality in tanks”, *Asian Fisheries Science*, **13(4)**, pp.391-396, DOI: 10.33997/j.afs.2000.13.4.011.
- [14] A.M. Daudpota, G. Abbas, I.B. Kalhor, et al. (2016), “Effect of feeding frequency on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)”, reared in low salinity water”, *Pakistan Journal of Zoology*, **48**, pp.171-177.
- [15] N.V. Khue, D.T. Ha, N.T. Hanh (2009), *Some Characteristics of Streptococcus Agalactiae - Causative Agent of Streptococcosis Disease of Tilapia in Northern Vietnam*, Research Institute for Aquaculture No1 (in Vietnamese).
- [16] R.P.E. Yanong, R. Francis-Floyd (2019), “Streptococcal infections of fish”, *IFAS Extension, University of Florida*, <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FA05700.pdf>, accessed 25 July 2021.

Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất chế phẩm *Trichoderma* phòng trừ bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi

Nguyễn Tiến Dũng^{1*}, Nguyễn Thị Thúy², Cao Thị Thu Dung², Quách Thị Hạnh¹, Nguyễn Thị Minh Trang¹, Nguyễn Thị Thu Hà¹, Phan Lệ Nga¹, Trần Phú Thắng¹, Trương Tuấn Oanh¹, Nguyễn Đức Thuận¹

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

²Viện Nông nghiệp và Tài nguyên, Trường Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, phường Trường Thi, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/8/2021; ngày chuyển phản biện 26/8/2021; ngày nhận phản biện 16/9/2021; ngày chấp nhận đăng 22/9/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối và sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ nấm *Trichoderma* bón cho cây có múi là cần thiết, giúp cải tạo đất và phòng trừ nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. gây bệnh vàng lá - thối rễ. Nghiên cứu sử dụng 2 chủng nấm *Trichoderma* đối kháng cao để nhân nuôi là *Trichoderma harzianum* 22.QH (T.haz.22.QH) và *Trichoderma asperellum* 11.TT (T.asp.11.TT). Môi trường lỏng với thành phần gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm *Trichoderma* đạt cao nhất ($4,35 \pm 0,48$ g/l) sau 1 ngày. Môi trường lên men rắn sử dụng cơ chất lúa nguyên hạt ninh nhừ và 10% dịch nấm *Trichoderma* là thích hợp cho nấm phát triển nhanh, mật độ bào tử đạt $8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất và thu sinh khối nấm sau 5-6 ngày nuôi cấy. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh sử dụng 100% phân chuồng hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng với 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* và thu sinh khối phân sau 60 ngày ủ.

Từ khóa: bệnh vàng lá - thối rễ, cây có múi, sinh khối, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trong sản xuất nông nghiệp, phân bón được xem là yếu tố quyết định đến năng suất và chất lượng nông sản. Tuy nhiên, việc sử dụng quá mức cần thiết các loại phân bón và thuốc trừ sâu hoá học đã gây ra nhiều hậu quả, ảnh hưởng đến con người và môi trường sống, làm đất canh tác nhanh bị bạc màu, giảm năng suất và chất lượng nông sản. Một trong những giải pháp để trả lại độ phì nhiêu cho đất, giảm chi phí phân hóa học đó là sử dụng phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma* được tạo ra từ các chủng vi sinh vật và nguyên liệu hữu cơ khác nhau vừa có tác dụng làm phân bón, cải tạo đất, kích thích cây trồng phát triển, đồng thời kiểm soát được nhiều bệnh hại cây trồng.

Hiện nay, bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi đã được xác định do nguyên nhân chính là nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., tuyến trùng hay ngập nước gây hại ngày càng phổ biến và nghiêm trọng trên cây có múi, việc sử dụng biện pháp hóa học hiệu quả không cao [1-3]. Trên thế giới, nghiên cứu ứng dụng nấm *Trichoderma* làm phân bón vi sinh đang là hướng được quan tâm. Nấm *Trichoderma* là một tác nhân quan trọng làm phân bón và kiểm soát nấm gây bệnh *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*... Ứng dụng công nghệ vi sinh đã lựa chọn các chủng nấm *Trichoderma* có hiệu lực cao và nhân nuôi sinh khối để sản xuất phân bón [4-6].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- 2 chủng nấm: T.haz.22.QH và T.asp.11.TT được tuyển chọn đối kháng cao với nấm *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. gây bệnh

vàng lá - thối rễ cây có múi, thu thập tại huyện Thạch Thành, tỉnh Thanh Hóa và huyện Quỳnh Hợp, tỉnh Nghệ An.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại Viện Nghiên cứu và Phát triển vùng và Trường Đại học Vinh.

- Nguyên vật liệu: agar, glucose, peptone, đường, lúa, giá đậu, ri mật, chloramphenicol, streptomycin, cồn, phân chuồng, bã mía, than bùn...

- Dụng cụ: đĩa petri, bình thủy tinh, kính hiển vi, bộ dụng cụ nuôi cấy vi nấm...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ứng dụng công nghệ lên men bề mặt trên môi trường rắn, thu sinh khối và sản xuất chế phẩm nấm *Trichoderma* được tiến hành theo phương pháp của Phạm Thị Thùy (2004) [7], T. Pramod Kumar và M.G. Palakshappa (2009) [8], Z. Shahrim và cs (2008) [9], A. Singh (2007) [10].

Thí nghiệm 1: Xác định thành phần môi trường lỏng nhân sinh khối nấm *Trichoderma* (10 ml dịch nấm *Trichoderma* trong 1 l môi trường).

- Các công thức thí nghiệm gồm:

+ CT1.1: ri mật 140 g.

+ CT1.2: đường mía 30 g.

+ CT1.3: dịch chiết từ 150 g giá đậu.

+ CT1.4: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 140 g ri mật.

+ CT1.5: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía.

*Tác giả liên hệ: Email: dungnguyentien85@gmail.com

Research on technical production of *Trichoderma* preparations for control of yellow leaf - root rot on citrus trees

Tien Dung Nguyen^{1*}, Thi Thuy Nguyen²,
Thi Thu Dung Cao², Thi Hanh Quach¹,
Thi Minh Trang Nguyen¹, Thi Thu Ha Nguyen¹,
Le Nga Phan¹, Phu Thang Tran¹,
Tuan Oanh Truong¹, Duc Thuan Nguyen¹

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

²School of Agriculture and Natural Resources, Vinh University,
182 Le Duan Street, Truong Thi Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received 23 August 2021; revised 16 September 2021; accepted 22 September 2021

Abstract:

It is necessary to study conditions biomass multiplication and production of microbial organic fertilizers from *Trichoderma* for citrus trees, to help improve soil and prevent *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. causes yellow leaf - root rot. This study used two very high resistance strains of *Trichoderma* fungi for culture, namely T.haz.22.QH and T.asp.11.TT. Cultures of *Trichoderma* in liquid medium with the composition of extract from 150 g bean sprouts + 30 g sugar + 1 g urea + 1 g KH_2PO_4 + 0.5 g MgSO_4 achieved the highest biomass of 4.35 ± 0.48 g/l after 1 day. Solid fermentation medium using simmered whole-grain rice substrate and 10% fungal juice were suitable for fast growth and spores 8.82×10^9 CFU/g and obtained fungal biomass after 5-6 days. Producing micro-organic fertilizers using 100% manure or 50% bagasse + 50% manure with 6-8 kg of *Trichoderma* and obtained faecal biomass after 60 days of incubation.

Keywords: biomass, citrus, *Trichoderma*, yellow leaf - root rot.

Classification number: 4.6

+ CT1.6: dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 .

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm: 2 chủng nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT cùng được nuôi trên môi trường PDA (200 g khoai tây, 20 g đường glucosơ, 20 g agar, 1000 ml nước cất) trong bình tam giác, trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%, 12 giờ sáng/12 giờ tối trong 2-3 ngày [9, 11].

+ Pha môi trường lỏng theo các công thức, hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút rồi lấy ra để nguội.

Cho 10 ml dịch nấm *Trichoderma* vào trong 1 l môi trường. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%.

- Chỉ tiêu theo dõi: khối lượng sinh khối nấm thu được (g/l) sau 1 ngày nuôi.

- *Thí nghiệm 2: Xác định thành phần cơ chất môi trường lên men rắn để sản xuất chế phẩm Trichoderma (mỗi công thức 10% dịch nấm Trichoderma).*

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT2.1: 10 g lúa nguyên hạt ninh nhừ.

+ CT2.2: 10 g lúa nghiền nhỏ + 10 ml nước.

+ CT2.3: 20 g cám gạo + 15 g trấu + 15 g cám vỏ lạc

+ 20 ml nước.

+ CT2.4: 20 g than bùn + 20 ml nước.

+ CT2.5: 20 g cám + 10 g trấu + 10 g cám ngô + 20 ml nước.

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm: 2 chủng nấm *Trichoderma* được nuôi trên môi trường gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường mía + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 . Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút, ở điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, RH=75-80%. Thu dịch nấm sau 2 ngày, nồng độ trung bình $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l.

+ Cho nguyên liệu môi trường vào mỗi túi bóng loại 0,5 kg có ống nhựa làm miệng. Đong lượng nước/cơ chất theo tỷ lệ 1/1 cho vào mỗi bịch, ngâm trong vòng 60 phút trước khi hấp khử trùng 2 lần liên tiếp ở 121°C trong 30 phút rồi lấy ra để nguội. Dùng bơm tiêm hút 10% dịch nấm và bơm vào môi trường rắn. Nuôi ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, theo dõi đến khi bào tử bao phủ kín túi.

- Chỉ tiêu đánh giá: thời gian phát triển nấm, nồng độ bào tử CFU/g cơ chất.

- *Thí nghiệm 3: Xác định tỷ lệ giữa dịch nấm Trichoderma và cơ chất lúa nguyên hạt ninh nhừ để sản xuất chế phẩm Trichoderma.*

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT3.1: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 10% khối lượng lúa ninh nhừ.

+ CT3.2: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 15% khối lượng lúa ninh nhừ.

+ CT3.3: dịch nấm *Trichoderma* chiếm 20% khối lượng lúa ninh nhừ.

- Phương pháp thực hiện:

+ Chuẩn bị dịch nấm *Trichoderma* nồng độ $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l (tương tự thí nghiệm 2).

+ Cho 2,5 kg lúa vào mỗi túi bóng loại 5 kg có ống nhựa làm miệng. Đong lượng nước/lúa theo tỷ lệ 1/1 cho vào mỗi bịch, ngâm trong vòng 60 phút trước khi hấp khử trùng 2 lần liên tiếp ở 121°C trong 30 phút rồi lấy ra để nguội. Dùng bơm tiêm hút dịch nấm và bơm vào môi trường lúa chín nhừ. Nuôi ở 28±2°C, theo dõi đến khi bào tử bao phủ kín túi.

+ Phương pháp thu sinh khối nấm: Khi sợi nấm bao phủ lên toàn bộ khối môi trường rắn đồng thời quá trình hình thành bào tử kết thúc, tiến hành thu sinh khối nấm. Sau đó sấy khô ở 40°C trong 1 ngày, nghiền mịn thu được chế phẩm *Trichoderma*.

- Chỉ tiêu theo dõi: Nồng độ bào tử nấm *Trichoderma* CFU/g cơ chất.

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu liều lượng chế phẩm *Trichoderma* thích hợp để xử lý chất mang hữu cơ.

Gồm 4 công thức thí nghiệm với lượng chế phẩm *Trichoderma* là 2, 4, 6 và 8 kg (mật độ bào tử nấm $7,6 \times 10^9$ CFU/g), xử lý cho 1 tấn phân chuồng (bổ sung đạm, lân, EM và ri mật).

- Phương pháp thực hiện: Phối trộn đều các thành phần nguyên liệu với lượng chế phẩm nấm với nhau theo các công thức. Ủ hiếu khí, độ ẩm đạt 50-60%. Đảo trộn 7-10 ngày/lần, nhiệt độ khối ủ tăng >60°C. Theo dõi các chỉ tiêu sau 60 ngày ủ.

- Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ bào tử CFU/g chất mang, hàm lượng C, N.

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu thành phần và tỷ lệ chất mang làm phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma*.

- Các công thức thí nghiệm:

+ CT5.1: bã mía.

+ CT5.2: phân chuồng.

+ CT5.3: bã mía 80% + phân chuồng 20%.

+ CT5.4: bã mía 70% + phân chuồng 30%.

+ CT5.5: bã mía 60% + phân chuồng 40%.

+ CT5.6: bã mía 50% + phân chuồng 50%.

- Phương pháp thực hiện: Phối trộn đều các nguyên liệu theo tỷ lệ trên với 6 kg chế phẩm nấm *Trichoderma* (mật độ bào tử nấm $7,6 \times 10^9$ CFU/g) được 1 tấn chất mang (bổ sung đạm, lân, EM và ri mật). Phân chuồng và bã mía đã được xử lý. Ủ hiếu khí, độ ẩm đạt 50-60%. Đảo trộn 7-10 ngày/lần, nhiệt độ khối ủ tăng >60°C. Theo dõi các chỉ tiêu sau 60 ngày ủ.

- Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ bào tử CFU/g chất mang, hàm lượng C, N.

- Phương pháp xác định nồng độ bào tử bằng buồng đếm hồng cầu.

Số liệu được xử lý theo chương trình Excel và phần mềm thống kê sinh học Statistix 9.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định thành phần môi trường lỏng thích hợp nhân sinh khối nấm *Trichoderma*

Nhân nuôi nấm *Trichoderma* trên môi trường lỏng là bước cần thiết để có nguồn dịch nấm đủ cho nhân sinh khối trên môi trường rắn. Kết quả nghiên cứu sự phát triển của 2 chủng nấm trên 6 loại môi trường lỏng khác nhau cho thấy: môi trường lỏng có thành phần gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm *Trichoderma* đạt cao nhất ($4,35 \pm 0,48$ g/l) sau 1 ngày. Ngoài thành phần chính là giá đậu và đường thì việc bổ sung thêm urê, vi lượng KH_2PO_4 và MgSO_4 giúp nấm *Trichoderma* phát triển mạnh hơn (bảng 1).

Bảng 1. Sinh khối nấm *Trichoderma* trên môi trường lỏng sau 1 ngày nuôi cấy.

Công thức	Lượng sinh khối sau 1 ngày (g/l) (TB±SD)
Ri mật	1,92±0,34 ^d
Đường mía	3,78±0,45 ^c
DCGD	3,66±0,54 ^c
DCGD + ri mật	3,84±0,57 ^{bc}
DCGD + đường mía	4,03±0,51 ^b
DCGD + đường + N + P + Mg	4,35±0,48 ^a
LSD _{0,05}	0,22
CV%	5,70

Ghi chú: DCGD: dịch chiết giá đậu; các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2. Xác định thành phần cơ chất và tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn

Xác định thành phần cơ chất thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn: Trên 5 loại môi trường lên men rắn thì cả 2 chủng nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT đều thích hợp phát triển trên cơ chất là lúa nguyên hạt chín nhừ với thời gian sinh trưởng, phát triển ngắn nhất. Bào tử hình thành sau 2 ngày, bao phủ toàn túi chỉ sau 5 ngày nhân nuôi với mật độ bào tử đạt cao nhất là $8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất (sai khác với các công thức còn lại ở mức $p < 0,05$). Thời điểm thu sinh khối nấm *Trichoderma* thích hợp cũng là 5-6 ngày sau nuôi cấy.

Trong khi đó, 4 công thức môi trường rắn còn lại bào tử nấm cần 6,5-11 ngày sau nhân nuôi mới bao phủ toàn túi, mật độ bào tử đạt thấp ($1,87$ - $6,60 \times 10^9$ CFU/g cơ chất). Nấm phát triển kém nhất trên môi trường CT2.4 gồm 20 g than bùn + 20 ml nước (bảng 2 và 3).

Bảng 2. Sự phát triển của 2 chủng nấm *Trichoderma* trên một số cơ chất khác nhau ở các ngày sau khi nuôi cấy.

Công thức	Sự phát triển của nấm <i>Trichoderma</i> sau cấy (ngày)			
	Ngày sợi nấm mọc	Ngày hình thành bào tử	Ngày nấm mọc kín túi	Ngày bào tử bao phủ trong toàn túi
CT2.1	1,0	2,0	3,0	5,0
CT2.2	1,0	2,0	4,5	6,5
CT2.3	1,0	2,5	5,0	7,5
CT2.4	3,0	3,5	7,0	11,0
CT2.5	1,5	2,0	5,5	7,0

Bảng 3. Mật độ bào tử của 2 chủng nấm *Trichoderma* trên các loại môi trường rắn khác nhau sau khi nuôi cấy.

Công thức	Mật độ bào tử mỗi chủng ($\times 10^9$ CFU/g)				
	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
CT2.1	1,31 $\pm$ 0,3 ^a	3,14 $\pm$ 0,7 ^a	6,80 $\pm$ 1,1 ^a	8,82 $\pm$ 1,4 ^a	8,61 $\pm$ 1,3 ^a
CT2.2	0,86 $\pm$ 0,2 ^b	1,95 $\pm$ 0,5 ^b	3,13 $\pm$ 0,9 ^b	4,05 $\pm$ 0,6 ^c	4,50 $\pm$ 0,8 ^c
CT2.3	0,62 $\pm$ 0,1 ^b	2,27 $\pm$ 0,4 ^{ab}	4,50 $\pm$ 0,8 ^b	5,90 $\pm$ 1,0 ^{bc}	6,15 $\pm$ 1,0 ^b
CT2.4	0,14 $\pm$ 0,0 ^c	0,40 $\pm$ 0,1 ^c	0,82 $\pm$ 0,2 ^c	1,20 $\pm$ 0,4 ^d	1,87 $\pm$ 0,7 ^c
CT2.5	1,05 $\pm$ 0,2 ^{ab}	2,68 $\pm$ 0,5 ^{ab}	4,79 $\pm$ 1,0 ^b	6,20 $\pm$ 1,1 ^b	6,60 $\pm$ 1,1 ^b
LSD _{0,05}	0,34	0,84	1,64	1,81	1,58
CV%	5,10	5,60	7,10	6,70	8,10

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Xác định tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* thích hợp để nhân sinh khối trên môi trường lên men rắn: Dịch hỗn hợp của 2 chủng nấm *Trichoderma* cùng được nuôi trên môi trường lên men lỏng (nồng độ $12,4 \times 10^{10}$ CFU/l), sau đó được khi tiêm vào môi trường rắn. Tỷ lệ dịch nấm *Trichoderma* được thí nghiệm ở 3 mức là 10, 15 và 20% khối lượng cơ chất trên môi trường rắn lúa nguyên nhữ.

Kết quả theo dõi được trình bày ở bảng 4 cho thấy, ở cả 3 mức tỷ lệ dịch nấm đều cho khả năng phát triển với mật độ bào tử và thời gian không có sự sai khác nhau. Mật độ bào tử đạt mức cao ($8,34-8,76 \times 10^9$ CFU/g). Như vậy, khi nhân sinh khối trên môi trường cơ chất lúa nguyên hạt nhữ, chỉ cần sử dụng 10% dịch bào tử hỗn hợp của 2 chủng nấm *Trichoderma* là đảm bảo sự phát triển của nấm (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng tỷ lệ dịch nấm của 2 chủng *Trichoderma* đến khả năng phát triển trên cơ chất lúa nguyên hạt nhữ.

Tỷ lệ dịch nấm/cơ chất (%)	Sự phát triển của nấm sau khi cấy (ngày)				Mật độ bào tử cao nhất (CFU/g)
	Ngày sợi nấm mọc	Ngày bắt đầu hình thành bào tử	Ngày sợi nấm mọc kín túi	Ngày bào tử bao phủ trong toàn túi	
10	1	2	4	5	$8,76 \times 10^9$
15	1	2	4	5	$8,34 \times 10^9$
20	1	2	4	5	$8,56 \times 10^9$
LSD _{0,05}					0,73
CV%					9,30

3.3. Xác định liều lượng chế phẩm *Trichoderma* thích hợp để xử lý chất mang

Xác định ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm *Trichoderma* đến nồng độ bào tử: Nấm sau khi được nhân sinh khối trên môi trường rắn là lúa nguyên hạt nhữ tạo ra chế phẩm *Trichoderma* và được sử dụng xử lý chất hữu cơ làm phân bón. Kết quả bảng 5 cho thấy, mật độ bào tử nấm trong khối ủ có xu hướng tăng dần theo liều lượng chế phẩm *Trichoderma* từ khi ủ đến 40 ngày sau đó giảm dần đến 60 ngày. Với liều lượng 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* xử lý cho 1 tấn chất mang hữu cơ thì cho mật độ bào tử nấm cao nhất sau 40 ngày ủ là $8,93-9,66 \times 10^6$ CFU/g.

Bảng 5. Nồng độ bào tử của khối ủ với các liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau.

Liều lượng chế phẩm <i>Trichoderma</i> (kg)	Mật độ bào tử của khối ủ theo thời gian (CFU/g)			
	0 ngày	20 ngày	40 ngày	60 ngày
2	$3,20 \times 10^3$	$4,15 \times 10^{4d}$	$5,40 \times 10^{4c}$	$4,45 \times 10^{3c}$
4	$6,40 \times 10^3$	$5,21 \times 10^{5c}$	$7,46 \times 10^b$	$6,90 \times 10^{4b}$
6	$9,60 \times 10^3$	$7,53 \times 10^{6b}$	$8,93 \times 10^{6a}$	$8,12 \times 10^{5a}$
8	$12,80 \times 10^3$	$8,62 \times 10^{6a}$	$9,66 \times 10^{6a}$	$8,79 \times 10^{5a}$
LSD _{0,05}		1,03	1,18	1,06
CV%		7,40	7,70	8,20

Xác định ảnh hưởng của liều lượng chế phẩm *Trichoderma* đến hàm lượng chất dinh dưỡng: Các mức liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau đã ảnh hưởng đến khả năng phân hủy, hình thành chất dinh dưỡng trong quá trình ủ phân. Hàm lượng chất hữu cơ có xu hướng tăng dần, còn hàm lượng nitơ tổng số lại giảm dần theo thời gian ủ. Trong đó, hàm lượng chất hữu cơ đạt cao nhất ở công thức sử dụng 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* là 27,40-28,82%, hàm lượng nitơ tổng số là 1,32-1,34% sau 60 ngày ủ (bảng 6).

Bảng 6. Hàm lượng dinh dưỡng trong khối ủ với liều lượng chế phẩm *Trichoderma* khác nhau.

Liều lượng chế phẩm <i>Trichoderma</i> (kg)	Hàm lượng chất dinh dưỡng sau khi ủ (%)							
	0 ngày		20 ngày		40 ngày		60 ngày	
	C%	N%	C%	N%	C%	N%	C%	N%
0 (đối chứng)	15,74	2,02	16,82 ^c	1,81 ^b	18,10 ^c	1,25 ^c	18,72 ^c	1,02 ^c
2	15,74	2,02	19,21 ^{bc}	1,90 ^b	21,80 ^b	1,51 ^b	21,65 ^b	1,17 ^b
4	15,74	2,02	20,10 ^b	1,96 ^{ab}	23,96 ^b	1,56 ^b	23,91 ^b	1,20 ^b
6	15,74	2,02	21,30 ^{ab}	2,01 ^a	25,02 ^a	1,65 ^a	27,40 ^a	1,32 ^{ab}
8	15,74	2,02	21,85 ^a	2,00 ^a	26,84 ^a	1,79 ^a	28,82 ^a	1,34 ^a
LSD _{0,05}			1,51	0,14	2,15	0,20	1,78	0,13
CV%			8,80	9,50	11,30	8,30	10,10	9,90

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Xác định thành phần và tỷ lệ chất mang làm phân hữu cơ vi sinh *Trichoderma*

Xác định ảnh hưởng của thành phần và tỷ lệ chất mang đến mật độ bào tử nấm *Trichoderma*: Chất mang gồm phân chuồng và bã mía là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ủ. Kết quả bảng 7 cho thấy, thành phần, tỷ lệ chất mang khác nhau thì mức độ hình thành bào tử nấm *Trichoderma*

trong khối ủ cũng khác nhau. Công thức chất mang là 100% phân chuồng (CT5.2) hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng (CT5.6) cho mật độ bào tử đạt cao nhất là $7,5-8,4 \times 10^6$ CFU/g sau 40-50 ngày sau ủ.

Bảng 7. Mật độ bào tử nấm *Trichoderma* trong khối ủ với thành phần, tỷ lệ chất mang khác nhau.

Công thức	Mật độ bào tử các khối ủ theo thời gian (CFU/g)					
	10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày	50 ngày	60 ngày
CT5.1	$1,7 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
CT5.2	$6,6 \times 10^4$	$7,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$
CT5.3	$3,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$
CT5.4	$2,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$
CT5.5	$5,5 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$
CT5.6	$7,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$

Xác định ảnh hưởng của thành phần và tỷ lệ chất mang đến hàm lượng chất dinh dưỡng: Thành phần, tỷ lệ chất mang là một trong những yếu tố quyết định đến hàm lượng các chất dinh dưỡng trong khối ủ. Hàm lượng chất hữu cơ có xu hướng tăng dần, còn hàm lượng nitơ tổng số lại giảm dần theo thời gian ủ. Trong đó, hàm lượng dinh dưỡng đạt cao nhất ở công thức chất mang là 100% phân chuồng (CT5.2) hoặc bã mía 50% + phân chuồng 50% (CT5.6) với hàm lượng chất hữu cơ là 26,5-27,1%, hàm lượng nitơ tổng số là 1,5% sau 60 ngày ủ (bảng 8).

Bảng 8. Hàm lượng dinh dưỡng trong khối ủ với thành phần và tỷ lệ chất mang khác nhau.

Công thức	Hàm lượng chất dinh dưỡng sau ngày ủ (%)								
	20 ngày			40 ngày			60 ngày		
	C%	N%	C/N	C%	N%	C/N	C%	N%	C/N
CT5.1	12,3 ^d	2,5 ^a	4,9	14,7 ^d	1,7 ^a	8,6	15,0 ^c	1,2 ^b	12,5
CT5.2	19,9 ^a	2,2 ^a	9,0	23,5 ^a	1,8 ^a	13,1	27,1 ^a	1,5 ^a	18,1
CT5.3	13,7 ^c	2,4 ^a	5,7	15,2 ^c	1,5 ^a	10,1	16,7 ^c	1,3 ^b	12,8
CT5.4	14,2 ^c	2,3 ^a	6,2	17,9 ^b	1,6 ^a	11,2	19,2 ^b	1,4 ^{ab}	13,7
CT5.5	16,1 ^b	2,3 ^a	7,0	19,5 ^b	1,8 ^a	10,8	21,1 ^b	1,4 ^{ab}	15,1
CT5.6	18,2 ^a	2,2 ^a	8,3	22,9 ^a	1,8 ^a	12,7	26,5 ^a	1,5 ^a	17,6
LSD _{0,05}	1,6	0,4		2,10	0,3		2,5	0,2	
CV%	7,8	5,5		8,1	6,7		8,5	7,1	

Ghi chú: các chữ cái là số mũ khác nhau trong cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Như vậy, thành phần, tỷ lệ chất mang ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình ủ và chất lượng phân. Nguyên liệu sử dụng tốt để làm chất mang sản xuất phân hữu cơ vi sinh 100% phân chuồng hoặc phân chuồng với bã mía theo tỷ lệ 1/1.

4. Kết luận

- Môi trường lỏng gồm dịch chiết từ 150 g giá đậu + 30 g đường + 1 g urê + 1 g KH_2PO_4 + 0,5 g MgSO_4 cho lượng sinh khối nấm T.haz.22.QH và T.asp.11.TT đạt cao nhất là $4,35 \pm 0,48$ g/l sau 1 ngày nuôi.

- Môi trường lên men rắn lúa nguyên hạt ninh nhừ với 10% dịch nấm của 2 chủng T.haz.22.QH và T.asp.11.TT là thích hợp cho thời gian phát triển ngắn, mật độ bào tử đạt

$8,82 \times 10^9$ CFU/g cơ chất và thu sinh khối nấm sau 5-6 ngày nuôi cấy.

- Xử lý cho 1 tấn chất mang hữu cơ 100% phân chuồng hoặc 50% bã mía + 50% phân chuồng cần 6-8 kg chế phẩm *Trichoderma* cho mật độ bào tử, hàm lượng chất hữu cơ, hàm lượng nitơ tổng số đạt cao nhất và thu sinh khối phân sau 60 ngày ủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.V. Kim (1997), "Identifying the causative agent of yellow leaf fall disease on citrus trees in the Mekong Delta", *Collection of Scientific and Technological Works, Can Tho University*, pp.85-91 (in Vietnamese).
- [2] L.T.T. Hong, L.T.M. Nuong (2002), *Results of Research on the Cause of Yellow Leaf Root Rot Disease on Tangerines Lai Vung, Dong Thap*, Southern Horticultural Research Institute, pp.509-516 (in Vietnamese).
- [3] D. Minh, D.T.T. Nha (2003), "Antagonism ability of *Trichoderma* sp. domestic citrus root rot disease caused by *Fusarium solani* fungus in the Mekong Delta", *Proceedings of the Workshop on Plant Protection to Serve the Policy of Crop Restructuring in the Southern and Central Highlands Provinces*, pp.82-85 (in Vietnamese).
- [4] T.T. Thuan, N.T. Ly, N.V. Dung (2000), "Results of production and use of the antagonistic fungus *Trichoderma* to control plant diseases 1996-2000", *Collection of Research Works on Plant Protection 1996-2000*, pp.221-227 (in Vietnamese).
- [5] P. Sawangsri, A. Pengnoo, J. Suwanprasert, et al. (2007), "Effect of *Trichoderma harzianum* biomass and *Bradyrhizobium* sp. strain NC92 to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) caused by *Rhizoctonia solani* in the field", *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **29**(1), pp.75-88.
- [6] R. Rajendiran, D. Jegadeeshkumar, B.T. Sureshkumar, et al. (2010), "In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens", *Journal of Agricultural Technology*, **6**(1), pp.31-35.
- [7] P.T. Thuy (2004), *Biotechnology in Plant Protection*, VNU Publishing House, 355pp (in Vietnamese).
- [8] T.P. Kumar, M.G. Palakshappa (2009), "Evaluation of suitable substrates for on farm production of antagonist *Trichoderma harzianum*", *Karnataka J. Agric. Sci.*, **22**(1), pp.115-117.
- [9] Z. Shahrim, V. Sabaratnam, N.A.A. Rahman, et al. (2008), "Production of reducing sugars by *Trichoderma* sp. KUPM0001 during solid substrate fermentation of sago starch processing waste hampas", *Research Journal of Microbiology*, **3**(9), pp.569-579.
- [10] A. Singh, S. Srivastava, H.B. Singh (2007), "Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases", *Bioresource Technology*, **98**(2), pp.470-473, DOI: 10.1016/j.biortech.2006.01.002.
- [11] M.G. Prakash, K.V. Gopal, M. Anandaraj, et al. (1999), "Evaluation of substrates for mass multiplication of fungal biocontrol agents *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens*", *Journal of Spices and Aromatic Crops*, **8**(2), pp.207- 210.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 64 - Number 9 - September 2022

Tiêu chuẩn chẩn đoán y học cổ truyền của Covid-19 bằng mô hình cây tiềm ẩn.

Trần Thị Hồng Ngai, Hoàng Thúy Hồng, Nguyễn Trường Nam

Nuôi cấy virus EV71 trong hệ thống lắc cho sản xuất vắc xin phòng bệnh tay, chân, miệng

Nguyễn Thị Yến Nhi, Nguyễn Thị Hạnh Lan, Hoàng Ngọc Khánh Quỳnh, Lê Thị Liên, Lê Hà Tầm Dương, Cao Thị Bảo Vân

Tổng hợp và thử hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế con đường quorum sensing.

Trương Thanh Tùng

Kết quả xác định tên khoa học và phân tích hàm lượng acid chlorogenic của các mẫu kim ngân hoa thu tại Hải Dương và Hà Nam.

Trần Thị Lan, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Thị Hương, Đặng Văn Hùng

Thành phần loài cây thuốc chữa bệnh ngoài da theo kinh nghiệm của cộng đồng dân tộc Thái ở Khu bảo tồn thiên nhiên Mường La, tỉnh Sơn La.

Vũ Thị Liên, Li Phô Xạ Nạ Xay, Quảng Văn Tuấn, Lò Văn Sung, Vũ Đức Toàn

Kết hợp điện di ion với các kỹ thuật xâm lấn tối thiểu làm tăng hiệu quả vận chuyển thuốc qua da.

Nguyễn Thị Hồng Đức, Võ Quốc Anh, Lý Công Thành, Nguyễn Anh Vũ

Xây dựng quy trình định lượng acid asperulosidic trong thuốc bột từ bài thuốc hỗ trợ điều trị thoái hóa cột sống của lương y Nguyễn Thiện Chung bằng phương pháp HPLC.

Nguyễn Hữu Mai Linh, Phạm Ngọc Thạc, Huỳnh Trần Quốc Dũng, Võ Thanh Hóa, Phan Thanh Dũng, Nguyễn Đức Hạnh

Xây dựng quy trình kỹ thuật ương và chăm sóc cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giai đoạn sau *in vitro*.

Nguyễn Thị Mai, Trương Hồng, Nguyễn Hắc Hiên, Ninh Thị Thảo

Ảnh hưởng của tưới nước trong mùa khô đến sản lượng lá cây *Trichanthera gigantea*.

Trần Thị Hoan, Từ Trung Kiên

Đặc điểm hình thái loài cá nhói mình tròn *Strongylura leiura* (Bleeker, 1850) ở vùng biển ven bờ huyện Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh.

Đinh Công Khánh, Trần Trung Can, Võ Thị Mộng Thu, Nguyễn Phú Hoà, Thái Ngọc Trí

Quan trắc môi trường và bệnh vùng nuôi trồng thủy sản khu vực phía Bắc.

Nguyễn Hữu Nghĩa, Phan Trọng Bình, Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Đức Bình, Phạm Thái Giang, Nguyễn Thị Nguyên, Lê Thị Mây, Phạm Thị Thanh

Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất chế phẩm *Trichoderma* phòng trừ bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi.

Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Thủy, Cao Thị Thu Dung, Quách Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Trang, Nguyễn Thị Thu Hà, Phan Lê Nga, Trần Phú Thắng, Trương Tuấn Oanh, Nguyễn Đức Thuận

1 Diagnostic traditional medicine criteria of Covid-19 by using a latent tree model.

Thi Hong Ngai Tran, Thuy Hong Hoang, Truong Nam Nguyen

5 Culture of EV71 virus in wave bioreactor system for production of hand, foot and mouth disease vaccine

Thi Yen Nhi Nguyen, Thi Hanh Lan Nguyen, Ngoc Khanh Quynh Hoang, Thi Lien Le, Ha Tam Duong Le, Thi Bao Van Cao

10 Synthesis and biological evaluation of some benzothiazole-2-thiol derivatives as potent quorum sensing inhibitors.

Thanh Tung Truong

14 Results of the chlorogenic acid content assessment and scientific name identification of collected *Lonicera* samples in Hai Duong and Ha Nam provinces.

Thi Lan Tran, Quynh Nga Nguyen, Thi Phuong Nguyen, Thi Huong Nguyen, Van Hung Dang

19 The composition of medicinal plants used for the treatment of skin diseases by the Thai ethnic minority at Muong La nature reserve, Son La province.

Thi Lien Vu, Pho Xa Na Xay Li, Van Tuan Quang, Van Sung Lo, Duc Toan Vu

25 Conjugation of iontophoresis and minimally invasive techniques to improve transdermal drug delivery.

Thi Hong Duc Nguyen, Quoc Anh Vo, Cong Thanh Ly, Anh Vu Nguyen

31 Development of an HPLC method for asperulosidic acid quantification in the powder prepared from the spinal degeneration remedy of physician Nguyen Thien Chung.

Huu Mai Linh Nguyen, Ngoc Thac Pham, Tran Quoc Dung Huynh, Thanh Hoa Vo, Thanh Dung Phan, Duc Hanh Nguyen

36 Establishment of an acclimatization protocol for pepper (*Piper nigrum* L.) plantlets post-*in vitro* stage.

Thi Mai Nguyen, Hong Truong, Hac Hien Nguyen, Thi Thao Ninh

43 Effect of irrigation during the dry season on leaf yield of *Trichanthera gigantea*.

Thi Hoan Tran, Trung Kien Tu

48 The morphological characteristics of banded needlefish *Strongylura leiura* (Bleeker, 1850) dwelling in the coastal water of Can Gio district, Ho Chi Minh city.

Cong Khanh Dinh, Trung Can Tran, Thi Mong Thu Vo, Phu Hoa Nguyen, Ngoc Tri Thai

54 Environmental and disease monitoring in the northern aquaculture area.

Huu Nghia Nguyen, Trong Binh Phan, Thi Hanh Nguyen, Thi Minh Nguyet Nguyen, Thi My Hanh Truong, Duc Binh Nguyen, Thai Giang Pham, Thi Nguyen Nguyen, Thi May Le, Thi Thanh Pham

60 Research on technical production of *Trichoderma* preparations for control of yellow leaf - root rot on citrus trees.

Tien Dung Nguyen, Thi Thuy Nguyen, Thi Thu Dung Cao, Thi Hanh Quach, Thi Minh Trang Nguyen, Thi Thu Ha Nguyen, Le Nga Phan, Phu Thang Tran, Tuan Oanh Truong, Duc Thuan Nguyen