



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

# KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of  
Science and Technology - MOST**

**B**

Tập 61 - Số 12 - Tháng 12 năm 2019

## HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ 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  
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên  
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 Kỹ thuật 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 Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh  
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội  
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

## TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

## PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng  
Nguyễn Thị Hương Giang

## TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

## TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

## TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

## EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - 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 - Vietnam National University, Hanoi  
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi  
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology  
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry  
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, Vietnam National University, 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 - Vietnam National University, Hanoi  
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University  
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi  
Pham Hung Viet - VNU University of Science

## EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

## DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang  
Nguyen Thi Huong Giang

## HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

## HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

## ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

## TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội  
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794  
Email: khcnvn@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: khcnvn@most.gov.vn  
E-journal: b.vjst.vn

## GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011  
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012  
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016

Giá: 18000<sup>d</sup>

## PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011  
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012  
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

# Đánh giá nhĩ lượng của bệnh nhân khe hở vòm miệng bị viêm tai giữa ứ dịch

Khiếu Hữu Thanh<sup>1\*</sup>, Nguyễn Đình Phúc<sup>2</sup>, Lương Thị Minh Hương<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y dược Thái Bình

<sup>2</sup>Bệnh viện Hữu nghị Việt Nam - Cuba

<sup>3</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 29/7/2019; ngày gửi phản biện 1/8/2019; ngày nhận phản biện 3/9/2019; ngày chấp nhận đăng 9/9/2019

## Tóm tắt:

Mục tiêu nghiên cứu là phân tích đặc điểm nhĩ lượng của bệnh nhân khe hở vòm miệng (KHVM) bị viêm tai giữa ứ dịch (VTGƯĐ). Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu mô tả 56 bệnh nhân KHVM bị VTGƯĐ chưa được tạo hình vòm miệng tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Nam - Cuba, Hà Nội năm 2016. Bệnh nhân được chẩn đoán qua nội soi, đánh giá sự thay đổi về màu sắc, hình dạng màng nhĩ. Nhĩ lượng được đo bằng máy Interacoustics AT235. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ các triệu chứng cơ năng như ù tai, nghe kém, lắc đầu tương ứng là 12,5, 3,6 và 3,6%. Màng nhĩ dày đục 24,1%, có mức dịch chiếm 14,3%, dịch màu vàng kem chiếm 83%. Trung bình thể tích ống tai ngoài là  $0,52 \pm 0,22$  ml; độ thông thuận là  $0,20 \pm 0,39$  ml; áp lực tai giữa là  $-146,4 \pm 116,4$  daPa. Nhĩ lượng hình phẳng B chiếm chủ yếu (58,3%), nhĩ lượng hình đồi C chiếm 28,6%. Nhĩ lượng đồ dạng B chủ yếu gặp ở màng nhĩ màu vàng kem, chiếm tỷ lệ 91,8%. Kết luận: nhĩ lượng đồ dạng B và C tương ứng ở bệnh nhân KHVM bị VTGƯĐ là 58,3 và 28,6%.

**Từ khóa:** khe hở vòm miệng, nhĩ lượng đồ, viêm tai giữa ứ dịch (VTGƯĐ).

**Chỉ số phân loại:** 3.2

## **Đặt vấn đề**

KHVM là dị tật bẩm sinh khá phổ biến với khoảng 700 trẻ mắc mỗi năm tại Việt Nam. Trong KHVM, những rối loạn chức năng vòm nhĩ do bất thường về bám tận của cơ nâng màn hầu và cơ căng màn hầu, hiện tượng viêm nhiễm vùng vòm do thiếu hụt khẩu cái làm gia tăng tỷ lệ bệnh lý tai giữa, đặc biệt là VTGƯĐ lên tới 94% [1]. Các biểu hiện rối loạn chức năng vòm nhĩ có thể bao gồm các triệu chứng: nghe kém, ù tai, đau tai; các biểu hiện ở hình dạng, màu sắc màng nhĩ. Đo nhĩ lượng đồ là công cụ đánh giá chức năng vòm nhĩ khách quan, có thể giúp chẩn đoán tình trạng tắc hay giãn rộng vòm nhĩ với độ chính xác cao. Do vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu vai trò của chức năng vòm nhĩ qua nhĩ lượng đồ nhằm mục tiêu phân tích đặc điểm nhĩ lượng của bệnh nhân KHVM bị VTGƯĐ.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### **Đối tượng nghiên cứu**

Các bệnh nhân KHVM bị VTGƯĐ chưa được tạo hình vòm miệng tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Nam - Cuba, Hà Nội từ tháng 1 đến tháng 12/2016 theo tiêu chuẩn lựa chọn sau: được chẩn đoán KHVM; nội soi hình ảnh màng nhĩ lõm, ứ dịch trong tai giữa; được đo nhĩ lượng.

Tiêu chuẩn loại trừ: KHVM trong các hội chứng.

## **Phương pháp nghiên cứu**

**Thiết kế nghiên cứu:** nghiên cứu tiền cứu, mô tả hàng loạt ca. Tổng số 56 bệnh nhân.

**Các bước tiến hành và chỉ số nghiên cứu:**

Bệnh nhân KHVM hoặc người giám hộ được hỏi bệnh bao gồm các triệu chứng cơ năng: nghe kém, ù tai, đau tai, các biểu hiện chậm đáp ứng với âm thanh, ù tai, lắc đầu.

Bệnh nhân được khám nội soi tai chẩn đoán bệnh lý tai giữa: xác định tình trạng màng nhĩ bao gồm: màu sắc (vàng, xanh, hồng phác), xung huyết, có dịch; hình dạng: co lõm, phồng, xẹp.

Đo nhĩ lượng đồ bằng máy Interacoustics AT235. Đánh giá thể tích ống tai, độ thông thuận, áp lực đỉnh tai giữa. Hình dạng nhĩ đồ với phân loại Jerger: A, As, Ad, B, C.

Đôi chiếu các đặc điểm bệnh lý tai giữa với nhĩ lượng đồ.

## **Kết quả nghiên cứu**

### **Triệu chứng lâm sàng bệnh nhân KHVM bị VTGƯĐ**

Tuổi trung bình là  $24 \pm 15,3$  tháng. Cao nhất là 7 tuổi. Thấp nhất là 12 tháng. Tỷ lệ nam là 76,8%, nữ là 23,2%.

\*Tác giả liên hệ: Email: khiethanh@tbump.edu.vn

# The tympanogram characteristics of cleft palate patients suffering from otitis media with effusion

Huu Thanh Khieu<sup>1\*</sup>, Dinh Phuc Nguyen<sup>2</sup>,  
Thi Minh Huong Luong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Thai Binh University of Medicine and Pharmacy

<sup>2</sup>Vietnam - Cuba Friendship Hospital

<sup>3</sup>Hanoi Medical University

Received 29 July 2019; accepted 9 September 2019

## Abstract:

The study aims to analyse the tympanogram characteristics of cleft palate patients suffering from otitis media with effusion. Patients and methods: the study was conducted on 56 cleft palate patients suffering from otitis media with effusion that have not undergone palate reconstruction at Vietnam - Cuba Friendship Hospital, Hanoi in 2016. Patients were diagnosed with endoscopy to evaluate the change in color and shape of their eardrums. Tympanogram were measured by Interacoustics AT235. The results showed that the rate of functional symptoms such as rubbing ears, hearing loss, and shaking the head was 12.5, 3.6, and 3.6%, respectively. The rate of thickened eardrum was 24.1% with a fluid level of 14.3%. Mostly-yellow tympanic membrane accounted for 83.0%. The average ECV was  $0.52 \pm 0.22$  ml; Sc was  $0.20 \pm 0.39$  ml; MEP was  $-146.4 \pm 116.4$  daPa. Type B tympanogram was higher with 58.3%; type C tympanogram was 28.6%. Type B tympanogram mainly occurred in mostly-yellow eardrums, accounting for 91.8%. In conclusion, the rate of type B and type C tympanogram in the cleft palate patients suffering from otitis media with effusion was 58.3 and 28.6%, respectively.

**Keywords:** cleft palate, otitis media with effusion, tympanogram.

**Classification number:** 3.2

Tỷ lệ trẻ bị khe hở không toàn bộ của vòm miệng thứ phát cao nhất (46,43%), tiếp đến là tỷ lệ KHVM toàn bộ hai bên (33,93%) và thấp nhất là tỷ lệ khe hở toàn bộ của vòm miệng thứ phát (19,64%).

Có 49 trẻ gặp bệnh lý ở 2 tai, trong đó 47 trẻ VTGU'D cả 2 bên, chiếm 83,9%. Có 2 trẻ gặp viêm tai giữa cấp ở 1 bên tai, tai đối diện là VTGU'D, chiếm tỷ lệ 3,6%. Có 7 trẻ 1 bên tai màng nhĩ bình thường, chiếm tỷ lệ 12,5%.

**Bảng 1. Triệu chứng lâm sàng.**

| Triệu chứng                       | n   | (%)    |
|-----------------------------------|-----|--------|
| <b>Cơ năng (n=56)</b>             |     |        |
| Nghe kém                          | 2   | (3,6)  |
| Lắc đầu                           | 2   | (3,6)  |
| Dụi tai                           | 7   | (12,5) |
| <b>Hình thái màng nhĩ (n=112)</b> |     |        |
| Phồng                             | 2   | (1,8)  |
| Lõm                               | 103 | (92,0) |
| Dịch toàn bộ                      | 87  | (77,7) |
| Có mức dịch                       | 16  | (14,3) |
| Màng nhĩ dày                      | 27  | (24,1) |
| <b>Màu sắc màng nhĩ (n=112)</b>   |     |        |
| Vàng kem                          | 93  | (83,0) |
| Trong                             | 10  | (8,9)  |
| Đục                               | 2   | (1,8)  |
| Bóng sáng                         | 7   | (6,3)  |

Triệu chứng cơ năng ở trẻ bị VTGU'D rất nghèo nàn, chỉ có nghe kém (đáp ứng kém với âm thanh, tiếng động), lắc đầu, dụi tai, trong đó dụi tai là cao nhất với tỷ lệ 12,5%. Đặc điểm màng nhĩ lõm hay gặp nhất (92,0%). Màng nhĩ có dịch toàn bộ chiếm tỷ lệ 77,7%. Màng nhĩ dày có tỷ lệ 24,1%. Đặc điểm có mức dịch chiếm tỷ lệ 14,3%. Màng nhĩ màu vàng kem hay gặp nhất (83,0%) (bảng 1).

**Đặc điểm nhĩ lượng đồ trên bệnh nhân KHVM bị VTGU'D**

**Bảng 2. Đặc điểm nhĩ lượng.**

| Chỉ số     | N (số tai) | Nhỏ nhất | Lớn nhất | Trung bình | ĐLC   |
|------------|------------|----------|----------|------------|-------|
| ECV (ml)   | 84         | 0,21     | 1,40     | 0,52       | 0,22  |
| Sc (ml)    | 84         | 0,00     | 3,00     | 0,20       | 0,39  |
| MEP (daPa) | 84         | -404     | 235      | -146,4     | 116,4 |

ECV: thể tích ống tai ngoài; Sc: độ thông thuận; MEP: áp lực tai giữa; ĐLC: độ lệch chuẩn.

Bảng 2 cho thấy, có 84 tai đo được nhĩ lượng đồ trên tổng số 112 tai. Đây đều là các trẻ bị VTGU'D 2 bên. Trung bình thể tích ống tai ngoài là  $0,52 \pm 0,22$ ; trung bình độ thông thuận là  $0,20 \pm 0,39$ ; trung bình áp lực tai giữa là  $-146,4 \pm 116,4$ .



**Bảng 3. Tỷ lệ dạng nhĩ đồ.**

| Dạng nhĩ đồ | n  | (%)    |
|-------------|----|--------|
| A           | 2  | (2,4)  |
| B           | 49 | (58,3) |
| C           | 24 | (28,6) |
| D           | 9  | (10,7) |
| Tổng        | 84 | (100)  |

Bảng 3 cho thấy, nhĩ lượng dạng B hay gặp nhất với tỷ lệ 58,3%. Dạng C gặp với tỷ lệ 28,6%. Dạng A chỉ có 2,4%.

**Bảng 4. Đối chiếu nhĩ lượng đồ với màu sắc dịch.**

| Màu sắc dịch | Vàng kem  | Trong     | Tổng      |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Dạng nhĩ đồ  | n (%)     | n (%)     | n (%)     |
| A            | 1 (1,2)   | 1 (1,2)   | 2 (2,4)   |
| B            | 45 (53,5) | 4 (4,8)   | 49 (58,3) |
| C            | 23 (27,4) | 1 (1,2)   | 24 (28,6) |
| As           | 5 (6,0)   | 4 (4,7)   | 9 (10,7)  |
| Tổng         | 74 (88,1) | 10 (11,9) | 84 (100)  |

Bảng 4 cho thấy, nhĩ lượng đồ dạng B chủ yếu gặp ở màng nhĩ màu vàng kem, với 45/49 trường hợp, chiếm tỷ lệ 91,8%. Màu sắc dịch trong gặp ở tất cả các dạng nhĩ đồ.

## Bàn luận

### Triệu chứng lâm sàng bệnh nhân KHVM bị VTGUĐ

**Đặc điểm chung:** viêm tai ứ dịch có độ tuổi trung bình trong nghiên cứu là  $24 \pm 15,3$  tháng. Nhóm tuổi hay gặp nhất là trên 36 tháng. Điều này phù hợp với chỉ định phẫu thuật KHVM tại Việt Nam cho các trẻ trên 18 tháng. Tỷ lệ nam là 76,8%, cao hơn nữ (23,2%). Đặc điểm về nhóm tuổi và giới của nhóm viêm tai ứ dịch tương đương với nhóm bệnh lý khe hở vòm chung. Kết quả này tương tự như của Phạm Thanh Hải và cs [2], nam chiếm 70,8%, nữ 29,2%.

**Triệu chứng cơ năng:** trong nghiên cứu của chúng tôi, đa số bệnh nhân trong độ tuổi tạo hình môi vòm miệng <6 tuổi, nên sự nhận biết các triệu chứng cơ năng như ù tai, nghe óc ách trong tai, đau tai, nghe kém... khi khai thác là rất khó khăn. Do đó, các dấu hiệu được khai thác gián tiếp thông qua bố mẹ bệnh nhân. Một bệnh nhân có thể có một hoặc nhiều triệu chứng, dấu hiệu.

Trong 56 bệnh nhân KHVM được khai thác có biểu hiện các triệu chứng, 7 bệnh nhân (12,5%) có biểu hiện dẹt tai, 2 bệnh nhân (3,6%) có triệu chứng nghe kém và 2 bệnh nhân (3,6%) có triệu chứng lắc đầu. Theo Paradise và cs [3], khi nghiên cứu trong nhóm tuổi  $\leq 12$  tháng thì triệu chứng có liên quan mật thiết với VTGUĐ là dẹt tai và các dấu hiệu nghi ngờ nghe kém; ngoài ra còn có khó chịu, rối loạn giấc ngủ, sốt không rõ nguyên nhân.

**Sự biến đổi về hình thái, vị trí màng nhĩ:** hình thái màng nhĩ dày chiếm 24,1%. Màng nhĩ dày, mất nón sáng, không

phồng cũng không lõm là triệu chứng dễ bị bỏ qua trong việc chẩn đoán. Bệnh phát hiện muộn gây ảnh hưởng tới sức nghe, tiến triển thành xẹp nhĩ, cholesteatoma nên các trường hợp màng nhĩ dày đục cần được kiểm tra kỹ. Các kết quả trong nghiên cứu này thấp hơn của Paradise và cs [3] với 76% màng nhĩ phồng và đục. 14,3% có bọt khí và mức dịch - dấu hiệu rõ ràng biểu hiện tình trạng có dịch trong hòm tai. Khác với kết quả của tác giả Zingade và cs [4], không có trường hợp nào có bọt khí và mức dịch, chủ yếu là mờ đục - điều này cho thấy bệnh lý vùi nhĩ là nguyên nhân chủ yếu của VTGUĐ trong KHVM.

**Màu sắc màng nhĩ:** màng nhĩ thay đổi màu sắc chiếm 84,8%. Trong đó, màng nhĩ màu vàng kem gặp đa số với 93 màng nhĩ, chiếm 83,0%. Không có trường hợp nào màng nhĩ màu xanh. Theo Paradise và cs [3], 95% màng nhĩ dày đục mất nón sáng, 34% màng nhĩ màu trắng và vàng. Theo Rudolf và cs [5], màu sắc màng nhĩ có thể chuyển từ xám sang vàng hoặc xanh tùy thuộc vào sự thay đổi màu sắc của dịch trong hòm nhĩ.

**Đặc điểm bệnh lý tai trên các bệnh nhân:** đa số bệnh nhân bị bệnh ở 2 tai với 49/56 bệnh nhân, chiếm 87,5%. Nhóm bị một tai có 7/56 bệnh nhân, chiếm 12,5%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Thành Chung [6]. Có thể do ở trẻ KHVM, các cơ nâng màn hầu và cơ căng màn hầu ảnh hưởng đến vùi nhĩ của trẻ ở cả 2 bên nên đa phần trẻ bị VTGUĐ ở 2 bên.

Viêm tai giữa ở bệnh nhân KHVM thường phổ biến và xuất hiện sớm. Viêm tai ứ dịch có thể diễn biến thành đợt cấp khi có nhiễm khuẩn trở lại. Chẩn đoán phân biệt viêm tai ứ dịch và viêm tai giữa cấp khi không có các triệu chứng cơ năng cấp tính (sốt, đau tai) chủ yếu dựa vào hình dạng màng nhĩ. Với viêm tai giữa cấp thời kỳ ứ mủ thì màng nhĩ phồng, còn viêm tai ứ dịch có màng nhĩ lõm, có thể có mức nước hoặc bọt khí. Tỷ lệ viêm cấp trong nghiên cứu của chúng tôi là 1,8%.

### Đặc điểm nhĩ lượng đồ trên bệnh nhân KHVM bị VTGUĐ

Nhĩ lượng đồ là một trong các phương pháp đo khách quan, độc lập với ý thức của người bệnh, rất có giá trị trong đánh giá tổn thương tai giữa mà ta không nhìn thấy trực tiếp. Đo nhĩ lượng giúp đánh giá chức năng vùi nhĩ, sự hoạt động hệ thống màng nhĩ xương con và dịch trong hòm tai. Tuy nhiên, để đo được nhĩ đồ cần phải làm sạch ống tai trẻ, trong khi đo cần tránh làm bít tắc đầu dò. Trong số 112 tai của 56 trẻ, chúng tôi đo được 84 nhĩ đồ.

**Đặc điểm nhĩ lượng đồ:** trung bình thể tích ống tai ngoài là  $0,52 \pm 0,22$  ml. Thể tích ống tai phù hợp với thể tích ống tai của trẻ em ở Việt Nam, nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với ống tai người trưởng thành là 1,25 ml [7]. Trung bình áp lực tai giữa là  $-146,4 \pm 116,4$  daPa. Áp lực tai giữa giảm làm màng nhĩ lõm vào trong, máu ngấn xương búa nổi gồ lên,

cán búa nằm ngang. Áp lực tai giữa giảm cũng dẫn tới tình trạng màng nhĩ kém di động. Trung bình độ thông thuận là  $0,20 \pm 0,39$  ml. Độ thông thuận cho biết tình trạng di động của hệ thống màng nhĩ xương con. Độ thông thuận giảm chứng tỏ tình trạng ứ dịch làm màng nhĩ không di động được. Hậu quả lâu dài của tình trạng ứ dịch tai giữa khiến cho màng nhĩ tiêu dần lớp sợi, lõm, dính vào thành trong hòm tai. Hậu quả của quá trình này là hình thành bệnh lý xẹp nhĩ, cholesteatoma [8].

**Hình thái nhĩ lượng đồ:** theo phân loại của Jerger hiện đang được sử dụng rộng rãi ở các nước trên thế giới, nhĩ đồ dạng B (nhĩ đồ hình đôi và phẳng, không có đỉnh) chiếm 58,3%. Nhĩ đồ dạng C với đỉnh lệch âm chiếm 28,6%. Nhĩ đồ dạng A gặp 2,4% với đỉnh bình thường, nhĩ đồ dạng As gặp 10,7% với đỉnh hạ thấp. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Zingade và cs [4] có 64,77% nhĩ đồ dạng B, thấp hơn nghiên cứu của Khan và cs [9] với nhĩ đồ dạng B chiếm 75%. Ở Việt Nam, tác giả Nguyễn Tấn Phong [8] đã đưa ra cách phân loại nhĩ đồ mới. Theo đó, trong nghiên cứu của chúng tôi nhĩ đồ chủ yếu gặp dạng phẳng và đôi, nhĩ đồ lệch âm gặp ít hơn. Nhĩ đồ thường gặp có sự biến đổi cả ở trục tung và trục hoành gọi là nhĩ đồ thứ cấp.

Kết quả này tương tự nhận xét của Lương Hồng Châu [7], nhĩ đồ hình đôi gặp nhiều trong VTGUĐ. Nhĩ lượng đồ là kết quả khách quan và rất có giá trị trong VTGUĐ nhưng nó cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố nên vẫn có các sai lệch khi chẩn đoán chỉ dựa vào nhĩ đồ. Theo tác giả Grant và cs [10], độ chính xác của nhĩ lượng trong VTGUĐ là 90%, trong khi kính hiển vi là 95,7%, chích rạch màng nhĩ là 97,4%, nghiên cứu của tác giả đưa ra 92,2% dạng nhĩ đồ B khi đánh giá qua rạch màng nhĩ có dịch chiếm 46/51 trường hợp. Tuy nhiên ở Việt Nam, trong thực tế, dùng kính hiển vi và chích rạch màng nhĩ trong thăm khám ban đầu là không khả thi nên nội soi màng nhĩ kết hợp đo nhĩ lượng vẫn đem lại hiệu quả về lâm sàng và kinh tế.

## Kết luận

VTGUĐ ở trẻ KHVM có triệu chứng cơ năng rất nghèo nàn, tỷ lệ các triệu chứng cơ năng như dẹt tai, nghe kém, lắc đầu dưới 15%. Bệnh biểu hiện sự thay đổi hình thái màng nhĩ dày 24,1%, có mức dịch chiếm 14,3%. Chủ yếu dịch màu vàng kem (chiếm 83,0%).

Trung bình thể tích ống tai ngoài là  $0,52 \pm 0,22$  ml. Trung bình độ thông thuận là  $0,20 \pm 0,39$  ml. Trung bình áp lực tai giữa là  $-146,4 \pm 116,4$  daPa. Nhĩ lượng hình phẳng B chiếm chủ yếu với 58,3%, nhĩ lượng hình đôi C chiếm 28,6%. Nhĩ lượng đồ dạng B chủ yếu gặp ở màng nhĩ màu vàng kem, chiếm tỷ lệ 91,8%. Màu sắc dịch trong gặp ở tất cả các dạng nhĩ đồ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.E. Stool, P. Randall (1967), "Unexpected ear disease in infants with cleft palate", *Cleft Palate J.*, **4**, pp.99-103.
- [2] Phạm Thanh Hải, Vũ Quang Hưng, Phạm Văn Liệu (2012), "Nghiên cứu đặc điểm dị tật bẩm sinh khe hở môi - vòm miệng và thể lực của trẻ em tại Bệnh viện Đại học Y Hải Phòng năm 2011", *Y học Thực hành*, **807(2)**, tr.106-109.
- [3] J.L. Paradise, C.D. Bluestone, and H. Felder (1969), "The universality of otitis media in 50 infants with cleft palate", *Pediatrics*, **44(1)**, pp.35-42.
- [4] N.D. Zingade, R.R. Sanji (2009), "The prevalence of otological manifestations in children with cleft palate", *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, **61(3)**, pp.218-222.
- [5] Rudolf Probst, Gerhard Grevers, et al. (2005), *Basic Otorhinolaryngology: A Step-by-step Learning Guide*, 430pp, Thieme.
- [6] Đỗ Thành Chung (1999), *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và kết quả điều trị viêm tai ứ dịch tại Viện Tai Mũi Họng*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [7] Lương Hồng Châu (2003), *Nghiên cứu chức năng thông khí của vòi nhĩ bằng máy đo trở kháng trên bệnh nhân viêm tai giữa*, Luận án tiến sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [8] Nguyễn Tấn Phong (2009), *Phẫu thuật nội soi chức năng tai*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [9] S.Y. Khan, R. Paul, A. Sengupta, P. Roy (2006), "Clinical study of otological manifestations in cases of cleft palate", *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, **58(1)**, pp.35-37.
- [10] H.R. Grant, R.E. Quiney, D.M. Mercer, et al. (1988), "Cleft palate and glue ear", *Arch. Dis. Child.*, **63(2)**, pp.176-179.

# Đánh giá hiệu quả giảm đau bằng phương pháp nhĩ châm ở các huyết tử cung, nội tiết, giao cảm, gan, bụng trên bệnh nhân đau bụng kinh

Ngô Thị Hiếu Hằng\*, Bùi Phạm Minh Mẫn, Trịnh Thị Diệu Thường

Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 18/7/2019; ngày chuyển phản biện 22/7/2019; ngày nhận phản biện 26/8/2019; ngày chấp nhận đăng 5/9/2019

## Tóm tắt:

Thống kinh (đau bụng kinh - ĐBK) là triệu chứng phụ khoa phổ biến nhất ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, làm cho chất lượng cuộc sống trong những ngày hành kinh bị ảnh hưởng đáng kể. Hiện nay, thuốc kháng viêm không steroid (NSAID) là nhóm thuốc hàng đầu trong điều trị ĐBK. Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài NSAID luôn đi kèm nhiều tác dụng phụ và tỷ lệ thất bại cao. Vì vậy, việc sử dụng những trị liệu không dùng thuốc trong điều trị ĐBK ngày càng được chú trọng, trong đó nổi lên vai trò ngày càng lớn của châm cứu. Mặc dù nhĩ châm đã và đang được ứng dụng trong nhiều bệnh lý, nhưng vai trò của liệu pháp này trong điều trị ĐBK vẫn chưa được đánh giá rõ ràng. Nghiên cứu này tiến hành so sánh sự thay đổi của thang điểm VAS (visual analog scale) và thời gian ĐBK trước và sau khi nhĩ châm ở sinh viên nữ bị ĐBK. Tiến hành nhĩ châm 42 sinh viên nữ bị ĐBK trong vòng 4 ngày trong 1 chu kỳ gồm 2 ngày trước và 2 ngày sau khi hành kinh, so sánh sự thay đổi mức độ ĐBK qua thang điểm VAS và tổng thời gian ĐBK trước và sau khi nhĩ châm. Sau 4 ngày can thiệp nhĩ châm cho thấy, điểm VAS trung bình và tổng thời gian ĐBK trung bình trước và sau khi can thiệp nhĩ châm lần lượt là  $6,79 \pm 1,07$ ,  $4,52 \pm 2,37$  (điểm);  $24,55 \pm 17,86$ ,  $13,19 \pm 14,38$  (giờ). Sự giảm của điểm VAS và tổng thời gian ĐBK có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Như vậy, sử dụng phương pháp nhĩ châm trong điều trị ĐBK giúp cải thiện mức độ và thời gian đau bụng ở những sinh viên nữ bị ĐBK.

**Từ khóa:** đau bụng kinh, nhĩ châm, sinh viên nữ, thang điểm VAS.

**Chỉ số phân loại:** 3.2

## **Đặt vấn đề**

ĐBK là triệu chứng phụ khoa phổ biến nhất ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, làm cho chất lượng cuộc sống trong những ngày hành kinh bị ảnh hưởng đáng kể [1, 2]. ĐBK có thể điều trị bằng phương pháp dùng thuốc, hoặc các liệu pháp bổ sung và thay thế thuốc như thư giãn, tập thể dục, chườm ấm, trong đó nhóm thuốc kháng viêm giảm đau NSAID được sử dụng nhiều nhất [3]. Tuy nhiên, nó cũng gây ra nhiều tác dụng phụ và tỷ lệ thất bại cao do có hiện tượng dung nạp thuốc [4]. Các liệu pháp bổ sung và thay thế thuốc lại làm gián đoạn hoạt động hàng ngày.

Chính vì thế, việc tìm kiếm phương pháp điều trị có hiệu quả, ít tác dụng phụ và tiện lợi là rất cần thiết. Việc điều trị giảm đau theo y học cổ truyền ngày nay có nhiều phương pháp không dùng thuốc như châm cứu, dưỡng sinh..., trong đó châm cứu - đặc biệt là nhĩ châm - là một phương pháp được sử dụng từ rất lâu, an toàn và có hiệu quả giảm đau ngay lập tức, giảm lượng thuốc, ít tác dụng phụ hơn phác đồ điều trị đau hiện tại. Phương pháp châm cứu đang được xem xét sử dụng ở ngoại trú, nội trú và cấp cứu để giảm đau nói chung [5]. Các nghiên cứu sử dụng nhĩ châm để điều trị giảm ĐBK được áp dụng cho ĐBK nguyên phát và thứ phát ở

nước ngoài cho thấy hiệu quả đáng kể so với các phương pháp điều trị trước đây. Trong các nghiên cứu của Cha và cs (2016) [6], Yeh và cs (2013) [7] đã sử dụng nhĩ châm ở các huyết: thần môn, thận, gan, bộ phận sinh dục, cạnh trung tâm, nội tiết trên thanh thiếu niên bị ĐBK nguyên phát, can thiệp trong 2 ngày sau khi xuất hiện ĐBK lần đầu, sau can thiệp điều trị có sự thay đổi đáng kể trước và sau về mức độ ĐBK theo thang điểm VAS ( $p < 0,001$ ). Trong nghiên cứu của tác giả Zhu và cs (2011) [8], sử dụng nhĩ châm trên các huyết: nội tiết, giao cảm, bộ phận sinh dục trong, dưới vỏ, trung tâm thùy tai trên bệnh nhân lạc nội mạc tử cung gây ĐBK, can thiệp trong 5 ngày trước khi hành kinh, mỗi ngày 4 lần nhĩ châm, sau điều trị kết quả thu được tỷ lệ hiệu quả tổng ('chữa khỏi', 'hiệu quả đáng kể' hoặc 'hiệu quả') là 91,9% trên các trường hợp ĐBK từ nhẹ đến nặng. Các nghiên cứu trên cho thấy, châm cứu nói chung, nhĩ châm nói riêng mang lại kết quả tốt trên bệnh nhân ĐBK, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào tiến hành phương pháp nhĩ châm trên bệnh nhân ĐBK. Đề tài mong muốn đánh giá hiệu quả giảm đau bằng phương pháp nhĩ châm ở các huyết: tử cung, nội tiết, giao cảm, gan, bụng trên bệnh nhân ĐBK thông qua thang điểm VAS và tổng thời gian ĐBK.

\*Tác giả liên hệ: Email: hieuhangngo992@gmail.com

# Auricular acupuncture on uterus, endocrine, sympathetic, liver, abdominal acupoints for pain relief in patients with dysmenorrhea

Thi Hieu Hang Ngo\*, Pham Minh Man Bui,  
Thi Dieu Thuong Trinh

Faculty of Traditional Medicine,  
University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

Received 18 July 2019; accepted 5 September 2019

## Abstract:

Dysmenorrhea is a common problem among menstruating women. It may cause physical distress, affecting physical activity and quality of life. Nowadays, non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) remains as a core treatment for dysmenorrhea. However, using NSAID for a long period of time involves many concerned side effects and a high failure rate. Therefore, non-drug treatment for dysmenorrhea including auricular acupuncture gains a lot of attention over time. Despite being a favoured therapy for many diseases, the role of auricular acupuncture in treatment of dysmenorrhea has not been yet well investigated. This study was conducted to observe the improvement of period pain with VAS score and dysmenorrhea duration before and after applying auricular acupuncture. In a case series report, the authors applied auricular acupuncture on 42 female students with dysmenorrhea who were recruited and assigned to the experimental group. The experimental group received auricular acupuncture for 4 days (2 days before menstrual period, and 2 days after menstrual period). The improvement of period pain with VAS score and dysmenorrhea duration were observed.

After 4 days of treatment, the average VAS score decreased from  $6.79 \pm 1.07$  to  $4.52 \pm 2.37$ , and the dysmenorrhea duration decreased from  $24.55 \pm 17.86$  hours to  $13.19 \pm 14.38$  hours. These results confirmed the improvement during treatment ( $p < 0.05$ ).

In conclusion, auricular acupuncture could reduce the level and duration dysmenorrhea for menstruating female students.

**Keywords:** auricular acupuncture, dysmenorrhea, female students, VAS score.

**Classification number:** 3.2

## Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### Đối tượng nghiên cứu

Các sinh viên nữ, từ 18 tuổi trở lên ở Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh có ĐBK từ tháng 12/2018 đến tháng 6/2019.

### Tiêu chuẩn chọn bệnh

**Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:** sinh viên nữ bị ĐBK, tuổi từ 18-25, độc thân; VAS từ 4-10 điểm trong thời gian hành kinh với ít nhất 3 chu kỳ trong 6 tháng qua; không có bệnh nội khoa liên quan (tim mạch, thận, rối loạn hô hấp, tiểu đường, hen suyễn, suy giáp/cường giáp) và phụ khoa trước đó; thời gian hành kinh từ 3-8 ngày, chu kỳ 21-35 ngày; không sử dụng thuốc tránh thai đường uống và các phương pháp tránh thai khác, không sử dụng các thuốc làm gián đoạn chu kỳ rụng trứng, giảm đau, ức chế tổng hợp prostaglandin 4 ngày trước khi can thiệp.

**Tiêu chuẩn loại trừ:** đối tượng không đồng ý tham gia nghiên cứu; trạng thái tâm thần kinh không ổn định, căng thẳng tâm lý nghiêm trọng, khiếm khuyết nghe, nhìn, phát âm; hút thuốc lá, dùng đồ uống kích thích như trà, cà phê hoặc rượu thường xuyên; tiền sử ĐBK mạn tính (>14 ngày mỗi tháng); phẫu thuật vùng bụng trong 3 tháng trước; có thai.

### Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: thử nghiệm lâm sàng so sánh trước sau đo lường lặp lại.

Phương pháp can thiệp: nhĩ châm các huyệt: tử cung, nội tiết, giao cảm, gan, bụng (bảng 1).

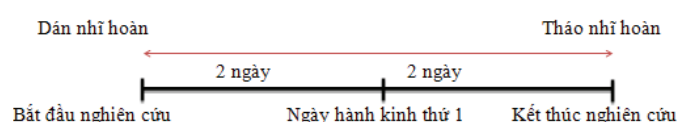
Nhĩ châm bằng kim nhĩ hoàn vào vị trí huyệt 1 bên tai đã được xác định, để cố định 4 ngày trong 1 chu kỳ kinh.

Đối tượng nghiên cứu trực tiếp đánh giá điểm VAS lúc xuất hiện cơn đau đầu tiên 0 phút và tiếp tục theo dõi sau 15 phút, 1, 12, 24 và 48 giờ.

**Bảng 1. Tên và vị trí huyệt nhĩ châm.**

| Huyệt nhĩ châm | Vị trí huyệt                                                                                                                                                    |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tử cung        | 1/3 trước hố tam giác, ngay giữa chỗ lõm phía dưới nếp gấp vành tai                                                                                             |
| Giao cảm       | Chỗ giao nhau giữa phía trên của chân dưới đối vành tai và cạnh trong vành tai; bị nếp vành tai che lấp, muốn nhìn thấy phải kéo nếp gấp vành tai ra phía trước |
| Nội tiết       | Phía trước của tận cùng vết cắt giữa nhĩ bình                                                                                                                   |
| Gan            | Ở phần sau - trên của xoắn tai trên, phía sau các huyệt dạ dày, tá tràng và tụy mật                                                                             |
| Bụng           | Vùng đối vành tai ngang bằng với viền phía dưới của chân dưới đối vành tai                                                                                      |

### Quy trình thực hiện (hình 1)



**Hình 1. Quy trình tiến hành nghiên cứu.**



### Phương tiện nghiên cứu

Nhĩ hoàn: kích thước 0,22x1,3 mm, hiệu Khánh Phong; bông gòn, cồn sát trùng; các bảng câu hỏi phỏng vấn.

### Định nghĩa biến số

#### Biến số nền:

Tuổi: là biến định lượng liên tục, được tính từ năm sinh cho đến thời điểm đối tượng tham gia nghiên cứu, đơn vị năm.

Tuổi bắt đầu hành kinh: biến định lượng, năm bắt đầu hành kinh - năm sinh, đơn vị là năm.

Chu kỳ kinh nguyệt: biến định lượng, được tính từ lúc bắt đầu ra kinh lần này đến lúc bắt đầu ra kinh lần kế, đơn vị là ngày.

Thời gian hành kinh: biến định lượng, được tính bằng ngày cuối cùng hành kinh (ngày hết ra máu âm đạo) - ngày đầu tiên hành kinh (ngày đầu tiên ra máu âm đạo) của cùng 1 chu kỳ, đơn vị là ngày.

Thời gian khởi đầu ĐBK: biến định tính, được tính bằng cách lấy năm khởi đầu ĐBK - năm bắt đầu hành kinh, với 3 giá trị (<1 năm, 1-2 năm, khác).

Thời điểm xuất hiện cơn đau lần đầu trong mỗi chu kỳ hành kinh: biến định tính với 3 giá trị (ngày trước khi hành kinh, 2 ngày đầu tiên, 1 ngày đầu hoặc >2 ngày).

Tiền căn gia đình: biến định tính, người thân là mẹ hoặc chị em gái bị ĐBK, với 2 giá trị (có hoặc không).

Biến số theo dõi: thang điểm VAS: là biến số định lượng, đơn vị là điểm; tổng thời gian đau: biến định lượng xác định bằng cách lấy thời điểm cơn đau kết thúc trừ đi thời điểm bắt đầu xuất hiện cơn đau, đơn vị giờ.

### Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê bằng máy vi tính với sự hỗ trợ của phần mềm STATA 13.0. So sánh giá trị trung bình của hai nhóm độc lập dùng phép kiểm định T (phân phối chuẩn) hoặc phép kiểm định Kruskal Wallis (phân phối không chuẩn). So sánh giữa các tỷ lệ của hai nhóm dùng phép kiểm định chi bình phương ( $\chi^2$ ).

### Đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu đã thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Trường Đại học Y dược Tp Hồ Chí Minh số 437/ĐHYD-HĐ ngày 6/12/2018.

### Kết quả

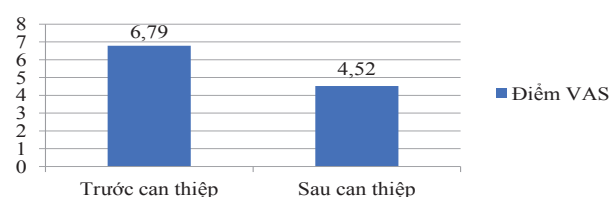
Đặc điểm của các đối tượng nghiên cứu (tuổi, tuổi hành kinh, chu kỳ kinh, ngày hành kinh, số lần ĐBK, năm xuất hiện ĐBK, ảnh hưởng chất lượng cuộc sống, tiền căn gia đình) được thể hiện trong bảng 2.

**Bảng 2. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu.**

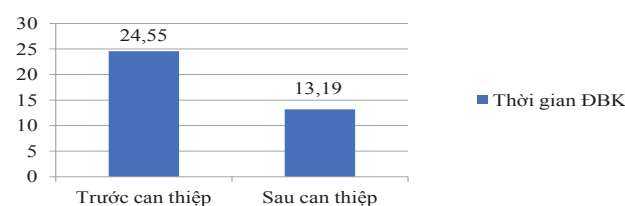
| N=42                                 |                         | Giá trị     |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------|
| Tuổi (năm)                           |                         | 21,60±1,67  |
| Tuổi hành kinh (năm)                 |                         | 13,5±1,52   |
| Chu kỳ kinh (ngày)                   |                         | 29,98±2,7   |
| Ngày hành kinh (ngày)                |                         | 5,19±1,17   |
| Số lần ĐBK trong 6 tháng trước (lần) |                         | 5,45±0,71   |
| Năm xuất hiện ĐBK                    | <1 năm                  | 16 (38%)    |
|                                      | 1-2 năm                 | 13 (31%)    |
|                                      | 3 năm trở lên           | 13 (31%)    |
| Ngày xuất hiện ĐBK                   | Trước hành kinh         | 5 (11,9%)   |
|                                      | 2 ngày đầu hành kinh    | 22 (52,4%)  |
|                                      | 1 ngày đầu hoặc >2 ngày | 15 (35,7%)  |
| Ảnh hưởng chất lượng cuộc sống       | Có                      | 39 (92,86%) |
|                                      | Không                   | 3 (7,14%)   |
| Tiền căn gia đình                    | Có                      | 22 (52,38%) |
|                                      | Không                   | 20 (47,62%) |

**Bảng 3. Điểm VAS và tổng thời gian ĐBK tại thời điểm trước, sau can thiệp nhĩ châm.**

| Đặc điểm        | Trước can thiệp | Sau can thiệp | Cải thiện   | Trị số p |
|-----------------|-----------------|---------------|-------------|----------|
| VAS (điểm)      | 6,79±1,07       | 4,52±2,37     | 2,26±2,45   | <0,001   |
| Thời gian (giờ) | 24,55±17,86     | 13,19±14,38   | 11,35±12,14 | <0,001   |



**Hình 2. Sự thay đổi điểm VAS trước và sau can thiệp nhĩ châm.**



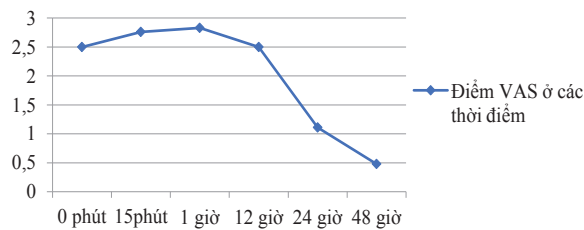
**Hình 3. Sự thay đổi thời gian ĐBK trước và sau can thiệp nhĩ châm.**

Qua bảng 3 và các hình 2, 3 cho thấy, điểm VAS và tổng thời gian ĐBK sau can thiệp nhĩ châm giảm có ý nghĩa thống kê ( $p<0,001$ ).

**Bảng 4. Điểm VAS ở các thời điểm nghiên cứu sau khi can thiệp nhĩ châm.**

| Thời điểm  | Lúc 0 phút | Lúc 15 phút | Lúc 1 giờ  |
|------------|------------|-------------|------------|
| VAS (điểm) | 2,5±2,02   | 2,76±2,14   | 2,83±2,29  |
| Thời điểm  | Lúc 12 giờ | Lúc 24 giờ  | Lúc 48 giờ |
| VAS (điểm) | 2,5±2,58   | 1,11±2      | 0,48±1,33  |





Hình 4. Điểm VAS ở các thời điểm sau can thiệp.

Bảng 5. Cải thiện chất lượng cuộc sống sau nghiên cứu.

| Chất lượng cuộc sống | Có cải thiện | Không cải thiện | Trị số p |
|----------------------|--------------|-----------------|----------|
|                      | 35 (83,3%)   | 7 (16,7%)       | <0,001   |

Bảng 4 và hình 4 cho thấy, điểm VAS ở các thời điểm sau can thiệp có sự giảm rõ rệt. Bảng 5 cho thấy, chất lượng cuộc sống sau can thiệp nhĩ châm cải thiện có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

## Bàn luận

### Điểm VAS

Phương pháp nhĩ châm làm giảm rõ rệt mức độ ĐBK thông qua thang điểm VAS từ  $6,79 \pm 1,07$  còn  $4,52 \pm 2,37$ , cải thiện  $2,26 \pm 2,45$  ( $p < 0,001$ ) và điểm VAS tại các thời điểm 0 phút, 15 phút, 1 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ lần lượt là  $2,5 \pm 2,02$ ;  $2,76 \pm 2,14$ ;  $2,83 \pm 2,29$ ;  $2,5 \pm 2,58$ ;  $1,11 \pm 2$ ;  $0,48 \pm 1,33$  (bảng 4). Kết quả của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trước đó. Nghiên cứu điện châm điều trị ĐBK của Liu và cs (2011) [9] thực hiện trong 3 ngày đầu tiên của chu kỳ cải thiện 1,81 điểm VAS ( $p < 0,001$ ), nghiên cứu tương tự của Liu và cs (2014) [10] ghi nhận điểm VAS tại các thời điểm 0 phút, 5 phút, 10 phút, 30 phút và 60 phút (1 giờ) lần lượt là 5,63; 4,3; 3,74; 2,75; 2,95. Nghiên cứu nhĩ châm sử dụng hạt dán trong 3 ngày hành kinh đầu tiên của Wang và cs (2013) [11] cho biết điểm VAS tại các ngày 1, 2 và 3 lần lượt là 5,74; 4,07 và 2,22. Nghiên cứu sử dụng nhĩ hoàn của Cha và cs (2016) [6] trên học sinh nữ trung học giảm điểm VAS từ  $6,11 \pm 0,43$  còn  $3,01 \pm 2,68$ , cải thiện 3,1 điểm ( $p < 0,001$ ). Điều này cho thấy việc điều trị không dùng thuốc đem lại hiệu quả cao.

Qua những phân tích nêu trên có thể thấy, việc sử dụng nhĩ châm có tác dụng giảm ĐBK. Việc dán nhĩ hoàn lên huyết loa tai trước khi hành kinh đã làm giảm mức độ ĐBK, điều này có thể lý giải do loa tai chịu sự chi phối của hệ thần kinh, giúp tăng khả năng chịu đau bằng cách phóng thích vào dịch não tủy các á phiện nội sinh như enkephalin, dynorphine, endorphin..., các á phiện có tác dụng hiệp đồng với morphine làm tăng tác dụng giảm đau [12].

### Tổng thời gian ĐBK

Thời gian ĐBK trước khi nghiên cứu là  $24,55 \pm 17,86$  giờ, sau khi can thiệp nhĩ châm thì giảm còn  $13,19 \pm 14,38$  giờ, nhĩ châm cải thiện so với trước can thiệp là  $11,35 \pm 12,14$  giờ ( $p < 0,001$ ). So sánh với kết quả của Smith và cs (2011) [13] sử dụng thể châm điều trị ĐBK với thời gian khảo sát là 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng tương ứng là 31,5 giờ, 30,7 giờ và 38,3 giờ. Tương tự, nghiên cứu của Liu và cs (2014) [10] sử dụng phương pháp điện châm huyết tam âm giao, kết quả thu được thời gian ĐBK trung bình ngày 1 sau khi điện

châm ở nhóm can thiệp là 406 phút (6,7 giờ)/ngày so với trước khi điện châm là 492 phút (8,2 giờ)/ngày, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Các nghiên cứu dùng nhĩ châm xem xét kết quả giảm thời gian ĐBK chưa được ghi nhận. Các phân tích nêu trên cho thấy hiệu quả của nhĩ châm giúp làm giảm tổng thời gian ĐBK.

Ưu điểm của việc sử dụng kim nhĩ hoàn là tác dụng vào huyết ở loa tai kéo dài liên tục trên huyết được dán. Chính vì vậy, sau khi nhĩ châm thì thời gian ĐBK trung bình ở nhóm can thiệp được giảm đáng kể so với tiền sử đau trước đây.

## Kết luận

Sử dụng phương pháp nhĩ châm điều trị ĐBK có hiệu quả, cải thiện có ý nghĩa thống kê về giảm mức độ ĐBK thông qua thang điểm VAS và giảm số giờ đau bụng trong mỗi lần hành kinh, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống. Khuyến cáo nên thực hiện phương pháp này trong điều trị ĐBK lâm sàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Burnett and M. Lemyre (2017), "No. 345-primary dysmenorrhea consensus guideline", *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, **39**(7), pp.585-595.
- [2] C.L. Wong (2018), "Health-related quality of life among Chinese adolescent girls with dysmenorrhoea", *Reprod. Health*, **15**, Doi: 10.1186/s12978-018-0540-5.
- [3] Z. Harel (2012), "Dysmenorrhea in adolescents and young adults: an update on pharmacological treatments and management strategies", *Expert Opin. Pharmacother.*, **13**(15), pp.2157-2170.
- [4] M. Valiani, E. Babaei, R. Heshmat, et al. (2010), "Comparing the effects of reflexology methods and Ibuprofen administration on dysmenorrhea in female students of Isfahan University of Medical Sciences", *Iran J. Nurs. Midwifery Res.*, **15**, Suppl.1, pp.371-378.
- [5] M. Murakami, L. Fox, and M.P. Dijkers (2017), "Ear acupuncture for immediate pain relief - a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *Pain Med.*, **18**(3), pp.551-564.
- [6] N.H. Cha and S.R. Sok (2016), "Effects of auricular acupressure therapy on primary dysmenorrhea for female high school students in South Korea", *J. Nurs. Scholarsh.*, **48**(5), pp.508-516.
- [7] M.L. Yeh, Y.L. Hung, H.H. Chen, et al. (2013), "Auricular acupressure for pain relief in adolescents with dysmenorrhea: a placebo-controlled study", *J. Altern. Complement. Med.*, **19**(4), pp.313-318.
- [8] X. Zhu, K.D. Hamilton, and E.D. McNicol (2011), "Acupuncture for pain in endometriosis", *Cochrane Database Syst. Rev.*, **9**, Doi: 10.1002/14651858.CD007864.pub2.
- [9] C.Z. Liu, J.P. Xie, L.P. Wang, et al. (2011), "Immediate analgesia effect of single point acupuncture in primary dysmenorrhea: a randomized controlled trial", *Pain Med.*, **12**(2), pp.300-307.
- [10] C.Z. Liu, J.P. Xie, L.P. Wang, et al. (2014), "A randomized controlled trial of single point acupuncture in primary dysmenorrhea", *Pain Med.*, **15**(6), pp.910-920.
- [11] Y.J. Wang, C.C. Hsu, M.L. Yeh, et al. (2013), "Auricular acupressure to improve menstrual pain and menstrual distress and heart rate variability for primary dysmenorrhea in youth with stress", *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, Doi: 10.1155/2013/138537.
- [12] A. Santoro, S.L. Nori, L. Lorusso, et al. (2015), "Auricular acupressure can modulate pain threshold", *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2015**, Doi: 10.1155/2015/457390.
- [13] C.A. Smith, C.A. Crowther, O. Petrucco, et al. (2011), "Acupuncture to treat primary dysmenorrhea in women: a randomized controlled trial", *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**, Doi: 10.1093/ecam/nep239.

# Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu nước bọt bằng phương pháp PCR

Triệu Tiến Sang<sup>1\*</sup>, Trần Văn Khoa<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Tùng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Hoàng Hiệp<sup>1</sup>, Nguyễn Thu Huyền<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Trang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Học viện Quân y

<sup>2</sup>Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup>Bộ môn Y sinh học và Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 10/5/2019; ngày chuyển phản biện 14/5/2019; ngày nhận phản biện 17/6/2019; ngày chấp nhận đăng 2/7/2019

## **Tóm tắt:**

*Helicobacter pylori* (Hp) là một vi khuẩn tồn tại phổ biến trong niêm mạc dạ dày người. Hơn 50% dân số thế giới có vi khuẩn Hp trong đường tiêu hóa; 10-20% trong số đó có nguy cơ nhiễm trùng dạ dày và 1-2% có nguy cơ mắc ung thư dạ dày. Hiện nay có nhiều phương pháp chẩn đoán Hp, trong đó CLOtest trên mảnh sinh thiết dạ dày là phương pháp lâm sàng được sử dụng thường xuyên với độ chính xác cao, nhưng đòi hỏi phải có quá trình xâm lấn nội mô. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã xây dựng thành công quy trình chẩn đoán vi khuẩn Hp trong mẫu nước bọt bằng phương pháp PCR thông qua việc xác định hai gen đặc hiệu *ureC* và *hsp60* của vi khuẩn Hp. Thử nghiệm quy trình trên 67 mẫu nước bọt cho thấy, phương pháp này cho kết quả tương đồng với phương pháp PCR trên mẫu mô sinh thiết dạ dày và phương pháp lâm sàng CLOtest.

**Từ khóa:** *Helicobacter pylori*, không xâm lấn, nước bọt, PCR.

**Chỉ số phân loại:** 3.2

## **Đặt vấn đề**

Vi khuẩn Hp là một loại khuẩn dạng xoắn ốc tồn tại phổ biến trong đường tiêu hóa của hơn 50% dân số thế giới [1]. Khoảng 10-20% số người nhiễm Hp có nguy cơ bị nhiễm trùng dạ dày và 1-2% có nguy cơ mắc ung thư dạ dày [2]. Tại Hội nghị khoa học quốc tế chuyên ngành Tiêu hóa - Gan do Bệnh viện Bạch Mai tổ chức, một nghiên cứu đã công bố tỷ lệ nhiễm Hp ở Việt Nam có thể lên đến 70% - cao hơn nhiều so với các nước như Mỹ và Canada (khoảng 30%), Việt Nam hiện cũng đang đứng thứ 18 trong số 20 nước có tỷ lệ ung thư dạ dày cao nhất thế giới.

Hiện nay có nhiều phương pháp chẩn đoán vi khuẩn Hp trong dạ dày, bao gồm cả phương pháp xâm lấn và không xâm lấn. Tuy nhiên các phương pháp này đều có các nhược điểm như chỉ khẳng định được có vi khuẩn tiết Urease (nội soi, CLOtest, test Carbon đường thở), chỉ xác định được hình thái (mô bệnh học, tế bào học), đòi hỏi kỹ thuật cao (nuôi cấy), phải có một lượng vi khuẩn nhất định (CLOtest), độ nhạy và độ đặc hiệu thấp (xét nghiệm phân hoặc nước tiểu), không phân biệt được thời điểm xâm nhiễm (xét nghiệm huyết thanh). Phương pháp PCR trên mẫu sinh thiết mô có ưu điểm là chính xác, trực tiếp, khẳng định được sự có mặt của vi khuẩn Hp nên được sử dụng như một tiêu

chuẩn vàng để chẩn đoán vi khuẩn Hp [3]. Phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao (90-100%) [4, 5], nhưng có nhược điểm là phải yêu cầu xâm lấn.

Thực tế, vi khuẩn Hp có thể xuất hiện trong nước bọt của những người mang vi khuẩn Hp trong dạ dày với tỷ lệ khá cao [6], điều này đã gợi ý về việc có thể phát triển một xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn Hp sử dụng mẫu bệnh phẩm là nước bọt bằng phương pháp PCR không xâm lấn với độ chính xác cao. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn Hp trong dạ dày bằng phương pháp PCR thông qua việc xác định sự có mặt của vi khuẩn Hp trong mẫu nước bọt.

Gen *ureC* của Hp mã hóa cho phosphoglucosamine mutase - *glmM*, được coi như một gen “quản gia.2” góp phần cho sự sinh trưởng và phát triển của thành tế bào vi khuẩn. Gen *ureC* là gen bảo thủ ở hầu hết các chủng Hp, cung cấp cơ sở chính xác để nhận dạng nhiều chủng Hp khác nhau [7]. Gen *hsp60* mã hóa cho protein HSP60 - phân tử chaperone được Hp sản xuất nhiều nhất và đóng vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm và gây bệnh của vi khuẩn này, *hsp60* đã được chọn để phát hiện vi khuẩn Hp trong các mẫu bệnh phẩm vì nó là gen có độ bảo thủ cao, hiện diện trong tất cả các sinh vật [8] nhưng cũng đủ biến đổi để có các motif đặc hiệu cho loài. Chính vì vậy, nghiên cứu đã

\*Tác giả liên hệ: Email: triesang83@yahoo.com.vn

# The development of PCR assay for diagnosis of *Helicobacter pylori* in saliva samples

Tien Sang Trieu<sup>1\*</sup>, Van Khoa Tran<sup>1</sup>,  
Thanh Tung Nguyen<sup>1</sup>, Hoang Hiep Nguyen<sup>1</sup>  
Thu Huyen Nguyen<sup>2</sup>, Thi Trang Nguyen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Military Medical University

<sup>2</sup>Faculty of Biology, University of Natural Sciences,  
Vietnam National University, Ha Noi

<sup>3</sup>Department of Medical Biology and Genetic,  
Ha Noi Medical University

Received 10 May 2019; accepted 2 July 2019

## Abstract:

*Helicobacter pylori* (Hp) is a common bacterium in human gastric mucosa. More than 50% of the world's population has Hp bacteria in the gastrointestinal tract; 10-20% of them is at risk of stomach infections; and 1-2% is at risk of stomach cancer. Currently, there are many methods of Hp diagnosis, in which CLOtest on gastric biopsy tissue samples is a frequently-used clinical method with high accuracy, but it requires a process of intracellular invasion. In this study, we have successfully developed a process to diagnose Hp in saliva samples using PCR method through identifying two specific genes *ureC* and *hsp60* of Hp. After designing primer pairs for two genes and optimising PCR reactions, we conducted a test on 67 saliva samples, and the results showed that this process gave similar results with PCR method on the gastric biopsy tissue samples and the clinical method CLOtest.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, non-invasive, PCR, saliva.

**Classification number:** 3.2

sử dụng hai gen *ureC* và *hsp60* để xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn Hp trong mẫu nước bọt bằng PCR. Quy trình tối ưu được thử nghiệm trên 67 mẫu bệnh phẩm và được so sánh với phương pháp xét nghiệm PCR trên mẫu sinh thiết và phương pháp CLOtest.

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

9 mẫu chứng dương đã được xác định dương tính với vi khuẩn Hp.

Mẫu nước bọt cùng với mẫu mô dạ dày được lấy từ 67 bệnh nhân tại phòng khám thực hiện nội soi dạ dày tá tràng

của Bệnh viện Quân y 103.

Các mẫu bệnh phẩm được bảo quản ở -4°C. Thông tin về bệnh nhân và kết quả xét nghiệm được lưu lại trong bệnh án nghiên cứu.

## Phương pháp

**Tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR:** đầu tiên phản ứng PCR với mẫu bệnh phẩm Hp dương tính được lần lượt tối ưu với hai cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho vùng gen *ureC* (F1/R1) và *hsp60* (F2/R2). Trình tự của hai cặp mồi và kích thước của đoạn ADN nhân lên được thể hiện ở bảng 1. Phản ứng PCR được tiến hành với dải nhiệt độ từ 52 đến 60°C, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% để phân tích kết quả. Nhiệt độ nào cho ra băng sản phẩm rõ ràng, chính xác và ổn định nhất sẽ được lựa chọn làm nhiệt độ gắn mồi. Sau khi lựa chọn được nhiệt độ gắn mồi thích hợp cho phản ứng PCR đơn mồi, tiến hành phản ứng multiplex PCR với cùng nhiệt độ nhằm kiểm tra khả năng sử dụng phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời cả hai gen.

**Bảng 1.** Trình tự mồi, kích thước của đoạn ADN được nhân lên.

|              | Tên mồi | Trình tự                    | T <sub>m</sub> (°C) | Kích thước đoạn ADN được nhân bản |
|--------------|---------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>ureC</i>  | F1      | 5'AAGCTTTTAGGGG3'           | 58,6                | 294 bp                            |
|              | R1      | 5'AAGCTTACTTTCTAACACTAACG3' | 53,3                |                                   |
| <i>hsp60</i> | F2      | 5'TTGATAGAGGCTACCTCTCC3'    | 52,7                | 501 bp                            |
|              | R2      | 5'TGTCATAATCGCTTGTCTGTC3'   | 55,7                |                                   |
| <i>Nsea</i>  | N-a     | 5'AGGACCTTGGATGGCGTTGG3'    |                     | 851 bp                            |
|              | F-a     | 5'TTCGACGGAAGCTCGGTCGTC3'   |                     |                                   |

**Thử nghiệm quy trình chẩn đoán vi khuẩn Hp trong nước bọt multiplex PCR:**

Tách chiết ADN tổng số từ mẫu nước bọt: ADN được tách chiết sử dụng bộ kit G-spin™ Total Extraction của iNtRON Biotechnology: 400 µl nước bọt được cho vào ống ly tâm 1,5 ml; thêm 400 µl CL Buffer, 20 µl Proteinase K, 5 µl RNase, trộn đều, ủ ở 56°C trong thời gian 30 phút; thêm 400 µl Buffer BL, trộn đều, ủ ở 70°C trong vòng 5 phút; thêm 400 µl EtOH 100%, trộn đều; chuyển 800 µl dung dịch từ ống ly tâm 1,5 ml vào cột lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, đổ dịch; chuyển hết toàn bộ dung dịch còn lại trong ống vào cột lọc và lặp lại bước trước đó; thêm 700 µl Buffer WA vào cột lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, đổ dịch; thêm 700 µl Buffer WB vào cột lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, đổ dịch; ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C làm khô màng lọc, chuyển cột lọc sang một ống ly tâm 1,5 ml mới; thêm 85 µl nước khử ion đã được ủ ở 56°C vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng tối thiểu 5 phút, ly tâm 13000 vòng/phút



trong 1 phút ở 25°C, thu ADN ở ống ly tâm 1,5 ml. ADN được đo nồng độ và giá trị A260/A280 để kiểm tra chất lượng bằng máy Nanodrop.

Thực hiện phản ứng multiplex PCR: phản ứng PCR được tiến hành với hai cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho vùng gen *ureC* (F1/R1) và *hsp60* (F2/R2) và cặp mồi của gen nội chuẩn *Nsea* (N- $\alpha$ /F- $\alpha$ ) có trình tự như bảng 1. Tổng thể tích phản ứng là 25  $\mu$ l, bao gồm 12,5  $\mu$ l Master mix 2X, 0,5  $\mu$ l mỗi mồi. Chu trình nhiệt được thể hiện ở phần kết quả của quá trình tối ưu phản ứng multiplex PCR.

Đọc kết quả: sản phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose 2% và được chụp bằng máy để xác định kết quả.

*Xét nghiệm Hp bằng phương pháp PCR trên mẫu mô sinh thiết dạ dày:*

Tách chiết ADN tổng số từ mẫu mô sinh thiết dạ dày: ADN được tách chiết từ mẫu mô có khối lượng không quá 25 mg, bổ sung 180  $\mu$ l dung dịch ATL, 20  $\mu$ l proteinase K vào ống ly tâm 1,5 ml, trộn đều. Ủ ở 56°C từ 1 đến 3h. Bổ sung 200  $\mu$ l EtOH 100%, trộn đều trong 15 phút, ủ ở 70°C trong 10 phút. Chuyển toàn bộ dung dịch vào cột lọc, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, bỏ dịch. Thêm 500  $\mu$ l Buffer AW1 vào cột lọc, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, bỏ dịch. Thêm 500  $\mu$ l Buffer AW2 vào cột lọc, ly tâm 14000 vòng/phút trong 3 phút ở 25°C, bỏ dịch. Ly tâm 14000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C làm khô màng lọc. Thêm 200  $\mu$ l nước khử ion đã được ủ ở 56°C vào cột lọc, ủ trong nhiệt độ phòng tối thiểu 5 phút, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút ở 25°C, thu ADN. ADN sau khi thu sẽ được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng máy Nanodrop.

Thực hiện phản ứng multiplex PCR: phản ứng multiplex PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi và thành phần phản ứng giống với phản ứng trên mẫu nước bọt. Chu trình nhiệt của phản ứng: 95°C - 5 phút; 40 chu kỳ của các nhiệt độ 94°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 30 giây; 72°C - 10 phút; 4°C -  $\infty$ .

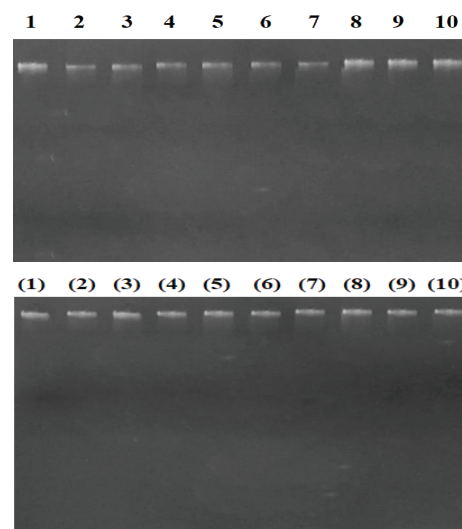
Đọc kết quả: sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% và được chụp bằng máy để xác định kết quả.

*Xét nghiệm Hp bằng phương pháp CLOtest:* quy trình thực hiện xét nghiệm bằng phương pháp CLOtest được thực hiện theo đúng tiêu chuẩn tại phòng khám thực hiện nội soi dạ dày tá tràng, Bệnh viện Quân y 103.

## Kết quả và thảo luận

### Tách chiết ADN tổng số từ mẫu nước bọt

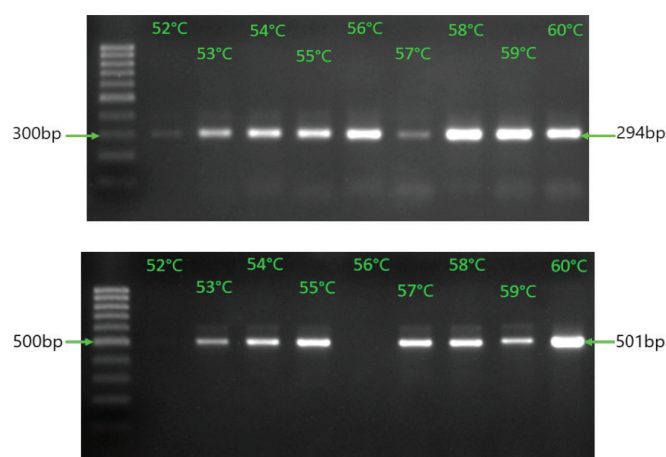
ADN tổng số sau khi được tách chiết và tiến hành đo quang phổ sẽ được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết quả được thể hiện ở hình 1.



**Hình 1. Ảnh điện di ADN tổng số của một số mẫu nghiên cứu.**  
1, 2, 3...: ADN tách từ mẫu nước bọt; (1), (2), (3)...: ADN tách từ mẫu mô dạ dày.

Các mẫu ADN được tách chiết từ nước bọt có độ tinh sạch đảm bảo, một số mẫu có nồng độ quá cao sẽ được pha loãng xuống nồng độ phù hợp cho phản ứng PCR.

### Kết quả tối ưu phản ứng multiplex PCR



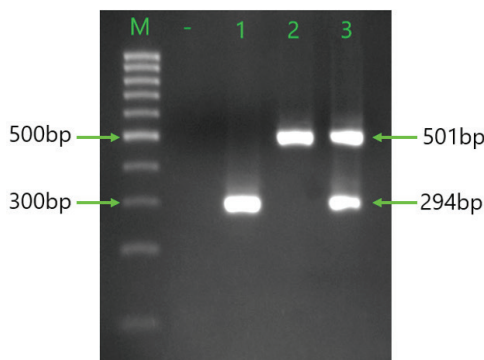
**Hình 2. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi của phản ứng PCR nhân bản gen *ureC* (trên) và *hsp60* (dưới) của vi khuẩn Hp.**

Phân tích kết quả điện di sản phẩm sPCR trên gel agarose 2% (hình 2) cho thấy, các băng sản phẩm được khuếch đại của gen *ureC* và *hsp60* tại dải nhiệt độ từ 52 đến 60°C có kích thước phù hợp với tính toán khi thiết kế mồi: gen *ureC* có vị trí băng nằm dưới vạch 300 bp của thang chuẩn, vào khoảng phù hợp với dự kiến (294 bp); gen *hsp60* có vị trí băng nằm trên vạch 500 bp của thang chuẩn, vào khoảng phù hợp với dự kiến (501 bp). Kết quả điện di thu được tại nhiệt độ gắn mồi 60°C cho băng sáng rõ nhất, không có sản phẩm phụ với cả hai gen. Do đó, 60°C được lựa chọn làm nhiệt độ gắn mồi để tiến hành phản ứng multiplex PCR.



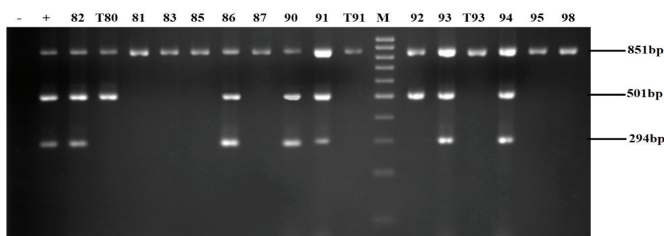
Từ hình ảnh điện di trên gel agarose 2% (hình 3) nhận thấy, khi tiến hành phản ứng multiplex PCR tại nhiệt độ gần mỗi 60°C cho hai băng sản phẩm khuếch đại của hai gen *ureC* và *hsp60* sáng, rõ nét, băng nằm tại vị trí có kích thước so với thang chuẩn phù hợp với tính toán khi thiết kế mỗi. Các băng sản phẩm khuếch đại của phản ứng multiplex PCR cho thấy sự ổn định khi so sánh với các băng sản phẩm khuếch đại của phản ứng sPCR, và không thấy xảy ra hiện tượng bắt cặp chéo giữa các cặp mỗi. Sản phẩm không có băng phụ, chứng tỏ chu trình nhiệt và nồng độ thành phần tham gia phản ứng là thích hợp. Trong quá trình tiến hành thí nghiệm với các nồng độ ADN khác nhau, chúng tôi nhận thấy nồng độ ADN thích hợp để thực hiện phản ứng multiplex PCR trên mẫu nước bọt là 5-20 ng/μl.

Chu trình nhiệt của phản ứng multiplex PCR sau khi tối ưu là: 95°C - 5 phút; 40 chu kỳ của 94°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 30 giây; 72°C - 10 phút; 4°C - ∞.



**Hình 3. Nhân bản đồng thời cả hai gen *ureC* và *hsp60* đặc hiệu của vi khuẩn Hp bằng PCR.** M: thang chuẩn ADN 100 bp; (-): đối chứng âm - nước khử ion; 1: sản phẩm PCR nhân bản gen *ureC*; 2: sản phẩm PCR nhân bản gen *hsp60*; 3: sản phẩm PCR nhân bản đồng thời cả hai gen *ureC* và *hsp60*.

#### Kết quả thử nghiệm quy trình chẩn đoán Hp trên mẫu nước bọt



**Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại sau khi áp dụng quy trình lên mẫu bệnh phẩm nước bọt.** M: thang chuẩn ADN 100 bp; (-): đối chứng âm - nước khử ion; (+): đối chứng dương; T80, 81, 82...: mẫu bệnh phẩm xét nghiệm.

Kết quả điện di của các sản phẩm khuếch đại khi áp dụng phản ứng multiplex PCR đã được xây dựng trên các mẫu bệnh phẩm nước bọt (hình 4) cho thấy, tất cả các mẫu ADN

đều lên băng sản phẩm khuếch đại của gen nội chuẩn *Nsea* có vị trí băng nằm giữa vạch 800 và 900 bp của thang chuẩn, cho kích thước phù hợp với dự kiến (851 bp), chứng tỏ tất cả các mẫu đều đã tách chiết thành công ADN. Các băng sản phẩm của hai gen đặc hiệu cũng có vị trí phù hợp với kích thước tính toán khi thiết kế mỗi: *ureC* (294 bp) và *hsp60* (501 bp).

Các mẫu ADN vi khuẩn có chứa đoạn gen *ureC* đã khuếch đại được nhận định là dương tính với vi khuẩn Hp. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, kết quả về độ nhạy khi sử dụng phương pháp PCR với cặp mỗi đặc hiệu của gen *ureC* để xác định vi khuẩn Hp là tương đồng nhau giữa các phòng thí nghiệm [4, 7, 9, 10]. Tương tự, các mẫu ADN vi khuẩn có chứa đoạn gen *hsp60* đã khuếch đại được nhận định là dương tính với vi khuẩn Hp. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu được thực hiện trước đó, chẩn đoán sử dụng phương pháp Nested PCR với gen *hsp60* được nhận định có độ đặc hiệu cao nhất [3].

Một số mẫu dương tính đồng thời cả hai gen *ureC* và *hsp60* cũng được nhận định là dương tính với vi khuẩn Hp. Những mẫu âm tính đồng thời với cả hai gen sẽ được nhận định là âm tính với vi khuẩn Hp.

#### So sánh, đối chiếu giữa các phương pháp

**Bảng 2. So sánh kết quả giữa hai phương pháp PCR trên mẫu nước bọt và mô dạ dày.**

|                               |                        | <i>ureC</i> | <i>hsp60</i> | <i>ureC</i> và <i>hsp60</i> |
|-------------------------------|------------------------|-------------|--------------|-----------------------------|
| Số mẫu dương tính với Hp      | PCR trên mẫu nước bọt  | 38          | 41           | 42                          |
|                               | PCR trên mẫu mô dạ dày | 45          | 43           | 46                          |
| Tổng số mẫu dương tính với Hp |                        | 42          | 42           | 42                          |

Từ bảng so sánh giữa phương pháp PCR trên mẫu nước bọt và mô dạ dày (bảng 2) cho thấy, tỷ lệ xác định được vi khuẩn Hp dương tính giữa hai phương pháp với gen *ureC* là 84% (38/45 mẫu), gen *hsp60* là 95% (41/43 mẫu) và khi áp dụng phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời cả hai gen tỷ lệ này đạt được 91% (42/46 mẫu).

**Bảng 3. So sánh kết quả giữa ba phương pháp PCR trên mẫu nước bọt, mô dạ dày và CLOtest.**

| Các phương pháp        | Dương tính | Âm tính | Tổng số mẫu |
|------------------------|------------|---------|-------------|
| PCR trên mẫu nước bọt  | 42         | 25      | 67          |
| PCR trên mẫu mô dạ dày | 46         | 21      | 67          |
| CLOtest                | 39         | 28      | 67          |

Khi so sánh kết quả phương pháp PCR trên mẫu nước bọt với hai phương pháp xâm lấn có độ chính xác cao hiện nay là phương pháp “tiêu chuẩn vàng” - PCR trên mẫu mô dạ dày và CLOtest (bảng 3) cho thấy, PCR trên mẫu nước bọt có kết quả tương đồng cao với phương pháp PCR trên mẫu mô dạ dày và CLOtest. Các mẫu dương tính Hp khi sử

dùng phương pháp CLOtest đều cho kết quả dương tính khi sử dụng phương pháp PCR trên mẫu nước bọt và mẫu mô dạ dày. Các mẫu âm tính Hp khi sử dụng hai phương pháp PCR trên mẫu nước bọt và PCR trên mẫu mô dạ dày đồng thời cũng cho kết quả âm tính khi sử dụng phương pháp CLOtest.

Mặc dù hai gen *ureC* và *hsp60* đều là các gen bảo thủ của vi khuẩn Hp, tỷ lệ phát hiện vi khuẩn sử dụng các gen này khác nhau phụ thuộc vào từng loại mẫu bệnh phẩm. Với các mẫu sinh thiết dạ dày, tỷ lệ phát hiện Hp sử dụng gen *ureC* và *hsp60* đều đạt tới 100%. Tuy nhiên, dù không có sự khác biệt nào được tìm thấy giữa trình tự các gen này ở nước bọt và mô sinh thiết dạ dày, tỷ lệ phát hiện Hp trên mẫu bệnh phẩm nước bọt sử dụng hai gen này vẫn chưa đạt 100% [11, 12].

### Kết luận

Nghiên cứu đã tách chiết thành công ADN vi khuẩn từ mẫu nước bọt và mẫu mô dạ dày. Tối ưu thành công phản ứng sPCR khuếch đại hai gen đặc hiệu (*UreC* và *Hsp60*) của vi khuẩn Hp với nhiệt độ gần mỗi đều là 60°C. Phản ứng multiplex PCR khuếch đại đồng thời hai gen đặc hiệu với chu trình nhiệt 95°C - 5 phút; 40 chu kỳ của 94°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 30 giây; 72°C - 10 phút; 4°C - ∞ và nồng độ ADN sử dụng nằm trong khoảng 5-20 ng/μl. Bước đầu khảo sát khả năng áp dụng quy trình bằng việc tiến hành so sánh với hai phương pháp xâm lấn là PCR trên mẫu mô dạ dày và CLOtest: ứng dụng trên 67 mẫu bệnh phẩm nước bọt cho kết quả 42 mẫu dương tính và 25 mẫu âm tính, có sự tương đồng cao với phương pháp PCR trên mẫu mô dạ dày (46 mẫu dương tính, 21 mẫu âm tính) và CLOtest (39 mẫu dương tính và 28 mẫu âm tính).

Cần tiếp tục mở rộng quy mô thí nghiệm nhằm đánh giá độ tin cậy của quy trình với một cỡ mẫu lớn có ý nghĩa thống kê cao; tiếp tục nghiên cứu nhằm xác định chính xác độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Amieva, et al. (2016), "Pathobiology of *Helicobacter pylori* induced gastric cancer", *Gastroenterology*, **150**(1), pp.64-78.
- [2] Jose A. Mendoza, Kevin K. Weinberger, Matthew J. Swan (2017), "The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori* displays chaperone activity under acidic conditions", *Biochemistry and Biophysics Reports*, **9**, pp.95-99.
- [3] Jang Jih Lu, et al. (1999), "Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues", *J. Clin. Microbiol.*, **37**, pp.772-774.
- [4] C.L. Clayton, et al. (1992), "Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction", *J. Clin. Microbiol.*, **30**, pp.192-200.
- [5] C.Y. Hachem, et al. (1995), "Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*", *J. Clin. Pathol.*, **48**, pp.714-716.
- [6] C. Li, et al. (1995), "High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay", *J. Clin. Pathol.*, **48**, pp.662-666.
- [7] R.K. El Dairouty, et al. (2016), "*Helicobacter pylori* and its Interrelations with other Foodborne Pathogenic Bacteria in Egyptian Meat and some Meat Products", *Curr. Sci. Int.*, **5**(2), pp.139-146.
- [8] S. Karlin (2001), "Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes", *Trends in Microbiology*, **9**(7), pp.335-343.
- [9] M.G.C. Espinoza, et al. (2011), "Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR", *Journal of Clinical Microbiology*, **49**(4), pp.1650-1652.
- [10] C. Habich, V. Burkart (2007), "Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells", *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**(6), pp.742-751.
- [11] A.N. Al Thwai, S.F. Ali (2013), "Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and biopsy specimens of some Iraqi patients using PCR technique", *International Journal of Advanced Biological Research*, **3**(4), pp.593-598.
- [12] S. Mishra, et al. (2008), "Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects - a nested PCR based study", *Infection, Genetics and Evolution*, **8**(6), pp.815-819.

# Xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh

Hồ Hữu Thọ<sup>1,2\*</sup>, Lê Thị Thúy<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Ứng<sup>1</sup>, Hồ Anh Sơn<sup>1</sup>, Hoàng Văn Lương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Văn Chuyên<sup>3</sup>, Nguyễn Văn Ba<sup>2</sup>, Nguyễn Trọng Chính<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

<sup>2</sup>Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

<sup>3</sup>Khoa Vệ sinh quân đội, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 19/7/2019; ngày chuyển phản biện 22/7/2019; ngày nhận phản biện 19/8/2019; ngày chấp nhận đăng 28/8/2019

## Tóm tắt:

Leptospirosis, hay vàng da do xoắn khuẩn là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất trên thế giới với tác nhân gây bệnh là các loài *Leptospira* spp. gây bệnh thuộc chi *Letospira*. Ở Việt Nam, leptospirosis được xem là bệnh đặc hữu và có nguy cơ bùng phát thành dịch cao nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Ứng dụng kỹ thuật PCR là một hướng đi triển vọng trong phát hiện *Leptospira* spp. giai đoạn sớm của bệnh. Tuy nhiên, kỹ thuật này quá phức tạp và đòi hỏi khắt khe trong quá trình vận hành máy luân nhiệt, nên đã được thay thế bởi các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã xây dựng thành công quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện chính xác một số loài *Leptospira* spp. gây bệnh chỉ với thời gian 30 phút. Quy trình RPA được xây dựng có ngưỡng phát hiện, độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường.

**Từ khóa:** độ đặc hiệu, độ nhạy, khuếch đại đẳng nhiệt, *Leptospira* spp., Việt Nam.

**Chỉ số phân loại:** 3.5

## Mở đầu

Leptospirosis, hay bệnh vàng da do xoắn khuẩn là bệnh truyền nhiễm phổ biến trên thế giới với tác nhân gây bệnh là các loài *Leptospira* spp. gây bệnh thuộc chi *Letospira* [1, 2]. Ở Việt Nam, leptospirosis được xem là bệnh đặc hữu và có nguy cơ bùng phát thành dịch nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời [3]. Vì biểu hiện lâm sàng của bệnh giống với nhiều bệnh nhiễm trùng khác như rickettsia, dengue và các loại sốt xuất huyết do virus khác [4], nên trong vùng dịch tễ của bệnh leptospirosis thường không được đánh giá đúng mức. Do khó khăn trong chẩn đoán bệnh leptospirosis nên việc giám sát bệnh một cách thỏa đáng vẫn chưa được thực hiện. Các công cụ để chẩn đoán sớm góp phần đưa ra cảnh báo dịch sớm là hết sức cấp thiết.

Các phương pháp phát hiện *Leptospira* spp. hiện nay gồm nuôi cấy, huyết thanh học và các phương pháp sinh học phân tử [5]. Cấy máu ở giai đoạn sớm của bệnh có thể được áp dụng cung cấp bằng chứng về việc bị nhiễm *Leptospira* spp. [2], tuy nhiên kết quả này lại không có giá trị phục vụ điều trị cho từng bệnh nhân vì thời gian để nuôi

cấy thường mất hàng tuần đến hàng tháng [6]. Các phương pháp huyết thanh học thường được sử dụng trong chẩn đoán leptospirosis còn nhiều hạn chế, như quy trình thực hiện phức tạp và tốn nhiều công sức; thời gian xác định ca bệnh muộn do các kháng thể chỉ có thể được phát hiện trong giai đoạn muộn của bệnh, dẫn đến điều trị kháng sinh kém hiệu quả [7]. Ngược lại, hầu hết các phương pháp phát hiện sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử có thể được áp dụng trong giai đoạn sớm của bệnh [8]. Hiện nay, các quy trình realtime PCR đã xây dựng có thể phát hiện *Leptospira* spp. trong giai đoạn cấp tính sớm của bệnh với độ nhạy, độ đặc hiệu rất cao [1, 9]. Tuy nhiên, kỹ thuật này quá phức tạp và đòi hỏi khắt khe trong quá trình vận hành máy luân nhiệt, nên đã được thay thế bởi các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt.

Khuếch đại DNA đẳng nhiệt là một phương pháp thay thế cho kỹ thuật PCR và được phát triển để phục vụ chẩn đoán tại chỗ [10, 11]. Vì là đẳng nhiệt, các phản ứng khuếch đại được thực hiện ở nhiệt độ không đổi và do đó không cần đến máy luân nhiệt đắt tiền. Các kỹ thuật khuếch đại DNA đẳng nhiệt rất đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả về

\*Tác giả liên hệ: Email: daibi0109@gmail.com

# Development of isothermal Recombinase polymerase amplification (RPA) process for detection of *Leptospira* spp. causing diseases

Huu Tho Ho<sup>1,2\*</sup>, Thi Thuy Le<sup>1</sup>, Dinh Ung Nguyen<sup>1</sup>, Anh Son Ho<sup>1</sup>, Van Luong Hoang<sup>1</sup>, Van Chuyen Nguyen<sup>3</sup>, Van Ba Nguyen<sup>2</sup>, Trong Chinh Nguyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Military Medical Research Institute, Military Academy

<sup>2</sup>Military Medical Hospital 103, Military Academy

<sup>3</sup>Department of Military Hygiene, Military Academy

Received 19 July 2019; accepted 28 August 2019

## Abstract:

**Leptospirosis is one of the common infectious diseases in the world with the pathogen as *Leptospira* spp. belonging to *Leptospira*. In Vietnam, leptospirosis is considered an endemic disease, and there is a high risk of outbreaks if not diagnosed and treated promptly. Application of realtime PCR technique is promoting technique in the detection of *Leptospira* spp. at the early stages of the disease. However, this technique is too complex and demanding in the operation of the thermal cycler, so it is increasingly replaced by isothermal amplification methods. In this study, the team successfully developed an isothermal amplification process using Recombinase polymerase amplification (RPA) to accurately detect *Leptospira* spp. causing the disease with the detection time of only 30 minutes. The RPA process developed by the team not only has a limit of detection (LOD) equivalent to the commercially available kit (100 copies/reaction) but also achieves similar sensitivity and specificity (100%).**

**Keywords:** isothermal amplification, *Leptospira* spp., sensitivity, specificity, Vietnam.

**Classification number:** 3.5

chi phí, với độ đặc hiệu và độ nhạy tương đương với PCR [11]. Trong các kỹ thuật khuếch đại acid nucleic đẳng nhiệt, Recombinase polymerase amplification (RPA) cho thấy nhiều ưu điểm nổi bật. Sự khuếch đại trong phản ứng RPA được thực hiện nhờ vào sự kết hợp đặc hiệu của các enzyme và protein (recombinase, SSB protein và DNA polymerase thay thế sợi), giúp các primer gắn đặc hiệu vào gen đích và tổng hợp sợi mới. Phản ứng RPA có thể được tiến hành trong khoảng nhiệt độ từ 24-45°C, so với các kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt khác thì điều kiện nhiệt độ của RPA khá dễ dàng thiết lập và đảm bảo [12]. Thêm vào đó, các hóa chất của kỹ thuật này cho phép phát hiện tín hiệu realtime hoặc sau khi kết thúc phản ứng, nhờ vậy có thể được ứng dụng phù hợp trong nhiều hoàn cảnh khác nhau, ở phòng thí nghiệm chẩn đoán hiện đại hay xét nghiệm ngay tại thực địa.

Chính vì những lý do thực tiễn trên, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của quy trình RPA đã xây dựng trên các mẫu dương tính giả định với 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh phổ biến; các mẫu âm tính với *Leptospira* spp., chủng *Leptospira biflexa* serovar *Patoc* không gây bệnh và các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt; đồng thời so sánh các thông số này với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường (Primerdesign).

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

Chủng chuẩn *Leptospira* spp. do Viện Y học Dự phòng Quân đội cung cấp: 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh gồm *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira interrogans* serovar *Australis* và 1 chủng *Leptospira biflexa* serovar *Patoc* không gây bệnh.

Các mẫu bệnh phẩm dương tính giả định gồm 10 mẫu dương tính giả định *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* và 10 mẫu dương tính giả định *Leptospira interrogans* serovar *Australis* các nồng độ cao, trung bình và thấp khác nhau do nhóm nghiên cứu chuẩn bị:  $8 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$  copy/p.u (tp1-tp10).

Các mẫu âm tính với *Leptospira* spp. gây bệnh (10 mẫu) được thu thập tại Phòng Công nghệ gen và di truyền tế bào, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y.

Các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt gồm Dengue virus, Hepatitis b virus (HBV), *Orientia tsutsugamushi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* do Khoa Vi sinh, Học viện Quân y cung cấp.



Bộ kit *Leptospirosis* outer membrane protein *lipL32* gene (Primerdesign) có độ đặc hiệu 100% với một loạt các trình tự gen các chủng *Leptospira* spp. gây bệnh. Trong điều kiện PCR tối ưu, bộ kit chẩn đoán *leptospirosis* có hiệu suất bắt cặp rất cao (>95%) và có thể phát hiện ít hơn 100 bản sao gen đích.

Các hóa chất, sinh phẩm và thiết bị dùng trong tách chiết DNA và phản ứng RPA.

### Phương pháp nghiên cứu

**Tách chiết DNA:** DNA được tách chiết bằng bộ kit QiAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) theo quy trình của nhà sản xuất (Spin Protocol).

**Thiết kế primer, probe cho phản ứng RPA:** trình tự gen *lipL32* là gen mã hóa cho lipoprotein màng ngoài *lipL32*, dường như là một yếu tố độc lực quan trọng giúp xác định các chủng gây bệnh của tất cả các loài *Leptospira* spp. được lựa chọn là gen đích đặc hiệu thiết kế primer, probe cho phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh. Các trình tự mỗi được thiết kế bằng phần mềm Primer3. Trình tự của gen đích *Leptospira* spp. được lấy từ cơ sở dữ liệu trình tự của GenBank (số truy cập của trình tự là JN683900.1).

**Phản ứng RPA:** tổng thể tích phản ứng được sử dụng là 20  $\mu$ l gồm các thành phần có nồng độ như đề xuất của nhà sản xuất (TwistAmp exo), trong đó nồng độ primer, probe tối ưu lần lượt là 0,42  $\mu$ M và 0,06  $\mu$ M với thể tích template là 2  $\mu$ l. Phản ứng được thực hiện ở 38°C trong 30 phút trên thiết bị Genie®II.

**Phản ứng realtime PCR:** phản ứng realtime PCR (Primerdesign) được thực hiện với 5  $\mu$ l PrecisionPLUS 2X qPCR Master Mix, 0,5  $\mu$ l *Leptospirosis* primer/probe mix, 2  $\mu$ l template và 2,5  $\mu$ l nước. Phản ứng được thực hiện trên thiết bị Rotor-GeneQ với chu trình nhiệt gồm các bước: biến tính ban đầu 95°C trong 2 phút, sau đó là 50 chu kỳ gồm 2 bước (biến tính ở 95°C 10s và thu nhận tín hiệu 60°C 60s qua kênh FAM). Phản ứng đối chứng dương sử dụng DNA chứng dương do bộ kit cung cấp, đối chứng âm nước.

### Kết quả

#### Trình tự primer, probe đặc hiệu gen đích *lipL32*

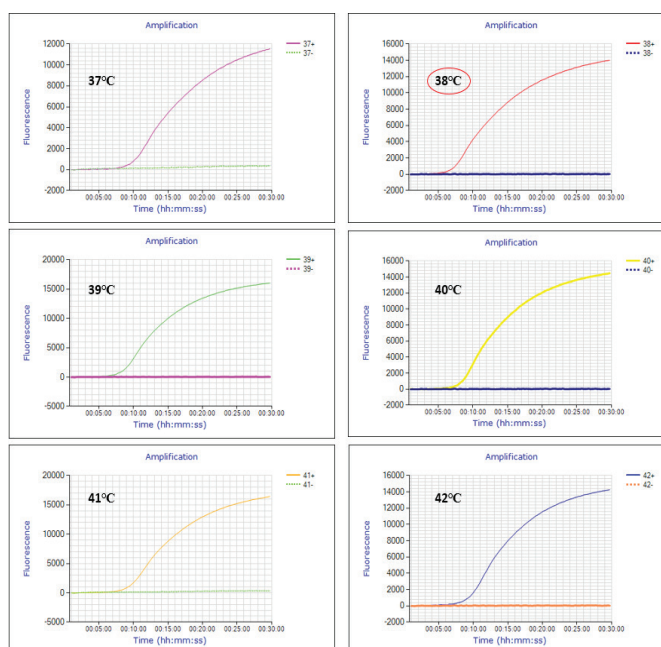
Căn cứ trên báo cáo về tính đa hình các gen của *Leptospira* spp. lưu hành trên thế giới và Việt Nam, nhóm nghiên cứu lựa chọn gen đích *lipL32* làm khuôn để thiết kế bộ công cụ primer/probe dùng cho kỹ thuật RPA. Bộ primer/probe được đánh giá khả năng bắt cặp đặc hiệu và các thông số cần thiết bằng công cụ BLAST, kết quả cho thấy sự bắt cặp rất tốt. Kết quả thực hiện phản ứng RPA với cặp primer/probe đã thiết kế cho thấy cường độ tín hiệu huỳnh quang và thời gian thu nhận tín hiệu khá tốt (bảng 1).

**Bảng 1. Trình tự primer/probe trong phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.**

| Primer/probe   | Trình tự (5'-3')                                                                   |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Forward primer | AAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAAT                                                     |
| Reverse primer | AGACCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTTCAC                                                   |
| Probe          | AAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAGAAT-(FAM-dT)<br>-T-(THF)-T-(BHQ1-dT)-TCACTACCTA-blocker |

#### Tối ưu nhiệt độ phản ứng RPA

Dải nhiệt độ phản ứng từ 37-42°C được khảo sát để chọn ra nhiệt độ phản ứng RPA tối ưu. Kết quả chỉ ra trong hình 1 cho thấy nhiệt độ phản ứng tối ưu là 38°C với thời gian phát hiện sản phẩm khuếch đại sớm nhất (8 phút).



**Hình 1. Tối ưu nhiệt độ phản ứng RPA khuếch đại DNA *Leptospira* spp.**

Các phản ứng chứng dương cùng lượng khuôn DNA; phản ứng chứng âm không có khuôn DNA với nồng độ primer là 0,42  $\mu$ M, nồng độ probe là 0,12  $\mu$ M.

#### Tối ưu thành phần phản ứng RPA phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh

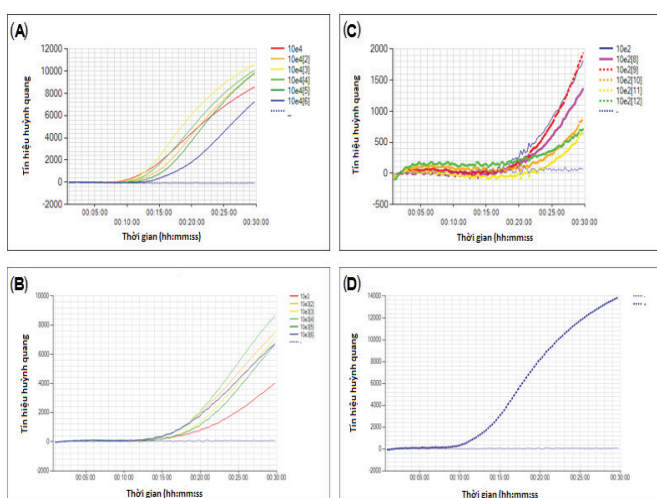
Các thành phần phản ứng bao gồm nồng độ môi, nồng độ probe và nồng độ Magnesium-Acetate (MgOAc) được chúng tôi tiến hành tối ưu để cải thiện hiệu suất khuếch đại của phản ứng. Dải nồng độ môi 0,24  $\mu$ M, 0,36  $\mu$ M, 0,42  $\mu$ M và 0,54  $\mu$ M; dải nồng độ probe 0,06  $\mu$ M, 0,09  $\mu$ M, 0,12  $\mu$ M và dải nồng độ MgOAc từ 12-20 mM được khảo sát. Kết quả tối ưu được tổng hợp trong bảng 2 cho thấy, nồng độ môi tối ưu là 0,42  $\mu$ M, nồng độ probe tối ưu là 0,09  $\mu$ M và nồng độ MgOAc tối ưu là 14 mM.

**Bảng 2. Thành phần phản ứng RPA khuếch đại DNA *Leptospira* spp. tối ưu (thể tích phản ứng là 20  $\mu$ l).**

| STT | Thành phần        | Nồng độ      | Thể tích     |
|-----|-------------------|--------------|--------------|
| 1   | Reaction Buffer   | 1x           | 10 $\mu$ l   |
| 2   | dNTPs             | 1,8 mM       | 1,44 $\mu$ l |
| 3   | H <sub>2</sub> O  |              | 0,36 $\mu$ l |
| 4   | Probe E-mix       | 1x           | 2 $\mu$ l    |
| 5   | Primer 872        | 0,42 $\mu$ M | 0,84 $\mu$ l |
| 6   | Primer 432        | 0,42 $\mu$ M | 0,84 $\mu$ l |
| 7   | Probe 174p        | 0,06 $\mu$ M | 0,12 $\mu$ l |
| 8   | Core Reaction Mix | 1x           | 1 $\mu$ l    |
| 9   | Exo               | 1x           | 0,4 $\mu$ l  |
| 10  | Template          |              | 2 $\mu$ l    |
| 11  | MgOAc             | 14 mM        | 1 $\mu$ l    |

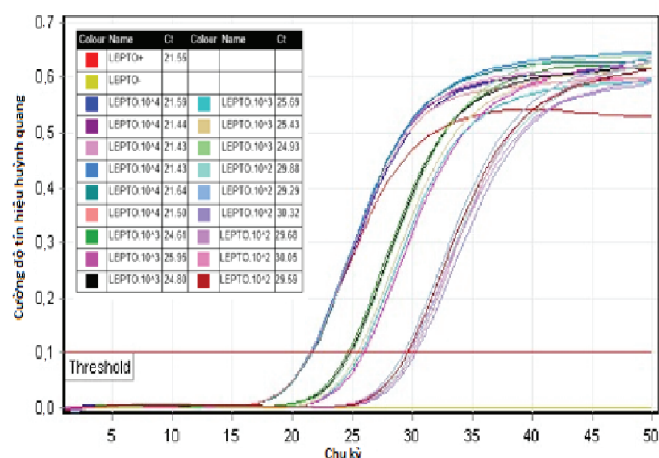
### Ngưỡng phát hiện tương đương với quy trình realtime PCR (Primerdesign)

Panel dài nồng độ plasmid tái tổ hợp *Leptospira interrogans* serovar *Australis* nồng độ  $10^2$ - $10^4$  copy/p.u được sử dụng để đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA đã xây dựng và quy trình realtime PCR của bộ kit *Leptospirosis* outer membrane protein *lipL32* gene (Primerdesign), mỗi nồng độ được lặp lại 6 lần. Kết quả cho thấy, quy trình RPA có khả năng phát hiện 6/6 lần lặp lại nồng độ 100 copy/p.u, tương đương với quy trình realtime PCR (Primerdesign). Hình 2, 3 lần lượt là kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA phát hiện *Leptospira interrogans* serovar *Australis*, kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình realtime PCR (Primerdesign).



**Hình 2. Kết quả đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình RPA phát hiện *Leptospira interrogans* serovar *Australis*.**

(A) - nồng độ  $10^4$  copy/p.u; (B) - nồng độ  $10^3$  copy/p.u; (C) - nồng độ  $10^2$  copy/p.u; (D) - đối chứng âm/đối chứng dương.



**Hình 3. Đánh giá ngưỡng phát hiện quy trình realtime PCR (Primerdesign) phát hiện *Leptospira interrogans* serovar *Australis*.**

So sánh về thời gian phát hiện tương ứng các nồng độ của từng quy trình (bảng 3) cho thấy, quy trình RPA không những có khả năng phát hiện được mẫu DNA của *Leptospira interrogans* serovar *Australis* tương đương với quy trình realtime PCR mà còn cho phép phân tích kết quả nhanh hơn rất nhiều (23,17 phút) ở điều kiện đẳng nhiệt ( $38^{\circ}\text{C}$ ).

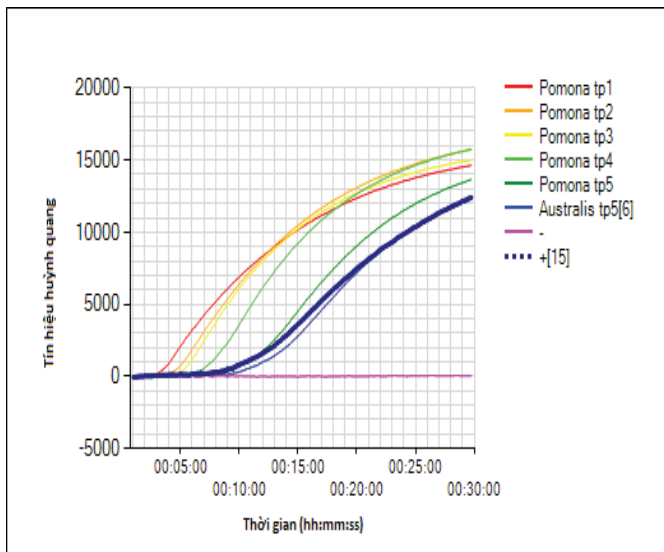
**Bảng 3. So sánh thời gian phát hiện tương ứng các nồng độ của từng quy trình phát hiện *Leptospira interrogans* serovar *Australis*.**

| Nồng độ (copy/p.u) | Thời gian khuếch đại trung bình        |            |
|--------------------|----------------------------------------|------------|
|                    | Realtime PCR (chu kỳ $\approx$ phút *) | RPA (phút) |
| $10^4$             | 21,50 $\approx$ 28,47                  | 14,67      |
| $10^3$             | 25,24 $\approx$ 33,09                  | 18,17      |
| $10^2$             | 29,80 $\approx$ 38,72                  | 23,17      |

Chú thích: (\*) với n là số chu kỳ, thời gian (phút) phát hiện sản phẩm khuếch đại quy trình realtime PCR được quy đổi  $\approx$  thời gian biến tính ban đầu 2 phút + n x (70s mỗi chu kỳ + 1,75s thời gian giảm nhiệt ( $20^{\circ}\text{C/s}$ ) + (n-2) x 7/3s thời gian gia nhiệt ( $15^{\circ}\text{C/s}$ )/60.

### Độ nhạy trên các mẫu dương tính giả định với các serovar khác nhau cho kết quả tương đương với bộ kit thương mại

Đánh giá trên các mẫu dương tính giả định nồng độ khác nhau của 2 serovar *Leptospira* spp. gây bệnh *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* (Pomona tp1-tp10), *Leptospira interrogans* serovar *Australis* (Australis tp1-tp10) cho thấy, quy trình RPA có khả năng phát hiện 20/20 mẫu bệnh phẩm dương tính giả định, tương đương với độ nhạy 100%. Độ nhạy này là tương đương với quy trình realtime PCR của bộ kit thương mại hiện hành (Primerdesign). Hình 4 là kết quả đánh giá độ nhạy quy trình RPA trên một số mẫu dương tính giả định với *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*.



Hình 4. Kết quả đánh giá độ nhạy quy trình RPA trên một số mẫu dương tính giả định với *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*.

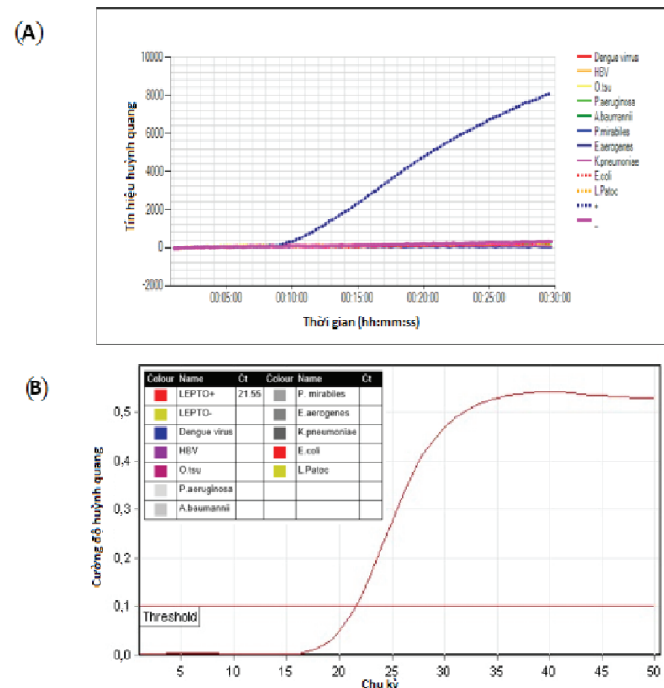
#### Độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường

Độ đặc hiệu quy trình RPA được đánh giá trên DNA các mẫu âm tính với *Leptospira* spp. và các chủng vi sinh vật thường gặp trong chẩn đoán phân biệt, đặc biệt có 1 chủng *Leptospira biflexa* serovar *Patoc* không gây bệnh (đã mô tả ở trên). Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của quy trình RPA đã xây dựng được so sánh với bộ kit thương mại Leptospirosis outer membrane protein lipL32 gene kit qua một chuỗi các phản ứng realtime PCR tương ứng. Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 5.

Quy trình RPA đã xây dựng không phát hiện bất kỳ mẫu nào trong 10 mẫu âm tính với *Leptospira* spp. và trên 10 mẫu DNA các chủng vi sinh vật khác thường gặp trong chẩn đoán phân biệt, tương đương với độ đặc hiệu 100%. Quy trình realtime PCR (Primerdesign) cũng cho kết quả đánh giá độ đặc hiệu tương đương (bảng 4).

Bảng 4. So sánh độ đặc hiệu của từng quy trình.

| Mẫu đánh giá                                                                                            | Độ đặc hiệu (%) |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----|
|                                                                                                         | Realtime PCR    | RPA |
| Đánh giá trên mẫu bệnh phẩm âm tính với <i>Leptospira</i> spp.                                          | 100             | 100 |
| Đánh giá trên chủng <i>Leptospira</i> không gây bệnh và các vi sinh vật có thể gây triệu chứng tương tự | 100             | 100 |



Hình 5. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu từng quy trình phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.

Quy trình RPA (A) và quy trình realtime PCR (Primerdesign) (B) trên chủng *Leptospira* không gây bệnh và các chủng vi sinh vật khác thường gặp trong chẩn đoán phân biệt leptospirosis.

#### Bàn luận

Tác nhân gây bệnh leptospirosis được xác định lần đầu tiên ở nước ta vào năm 1930 và Việt Nam được xem là khu vực đặc hữu của bệnh với đỉnh điểm diễn ra vào mùa mưa [13]. Tuy chưa có số liệu chính thức cho thấy dịch bệnh bùng phát ở Việt Nam nhưng các nghiên cứu gần đây vẫn cho thấy mức độ lưu hành cao của *Leptospira* spp. và nguy cơ tiềm tàng của nhiễm trùng leptospirosis [14, 15]. Do vậy, xây dựng các phương pháp phát hiện nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh leptospirosis sẽ hỗ trợ cho công tác chẩn đoán, giám sát và cảnh báo dịch bệnh, đặc biệt là ở các quốc gia đang phát triển và được cho là vùng đặc hữu của bệnh như Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, quy trình khuếch đại đẳng nhiệt RPA lần đầu tiên ở Việt Nam phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh đã được nghiên cứu và xây dựng thành công. Quy trình phản ứng được thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt 38°C, trên thiết bị Genie® II chỉ trong vòng 30 phút mà không cần sử dụng đến thiết bị luân nhiệt tinh vi với giá thành cao như PCR. Thiết bị được sử dụng là Genie® II với thiết kế nhỏ gọn, nhẹ và dễ dàng mang đi, phù hợp để thực hiện bất kỳ phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt nào phát hiện sản phẩm khuếch đại qua thu nhận tín hiệu huỳnh quang. Thiết bị này yêu cầu năng lượng thấp và sử dụng pin Lithium-polymer có thể sạc lại và giữ cho máy hoạt động cả ngày nên có thể dễ dàng mang đi. Nếu quy trình realtime PCR cần ít nhất 2 giờ để phân tích kết quả thì quy trình



RPA chỉ cần 30 phút để đưa ra kết quả chính xác cho một mẫu cần phân tích, rút ngắn đáng kể thời gian phát hiện tác nhân gây bệnh.

Ngưỡng phát hiện quy trình RPA đạt được là 100 copy/p.u, ngưỡng phát hiện này là tương đương với quy trình realtime PCR bộ kit Leptospirosis outer membrane protein *lipL32* gene của hãng Primerdesign nhưng với thời gian phát hiện nhanh hơn rất nhiều (bảng 3). Ngoài ra, ngưỡng phát hiện của xét nghiệm RPA còn được biết đến là không bị giới hạn, nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng phát hiện sản phẩm được khuếch đại của công nghệ RPA là chỉ từ một phân tử DNA duy nhất [16].

Độ nhạy quy trình RPA được đánh giá trên các mẫu dương tính giả định với các nồng độ khác nhau của 2 serovar gây bệnh phổ biến nhất ở Việt Nam là *Leptospira interrogans* serovar *Australis* và *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* [17]. Kết quả cho thấy, 20/20 mẫu dương tính giả định với 2 serovar gây bệnh đều được phát hiện chỉ trong 30 phút phản ứng, tương đương với độ nhạy 100%.

Bên cạnh đó, quy trình RPA đã thiết lập cũng cho thấy độ đặc hiệu rất cao (100%), tương đương với bộ kit thương mại Primerdesign ngay cả khi đánh giá trên chủng *Leptospira* không gây bệnh, các mẫu bệnh phẩm âm tính và trên các chủng vi sinh vật có thể gây ra một số triệu chứng tương tự. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu quy trình RPA là như mong đợi, với việc sử dụng probe làm tăng tính đặc hiệu của phản ứng. Việc lựa chọn gen đích *lipL32* chỉ có mặt ở các chủng *Leptospira* spp. gây bệnh cũng góp phần làm tăng tính đặc hiệu quy trình RPA. Như vậy, quy trình RPA đã xây dựng không những có ngưỡng phát hiện tương đương mà còn đạt được độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường, cho thấy khả năng ứng dụng trong lâm sàng phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.

Mặc dù quy trình RPA được tối ưu trong nghiên cứu này mới ở mức phát hiện định tính mà chưa phải là định lượng, nhưng với ngưỡng phát hiện đạt được rất tốt và độ nhạy, độ đặc hiệu cao gợi ý rằng có thể sử dụng quy trình này ở các điều kiện thực tế mà không cần trải qua các công đoạn làm giàu mẫu bệnh phẩm nhằm tăng độ nhạy như các kỹ thuật khuếch đại gen dựa trên phản ứng luân nhiệt đang sử dụng. Với thời gian phát hiện nhanh và các thông số kỹ thuật tương đương với bộ kit hiện hành, quy trình đẳng nhiệt đã thiết lập hứa hẹn là công cụ chẩn đoán hữu hiệu có khả năng ứng dụng trong các phòng thí nghiệm được trang bị hiện đại, phòng thí nghiệm di động hoặc khu vực có điều kiện hạn chế về trang thiết bị cơ sở hạ tầng, giúp chẩn đoán tác nhân gây bệnh leptospirosis.

## Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình đẳng nhiệt RPA đầu tiên tại Việt Nam, cho phép phát hiện nhanh và chính xác *Leptospira* gây bệnh với ngưỡng phát hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương với bộ kit thương mại hiện có trên thị trường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.A. Stoddard (2013), "Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the *lipL32* gene", *Methods Mol. Biol.*, **943**, pp.257-266.
- [2] D.A. Haake and P.N. Levett (2015), "Leptospirosis in humans", *Curr. top Microbiol. Immunol.*, **387**, pp.65-97.
- [3] H.S. Lee, et al. (2017), "Sero-prevalence of specific *Leptospira* serovars in fattening pigs from 5 provinces in Vietnam", *BMC Vet. Res.*, **13**(1), p.125.
- [4] P.N. Levett (2001), "Leptospirosis", *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**(2), pp.296-326.
- [5] S.V. Budihal and K. Perwez (2014), "Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests", *J. Clin. Diagn. Res.*, **8**(1), pp.199-202.
- [6] M.F. Palmer and W.J. Zochowski (2000), "Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited", *J. Clin. Pathol.*, **53**(9), pp.713-714.
- [7] D. Musso and B. La Scola (2013), "Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge", *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **46**(4), pp.245-252.
- [8] Ahmed Ahmed, Paul R. Klatser<sup>1</sup>, and Rudy A. Hartskeerl (2012), "Molecular approaches in the detection and characterization of leptospira", *Journal of Bacteriology and Parasitology*, DOI:10.4172/2155-9597.1000e102.
- [9] L.M. Esteves, et al. (2018), "Diagnosis of human leptospirosis in a clinical setting: Real-time PCR high resolution melting analysis for detection of leptospira at the onset of disease", *Sci. Rep.*, **8**(1), p.9213.
- [10] J. Kim and C.J. Easley (2011), "Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications", *Bioanalysis*, **3**(2), pp.227-239.
- [11] P. Craw and W. Balachandran (2012), "Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review", *Lab on a Chip*, **12**(14), pp.2469-2486.
- [12] I.M. Lobato and C.K. O'Sullivan (2018), "Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances", *Trac Trends in Analytical Chemistry*, **98**, pp.19-35.
- [13] K.T. Thai, et al. (2006), "Seroepidemiology of leptospirosis in southern Vietnamese children", *Trop. Med. Int. Health*, **11**(5), pp.738-745.
- [14] C.T. Van, et al. (1998), "Human leptospirosis in the Mekong delta, Vietnam", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**(6), pp.625-628.
- [15] G. Pappas, et al. (2008), "The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends", *Int. J. Infect. Dis.*, **12**(4), pp.351-357.
- [16] I.M.K. O'Sullivan (2018), "Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances", *Science Direct*.
- [17] Bộ Y tế (2017), *Bệnh xoắn khuẩn vàng da*, Cục Y tế Dự phòng.



# Một số đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của *Serratia marcescens* phân lập trên bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Hoàng Thị Hằng<sup>1</sup>, Phạm Duy Thái<sup>2</sup>, Trần Thị Vân Phương<sup>2</sup>, Ngô Thị Hồng Hạnh<sup>2</sup>, Trần Huy Hoàng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

<sup>2</sup>Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 22/7/2019; ngày chuyển phản biện 25/7/2019; ngày nhận phản biện 23/8/2019; ngày chấp nhận đăng 3/9/2019

## Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của 25 chủng *Serratia marcescens* được phân lập từ năm 2014 đến năm 2016 tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Kết quả cho thấy, có sự gia tăng kháng thuốc ở các chủng *Serratia marcescens* trong nghiên cứu này đối với các nhóm kháng sinh như aminoglycosides, fluoroquinolones và cephalosporin phổ tác dụng rộng được dùng chủ yếu để điều trị cho *Serratia marcescens*. Tỷ lệ kháng với cefotaxime (32%), ciprofloxacin (28%), aztreonam (28%), gentamycin (24%) và cefepime (12%), cao hơn so với các nghiên cứu trước đó trên thế giới như ở Mỹ và châu Âu. 20% *Serratia marcescens* có khả năng sinh ESBL mang gen *bla* CTX-M và 12% mang gen *bla* TEM. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật điện di xung trường (PFGE) cho thấy, các chủng vi khuẩn không thuộc một kiểu gen duy nhất mà thuộc 3 nhóm kiểu gen là S1, S2, S3 với hệ số tương đồng  $\geq 85\%$  và có khả năng tồn tại sự lây nhiễm vi khuẩn giữa các khoa trong bệnh viện.

**Từ khóa:** ESBL, MIC, PFGE, *Serratia marcescens*.

**Chỉ số phân loại:** 3.5

## **Đặt vấn đề**

Cuối thế kỷ XX, *Serratia marcescens* vẫn được xem là một vi khuẩn hoại sinh không gây bệnh. Tỷ lệ nhiễm *Serratia marcescens* ở người đã bị đánh giá thấp trong nhiều năm, cho đến năm 1951 khi xảy ra nhiễm trùng bệnh viện do sự bùng nổ của *Serratia marcescens*, kể từ đó các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn này đã được báo cáo ngày càng thường xuyên hơn [1, 2]. *Serratia marcescens* gây ra một loạt nhiễm trùng như viêm phổi, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng vết thương, nhiễm trùng tiết niệu, viêm màng não, viêm kết mạc... [3, 4]. Chúng là nguồn lây nhiễm ở cả người lớn và trẻ em [5, 6], đặc biệt là nguyên nhân gây bệnh nguy hiểm trên các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, người bệnh nặng, những bệnh nhân ở khoa hồi sức tích cực (ICUs) và khoa sơ sinh (NICUs) [7, 8].

Kết quả từ Chương trình giám sát kháng sinh (SENTRY) ở Mỹ và châu Âu năm 2009-2011 cho thấy, *Serratia* spp. xếp thứ 5 trong số các vi khuẩn gram âm gây bệnh ở ICU [9]. Ở châu Âu, theo dữ liệu gần đây nhất từ Mạng lưới giám

sát nhiễm trùng - chăm sóc sức khỏe HAI-Net (Healthcare-Associated Infections Surveillance Network) thuộc Trung tâm Phòng chống dịch bệnh châu Âu (ECDC) năm 2016, *Serratia* spp. là vi khuẩn được phân lập phổ biến xếp thứ 6 ở bệnh nhân bị viêm phổi trong ICU, xếp thứ 9 ở bệnh nhân nhiễm trùng đường tiết niệu và thứ 10 ở bệnh nhân bị nhiễm trùng máu [10].

Sự xuất hiện, lây lan nhanh chóng và những hậu quả tiềm tàng của các chủng kháng đa kháng sinh sản xuất beta-lactamase phổ rộng đang trở thành mối đe dọa ngày càng lớn đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới [7, 11] và hiện nay đã trở thành một vấn đề nhiễm trùng cần phải được kiểm soát [12]. *Serratia marcescens* là mầm bệnh có mặt ở khắp nơi, nên gây khó khăn trong việc kiểm soát dịch bệnh [12, 13] và các nhiễm trùng do *Serratia marcescens* thể hiện tính đề kháng với nhiều loại kháng sinh [14].

Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về đặc tính kháng kháng sinh cũng như mối liên hệ kiểu gen của các chủng *Serratia marcescens*. Trong nghiên cứu này,

\*Tác giả liên hệ: Email: thh@nihe.org.vn

# Antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of *Serratia marcescens* strains isolated in patients treated at 108 Central Military Hospital

Thi Hang Hoang<sup>1</sup>, Duy Thai Pham<sup>2</sup>, Thi Van Phuong Tran<sup>2</sup>,  
Thi Hong Hanh Ngo<sup>2</sup>, Huy Hoang Tran<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Hai Duong Medical Technical University

<sup>2</sup>National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 22 July 2019; accepted 3 September 2019

## Abstract:

The study was conducted to describe antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of 25 *Serratia marcescens* strains isolated in patients treated at 108 Central Military Hospital from 2014-2016. The results showed that there was an increase in antibiotic resistance of *Serratia marcescens* strains in this study for antibiotic groups such as fluoroquinolones, aminoglycosides, and extended-spectrum cephalosporins, which were commonly used for treatment of *Serratia marcescens* infection. The rates of resistance to cefotaxime (32%), ciprofloxacin (28%), gentamycin (24%), aztreonam (28%) and cefepime (12%) were higher than previous studies in the world such as in the US and Europe. Twenty percent of *Serratia marcescens* isolates capable of producing ESBL carried *bla* CTX-M gene and 12% carried *bla* TEM gene. Analysis on genotype correlation by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique showed that strains of the bacterium did not belong to a single genotype, there were three genotypes S1, S2, S3 identified with similarity of  $\geq 85\%$ , and the possible hypothesis about the spread of bacterial infections between departments in the hospital existed.

**Keywords:** ESBL, MIC, PFGE, *Serratia marcescens*.

**Classification number:** 3.5

Chúng tôi áp dụng kỹ thuật MIC (nồng độ ức chế tối thiểu), kỹ thuật PCR để xác định một số đặc điểm kháng kháng sinh và kỹ thuật PFGE để nghiên cứu mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng. Từ đó, đưa ra các biện pháp để kiểm soát, phòng ngừa sự lây lan và đề xuất phác đồ điều trị cho phù hợp.

## Phương pháp nghiên cứu

### Chủng vi khuẩn

Bao gồm 25 chủng *Serratia marcescens* phân lập được tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ 2014-2016 theo thường quy của Bệnh viện. Sau đó, các chủng này được chuyển đến lưu trữ tại Phòng Kháng sinh - Khoa Vi khuẩn - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Trước khi tiến hành nghiên cứu, các chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy trên môi trường thạch Luria Bertani (LB agar), tiếp đó khẳng định lại bằng kỹ thuật MALDI-TOF tại Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Hà Nội.

### Kỹ thuật nghiên cứu

Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC): tiến hành kỹ thuật MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch Muller-hinton. Thử nghiệm với 9 loại kháng sinh thuộc 4 nhóm kháng sinh khác nhau bao gồm: imipenem (IMP), meropenem (MEM), ceftriaxone (CTX), cefepim (FEP), aztreonam (AZT), gentamycin (GEN), amikacin (AMK), ciprofloxacin (CIP), doxycycline (DOX), trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) (STX). Kết quả diễn giải dựa theo tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và Xét nghiệm Hoa Kỳ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) 2018 [15]. Chủng chuẩn *Escherichia Coli* ATCC 25922 được sử dụng làm đối chứng cho thử nghiệm.

Xác định gen kháng kháng sinh bằng kỹ thuật PCR:

- Môi:

| Môi     | Trình tự môi 5'----3'    | Nhiệt độ ủ (°C) | Kích thước (bp) | Tài liệu tham khảo |
|---------|--------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| CTX-M F | CGATGTGCAGTACCAGTAA      | 60              | 585 bp          | [16]               |
| CTX-M R | TTAGTGACCAGAATCAGCGG     |                 |                 |                    |
| TEM F   | TTTTCGTGTCGCCCTTATTC     | 58              | 798 bp          | [17]               |
| TEM R   | CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTC |                 |                 |                    |

- Tách chiết ADN vi khuẩn: lấy 3-5 khuẩn lạc vi khuẩn thuần, hòa vào 200  $\mu$ l nước cất vô trùng đựng trong tube vô trùng. Đun cách thủy ở 95°C/5 phút, sau đó ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn, thu nước nổi làm khuôn mẫu ADN cho phản ứng PCR.

Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: 10  $\mu$ l Go Taq Green Master Mix (Promega) [đã bao gồm: 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP và 3 mM  $MgCl_2$ ], 0,2  $\mu$ l mỗi xuôi và mỗi ngược mỗi loại (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l DNA khuôn (1-10 ng/ $\mu$ l) và 7,6  $\mu$ l nước nuclease free. Tổng thể tích là 20  $\mu$ l. Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermo-cycler (Applied Biosystems, Verti Veriti):

Chương trình chạy CTX-M: giai đoạn khởi động 94°C/5 phút; giai đoạn biến tính ở 94°C/36 giây, gắn mỗi ở 60°C/36 giây, kéo dài ở 72°C/1 phút; tổng số 30 chu kỳ; giai đoạn kết thúc 72°C/5 phút.

Chương trình chạy TEM: giai đoạn khởi động 94°C/5 phút; giai đoạn biến tính ở 94°C/1 phút, gắn mỗi ở 58°C/1 phút, kéo dài ở 72°C/1 phút; tổng số 30 chu kỳ; giai đoạn kết thúc 72°C/7 phút.

Điện di 10  $\mu$ l sản phẩm phản ứng PCR trên thạch agarose 1,5% và nhuộm bằng Red safe. Quan sát và phân tích kết quả trên hệ thống máy chụp gel.

#### Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE):

- Chuẩn bị ADN tổng số để tiến hành điện di: các chủng vi khuẩn được cấy vào đĩa thạch Muller-Hinton (Merck, Đức) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. ADN toàn phần của các chủng *Serratia marcescens* được ly giải trong thạch mềm (plug) sẽ được cắt bằng enzym giới hạn *SpeI* (25 U/ $\mu$ l) (Biolabs New England), ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chủng vi khuẩn *Salmonella braendrup* H9812 được sử dụng làm marker, cắt bằng enzym giới hạn *XbaI* (20 U/ $\mu$ l) (Biolabs New England) ở 37°C trong 2 giờ.

- Điện di: điện di bằng thạch Seakem Gold 1% (Lonza, Mỹ). Sử dụng bộ điện di CHEF-DR III (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif) ở hiệu điện thế 6 V/cm trong 22 giờ ở nhiệt độ 14°C, thời gian một xung từ 5 đến 25 giây và góc điện trường là 120°.

- Nhuộm thạch: sau khi điện di, gel sẽ được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh, các đoạn cắt deoxyribonucleic acid (ADN) của các chủng vi khuẩn sẽ được so sánh với nhau [18].

- Phân tích: sử dụng phần mềm Bionumerics 6.6 (Applied Maths) để tạo cây phả hệ.

## Kết quả

### Kết quả thử nghiệm mức độ kháng kháng sinh của *Serratia marcescens* bằng phương pháp xác định nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu (MIC)

Bảng 1. Kết quả MIC của các chủng *Serratia marcescens*.

| Kháng sinh     | Mã  | Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC mg/l) (n=25) |                           |                             |                                    |
|----------------|-----|--------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
|                |     | R<br>n (%)                                 | I<br>n (%)                | SDD<br>n (%)                | S<br>n (%)                         |
| Cefotaxime     | CTX | 8 (32%)<br>(8- >128 $\mu$ g/ml)            | 0%                        | -                           | 17 (68%)<br>(0,25-0,5 $\mu$ g/ml)  |
| Ciprofloxacin  | CIP | 7 (28%)<br>(16-32 $\mu$ g/ml)              | 0%                        | -                           | 18 (72%)<br>(0,03-0,25 $\mu$ g/ml) |
| Aztreonam      | AZT | 7 (28%)<br>(16-128 $\mu$ g/ml)             | 0%                        | -                           | 18 (72%)<br>(0,5-2 $\mu$ g/ml)     |
| Co-trimoxazole | STX | 6 (24%)<br>(>32/608 $\mu$ g/ml)            | 0%                        | -                           | 19 (76%)<br>(0,25/4,75 $\mu$ g/ml) |
| Gentamycin     | GEN | 6 (24%)<br>(16-128 $\mu$ g/ml)             | 0%                        | -                           | 19 (76%)<br>(1-2 $\mu$ g/ml)       |
| Cefepim        | FEP | 3 (12%)<br>(16-32 $\mu$ g/ml)              | -                         | 4 (16%)<br>(4-8 $\mu$ g/ml) | 18 (72%)<br>(0,06-0,12 $\mu$ g/ml) |
| Amikacin       | AMK | 0%                                         | 1 (4%)<br>(32 $\mu$ g/ml) | -                           | 24 (96%)<br>(2-8 $\mu$ g/ml)       |
| Imipenem       | IPM | 0%                                         | 0%                        | -                           | 0%<br>(0,25-0,5 $\mu$ g/ml)        |
| Meropenem      | MEM | 0%                                         | 0%                        | -                           | 0%<br>(0,03-0,06 $\mu$ g/ml)       |

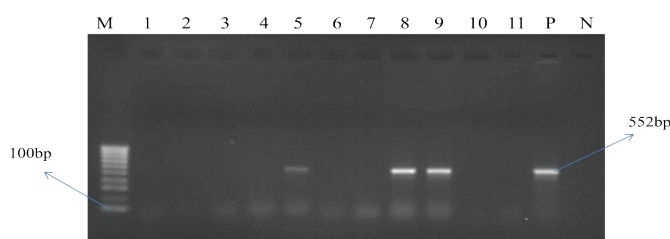
Ghi chú: R: kháng; I: trung gian; SDD: nhạy cảm phụ thuộc liều; S: nhạy cảm.

Kết quả MIC ở bảng 1 cho thấy, tỷ lệ kháng cao nhất là cefotaxime (32%). Các chủng này vẫn còn nhạy cảm amikacin và kháng sinh nhóm carbapenem.

### Kết quả PCR phát hiện gen ESBL của các chủng *Serratia marcescens*

Bảng 2. Tỷ lệ hiện diện gen ESBL của các chủng *Serratia marcescens*.

| Gen         | Số chủng ESBL(+) | Tỷ lệ |
|-------------|------------------|-------|
| CTX-M       | 5                | 20%   |
| TEM         | 3                | 12%   |
| CTX-M + TEM | 3                | 12%   |



**Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đại diện phát hiện gen *bla* CTX-M.**

Ghi chú: giếng 5, 8, 9: các chủng dương tính với CTX-M; P: chứng dương; N: chứng âm; M: thang chuẩn 100 bp.



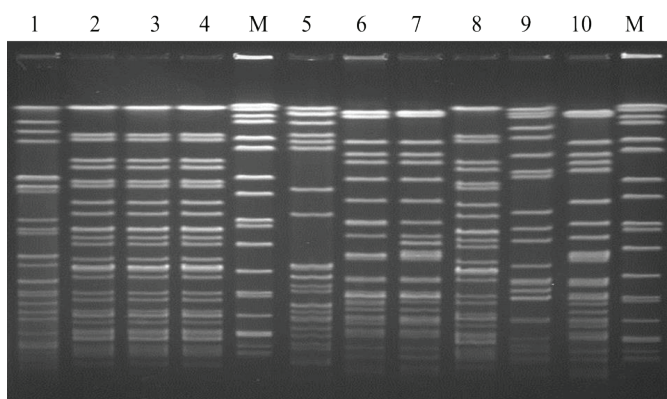
**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR đại diện phát hiện gen *bla* TEM.**

Ghi chú: giếng 9, 14: các chủng dương tính với TEM; P: chứng dương; N: chứng âm; M: thang chuẩn 100 bp.

Bảng 2 cho thấy, trong 25 chủng *Serratia marcescens* có 20% (5/25) mang gen *bla* CTX-M gồm 1 chủng được phân lập ở Khoa Lao - Bệnh phổi, 1 chủng ở Khoa Thần kinh và 3 chủng ở Khoa Hồi sức tích cực. 12% (3/25) chủng mang gen *bla* TEM. Trong đó, những chủng mang gen *bla* TEM đồng thời mang cả gen *bla* CTX-M.

Kết quả điện di sản phẩm PCR đại diện phát hiện các gen *bla* CTX-M, *bla* TEM được thể hiện ở các hình 1, 2.

### Kết quả phân tích kiểu gen của các chủng *Serratia marcescens* bằng kỹ thuật PFGE



**Hình 3. Ảnh kết quả điện di xung trường đại diện của các chủng *Serratia marcescens*.**

Ghi chú: đường chạy 1-10: các chủng *Serratia marcescens*; M: marker (chủng *Salmonella braenderup* H9812).

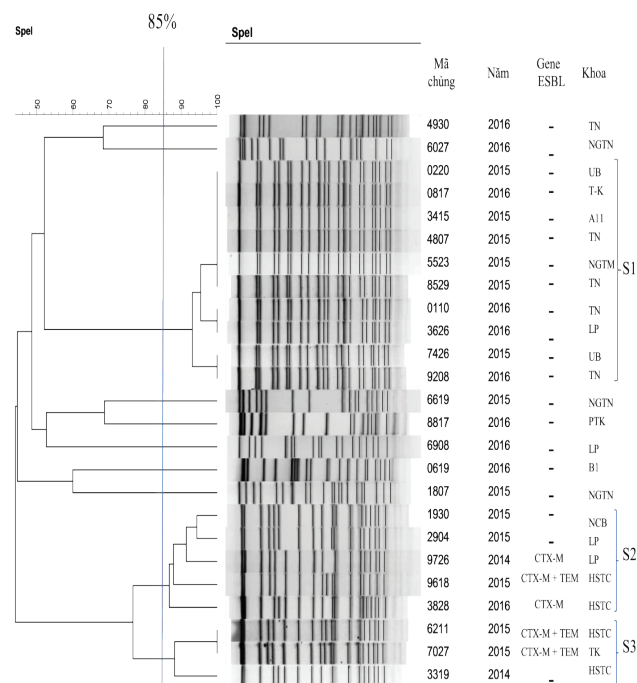
Kết quả điện di xung trường đại diện của các chủng *Serratia marcescens* được thể hiện ở hình 3. Khi sử dụng phần mềm Bionumerics để phân tích kết quả PFGE, có 3 nhóm kiểu hình với hệ số tương đồng  $\geq 85\%$ , được ký hiệu từ S1-S3 (hình 4).

Nhóm S1: gồm 10 chủng có hệ số tương đồng  $>90\%$  đều được phân lập từ bệnh phẩm máu, trong đó 4 chủng ở Khoa Bệnh lý đường tiêu hóa, 2 chủng ở Khoa Ung thư và Bệnh máu, còn lại ở các Khoa Thận - Bệnh khớp, Bảo vệ và Chăm sóc sức khỏe cán bộ, Phẫu thuật tim, Lao - Bệnh phổi, mỗi khoa 1 chủng.

Nhóm S2: gồm 5 chủng 1930; 2904; 9726; 9618; 3828 được phân lập từ bệnh phẩm đường hô hấp và máu, gồm 2 chủng ở Khoa Hồi sức tích cực, 2 chủng ở Khoa Lao - Bệnh phổi và 1 chủng ở Khoa Nội cán bộ.

Nhóm S3: gồm 3 chủng 3319; 6211; 7027 được phân lập từ bệnh phẩm đường hô hấp và máu, gồm 2 chủng ở Khoa Hồi sức tích cực và 1 chủng ở Khoa Thần kinh.

Các chủng còn lại có kiểu gen PFGE hoàn toàn khác biệt với các chủng trong 3 nhóm trên.



**Hình 4. Cây phả hệ của 25 chủng *Serratia marcescens* phân lập được tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ 2014-2016.**

Ghi chú: S1, S2, S3: các nhóm kiểu hình; TN: bệnh lý đường tiêu hóa; NGTN: ngoại tiết niệu; UB: ung thư và bệnh máu; T-K: thận - bệnh khớp; A11: bảo vệ và chăm sóc sức khỏe cán bộ; NGTM: ngoại tim mạch; LP: lao - bệnh phổi; PTK: phẫu thuật bàn tay và vi phẫu; NCB: nội cán bộ; HSTC: hồi sức tích cực; TK: thần kinh.



## Bàn luận

Trong nghiên cứu này, các chủng *Serratia marcescens* được phân lập phổ biến nhất từ bệnh phẩm máu 52% (13/25), tiếp đến là bệnh phẩm đường hô hấp gồm đờm và dịch màng phổi 32% (8/25), kết quả này tương tự với nghiên cứu của M. Simsek, Thổ Nhĩ Kỳ (giai đoạn 2014-2018) [19].

Trong đó, tỷ lệ kháng cao nhất là cefotaxime (32%) (kết quả MIC cho thấy có những chủng kháng ở mức độ rất cao >128 µg/ml) nhưng trái ngược với tỷ lệ kháng cefotaxime ở Thổ Nhĩ Kỳ là thấp nhất (0,6%). Các tỷ lệ kháng với ciprofloxacin (28%), aztreonam (28%), gentamycin (24%) và cefepim (12%) trong nghiên cứu này cũng tăng lên rất nhiều so với các nghiên cứu trước đó trên thế giới (giai đoạn 2009-2011) như ở Mỹ và châu Âu. Ở Mỹ, tỷ lệ kháng trong ICU - ngoài ICU với ciprofloxacin lần lượt là 3,8-4,4%; kháng gentamycin 4,2-1,8%; kháng aztreonam 5,9-3%, kháng cefepime 0,8- 3% và ở châu Âu tỷ lệ kháng với ciprofloxacin là 16,2-14,1%; kháng gentamycin 8,1- 2,2%; kháng aztreonam 10,1-12,2%; kháng cefepime 2-4% [9]. Kết quả cho thấy, có sự gia tăng kháng thuốc ở các chủng *Serratia marcescens* trong nghiên cứu này đối với các nhóm kháng sinh như aminoglycosides, fluoroquinolones và cephalosporin phổ tác dụng rộng được dùng chủ yếu để điều trị cho *Serratia marcescens*. Có thể giả thuyết sự gia tăng đó phụ thuộc vào điều kiện môi trường như áp lực chọn lọc tự nhiên, do việc sử dụng kháng sinh, sự lạm dụng thuốc trong điều trị hoặc do hiệu quả của công tác kiểm soát nhiễm khuẩn bệnh viện ở nước ta, vậy nên cần phải tiếp tục giám sát sự đề kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn này. Tuy nhiên, nhìn chung các nghiên cứu gần đây cho thấy *Serratia marcescens* vẫn còn rất nhạy với amikacin và kháng sinh nhóm carbapenem.

Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này 20% *Serratia marcescens* có khả năng sinh ESBL mang gen *bla* CTX-M. Tỷ lệ này gần giống với các nghiên cứu khác trên thế giới như ở Mexico (2006-2009) 20,5% ESBL(+); Thái Lan (2006-2007) 24,1% ESBL(+); Hàn Quốc dao động từ 12,4-30,6%, tỷ lệ này cao hơn ở Đài Loan (2005) 16% ESBL(+) và thấp hơn ở Ấn Độ (2007-2008) 33% ESBL(+) [3]. Tuy nhiên, ở Ba Lan (giai đoạn 1996-2000) 19% chủng *Serratia marcescens* phân lập được có sinh ESBL [20], nhưng theo một báo cáo quốc gia báo động vào năm 2003-2004, các vi khuẩn đường ruột từ 13 bệnh viện khác nhau ở Ba Lan đã được nghiên cứu khả năng sinh ESBL và trong số đó có đến 70,8% *Serratia marcescens* có ESBL(+) và đa số là mang gen *bla* CTX-M [3]. Ngoài ra, có 12% mang gen *bla* TEM, các chủng mang gen *bla* TEM đồng thời mang cả gen *bla* CTX-M và các chủng sinh ESBL này đều được phân lập từ bệnh phẩm đường hô hấp, bao gồm đờm và dịch màng phổi. Từ đó cho thấy, các chủng vi khuẩn mang gen kháng thuốc ngày càng đa dạng, với một chủng vi khuẩn có thể mang một hoặc

nhiều loại gen kháng thuốc khác nhau.

Để phân tích sâu hơn về sự liên quan giữa các chủng trong nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành kỹ thuật PFGE xác định mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng. Kết quả là, các chủng vi khuẩn không thuộc một kiểu gen duy nhất, xác định được 3 nhóm genotype là S1, S2, S3 với hệ số tương đồng  $\geq 85\%$ . Nhóm S1 bao gồm 10 chủng (2015-2016) với hệ số tương đồng >90% được phân lập từ các khoa khác nhau. Nhóm S2 có 5 chủng (2014-2015-2016), nhóm S3 có 3 chủng (2014-2015). Như vậy có thể thấy, các chủng ở các năm khác nhau không những có khả năng lây lan giữa các khoa khác nhau, giữa các bệnh nhân nằm điều trị trong cùng một khoa tại một thời điểm (cùng năm) mà chúng còn có mối quan hệ mật thiết, dẫn đến giả thiết về sự tồn tại và lưu hành các chủng này tại các khoa trong nhiều năm. Đáng chú ý là các cặp (0110-3626) (Khoa Bệnh lý đường tiêu hóa và Khoa Lao - Bệnh phổi), cặp (9208-7426) (Khoa Bệnh lý đường tiêu hóa và Khoa Ung thư - Bệnh máu) và nhóm chủng (0220; 3415; 4807; 5523; 8529; 0817) (ở các Khoa Ung thư - Bệnh máu, Bệnh Lý đường tiêu hóa, Ngoại - Tim mạch, Thận - Bệnh khớp, Bảo vệ và Chăm sóc sức khỏe cán bộ) thuộc nhóm S1 và nhóm S3 có cặp (6211-7027) (Khoa Hồi sức tích cực và Khoa Thần kinh), có hệ số tương đồng 100%, chúng tôi cho rằng các chủng có sự tương đồng về kiểu gen trong PFGE nhiều khả năng là có chung một nguồn gốc. Kết quả của sự tương đồng về kiểu gen giữa các chủng trong cùng một khoa và giữa các khoa khác nhau có thể giả thiết về sự lây lan thông qua yếu tố môi trường (dụng cụ y tế, môi trường trong bệnh viện) hoặc yếu tố con người (cán bộ y tế, người thân), cũng như chính bản thân bệnh nhân mang vi khuẩn.

Tuy nhiên, để kết luận các giả thiết trên sẽ cần phải thực hiện thêm các nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học, nghiên cứu về sinh học phân tử sâu hơn và với cỡ mẫu lớn hơn. Từ đó có các biện pháp để phòng ngừa, ngăn chặn sự lây lan, cũng như đưa ra các biện pháp kiểm soát và can thiệp phù hợp đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh.

## Kết luận

Thử nghiệm MIC cho thấy, có sự gia tăng kháng thuốc ở các chủng *Serratia marcescens* trong nghiên cứu này đối với các nhóm kháng sinh như aminoglycosides, fluoroquinolones và cephalosporin phổ tác dụng rộng được dùng chủ yếu để điều trị cho *Serratia marcescens*: cefotaxime (32%), ciprofloxacin (28%), aztreonam (28%), gentamycin (24%) và cefepime (12%); nhưng vẫn còn rất nhạy cảm với amikacin và kháng sinh nhóm carbapenem.

Phát hiện 20% *Serratia marcescens* có khả năng sinh ESBL mang gen *bla* CTX-M và 12% mang gen *bla* TEM, các chủng mang gen *bla* TEM đồng thời mang cả gen *bla* CTX-M.

Kết quả phân tích PFGE các chủng *Serratia marcescens* đã xác định được 3 nhóm kiểu gen với hệ số tương đồng  $\geq 85\%$ , cho thấy mối liên hệ giữa các chủng trong cùng một nhóm. Qua đó có thể thấy, nguy cơ về khả năng lây lan của các chủng này trong cùng một khoa và giữa các khoa với nhau trong cùng một năm và qua các năm khác nhau tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài cấp nhà nước “Đánh giá thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn tại Việt Nam, xác định đặc điểm cấu trúc gen và yếu tố liên quan của các vi khuẩn kháng thuốc thường gặp ở Việt Nam” (2016-2019), mã số HNQT/SPĐP/02.16. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.M. Al Jarousha, I.A. El Qouqa, A.H. El Jadba, et al. (2008), “An outbreak of *Serratia marcescens* septicaemia in neonatal intensive care unit in Gaza city, Palestine”, *J. Hosp. Infect.*, **70**(2), pp.119-126.
- [2] L.H. Su, J.T. Ou, H.S. Leu, et al. (2003), “Extended epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by *Serratia marcescens*”, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(10), pp.4726-4732.
- [3] Steven D. Mahlen (2011), “*Serratia* infections: from military experiments to current practice”, *Clinical Microbiology Reviews*, **24**(4), pp.755-791.
- [4] <http://www.sitinazionale.org/bdsdocs/gisio/ricerca/01serratia.pdf> (2018), Società Italiana di Igene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica (SItI) - Gruppo Italiano Studio Igene Ospedaliera (GISIO).
- [5] H.J. Yoon, J.Y. Choi, Y.S. Park, et al. (2005), “Outbreaks of *Serratia marcescens* bacteriuria in a neurosurgical intensive care unit of a tertiary care teaching hospital: a clinical, epidemiologic, and laboratory perspective”, *Am. J. Infect. Control*, **33**(10), pp.595-601.
- [6] A. Voelz, A. Muller, J. Gillen, et al. (2010), “Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management”, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **213**(2), pp.79-87.
- [7] S.A. Uduman, A.S. Farrukh, K.N. Nath, et al. (2002), “An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a special-care baby unit of a community hospital in United Arab Emirates: the importance of the air conditioner duct as a nosocomial reservoir”, *J. Hosp. Infect.*, **52**(3), pp.175-180.
- [8] A. Dessi, M. Puddu, M. Testa, et al. (2009), “*Serratia marcescens* infections and outbreaks in neonatal intensive care units”,

*J. Chemother.*, **21**(5), pp.493-499.

- [9] H.S. Sader, D.J. Farrell, R.K. Flamm, et al. (2014), “Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011)”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **78**(4), pp.443-448.
- [10] European Centre for Disease Prevention and Control (2018), *Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units - Annual Epidemiological Report for 2016*.
- [11] Atsushi Iguchi, Yutaka Nagaya, Elizabeth Pradel, et al. (2014), “Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen”, *Genome Biology and Evolution*, **6**(8), pp.2096-2110.
- [12] B.H. Liou, R.W. Duh, Y.T. Lin, et al. (2014), “A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **47**(5), pp.387-393.
- [13] C. Montagnani, P. Cocchi, L. Lega, et al. (2015), “*Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants”, *BMC Infect. Dis.*, **15**, p.11.
- [14] D.M. Livermore (1995), “Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance”, *Clinical Microbiology Reviews*, **8**(4), pp.557-584.
- [15] CLSI (2018), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed., CLSI supplement M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [16] E. Liebana, M. Batchelor, K.L. Hopkins, et al. (2006), “Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance”, *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(5), pp.1630-1634.
- [17] John Wain, L.T. Diem Nga, Claire Kidgell, et al. (2003), “Molecular analysis of *incHI1* antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**(9), pp.2732-2739.
- [18] Z.Y. Shi, P.Y. Liu, Y.J. Lau, et al. (1997), “Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens*”, *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(1), pp.325-327.
- [19] M. Simsek (2019), “Determination of the antibiotic resistance rates of *Serratia marcescens* isolates obtained from various clinical specimens”, *Nigerian Journal of Clinical Practice*, **22**(1), pp.125-130.
- [20] L. Naumiuk, A. Baraniak, M. Gniadkowski, et al. (2004), “Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Gdansk, Poland, over a 5-year period”, *J. Clin. Microbiol.*, **42**(7), pp.3108-3816.

# Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* ở điều kiện nhà kính và tự nhiên tại Lâm Đồng

Phan Công Du<sup>1</sup>, Nguyễn Lê Quốc Hùng<sup>1</sup>, Hoàng Thanh Tùng<sup>2</sup>, Đỗ Mạnh Cường<sup>2</sup>,  
Lê Xuân Thám<sup>1</sup>, Dương Tấn Nhựt<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ban quản lý Khu công nghệ sinh học và nông nghiệp ứng dụng công nghệ cao Đà Lạt

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên

Ngày nhận bài 1/7/2019; ngày chuyển phản biện 8/7/2019; ngày nhận phản biện 8/8/2019; ngày chấp nhận đăng 19/8/2019

## Tóm tắt:

Hiện nay, sâm Ngọc Linh đang được khai thác quá mức nên việc chủ động nguồn giống từ hạt còn gặp nhiều khó khăn. Trong nghiên cứu này, cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* được sử dụng làm nguồn vật liệu ban đầu để khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể nuôi cấy khác nhau (đất sạch Pindstrup, đất mùn núi, xơ dừa, phân bò khô, bã trồng nấm và vỏ trấu hun), chế độ dinh dưỡng (tỷ lệ N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O) và điều kiện sinh thái của 4 điều kiện nuôi trồng (2 điều kiện nhà kính, 1 điều kiện nhà mái che kiên cố và 1 điều kiện trồng ngoài tự nhiên) đối với khả năng thích nghi, sinh trưởng, phát triển và ra hoa của cây sâm Ngọc Linh. Kết quả ghi nhận được cho thấy, cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy mô cho sự thích nghi và sinh trưởng tốt trên giá thể đất mùn:phân bò khô: xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1) và chế độ dinh dưỡng N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O (3:1:1) ở giai đoạn vườn ươm (cây 1 năm tuổi, bón phân 1 tháng/lần với liều lượng 5 g/cây); trong khi đó ở giai đoạn vườn trồng (cây 2 năm tuổi trở lên, bón phân 1 tháng/lần với liều lượng 20 g/cây) là giá thể đất mùn:phân bò khô:Pindstrup (tỷ lệ 1:1:1) và chế độ dinh dưỡng N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O (tỷ lệ 4:1:3). Bên cạnh đó, điều kiện nhà kính cho tỷ lệ sống sót cao (79,8%) và cây sâm đã cho hoa (18 cây). Các cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* 5 năm tuổi cho khả năng tích lũy saponin G-Rg<sub>1</sub> 1,248% và G-Rb<sub>1</sub> 1,012% là tương đồng và saponin M-R<sub>2</sub> 1,417% là thấp hơn so với sâm Ngọc Linh tự nhiên (Quảng Nam và Kon Tum). Đây là cơ sở cho việc có thể di thực cây sâm Ngọc Linh tới các vùng có điều kiện sinh thái tương tự nhằm mở rộng vùng trồng sâm.

**Từ khóa:** điều kiện nuôi trồng, giá thể, Lâm Đồng, saponin, sâm Ngọc Linh.

**Chỉ số phân loại:** 4.1

## **Đặt vấn đề**

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam thuộc chi Nhân sâm (*Panax* L.), còn có các tên gọi khác là sâm Việt Nam, sâm Khu Năm (K5), sâm Trúc (sâm Đốt trúc, Trúc tiết sâm), củ Ngải rơm con, hay cây Thuốc giầu. Sâm Ngọc Linh là loài đặc biệt, có giá trị về khoa học và kinh tế, với thành phần saponin, hàm lượng các amino acid, các chất khoáng vi lượng trong củ, lá và rễ hơn nhiều loài sâm khác. Ngoài tác dụng dược lý, sâm Ngọc Linh còn giúp chống căng thẳng, trầm cảm, oxy hóa... [1]. Do vùng phân bố hạn chế và việc khai thác quá mức, sâm Ngọc Linh trở nên khan hiếm trong tự nhiên và được đưa vào Danh lục đỏ của IUCN (2003), cũng như danh sách các loài hạn chế khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại [2]. Trước nguy cơ tuyệt chủng của giống sâm quý, Chính phủ Việt Nam đã quyết định thành lập vùng cấm quốc gia ở khu vực có sâm mọc tập trung tại 2 tỉnh Kon Tum và Quảng Nam, đồng thời xếp sâm Ngọc Linh vào danh sách các loại cây cấm khai thác, mua bán bất hợp pháp.

Để bảo vệ cây thuốc này cùng một số cây dược liệu khác, một số địa phương đã triển khai di thực cây sâm Ngọc Linh về trồng tại địa phương. Lâm Đồng là một trong những tỉnh đầu tiên di thực cây sâm Ngọc Linh về trồng tại Đà Lạt. Tỉnh cũng đã từng bước áp dụng thành công tiến bộ khoa học và kỹ thuật vào làm chủ công nghệ nhân giống, ươm tạo và trồng sâm không bị lệ thuộc bởi thiên nhiên cũng như các yếu tố về thổ nhưỡng. Đây là tín hiệu khả quan đối với các tỉnh thành khác đang có ý định phát triển loài cây dược liệu quý này ở địa phương.

Việc tạo cây con *in vitro* có củ góp phần tăng sức sống của cây, nâng cao tỷ lệ sống sót của cây khi đưa ra vườn ươm là một trong những bước đi mới, góp phần bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý này. Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở điều kiện nhà kính và tự nhiên tại tỉnh Lâm Đồng là một trong những nhiệm vụ mang tính cấp thiết nhằm đánh giá khả năng nhân rộng loài sâm quý hiếm này trên địa bàn Đà Lạt (Lâm Đồng).

\*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com



# The *in vitro* cultivation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. in the natural and greenhouse conditions in Lam Dong province

Cong Du Phan<sup>1</sup>, Le Quoc Hung Nguyen<sup>1</sup>,  
Thanh Tung Hoang<sup>2</sup>, Manh Cuong Do<sup>2</sup>,  
Xuan Tham Le<sup>1</sup>, Tan Nhut Duong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Management Board of Dalat Zone for Biotechnology  
and Applied high - tech Agriculture

<sup>2</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research

Received 1 July 2019; accepted 19 August 2019

## Abstract:

Currently, Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is being over-exploited, so it is difficult to take the initiative in seed sources. In this study, Ngoc Linh ginseng derived from *in vitro* culture was used as an initial material source to investigate the effect of different types of substrates (Pindstrup clean soil, mountain humus, coconut fiber, dry cow manure, mushrooms cultivated residues, and rice husks), minerals (N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O ratio), and ecological conditions of four farming models (two greenhouse models, one roof house model, and one natural model) on adaptability, growth, development, and flowering of Ngoc Linh ginseng. The results showed that the Ngoc Linh ginseng derived from tissue culture exhibited good adaptation and growth on the humus soil:dry cow manure:coconut fiber ratio of 1:1:1 and N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O ratio of 3:1:1 at nursery stage (1 year old, fertilised once a month with a dose of 5 g/plant); meanwhile, it grew well in the planting period (>2 years old, fertilised once a month with a dose of 20 g/plant) under the humus soil:dry cow manure:Pindstrup ratio of 1:1:1, and N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O ratio of 4:1:3. Besides, the greenhouse model gave a high survival rate (79.8%) and high flowering rate (18 plants). Ngoc Linh ginseng (5 years old) derived from *in vitro* culture had the ability to accumulate saponins G-Rg<sub>1</sub> (1.248%) and G-Rb<sub>1</sub> (1.012%) that were similar to the natural Ngoc Linh ginseng, and its M-R<sub>2</sub> (1.417%) saponins accumulation was lower than that of natural Ngoc Linh ginseng (Quang Nam and Kon Tum provinces). This is the basis for being able to migrate Ngoc Linh ginseng to areas with similar ecological conditions to expand the ginseng growing area.

**Keywords:** cultivation conditions, Lam Dong, Ngoc Linh ginseng, saponin, substrate.

**Classification number:** 4.1

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

Cây sâm Ngọc Linh 1, 2 và 3 năm tuổi được ương trồng trên các giá thể đất sạch Pindstrup có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* (có 1-3 lá, thân củ có hình chóp với chồi chính và các mắt ngủ xung quanh hoặc thân củ có nhiều chồi và mắt ngủ, có rễ tơ dài 1-2 cm) [3-5].

### Phương pháp

Ảnh hưởng của các loại giá thể nuôi cấy khác nhau đến sự sinh trưởng của cây sâm *in vitro* ở điều kiện nhà kính: cây sâm *in vitro* (1 năm tuổi) khỏe mạnh, sinh trưởng và phát triển tốt được chuyển ra thích nghi ở điều kiện vườn ương trên giá thể đất sạch Pindstrup khoảng 1 tháng. Sau đó, những cây này được chuyển ra các chậu gốm (đường kính miệng 20 cm, đường kính đáy 12 cm, chiều cao 20 cm) với các loại giá thể khác nhau (đất sạch Pindstrup; đất mùn núi khu vực hồ Tuyên Lâm, Đà Lạt; xơ dừa đã xử lý chất tannin; phân bò khô hoại mục; bã trồng nấm của nấm mèo và vỏ trấu hun) được thiết kế thí nghiệm như ở bảng 1. Các chỉ tiêu về tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), đường kính tán lá (cm), khả năng sinh trưởng được ghi nhận sau 6 tháng nuôi trồng.

**Bảng 1.** Thiết kế thí nghiệm ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau đến sự thích nghi và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* ở điều kiện vườn ương.

| Nghiệm thức | Loại giá thể                                | Tỷ lệ |
|-------------|---------------------------------------------|-------|
| NT1         | Đất mùn núi                                 | 100%  |
| NT2         | Giá thể đất sạch Pindstrup*                 | 100%  |
| NT3         | Giá thể xơ dừa**                            | 100%  |
| NT4         | Đất mùn núi: giá thể Pindstrup              | 1:1   |
| NT5         | Đất mùn núi: xơ dừa                         | 1:1   |
| NT6         | Đất mùn núi: giá thể Pindstrup: xơ dừa      | 1:1:1 |
| NT7         | Đất mùn núi: giá thể Pindstrup              | 1:2   |
| NT8         | Đất mùn núi: xơ dừa                         | 1:2   |
| NT9         | Đất mùn núi: giá thể Pindstrup: xơ dừa      | 2:1:1 |
| NT10        | Đất mùn núi: phân bò khô: xơ dừa            | 1:1:1 |
| NT11        | Đất mùn núi: phân bò khô: bã nấm            | 1:1:1 |
| NT12        | Đất mùn núi: phân bò khô: giá thể Pindstrup | 1:1:1 |
| NT13        | Đất mùn núi: phân bò khô: vỏ trấu hun       | 1:1:1 |

(\*): giá thể đất sạch (Pindstrup): N 0,33%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,06%, K<sub>2</sub>O 0,12%, mùn và hữu cơ >90%, pH 6,0-6,5, EC 1,2-1,8 mS/cm, độ ẩm 50±5%, màu nâu sẫm; (\*\*): giá thể xơ dừa: EC≤0,5 mS/cm; pH 5,8-7,0; độ ẩm <40%; tanin và lignin <10%.



*Ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng khác nhau đến sự sinh trưởng của cây sâm in vitro ở điều kiện nhà kính:* các tỷ lệ phân bón ( $N:P_2O_5:K_2O$ ) 10:4:1; 3:1:1; 4:1:3 được áp dụng cho cây sâm nuôi cấy *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm và vườn trồng: i) Giai đoạn vườn ươm: chu kỳ bón phân được thực hiện 1 tháng/lần với liều lượng 5 g/gốc, bón phân quanh gốc vào buổi chiều (sau 15 giờ). Các loại phân bón sử dụng là urea Phú Mỹ ( $\geq 46,3\%$  N,  $\leq 1\%$  biuret, độ ẩm  $\leq 0,4\%$ , hạt màu trắng), DAP Philipin (18% N, 46%  $P_2O_5$ ) và kali sulphate Phú Mỹ (50%  $K_2O$  và 18% S). Theo dõi tỷ lệ sống của cây (%), hình thái về thân, lá của cây con sau 6 tháng nuôi trồng; ii) Giai đoạn vườn trồng: chu kỳ bón phân được thực hiện 1 tháng/lần với liều lượng 20 g/gốc, bón phân quanh gốc vào buổi chiều (sau 15 giờ). Theo dõi tỷ lệ sống, hình thái và sự phát triển của thân, lá, củ, rễ sau 6 tháng nuôi trồng.

*Đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sâm in vitro ở các điều kiện nuôi trồng khác nhau:* trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu, các yếu tố sinh thái của môi trường như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, thổ nhưỡng của vùng núi Ngọc Linh được khảo sát để xây dựng tiểu vùng sinh thái có yếu tố sinh thái tương đối phù hợp nhằm đánh giá khả năng ra hoa của cây sâm trong điều kiện tại Đà Lạt. Trên cơ sở tổng hợp các kết quả nghiên cứu về yếu tố sinh thái môi trường tại vùng núi Ngọc Linh, 4 vị trí có điều kiện tương đối phù hợp đã được điều tra, khảo sát và lựa chọn để xây các điều kiện tại Đà Lạt và vùng phụ cận bao gồm 2 điều kiện nhà kính (35 Trần Hưng Đạo, phường 10, Đà Lạt và xã Đa Sar, Lạc Dương); 1 nhà mái che kiên cố tại khu vực hồ Tuyền Lâm; 1 điều kiện trồng ngoài trời tại hồ Tuyền Lâm, cụ thể như sau:

Nhà kính tại Đà Lạt: khu vực có nhiều tán cây che mát (diện tích 50 m<sup>2</sup>), thiết kế nhà kính theo hướng đông tây; nhiệt độ bình quân ngày đêm dao động từ 14 đến 26°C, cường độ ánh sáng trung bình (ban ngày) 3.200-4.000 lux; số giờ nắng trung bình tháng trong năm 186 giờ; độ ẩm trung bình 78%. Đây là nhà kính hiện đại, có hệ thống tưới được thiết kế theo công nghệ phun sương tự động, điều chỉnh tùy theo thời tiết; hệ thống màng che sáng bằng lưới đen. Xung quanh nhà kính, phần tiếp giáp mặt đất được phủ bạt nilon để hạn chế cỏ và côn trùng trong đất. Cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được bố trí trồng trong các chậu lớn nhỏ tùy vào độ tuổi của cây.

Nhà kính tại xã Đa Sar, huyện Lạc Dương: khu vực giáp với rừng phòng hộ, thiết kế nhà kính theo hướng đông tây (tránh nắng trực tiếp buổi chiều); nhiệt độ bình quân ngày đêm dao động từ 12 đến 26°C; số giờ nắng trung bình tháng trong năm 189 giờ; độ ẩm trung bình 67%.

Nhà mái che kiên cố tại khu vực hồ Tuyền Lâm: khu vực có rừng và gần hồ nước (diện tích 100 m<sup>2</sup>), thiết kế nhà theo hướng đông bắc - tây nam; nhiệt độ trung bình ngày đêm dao động từ 10 đến 22°C; số giờ nắng trung bình tháng trong năm 123 giờ; độ ẩm trung bình 80% (ở ngoài trời) và 80-85% (ở dưới tán rừng). Nhà mái che được thiết kế với khung gỗ, mái che bằng tranh, xung quanh bao bởi lớp lưới đen, hệ thống tưới phun sương tự động.

Khu vực ngoài trời hồ Tuyền Lâm: khu vực rừng hồ Tuyền Lâm (diện tích 200 m<sup>2</sup>), được rào chắn lưới xung quanh tránh động vật gây hại cây. Khu vực được bố trí ở vị trí có độ che phủ rừng trên 80%, gần hồ nước để chủ động về nước tưới cho cây. Tại mô hình, đất trồng (0,5% N, 0,3%  $K_2O$ , 293,1 mg/kg  $P_2O_5$ , 12,6% chất hữu cơ, pH 6,1, đất thịt nhẹ) được lên luống bằng phẳng, hơi xuôi để có thể thoát nước tốt khi mùa mưa đến. Mặt luống rộng 40 cm, cao 20-30 cm, chiều dài luống 10 m.

*Khả năng tích lũy saponin:* khả năng tích lũy các saponin chính ( $M-R_2$ ,  $Rb_1$  và  $Rg_1$ ) của sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* ở các độ tuổi khác nhau (2, 3, 4 và 5 năm tuổi) được phân tích tại Trung tâm Sâm và dược liệu TP Hồ Chí Minh theo phương pháp định lượng G- $Rb_1$ , G- $Rg_1$  và  $M-R_2$  trong sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận [6].

So sánh và đánh giá hàm lượng saponin của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô trồng tại Lâm Đồng với các kết quả hiện có về sâm Ngọc Linh đã công bố trước đây.

### Xử lý số liệu

Phương pháp bố trí thí nghiệm đồng ruộng theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCDB); thí nghiệm nhắc lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức, mỗi ô nghiệm thức 5 m<sup>2</sup> với 45 cây/nghiệm thức. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và ANOVA với mức ý nghĩa 5%.

### Kết quả và thảo luận

*Ảnh hưởng của các loại giá thể nuôi trồng khác nhau đến sự sinh trưởng của cây sâm in vitro ở điều kiện nhà kính*

Sau 3 tháng nuôi trồng tại điều kiện vườn ươm, kết quả ban đầu cho thấy chỉ có 5 loại giá thể nuôi trồng (NT4, NT7, NT9, NT10 và NT12) thích hợp cho sự sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô sinh trưởng và phát triển tốt. Chính vì vậy, 5 loại giá thể này được sử dụng để tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của cây sâm nuôi cấy mô (1, 2 và 3 năm tuổi). Sau 6 tháng theo dõi, kết quả được ghi nhận trong bảng 2.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của các loại giá thể nuôi cấy khác nhau lên sự sinh trưởng của cây sâm *in vitro* ở điều kiện nhà kính.**

| Tuổi của cây | Nghiệm thức | Chiều cao thân (cm) | Đường kính tán lá (cm) |
|--------------|-------------|---------------------|------------------------|
| 1 năm        | NT4         | 4,58                | 4,58                   |
|              | NT7         | 4,69                | 6,63                   |
|              | NT9         | 5,05                | 4,62                   |
|              | NT10        | 4,30                | 4,53                   |
|              | NT12        | 4,52                | 5,72                   |
| 2 năm        | NT4         | 9,01                | 8,12                   |
|              | NT7         | 9,24                | 7,70                   |
|              | NT9         | 9,12                | 8,50                   |
|              | NT10        | 8,67                | 9,12                   |
|              | NT12        | 8,92                | 9,06                   |
| 3 năm        | NT4         | 10,19               | 8,56                   |
|              | NT7         | 12,56               | 11,70                  |
|              | NT9         | 12,30               | 10,57                  |
|              | NT10        | 13,58               | 12,65                  |
|              | NT12        | 13,75               | 11,94                  |

Qua bảng 2 cho thấy, chiều cao và đường kính tán tăng dần theo năm tuổi. Giai đoạn cây 1 năm tuổi, sự khác biệt về các chỉ tiêu chiều cao thân và đường kính tán lá ở 5 loại giá thể là không lớn; tuy nhiên, khi cây ở giai đoạn 2 và 3 năm, chiều cao cây và đường kính tán tăng mạnh ở điều kiện nuôi trồng trong giá thể đất mùn:phân bò khô:xơ dừa và đất mùn:phân bò khô:giá thể Pindstrup. Điều này có thể cho thấy nhu cầu dinh dưỡng bắt đầu tăng mạnh ở 2-3 năm tuổi. Như vậy, qua 5 nghiệm thức theo dõi trong 6 tháng cho thấy, trong những năm đầu cây sâm Ngọc Linh không cần nhiều dinh dưỡng, các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây càng tăng khi bắt đầu bước sang năm thứ 2 trở đi. Giá thể phù hợp cho việc trồng sâm Ngọc Linh *in vitro* tại Đà Lạt tương ứng với các nghiệm thức NT10 và NT12. Trong đó, NT10 phù hợp cho cây ở giai đoạn vườn ươm và NT12 phù hợp cho cây ở giai đoạn vườn trồng với cây sâm Ngọc Linh *in vitro* từ 2, 3 năm tuổi trở lên.

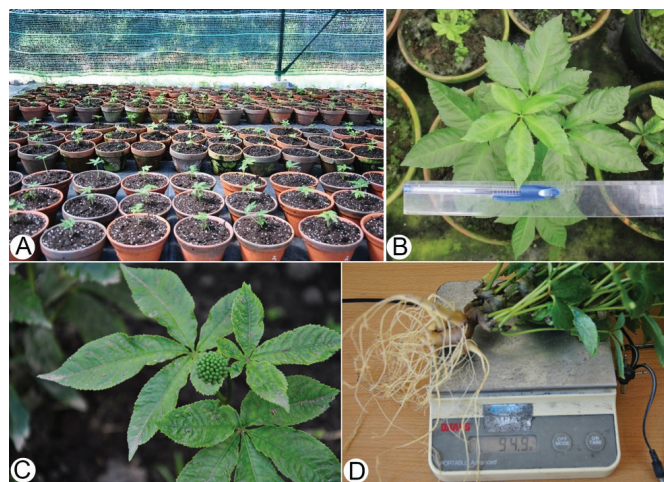
#### **Ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng khác nhau lên sự sinh trưởng của cây sâm *in vitro* ở điều kiện nhà kính**

Sau 6 tháng theo dõi, đối với giai đoạn vườn ươm (1 năm tuổi), cây phát triển tốt ở nghiệm thức N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O tỷ lệ 3:1:1 (bảng 3, hình 1A); ở giai đoạn vườn trồng, cây 2, 3 năm tuổi sinh trưởng tốt ở nghiệm thức tỷ lệ 4:1:3 (bảng 3). Đối với giai đoạn vườn trồng, nghiệm thức tỷ lệ 4:1:3 cây phát triển nhanh hơn so với ở nghiệm thức tỷ lệ 3:1:1. Ở nghiệm thức này, cây phát triển mạnh về chiều cao, thân lá, đường kính tán, số lá trên cây cũng ra nhiều và xanh, thân cây to và cứng cáp, rễ phát triển mạnh, đường kính củ phát triển (bảng 3).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của phân bón đa lượng (N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O) đến sự phát triển của sâm Ngọc Linh *in vitro* giai đoạn vườn ươm (1 năm tuổi) và giai đoạn vườn trồng (cây 2, 3, 4 và 5 năm tuổi).**

| Tuổi cây | Nghiệm thức | Chiều cao thân (cm) | Số lá kép/cây | Đường kính tán lá (cm) | Khối lượng thân rễ (g) |
|----------|-------------|---------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| 1 tuổi   | 10:4:1      | 4,01                | 1,0           | 4,06                   | -                      |
|          | 4:1:3       | 4,01                | 1,0           | 4,58                   | -                      |
|          | 3:1:1       | 4,69                | 1,0           | 5,63                   | -                      |
| 2 tuổi   | 10:4:1      | 9,04                | 1,0           | 8,06                   | 5,00                   |
|          | 4:1:3       | 10,06               | 1,01          | 10,3                   | 8,01                   |
|          | 3:1:1       | 10,08               | 1,06          | 8,54                   | 4,63                   |
| 3 tuổi   | 4:1:3       | 21,0                | 2,04          | 15,8                   | 11,5                   |
|          | 3:1:1       | 20,2                | 1,86          | 13,45                  | 10,9                   |
| 4 tuổi   | 4:1:3       | 23,46               | 3,0           | 17,4                   | 43,50                  |
|          | 3:1:1       | 20,96               | 2,71          | 14,13                  | 38,12                  |
| 5 tuổi   | 4:1:3       | 24,42               | 3,20          | 15,0                   | 77,50                  |

Giai đoạn cây 2 năm tuổi, tỷ lệ phân bón phù hợp cho cây sinh trưởng và phát triển tốt là tỷ lệ 4:1:3. Giai đoạn cây 3 năm tuổi trở lên (hình 1B) chúng tôi loại bỏ công thức 10:4:1, chỉ còn lại 2 tỷ lệ phân bón. Kết quả cho thấy, cả cây 3 và 4 năm tuổi đều thích hợp ở tỷ lệ phân bón 4:1:3. Giai đoạn cây 5 năm tuổi (hình 1C), chúng tôi chỉ còn theo dõi cây trồng ở 1 tỷ lệ phân bón duy nhất là 4:1:3. Kết quả cho thấy, khối lượng thân rễ trung bình trên mẫu thu đạt 77,5 g, đặc biệt có cây đạt 94,9 g (hình 1D).



**Hình 1. Cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* sinh trưởng trong điều kiện nuôi trồng tại Đà Lạt. (A) Cây 1 năm tuổi; (B) Cây 3 năm tuổi; (C) Cây 5 năm tuổi ra hoa; (D) Cây 5 năm tuổi cho khối lượng 94,9 g.**

#### **Đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sâm *in vitro* ở các điều kiện nuôi trồng khác nhau**

Ảnh hưởng của các yếu tố sinh thái môi trường đến quá trình thích nghi, sinh trưởng và ra hoa của cây sâm Ngọc Linh tại các điều kiện nuôi trồng khác nhau (bảng 4) cũng được ghi nhận.



**Bảng 4. Các yếu tố sinh thái tại các điều kiện nuôi trồng.**

| Địa điểm                  | Nhiệt độ ban ngày (°C) | Độ ẩm đất (%) | Độ ẩm không khí (%) | pH đất | Ánh sáng (lux) | Biên độ nhiệt ngày đêm* |
|---------------------------|------------------------|---------------|---------------------|--------|----------------|-------------------------|
| Nhà kính 35 Trần Hưng Đạo | 24,0                   | 80-85         | 70-90               | 6,5    | 4.000-12.000   | 13,2-27,5               |
| Nhà kính xã Đa Sar        | 26,5                   | 80-95         | 70-92               | 6,5    | 4.000-12.000   | 13,2-27,5               |
| Nhà mái che               | 25,5                   | 80            | 60-70               | 6,5    | 2.800-12.000   | 13,2-27,5               |
| Dưới tán rừng             | 25,5                   | 80            | 70-75               | 6,0    | 400-8.000      | 13,2-27,5               |

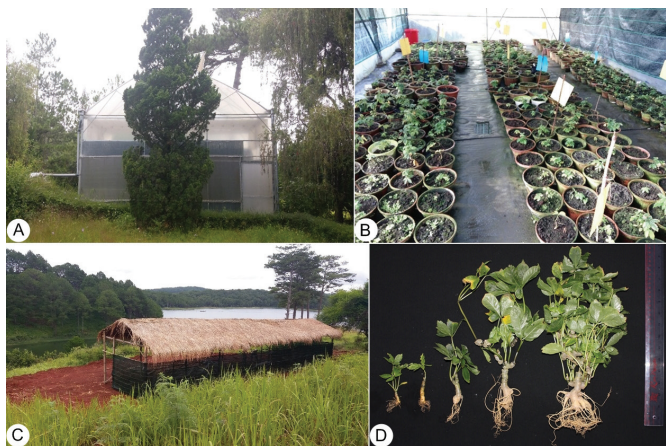
\*: theo số liệu của Trạm Khí tượng thủy văn Đà Lạt - trung bình cho năm 2016.

Kết quả cho thấy, khi trồng cây sâm Ngọc Linh *in vitro* ở điều kiện nuôi trồng khác nhau cho kết quả khác nhau. Tỷ lệ sống sót của cây sâm Ngọc Linh đạt cao nhất ở nhà kính tại 35 Trần Hưng Đạo (79,8%), tiếp theo là khu vực ngoài trời hồ Tuyền Lâm (70,0%), khu vực nhà mái che (61,0%) và thấp nhất tại khu vực xã Đa sar (40%) (bảng 5).

**Bảng 5. Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* ở các điều kiện nuôi trồng khác nhau.**

| Điều kiện nuôi trồng             | Tỷ lệ sống (%) | Số cây ra hoa |          |          |          |
|----------------------------------|----------------|---------------|----------|----------|----------|
|                                  |                | Tổng          | Năm 2017 | Năm 2018 | Năm 2019 |
| Nhà kính 35 Trần Hưng Đạo        | 79,8           | 18            | 6        | 8        | 4        |
| Ngoài trời hồ Tuyền Lâm          | 70,0           | 7             | 2        | 3        | 2        |
| Khu vực xã Đa Sar                | 40,0           | —             | —        | —        | —        |
| Nhà mái che kiên cố hồ Tuyền Lâm | 61,0           | —             | —        | —        | —        |
| Tổng số cây ra hoa               |                | 25            | 8        | 11       | 6        |

Kết quả cũng cho thấy, chỉ có 2 mô hình (hình 2) có cây ra hoa là tại khu vực 35 Trần Hưng Đạo và khu vực rừng hồ Tuyền Lâm (2 điều kiện nuôi trồng đã có 25 cây ra hoa).



**Hình 2. Điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* tại Đà Lạt, Lâm Đồng. (A, B) Nhà kính 35 Trần Hưng Đạo, Đà Lạt; (C) Nhà mái che hồ Tuyền Lâm, Đà Lạt; (D) Cây sâm Ngọc Linh 1, 2, 3, 4 và 5 năm tuổi (từ trái sang phải).**

Hai mô hình tại khu vực xã Đa Sar và nhà mái che kiên cố khu vực hồ Tuyền Lâm không có cây cho hoa. Điều này có thể lý giải rằng: các yếu tố sinh thái tại 2 khu vực trên chưa phù hợp. Ở khu vực xã Đa Sar, để giảm nhiệt độ xuống mức thấp nhất có thể, ngoài việc che sáng bằng lưới chắn sáng, chúng tôi còn tăng lượng nước tưới phun sương, dẫn đến tăng độ ẩm đất, do đó cây sinh trưởng phát triển kém, tỷ lệ sống không cao. Khu vực nhà mái che kiên cố, mái lợp bằng phen tranh, xung quanh chắn lưới đen: mặc dù phần mái được lợp bằng tấm phen tranh, khả năng che chắn ánh sáng tốt, lượng nước tưới ổn định, nhưng độ ẩm tương đối thấp, gió nhiều (do địa hình tương đối thông thoáng). Mặc dù cây sinh trưởng tương đối tốt, nhưng chưa có cây ra hoa - đây cũng là yếu tố cần xem xét đánh giá thêm.

### Khả năng tích lũy saponin

Các mẫu cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* (hình 2D) được phân tích hàm lượng saponin. Kết quả được ghi nhận và so sánh với mẫu sâm tự nhiên thu nhận tại vùng trồng sâm Ngọc Linh (4 và 5 năm tuổi) ở Quảng Nam, Kon Tum trong bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả phân tích hàm lượng saponin trong sâm Ngọc Linh *in vitro* qua các năm tuổi.**

| Hợp chất    | G-Rg <sub>1</sub> (%) | M-R <sub>2</sub> (%) | G-Rb <sub>1</sub> (%) | Tổng (G-Rg <sub>1</sub> + M-R <sub>2</sub> + G-Rb <sub>1</sub> ) (%) |
|-------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Mẫu 2 tuổi  | 0,404±0,007           | 0,073±0,001          | 0,196±0,005           | 0,673±0,013                                                          |
| Mẫu 3 tuổi  | 0,873±0,014           | 0,225±0,018          | 0,506±0,005           | 1,604±0,037                                                          |
| Mẫu 4 tuổi  | 1,149±0,011           | 1,389±0,014          | 0,988±0,013           | 3,526±0,038                                                          |
| Mẫu 4 tuổi* | 1,110±0,0032          | 2,040±0,0024         | 0,990±0,0087          | 4,140±0,0143                                                         |
| Mẫu 5 tuổi  | 1,248±0,009           | 1,417±0,032          | 1,012±0,003           | 3,677±0,044                                                          |
| Mẫu 5 tuổi* | 1,550±0,0088          | 3,120±0,0538         | 1,370±0,0207          | 6,040±0,0833                                                         |

\*: bản mô tả tính chất, chất lượng, danh tiếng của sản phẩm sâm củ mang chỉ dẫn địa lý “Ngọc Linh” do Cục Sở hữu trí tuệ cấp ngày 24/5/2016.

Từ kết quả của đề tài so sánh với cây sâm Ngọc Linh được trồng tại vùng núi Ngọc Linh cho thấy, đối với sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro*, saponin trong cây 4 năm tuổi có hàm lượng G-Rg<sub>1</sub> và G-Rb<sub>1</sub> tương đương cây sâm Ngọc Linh 4 năm tuổi được trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Riêng hàm lượng M-R<sub>2</sub> thấp hơn (1,389 so với 2,040), đạt 68% so với sâm trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Tính tổng thể, so sánh ở cây 4 năm tuổi: hàm lượng saponin của cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* đạt 85% so với cây sâm được trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Đối với sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* 5 năm tuổi, hàm lượng G-Rg<sub>1</sub> và G-Rb<sub>1</sub> thấp hơn cây sâm Ngọc Linh 5 năm tuổi được trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Riêng hàm lượng M-R<sub>2</sub> thấp hơn nhiều (1,417 so với 3,120), đạt 45,4% so với sâm trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Tính tổng thể, so sánh ở cây 5 năm tuổi, hàm lượng saponin của cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* đạt 60,8% so với cây sâm được trồng tại vùng núi Ngọc Linh. Tuy nhiên, khối lượng trung bình (77,50 g) thu nhận được tại điều kiện

Đà Lạt, Lâm Đồng tương đương khoảng 10-15 củ/kg thì hiệu quả mang lại cũng tương đối cao.

Với tình hình sâm Ngọc Linh tự nhiên bị khai thác bừa bãi và trữ lượng không còn đáng kể như hiện nay, biện pháp nuôi trồng tạo cây sâm hoàn chỉnh giúp ta có thể chủ động trong nguồn cung cấp sâm. Khi khảo sát Trại được liệu Trà Linh tại tỉnh Quảng Nam, Đặng Ngọc Phái và cộng sự (2002) đã đưa ra một số khó khăn của việc chăm sóc cây sâm Ngọc Linh (bón các loại phân hữu cơ, NPK...) chưa thực hiện được do đặc điểm địa hình trở ngại cho việc vận chuyển, cũng như khó khăn về kinh phí [7]. Do trồng ngoài tự nhiên nên cây sâm dễ bị các loại bệnh như rỉ sắt, thối cổ rễ (rễ nhũn dần), bệnh vàng lá... Theo lý thuyết, số lượng hạt mỗi năm thu được sẽ tăng lên do số lượng cây có khả năng thu được hạt hàng năm tăng, nhưng trên thực tế số lượng này không tăng nhiều do các nguyên nhân như hạn chế trong kỹ thuật chăm sóc của công nhân; sự phá hoại của các loại chim, chuột, sóc; ảnh hưởng của thời tiết...

Một nhược điểm nữa của việc nuôi trồng theo phương pháp truyền thống là cần diện tích canh tác lớn, thời gian trồng lâu (khoảng 5-6 năm mới thu hoạch được). Hơn nữa, loài sâm này chỉ có thể tăng trưởng trong những điều kiện nhất định, nên những khu vực có thể trồng trọt là rất hạn chế. Mặt khác, lượng sâm thu được cũng không nhiều do củ sâm 5-6 tuổi có khối lượng tươi bé nhất khoảng 5-7 g, lớn chỉ khoảng 50-70 g. Hiện nay, giá sâm Ngọc Linh tăng lên rất cao, đạt 40-50 triệu đồng/kg sâm tươi (trên 20 củ) và 60-80 triệu đồng/kg sâm tươi (dưới 20 củ) nên việc thất thoát nguồn sâm do khai thác bừa bãi và trộm cắp là một điều rất đáng lo ngại.

Việc ứng dụng nuôi cấy mô để nhân giống cây sâm Ngọc Linh nhằm tạo ra một nguồn giống lớn cung cấp cho các khu vực trồng sâm Ngọc Linh là một hướng để giải quyết những hạn chế còn tồn tại của phương pháp nhân giống truyền thống. Mặt khác bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể tạo ra một nguồn giống lớn, cung cấp cho người dân, từ đó có thể xã hội hóa việc trồng sâm Ngọc Linh, mang lại lợi ích kinh tế cho đồng bào các dân tộc và phát triển thương hiệu sâm Việt Nam trên thế giới. Hiện nay, có hai tỉnh có khu vực trồng và phát triển cây sâm Ngọc Linh là Quảng Nam và Kon Tum. Tỉnh Quảng Nam có Trại được liệu Trà Linh thuộc xã Trà Linh là xã vùng cao phía tây nam của huyện Trà My. Tỉnh Kon Tum có Lâm trường sâm Ngọc Linh với chót sâm đóng tại xã Măng Ri, huyện Tu Mơ Rông, đây là khu vực trồng sâm nằm trong dự án bảo tồn cây sâm Ngọc Linh của Chính phủ do Công ty Đầu tư phát triển lâm nghiệp, công nghiệp và dịch vụ Đắk Tô quản lý. Ngoài ra, ở hai tỉnh này còn có các điểm trồng tự phát của người dân. Các khu vực trồng sâm đều nằm trên núi cao, có khí hậu mát mẻ, nhiệt độ trung bình 20-23°C, nhiệt độ cao nhất trung bình 28°C, nhiệt độ thấp nhất trung bình 5-10°C. Nhờ điều kiện khí hậu mát mẻ như trên, cây sâm mới có thể tồn tại và phát triển ở nước ta, nơi có khí hậu nhiệt đới gió

mùa [7]. Nghiên cứu cho thấy, với điều kiện nuôi trồng ở Đà Lạt và cách thức bố trí thí nghiệm tương đồng với vùng núi Ngọc Linh thì cây sâm Ngọc Linh có thể thích nghi và sinh trưởng. Kết quả ghi nhận về tỷ lệ sống sót, khả năng sinh trưởng, ra hoa của cây chưa cao so với kỳ vọng nhưng đây là nghiên cứu tiền đề cho những nghiên cứu sâu và rộng hơn trong tương lai nhằm phát triển vùng trồng sâm Ngọc Linh.

## Kết luận

Kết quả ghi nhận được cho thấy, giá thể đất mùn:phân bò khô:xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1) và chế độ dinh dưỡng N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O (3:1:1) ở giai đoạn vườn ươm (cây 1 năm tuổi); giá thể đất mùn:phân bò khô:Pindstrup (tỷ lệ 1:1:1) và chế độ dinh dưỡng N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O (tỷ lệ 4:1:3) ở giai đoạn vườn trồng (cây 2 năm tuổi trở lên) là thích hợp cho cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy mô cho sự thích nghi và sinh trưởng. Các cây sâm Ngọc Linh có nguồn gốc nuôi cấy *in vitro* 5 năm tuổi cho khả năng tích lũy saponin G-Rg<sub>1</sub> 1,248% và G-Rb<sub>1</sub> 1,012% là tương đồng và saponin M-R<sub>2</sub> 1,417% là thấp hơn so với sâm Ngọc Linh tự nhiên trồng tại Quảng Nam và Kon Tum. Kết quả của nghiên cứu đã bước đầu đánh giá được khả năng thích nghi của cây sâm Ngọc Linh ở điều kiện Đà Lạt (Lâm Đồng) - nơi có khí hậu tương đồng với vùng núi Ngọc Linh thuộc 2 tỉnh Quảng Nam và Kon Tum (vùng phân bố sâm Ngọc Linh tự nhiên).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thượng Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007), *Sâm Việt Nam và một số họ Nhân sâm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [2] G. Bruszt, T. Ammour, J. Claussen, Z. Ofir, N.C. Saxena, S. Turner (2003), *External Review*, IUCN (International Union for Conservation of Nature).
- [3] Dương Tấn Nhựt (2011), *Hệ thống nuôi cấy lớp mỏng tế bào trong nghiên cứu chương trình phát sinh hình thái và bảo tồn cây sâm Ngọc Linh*, Báo cáo tổng kết đề tài NAFOSTED.
- [4] Dương Tấn Nhựt (2014), *Hệ thống chiếu sáng đơn sắc - nguồn sáng nhân tạo cho nghiên cứu tái sinh và nhân giống một số loại cây trồng nuôi cấy in vitro*, Báo cáo tổng kết đề tài NAFOSTED.
- [5] Dương Tấn Nhựt (2014) *Ứng dụng hệ thống chiếu sáng đơn sắc (LED) trong nghiên cứu nhân nhanh cây sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) với số lượng lớn phục vụ nhu cầu nhân giống của tỉnh Quảng Nam*, Báo cáo tổng kết dự án sản xuất thử nghiệm cấp Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.
- [6] Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận (2011), “Xây dựng phương pháp định lượng G-Rb<sub>1</sub>, G-Rg<sub>1</sub> và M-R<sub>2</sub> trong sâm Việt Nam bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Dược liệu*, **16**, tr.44-50.
- [7] Đặng Ngọc Phái, Nguyễn Như Chính, Nguyễn Minh Đức, Trần Thị Vi Cẩm, Lê Thế Tùng, Nguyễn Minh Cang (2002), “Tình hình trồng trọt - phát triển cây sâm Việt Nam và một số kết quả nghiên cứu về cây sâm Việt Nam”, *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **6**, tr.12-18.



# Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng *Erwinia carotovora* từ đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam

Trương Thị Chiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Cảnh<sup>2</sup>,  
Nguyễn Ngọc Lan<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>1</sup>, Trần Bảo Trâm<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

<sup>2</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu Hệ gen

Ngày nhận bài 6/5/2019; ngày chuyển phản biện 10/5/2019; ngày nhận phản biện 13/6/2019; ngày chấp nhận đăng 24/6/2019

## Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn ở cây trồng từ các mẫu đất trồng sâm Ngọc Linh thu tại huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã sàng lọc và xác định được 8 chủng trong số 65 chủng vi khuẩn phân lập có khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn. Chủng K29 được xác định là vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh enzyme và đồng hóa/lên men được nhiều nguồn cacbon, có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng *E. carotovora* lên tới 27 mm và có quan hệ với loài *Bacillus amyloliquefaciens* ở mức độ tương đồng 99,44%.

**Từ khóa:** bệnh thối nhũn, *Erwinia carotovora*, kháng khuẩn, vi khuẩn đất.

**Chỉ số phân loại:** 4.1

## **Đặt vấn đề**

Việc sử dụng các vi sinh vật có lợi là một trong những phương pháp an toàn nhất trong việc kiểm soát sinh học mầm bệnh ở thực vật. Phần lớn các chủng vi khuẩn được khai thác làm thuốc trừ sâu sinh học thuộc chi *Agrobacterium*, *Pseudomonas* và *Bacillus* [1]. Vi khuẩn sản xuất kháng sinh có thể được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như đất, nước biển, thực vật, địa y và cả động vật. Theo Bubnoff và cs (2006) [2], các nhà khoa học đang liên tục tìm kiếm các loại kháng sinh mới từ vi sinh vật ở những nơi có điều kiện đặc biệt như bùn, biển sâu và rong biển. Tuy nhiên, đất vẫn là mục tiêu quan trọng nhất đối với hầu hết các nhà nghiên cứu trong nỗ lực tìm ra các loại kháng sinh mới có giá trị [3] bởi nhiều vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn sống trong đất có khả năng chuyển hóa các chất thứ cấp và hoạt động như một kháng sinh hữu ích.

Thối rễ là một trong những bệnh gây tổn thất lớn về năng suất và chất lượng của nhân sâm [4, 5]. Việc trồng nhân sâm liên tục dễ gây cho rễ bị các bệnh rỉ sắt và thối nhũn [6, 7]. Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng các chất đối kháng vi sinh vật đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và được coi như một phương pháp hiệu quả để giảm sự phát triển của mầm bệnh thực vật. Cơ chế đối kháng với vi sinh vật gây bệnh có thể ở các dạng như tiết ra chất kháng sinh,

cạnh tranh về dinh dưỡng hoặc tấn công trực tiếp lên vi sinh vật gây bệnh hay tiết ra những chất kích thích sinh trưởng giúp cho cây trồng tăng khả năng kháng bệnh... Tuy nhiên, các chất đối kháng vi khuẩn chống thối rễ được tìm thấy ở đất trồng nhân sâm rất hiếm [8], mới chỉ có trong nghiên cứu của Dong và cs (2018) đã xác định một số chủng thuộc chi *Bacillus* là tác nhân kiểm soát sinh học mạnh trong đất trồng tam thất (*Panax notoginseng*) ở Trung Quốc như *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* (B5), *B. cereus sensulato* (B25) và *Bacillus sp.* (B35), chủng *B. subtilis* 50-1 được xác định là vi khuẩn kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh với hiệu quả kiểm soát sinh học lên tới 67,8%.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn từ đất trồng sâm có hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối củ. Đây là vấn đề có ý nghĩa thực tế và có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh cho cây sâm Ngọc Linh phục vụ phát triển bền vững sản phẩm quốc gia.

## **Vật liệu và phương pháp nghiên cứu**

### *Vật liệu*

Mẫu đất sâm Ngọc Linh được lấy ở 3 khu trồng sâm với các độ tuổi khác nhau, thuộc Trung tâm sâm Ngọc Linh (xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam). Mẫu đất

\*Tác giả liên hệ: Email: trantram\_74@yahoo.com

# Isolation and selection of bacterial strains with bioactivity against *Erwinia carotovora* from Ngoc Linh ginseng cultivated soil in Quang Nam

Thi Chien Truong<sup>1</sup>, Thi Thanh Mai Nguyen<sup>1</sup>,  
Xuan Canh Nguyen<sup>2</sup>, Ngoc Lan Nguyen<sup>3</sup>,  
Thi Hien Nguyen<sup>1</sup>, Bao Tram Tran<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Experimental Biology,  
National Center for Technological Progress

<sup>2</sup>Vietnam National University of Agriculture

<sup>3</sup>Institute of Genome Research

Received 6 May 2019; accepted 24 June 2019

## Abstract:

This study aims to isolate and select bacterial strains that are antagonistic to *Erwinia carotovora* causing the soft rot disease on plants from the Ngoc Linh ginseng cultivated soil in Nam Tra My district, Quang Nam province. Eight out of 65 bacterial strains that were screened and identified by the agar diffusion plate method exhibited their resistance to *E. carotovora*. The K29 strain was determined as a Gram-positive bacterium, having the capability of producing enzymes and assimilating/fermenting different carbon sources, having the strongest anti-bacterial activity with a resistant zone diameter of 27 mm to *E. carotovora* and relating closely to *Bacillus amyloliquefaciens* with 99.44% similarity.

**Keywords:** antibacterial, *Erwinia carotovora*, soft rot disease, soil bacteria.

**Classification number:** 4.1

được dán nhãn, để trong túi nilon đã khử trùng và bảo quản ở 4°C trước khi tiến hành thí nghiệm.

Chủng vi khuẩn kiểm định *E. carotovora* M5.2 do Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

## Phương pháp nghiên cứu

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *E. carotovora*:

Việc sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa

thạch [9]: vi khuẩn được cấy đều trên đĩa petri chứa môi trường R2A ở 37°C. Sau 2 ngày nuôi cấy, chủng vi khuẩn được cấy vào đĩa petri chứa môi trường MPA đã được cấy trải vi khuẩn, ủ ở 4°C trong 2 giờ để các hoạt chất từ đĩa thạch khuếch tán vào môi trường, sau đó cho vào tủ ẩm 37°C. Đường kính vòng ức chế sinh trưởng được xác định sau một ngày nuôi cấy. Đối chứng dương là kháng sinh gentamycin 80 µg/g.

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn:

- Quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của vi khuẩn trên môi trường R2A sau nuôi cấy 2 ngày ở 37°C.

- Kiểm tra các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng kit API 50E (Biomérieux).

- Xác định khả năng sinh tổng hợp một số enzyme (amylase, protease, cellulase) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

## Định danh chủng K29:

DNA tổng số được tách chiết bằng GeneJET Genomic DNA purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). Phản ứng khuếch đại gen 16S rRNA được xác nhận bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR được làm sạch và giải trình tự sử dụng mồi 27F trên máy giải trình tự gen tự động ABI 3500 Bio system (USA). Dữ liệu giải trình tự 16S rRNA của chủng K29 được phân tích BLAST để so sánh sự tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng gen GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp khoảng cách (Neighbor-joining) trên phần mềm MEGA 7 [10].

## Kết quả nghiên cứu

### Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. carotovora*

Nghiên cứu đặc điểm của 65 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất trồng sâm Ngoc Linh cho thấy khuẩn lạc của hầu hết các chủng có màu trắng, trắng trong hoặc trắng sữa, chỉ một số ít có màu vàng, vàng nhạt, hồng và hồng đỏ. Hình thái các khuẩn lạc chủ yếu có dạng tròn, bề mặt nhẵn, bóng, viền trơn hoặc nhẵn.

Kết quả sàng lọc trong số 65 chủng vi khuẩn có 8 chủng có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *E. carotovora*. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

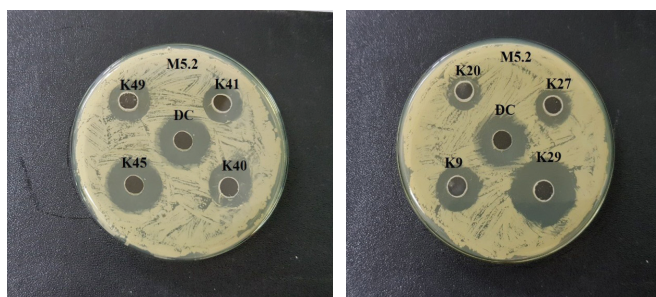
**Bảng 1.** Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng.

| Chủng | Đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn phân lập |           |                 |      |
|-------|------------------------------------------------|-----------|-----------------|------|
|       | Màu sắc                                        | Hình dạng | Bề mặt          | Mép  |
| K9    | Trắng sữa                                      | Tròn đều  | Nhẵn, bóng      | Nhẵn |
| K20   | Trắng sữa                                      | Tròn đều  | Không lồi, bóng | Tron |
| K27   | Trắng trong                                    | Tròn      | Nhẵn, bóng      | Tron |
| K29   | Trắng trong                                    | Tròn đều  | Nhẵn, lồi bóng  | Nhẵn |
| K40   | Trắng                                          | Tròn đều  | Nhẵn            | Nhẵn |
| K41   | Trắng sữa                                      | Tròn đều  | Nhẵn, bóng      | Nhẵn |
| K45   | Trắng trong                                    | Tròn      | Nhẵn, bóng      | Nhẵn |
| K49   | Trắng trong                                    | Tròn méo  | Nhẵn, lồi       | Nhẵn |

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định của các chủng sàng lọc với đối chứng dương là kháng sinh gentamicin bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

**Bảng 2.** Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn phân lập.

| Chủng | D - d (mm) | Chủng | D - d (mm) |
|-------|------------|-------|------------|
| ĐC    | 13±0,76    | ĐC    | 13±0,76    |
| K9    | 10±1,00    | K40   | 10±0,87    |
| K20   | 7±0,87     | K41   | 10±1,00    |
| K27   | 8±0,58     | K45   | 19±0,50    |
| K29   | 27±0,58    | K49   | 12±0,76    |



**Hình 1.** Hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* của các chủng vi khuẩn đất.

Kết quả cho thấy, trong số 8 chủng vi khuẩn có khả năng kháng *E. carotovora* thì chủng K29 có hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 27 mm, các chủng khác (K9, K20, K27, K40, K41, K49) đều có hoạt tính nhưng thấp hơn so với đối chứng (<13 mm) hoặc không cao như chủng K45 (19 mm) so với các công bố trước của nhóm tác giả Nguyễn Xuân Cảnh và cs (2017) [9] đã phân lập được chủng L2.5 (*Streptomyces psammoticus*) có hoạt

tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh nhất (vòng kháng khuẩn đạt 23 mm).

### Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn K29

Về đặc điểm hình thái, chủng K29 được xác định là vi khuẩn Gram dương, hình que kết chuỗi, kích thước 0,7-0,8 x 2,5-3,0  $\mu\text{m}$ . Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn K29 được thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3.** Một số đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn K29.

| Hoạt tính                              |   | Hoạt tính  |   | Hoạt tính  |   |
|----------------------------------------|---|------------|---|------------|---|
| Khả năng đồng hóa/lên men nguồn cacbon |   |            |   |            |   |
| Glycerol                               | + | Sorbitol   | - | D-Turanose | - |
| Erythritol                             | - | Adonitol   | - | D-Lyxose   | - |
| D-Arabinose                            | - | Galactose  | + | D-Tagatose | - |
| L-Arabinose                            | + | Glucose    | + | D-Fucose   | - |
| Ribose                                 | + | Amygdalin  | + | L-Fucose   | - |
| D-Xylose                               | + | Arbutin    | + | D-Arabitol | - |
| L-Xylose                               | - | Esculin    | + | L-Arabitol | - |
| Methyl-β-D-Xylopyranside               | - | Salicin    | + | Gluconate  | + |
| Methyl-α D-Mannopyranside              | - | Cellobiose | + | Fructose   | + |
| Methyl-α D-Glucoside                   | + | Maltose    | + | Trehalose  | + |
| N-Acethyl-glucosamine                  | - | Lactose    | + | Inulin     | - |
| Xylitol                                | - | Melibiose  | + | Raffinose  | + |
| Dulcitol                               | - | Sorbose    | - | Glycogen   | + |
| Inositol                               | + | Sucrose    | + | Rhamnose   | - |
| Mannitol                               | + | Tinh bột   | + |            |   |
| Khả năng sinh enzyme                   |   |            |   |            |   |
| Amylase                                | + | Protease   | + | Cellulase  | + |

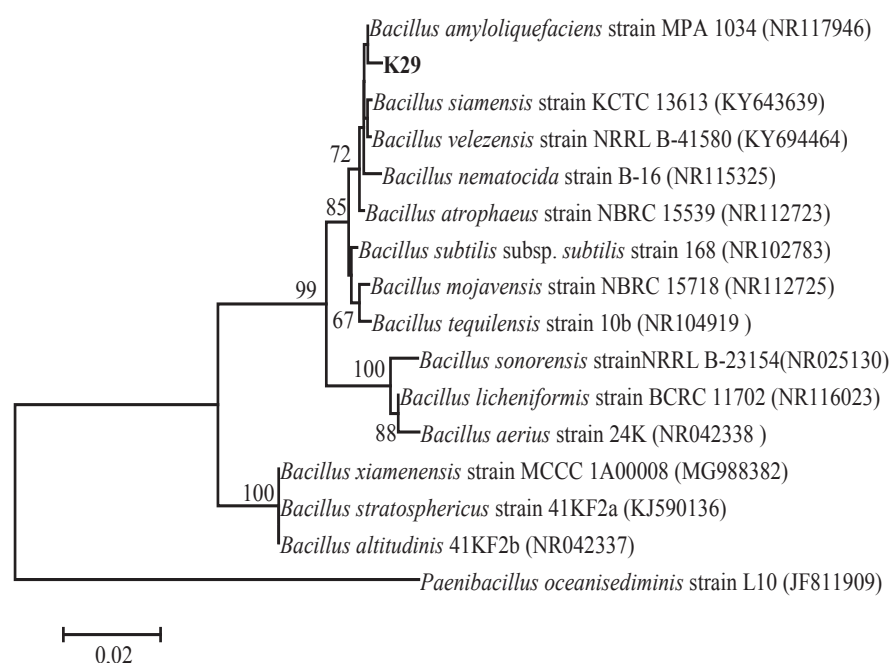
Ghi chú: +: có hoạt tính, -: không có hoạt tính.

Đánh giá các đặc điểm sinh hóa cho thấy, chủng K29 có khả năng đồng hóa/lên men nhiều nguồn cacbon khác nhau như glycerol, glucose, inositol, mannitol, methyl- $\alpha$ -D-glucoside, galactose, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, fructose, raffinose, tinh bột. Kết quả này cung cấp thông tin quan trọng làm căn cứ để tiến hành phân loại vi khuẩn theo loài.

### Định danh chủng vi khuẩn K29

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp khoảng cách bằng phần mềm MEGA 7 với độ tin cậy là 1.000 lần lặp lại. Trình tự 16S rRNA của chủng *Paenibacillus oceanisediminis* strain L10 được lựa chọn để làm nhóm ngoài. Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên một phần trình tự gen 16S rRNA (hình 2) cho thấy, chủng phân lập K29 hình thành nhóm với *Bacillus amyloliquefaciens* strain MPA 1034. Nhóm này phân nhánh rõ rệt so với các loài *Bacillus* khác.





Hình 2. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng K29.

Kết quả phân tích các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và dựa trên trình tự 16S rRNA của K29 cho thấy, chủng này thuộc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với mức độ tương đồng 99,44%.

*Bacillus* sp. có tiềm năng ứng dụng trong ngành nông nghiệp, dược phẩm và công nghệ sinh học bởi chúng có khả năng chống lại các bệnh nấm gây thối rễ như *F. oxysporum*, *F. solani* [1] và một số bệnh về vi khuẩn như *X. oryzae* pv. *oryzae*, *B. plantarii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *R. solanacearum*, và có khả năng chống lại vi khuẩn *E. carotovora* [11]. Trong đó, *Bacillus amyloliquefaciens* có hơn 8% bộ gen tìm thấy có khả năng tổng hợp chuỗi polyketide và các loại kháng sinh.

## Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 65 chủng vi khuẩn từ đất trồng sâm Ngọc Linh, trong đó có 8 chủng có khả năng đối kháng *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn. Chủng K29 được xác định là vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh enzyme và đồng hóa/lên men được nhiều nguồn cacbon khác nhau, có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng *E. carotovora* lên tới 27 mm và có quan hệ với loài *Bacillus amyloliquefaciens* ở mức độ tương đồng 99,44%.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN của Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Berić, M. MilanKojić, S. Stanković, L. Topisirović, G. Degrassi, M. Myers, V. Venturi, D. Fira (2012), "Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria", *Food Technol. Biotechnol.*, **50**(1), pp.25-31.
- [2] N.V. Bubnoff, P.W. Manley, J. Mestan, J. Sanger, C. Peschel, J. Duyster (2006), "Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107)", *Blood*, **108**(4), pp.1328-1333.
- [3] S.A. Hassan, E. Hanif, R.R. Zohra (2014), "Isolation and screening of soil bacteria for potential antimicrobial activity", *Fuust J. Biol.*, **4**(2), pp.217-219.
- [4] L. Dong, J. Xu, G. Feng, X. Li, S. Chen (2016), "Soil bacterial and fungal community dynamics in relation to *Panax notoginseng* death rate in a continuous cropping system", *Sci. Rep.*, **6**, p.31802.
- [5] Z. Miao, S. Li, X. Liu., Y. Chen, Y. Li, Y. Wang (2006), "The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease", *Sci. Agric. Sin.*, **39**, pp.1371-1378.
- [6] C. Xiao, L. Yang, L. Zhang, C. Liu, M. Han (2016), "Effects of cultivation ages and modes on microbial diversity in the rhizosphere soil of *Panax ginseng*", *Journal of Ginseng Research*, **40**, pp.28-37.
- [7] L.X. Zhang, C.B. Chen, Y.P. Wang, S.Q. Xu, C. Chang (2008), "Study on discontinuous cultivating of *Panax ginseng* and its workable solution", *J. Jilin. Agric. Univ.*, **30**, pp.481-485.
- [8] L. Dong, J. Xu, L. Zhang, R. Cheng, G. Wei, H. Su, J. Yang, J. Qian, R. Xu, S. Chen (2018), "Rhizospheric microbial communities are driven by *Panax ginseng* at different growth stages and biocontrol bacteria alleviates replanting mortality", *Acta Pharm. Sin. B*, **8**(2), pp.272-282.
- [9] Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Thị Khánh, Phạm Hồng Hiền (2017), "Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **7**(80), tr.41-46.
- [10] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33**, pp.1870-1874.
- [11] A. Sarwar, G. Brader, E. Corretto, G. Aleti, M.A. Ullah, A. Sessitsch, F.Y. Hafeez (2018), "Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity", *PLOS ONE*, **13**(6), p.e0198107.

# Đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị hình thái và tương quan kiểu hình của các dòng Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.)

Nguyễn Văn Tâm<sup>1</sup>, Nhữ Thu Nga<sup>1\*</sup>, Trịnh Văn Vượng<sup>1</sup>, Phan Thúy Hiền<sup>1</sup>,  
Trần Ngọc Thanh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hương<sup>1</sup>, Vũ Đình Hòa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Dược liệu

<sup>2</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 13/6/2019; ngày chuyển phản biện 21/6/2019; ngày nhận phản biện 16/7/2019; ngày chấp nhận đăng 24/7/2019

## Tóm tắt:

Đa dạng nguồn gen là lợi thế trong công tác chọn tạo giống cây trồng. Tổng số 10 dòng Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.) chọn lọc từ năm 2014-2017 đã được theo dõi các tính trạng kiểu hình, đánh giá đa dạng di truyền và mối tương quan. Nghiên cứu được bố trí theo kiểu tuần tự không lặp lại. Kết quả, căn cứ vào chỉ thị hình thái, 10 dòng Náng hoa trắng đã được chia làm 3 nhóm. Năng suất cá thể và hàm lượng lycorine có xu hướng tương quan thuận với các tính trạng như tỷ lệ đậu quả, chiều dài lá, tỷ lệ tươi/khô. Kết quả này là bước đánh giá quan trọng, làm tiền đề cho công tác chọn tạo giống sau này.

**Từ khóa:** *Crinum asiaticum*, đa dạng di truyền, Náng hoa trắng, tương quan.

**Chỉ số phân loại:** 4.1

## **Đặt vấn đề**

Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.) là một loài dược liệu dùng để chữa thấp khớp và giảm đau ở Malaysia [1] và hỗ trợ điều trị phi đại tuyến tiền liệt ở Việt Nam. Náng hoa trắng là cây vừa sinh sản hữu tính (giao phấn) vừa sinh sản vô tính nên kiểu gen dị hợp cao [2], khi lai giữa các nguồn vật liệu thì khả năng tạo ra giá trị phân ly cao ở thế hệ con lai. Do đó, đánh giá đa dạng di truyền giúp xác định nguồn gen bố mẹ có giá trị sai khác cao để nâng cao xác suất tạo con lai có ưu thế lai cao [3]. Việc đánh giá đa dạng di truyền và phân tích tương quan giữa các tính trạng sẽ giúp định hướng tốt trong công tác chọn tạo giống sau lai. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá mức độ đa dạng di truyền và mối quan hệ tương quan kiểu hình của các dòng Náng hoa trắng đã chọn lọc.

## **Vật liệu và phương pháp nghiên cứu**

### **Vật liệu**

Vật liệu nghiên cứu gồm 10 dòng Náng hoa trắng (bảng 1) được chọn lọc từ 2 mẫu Náng hoa trắng. Tất cả các dòng Náng hoa trắng sử dụng trong thí nghiệm có chu vi đường kính thân giả là 5-6 cm.

**Bảng 1. Nguồn gốc các dòng Náng hoa trắng trong thí nghiệm.**

| TT | Ký hiệu | Nguồn gốc  |
|----|---------|------------|
| 1  | NHT-1   | Nha Trang  |
| 2  | NHT-2   | Quảng Ninh |
| 3  | NHT-3   | Quảng Ninh |
| 4  | NHT-4   | Quảng Ninh |
| 5  | NHT-5   | Nha Trang  |
| 6  | NHT-6   | Quảng Ninh |
| 7  | NHT-7   | Quảng Ninh |
| 8  | NHT-8   | Nha Trang  |
| 9  | NHT-9   | Quảng Ninh |
| 10 | NHT-10  | Nha Trang  |

### **Phương pháp nghiên cứu**

**Bố trí thí nghiệm:** các dòng Náng hoa trắng được bố trí theo kiểu tuần tự không lặp lại với số lượng 30 cây/dòng. Thí nghiệm được thực hiện trong các năm 2017-2019 tại Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội thuộc Viện Dược liệu (Thanh Trì, Hà Nội).

**Các chỉ tiêu theo dõi:** 19 tính trạng (chiều cao cây, số lá, số nhánh, đường kính thân, chiều dài lá, chiều rộng lá, màu sắc lá, độ lượn sóng mép lá, chiều dài cánh hoa, chiều

\*Tác giả liên hệ: Email: thungagi51@gmail.com

# Evaluating the genetic diversity and phenotypic correlation of giant crinum lily lines (*Crinum asiaticum* L.)

Van Tam Nguyen<sup>1</sup>, Thu Nga Nhu<sup>1\*</sup>, Van Vuong Trinh<sup>1</sup>,  
Thuy Hien Phan<sup>1</sup>, Ngoc Thanh Tran<sup>1</sup>,  
Thi Huong Nguyen<sup>1</sup>, Dinh Hoa Vu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Medicinal Materials

<sup>2</sup>Vietnam National University of Agriculture

Received 13 June 2019; accepted 24 July 2019

## Abstract:

Genetic diversity is an advantage for plant breeding. Total 10 lines of *Crinum asiaticum* L. selected from 2014 to 2017 were studied in terms of phenotypic traits, genetic diversity assessment, and correlation. The experiment was arranged in a sequential pattern that was not repeated. Based on the morphology indicator, 10 lines of *Crinum asiaticum* L. were divided into 3 groups. Individual productivity and lycorine levels proportionally correlated with such traits as fruiting rate, leaf length, fresh/dried ratio. The result is the important evaluation stage that plays as a prerequisite for future plant breeding.

**Keywords:** correlation, *Crinum asiaticum*, genetic diversity, giant crinum lily.

**Classification number:** 4.1

dài cuống cụm hoa, số hoa/bông, số quả, tỷ lệ đậu quả, màu sắc vỏ quả giai đoạn đang sinh trưởng, kích thước quả, kích thước hạt, năng suất cá thể, tỷ lệ tươi khô, hàm lượng lycorine).

**Phương pháp điều tra sâu bệnh hại:** theo phương pháp của Viện Bảo vệ thực vật (1997).

**Phương pháp phân tích chất lượng dược liệu:** chất lượng dược liệu Náng hoa trắng được xác định bằng hàm lượng lycorine theo phương pháp phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tại Khoa Hóa - Phân tích tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

## Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng các chương trình Excel, Irristat 5.0.

Đánh giá đa dạng di truyền dựa trên 19 tính trạng đã nêu ở trên bằng cách xây dựng sơ đồ quan hệ di truyền hình cây sử dụng phần mềm NTSYS 2.1.

## Kết quả và thảo luận

### Đặc điểm nông sinh học của các dòng Náng hoa trắng

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2 cho thấy, các dòng Náng hoa trắng có đặc điểm thân đều có màu xanh lục nhạt, hình trụ nhẵn. Lá màu xanh lục nhạt - đậm, bản lá to, rộng hoặc nhỏ, thuôn dài, mép lá phẳng hoặc lượn sóng. Cánh hoa màu trắng, cuống cụm hoa đẹp, nhẵn. Quả có vỏ màu xanh nhạt hoặc đậm, căng, bóng. Hạt có vỏ xám, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng hoặc xanh nhạt.

Từ kết quả nghiên cứu ở bảng 3 cho thấy, các dòng Náng hoa trắng trong thí nghiệm khá đa dạng. Chiều cao cây dao động trong khoảng 63,4-97,9 cm. Số lá dao động trong khoảng 16,5-21,0 lá. Số nhánh dao động trong khoảng 6,6-13,4 nhánh/cây. Đường kính thân trong khoảng 6,5-10,0 cm. Chiều dài cuống cụm hoa từ 10,4 đến 35,2 cm. Số hoa/bông thay đổi trong khoảng 15,8-21,4 hoa. Số quả dao động trong khoảng 13,4-20,1 quả/cây. Tỷ lệ đậu quả dao động trong khoảng 79,1-96,4%.

Từ số liệu ở bảng 4 cho thấy, các dòng Náng hoa trắng có năng suất khác biệt nhau. Năng suất cá thể các dòng dao động trong khoảng 0,420-0,672 kg/cây, năng suất thực thu dao động trong khoảng 6,45-11,98 tạ/ha. Tỷ lệ tươi khô của các dòng cũng khác nhau và dao động trong khoảng 13,9-18,0%. Các dòng Náng hoa trắng có năng suất vượt trội hơn là NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4, NHT-5 và NHT-7.

Hàm lượng lycorine (hoạt chất chính) của các dòng Náng hoa trắng trong thí nghiệm dao động trong khoảng 0,25-1,29%, cao hơn hàm lượng lycorine chiết được từ 12 kg dược liệu khô (đạt 0,029% khối lượng hoạt chất tính khiết, độ tinh khiết 99%) được công bố bởi Nguyễn Ngọc Quỳnh và cs (2011) [4]. Như vậy, hàm lượng lycorine định lượng được gấp 8,62-40,69 lần chất tinh khiết theo như công bố này. Giá trị sai khác lớn này hứa hẹn một thuận lợi cho công tác chọn giống Náng hoa trắng có hàm lượng lycorine cao.



**Bảng 2. Một số tính trạng chất lượng của các dòng Náng hoa trắng chọn lọc.**

| TT | Tên dòng | Thân                         | Lá                                                      | Cuống cụm hoa                      | Bông hoa                               | Quả                                  | Hạt                                                                      |
|----|----------|------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1  | NHT-1    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục đậm, bản lá to, rộng, mép lá lượn sóng ít   | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh hoa thuần dài, màu trắng | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả to  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu xanh nhạt, hạt to |
| 2  | NHT-2    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá to, rộng, mép lá lượn sóng rõ  | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh hoa thuần dài, màu trắng | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả to  | Vỏ màu nâu, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt to          |
| 3  | NHT-3    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục đậm, bản lá to, rộng, mép lá lượn sóng ít   | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh hoa thuần dài, màu trắng | Vỏ quả xanh nhạt, căng, bóng, quả to | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt to     |
| 4  | NHT-4    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục đậm, thuần dài, mép lá gần gốc lượn sóng rõ | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh hoa thuần dài, màu trắng | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả to  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt to     |
| 5  | NHT-5    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá nhỏ, thuần dài                 | Hình trụ dẹp, ngắn, màu xanh, nhẵn | Bông to, cánh hoa to, ngắn, màu trắng  | Vỏ quả xanh nhạt, căng, bóng, quả to | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt to     |
| 6  | NHT-6    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục đậm, bản lá to, rộng, mép lá lượn sóng ít   | Hình trụ dẹp, ngắn, màu xanh, nhẵn | Bông to, cánh ngắn, màu trắng          | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả bé  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt bé     |
| 7  | NHT-7    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá nhỏ, thuần dài                 | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh dài, màu trắng           | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả to  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt to     |
| 8  | NHT-8    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá nhỏ, thuần dài                 | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh dài, màu trắng           | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả bé  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt bé     |
| 9  | NHT-9    | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá nhỏ, thuần dài                 | Hình trụ dẹp, dài, màu xanh, nhẵn  | Bông to, cánh dài, màu trắng           | Vỏ quả xanh nhạt, căng, bóng, quả bé | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu xanh nhạt, hạt bé |
| 10 | NHT-10   | Xanh lục nhạt, hình trụ ngắn | Lá xanh lục nhạt, bản lá nhỏ, thuần dài                 | Hình trụ dẹp, ngắn, màu xanh, nhẵn | Bông to, cánh ngắn, màu trắng          | Vỏ quả xanh đậm, căng, bóng, quả bé  | Vỏ màu xám xanh, phôi màu trắng viền xanh, nội nhũ màu trắng, hạt bé     |

**Bảng 3. Tính trạng số lượng các dòng Náng hoa trắng.**

| Tên dòng | Chiều cao cây (cm) | Số lá (lá) | Số nhánh (nhánh) | Đường kính thân (cm) | Chiều dài lá (cm) | Chiều rộng lá (cm) | Chiều dài cuống cụm hoa (cm) | Số hoa/ bông (hoa) | Số quả (quả) | Tỷ lệ đậu quả (%) |
|----------|--------------------|------------|------------------|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------|-------------------|
| NHT-1    | 87,4±7,9           | 17,2±1,2   | 9,0±0,7          | 6,7±0,6              | 58,5±2,1          | 10,5±0,8           | 23,4±1,1                     | 19,3±2,2           | 18,6±3,8     | 96,4±3,1          |
| NHT-2    | 90,1±0,6           | 18,2±2,3   | 8,8±0,5          | 7,7±0,5              | 62,3±3,2          | 10,1±0,5           | 24,5±1,4                     | 20,2±1,9           | 18,3±1,6     | 90,6±5,4          |
| NHT-3    | 97,9±9,0           | 20,4±1,8   | 13,4±0,7         | 10,0±0,4             | 58,2±2,4          | 11,5±0,6           | 30,3±2,1                     | 21,2±1,2           | 18,2±1,7     | 85,8±4,3          |
| NHT-4    | 83,6±8,3           | 17,2±1,4   | 8,0±0,5          | 8,0±0,3              | 62,6±4,3          | 10,3±0,5           | 35,2±1,8                     | 21,4±0,9           | 20,1±1,4     | 93,9±3,8          |
| NHT-5    | 95,7±7,4           | 21,0±2,0   | 13,0±0,3         | 8,2±0,5              | 56,2±3,8          | 10,2±0,3           | 10,4±1,4                     | 20,3±1,4           | 19,2±1,8     | 94,6±4,6          |
| NHT-6    | 80,3±5,6           | 16,5±1,5   | 8,0±0,4          | 7,5±0,6              | 57,1±4,2          | 9,4±0,2            | 12,1±0,8                     | 17,1±0,6           | 15,3±1,6     | 89,5±5,2          |
| NHT-7    | 67,5±5,2           | 17,1±1,6   | 7,8±0,6          | 6,5±0,2              | 55,6±2,9          | 9,7±0,4            | 22,2±0,4                     | 16,6±0,7           | 14,8±1,4     | 89,2±4,3          |
| NHT-8    | 68,3±4,9           | 16,8±1,3   | 7,5±0,5          | 7,7±0,8              | 50,2±1,7          | 10,1±0,5           | 25,7±1,2                     | 15,8±0,5           | 13,4±1,2     | 84,8±4,5          |
| NHT-9    | 63,4±5,3           | 16,7±1,5   | 6,6±0,7          | 6,9±0,4              | 50,7±3,6          | 9,4±0,5            | 26,1±1,3                     | 18,4±0,6           | 15,2±1,3     | 82,6±5,6          |
| NHT-10   | 66,2±3,2           | 16,9±1,6   | 7,3±0,5          | 7,0±0,3              | 51,9±2,7          | 8,9±0,4            | 13,4±0,9                     | 17,2±0,8           | 13,6±1,1     | 79,1±3,9          |

**Bảng 4. Năng suất và hàm lượng lycorine của các dòng Náng hoa trắng.**

| TT | Dòng   | Năng suất cá thể khô (kg) | Năng suất thực thu (tạ/ha) | Tỷ lệ khô/ tươi (%) | Hàm lượng lycorine (%) |
|----|--------|---------------------------|----------------------------|---------------------|------------------------|
| 1  | NHT-1  | 0,636±0,033               | 9,78±0,56                  | 17,0±1,2            | 1,29±0,03              |
| 2  | NHT-2  | 0,546±0,065               | 7,45±0,45                  | 15,7±0,9            | 1,01±0,06              |
| 3  | NHT-3  | 0,530±0,034               | 7,86±0,06                  | 16,5±1,1            | 0,95±0,10              |
| 4  | NHT-4  | 0,654±0,021               | 11,98±1,04                 | 18,0±1,0            | 1,18±0,10              |
| 5  | NHT-5  | 0,672±0,015               | 7,21±0,68                  | 16,0±0,8            | 0,79±0,04              |
| 6  | NHT-6  | 0,462±0,038               | 6,88±0,58                  | 14,2±0,7            | 1,09±0,06              |
| 7  | NHT-7  | 0,528±0,029               | 7,01±0,69                  | 14,6±0,8            | 0,83±0,03              |
| 8  | NHT-8  | 0,420±0,032               | 7,23±0,72                  | 15,0±0,9            | 0,89±0,06              |
| 9  | NHT-9  | 0,484±0,024               | 7,41±0,70                  | 14,1±0,9            | 0,25±0,06              |
| 10 | NHT-10 | 0,456±0,036               | 6,45±0,59                  | 13,9±1,2            | 0,43±0,03              |

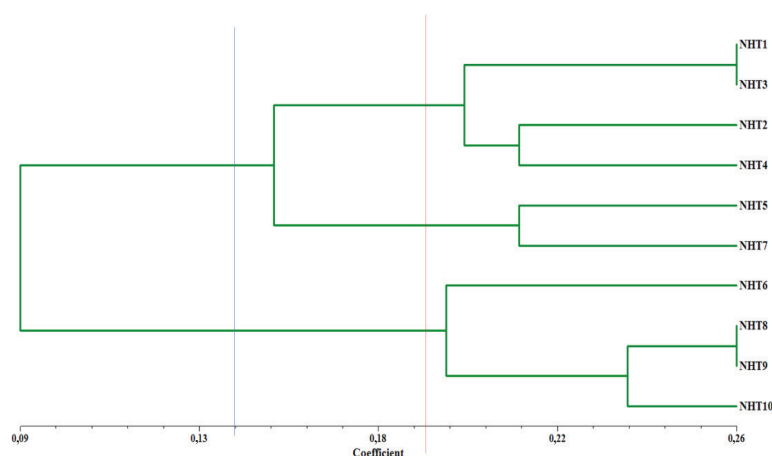
Theo Kim và cs (2008) [5] thì lycorine chiết xuất trong Náng hoa trắng bằng phương pháp HPLC đã xác định được hàm lượng là 1%. Các dòng Náng hoa trắng có hàm lượng lycorine cao hơn 1% là NHT-1 (1,29%), NHT-2 (1,01%), NHT-4 (1,18%) và NHT-6 (1,09%).

#### **Đa dạng di truyền giữa các dòng dựa trên kiểu hình**

Dựa vào 19 tính trạng kiểu hình đã nêu ở trên, sơ đồ quan hệ di truyền bằng chỉ thị hình thái giữa các dòng đã được xây dựng (hình 1).

Ở mức sai khác 14%, 10 dòng Náng hoa trắng được chia làm 2 nhóm:

+ Nhóm I gồm 4 dòng NHT-6, NHT-8, NHT-9 và NHT-10. Các dòng thuộc nhóm này đa số có đặc điểm chung là



Hình 1. Sơ đồ quan hệ di truyền hình cây xây dựng bằng chỉ thị hình thái giữa các dòng Nắng hoa trắng.

quả và hạt có kích thước bé, mép lá phẳng không lượn sóng, màu lá xanh nhạt, số quả không nhiều, chiều dài cuống cụm hoa ngắn.

+ Nhóm II gồm 6 dòng còn lại là NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4, NHT-5 và NHT-7. Các dòng này thường có đặc điểm chung là quả và hạt to, cây cao, lá rộng, nhiều quả, sinh khối lớn.

Ở mức sai khác 19%, 10 dòng Nắng hoa trắng được chia làm 3 nhóm:

+ Nhóm A gồm 4 dòng NHT-6, NHT-8, NHT-9 và NHT-10. Các dòng thuộc nhóm này đa số có đặc điểm chung là quả và hạt có kích thước bé, mép lá phẳng không lượn sóng, màu lá xanh nhạt, số quả không nhiều, chiều dài cuống cụm hoa ngắn.

Bảng 5. Tương quan kiểu hình giữa các dòng Nắng hoa trắng.

|      | NSCT   | HLly  | TLTK  | CDCH   | SH    | SQ    | TLDQ  | CCC   | SL    | SN    | DKTh  | CDL   | CRL   |
|------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NSCT | 1,000  |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| HLly | 0,497  | 1,000 |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| TLTK | 0,699  | 0,698 | 1,000 |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| CDCH | 0,255  | 0,246 | 0,569 | 1,000  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| SH   | 0,496  | 0,324 | 0,782 | 0,401  | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| SQ   | 0,700  | 0,560 | 0,874 | 0,318  | 0,929 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |       |
| TLDQ | 0,787  | 0,775 | 0,716 | 0,067  | 0,486 | 0,774 | 1,000 |       |       |       |       |       |       |
| CCC  | 0,283  | 0,602 | 0,688 | 0,055  | 0,791 | 0,834 | 0,634 | 1,000 |       |       |       |       |       |
| SL   | -0,036 | 0,080 | 0,387 | -0,095 | 0,634 | 0,571 | 0,277 | 0,780 | 1,000 |       |       |       |       |
| SN   | -0,018 | 0,254 | 0,449 | -0,085 | 0,615 | 0,583 | 0,345 | 0,849 | 0,962 | 1,000 |       |       |       |
| DKTh | -0,264 | 0,222 | 0,428 | 0,276  | 0,595 | 0,430 | 0,014 | 0,689 | 0,722 | 0,773 | 1,000 |       |       |
| CDL  | 0,608  | 0,737 | 0,729 | 0,321  | 0,731 | 0,825 | 0,708 | 0,719 | 0,278 | 0,330 | 0,314 | 1,000 |       |
| CRL  | 0,161  | 0,555 | 0,753 | 0,540  | 0,649 | 0,644 | 0,434 | 0,758 | 0,640 | 0,736 | 0,744 | 0,483 | 1,000 |

Ghi chú: NSCT: năng suất cá thể; HLly: hàm lượng lycorine; TLTK: tỷ lệ tươi khô; CDCH: chiều dài cuống cụm hoa; SH: số hoa; SQ: số quả; TLDQ: tỷ lệ đậu quả; CCC: chiều cao cây; SL: số lá; SN: số nhánh; DKTh: đường kính thân; CDL: chiều dài lá; CRL: chiều rộng lá.

+ Nhóm B gồm 2 dòng NHT-5 và NHT-7. Các dòng này thường có sinh khối khá cao, cuống cụm hoa hơi ngắn, tỷ lệ đậu quả tương đối cao.

+ Nhóm C gồm các dòng còn lại NHT-1, NHT-2, NHT-3 và NHT-4. Các dòng này thường có đặc điểm chung là cuống cụm hoa dài, quả và hạt to.

Từ kết quả trên cho thấy, muốn nâng cao xác suất tìm được ưu thế lai quần thể Nắng hoa trắng, trong thí nghiệm tạo biến dị bằng phương pháp lai hữu tính nên thực hiện lai giữa các dòng thuộc nhóm I (NHT-6, NHT-8, NHT-9, NHT-10) với nhóm II (NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4, NHT-5, NHT-7). Hạn chế thực hiện phép lai giữa các dòng trong cùng một nhóm A (NHT-6, NHT-8, NHT-9, NHT-10), nhóm B (NHT-5 và NHT-7) và nhóm C (NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4). Tuy nhiên, để tạo con cái có sinh khối, hàm lượng hoạt chất tương đối giống với bố mẹ thì nên thực hiện duy trì phép lai đa giao trong nhóm A (NHT-6, NHT-8, NHT-9, NHT-10).

#### Tương quan kiểu hình giữa các dòng Nắng hoa trắng nghiên cứu

Từ tổng số 13 tính trạng kiểu hình (năng suất cá thể, hàm lượng lycorin, tỷ lệ tươi khô, chiều dài cuống cụm hoa, số hoa/bông, số quả, tỷ lệ đậu quả, chiều cao cây, số lá, số nhánh, đường kính thân, chiều dài lá, chiều rộng lá) được phân tích, chúng tôi đã xây dựng bảng hệ số tương quan (bảng 5).

Kết quả bảng 5 cho thấy, năng suất cá thể và hàm lượng lycorine có tương quan thuận với nhau, tuy nhiên, mối tương quan này không chặt (hệ số tương quan đạt 0,497). Mặt khác, năng suất cá thể các mẫu Náng hoa trắng có xu hướng tương quan thuận với các tính trạng như số quả, tỷ lệ đậu quả, chiều dài lá, tỷ lệ tươi khô. Kết quả này là do những cá thể đạt năng suất cá thể cao có xu hướng tăng tỷ lệ đậu quả và có nhiều quả hơn. Chiều dài lá là một trong các yếu tố cấu thành nên năng suất của cây Náng (cây có bộ phận sử dụng là lá) dẫn đến chiều dài lá càng lớn thì năng suất cá thể cây càng cao.

Hàm lượng hoạt chất chính là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất. Lycorine là nhóm hoạt chất chính trong cây Náng hoa trắng [6], có hoạt tính chống lại tế bào ung thư [7-10]. Trong quần thể Náng hoa trắng nghiên cứu, hàm lượng lycorine có xu hướng tỷ lệ thuận với các chỉ tiêu về tỷ lệ đậu quả, tỷ lệ tươi khô, chiều cao cây và chiều dài lá. Đồng thời, chiều dài lá có xu hướng tương quan thuận với hàm lượng lycorine (0,737), tỷ lệ tươi khô (0,729), số hoa (0,731), số quả (0,825), tỷ lệ đậu quả (0,708) và chiều cao cây (0,719). Tỷ lệ tươi khô được liệu có xu hướng tương quan thuận với số hoa (0,782), số quả (0,874), tỷ lệ đậu quả (0,716), chiều cao cây (0,688), chiều dài lá (0,729), chiều rộng lá (0,753). Chiều cao cây có xu hướng tương quan thuận với số hoa (0,791), số quả (0,834), số lá (0,780), số nhánh (0,849), chiều rộng lá (0,758).

Như vậy, trong chọn tạo giống từ quần thể Náng hoa trắng nghiên cứu, ngoài mục tiêu chọn năng suất, chất lượng (hàm lượng lycorine) thì các chỉ tiêu khác như chiều cao cây, chiều dài lá, tỷ lệ đậu quả, tỷ lệ tươi khô nên được chú ý chọn lọc bổ trợ cùng vì giữa chúng có mối liên hệ tương quan thuận với nhau.

## Kết luận

Các mẫu Náng hoa trắng trong nghiên cứu có độ đa dạng di truyền về kiểu hình. Ở mức sai khác 14%, 10 dòng Náng hoa trắng được chia làm 2 nhóm: Nhóm I gồm 4 dòng NHT-6, NHT-8, NHT-9, NHT-10; Nhóm II gồm 6 dòng còn lại là NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4, NHT-5, NHT-7. Ở mức sai khác 19%, 10 dòng Náng hoa trắng được chia làm 3 nhóm: nhóm A gồm 4 dòng NHT-6, NHT-8, NHT-9, NHT-10; nhóm B gồm 2 dòng NHT-5 và NHT-7; nhóm C gồm các dòng còn lại NHT-1, NHT-2, NHT-3, NHT-4. Để tạo ưu thế lai nên ưu tiên phép lai giữa các mẫu khác nhóm trong sơ đồ quan hệ di truyền.

Năng suất cá thể các mẫu Náng hoa trắng có xu hướng tương quan thuận với các tính trạng như số quả, tỷ lệ đậu quả, chiều dài lá, tỷ lệ tươi khô. Hàm lượng lycorine có xu hướng tỷ lệ thuận với các chỉ tiêu về tỷ lệ đậu quả, tỷ lệ tươi khô, chiều cao cây và chiều dài lá. Ngoài chỉ tiêu về năng suất và hàm lượng lycorine cần chọn lọc bổ trợ các tính trạng có tương quan thuận với hai tính trạng này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Awatef M Samud, et al. (1999), "Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* plant and its effect on bradykinin-induced contractions on isolated uterus", *Immunopharmacology*, **43**(2-3), pp.311-316.
- [2] Vũ Đình Hòa, Vũ Văn Liệt, Nguyễn Văn Hoan (2005), *Giáo trình chọn giống cây trồng*, Nhà xuất bản Học viện Nông nghiệp Việt Nam, tr.76-78.
- [3] Nguyễn Thị Hồng Nhung, Bùi Thị Hồng, Đặng Văn Đông, Vũ Đình Hòa (2017), "Đánh giá đặc điểm nông sinh học và biến động di truyền của một số giống hoa Lay ơn (*Gladiolus* sp.)", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **15**(11), tr.1565-1574.
- [4] Nguyễn Ngọc Quỳnh, Nguyễn Hữu Phúc, Trần Hùng (2011), "Nghiên cứu phân lập lycorine từ Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* Roxb)", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **15**(1), tr.60-66.
- [5] Y.H. Kim, et al. (2008), "Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* Linne var. *japonicum* extract and its application as a cosmeceutical ingredient", *J. of Cosmetic Science*, **59**(5), pp.419-430.
- [6] John Refaat, et al. (2017), "Crinum an endless source of bioactive principles: a review. Part 1 - Crinum alkaloids: lycorine - tupe alkaloids", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**(7), pp.1883-1890.
- [7] D. Lamoral Theys, et al. (2009), "Lycorine the main phenanthridine *Amaryllidaceae* alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight", *J. Med. Chem.*, **52**(20), pp.6244-6256.
- [8] F. Lefranc, et al. (2009), "Narciclasine, a plant growth modulator, activates rho and stress fibers in glioblastoma cells", *Mol. Cancer Ther.*, **8**(7), pp.1739-1750.
- [9] G. Van Goietsenoven, et al. (2010), "Targeting of eEF1A with *Amaryllidaceae* isocarbostyrils as a strategy to combat melanomas", *FASEB J.*, **24**(11), pp.4575-4584.
- [10] G. Van Goietsenoven, et al. (2013), "Narciclasine as well as other *Amaryllidaceae* isocarbostyrils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers", *Med. Res. Rev.*, **33**(2), pp.439-455.



# Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hấp phụ phốt pho trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng

Nguyễn Đức Thành<sup>1,2</sup>, Hoàng Quốc Nam<sup>1,2</sup>, Lưu Thế Anh<sup>3\*</sup>,  
Nguyễn Thị Thủy<sup>3</sup>, Lê Bá Biên<sup>3</sup>, Hoàng Thị Thu Duyên<sup>4,5</sup>, Đinh Mai Vân<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Viện Địa lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>4</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

<sup>5</sup>Chương trình Biến đổi khí hậu và phát triển, Trường Đại học Việt Nhật, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 5/9/2019; ngày chuyển phản biện 9/9/2019; ngày nhận phản biện 10/10/2019; ngày chấp nhận đăng 18/10/2019

## Tóm tắt:

Trong các nguyên tố dinh dưỡng đa lượng mà cây trồng cần, phốt pho (P) là nguyên tố dễ bị cố định vào pha rắn của đất hơn cả. Hơn nữa, trong bối cảnh tác động của biến đổi khí hậu, sự gia tăng nhiệt độ sẽ ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán của dung dịch đất và độ bền liên kết giữa hợp chất P với pha rắn của đất. Để tăng hiệu lực phân lân khi bón vào đất, cần phải xem xét và quan tâm đến ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ và thời gian bón. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu này ở Việt Nam hiện còn hạn chế. Nghiên cứu của các tác giả được thực hiện trong chuỗi các thí nghiệm về ảnh hưởng của các yếu tố vô cơ và hữu cơ đến động thái P trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng, từ đó đưa ra các khuyến nghị sử dụng hợp lý các loại phân lân trong canh tác nông nghiệp. Nghiên cứu được thực hiện với 3 mẫu đất lấy tại TP Hải Phòng (HP), tỉnh Nam Định (ND) và tỉnh Ninh Bình (NB). Kết quả nghiên cứu cho thấy, có sự tăng tuyến tính giữa nhiệt độ và khả năng hấp phụ P của đất, nhưng mức tăng rõ rệt hơn ở khoảng nhiệt độ 25-40°C. Trong khi đó, ảnh hưởng của yếu tố thời gian lại ngược lại, quá trình hấp phụ P trong khoảng 1-4 ngày đầu diễn ra mạnh gấp 2 đến 3 lần so với giai đoạn 4-8 ngày tiếp theo. Do vậy, khi xem xét hiệu lực của phân lân, cần lưu ý tới ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ và thời điểm bón.

**Từ khóa:** dung lượng hấp phụ, đất phù sa, Đồng bằng sông Hồng, hấp phụ P.

**Chỉ số phân loại:** 4.1

## **Mở đầu**

P vừa là nguyên tố cần thiết đối với cây trồng, nhưng đồng thời lại là nguyên tố gây ô nhiễm nguồn nước mặt khi bị rửa trôi vào các thủy vực. Hầu hết (95-99%) lượng P trong đất nhiệt đới tồn tại dưới dạng P hữu cơ và vô cơ, chúng được giải phóng hòa tan vào dung dịch đất rất chậm [1]. 1-5% lượng P còn lại nằm ở các phức hợp hữu cơ khoáng khi các nhóm humic và fulvic liên kết chặt chẽ với các hợp chất sắt hoặc nhôm trong đất [2]. Động thái của nguyên tố P trong đất phụ thuộc nhiều vào thành phần vô cơ và hữu cơ của đất như: pH của dung dịch đất; hàm lượng ôxit và hydroxit Fe, Al, Ca và Mg; quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ trong đất... Trong đất, hàm lượng P tổng số thường chiếm khoảng 100-3.000 mg/kg đất, nhưng cây trồng chỉ hấp thu được một phần nhỏ lượng P vô cơ hòa tan trong dung dịch đất dưới dạng  $\text{HPO}_4^{2-}$  và  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Hơn nữa, khoảng 30% lượng P vô cơ bị cố định trong các đoàn lap đất [3]. Do đó, hàm lượng P dễ tiêu trong tự nhiên không đáp

ứng đủ nhu cầu của cây trồng và thường được bổ sung từ phân lân vô cơ. Tuy vậy, cây trồng cũng chỉ có thể hấp thu được khoảng 5-25% tổng lượng phân lân bón vào đất, một lượng lớn phân lân còn lại bị cố định trong đất [4]. Trong thâm canh cây trồng năng suất cao, nhu cầu phân bón P trong nền sản xuất nông nghiệp toàn cầu ngày càng tăng và được dự báo đạt đỉnh vào năm 2030 [5]. Trong khi đó, nguyên liệu khoáng để sản xuất phân lân lại là nguồn tài nguyên không thể tái tạo được và có thể bị cạn kiệt trong khoảng 50-100 năm tới [6]. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của biến đổi khí hậu sẽ làm cho nhiệt độ toàn cầu tăng 2°C vào cuối thế kỷ này, điều này sẽ tác động không nhỏ tới quá trình hấp phụ P trong đất. Bằng phương pháp mô hình, Barrow cho rằng, nếu nồng độ P trong dung dịch đất đạt trạng thái ổn định thì sự tăng nhiệt độ sẽ làm tăng quá trình hấp phụ P vào pha rắn của đất [7, 8]. Tốc độ phân giải và hấp phụ P trong đất bị ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ, tốc độ của hai quá trình này tăng khi nhiệt độ gia tăng [7-10]. Khi nhiệt độ

\*Tác giả liên hệ: Tel: 09974826969, email: luutheanhig@yahoo.com/ltanh@cres.edu.vn

# Effect of temperature and time on phosphorus adsorption in alluvial soils of the Red River Delta

Duc Thanh Nguyen<sup>1,2</sup>, Quoc Nam Hoang<sup>1,2</sup>,  
The Anh Luu<sup>3\*</sup>, Thi Thuy Nguyen<sup>3</sup>, Ba Bien Le<sup>3</sup>,  
Thi Thu Duyen Hoang<sup>4,5</sup>, Mai Van Dinh<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Geography, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology,  
Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Central Institute for Natural Resources and Environmental Studies,  
Vietnam National University, Hanoi

<sup>4</sup>Vietnam National University of Forestry,  
Ministry of Agriculture and Rural Development

<sup>5</sup>Program in Climate change and Development, Vietnam - Japan University,  
Vietnam National University, Hanoi

Received 5 September 2019; accepted 18 October 2019

## Abstract:

Phosphorus (P) is one of the most important macronutrients to plants, but it is very sensitive to the adsorption by soil solid-state. On the other hand, in the context of the climate change impact, the increase in temperature will accelerate solid-state diffusion and the value of the binding constant of soil solution. As a consequence, in order to enhance P-fertiliser efficiency, it is required to consider the temperature and time of fertiliser application. However, to date studies on effects of time and temperature on P-fertiliser efficiency are lacking in Vietnam. This study is in a series of researches on P dynamic in alluvial soils of the Red River delta, aiming at giving recommendations of P-fertiliser efficiency enhancement in cultivation practices. The study was implemented in three alluvial soil samples of the Red River Delta taken at Hai Phong city, Nam Dinh and Ninh Binh provinces. The study results showed that there was an association between temperature and P adsorption, but the adsorption rate was more observable within 25 and 40°C. By contrast, in the first stage (from 1<sup>st</sup> to 4<sup>th</sup> days after fertiliser application) P adsorption doubled and tripled compared with the later stage (from 4<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> days). In conclusion, temperature and time should be included to enhance P-fertiliser efficiency for alluvial soils in the Red River Delta.

**Keywords:** adsorption capacity, alluvial soils, phosphorus adsorption, Red River Delta.

**Classification number:** 4.1

tăng lên sẽ làm gia tăng quá trình khuếch tán của pha rắn hoặc làm giảm giá trị của hằng số kết nối giữa P và pha rắn của đất, từ đó tác động đến động thái P trong dung dịch đất [11]. Trong một khoảng thời gian nhất định, quá trình hấp phụ P của đất tăng theo thời gian [12, 13]. Ảnh hưởng của yếu tố thời gian đến quá trình hấp phụ P trong đất được biểu hiện bằng phương trình (1) [12, 14]:

$$S = k c^{b_1} t^{b_2} \quad (1)$$

Trong đó, S là lượng P hấp phụ; c là nồng độ dung dịch photphat; t là thời gian; k, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> là các hằng số.

Đất phù sa Đồng bằng sông Hồng có hàm lượng P tổng số dao động trong khoảng 350-650 mg P/kg đất [15]. Khả năng hấp phụ P của đất Việt Nam dao động khá mạnh, trong khoảng 10-2.656 mg P/kg đất, tùy theo từng loại đất. Đồng bằng sông Hồng gồm 10 tỉnh, thành phố với diện tích đất phù sa chiếm hơn 70% diện tích tự nhiên toàn vùng. Đây là một trong những vùng canh tác lúa trọng điểm của cả nước nhằm đảm bảo an ninh lương thực quốc gia và phục vụ xuất khẩu. Đất phù sa Đồng bằng sông Hồng có biến động lớn về tỷ lệ phần trăm cấp hạt, nên đất có thành phần cơ giới từ nhẹ đến nặng (từ cát đến thịt pha sét) [16]. Đất có phản ứng từ hơi chua cho đến trung tính, hàm lượng chất hữu cơ, đạm, kali tổng số, dung tích hấp phụ ở mức trung bình; hàm lượng P tổng số giàu; hàm lượng các cation trao đổi ở mức khá [17]. Một thực tế xảy ra tại khu vực này là hàm lượng P tổng số dù ở mức cao nhưng vẫn không đáp ứng được nhu cầu sinh trưởng của cây, nguyên nhân có thể do phần lớn P dễ tiêu bị hấp phụ và cố định bởi các hợp chất ôxit và hydrôxit kim loại (Fe, Al, Ca, Mg). Tính chất hóa học của đất phù sa Đồng bằng sông Hồng cũng có sự khác nhau về một số chỉ tiêu do sự phân bố địa lý của đất [17], nên khả năng hấp phụ P của đất phù sa tại các khu vực khác nhau có thể có sự khác nhau.

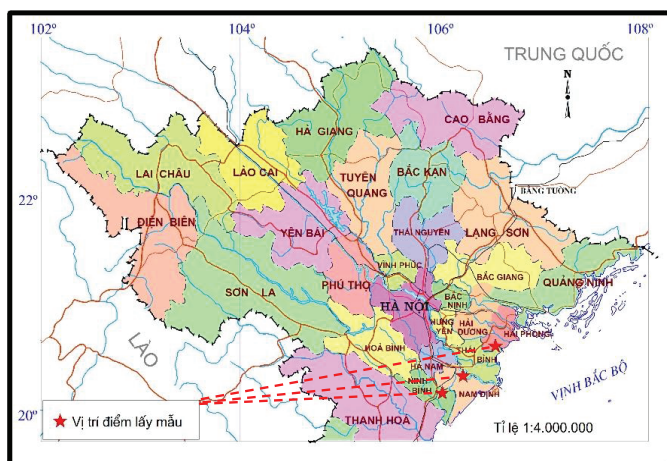
Tuy nhiên, đến nay chưa có nhiều nghiên cứu ở Việt Nam nói chung và vùng Đồng bằng sông Hồng nói riêng về ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ và thời gian đến quá trình hấp phụ P của đất. Vì vậy, tiếp nối các nghiên cứu về ảnh hưởng của pH và nồng độ phân bón lân lên quá trình hấp phụ P trong đất, nghiên cứu này tập trung vào nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ và thời gian đến quá trình hấp phụ P của đất phù sa trồng lúa nước ở vùng Đồng bằng sông Hồng, từ đó đưa ra khuyến cáo nhằm giúp tăng hiệu lực phân lân khi bón vào đất trong bối cảnh ảnh hưởng của biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng. Các thí nghiệm được tiến hành trên cùng một nhóm đất phù sa nhưng thuộc 3 khu vực địa lý khác nhau của Đồng bằng sông Hồng là HP, ND và NB với 2 giả thuyết nghiên cứu: (i) Nhiệt độ tăng sẽ tác động đến phức hệ hấp phụ keo đất và khả năng khuếch tán

của dung dịch đất, từ đó làm gia tăng khả năng hấp phụ P trong đất; (ii) Quá trình hấp phụ P lên pha rắn của đất tỷ lệ thuận với thời gian tiếp xúc với dung dịch chứa P hòa tan nhưng quá trình này có xu hướng nhanh trong thời gian đầu và chậm dần ở giai đoạn sau.

## Phương pháp nghiên cứu

### Thu thập và xử lý mẫu đất

Phương pháp lấy mẫu đất ngoài thực địa thực hiện theo quy định tại TCVN 7538-2:2005 - chất lượng đất - lấy mẫu, phần 2: hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu. Trên diện tích 2 ha đất phù sa sau thu hoạch lúa, lập các ô vuông có kích thước 5x5 m, tại mỗi góc của ô vuông tiến hành lấy 1 kg đất rồi trộn đều, từ mẫu hỗn hợp trộn đều này lấy 1 mẫu đại diện cho loại đất nghiên cứu của 3 địa phương ở Đồng bằng sông Hồng gồm HP, ND và NB (hình 1), nhằm đảm bảo tính đặc trưng của khu vực nghiên cứu. Mẫu đất được xử lý sơ bộ theo hướng dẫn kỹ thuật tại TCVN 6647:2000 (ISO 11464:1994) - chất lượng đất - xử lý sơ bộ đất để phục vụ thí nghiệm. Các công đoạn xử lý mẫu, phân tích mẫu và thí nghiệm được thiết lập và thực hiện tại Phòng Phân tích thí nghiệm tổng hợp địa lý, Viện Địa lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 1. Vị trí lấy mẫu đất nghiên cứu tại Hả Phòng, Nam Định và Ninh Bình.

### Phân tích trong phòng thí nghiệm

Mẫu đất được xử lý trong điều kiện không khí khô và rây qua rây kích thước 2x2 mm trước khi phân tích các tính chất cơ bản như: độ chua trao đổi ( $pH_{KCl}$ ); thành phần cơ giới; hàm lượng hữu cơ tổng số (OM); hàm lượng sắt (Fe); nhôm (Al); canxi (Ca); magiê (Mg) tổng số; tổng cation trao đổi (CEC); các dạng tồn tại của P trong đất. Các phương pháp phân tích từng chỉ tiêu cụ thể được trình bày chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Phương pháp phân tích các tính chất vật lý và hóa học của mẫu đất.

| STT | Chỉ tiêu                       | Đơn vị        | Phương pháp phân tích                                                                                                                                                                                            |
|-----|--------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | $pH_{KCl}$                     |               | TCVN 5979:2007. Đo bằng máy pH meter trong huyền phù theo tỷ lệ đất và KCl 1M là 1:5.                                                                                                                            |
| 2   | Thành phần cơ giới             | %             | TCVN 8567:2010. Khuếch tán keo bằng Natri Hexametaphosphat/Natri cacbonat. Xác định thành phần limon và sét bằng pipet, xác định thành phần cát bằng rây.                                                        |
| 3   | CEC                            | meq/100 g đất | TCVN 8568:2010. Phương pháp amoni axetat, trao đổi $NH_4^+$ bằng KCl 1M, xác định $NH_4^+$ trong dung dịch theo Kjeldahl.                                                                                        |
| 4   | $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ trao đổi | meq/100 g đất | TCVN 8569:2010. Phương pháp amoni axetat, các cation được đo trong dung dịch chiết và đo trên máy phổ hấp thụ nguyên tử (AAS-3300 Pekin Elmer).                                                                  |
| 5   | $Al^{3+}$ trao đổi             | meq/100 g đất | TCVN 4403:2011. Trao đổi $Al^{3+}$ bằng dung dịch KCl 1M và xác định $Al^{3+}$ bằng phương pháp chuẩn độ trung hòa.                                                                                              |
| 6   | Nitơ tổng số                   | %             | TCVN 6498:1999. Phương pháp Kjeldahl. Chuyển N hữu cơ về dạng sunphat amon - $(NH_4)_2SO_4$ , cho kiềm tác động chuyển về dạng $NH_3$ và hấp thụ bằng axit boric.                                                |
| 7   | $P_2O_5$ tổng số               | %             | TCVN 8940:2011. Sử dụng axit pecloric cùng $H_2SO_4$ phân hủy và hòa tan các hợp chất photpho trong đất; xác định hàm lượng lân bằng phương pháp trắc quang.                                                     |
| 8   | Chất hữu cơ tổng số (OM)       | %             | TCVN 8941:2011. Phương pháp Walkley-Black. Oxy hóa các bon hữu cơ trong đất bằng dung dịch kali dicromat trong môi trường axit sunfuric đậm đặc. Chuẩn độ lượng dư kali dicromat bằng dung dịch muối $Fe^{2+}$ . |
| 9   | Tổng Fe, Al, Ca, Mg            | mg/kg         | TCVN 8246:2009. Phá hủy mẫu bằng kỹ thuật lò vi sóng trong hỗn hợp axit clohidric/nitric, sau đó xác định các nguyên tố bằng phương pháp phổ khối/plasma cặp cảm ứng (ICP/MS).                                   |

### Thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình hấp phụ P của đất

Tiến hành cân và lấy 2 g mẫu đất đã qua xử lý đưa vào bình tam giác 250 ml. Sau đó thêm vào 20 ml dung dịch  $KH_2PO_4$  nồng độ 50 mg P/l. Bình tam giác chứa đất và dung dịch P được ủ qua đêm ở 3 mức nhiệt độ khác nhau: 10, 25 và 40°C. Sau đó, dung dịch được lọc qua giấy lọc P và xác định hàm lượng P bằng phương pháp so màu. Dung lượng hấp phụ P được tính theo công thức (2):

$$Q = \frac{(C_0 - C_1) * V}{W} \quad (2)$$

Trong đó, Q là dung lượng hấp phụ P (mg/kg);  $C_0$  là nồng độ P ban đầu đưa vào trong dung dịch hấp phụ (mg/l);  $C_1$  là nồng độ P còn lại tại thời điểm đạt cân bằng hấp phụ (mg/l); W là khối lượng đất cân đem hấp phụ (g); V là thể tích của dung dịch hấp phụ (ml).

### Thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian đến quá trình hấp phụ P của đất

Với cách thiết kế thí nghiệm tương tự thí nghiệm về ảnh hưởng của nhiệt độ, 4 bình tam giác 250 ml chứa đất và dung



dịch P được ủ ở nhiệt độ ổn định 25°C. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần nên tổng cộng thí nghiệm này có 12 bình tam giác. Dịch lọc của 3 bình đầu tiên thu được khi cho dung dịch đất qua giấy lọc P sau 1 ngày ủ, dịch lọc của mỗi 3 bình tiếp theo thu được sau 2, 4 và 8 ngày ủ. Mẫu dịch lọc dùng để xác định hàm lượng P bằng phương pháp so màu. Dung lượng hấp phụ cũng được tính theo công thức (2).

## Kết quả và thảo luận

### Tính chất cơ bản của các mẫu đất phù sa nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu cho thấy, thành phần cơ giới của đất thay đổi từ cát pha đến thịt nặng, phụ thuộc vào phân bố của đất từ thượng lưu xuống hạ lưu, đất thịt có hàm lượng sét 2,30-31,38%, đất cát pha có hàm lượng cát 18,96-89,22%. Đất có phản ứng hơi chua đến trung tính ( $pH_{KCl}$  dao động 4,71-6,50). Hàm lượng các chất dinh dưỡng tổng số ở mức trung bình đến khá; OM dao động 1,02-3,06%; N tổng số dao động trong khoảng 0,06-0,16%; P tổng số 0,04-0,06%. CEC đất ở mức thấp đến trung bình (5,6-18,2 meq/100 g đất); hàm lượng  $Al^{3+}$  trao đổi thấp (<0,02 meq/100 g đất);  $Fe^{2+}$  trao đổi dao động 0,22-0,35 meq/100 g đất; hàm lượng  $Ca^{2+}$  và  $Mg^{2+}$  tương ứng dao động 1,40-1,55 meq/100 g đất và 0,15-0,60 meq/100 g đất (bảng 2).

**Bảng 2.** Tính chất vật lý và hoá học cơ bản của các mẫu đất phù sa nghiên cứu.

| STT | Chỉ tiêu                  | Giá trị  |         |          |
|-----|---------------------------|----------|---------|----------|
|     |                           | Mẫu HP   | Mẫu NB  | Mẫu ND   |
| 1   | Cát (%)                   | 33,04    | 89,22   | 18,96    |
| 2   | Limon (%)                 | 36,56    | 8,48    | 49,66    |
| 3   | Sét (%)                   | 30,40    | 2,30    | 31,38    |
| 4   | $pH_{KCl}$                | 4,71     | 6,50    | 5,11     |
| 5   | Tổng N (%)                | 0,06     | 0,07    | 0,16     |
| 6   | Tổng P (%)                | 0,04     | 0,06    | 0,04     |
| 7   | OM (%)                    | 3,06     | 1,02    | 1,26     |
| 8   | CEC (meq/100 g đất)       | 12,0     | 5,6     | 18,2     |
| 9   | $Ca^{2+}$ (meq/100 g đất) | 1,50     | 1,40    | 1,55     |
| 10  | $Mg^{2+}$ (meq/100 g đất) | 0,6      | 0,15    | 1,30     |
| 11  | $Al^{3+}$ (meq/100 g đất) | 0,00     | 0,00    | 0,02     |
| 12  | $Fe^{3+}$ (meq/100 g đất) | 0,350    | 0,350   | 0,225    |
| 13  | Tổng Fe (mg/kg đất)       | 20.089,2 | 4.836,4 | 18.080,6 |
| 14  | Tổng Al (mg/kg đất)       | 19.472,4 | 3.944,2 | 22.491,3 |
| 15  | Tổng Ca (mg/kg đất)       | 934,9    | 1.205,0 | 467,4    |
| 16  | Tổng Mg (mg/kg đất)       | 1.585,6  | 598,3   | 2.480,4  |

### Các dạng tồn tại của P trong đất

Kết quả phân tích P tổng số và các dạng tồn tại của P trong 3 mẫu đất thí nghiệm được trình bày trong bảng 3. Hàm lượng P tổng số trong các mẫu đất HP, ND và NB tương ứng là 0,04, 0,04 và 0,06%. Như vậy, đất phù sa ở HP và ND được xếp vào loại nghèo P; đất phù sa tại NB được xếp vào loại có hàm lượng P trung bình.

Các dạng tồn tại của P trong các mẫu đất nghiên cứu chủ yếu ở dạng liên kết với Al và Fe. Mẫu đất NB có hàm lượng

Ca cao, nên P còn tồn tại ở dạng liên kết với Ca cao. Mẫu đất HP có hàm lượng OM cao, nên hàm lượng P tồn tại tương đối nhiều ở dạng liên kết trong các hợp chất hữu cơ bền so với hai mẫu đất NB và ND.

So sánh hàm lượng các dạng tồn tại của P trong 3 mẫu đất nghiên cứu cho thấy, ở mẫu đất HP có phân bố các dạng P theo thứ tự từ cao xuống thấp như sau:  $F3 > F5 > F2 > F4 > F1$ ; mẫu đất NB có trật tự:  $F4 > F2 > F3 > F5 > F1$ ; mẫu đất ND theo trật tự:  $F3 > F2 > F5 > F4 > F1$ .

**Bảng 3.** Hàm lượng tổng số và các dạng P trong mẫu đất phù sa nghiên cứu.

| STT | Chỉ tiêu                                                 | Đơn vị | Mẫu HP | Mẫu NB | Mẫu ND |
|-----|----------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | Dạng P hoà tan và liên kết yếu (F1)                      | mg/kg  | 2,4    | 23,6   | 1,9    |
| 2   | Dạng P liên kết với Al (F2)                              | mg/kg  | 90,8   | 188,1  | 104,4  |
| 3   | Dạng P liên kết với Fe (F3)                              | mg/kg  | 227,3  | 186,1  | 232,3  |
| 4   | Dạng P liên kết Ca (F4)                                  | mg/kg  | 43,8   | 194,0  | 43,6   |
| 5   | Dạng P liên kết trong hợp chất hữu cơ bền và khoáng (F5) | mg/kg  | 93,4   | 43,1   | 65,4   |
|     | Tổng P ( $P_{TS}$ )                                      | mg/kg  | 457,0  | 635,5  | 447,5  |
|     |                                                          | %      | 0,04   | 0,06   | 0,04   |

### Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hấp phụ P của đất

Trong trồng trọt, nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây trồng. Đồng thời, nhiệt độ cũng ảnh hưởng lớn đến môi trường sống của các loài vi sinh vật đất và quá trình chuyển hóa các chất dinh dưỡng trong đất. Nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình khoáng hoá và tạo dung dịch keo đất, qua đó sẽ ảnh hưởng đến hiện tượng hấp phụ các chất dinh dưỡng trong phân bón khi bón cho cây trồng. Do vậy, ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình hấp phụ P trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng được thí nghiệm trong dải nhiệt độ 10-40°C, tương ứng với phân hóa nhiệt độ theo mùa tại miền Bắc. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc điều chỉnh lượng bón phân lân hợp lý trong điều kiện nhiệt độ từng mùa vụ khác nhau ở vùng Đồng bằng sông Hồng.

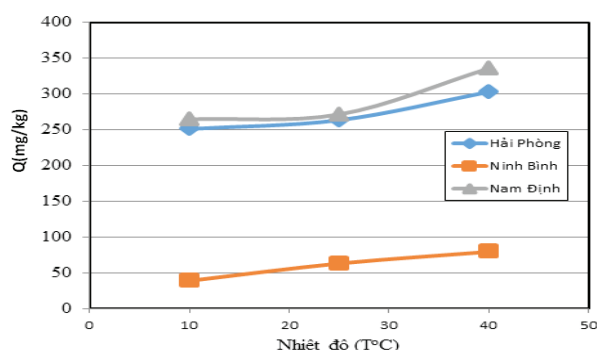
**Bảng 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến dung lượng hấp phụ P của đất phù sa.

| STT | Nhiệt độ (°C) | Dung lượng hấp phụ P của đất phù sa (Q: mg/kg) |        |        |
|-----|---------------|------------------------------------------------|--------|--------|
|     |               | Mẫu HP                                         | Mẫu ND | Mẫu NB |
| 1   | 10            | 251,0                                          | 264,5  | 38,8   |
| 2   | 25            | 263,3                                          | 271,3  | 63,0   |
| 3   | 40            | 302,8                                          | 335,5  | 79,3   |

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hấp phụ P trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng lấy tại HP, ND và NB được trình bày trong bảng 4 và thể hiện ở hình 2. Kết quả thí nghiệm cho thấy, dung lượng hấp phụ P của mẫu đất NB thấp hơn nhiều so với mẫu đất HP và ND, điều này có thể giải thích do trong thành phần cơ giới của mẫu đất NB có hàm lượng cát rất cao (89,22%) so với mẫu HP và ND. Tuy nhiên, dung lượng hấp phụ P của cả 3 mẫu đất nghiên cứu đều tăng khi nhiệt độ tăng, mặc dù xu hướng tăng dung lượng hấp phụ P của các mẫu đất nghiên

cứu không giống nhau. Như vậy, có thể thấy rõ yếu tố nhiệt độ đã ảnh hưởng mạnh đến tốc độ hấp phụ P của đất phù sa Đồng bằng sông Hồng. Dung lượng hấp phụ P của đất tăng tỷ lệ thuận với gia tăng nhiệt độ, kết quả nghiên cứu này phù hợp với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới [7, 8, 10, 18-20]. Đồng thời, kết quả nghiên cứu cũng khẳng định giả thiết đưa ra ban đầu. Điều này có thể giải thích như sau: năng lượng liên kết của P bị hấp phụ trong đất và P kết tủa tăng khi nhiệt độ tăng; hơn thế nữa, nhiệt độ tăng sẽ làm giảm thời gian kết tinh của các tinh thể khoáng, do đó lượng tinh thể được hình thành nhiều sẽ làm tăng khả năng hấp phụ P của đất. Với loại đất phù sa có pH trung tính, hàm lượng Ca cao, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng kết tủa của các khoáng Ca như  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaO}$ ... tạo ra nhiều tâm hấp phụ trong dung dịch đất.

Kết quả của nghiên cứu đã chỉ rõ, dung lượng hấp phụ P của các mẫu đất nghiên cứu không giống nhau. Cùng khoảng tăng nhiệt độ là  $15^\circ\text{C}$  (từ  $10^\circ\text{C}$  lên  $25^\circ\text{C}$  và từ  $25^\circ\text{C}$  lên  $40^\circ\text{C}$ ), dung lượng hấp phụ P của đất ở dải nhiệt độ  $25-40^\circ\text{C}$  lại tăng gấp từ 3,2 lần (đối với mẫu đất HP) đến 9,4 lần (mẫu đất NB) so với dung lượng hấp phụ P của đất ở dải nhiệt độ  $10-15^\circ\text{C}$ . Khi nhiệt độ tăng từ  $10^\circ\text{C}$  lên  $25^\circ\text{C}$ , dung lượng hấp phụ P tăng tương ứng là 12,3 mg/kg đối với mẫu đất HP; 24,2 mg/kg đối với mẫu đất NB và 6,8 mg/kg đối với mẫu đất ND. Trong khi đó, nhiệt độ tăng từ  $25^\circ\text{C}$  lên  $40^\circ\text{C}$ , dung lượng hấp phụ P tăng lần lượt là 39,5 mg/kg đối với mẫu đất HP; 16,3 mg/kg đối với mẫu đất NB và 64,2 mg/kg đối với mẫu đất ND.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hấp phụ P trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng.

Như vậy, dung lượng hấp phụ (cố định) P của đất tăng lên khi nhiệt độ tăng. Do đó, về lý thuyết, để đáp ứng đủ nhu cầu P cần thiết cho cây trồng ở vùng Đồng bằng sông Hồng, cần điều chỉnh lượng phân lân bón tăng vào mùa hè và giảm vào mùa đông. Tuy nhiên, tăng lượng phân lân sử dụng sẽ làm gia tăng chi phí đầu vào. Hơn nữa, đây mới là những kết quả nghiên cứu bước đầu, để có số liệu chính xác về lượng phân bón cần thiết cho từng mùa vụ sản xuất, cần tiếp tục có các nghiên cứu chi tiết trên từng đối tượng cây trồng cụ thể.

#### Ảnh hưởng của thời gian đến hấp phụ P của đất

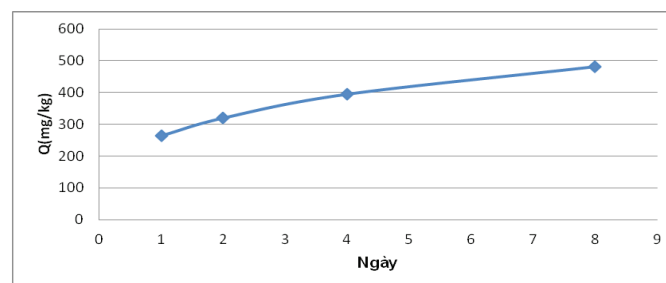
Thí nghiệm về ảnh hưởng của thời gian đến dung lượng hấp phụ P của các mẫu đất được tiến hành ở cùng nhiệt độ ( $25^\circ\text{C}$ ) và  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  của dung dịch đất. Nồng độ dung dịch P

thêm vào là 50 mg P/l và thời gian theo dõi thí nghiệm là 1, 2, 4 và 8 ngày. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian đến dung lượng hấp phụ P của đất phù sa.

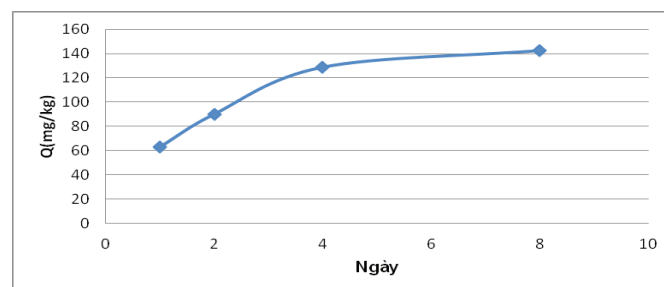
| STT | Thời gian (ngày) | Dung lượng hấp phụ P (Q: mg/kg) |        |        |
|-----|------------------|---------------------------------|--------|--------|
|     |                  | Mẫu HP                          | Mẫu ND | Mẫu NB |
| 1   | 1                | 263,3                           | 264,5  | 63,0   |
| 2   | 2                | 319,3                           | 359,0  | 90,0   |
| 3   | 4                | 394,5                           | 414,5  | 128,8  |
| 4   | 8                | 481,3                           | 490,5  | 142,5  |

- Đối với đất phù sa lấy tại HP: kết quả thí nghiệm cho thấy, dung lượng hấp phụ P của đất phù sa trồng lúa nước tại HP tăng theo thời gian. Tuy nhiên, mức tăng không cao, đồ thị mối quan hệ giữa dung lượng hấp phụ P của mẫu đất thí nghiệm và thời gian có độ dốc nhỏ (hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian đến hấp phụ P của đất phù sa lấy tại Hải Phòng.

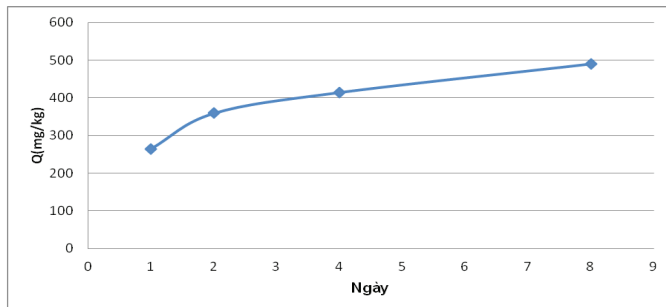
- Đối với đất phù sa lấy tại NB: kết quả nghiên cứu cho thấy, dung lượng hấp phụ P của đất phù sa trồng lúa tại đây tăng theo thời gian. Tuy nhiên, từ hình 4 cho thấy, đồ thị mối quan hệ giữa dung lượng hấp phụ và thời gian có độ dốc lớn trong khoảng từ 1 đến 4 ngày; từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 8 thì đồ thị này có xu thế tiến tới đạt trạng thái nằm ngang, chứng tỏ đất ở đây đạt cân bằng hấp phụ sau ngày thứ 8 trở đi, nghĩa là sự hấp phụ P đạt cực đại trong thời gian ngắn.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hấp phụ P của đất phù sa lấy tại Ninh Bình.

- Đối với đất phù sa lấy tại ND: tương tự với mẫu đất HP, dung lượng hấp phụ P của mẫu đất lấy tại ND tăng theo thời gian dài. Tuy nhiên, tốc độ tăng chậm, thể hiện độ dốc

của đường phụ thuộc giữa nồng độ và thời gian không lớn (hình 5). Do trong mẫu đất có thành phần limon, sét cao nên trong khoảng thời gian khảo sát, dung lượng hấp phụ P của đất chưa đạt được cân bằng, cần có các nghiên cứu tiếp tục với khoảng thời gian dài hơn để xác định dung lượng hấp phụ P cực đại của đất phù sa nghiên cứu.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian đến hấp phụ P của đất phù sa lấy tại tỉnh Nam Định.

Với những loại đất phù sa có thành phần cơ giới nhẹ, dung dịch đất có phản ứng trung tính và có hàm lượng Ca cao, trong quá trình canh tác nên lưu ý bón phân lân vào thời kỳ cây trồng đang phát triển, tránh sử dụng phân lân bón lót.

## Kết luận

Hiện tượng hấp phụ (cố định) P diễn ra phổ biến trong các loại đất nhiệt đới, từ đó làm giảm hiệu lực của phân lân đối với cây trồng. Khả năng hấp phụ P trong dung dịch đất phụ thuộc nhiều vào các tính chất và đặc điểm của từng loại đất canh tác, hàm lượng thành phần vô cơ và hữu cơ của đất. Do vậy, để tăng hiệu lực của phân lân trong canh tác, cần thiết phải xem xét đến các thành phần này. Bên cạnh ảnh hưởng của độ chua môi trường đất và nồng độ phân lân đưa vào đất đến quá trình hấp phụ (cố định) P của đất, nhiệt độ và thời gian cũng ảnh hưởng mạnh đến quá trình hấp phụ P. Trong nghiên cứu này, yếu tố nhiệt độ và thời gian lần đầu tiên được xem xét trong mối tương quan với quá trình hấp phụ P của đất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong khoảng nhiệt độ 25-40°C, quá trình hấp phụ P của đất diễn ra nhanh hơn ở khoảng nhiệt độ 10-25°C. Đồng thời, quá trình hấp phụ P ở giai đoạn đầu khi mới bón phân lân vào đất diễn ra nhanh hơn 2-3 lần so với giai đoạn sau. Như vậy, kết quả nghiên cứu hoàn toàn trùng với giả thuyết đã đưa ra.

Trong bối cảnh biến đổi khí hậu, để cải thiện hiệu lực phân lân đối với cây trồng trên đất phù sa vùng Đồng bằng sông Hồng, yếu tố nhiệt độ và thời điểm bón phân cần được tính đến. Trong đó, hạn chế sử dụng phân lân để bón lót, nên bón trong giai đoạn cây đang sinh trưởng và phát triển. Đồng thời, hạn chế bón phân lân trong thời kỳ môi trường đất có nhiệt độ cao.

Để có thể đưa ra các khuyến nghị có tính khả thi về thời điểm và lượng phân lân sử dụng cho cây trồng hiệu quả ở vùng Đồng bằng sông Hồng, cần tiếp tục có những nghiên cứu thực nghiệm theo hướng này trên từng đối tượng cây trồng cụ thể.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả của Đề tài độc lập cấp quốc gia: “Nghiên cứu, đánh giá tác động của biến đổi khí hậu đến tài nguyên đất vùng Đồng bằng sông Hồng và đề xuất các giải pháp chủ động ứng phó”, mã số ĐTĐLCN.48/16.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.E. Pérez Corona, I. Van Der Klundert, J.T.A. Verhoeven (1996), “Availability of organic and inorganic phosphorus compounds as phosphorus sources for *Carex* species”, *New Phytologist*, **133**(2), pp.225-231.
- [2] M.K. Sinha (1971), “Organo-metallic phosphates”, *Plant and Soil*, **35**, pp.471-484.
- [3] E. Frossard, L.M. Condron, A. Oberson, S. Sinaj, J.C. Fardeau (2000), “Processes governing phosphorus availability in temperate soils”, *Environment Quality*, **29**(1), p.15.
- [4] B.W. Murphy (2014), *Soil organic matter and soil function - Review of the Literature and Underlying Data*, Department of the Environment, Canberra, Australia.
- [5] D. Cordell, J.O. Drangert, S. White (2009), “The story of phosphorus: global food security and food for thought”, *Global Environmental Change*, **19**, pp.292-305.
- [6] S.J. Van Kauwenbergh, M. Steward, R. Mikkelsen (2016), “World reserves of phosphate rock - a dynamic and unfolding story”, *Better Crops*, **97**(3), pp.18-20.
- [7] N.J. Barrow, T.C. Shaw (1975), “The slow reactions between soil and anions: 2 effects of time and temperature on the decrease in phosphate concentration in the soil solution”, *Soil Science*, **119**, pp.167-177.
- [8] N.J. Barrow (1979), “Three effects of temperature on the reactions between inorganic phosphate and soils”, *Journal of Soil Science*, **30**, pp.271-279.
- [9] M. Doula, A. Ioannou, A. Dimirkou (1996), “Thermodynamics of phosphate adsorption-desorption by alfisols, entisols, vertisols and inceptisols”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **27**, pp.1749-1764.
- [10] B.R. Gardner, J.P. Jones (1973), “Effects of temperature on phosphate sorption isotherms and phosphate desorption”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **4**, pp.83-93.
- [11] N.J. Barrow (1983), “A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil”, *Journal of Soil Science*, **34**, pp.733-750.
- [12] N.J. Barrow (1982), “A discussion of the methods for measuring the rate of reaction between soil and phosphate”, *Fertilizer Research*, **4**, pp.51-61.
- [13] R.G.V. Bramley, N.J. Barrow, T.C. Shaw (1992), “The reaction between phosphate and dry soil. I. The effect of time, temperature and dryness”, *Journal of Soil Science*, **43**(4), pp.749-758.
- [14] V.E. Berkheiser, J.J. Street, P.S.C. Rao, T.L. Yuan (1980), “Partitioning of inorganic orthophosphate in soil-water systems”, *CRC Critical Reviews on Environmental Control*, **10**(3), pp.179-224.
- [15] Võ Đình Quang (1999), *Trạng thái lân trong đất Việt Nam*, Nxb Nông nghiệp.
- [16] Đỗ Thu Hà, Phạm Quang Hà (2008), “Chì (Pb) tổng số và mối liên hệ với một số đặc tính lý, hoá học của đất phù sa sông Hồng”, *Tạp chí Khoa học đất*, **30**, tr.16-19.
- [17] Hội Khoa học Đất Việt Nam (1996), *Đất Việt Nam*, Nxb Nông nghiệp.
- [18] N.J. Barrow (2006), “Three effects of temperature on the reactions between inorganic phosphate and soil”, *European Journal of Soil Science*, **30**(2), pp.271-279.
- [19] J. Bai, X. Ye, J. Jia, G. Zhang, Q. Zhao, B. Cui, X. Liu (2017), “Phosphorus sorption-desorption and effects of temperature, pH and salinity on phosphorus sorption in marsh soils from coastal wetlands with different flooding conditions”, *Chemosphere*, **188**, pp.677-688.
- [20] S.H. Chien, N.K. Savant, U. Mokwunye (1982), “Effect of temperature on phosphate sorption and desorption in two acid soils”, *Soil Science*, **133**(3), pp.160-166.



# Khả năng sinh trưởng và năng suất sinh sản của lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) nuôi tại Công ty Indovina Thái Bình

Trịnh Hồng Sơn\*, Nguyễn Thị Hương

Trung tâm Nghiên cứu lợn Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 5/8/2019; ngày chuyển phản biện 9/8/2019; ngày nhận phản biện 16/9/2019; ngày chấp nhận đăng 4/10/2019

## **Tóm tắt:**

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng của lợn cái hậu bị (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace); năng suất sinh sản của lợn nái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) khi phối tinh lợn đực Duroc nuôi tại Công ty Indovina Thái Bình. Các chỉ tiêu về khả năng sinh trưởng và sinh lý phát dục được theo dõi trên 30 lợn cái hậu bị (Landrace x Yorkshire) và 30 lợn cái hậu bị (Yorkshire x Landrace). Năng suất sinh sản được đánh giá ở lứa đầu của 60 lợn nái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace). Kết quả nghiên cứu cho thấy, lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) trong giai đoạn 70-160 ngày tuổi có tăng khối lượng bình quân đạt 758,16 và 772,85 g/con/ngày, dày mỡ lưng tại thời điểm kết thúc thí nghiệm đạt 16,99 và 17,20 mm. Lợn nái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) có tuổi động dục lần đầu tương ứng là 169,40 và 170,17 ngày, tuổi phối giống lần đầu 211,40 và 212,83 ngày; tuổi đẻ lứa đầu 339,47 và 340,25 ngày. Khi phối với đực Duroc, lợn nái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) có số con sơ sinh sống/ổ đạt 11,12 và 11,25 con, lợn con được cai sữa ở 22 ngày tuổi có số con cai sữa là 10,92 và 11,08 con, khối lượng cai sữa/ổ đạt 59,15 và 66,49 kg. Lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) có khả năng sản xuất tốt trong điều kiện chăn nuôi công nghiệp.

**Từ khóa:** Landrace, sinh lý phát dục, sinh sản, sinh trưởng, Yorkshire.

**Chỉ số phân loại:** 4.2

## **Đặt vấn đề**

Con giống có vai trò quyết định đến khả năng sản xuất tối đa của vật nuôi. Để nâng cao năng suất và chất lượng thịt cũng như cải thiện di truyền đàn lợn giống ở nước ta, trong những gần đây, nhiều cơ sở chăn nuôi đã nhập một số giống lợn cao sản. Một số nghiên cứu sử dụng các giống lợn cao sản như Landrace, Yorkshire và Duroc cho mục đích nuôi thịt và sinh sản trong các trang trại chăn nuôi công nghiệp đã được thực hiện. Bên cạnh các ưu điểm, mỗi con giống đều có những nhược điểm nhất định liên quan đến khả năng sinh sản và khả năng sản xuất thịt. Một trong những giải pháp để hạn chế những nhược điểm và phát huy tối đa ưu điểm của mỗi giống là tạo ra các tổ hợp lai. Con lai không chỉ được sử dụng vào mục đích nuôi thịt mà còn được sử dụng làm nái để tận dụng ưu thế lai của con mẹ.

Phát triển chăn nuôi lợn lai đã được nhiều nước sử dụng nhằm nâng cao năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế. Trong những năm gần đây, giống lợn ngoại Landrace và Yorkshire sử dụng trong sản xuất chăn nuôi lợn ở nước ta đã góp phần nâng cao năng suất và chất lượng thịt. Theo Phùng Thị Vân và cs (2000) [1], việc tận dụng ưu thế lai của 2 giống lợn này tạo ra các tổ hợp lai (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x

Landrace) có khả năng sinh trưởng cao. Ngoài ra, các tác giả Vũ Đình Tôn và cs (2010) [2], Lê Đình Phùng và cs (2012) [3] đã thông báo các tổ hợp lai (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) có năng suất sinh sản cao khi phối với lợn đực Duroc tạo tổ hợp lợn lai thương phẩm 3 giống có năng suất, chất lượng thịt cao, được sử dụng phổ biến trong sản xuất chăn nuôi ở nhiều địa phương. Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng và năng suất sinh sản của lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) nuôi tại Công ty Indovina Thái Bình.

## **Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu**

### **Đối tượng**

Lợn cái giống (Landrace x Yorkshire) viết tắt là LY và (Yorkshire x Landrace) viết tắt là YL mỗi công thức theo dõi 30 con, từ tháng 6/2017-6/2018, tại Công ty Indovina Thái Bình.

### **Nội dung**

Đánh giá khả năng sinh trưởng của lợn cái lai LY và YL.

Đánh giá sinh lý phát dục của lợn cái lai LY và YL.

Đánh giá năng suất sinh sản của lợn nái lai LY và YL tại lứa 1.

\*Tác giả liên hệ: Email: sontrinhvcn@gmail.com

# Growth and reproductive performance of female pigs (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) raised at Indovina Thai Binh Company

Hong Son Trinh\*, Thi Huong Nguyen

National Pig Research and Development Center, NIAS

Received 5 August 2019; accepted 4 October 2019

## Abstract:

The objective of this research is to evaluate the growth rate of (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) gilts and the reproductive performance of sows mated with Duroc boars at Indovina Thai Binh Company. The indicators of growth rate and physiology were observed on 30 (Landrace x Yorkshire) gilts and 30 (Yorkshire x Landrace) gilts. Reproductive performance was evaluated in the first litter of 60 (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) sows. Results obtained showed that: the ADG of (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) gilts in the period from 70 to 160 days was 758.16 and 772.85 g/pig/day, and the back fat thickness at the end of the experiment was 16.99 and 17.20 mm, respectively. The first oestrus age of (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) sows was 169.40 and 170.17 days; the age of first mating was 211.40 and 212.83 days; the age of birth giving was 339.47 and 340.25 days, respectively. The number of piglets born alive of (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) sows mated with Duroc boars was 11.12 and 11.25; the number of piglets at weaning at 22 days old was 10.92 and 11.08; the weaning weight/litter was 59.15 and 66.49 kg, respectively. (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) sows were capable of properly producing in industrial breeding conditions.

**Keywords:** growth rate, Landrace, physiology, reproductive performance, Yorkshire.

**Classification number:** 4.2

## Phương pháp

**Nội dung 1 - Khả năng sinh trưởng của lợn cái LY và YL:** mỗi loại lợn được bố trí thành 3 lô, mỗi lô 10 con, đảm bảo đồng đều về khối lượng bắt đầu thí nghiệm, chế độ chăm sóc, nuôi dưỡng và vệ sinh phòng bệnh. Thức ăn cho lợn thí nghiệm áp dụng theo tiêu chuẩn cho lợn cái hậu bị của Việt Nam (TCVN 1547:2007).

Lợn được uống nước tự do bằng núm tự động, ăn thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh công nghiệp phù hợp với từng giai đoạn sinh trưởng và được ăn tự do. Sau khi bố trí nuôi thích nghi 1 tuần, lợn được cân lần đầu là khối lượng bắt đầu thí nghiệm.

Lợn được nuôi kiểm tra năng suất theo từng lô trong giai đoạn từ 70 đến 160 ngày tuổi. Khối lượng bắt đầu và kết thúc thí nghiệm được cân trên cùng một loại cân có độ chính xác 0,1 kg và được cân vào buổi sáng trước khi cho ăn để tính tăng khối lượng trung bình/ngày.

Đo độ dày mỡ lưng tại điểm P2 tại thời điểm kết thúc thí nghiệm.

**Nội dung 2 - Sinh lý phát dục của lợn cái LY và YL:** sau khi kết thúc nội dung 1, lợn thí nghiệm tiếp tục được nuôi dưỡng và theo dõi các chỉ tiêu về sinh lý phát dục. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: tuổi động dục lần đầu (ngày), tuổi phối giống lần đầu (ngày), khối lượng động dục lần đầu (kg), khối lượng phối giống lần đầu (kg), thời gian động dục (ngày), chu kỳ động dục (ngày) và tuổi đẻ lứa đầu (ngày).

**Nội dung 3 - Khả năng sinh sản của lợn nái LY và YL tại lứa 1:** lợn nái thí nghiệm được bố trí theo phương pháp phân nhóm so sánh đảm bảo yếu tố đồng đều về chế độ nuôi dưỡng, chuồng trại, thú y, đực giống Duroc, phương thức phối giống (thụ tinh nhân tạo - phối kép), quản lý (các chỉ tiêu sinh sản của lợn nái được ghi chép theo cùng một biểu mẫu). Thức ăn cho lợn nái chữa, nái nuôi con và lợn con: áp dụng theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 1547:2007). Số con sơ sinh/ổ, số con sơ sinh sống/ổ, số con cai sữa/ổ được đếm trực tiếp. Khối lượng lợn sơ sinh được cân từng con bằng cân đồng hồ loại 5 kg và lợn cai sữa bằng cân đồng hồ loại 10 kg. Khối lượng sơ sinh sống/ổ, khối lượng cai sữa/ổ là tổng khối lượng toàn ổ tại các thời điểm tương ứng.

## Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1 (2002), các tham số thống kê bao gồm: dung lượng mẫu (n), số trung bình (Mean), độ lệch chuẩn (SD).

## Kết quả và thảo luận

### Khả năng sinh trưởng của lợn cái hậu bị LY và YL

Lợn cái LY và YL có khối lượng vào thí nghiệm đạt 31,50 kg và 30,97 kg, không có sự sai khác về thống kê ở chỉ tiêu này giữa hai nhóm giống. Khối lượng kết thúc thí nghiệm và khối lượng tăng trong thời gian thí nghiệm chênh lệch nhỏ nhưng sự sai khác này có ý nghĩa thống kê. Kết quả bảng 1 cho thấy,

trong cùng giai đoạn kiểm tra từ 70 đến 160 ngày tuổi, lợn YL có khối lượng tăng cao hơn so với lợn LY 1,57 kg.

Kết quả về khả năng sinh trưởng của lợn cái hậu bị LY và YL trong nghiên cứu này đạt 758,16 và 772,85 g/ngày. Kết quả này cao hơn so với lợn lai LY và YL trong nghiên cứu của Phùng Thị Vân và cs (2000) [1] trên 2 đối tượng lợn lai LY và YL với 695 và 726 g/ngày.

**Bảng 1. Khả năng sinh trưởng của lợn cái hậu bị LY và YL.**

| Chỉ tiêu                                       | LY (n=30)          |       | YL (n=30)           |       |
|------------------------------------------------|--------------------|-------|---------------------|-------|
|                                                | Mean               | SD    | Mean                | SD    |
| Tuổi bắt đầu kiểm tra (ngày)                   | 72,07              | 4,63  | 71,37               | 2,51  |
| Khối lượng bắt đầu kiểm tra (kg)               | 31,50              | 1,85  | 30,97               | 1,88  |
| Tuổi kết thúc kiểm tra (ngày)                  | 161,40             | 4,44  | 161,03              | 2,51  |
| Khối lượng kết thúc kiểm tra (kg)              | 99,23 <sup>b</sup> | 1,83  | 100,27 <sup>a</sup> | 1,87  |
| Khối lượng tăng (kg)                           | 67,73 <sup>b</sup> | 2,69  | 69,30 <sup>a</sup>  | 2,88  |
| Tăng khối lượng thời gian thí nghiệm (g/ngày)  | 758,16             | 28,58 | 772,85              | 31,50 |
| Dày mỡ lưng thời điểm kết thúc thí nghiệm (mm) | 16,99              | 1,61  | 17,20               | 1,51  |

Ghi chú: các giá trị trong cùng một hàng có mang các chữ cái khác nhau thì sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Khả năng sinh trưởng của lợn cái LY và YL có xu hướng thấp hơn so với con lai của chúng, theo Đoàn Xuân Soạn (2017) [4] tăng khối lượng giai đoạn 60-150 ngày tuổi của tổ hợp lai DxF<sub>1</sub> (LY) và PiDuxF<sub>1</sub> (LY) lần lượt là 778,1 và 788,18 g/ngày. Kết quả nghiên cứu của Magowan và McCann (2009) [5] trên các tổ hợp lai giữa nái F<sub>1</sub> (LY) với đực Landrace, Pietrain Austrian, Pietrain Belgium cho tăng khối lượng tương ứng là 804,0, 815,0 và 794,0 g/ngày.

Dày mỡ lưng của lợn cái LY và YL trong nghiên cứu này không có sự sai khác về mặt thống kê, tương ứng đạt 16,99 và 17,20 mm. Theo Nguyễn Đức Hùng và Đặng Văn Nghiệp (2012) [6], dày mỡ lưng và số con sơ sinh/ổ có tương quan âm (-0,9988). Lợn cái có dày mỡ lưng 15-20 mm có số con sinh ra/ổ và tỷ lệ sống đến cai sữa cao nhất. Như vậy, dày mỡ lưng của lợn LY và YL trong nghiên cứu này nằm trong ngưỡng dày mỡ lưng của lợn nái có số con sơ sinh sống trên ổ cao.

### Sinh lý phát dục của lợn LY và YL

Kết quả bảng 2 cho thấy, các chỉ tiêu sinh lý phát dục của lợn nái LY và YL là tương đối ổn định so với sinh lý bình thường của lợn. Tuổi động dục lần đầu, tuổi phối giống lần đầu và tuổi đẻ lứa đầu tương ứng đạt 169,40, 211,40, 339,47 ngày và 170,17, 212,83, 340,25 ngày. Tuổi phối giống lần đầu và tuổi đẻ lứa đầu trong nghiên cứu của chúng tôi sớm hơn, theo Hà Xuân Bộ và Đỗ Đức Lực (2017) [7] tuổi phối giống lần đầu của lợn nái LY và YL là 264,74 và 267,59 ngày; tuổi đẻ lứa đầu trong các nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Phục (2009) [8] là 72 ngày; Lê Đình Phùng và Nguyễn Trường Thi (2009) [9] 45 ngày trên cùng đối tượng.

Lợn YL có khối lượng phối giống lần đầu cao hơn lợn

**Bảng 2. Sinh lý phát dục của lợn LY và YL.**

| Chỉ tiêu                           | LY (n=30) |      | YL (n=30) |      |
|------------------------------------|-----------|------|-----------|------|
|                                    | Mean      | SD   | Mean      | SD   |
| Tuổi động dục lần đầu (ngày)       | 169,40    | 5,93 | 170,17    | 3,82 |
| Khối lượng động dục lần đầu (kg)   | 94,97     | 3,72 | 95,40     | 2,25 |
| Tuổi phối giống lần đầu (ngày)     | 211,40    | 5,93 | 212,83    | 4,21 |
| Khối lượng phối giống lần đầu (kg) | 136,30    | 4,66 | 138,77    | 2,57 |
| Chu kỳ động dục (ngày)             | 20,77     | 1,65 | 21,33     | 2,07 |
| Thời gian động dục (ngày)          | 2,47      | 0,09 | 2,44      | 0,11 |
| Tuổi đẻ lứa đầu (ngày)             | 339,47    | 2,55 | 340,25    | 2,45 |

LY và sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cao hơn khối lượng phối giống lần đầu trong nghiên cứu của Nguyễn Hải Lý (2012) [10] khi nghiên cứu trên cùng đối tượng với 106 kg.

### Năng suất sinh sản của lợn nái LY và YL tại lứa 1

Số liệu ở bảng 3 cho thấy, nái lai LY có các chỉ tiêu về số con sơ sinh/ổ, số con sơ sinh sống/ổ, số con đẻ nuôi/ổ và số con cai sữa/ổ không có sự sai khác so với nái lai YL. Ở lứa 1, lợn LY và YL có số con cai sữa tương ứng là 10,92 và 11,08 con. Kết quả sinh sản của lợn LY và YL trong nghiên cứu này đánh giá ở lứa 1 cao hơn so với kết quả nghiên cứu ở 3 lứa đầu trong nghiên cứu của Đoàn Văn Soạn và Đặng Vũ Bình (2010) [11] trên cùng đối tượng nghiên cứu tương ứng với 10,37 và 10,66 con. Theo Hà Xuân Bộ và Đỗ Đức Lực (2017) [7] lợn nái LY và YL có số con sơ sinh/ổ là 10,90 và 11,30 con; số con cai sữa/ổ là 7,52 và 7,37 con.

**Bảng 3. Năng suất sinh sản của lợn nái LY và YL tại lứa 1.**

| Chỉ tiêu                         | LY  |                    |       | YL  |                    |      |
|----------------------------------|-----|--------------------|-------|-----|--------------------|------|
|                                  | n   | Mean               | SD    | n   | Mean               | SD   |
| Số con sơ sinh/ổ (con)           | 30  | 11,33              | 1,95  | 30  | 11,50              | 1,64 |
| Số con sơ sinh sống/ổ (con)      | 30  | 11,12              | 1,73  | 30  | 11,25              | 1,42 |
| Số con đẻ nuôi/ổ (con)           | 30  | 11,12              | 0,92  | 30  | 11,18              | 1,37 |
| Số con cai sữa/ổ (con)           | 30  | 10,92              | 0,94  | 30  | 11,08              | 1,32 |
| Khối lượng sơ sinh sống/con (kg) | 334 | 1,42               | 0,12  | 338 | 1,41               | 0,10 |
| Khối lượng sơ sinh sống/ổ (kg)   | 30  | 15,79              | 1,49  | 30  | 15,86              | 0,90 |
| Khối lượng cai sữa/con (kg)      | 328 | 5,41 <sup>b</sup>  | 0,95  | 332 | 6,04 <sup>a</sup>  | 0,53 |
| Khối lượng cai sữa/ổ (kg)        | 30  | 59,15 <sup>b</sup> | 12,10 | 30  | 66,49 <sup>a</sup> | 6,10 |

Ghi chú: các giá trị trong cùng một hàng có mang các chữ cái khác nhau thì sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Khối lượng sơ sinh sống/con và khối lượng sơ sinh sống/ổ của lợn nái LY khi phối với lợn đực Duroc đạt 1,42 và 15,79 kg, tương đương với lợn YL đạt 1,41 và 15,86 kg ( $p > 0,05$ ). Theo Vũ Đình Tôn và Nguyễn Công Oánh (2010) [2], lợn LY khi phối với lợn đực Duroc có khối lượng sơ sinh đạt 1,38 kg. Nguyễn Văn Thắng và Vũ Đình Tôn (2010)



[12] nghiên cứu ở tổ hợp lai Duroc và LY đạt 1,39 kg. Kết quả nghiên cứu về khối lượng sơ sinh/con trong nghiên cứu này cao hơn các nghiên cứu trên.

Lợn LY và YL trong nghiên cứu này được cai sữa ở 22 ngày tuổi. Số ngày cai sữa trong nghiên cứu này phù hợp với xu hướng tổ chức quản lý trong chăn nuôi lợn công nghiệp hiện nay và tương đương với nghiên cứu của Nguyễn Văn Thắng và Vũ Đình Tôn (2010) [12], Đoàn Văn Soạn và Đặng Vũ Bình (2011) [13] trên đối tượng lợn nái  $F_1$ LY và  $F_1$ YL với thời gian cai sữa dao động từ 21,5 ngày đến 22,4 ngày. Kết quả của Nguyễn Ngọc Phục và cs (2009) [8], Lê Đình Phùng và Đậu Thị Tương (2012) [3] trên cùng đối tượng lợn nái  $F_1$ LY với thời gian cai sữa lợn con dao động từ 23,6 ngày đến 24,4 ngày.

Khối lượng cai sữa/ổ của lợn YL đạt 66,49 kg, cao hơn so với lợn LY với 59,15 kg. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Đoàn Văn Soạn và Đặng Vũ Bình (2010) [11] khi nghiên cứu trên cùng đối tượng tương ứng với 69,85 và 68,87 kg. Nguyên nhân là do năng suất sinh sản của lợn trong nghiên cứu này mới đánh giá ở lứa 1, còn các nghiên cứu của các tác giả đánh giá năng suất sinh sản ở 3 lứa đầu.

## Kết luận

Khả năng sinh trưởng của lợn cái LY và YL trong giai đoạn nuôi thịt từ 70-160 ngày tuổi có tăng khối lượng trung bình đạt 758,16 và 772,85 g/con/ngày, dày mỡ lưng tại thời điểm kết thúc thí nghiệm đạt 16,99 và 17,20 mm.

Lợn nái lai LY và YL có sinh lý phát dục bình thường với tuổi động dục lần đầu tương ứng là 169,40 và 170,17 ngày, tuổi phối giống lần đầu 211,40 và 212,83 ngày; tuổi đẻ lứa đầu 339,47 và 340,25 ngày.

Lợn nái lai LY và YL khi phối tinh lợn đực Duroc có khả năng sinh sản tốt với số con sơ sinh sống/ổ 11,12 và 11,25 con, lợn con được cai sữa lúc 22 ngày có số con cai sữa là 10,92 và 11,08 con, khối lượng cai sữa/ổ đạt 59,15 và 66,49 kg.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Phùng Thị Vân, Phạm Thị Kim Dung, Lê Thị Kim Ngọc, Hoàng Thị Nghệ, Phạm Duy Phẩm, Phạm Thị Thúy (2000), “Khả năng sinh trưởng, thành phần thịt xê của lợn thịt Landrace, Yorkshire, Duroc,  $F_1$ LY,  $F_1$ YL có nguồn gốc từ Mỹ”, *Báo cáo khoa học phần chăn nuôi gia súc*, Viện Chăn nuôi, tr.207-209.

[2] Vũ Đình Tôn, Nguyễn Công Oánh (2010), “Năng suất sinh sản, sinh trưởng và chất lượng thân thịt của các tổ hợp lai giữa nái

$F_1$ LY với đực Duroc, Landrace nuôi ở Bắc Giang”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*, **8(1)**, tr.106-113.

[3] Lê Đình Phùng, Đậu Thị Tương (2012), “Năng suất sinh sản của lợn nái  $F_1$ LY được phối tinh giống Landrace, Yorkshire, Omega, PIC337, PIC408 trong chăn nuôi lợn công nghiệp”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **10**, tr.95-99.

[4] Đoàn Văn Soạn (2017), “Khả năng sinh trưởng, năng suất và chất lượng thịt của các tổ hợp lai giữa lợn nái  $F_1$ (Landrace x Yorkshire) phối với đực Duroc và PiDu”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, **76**, tr.43-50.

[5] E. Magowan, M.E.E McCann (2009), *The effect of sire line breed on the lifetime performance of slaughter generation pigs*, Agri-food and Biosciences Institute (www.Afbini.Gov.UK).

[6] Nguyễn Đức Hùng, Đặng Văn Nghiệp (2012), “Ảnh hưởng của độ dày mỡ lưng đến các chỉ tiêu sinh lý sinh dục và sức sản xuất của lợn nái ngoại nuôi trong trang trại tại thị xã Sông Công, tỉnh Thái Nguyên”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **88(12)**, tr.143-149.

[7] Hà Xuân Bộ, Đỗ Đức Lực (2017), “Năng suất sinh sản của lợn nái  $F_1$  giữa Landrace và Yorkshire phối với đực Pietsrain kháng stress, PiDu nuôi tại Xí nghiệp chăn nuôi Đồng Hiệp, Hải Phòng”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*, **218**, tr.8-14.

[8] Nguyễn Ngọc Phục, Lê Thanh Hải, Đinh Hữu Hùng (2009), “Đánh giá năng suất sinh sản của lợn nái thuần Landrace, Yorkshire, nái lai  $F_1$ (LY/YL), nái VCN22 và khả năng sinh trưởng, cho thịt của lợn thương phẩm hai, ba và bốn giống trong điều kiện chăn nuôi trang trại tại Quảng Bình”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, **16**, tr.1-6.

[9] Lê Đình Phùng, Nguyễn Trường Thi (2009), “Khả năng sinh sản của lợn nái lai  $F_1$ (Yorkshire x Landrace) và năng suất của lợn thịt lai 3 máu (Duroc x Landrace) x (Yorkshire x Landrace)”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, **55**, tr.53-60.

[10] Nguyễn Hải Lý (2012), *Khả năng sinh sản của lợn nái  $F_1$ (Landrace x Yorkshire) phối với đực Pietrain, Duroc và PiDu nuôi tại Trại chăn nuôi Vân Nga, huyện Hiệp Hòa, tỉnh Bắc Giang*, Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

[11] Đoàn Văn Soạn, Đặng Vũ Bình (2010), “Khả năng sinh trưởng của các lợn lai giữa nái lai  $F_1$ (Landrace x Yorkshire),  $F_1$ (Yorkshire x Landrace) phối giống với lợn đực Duroc và L19”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **8(5)**, tr.807-813.

[12] Nguyễn Văn Thắng, Vũ Đình Tôn (2010), “Năng suất sinh sản, sinh trưởng, thân thịt và chất lượng thịt của các lợn lai giữa lợn nái  $F_1$ (Landrace x Yorkshire) với đực giống Landrace, Duroc và PiDu”, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp*, **8(1)**, tr.98-105.

[13] Đoàn Văn Soạn, Đặng Vũ Bình (2011), “Khả năng sinh sản của các lợn lai giữa nái lai  $F_1$ (LxY),  $F_1$ (YxL) với đực Du và VCN03”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **9(4)**, tr.614-621.

# Nghiên cứu ứng dụng dịch chiết có hoạt tính sinh học từ gừng (*Zingiber officinale*), riềng (*Alpinia officinarum*) để bảo quản tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)

Phan Thanh Tâm<sup>1\*</sup>, Nguyễn Mạnh Cường<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Viện Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*

<sup>2</sup>*Viện Kinh tế và Quy hoạch thủy sản, Tổng cục Thủy sản*

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 21/10/2019; ngày chấp nhận đăng 28/10/2019

## **Tóm tắt:**

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là loài tôm nước lợ, cho năng suất cao, thịt tôm có giá trị dinh dưỡng khá cao, hiện đang được nuôi ở nhiều vùng miền trên cả nước. Sản lượng tôm thẻ chân trắng không ngừng tăng trưởng trong những năm gần đây, không chỉ là nguồn nguyên liệu dồi dào cho tiêu thụ trong nước mà còn chiếm tỷ trọng lớn trong xuất khẩu. Tuy nhiên, nếu bảo quản không đúng cách, các loại thủy hải sản (trong đó tôm) là loại nguyên liệu rất nhanh hư hỏng sau đánh bắt do quá trình tự phân hủy và nhiễm vi sinh vật. Việc khai thác thành phần có nguồn gốc tự nhiên, đảm bảo an toàn, có khả năng kháng khuẩn và chống oxy hóa cao từ gừng, riềng để thay thế hóa chất không an toàn trong công tác bảo quản tôm thẻ chân trắng sau thu hoạch là hướng đi cần thiết ở Việt Nam hiện nay. Nghiên cứu đã tiến hành bảo quản riêng rẽ tôm thẻ chân trắng sau thu hoạch bằng các phụ gia an toàn cũng như bằng dịch chiết gừng, riềng kết hợp với phụ gia. Trong quá trình bảo quản, đã đánh giá chất lượng tôm thẻ thông qua chỉ tiêu hóa lý (pH, NH<sub>3</sub>), chỉ tiêu vi sinh vật và cảm quan, cho thấy hiệu quả rõ rệt của các dịch chiết gừng, riềng. Khi kết hợp dịch chiết gừng, riềng bằng dung môi etanol/nước với tỷ lệ 1/1 cùng với nisin 200 ppm và chitosan 0,5%, giúp kéo dài thời gian bảo quản đến 10 ngày ở 0-2°C mà vẫn đảm bảo chỉ tiêu về chất lượng và an toàn thực phẩm. Kết quả này bước đầu được áp dụng cho mô hình bảo quản tôm thẻ sau thu hoạch tại một số cơ sở thu mua của huyện Núi Thành (tỉnh Quảng Nam) mang lại hiệu quả rất khả quan.

**Từ khóa:** chống oxy hóa, gừng, hoạt tính kháng khuẩn, phụ gia bảo quản, riềng, tôm thẻ chân trắng.

**Chỉ số phân loại:** 4.5

## **Đặt vấn đề**

Hiện tại ngành nuôi trồng và khai thác tôm nước ta đang chiếm tỷ trọng lớn trong ngành thủy sản, sản lượng tôm xuất khẩu (tôm he, tôm sú, tôm thẻ chân trắng...) không ngừng tăng trưởng qua các năm, đem lại nguồn thu không nhỏ cho nền kinh tế đất nước. Theo báo cáo tại Hội nghị tổng kết ngành thủy sản 2018 [1], kim ngạch xuất xuất thủy sản năm 2018 đạt 9 tỷ USD, tăng 8,4% so với năm trước, trong đó xuất khẩu tôm dẫn đầu (đạt 3,58 tỷ USD) và tôm chân trắng chiếm tỷ trọng cao nhất (2,48 tỷ USD). Để đảm bảo chất lượng tôm cho tiêu dùng trong nước và xuất khẩu, rất cần giải pháp công nghệ bảo quản phù hợp, do tôm nguyên liệu sau khi thu hoạch dễ bị biến đổi, hư hỏng chất lượng rất nhanh, gây mất an toàn thực phẩm nếu bảo quản không đúng cách... Hiện tại, trên thế giới để bảo quản tôm người ta hay sử dụng các phụ gia hóa học như các muối sunfit, metabisunfit... tuy nhiên phải tuân thủ nghiêm ngặt các quy định, nếu hàm lượng vượt quá mức cho phép sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Khai thác thành phần có khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn từ thảo dược như gừng, riềng, tỏi, hành... trong bảo quản thực phẩm là hướng đi

đang được thế giới rất quan tâm [2]. Thành phần polyphenol có nhiều trong gừng, riềng với khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn cao được rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đề cập [3-5]. Thêm vào đó, gừng, riềng là gia vị quen thuộc được sử dụng khi chế biến nguyên liệu thủy hải sản như tôm, mực..., chính vì vậy nghiên cứu này mong muốn khai thác thành phần dịch chiết từ gừng, riềng để ứng dụng vào việc bảo quản nguyên liệu tôm thẻ, giúp kéo dài thời gian bảo quản, đảm bảo an toàn thực phẩm. Ngoài ra, để có thể kéo dài và nâng cao hơn nữa hiệu quả bảo quản thủy sản như mong muốn, việc lựa chọn kết hợp với các phụ gia an toàn có bản chất tự nhiên như nisin, chitosan, lactat natri, erythobat natri... với vai trò kháng khuẩn, chống oxy hóa cũng sẽ được đề cập đến trong nghiên cứu này.

## **Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu**

### **Nguyên liệu**

Nguyên liệu tôm thẻ chân trắng được thu mua sống từ chợ ở Hà Nội (đầu mối là các vùng nuôi trồng lân cận Hà Nội như Nam Định, Thanh Hóa...), được cho vào thùng xốp giữ nhiệt, cứ một lớp đá xay đến một lớp tôm, trên cùng và

\*Tác giả liên hệ: Email: tam.phanthanh@hust.edu.vn

# Study on applying biological activity components from the extracts of ginger (*Zingiber officinale*) and galangal (*Alpinia officinarum*) for preserving whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Thanh Tam Phan<sup>1\*</sup>, Manh Cuong Nguyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Biotechnology and Food Technology,  
Hanoi University of Science and Technology

<sup>2</sup>Vietnam Institute of Fisheries Economics and Planning,  
Directorate of Fisheries

Received 16 September 2019; accepted 28 October 2019

## Abstract:

Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is a kind of brackish shrimp with high productivity, and the shrimp meat has high nutritional values; therefore, it has been raised in many regions throughout of Vietnam. The output of whiteleg shrimp has been constantly growing in recent years, so it is not only a plentiful raw material source for domestic consumption but also a large proportion for export. Seafood (including shrimps) is a type of easily damaged materials after harvesting due to self-decomposition process and microbial contamination if improperly preserved. Exploiting of safe and natural components with antibacterial and anti-oxidant properties from ginger and galangal to preserve whiteleg shrimp after harvest to extend preservation time and ensure the quality, replacing unsafe chemicals is an essential direction in Vietnam today. The study has been conducted for the preservation of whiteleg shrimp after harvest with safe additives as well as ginger and galangal extracts in combination with additives. During the preservation process, the quality of whiteleg shrimp through the physicochemical criteria (pH,  $\text{NH}_3$ ), microbiological and sensory indicators showed the clear effect of ginger and galangal extracts. When combining ginger and galangal extract in ethanol/water solvent at the ratio of 1/1 with the addition of nisin 200 ppm and chitosan 0.5%, the preservation time of the post-harvest shrimp was extended to 10 days at 0-2°C while ensuring the quality and food safety criteria. The result was initially applied to the postharvest shrimp preservation model at some whiteleg shrimp preservation and purchasing establishments in Nui Thanh district (Quang Nam province), and exhibited good outcomes.

**Keywords:** antibacterial bioactivity, antioxidant, galangal, ginger, preservative additives, whiteleg shrimp.

**Classification number:** 4.5

dưới đáy thùng là lớp đá với tỷ lệ tôm/đá là 1/1,5; rồi vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm. Sau đó, tôm sẽ được xử lý bằng dịch chiết gừng, riềng và các phụ gia để nghiên cứu quá trình bảo quản.

Riềng (*Alpinia officinarum*), gừng (*Zingiber officinale*) dạng tươi thu mua đúng vụ ở Bắc Ninh, Nghệ An... được loại bỏ tạp chất, bụi bẩn và xử lý theo quy định để thu dịch chiết.

Phụ gia bảo quản: nisin (Danisco) có hoạt lực 1050 IU/mg; chitosan (Công ty MTV Chitosan, Kiên Giang); erythobat natri tinh khiết (Nhật), lactat natri tinh khiết (Đức).

## Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp xác định chỉ tiêu vi sinh vật:** phân lập và đếm *Staphylococcus aureus* theo TCVN 4830-1:2005; phân lập và đếm *Enterobacteriaceae* theo TCVN 5518-2:2007; phân lập và đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí theo TCVN 7928:2008.

**Phương pháp xác định chỉ tiêu hóa lý:** xác định hàm lượng  $\text{NH}_3$  theo TCVN 3706:1990; xác định pH theo TCVN 4835:2002.

## Phương pháp thực nghiệm:

Thu hồi dịch chiết gừng, riềng trong dung môi ethanol/nước và nước: gừng, riềng tươi được thái lát mỏng và sấy khô ở 40°C trong 18-20 h đạt độ ẩm <8%, sau đó được nghiền nhỏ thành dạng bột và bảo quản ở -12°C. Tiến hành chiết bằng dung môi ethanol/nước, với gừng sử dụng nồng độ 50% (v/v), với riềng là 60% (v/v) ở nhiệt độ chiết 50°C; chiết bằng nước với gừng và riềng ở nhiệt độ 60°C. Tỷ lệ chiết bột gừng (riềng)/dung môi là 1/40. Dịch chiết thu hồi sẽ được cô quay chân không tách ethanol (nếu chiết bằng ethanol/nước) và được định mức lên cùng một thể tích theo tỷ lệ 1/40 (khối lượng bột/thể tích định mức) và bảo quản ở nhiệt độ -12°C. Nồng độ dịch chiết từ gừng/riềng được lựa chọn là 25 mg bột khô/ml. Kết quả lựa chọn dung môi, điều kiện chiết tách (nồng độ, thời gian, nhiệt độ...) để thu được thành phần dịch chiết có hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hóa cao nhất như trên được thực hiện theo kết quả đã công bố trước đó của nhóm nghiên cứu [6, 7].

Ký hiệu loại dịch chiết gừng, riềng như sau: bột gừng chiết bằng dung môi ethanol/nước 50% (v/v): G50; bột riềng chiết bằng dung môi ethanol/nước 60% (v/v): R60; bột gừng/riềng chiết bằng nước ở 60°C: G60N/R60N.

Các loại dung dịch được lựa chọn để bảo quản tôm thẻ trong nghiên cứu: dịch chiết gừng, riềng riêng rẽ, kết hợp với phụ gia an toàn (sử dụng dịch chiết gừng, riềng đạt nồng độ 25 mg bột khô/ml do đã được kiểm định về khả năng kháng khuẩn và chống oxy hóa theo [6, 7]), cụ thể như sau: hàm lượng polyphenol tính theo axit galic của các dịch chiết với G50 là 19,93 mg/g bột khô, với R60 là 10,81 mg/g bột khô,



với G60N là 9,27 mg/g bột khô và với R60N là 7,59 mg/g bột khô. Tiêu chuẩn về chống oxy hóa được đánh giá bằng khả năng loại bỏ gốc tự do DDPH với các dịch chiết G50, R60, G60N, R60N lần lượt là 68,16; 72,9; 44,08 và 51,25%.

- Mẫu dịch bảo quản là dịch gừng, riềng chiết trong ethanol/nước (G50+R60) tỷ lệ 1/1.

- Mẫu dịch bảo quản là dịch chiết gừng, riềng chiết trong nước (G60N+R60N) tỷ lệ 1/1.

- Mẫu dịch bảo quản là hỗn hợp gồm các phụ gia an toàn: natri lactat 3% + nisin 200 ppm + natri erythorbat 1% ký hiệu là (Lac 3%+Ni 200 ppm+E 1%).

- Mẫu dịch bảo quản là hỗn hợp gồm: dịch chiết gừng, riềng chiết trong ethanol/nước + chitosan 0,5% + nisin 200 ppm ký hiệu là (G50+R60+CH 0,5%+Ni 200 ppm).

- Mẫu đối chứng: không xử lý dịch bảo quản, chỉ bảo quản bằng nước đá.

Phương pháp bảo quản tôm thẻ bằng dịch chiết gừng, riềng và các phụ gia an toàn: nguyên liệu tôm thẻ sau khi thu hoạch được vận chuyển sống bằng nước đá trong thùng xốp đưa về phòng thí nghiệm sẽ được bảo quản bằng loại dịch chiết gừng/riềng và phụ gia an toàn theo 2 phương pháp:

- Phương pháp 1 (PP1): nguyên liệu tôm thẻ được ngâm ngập trong dịch bảo quản (dịch chiết gừng/riềng riêng rẽ hay phối hợp với phụ gia) trong 60 phút ở điều kiện 0-2°C. Sau đó vớt nguyên liệu ra xếp bảo quản trong thùng xốp, dưới cùng là lớp đá xay, sau đó cứ một lớp tôm lại rải một lớp đá xay, trên cùng là lớp đá xay, tỷ lệ tôm thẻ/đá xay là 1/1,2 đảm bảo ngập tôm, duy trì nhiệt độ 0-2°C trong tủ lạnh, mỗi mẻ tiến hành bảo quản cho 5 kg tôm thẻ.

- Phương pháp 2 (PP2 - còn gọi là phương pháp ướt): tiến hành bảo quản tôm thẻ trong thùng xốp trong có lót túi PE, dưới cùng là lớp đá xay, sau đó cứ một lớp tôm thẻ lại một lớp đá, trên cùng là lớp đá xay; sau đó hòa dịch chiết gừng/riềng đậm đặc với nước sạch và đá (tính toán lượng nước sạch và đá sao cho đạt nồng độ yêu cầu của các thành phần gừng/riềng cũng như các phụ gia như trên và đạt tỷ lệ tôm thẻ/(đá xay + nước sạch + dịch bảo quản) là 1/1,2 đảm bảo ngập tôm; duy trì bảo quản ở 0-2°C trong tủ lạnh.

Theo dõi đánh giá các chỉ tiêu hóa lý, vi sinh vật và cảm quan các mẫu tôm thẻ theo 2 phương pháp trên với mẫu đối chứng không xử lý dịch chiết và chất bảo quản (chỉ bảo quản bằng nước đá) trong thời gian bảo quản đến 10 ngày.

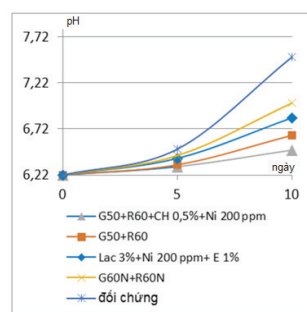
## Kết quả và thảo luận

**Nghiên cứu xác định chế phẩm tự nhiên gừng, riềng riêng rẽ/phối hợp và phương pháp phù hợp để bảo quản tôm thẻ chân trắng**

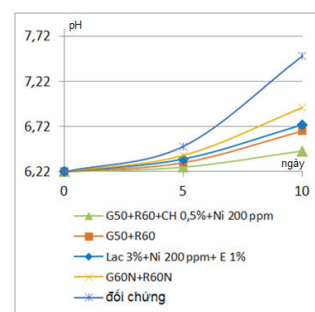
*Đánh giá các chỉ tiêu hóa, lý chất lượng tôm thẻ:*

Tiến hành bảo quản các mẫu tôm thẻ sau thu hoạch với 4 loại dung dịch bảo quản và với 2 phương pháp đã mô tả ở

trên. Đánh giá các chỉ tiêu hóa, lý như pH, hàm lượng  $\text{NH}_3$  của tôm theo ngày bảo quản 0, 5, 10 ngày, kết quả thể hiện ở hình 1 đến hình 4.

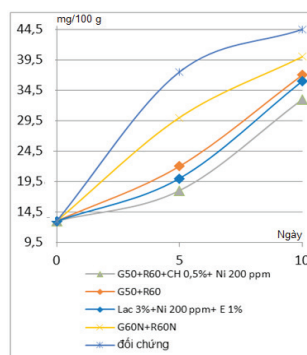


Hình 1. Sự thay đổi pH của mẫu tôm bảo quản bằng PP1.

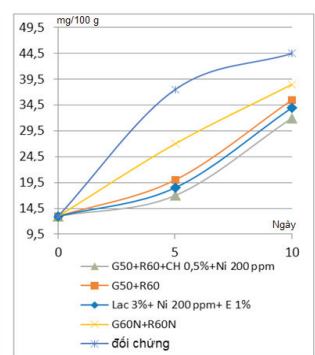


Hình 2. Sự thay đổi pH của mẫu tôm bảo quản bằng PP2.

Từ đồ thị hình 1 và hình 2 cho thấy, pH là chỉ tiêu khá quan trọng đánh giá sự biến đổi sinh hóa của tôm trong quá trình bảo quản, nếu pH càng ít biến đổi thì chất lượng của tôm sẽ ổn định và ít suy giảm nhất. Kết quả cho thấy, pH của mẫu tôm có sử dụng dịch chiết từ gừng và riềng trong cồn/nước riêng rẽ và dịch chiết gừng, riềng có kết hợp phụ gia khá ổn định; riêng mẫu đối chứng thì pH tăng lên khá nhanh và có hiện tượng hư hỏng sau 5 ngày. Với mẫu sử dụng dịch chiết gừng, riềng chiết trong nước thì pH ít thay đổi trong 5 ngày đầu, nhưng tăng nhanh và bắt đầu hư hỏng từ ngày thứ 8-9, còn đối với mẫu gừng, riềng chiết trong cồn và kết hợp phụ gia thì đến ngày thứ 10 pH mới tăng và sau thời gian này chất lượng tôm mới suy giảm, trong đó PP2 có pH ổn định hơn PP1.



Hình 3. Hàm lượng  $\text{NH}_3$  của mẫu tôm bảo quản bằng PP1.

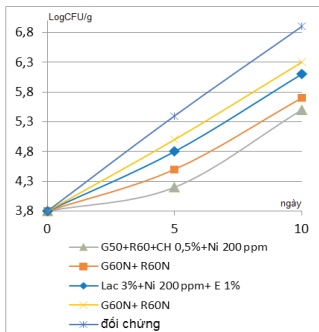


Hình 4. Hàm lượng  $\text{NH}_3$  của mẫu tôm bảo quản bằng PP2.

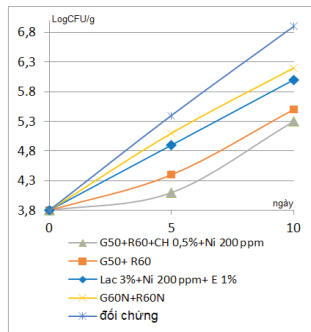
Từ đồ thị hình 3 và hình 4 cho thấy, sự thay đổi hàm lượng  $\text{NH}_3$  dẫn đến sự biến đổi hư hỏng khi bảo quản thủy sản theo chiều hướng không mong muốn. Hàm lượng  $\text{NH}_3$  của mẫu đối chứng tăng rất nhanh, ngày thứ 5 là 37,5 mg  $\text{NH}_3$ /100 g, trong khi đó tôm thẻ mẫu được xử lý bằng dịch bảo quản cho kết quả về hàm lượng  $\text{NH}_3$  thấp và ổn định. Mẫu dùng dịch bảo quản từ dịch chiết (G50+R60+CH 0,5%+Ni 200 ppm) cho kết quả tốt nhất. Từ đồ thị còn cho thấy sử dụng PP2 là phương pháp ngâm ướt tôm trong hỗn hợp dịch bảo quản và đá cho kết quả tốt hơn, hạn chế tối đa việc tôm bị đen.

### Đánh giá chất lượng tôm thẻ theo chỉ tiêu vi sinh vật:

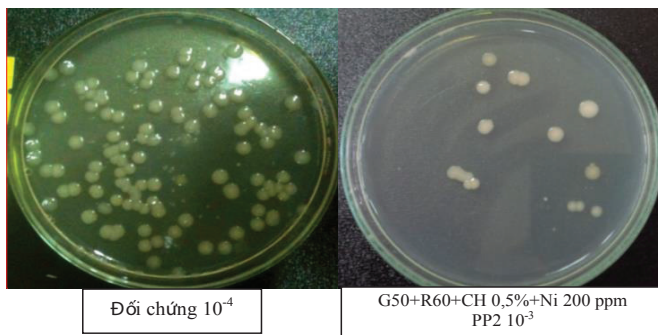
Cùng với chỉ tiêu hóa lý, chỉ tiêu vi sinh vật là vô cùng quan trọng khi đánh giá chất lượng thủy sản. Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra chỉ tiêu tổng vi sinh vật hiếu khí, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* của mẫu tôm bảo quản ở ngày 0, 5, 10. Kết quả được thể hiện ở các hình 5, 6 và 7 cho thấy, mẫu có xử lý bằng dịch gừng, riêng chiết trong cồn/nước kết hợp phụ gia có tổng số vi sinh vật hiếu khí thấp hơn hẳn so với mẫu đối chứng, trong đó PP2 cho kết quả tốt hơn PP1, chứng tỏ dịch chiết gừng riêng và phụ gia an toàn có khả năng ức chế vi sinh vật hiếu khí khá tốt, điều này khá phù hợp với các nghiên cứu [3, 4].



Hình 5. Số lượng vi sinh vật tổng số trong mẫu tôm bảo quản bằng PP1.

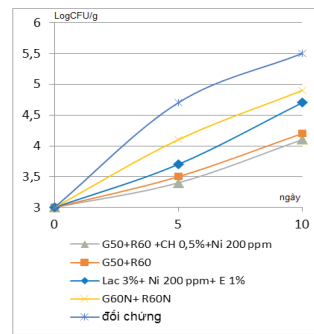


Hình 6. Số lượng vi sinh vật tổng số trong mẫu tôm bảo quản bằng PP2.

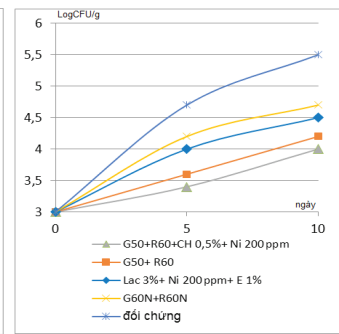


Hình 7. Ảnh khuẩn lạc vi sinh vật tổng số của mẫu tôm sau 10 ngày bảo quản và mẫu đối chứng sau 5 ngày.

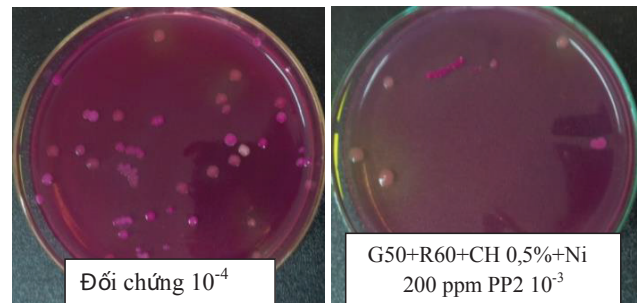
Hàm lượng *Enterobacteriaceae* thể hiện tổng các nhóm vi khuẩn gây bệnh đường ruột như *Salmonella*, *E. coli*... Hiệu quả ức chế các nhóm vi khuẩn này được thể hiện khá rõ ở các mẫu tôm thẻ được bảo quản bằng dịch chiết gừng, riêng, điều này đã được đề cập trong công bố của U.N. Ekwenye và cs [5]. Kết quả ở các hình 8, 9, 10 cho thấy, tổng số *Enterobacteriaceae* trong mẫu đối chứng tăng nhanh, ban đầu là 3 logCFU/g, sau 5 ngày bảo quản đã lên tới 4,7 logCFU/g, vượt quá chỉ tiêu cho phép. Trong khi đó, mẫu bảo quản bằng dịch chiết gừng, riêng trong cồn/nước kết hợp phụ gia tăng chậm hơn, đặc biệt trong 5 ngày đầu hàm lượng *Enterobacteriaceae* tương đối thấp và ổn định. Đến ngày 10 số lượng này mới tăng và đạt logCFU/g $\approx$ 4. Hiệu quả kiểm soát của PP2 tốt hơn PP1.



Hình 8. Số lượng *Enterobacteriaceae* của mẫu tôm bảo quản bằng PP1.



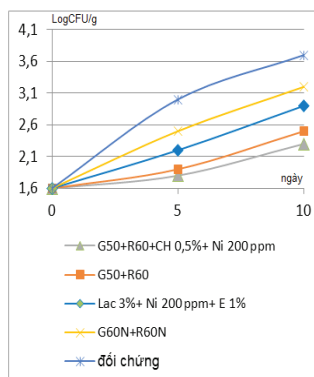
Hình 9. Số lượng *Enterobacteriaceae* của mẫu tôm bảo quản bằng PP2.



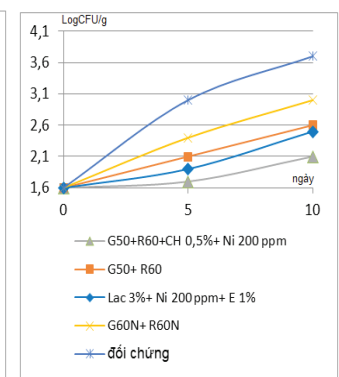
Hình 10. Ảnh khuẩn lạc *Enterobacteriaceae* các mẫu tôm thẻ sau 10 ngày bảo quản.

Từ đồ thị hình 11, 12 cho thấy, tổng số *S. aureus* trong mẫu đối chứng cao, trong khi mẫu có xử lý tăng chậm và thấp hơn nhiều, như vậy thành phần của dung dịch bảo quản có tác dụng ức chế *S. aureus* rất rõ rệt, phù hợp với nghiên cứu của Jirawan Oonmetta-areea và cs [3] về vai trò ức chế của dịch chiết gừng, riêng.

Kết quả đánh giá chỉ tiêu hóa lý và kết hợp chỉ tiêu vi sinh vật cho thấy, hỗn hợp dịch chiết gừng, riêng trong dung môi cồn kết hợp phụ gia có hiệu quả tốt nhất, có thể kéo dài thời gian bảo quản tôm thẻ trong điều kiện 0-2°C lên đến 10 ngày. Phương pháp bảo quản ướt (PP2) cho kết quả tốt hơn PP1.



Hình 11. Số lượng *S. aureus* các mẫu tôm bảo quản bằng PP1.



Hình 12. Số lượng *S. aureus* các mẫu tôm bảo quản bằng PP2.

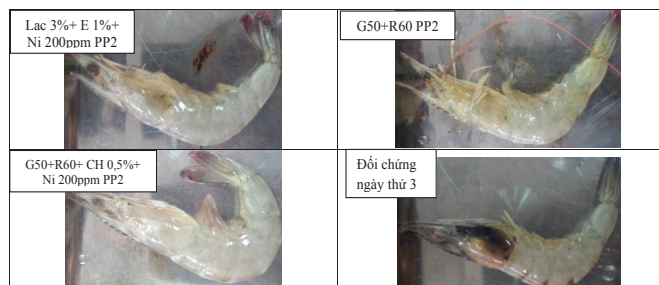
Đánh giá cảm quan các mẫu tôm được bảo quản bằng các dung dịch bảo quản:

Đánh giá cảm quan mẫu tôm tươi được bảo quản (hình 13) cho thấy, mẫu đối chứng bắt đầu hư hỏng sau 3 ngày, đến ngày thứ 5 tôm chuyển màu xám đen, có mùi thối nồng hơn, đầu tôm long, đốt lỏng lẻo, vỡ gạch, cấu trúc thịt bở, không đảm bảo an toàn thực phẩm.

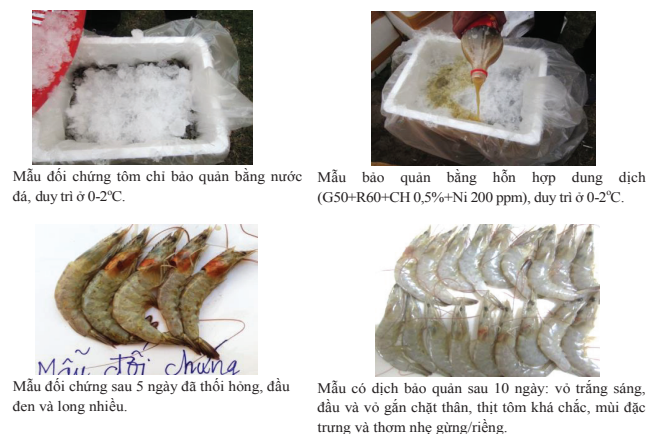
Mẫu bảo quản bằng dịch chiết (G60N+R60N) sau 8-9 ngày bắt đầu hư hỏng, màu xám hơn, vỡ gạch nhẹ, đốt vẫn gắn liền, đầu hơi bị long, so với dịch chiết gừng/riềng trong dung môi cồn/nước thì hiệu quả ít nhiều kém hơn.

Mẫu bảo quản bằng dịch chiết (G50+R60) đến ngày thứ 10 bắt đầu biến màu, gạch bắt đầu chuyển màu, cấu trúc thịt vẫn rắn chắc, đốt vẫn gắn liền, đầu long nhẹ.

Mẫu bảo quản bằng dịch chiết (G50+R60+CH 0,5%+Ni 200 ppm) đến ngày thứ 10 màu sắc tôm vẫn chưa biến đổi so với ban đầu, đầu gắn chặt, đốt vẫn gắn liền, cấu trúc thịt rắn chắc, mùi tôm đặc trưng và thơm nhẹ mùi gừng, riềng. Như vậy, đây là hỗn hợp dung dịch bảo quản có hiệu quả tốt nhất khi kết hợp được vai trò của các dịch chiết gừng, riềng (vai trò kháng khuẩn, chống oxy hóa) cùng các phụ gia an toàn có nguồn gốc tự nhiên như nisin (có khả năng kháng khuẩn cao) và chitosan (có khả năng kháng khuẩn nhẹ, làm tăng độ cứng chắc, sáng bóng của thủy sản).



Hình 13. Hình ảnh mẫu tôm sau 10 ngày bảo quản bằng các dung dịch khác nhau và mẫu đối chứng (chỉ bảo quản bằng nước đá sau 3 ngày).



Hình 14. Ứng dụng bảo quản tôm thẻ tại cơ sở thu mua tôm xã Tam Hòa, huyện Núi Thành, tỉnh Quảng Nam.

## Ứng dụng kết quả nghiên cứu bảo quản tôm thẻ tại cơ sở thu mua tôm ở xã Tam Hòa, huyện Núi Thành, Quảng Nam

Tiến hành bảo quản 2 mẫu tôm thẻ theo phương pháp ướp (PP2) và mẫu đối chứng (không dùng dịch bảo quản và chỉ bằng nước đá). Mẫu có sử dụng dung dịch bảo quản là (G50+R60+CH 0,5%+Ni 200 ppm) và nước đá; cả hai mẫu đều được duy trì ở nhiệt độ 0-2°C. Kết quả thể hiện qua hình 14.

## Kết luận

Nghiên cứu đã lựa chọn được hỗn hợp dịch bảo quản tôm thẻ từ dịch chiết gừng, riềng kết hợp với phụ gia an toàn cho kết quả tốt nhất là hỗn hợp gồm: dịch chiết gừng trong ethanol/nước 50% (G50) và riềng trong ethanol/nước 60% (R60) + chitosan 0,5% + nisin 200 ppm, ký hiệu (G50+R60+CH 0,5%+Ni 200 ppm) với PP2 (phương pháp ướp) đã kéo dài thời gian bảo quản lên tới 10 ngày ở 0-2°C, cho chất lượng tốt, đảm bảo an toàn thực phẩm (các chỉ tiêu như  $\text{NH}_3 < 35 \text{ mg/100 g}$ ; tổng số lượng vi sinh vật  $< 6,0 \text{ logCFU/g}$ ..., các đánh giá cảm quan về màu sắc, cấu trúc, mùi vị đều đạt yêu cầu). Kết quả này bước đầu đã được áp dụng để bảo quản tôm thẻ tại các cơ sở thu mua ở các xã của huyện Núi Thành, tỉnh Quảng Nam cho hiệu quả rất khả quan.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tổng cục Thủy sản (2018), *Tài liệu Hội nghị tổng kết công tác năm 2018 và triển khai nhiệm vụ năm 2019*.
- [2] Davide Gottardi (2016), “Beneficial effects of spices in food preservation and safety”, *Frontiers in Microbiology*, 7, p.1394.
- [3] Jirawan Oonmetta-areea, Tomoko Suzukib, Piyawan Gasalucka, Griangsak Eumkebc (2010), “Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*”, *LWT*, 39(2006), pp.1214-1220.
- [4] Shipra Bhargava, Kshipra Dhabhai, AmlaBatra, Asha Sharma, Bharti Malhotra (2012), “Zingiber officinale: Chemicaland phytochemical screeningan devaluation of its antimicrobialactivities”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(1), pp.360-364.
- [5] U.N. Ekwenye, N.N. Elegalam (2005), “Antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale roscoe*) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*”, *International Journal of Molecular Medicine and Advance Science*, 1(4), pp.411-416.
- [6] Phan Thanh Tam, Nguyen Hai Yen, Le Sy Hong Lam (2016), “Exploitation of bioactive components from extracts of ginger, galangal to preserve of squid and cuttlefish”, *Proceeding of the 10th South East Asian Technical University Consortium (SEATUC) Symposium, Shibaura Institute of Technology*, PSO4-02-OSO4 (Bioscience, Biological and Engineering Science. ISSN 1882-5796).
- [7] Phan Thanh Tam, Nguyen Manh Cuong, Nguyen Thi Hoai Duc, Ngo Thi Thuy Chinh (2016), “Study on the bioactivity of ginger, galangal extracts of different regions in Vietnam for preserving seafood”, *Advances in Natural Sciences*, 54(4A), pp.63-72, ISSN 0866-708X.



# Xác định sự có mặt và phiên mã gen *ZmLEA14A* ở cây chuyển gen *Nicotiana tabacum* dòng NiC9-1

Hà Hồng Hạnh<sup>1</sup>, Bùi Mạnh Minh<sup>1</sup>, Lê Thị Thu Hiền<sup>1,2</sup>, Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 24/5/2019; ngày chuyển phản biện 30/5/2019; ngày nhận phản biện 3/7/2019; ngày chấp nhận đăng 15/7/2019

## Tóm tắt:

Chức năng của các protein LEA trong thực vật được quan tâm nhiều là chức năng bảo vệ thành tế bào trước các stress phi sinh học. Việc ứng dụng kỹ thuật di truyền để chuyển các gen *LEA* vào thực vật nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn đã được tiến hành nhiều năm nay. Đối với cây ngô, nhóm gen *LEA* được xác định gồm 9 nhóm phân bố đều trên 10 nhiễm sắc thể của ngô. Trong đó, gen *ZmLEA14A* được xác định nằm trong nhóm 5C chứa một khung đọc mở mã hóa cho một chuỗi polypeptide với 152 axit amin. Trong nghiên cứu này, gen *ZmLEA14A* phân lập từ cây ngô địa phương Tẻ vàng 1 đã được chuyển vào cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* dòng NiC9-1, gen *ZmLEA14A* này nằm trong vector biểu hiện thực vật pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S. Các cây thuốc lá chuyển gen được tạo ra phát triển tốt ở các giai đoạn khác nhau, với tỷ lệ sống trong phòng thí nghiệm là 89,2%. Khi sử dụng 7 cây chuyển gen để kiểm tra bằng phương pháp PCR cho thấy, gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào hệ gen thuốc lá và trong đó 3 cây được kiểm tra thêm bằng RT-PCR cho thấy gen đã biểu hiện ở mức phiên mã. Như vậy, cấu trúc mang gen này đã có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác nhằm tạo cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng cường khả năng chịu hạn.

**Từ khóa:** chịu hạn, chuyển gen, thuốc lá, *ZmLEA14A*.

**Chỉ số phân loại:** 4.6

## **Đặt vấn đề**

Chức năng của các protein LEA trong thực vật được quan tâm nhiều là chức năng bảo vệ thành tế bào trước các stress phi sinh học. Từ nhiều năm nay, việc ứng dụng kỹ thuật di truyền với các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn cho thực vật trong điều kiện đồng ruộng cũng đã được nghiên cứu ở lúa [1] hay gen HVA1 mã hóa protein LEA nhóm 3 của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) đã chuyển nạp thành công vào cây lúa để tăng cường tính chống chịu khô hạn và mặn trong điều kiện nhà lưới [2]. Nghiên cứu của Li và Cao (2016) đã thực hiện phân tích so sánh hệ gen ở ngô, bao gồm quan hệ phát sinh chủng loại, vị trí trên nhiễm sắc thể, sự lặp gen, cấu trúc gen và thiết lập hồ sơ biểu hiện của họ gen *LEA*. Tổng cộng 32 gen *LEA* đã được xác định ở ngô và dựa trên các thành phần cấu trúc khác nhau, protein LEA được chia thành 9 nhóm. Tổ chức gen và thành phần cấu trúc của các thành viên gen *LEA* bảo thủ cao trong mỗi nhóm, các gen *LEA* phân bố đều trên 10 nhiễm sắc thể của ngô, và hiện tượng chuyển vị, lặp đoạn hay lặp đoạn nối tiếp đã góp phần mở rộng họ gen *LEA*. Nghiên cứu này đã dự đoán một gen *LEA* mã hóa cho 1 protein LEA nhóm 5 của ngô nằm trên nhiễm sắc thể số 8 và có chứa domain LEA-2 [3].

Trong nghiên cứu trước [4], một đoạn ADN mang mã có khả năng mã hóa cho một protein LEA trên giống ngô địa phương

Tẻ vàng 1 đã được phân lập và xác định trình tự. Đoạn trình tự *ZmLEA14* này có độ dài 693 bp với 1 khung đọc mở mã hóa cho một chuỗi polypeptide với số lượng 152 axit amin. Phân tích trình tự BLAST trên NCBI cho thấy, trình tự này giống tới 99% so với gen *LEA14A* của ngô (accession number NM\_001159174), tiếp theo là gen *LEA14A* của cây cao lương (*Shorgum bicolor*) (XM\_002454858.2) và 1 gen giống *LEA14A* của kê đuôi cáo (tỷ lệ tương đồng lần lượt 93 và 87%). Protein mã hóa bởi gen *ZmLEA14tv* được dự đoán có khối lượng phân tử khoảng 15,96 kDa với điểm đẳng điện là 6,08. Chỉ số GRAVY và chỉ số bất định của protein *ZmLEA14tv* lần lượt là 0,047 và 16,01 cho thấy đây là protein ổn định và có mức độ ưa nước rất cao. Dựa theo tìm kiếm trên InterProSca, protein có chứa một domain bảo thủ “LEA\_2” (PF03186) sẽ phân vào nhóm protein LEA 5C theo hệ thống phân loại của Battaglia. Phân tích thành phần amino acid cho thấy, gen *ZmLEA14A* phân lập từ cây ngô địa phương Tẻ vàng 1 chứa hàm lượng thấp các axit amin phân cực (23,2%) và hàm lượng cao các axit amin không ưa nước (47,02%). Trình tự protein *ZmLEA14tv* thể hiện tính tương đồng cao với các protein nhóm 5C khác, thể hiện sự bảo thủ và mối quan hệ tiến hóa lâu dài giữa các protein này. Một cấu trúc vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S đã được chúng tôi thiết kế gồm vùng mang mã của gen *ZmLEA14A* và gắn thêm đoạn peptide cmcy và KDEL tạo nên vùng gen tái tổ hợp, chèn vào khuôn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector trên đã

\*Tác giả liên hệ: Email: hthue@igr.ac.vn

# Verifying the presence and transcription of *ZmLEA14A* gene in *Nicotiana tabacum* line NiC9-1

Hong Hanh Ha<sup>1</sup>, Manh Minh Bui<sup>1</sup>, Thi Thu Hien Le<sup>1,2</sup>,  
Thi Thu Hue Huynh<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research, VAST

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 24 May 2019; accepted 15 July 2019

## Abstract:

The function of LEA proteins in plants that has received much attention recently is the cell wall protection against abiotic stresses. Improving the expression of LEA genes to enhance plant drought tolerance has been carried out by various genetic engineering applications for many years. In maize, the LEA genes are evenly distributed over ten chromosomes and classified into nine major groups. Among these LEA genes, *ZmLEA14A* belongs to 5C group and encodes for an open reading frame (ORF) of a 152-amino-acid polypeptide chain. In the current study, the *ZmLEA14A* gene was isolated from Tevang1, a drought-tolerant maize landrace, and transferred into the NiC9-1 tobacco line. The expression of this transgene was driven under the control of a minimised 35S promoter. The transgenic tobacco plants developed normally at all different growth stages with a survival rate of 89.2% in the laboratory condition. The *ZmLEA14A* gene was successfully inserted into the tobacco genome, and the presence of the transgene was verified in 7 transgenic lines by PCR. Applying the RT-PCR technique in three transgenic lines showed that the *ZmLEA14A* gene was currently expressed at the transcription level. In conclusion, the structure harboring the *ZmLEA14A* gene could be used to transfer genes to other target crops to improve the drought tolerance.

**Keywords:** drought tolerance, gene transfer, tobacco, *ZmLEA14A*.

**Classification number:** 4.6

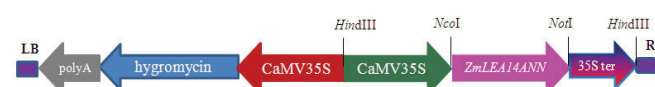
được tạo ra làm nguyên liệu chuyển gen thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả chuyển ổn định gen *ZmLEA14A* từ cấu trúc pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S vào cây thuốc lá *N. tabacum* nhằm kiểm tra sự hoạt động của gen ở cây mô hình.

## Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống thuốc lá *N. tabacum* NiC9-1 do Viện Kinh tế Kỹ thuật Thuốc lá cung cấp.

Chủng vi khuẩn: *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S (hình 1) do Phòng Đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu Hệ gen cung cấp. Các cặp môi sử dụng được trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Sơ đồ vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S.

Bảng 1. Các cặp môi sử dụng.

| Tên môi        | Trình tự                         |
|----------------|----------------------------------|
| HygromycinF    | 5'-AAAGCCTGAACCTACCGC-3'         |
| HygromycinR    | 5'-GCTTCCACTATCGGCGA-3'          |
| 35S promoter F | 5'-CACTGACGTAAGGGATGACGC-3'      |
| ZmLEA14ANcoIF  | 5'-ATTACCATGGCGCAGTTGGTG-3'      |
| cmcyKDELR      | 5'-TATCGACGGATCGGGCTAGAGTTTCG-3' |

### Phương pháp nghiên cứu

**Tạo nguyên liệu chuyển gen:** khử trùng hạt bằng khí clo trong 4h và gieo hạt trên môi trường MS (100 hạt/bình) [5]. Sau 4 ngày hạt bắt đầu nảy mầm và khi cây phát triển được 1 tuần, đánh giá tỷ lệ nảy mầm và cấy chuyển sang môi trường MS mới.

**Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*:** một khuẩn lạc đơn của chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen được chọn để cấy vào 10 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l, nuôi qua đêm ở 28°C. Khoảng 2 ml dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển sang 50 ml môi trường LB lỏng (không bổ sung kháng sinh) nuôi phục hồi trong 4h. Tế bào vi khuẩn được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu cặn. Cặn khuẩn được hòa tan trong môi trường 1/2 MS lỏng, pH=5,8 đến mật độ khuẩn đạt giá trị  $OD_{600nm}=0,7$ .

**Chuyển gen vào lá thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*:** các lá bánh tẻ có kích thước vừa phải ở cây con khỏe mạnh 2 tuần tuổi được chọn để cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 0,5 cm. Sau đó, các mảnh lá này được đặt trong môi trường 1/2 MS lỏng trước khi biến nạp để tránh bị khô. Các mảnh lá được ngâm vào dịch huyền phù vi khuẩn,  $OD_{600nm}=0,7$  trong 10 phút, lắc nhẹ. Mẫu lá được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy CT1 (MS + BAP 1 mg/l) 3 ngày trong tối. Sau đó, các mảnh lá được đặt lên giấy thấm hết dịch khuẩn và chuyển lên môi trường tạo chồi CT2 (MS + BAP 1mg/l + hygromycin). Sau

3-4 tuần, các cụm chồi nhỏ xuất hiện từ mép các mảnh lá được tách ra và tiếp tục cấy lên môi trường tạo chồi mới. Các chồi thật phát triển được tách thành từng chồi riêng rẽ và cấy lên môi trường ra rễ CT3 (MS + NAA 0,1 mg/l + hygromycin). Cây phát triển hoàn chỉnh trong bình sẽ được chuyển ra trồng ở bầu đất.

**Kiểm tra cây T0 chuyển gen bằng PCR:** phương pháp tách chiết ADN tổng số từ lá non thuốc lá của cây 1,5 tháng tuổi được thực hiện theo Michels và cs (2003) [6]. PCR của các dòng thuốc lá chuyển gen được thực hiện với cặp môi hygromycinF/R đặc hiệu cho gen chỉ thị *Hyg* có kích thước 984 bp và nhân gen *ZmLEA14A* với cặp môi 35S promoter và cmcyKDELRL đoạn có kích thước 537 bp, trình tự mỗi được trình bày tại bảng 1. Thành phần phản ứng gồm: 3,35 µl DEPC treated water, 1,5 µl đệm PCR 10X, 1 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl dNTPs 10 mM, 1 µl hygromycinF 10 pM, 1 µl hygromycinR 10 pM hoặc 1 µl 35S promoterF 10 pM - 1 µl cmcyKDELRL 10 pM, 1 µl DNA, 0,15 µl *Taq* polymerase 5 U/µl. Phản ứng được diễn ra với chu trình nhiệt như sau: 95°C - 3 phút; (95°C - 30 giây; 52°C - 1 phút; 72°C - 1 phút) x 30 chu kỳ; 72°C - 10 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước 984 và 657 bp được phát hiện trên gel agarose 0,8%.

**Kiểm tra cây T0 chuyển gen bằng RT-PCR:** ARN tổng số từ mẫu lá của cây thuốc lá chuyển gen được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Purelink™ Plant RNA Reagent. Sau đó, mRNA được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit FastTrack® MAG mRNA Isolation của Hãng Invitrogen và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR. cADN sợi đơn được tổng hợp từ khuôn của mRNA bằng Kit tổng hợp cADN Affymetrix của Hãng Invitrogen. Sản phẩm cADN sợi đơn được sử dụng làm khuôn để nhân gen.

Phản ứng nhân gen *Hyg* và gen *Zmlea14A* từ cDNA sử dụng cặp môi hygromycinF/R, hoặc cặp môi ZmLEA14ANcoIF/cmcyKDELRL có thành phần gồm 4,75 µl H<sub>2</sub>O, 1,5 µl đệm PCR 10 X, 0,5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,5 µl dNTPs 10 mM, 0,5 µl hygromycinF 10 pM, 0,5 µl hygromycinR 10 pM hoặc 0,5 µl ZmLEA14ANcoIF 10 pM - 0,5 µl cmcyKDELRL, 1 µl cDNA, 0,5 µl DMSO, 0,15 µl *Taq* polymerase 5 U/µl. Phản ứng được thực hiện trên máy GeneAmp®PCR Systems 9700 với chu trình nhiệt như sau: 95°C - 3 phút; (95°C - 30 giây; 54°C - 1 phút; 72°C - 1 phút) x 35 chu kỳ; 72°C - 8 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước dự kiến 984 và 537 bp được phát hiện trên gel agarose 0,8%.

## Kết quả và thảo luận

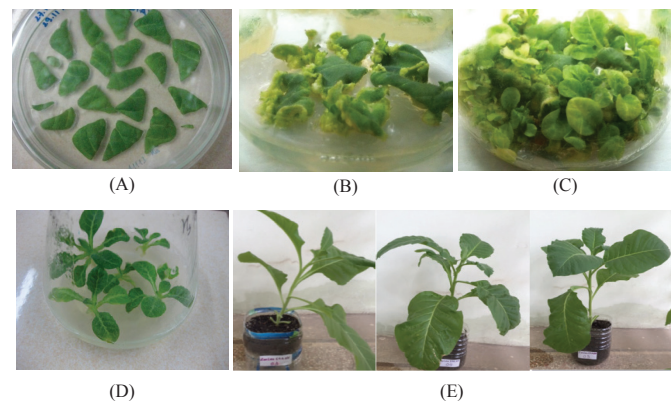
### Tạo nguyên liệu thực vật cho thí nghiệm chuyển gen

Theo Banerjee và cs (2006), mảnh lá bánh tẻ là nguyên liệu thích hợp để chuyển gen vào cây thuốc lá. Hạt thuốc lá dòng NiC9-1 được khử trùng bằng khí clo trước khi gieo lên môi trường MS để nảy mầm trong điều kiện vô trùng [7]. Theo Văn và cs (2008, 2009), dung dịch Javel thương phẩm nồng độ 30% có thể sử dụng để loại nấm mốc và vi khuẩn trên hạt thuốc lá [8, 9]. Phương pháp này đạt hiệu quả khử trùng 100%, cho tỷ lệ nảy mầm cao trên 90%. Tuy nhiên, đối với hạt có kích thước nhỏ như

hạt thuốc lá, việc lách rửa nhiều lần tiêu tốn nhiều thời gian cũng như làm mất một số lượng hạt đáng kể. Trong thí nghiệm này, hạt thuốc lá NiC9-1 được khử trùng bằng khí clo theo phương pháp của Topping (1988), nguồn khí clo tạo ra từ phản ứng giữa dung dịch HCl và Javel sẽ khử trùng bề mặt các hạt thuốc lá [10]. Các cây con sau khoảng 4 tuần trên môi trường MS có kích thước lá 4-6 cm là nguồn nguyên liệu tốt nhất để tái sinh và chuyển gen ở cây thuốc lá.

### Đồng nuôi cấy với dung dịch *A. tumefaciens* và cảm ứng tạo cụm chồi

Đối với giống NiC9-1, các mảnh lá hình vuông kích thước khoảng 0,5 cm được lách nhẹ trong dịch huyền phù vi khuẩn làm tăng thể tích tiếp xúc giữa vết thương thực vật và dịch khuẩn, là một trong những biện pháp có thể làm tăng khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào trong tế bào thực vật, dẫn tới tăng hiệu quả chuyển gen. Do vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S có mang đoạn gen kháng kanamycine, nên các môi trường sau biến nạp đều được bổ sung 50 mg/l kanamycine để chọn lọc các cụm chồi chuyển gen. Trong nghiên cứu này, những kết quả về cụm chồi/cây đề cập đến là những cụm chồi/cây sống sót trên môi trường chọn lọc có chứa kanamycine. Thí nghiệm chuyển gen *ZmLEA14A* vào cây thuốc lá NiC9-1 được lặp lại 2 lần, mỗi lần với 30 mảnh lá nguyên liệu. Sau 10 ngày tại những vết cắt ở các mảnh lá xuất hiện những cụm tế bào cứng, có màu xanh lá (hình 2B). Với 30 mảnh lá/lần biến nạp (lặp lại thí nghiệm 2 lần) thu được 49 mảnh lá có cảm ứng, đạt tỷ lệ khoảng 81,6% (bảng 2). Song song với thí nghiệm chuyển gen, thí nghiệm đối chứng được thiết lập bằng cách đặt các mảnh lá thuốc lá NiC9-1 trực tiếp lên môi trường CT1 và CT1 có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn và kháng sinh chọn lọc. Toàn bộ mảnh lá không chuyển gen được đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh đều vàng dần và chết. Trong số 8 mảnh lá ở 2 lần thí nghiệm đặt lên môi trường cảm ứng không bổ sung kháng sinh có 7 mảnh lá tạo mô sẹo, đạt tỷ lệ 87,5%.



**Hình 2. Các giai đoạn phát triển của cây *N. tabacum* chuyển gen *ZmLEA14A*.** (A) Mảnh lá đặt trên môi trường cảm ứng; (B) Cụm chồi xuất hiện trên môi trường chọn lọc; (C) Tách chồi chuyển sang môi trường ra rễ; (D) Cây phát triển hoàn chỉnh trong bình; (E) Cây phát triển ngoài bầu đất.



**Bảng 2. Kết quả cảm ứng chồi từ mảnh lá và kết quả tạo chồi.**

| Lô thí nghiệm     | Số lần lặp x<br>Số mẫu thí<br>nghiệm | Số mẫu<br>cảm<br>ứng | Tỷ lệ<br>(%) | Số mẫu<br>tạo chồi | Tổng<br>số<br>chồi | Số chồi<br>trung<br>bình |
|-------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| pCAM/35S-ZmLEA14A | 2x30                                 | 49                   | 81,6         | 43                 | 126                | 3,2±0,25                 |
| WT1               | 2x4                                  | 0                    | 0            | 0                  | 0                  | 0                        |
| WT2               | 2x4                                  | 7                    | 87,5         | 6                  | 21                 | 3,4±0,25                 |

Ghi chú: WT1: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh; WT2: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường không bổ sung kháng sinh.

Sau khoảng 2 tuần, bắt đầu quan sát được những chồi nhỏ. Tách các chồi nhỏ và cấy trên môi trường MS cơ bản, không bổ sung chất điều khiển sinh trưởng. Sau 3 tuần, 100% mảnh lá lô không chuyển gen đều thu được chồi, với tỷ lệ trung bình là 3,4±0,25 chồi/mảnh lá. Số lượng mẫu tạo chồi là 43 với số chồi trung bình 3,2±0,25 chồi/mảnh lá (bảng 2, hình 2C). Như vậy, không có sự khác biệt đáng kể trên các lô cây chuyển gen và không chuyển gen, chứng tỏ quá trình tái sinh cây thuốc lá thiết lập trong thí nghiệm này có hiệu quả.

### Tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh

Tạo rễ là khâu cuối cùng trong nuôi cấy *in vitro* và có ý nghĩa quan trọng đối với kỹ thuật chuyển gen ở thực vật. Vẫn tiếp tục lặp lại quy trình tái sinh thuốc lá đã công bố của Vân và cs (2008, 2009), môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l NAA được thử nghiệm tạo rễ thuốc lá NiC9-1 *in vitro*. Sau 4-5 tuần, quan sát thấy rễ xuất hiện ở hầu hết các chồi, tỷ lệ gần 90% (bảng 3, hình 2D). Các chồi đều phát triển xanh tốt và tạo nhiều lá mới. Quan sát thấy các chồi không chuyển gen trên môi trường đối chứng cũng có quá trình tạo rễ tương tự. Các cây có 4-8 lá và 3-5 rễ được lựa chọn để chuyển ra môi trường hỗn hợp đất/trấu theo tỷ lệ 1/1. Kết quả cho thấy, loại giá thể (đất/trấu với tỷ lệ 1/1) cho tỷ lệ cây sống cao lên đến 89,2%.

**Bảng 3. Kết quả chồi ra rễ và phát triển cây hoàn chỉnh.**

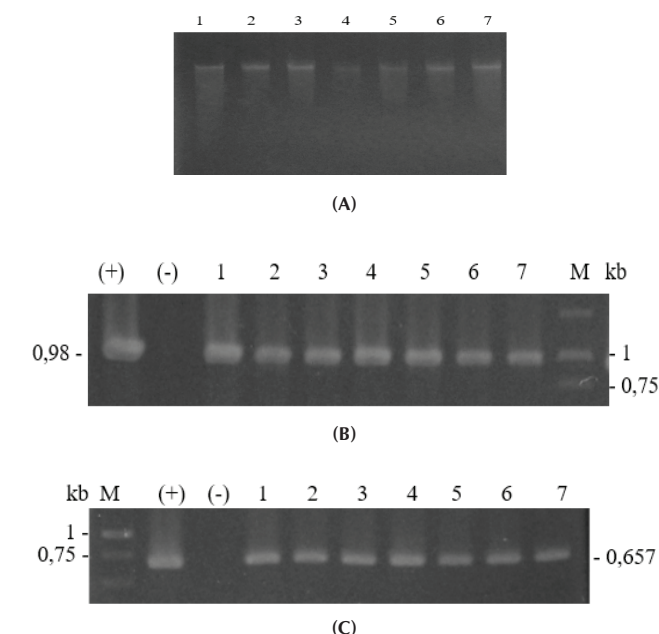
| Lô thí nghiệm    | Số chồi cấy trên<br>môi trường ra rễ | Số chồi<br>ra rễ | Số cây trong<br>phòng thí<br>nghiệm | Số cây<br>sống sót | Tỷ lệ<br>(%) |
|------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------|
| pCAM35S-ZmLEA14A | 126                                  | 110              | 110                                 | 99                 | 89,2         |
| WT1              | 0                                    | 0                | 0                                   | 0                  | 0            |
| WT2              | 21                                   | 21               | 21                                  | 19                 | 90,4         |

Ghi chú: WT1: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh; WT2: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường không bổ sung kháng sinh.

### Kiểm tra sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển bằng PCR và RT-PCR

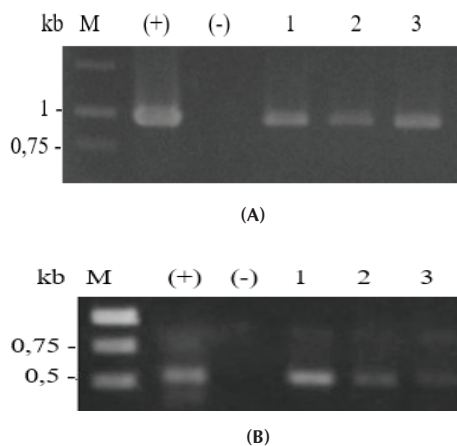
Trước tiên, 7 cây thuốc lá chuyển gen 1,5 tháng tuổi phát triển bình thường trên môi trường đất được chọn để tách chiết ADN tổng số từ lá non. Ảnh điện di cho thấy sản phẩm ADN tổng số được tách chiết khá sạch và nguyên vẹn, không lẫn tạp chất, ít bị phân hủy, đảm bảo đạt yêu cầu cho các thí nghiệm tiếp theo (hình 3A). Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là mẫu ADN tổng số tách từ lá cây thuốc lá các dòng chuyển gen sử dụng cặp mồi

là Hygromycin\_F/R để nhân gen vùng gen chỉ thị kháng hygromycin (984 bp). Sản phẩm PCR được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 0,8% và kết quả điện di cho thấy 7 cây thuốc lá chuyển gen đều xuất hiện sản phẩm PCR đặc hiệu, có kích thước khoảng 984 bp như tính toán lý thuyết (hình 3B). Các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA4A* dương tính khi PCR với cặp mồi HygromycinF/R được tiếp tục kiểm tra bằng cặp mồi 35S promoterF/cmycDKELR để nhân đoạn gen *ZmLEA14A*+cmycKDEL (657 bp). Kết quả trên hình 3C cho thấy sản phẩm PCR đặc hiệu đã xuất hiện ở 7 cây thuốc lá thí nghiệm. Như vậy, gen *Hyg* và *ZmLEA14A* có mặt trong hệ gen 7 cây thuốc lá chuyển gen.



**Hình 3. PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Hyg* và gen *ZmLEA14A* trên các cây thuốc lá T0. (A)** Điện di ADN tổng số tách từ các mẫu thuốc lá chuyển gen; **(B và C)** Kết quả nhân gen *Hyg* và *ZmLEA14A*: (+) Sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S; (-) Sản phẩm PCR từ ADN của cây wild type; 1-7. Sản phẩm PCR từ ADN của các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*.

Để đánh giá khả năng biểu hiện phiên mã của gen chuyển trong cấu trúc chứa gen *ZmLEA14A*, chúng tôi đã tiến hành tách chiết ARN của 3 dòng thuốc lá chuyển gen số 1, 2, 3 và một dòng wild type (-). Cặp mồi HygromycinF/R được sử dụng cho phản ứng RT-PCR nhân gen *Hyg*. Kết quả cho thấy, 3 dòng chuyển gen đều xuất hiện băng ADN có kích thước gần 1 kb và băng đối chứng dương (+), chứng tỏ 3 dòng thuốc lá chuyển gen có sự phiên mã của gen *Hyg* ở mức độ mARN (hình 4A). Sau đó, chạy phản ứng RT-PCR với cặp mồi *ZmLEA14A*NcoIF và cmycKDELRL để kiểm tra sự phiên mã gen *ZmLEA14A*. Kết quả điện di cho thấy, xuất hiện băng ADN kích thước trên 0,5 kb (537 bp) và bằng với đối chứng dương (+), như vậy đã có sự phiên mã của gen *ZmLEA14A* ở cây thuốc lá (hình 4B).



**Hình 4. RT-PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Hyg* và gen *ZmLEA14A* trên các cây thuốc lá. (A và B) Kết quả nhân gen *Hyg* và *ZmLEA14A*: (+) Sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S; (-) Sản phẩm PCR từ cDNA của cây wild type; 1-3. Sản phẩm PCR từ cDNA của các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*.**

Trong lĩnh vực chuyển gen thực vật, để kiểm tra sự biểu hiện của vector thực vật đã thiết kế, cây thuốc lá được xem xét như là loại cây mô hình phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá chức năng gen, bởi vì hệ thống tái sinh và tiếp nhận gen ngoại lai của cây thuốc rất hiệu quả, thời gian phân hóa từ mô đến tạo cây hoàn chỉnh khá ngắn, mặt khác cây thuốc lá là cây ngắn ngày, dễ trồng và chăm sóc nên dễ dàng thu được hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Sau khi đã có kết quả biểu hiện của gen trong cây mô hình thì thực hiện việc chuyển gen vào cây đích. Từ năm 1986, gen *CP* phân lập từ virus khảm thuốc lá (TMV) đã được sử dụng để chuyển vào cây thuốc lá, gen *CP* biểu hiện tốt cho thấy bệnh khảm thuốc lá chậm phát triển và hơn 50% cây chuyển gen không phát triển các triệu chứng bệnh [11]. Nội độc tố từ *Bacillus thuringiensis* (Bt) được biểu hiện trong thuốc lá cho thấy cây có khả năng kháng côn trùng bướm [12]. Tại Việt Nam từ năm 1989, Nguyễn Liên Chi và cs đã chuyển thành công gen kháng kanamycin vào mô thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) bằng vi khuẩn *A. tumefaciens* [13]. Năm 2013, Bùi Văn Thắng và cs đã tạo được cây thuốc lá chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase tăng cường khả năng chịu mặn cho cây [14]. Hà Hồng Hạnh và cs (2013) cũng đã phân lập gen mã hóa chitinase chuyển gen và kiểm tra sự biểu hiện của gen trong cây thuốc lá ở mức độ RT-PCR trong một nghiên cứu nhằm tạo cây chuyển gen có khả năng kháng nấm [15]. Việc chuyển các gen có liên quan đến chức năng bảo vệ tế bào thuộc nhóm gen *LEA* đã được thực hiện ở nhiều nghiên cứu thử nghiệm trên cây mô hình như gen mã hóa protein 5C LEA của cây lạc đã được chuyển gen và biểu hiện ở thuốc lá [16] hay gen SiLEA14 từ cây kê vàng (*S. Italica*) được chuyển gen và biểu hiện trên cây *Arabidopsis* [17] nhằm kiểm tra khả năng tăng cường sức chống chịu cho cây. Như vậy, trong nghiên cứu này việc tạo cây thuốc lá có sự biểu hiện gen chuyển *ZmLEA14A* cho thấy các cấu trúc đã hoạt động trên cây thuốc lá là phù hợp với những nghiên cứu đã có. Cấu trúc này có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác như lúa, ngô nhằm tạo cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng cường biểu hiện.

## Kết luận

Trong nghiên cứu này, gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào cây thuốc lá dòng Nic9-1. Các cây thuốc lá chuyển gen phát triển tốt ở các giai đoạn khác nhau, với tỷ lệ cây sống sót trong phòng thí nghiệm là 89,2%. Trong số các cây chuyển gen, có 7 cây biểu hiện dương tính với phương pháp PCR cho thấy gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào hệ gen thuốc lá, trong đó 3 cây được kiểm tra bằng RT-PCR cho thấy gen *ZmLEA14A* biểu hiện ở mức phiên mã. Như vậy, cấu trúc mang gen này có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác nhằm tạo ra cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng tính chịu hạn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Xiao, et al. (2007), "Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions", *Theor. Appl. Genet.*, **115**(1), pp.35-46.
- [2] D. Xu, et al. (1996), "Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1* from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice", *Plant Physiology*, **110**, pp.249-257.
- [3] X. Li, J. Cao (2016), "Late embryogenesis abundant (*LEA*) gene family in maize: identification, evolution, and expression profile", *Plant Mol. Biol.*, **34**(1), pp.15-28.
- [4] Bui Manh Minh, et al. (2019), "A *LEA* gene from a Vietnamese maize landrace can enhance drought tolerance of transgenic maize and tobacco", *Agronomy*, **9**(2), doi:10.3390/agronomy902006.
- [5] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, **15**(3), pp.473-497.
- [6] A. Michels, et al. (2003), "Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants", *Analytic Biochem.*, **315**(1), pp.85-89.
- [7] A.K. Banerjee, et al. (2006), "Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L.ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation", *Plant Science*, **170**, pp.732-738.
- [8] Phạm Thị Vân, Nguyễn Văn Bắc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2008), "Tạo cây thuốc lá kháng bệnh virus khảm dưa chuột bằng kỹ thuật RNAi", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **6**(4A), tr.679-687.
- [9] Phạm Thị Vân, Nguyễn Minh Hưng, Hà Việt Cường, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2009), "Tạo cây thuốc lá kháng virus TMV bằng kỹ thuật RNAi", *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, tr.32-40.
- [10] J.F. Topping (1988), "Tobacco transformation", *Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology*, **81**, pp.365-372.
- [11] P. Powell-Abel, et al. (1986), "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene", *Science*, **232**, pp.738-743.
- [12] K.A. Barton, et al. (1987), "*Bacillus thuringiensis* (Bt) - endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects", *Plant Physiol.*, **85**, pp.1103-1109.
- [13] Nguyễn Liên Chi, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyển (1989), "Chuyển gen kháng kanamycin vào mô thuốc lá (*N. tabacum*) và mô lá cây cà úc bằng vi khuẩn *A. tumefaciens*", *Tạp chí Di truyền*, **1**, tr.43-48.
- [14] Bùi Văn Thắng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2013), "Nghiên cứu tạo cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase tăng cường khả năng chịu mặn", *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1059-1063.
- [15] Hà Hồng Hạnh, Lê Thanh Hương, Lê Thị Thu Hiền (2013), "Phân lập gen mã hóa chitinase và thiết kế các vector biểu hiện thực vật", *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.82-86.
- [16] A. Sharma, et al. (2016), "Ectopic Expression of an Atypical Hydrophobic Group 5 *LEA* Protein from Wild Peanut, *Arachis diogeni* Confers Abiotic Stress Tolerance in Tobacco", *PLOS ONE*, **11**, e0150609.
- [17] M. Wang, et al. (2014), "SiLEA14, a novel atypical *LEA* protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet", *BMC Plant Biology*, **14**, pp.290-305.

# Tổng mục lục

| TT                             | Tác giả                                      | Tên bài                                                                                                                                                                                | Số | Số trang |
|--------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----------|
| Khoa học tự nhiên              |                                              |                                                                                                                                                                                        |    |          |
| 1                              | Phan Thị Lan Anh, Đỗ Hữu Tuấn                | Tổng quan về xử lý axit perfluorooctanoic (PFOA) và muối perfluorooctansulfonat (PFOS) bằng sóng siêu âm.                                                                              | 1  | 1        |
| 2                              | Nguyễn Quang Trung, Phạm Thị Phương Nam...   | Tổng hợp hiệu quả và tính chất quang của một số salophen dùng làm chemosensor quang trong phân tích ion kim loại chuyển tiếp.                                                          | 1  | 7        |
| 3                              | Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thúy Ngọc...        | Đóng góp vào việc phát triển quy trình phân tích pentaclophenol trong mẫu thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS).                                     | 1  | 11       |
| 4                              | Đỗ Quang Trung, Đoàn Văn Hương...            | Nghiên cứu quá trình phân hủy kỵ khí chất thải chăn nuôi lợn và rác hữu cơ trong sinh hoạt nông thôn để sinh khí mê-tan và phân hữu cơ.                                                | 1  | 16       |
| 5                              | Nguyễn Xuân Tông, Trần Thị Thu Hương         | Đánh giá độc tính của thuốc trừ sâu endosulfan đến sinh trưởng của <i>Daphnia magna</i> .                                                                                              | 1  | 21       |
| 6                              | Vũ Thị Duyên, Phạm Thị Kim Trang...          | Mối liên quan giữa hàm lượng asen và một số thành phần hóa học thể hiện tính khử trong nước ngầm tại khu vực ven sông Hồng, Hà Nội.                                                    | 1  | 26       |
| 7                              | Lê Văn Dũng, Cao Đình Triều...               | Động đất Mường Ảng (M=3,9) ngày 08/01/2018 và động đất Điện Biên Đông (M=4,3) ngày 09/01/2018.                                                                                         | 3  | 1        |
| 8                              | Bùi Hồng Quang, Nguyễn Văn Dư...             | Xác định vị trí phân loại mẫu <i>Alocasia</i> sp. thu thập ở Xuân Sơn (Phú Thọ) trên cơ sở phân tích 3 vùng gen <i>matK</i> , <i>petD</i> và <i>trnY-trnE</i> .                        | 3  | 11       |
| 9                              | Đặng Thị Hà, Bùi Thị Thu Trang...            | Nghiên cứu xây dựng bản đồ nguy cơ sạt lở đất cho huyện Văn Yên, tỉnh Yên Bái.                                                                                                         | 3  | 15       |
| 10                             | Lê Văn Trung, Trần Thị Văn...                | Giải pháp tích hợp viễn thám và GIS trong giám sát xâm nhập mặn sông Cửu Long.                                                                                                         | 3  | 22       |
| 11                             | Quách Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Hồng Thắm...  | Nghiên cứu tính chất nhiệt của tấm dán composite trên nền giấy bucky và polyaniline.                                                                                                   | 3  | 27       |
| 12                             | Phạm Ngọc Hoa, Nguyễn Xuân Lai               | Định lý thứ hai của Ritt và vấn đề duy nhất đối với tích q-sai phân của hàm phân hình trên một trường không-Acsimet.                                                                   | 6  | 1        |
| 13                             | Nguyễn Thu Hương                             | Một số vấn đề về giao của các mặt cong áp dụng trong vẽ kỹ thuật.                                                                                                                      | 6  | 7        |
| 14                             | Bùi Văn Thắng, Trần Việt Dũng...             | Nghiên cứu điều chế vật liệu bentonite lai vô cơ/hữu cơ và ứng dụng xử lý phenol đỏ, Mn(II) trong nước.                                                                                | 6  | 11       |
| 15                             | Vũ Thị Thu Lan, Hoàng Thanh Sơn...           | Phát triển mô hình Delta cảnh báo xâm nhập mặn các sông vùng hạ lưu lưu vực Vu Gia - Thu Bồn.                                                                                          | 6  | 17       |
| 16                             | Đinh Thị Vân, Ngô Cao Cường                  | Phân lập, định danh và nghiên cứu đặc điểm sinh học một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu mỏ trong mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại Quận khu 7.                             | 6  | 24       |
| 17                             | Trần Bích Châu, Trần Thị Thu Dung...         | Sự tích lũy BPA trong trầm tích khu vực tiếp nhận nước thải sau xử lý của bãi chôn lấp Phước Hiệp, TP Hồ Chí Minh.                                                                     | 6  | 29       |
| 18                             | Tô Quang Toàn, Trần Minh Tuấn...             | Biến động nguồn nước mùa lũ hàng năm ở Đồng bằng sông Cửu Long do ảnh hưởng của các hồ đập thượng lưu.                                                                                 | 6  | 34       |
| 19                             | Liêu Kim Phượng, Bùi Thị Luận...             | Nghiên cứu thạch học và sự biến đổi sau trầm tích của đá móng carbonate tuổi Paleozoic ở phía tây bắc bệ Sông Hồng.                                                                    | 8  | 1        |
| 20                             | Đỗ Văn Trường                                | Hệ thống học nhóm Thông đất và Dương xỉ ở Việt Nam theo hệ thống PPG (Pteridophyte Phylogeny Group) I.                                                                                 | 8  | 7        |
| 21                             | Nguyễn Hữu Tuyển, Phạm Tiến Dũng...          | Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp protease từ vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> Bs04 và xác định đặc tính của enzyme.                                                                     | 8  | 12       |
| 22                             | Trịnh Thị Thắm, Bùi Thị Phương...            | Nghiên cứu mức độ phân bố và tích lũy polychlorinated biphenyl trong trầm tích mặt khu vực hạ lưu sông Đáy.                                                                            | 8  | 18       |
| 23                             | Trương Tích Thiện, Trần Kim Bằng...          | Phân tích động lực học vết nứt trong vật liệu lẫn hạt cứng và lỗ rỗng bằng phương pháp phần tử hữu hạn nội suy liên tiếp mở rộng.                                                      | 8  | 22       |
| 24                             | Nguyễn Thùy Dung Thị, Mai Văn Thanh Tâm...   | Nghiên cứu cơ chế phản ứng nhiệt phân của gốc tự do furyl bằng phương pháp tính toán lượng tử.                                                                                         | 11 | 1        |
| 25                             | Nguyễn Văn Phòng, Nguyễn Thy Ngọc...         | Khảo sát sự đa dạng di truyền vùng D-loop hệ gen ty thể ở ba nhóm tộc người: Hà Nhì, Phù Lá, Si La.                                                                                    | 11 | 7        |
| 26                             | Hồ Việt Cường, Trịnh Quang Toàn...           | Nghiên cứu diễn biến mưa lớn trên lưu vực sông Đà - Thao trong tương lai dưới tác động của biến đổi khí hậu.                                                                           | 11 | 12       |
| 27                             | Mai Thị Phượng, Nguyễn Tuấn Hồng...          | Kem tản nhiệt với độ dẫn nhiệt cao nền silicon chứa thành phần graphene.                                                                                                               | 11 | 17       |
| Khoa học kỹ thuật và công nghệ |                                              |                                                                                                                                                                                        |    |          |
| 28                             | Vũ Minh Tuấn, Ngô Thị Ngân...                | Xây dựng phương pháp điện di mao quản xác định hàm lượng các amino axit tự do chính trong sản phẩm sữa ong chúa.                                                                       | 1  | 32       |
| 29                             | Bùi Thị Phương Thảo, Dương Thu Hà...         | Nghiên cứu xác định chọn lọc điện hóa axit uric trên điện cực biến tính nano composít rGO/PDA-Cu/CuNPs.                                                                                | 1  | 37       |
| 30                             | Nguyễn Mạnh Huy, Nguyễn Thanh Đàm...         | Phát triển quy trình phân tích phenol trong nước bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector UV/Vis tự chế tạo.                                                                 | 1  | 43       |
| 31                             | Cao Thế Hà, Vũ Ngọc Duy...                   | Hiện trạng công nghệ xử lý nước thải theo hướng phát triển bền vững.                                                                                                                   | 1  | 50       |
| 32                             | Trương Thị Trang, Đỗ Anh Tuấn...             | Nghiên cứu chế tạo thiết bị dựa trên nguyên lý đo áp suất để theo dõi liên tục BOD trong thời gian dài nhằm xác định đặc tính nước thải.                                               | 1  | 58       |
| 33                             | Lê Minh Tuấn, Đỗ Văn Mạnh                    | Ứng dụng sóng siêu âm tần số thấp để tiền xử lý bùn hữu cơ.                                                                                                                            | 1  | 64       |
| 34                             | Hoàng Lương, Trịnh Văn Tuyên...              | Xác định hiệu quả hấp phụ amoni của vật liệu EBB cải tiến.                                                                                                                             | 1  | 69       |
| 35                             | Nguyễn Trung Hiếu, Lý Trần Cường             | Nghiên cứu thực nghiệm hiệu quả gia cường dầm bê tông bị nứt bằng vật liệu tấm sợi các bon CFRP.                                                                                       | 3  | 32       |
| 36                             | Nguyễn Quang Phích, Nguyễn Huy Vững...       | Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện biên và kích thước vùng nghiên cứu đến kết quả dự báo và phân tích tai biến địa chất trong xây dựng công trình ngầm khi sử dụng phương pháp số. | 3  | 36       |
| 37                             | Nguyễn Chí Thanh, Nguyễn Huy Vượng...        | Giải pháp xả bùn cát bằng cửa phai giữa dòng chính, ứng dụng cho công trình đập dâng vùng Tây Bắc.                                                                                     | 3  | 42       |
| 38                             | Trần Thế Định, <span>Thân Văn Liên...</span> | Nghiên cứu xây dựng mô hình thống kê để tối ưu quá trình agglomerat hóa ứng dụng trong hòa tách đồng quặng urani.                                                                      | 3  | 48       |



|                   |                                                  |                                                                                                                                                                                                                       |    |    |
|-------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 39                | Nguyễn Ngọc Phong, Đỗ Chí Linh...                | Nghiên cứu phát triển hệ thống bảo vệ catôt bằng dòng điện ngoài chống ăn mòn vỏ tàu biển.                                                                                                                            | 3  | 53 |
| 40                | Trần Quốc Tuấn, Đinh Thị Lan Anh...              | Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng <i>Bacillus subtilis</i> DB104 thu nhận peptide kháng khuẩn tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.                                                                | 3  | 58 |
| 41                | Chu Văn Tuấn, Nguyễn Trọng Nghĩa...              | Nghiên cứu chế tạo vật liệu nanocomposite polyaniline ứng dụng cho cảm biến sinh học.                                                                                                                                 | 3  | 63 |
| 42                | Hoàng Phương Lan, Nguyễn Thị Lan Anh...          | Một số điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tách chiết Lentinan từ nấm hương khô Việt Nam.                                                                                                                               | 3  | 67 |
| 43                | Nguyễn Vũ Việt, Trần Thị Nhung                   | Đề xuất giải pháp cải tạo đập dâng thành hồ chứa cho khu vực Tây Nguyên.                                                                                                                                              | 6  | 38 |
| 44                | Mai Trọng Luân, Mai Cao Trí...                   | Sử dụng mô hình toán kiểm tra hiệu quả gây bồi, nâng bãi tại Sóc Trăng và Cà Mau.                                                                                                                                     | 6  | 42 |
| 45                | Nguyễn Huy Sinh, Vũ Văn Khải...                  | Chế tạo và nghiên cứu quá trình tạo thành đơn pha perovskite trong hệ hợp chất $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{CoO}_3$ (x=0,1; 0,3; 0,5).                                                                            | 6  | 47 |
| 46                | Phạm Thanh Tuấn Anh, Ngô Minh Nhứt...            | Ảnh hưởng của nhiệt độ lắng đọng lên cấu trúc tính thể, tính chất điện và quang của màng mỏng ZnO pha tạp F được chế tạo bằng phương pháp phun xạ magnetron.                                                          | 6  | 51 |
| 47                | Nguyễn Vũ Uyên Nhi, Trần Thị Ngọc Trân...        | Nghiên cứu ảnh hưởng của $\text{B}_2\text{O}_3$ tới nhiệt độ nóng chảy của men hệ $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Na}_2\text{O-Li}_2\text{O-K}_2\text{O-ZnO}$ bằng kính hiển vi nhiệt. | 6  | 56 |
| 48                | Lê Mỹ Hạnh, Nguyễn Thanh Bình...                 | Nghiên cứu khả năng xử lý nước thải nhà máy mía đường của cây Mái dầm ( <i>Cryptocoryne ciliata</i> Wydler).                                                                                                          | 6  | 59 |
| 49                | Nguyễn Thị Dung                                  | Phát hiện vi khuẩn bằng đĩa giấy lọc hấp phụ luciferase và luciferin.                                                                                                                                                 | 6  | 66 |
| 50                | Lê Phước Thọ, Trần Tấn Phát...                   | Khảo sát điều kiện tách chiết sophorolipid từ dịch lên men <i>Candida bombicola</i> và thử nghiệm hoạt tính sinh học.                                                                                                 | 6  | 70 |
| 51                | Lê Xuân Cường, Nguyễn Trọng Hoàng Phong...       | Hấp thụ các ion kim loại $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ và $\text{Pb}^{2+}$ bằng nano chitosan chế tạo từ chitosan cắt mạch bằng bức xạ Co-60.                                                                   | 6  | 76 |
| 52                | Nguyễn Trọng Đồng, Đặng Ngọc Anh...              | Nghiên cứu ứng dụng hệ lan can liên kết chìm trên các tuyến đường cao tốc ở Việt Nam.                                                                                                                                 | 8  | 29 |
| 53                | Bành Quốc Tuấn, Phạm Đức Quang...                | Nghiên cứu phát triển hệ độ độ dày vật liệu thủy tinh nhiều lớp dựa trên công nghệ giao thoa ánh sáng xung lược.                                                                                                      | 8  | 35 |
| 54                | Lê Hồng Minh, Võ Công Minh...                    | Giải pháp tính khoảng cách từ tàu đến mốc phía trước sử dụng định vị vệ tinh.                                                                                                                                         | 8  | 39 |
| 55                | Nguyễn Ngọc Tú, Bùi Thị Thanh Phương...          | Nghiên cứu phương pháp phát hiện một số sâu bệnh trên lúa sử dụng đặc trưng SIFT.                                                                                                                                     | 8  | 44 |
| 56                | Đinh Bá Trụ, Trần Văn Đoàn...                    | Nghiên cứu luyện và xử lý nhiệt một số mác thép độ bền cao tiên tiến.                                                                                                                                                 | 8  | 49 |
| 57                | Phạm Thị Thu Thảo, Nguyễn Ngọc Anh Thư...        | Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu vang thanh long ruột đỏ ( <i>Hylocereus polyrhizus</i> ).                                                                                                     | 8  | 54 |
| 58                | Đinh Nguyễn Tấn Hòa, Hoàng Trọng Minh Quân...    | Khảo sát hoạt tính $\beta$ -glucosidase từ cở khuẩn siêu chịu nhiệt <i>Pyrococcus furiosus</i> để ứng dụng trong sản xuất isoflavone từ đậu nành.                                                                     | 8  | 60 |
| 59                | Đặng Nguyễn Thế Duy, Nguyễn Thanh Châu...        | Nghiên cứu phương pháp chụp ảnh cắt lớp điện toán thể hệ thứ tư khảo sát tháp công nghiệp kích thước lớn.                                                                                                             | 11 | 23 |
| 60                | Nguyễn Hữu Lương, Dương Thanh Long...            | Sản xuất bio-oil từ rơm và bã mía trên hệ thống nhiệt phân nhanh công suất 5 kg nguyên liệu/giờ.                                                                                                                      | 11 | 29 |
| 61                | Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Ngọc Khánh Anh... | Ảnh hưởng của dung môi lên sự hình thành cấu trúc của vật liệu khung cơ kim cấu trúc zeolite.                                                                                                                         | 11 | 34 |
| 62                | Nguyễn Văn Hiệu, Nguyễn Bích Hà                  | Tổng quan tình hình nghiên cứu vật liệu cao phân tử khoáng.                                                                                                                                                           | 11 | 38 |
| 63                | Huỳnh Minh Tiến, Nguyễn Duy Linh...              | Xác định nồng độ $\text{Fe}^{3+}$ trong nước sinh hoạt bằng phương pháp quét thể sóng vuông sử dụng điện cực platin.                                                                                                  | 11 | 42 |
| 64                | Trần Thị Mai Phương, Đào Thị Thủy Nguyệt...      | Đặc trưng I-V và tính chất từ của các hạt nano $\text{Y}_3\text{Fe}_{5-x}\text{Sn}_x\text{O}_{12}$ chế tạo bằng phương pháp sol-gel.                                                                                  | 11 | 48 |
| Khoa học y - được |                                                  |                                                                                                                                                                                                                       |    |    |
| 65                | Nguyễn Văn Hiếu, Lê Văn Quảng...                 | Đánh giá kết quả bước đầu phẫu thuật nội soi trong điều trị ung thư đại trực tràng.                                                                                                                                   | 2  | 1  |
| 66                | Nguyễn Việt Anh, Vũ Trung Trực...                | Nhìn lại chỉ định phẫu thuật cắt chỉnh xương hàm mặt không chỉnh nha trước mổ nhân 2 trường hợp lâm sàng.                                                                                                             | 2  | 4  |
| 67                | Lương Thị Lan Anh, Hoàng Thu Lan                 | Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR phát hiện mất đoạn AZF ở bệnh nhân vô sinh nam không có tinh trùng.                                                                                                                   | 2  | 8  |
| 68                | Lê Thị Ngọc Lan, Đỗ Thị Hồng Tươi...             | Xây dựng công thức nhũ tương xịt họng chứa eucalyptol.                                                                                                                                                                | 2  | 13 |
| 69                | Trịnh Khánh Linh, Trần Văn Cường...              | Nghiên cứu tác dụng của dịch chiết cây Hạ khô thảo nam [ <i>Blumea lacera</i> (Burn. f.) DC] trên chuột bị gây suy thận mạn bởi adenine.                                                                              | 2  | 20 |
| 70                | Lê Xuân Đắc, Đặng Ngọc Huyền...                  | Đánh giá hàm lượng 20-hydroxyecdysone các loài cây thuốc ở Vườn quốc gia Tam Đảo và vùng đệm.                                                                                                                         | 2  | 25 |
| 71                | Phạm Thị Thanh Hương, Vũ Thanh Phương...         | Tình trạng vi khuẩn mang gen ESBL trên người khỏe mạnh tại xã Tràng An, huyện Bình Lục, tỉnh Hà Nam.                                                                                                                  | 5  | 1  |
| 72                | Hoàng Thanh Đức, Nguyễn Thị Thu Trang            | Nghiên cứu quá trình giải phóng thuốc quinin sulfat từ vật liệu tổ hợp polylactic axit/chitosan/quinin sulfat.                                                                                                        | 5  | 5  |
| 73                | Nguyễn Thị Kim Liên, Lê Xuân Trường...           | Bào chế gel vi nhũ tương từ cao khô Rau đắng đất [ <i>Glinus oppositifolius</i> (L.) Aug. DC, Molluginaceae].                                                                                                         | 5  | 11 |
| 74                | Nguyễn Thị Thanh Thảo, Lê Đức Vinh...            | Định loài ấu trùng <i>Gnathostoma</i> spp. từ ký chủ trung gian thứ 2 bằng phương pháp sinh học phân tử.                                                                                                              | 5  | 16 |
| 75                | Nguyễn Thị Mỹ Lan, Võ Thị Loan Thảo...           | Khảo sát hiệu ứng của hỗn hợp selen nano/oligochitosan và <i>Spirulina platensis</i> đến số lượng bạch cầu ở chuột.                                                                                                   | 5  | 21 |
| 76                | Phạm Cẩm Phương, Nguyễn Thuận Lợi...             | Đặc điểm đột biến EGFR phát hiện trong huyết tương ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai năm 2017-2018.                                                                           | 7  | 1  |
| 77                | Nguyễn Văn Phú, Lê Văn Đoàn...                   | Kết quả điều trị nhũ rở thần kinh C5, C6, ±C7 đám rối cánh tay bằng phẫu thuật chuyển thần kinh.                                                                                                                      | 7  | 5  |
| 78                | Lưu Thanh Liêm, Lê Quốc Hùng...                  | Ứng dụng kỹ thuật PCR tổ định loài giun móc <i>Ancylostoma</i> spp. và giun mô <i>Necator americanus</i> ở người nhiễm bệnh.                                                                                          | 7  | 10 |
| 79                | Phạm Đình Duy, Đoàn Duy Quốc                     | Xây dựng công thức gel nhũ tương dầu dừa (coconut oil) ứng dụng trong mỹ phẩm.                                                                                                                                        | 7  | 14 |
| 80                | Bùi Hoàng Đăng Long, Nguyễn Thị Tuyết Mai...     | Phân lập và tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn lactic có khả năng kháng vi khuẩn <i>Propionibacterium</i> spp. được phân lập trên da người.                                                                       | 7  | 21 |
| 81                | Võ Nguyễn Thanh Thảo, Hoàng Đình Hòa...          | Biểu hiện của protein TIF-1A và sự sinh tổng hợp RNA ribosome tăng cao ở khối u của bệnh nhân ung thư đại - trực tràng.                                                                                               | 7  | 29 |
| 82                | Nguyễn Viết Ngọc, Lê Văn Đoàn...                 | Kết quả chuyển thần kinh điều trị liệt hoàn toàn đám rối cánh tay do nhũ các rễ thần kinh.                                                                                                                            | 9  | 1  |

|                             |                                            |                                                                                                                                                                                     |    |    |
|-----------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 83                          | Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Thị Trang          | Đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy AND tinh trùng ứng dụng chẩn đoán vô sinh ở nam giới.                                                               | 9  | 6  |
| 84                          | Đoàn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thế Nghĩa...     | Nghiên cứu tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu cho sản xuất iodine-125 tại Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt.                                                                             | 9  | 10 |
| 85                          | Lê Thị Luyến, Bùi Sơn Nhật...              | Được động học - dược lực học của Rifampicin trong điều trị bệnh nhân lao phổi.                                                                                                      | 9  | 15 |
| 86                          | Lý Hải Triều, Nguyễn Thùy Diễm Thảo...     | Khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu ( <i>Morinda citrifolia</i> L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.                                                               | 9  | 21 |
| 87                          | Ngô Thị Hồng Hạnh, Phạm Duy Thái...        | Ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện các gen VEB, DIM và AmpC của các chủng vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i> phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn.    | 9  | 29 |
| 88                          | Đặng Thúy Hà, Phan Thị Ngọc Lan...         | Mối liên hệ giữa yếu tố độc lực của <i>H. pylori</i> và biểu hiện lâm sàng ở bệnh nhi: Những giá trị trong chỉ định điều trị.                                                       | 11 | 52 |
| 89                          | Lê Thị Phương, Trần Huy Thịnh...           | Xác định người lành mang gen bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne bằng kỹ thuật microsatellite - DNA.                                                                                        | 11 | 58 |
| 90                          | Nguyễn Chí Thiện, Võ Văn Phước...          | Vật liệu hydrogel - Tính chất và tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.                                                                                                          | 11 | 62 |
| 91                          | Khiếu Hữu Thanh, Nguyễn Đình Phúc...       | Đánh giá nhĩ lượng của bệnh nhân khe hở vòm miệng bị viêm tai giữa ứ dịch.                                                                                                          | 12 | 1  |
| 92                          | Ngô Thị Hiếu Hằng, Bùi Phạm Minh Mẫn...    | Đánh giá hiệu quả giảm đau bằng phương pháp nhĩ châm ở các huyết tử cung, nội tiết, giao cảm, gan, bụng trên bệnh nhân đau bụng kinh.                                               | 12 | 5  |
| 93                          | Triệu Tiến Sang, Trần Văn Khoa...          | Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i> trong mẫu nước bọt bằng phương pháp PCR.                                                                | 12 | 9  |
| 94                          | Hồ Hữu Thọ, Lê Thị Thuý...                 | Xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện <i>Leptospira</i> spp. gây bệnh.                                                      | 12 | 14 |
| 95                          | Hoàng Thị Hằng, Phạm Duy Thái...           | Một số đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của <i>Serratia marcescens</i> phân lập trên bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.                     | 12 | 20 |
| <b>Khoa học nông nghiệp</b> |                                            |                                                                                                                                                                                     |    |    |
| 96                          | Trần Thị Phương Thảo, Võ Công Thành...     | Tuyển chọn giống lúa ( <i>Oryza sativa</i> L.) chịu mặn sodic cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long.                                                                                     | 2  | 30 |
| 97                          | Vũ Thị Bích Hạnh, Vũ Văn Liệt...           | Chọn tạo giống ngô kiểu cây mới cho trồng mật độ cao.                                                                                                                               | 2  | 36 |
| 98                          | Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Xuân Cảnh...      | Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy <i>in vitro</i> tới khả năng kháng nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> của chủng <i>Bacillus velezensis</i> YMD1. | 2  | 42 |
| 99                          | Nguyễn Lê Phương, Nguyễn Võ Châu Ngân...   | Khảo sát sự tích lũy nitrat trong rau muống ( <i>Ipomoea aquatica</i> ) và cải xanh ( <i>Brassica juncea</i> L.) khi tưới bằng nước thải từ hầm ủ biogas.                           | 2  | 47 |
| 100                         | Lê Thị Mai Hoa, Nguyễn Văn Duy...          | Hiệu quả kinh tế của mô hình chăn nuôi giống vịt biển 15 - Đại Xuyên sinh sản.                                                                                                      | 2  | 55 |
| 101                         | Nguyễn Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lan Hoa... | Nghiên cứu đa dạng di truyền của đoạn gen <i>matK</i> ở một số nguồn gen nhân Việt Nam.                                                                                             | 2  | 61 |
| 102                         | Lê Thị Tâm Hồng, Lê Thị Thủy Tiên...       | Nuôi cấy <i>in vitro</i> đốt thân cây Xạ đen ( <i>Ehretia asperula</i> Zollinger et Moritz).                                                                                        | 5  | 26 |
| 103                         | Phan Xuân Bình Minh, Đỗ Thị Kim Trang...   | Ảnh hưởng của môi trường khoáng và chất kháng vi sinh vật trong nhân giống <i>in vitro</i> Thạch tùng răng cưa ( <i>Huperzia serrata</i> Thunb.).                                   | 5  | 31 |
| 104                         | Trần Thị Lan, Nguyễn Văn Tâm...            | Nghiên cứu ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật đến khả năng nhân giống hữu tính cây Xạ can ( <i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC.).                                             | 5  | 37 |
| 105                         | Từ Quang Hiền, Hoàng Thị Hồng Nhung...     | Xác định khoảng cách cắt thích hợp cho cây thức ăn xanh <i>Moringa oleifera</i> ở năm thứ nhất.                                                                                     | 5  | 41 |
| 106                         | Lê Nhất Tâm, Đoàn Như Khuê...              | Đánh giá sự biến đổi chất lượng của tôm sú nhằm xác định hạn sử dụng bằng các phương pháp bảo quản khác nhau.                                                                       | 5  | 47 |
| 107                         | Đoàn Thị Bích Thảo, Nguyễn Xuân Thắng...   | Đánh giá khả năng chịu hạn và một số chỉ tiêu sinh hóa của các dòng ngô chuyển gen <i>ZmDREB2A</i> trong điều kiện hạn nhân tạo ở giai đoạn cây con.                                | 5  | 55 |
| 108                         | Vũ Thị Huyền Trang, Trần Anh Khoa...       | Đặc điểm di truyền trình tự loài lan Hải hồng <i>Paphiopedilum delenatii</i> đặc hữu Việt Nam.                                                                                      | 5  | 60 |
| 109                         | Chu Thúc Đạt, Nguyễn Thị Thu Hà...         | Kết quả phân tích tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng cành quả và năng suất quả trên cây bưởi Da xanh tại Thái Nguyên.                                                      | 7  | 34 |
| 110                         | Nguyễn Thị Bích Thủy, Ngô Xuân Nghiễn...   | Sinh trưởng hệ sợi và hình thành quả thể của nấm sò vua <i>Pleurotus eryngii</i> (DC.: Fr.) chủng E2.                                                                               | 7  | 38 |
| 111                         | Phí Thị Cẩm Miện, Nguyễn Đức Bách...       | Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định Xảo tam phân ( <i>Paramignya trimera</i> ) trong điều kiện thủy canh <i>in vivo</i> .                                                           | 7  | 45 |
| 112                         | Trần Thị Phương Thảo, Võ Công Thành...     | Phá quang kỳ giống lúa mùa Nàng Quýt Biển bằng phương pháp xử lý đột biến sốc nhiệt.                                                                                                | 7  | 50 |
| 113                         | Chu Đức Hà, Nguyễn Đức Anh...              | Xác định và đánh giá mức độ biểu hiện của họ gen mã hóa tiểu phần Nuclear factor-YC ở cây sắn ( <i>Manihot esculenta</i> ).                                                         | 7  | 56 |
| 114                         | Phạm Thị Phương, Phạm Đức Toàn...          | Đánh giá đa dạng di truyền một số giống bơ ( <i>Persea americana</i> Mill.) bằng chỉ thị phân tử SSR.                                                                               | 7  | 60 |
| 115                         | Lưu Hoài Nam, Nguyễn Hoài Thanh...         | Nghiên cứu khả năng chịu hạn của 6 giống lúa mùa ở giai đoạn sinh dưỡng trong điều kiện hạn nhân tạo.                                                                               | 9  | 34 |
| 116                         | Nguyễn Thị Hồng, Lê Minh Sát...            | Xác định môi trường và kỹ thuật phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo ( <i>Cordyceps militaris</i> ) thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai).                       | 9  | 40 |
| 117                         | Phạm Thị Thu, Nguyễn Duy Trình...          | Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống đầu dòng nấm rễ dài <i>Oudemansiella raphanipes</i> (Beck.) Pegler & T.W.K. Young.                                                                   | 9  | 45 |
| 118                         | Phạm Huýnh Ninh, Vũ Minh...                | Tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô đầu đậu nành nhằm nâng cao khả năng sinh protease của chủng <i>Bacillus subtilis</i> N6 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt quy mô pilot.      | 9  | 50 |
| 119                         | Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hạnh...     | Tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá Chiên ( <i>Bagarius yarrelli</i> ) nuôi lồng tại Tuyên Quang và đề xuất biện pháp phòng trị.                                                      | 9  | 55 |
| 120                         | Chu Đức Hà, Chu Thị Bích Thủy...           | Dự đoán cơ chế lập của họ gen mã hóa protein vận chuyển đường sucrose ở loài đậu gà ( <i>Cicer arietinum</i> ).                                                                     | 9  | 60 |
| 121                         | Tạ Hồng Linh, Trịnh Khắc Quang...          | Đánh giá các dòng lúa ( <i>Oryza sativa</i> ) triển vọng phục vụ cho chương trình sản phẩm lúa gạo quốc gia.                                                                        | 11 | 69 |
| 122                         | Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thị Khánh Huyền... | Nghiên cứu sử dụng vật liệu sinh học trong tái tạo thảm thực vật trên đất dốc.                                                                                                      | 11 | 74 |

|                                    |                                            |                                                                                                                                                                                                   |    |    |
|------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 123                                | Nguyễn Thành Mến, Nguyễn Mạnh Hà           | Nghiên cứu, xác định và tuyển chọn nhóm thực vật, cây trồng có triển vọng trên đất bãi thải sau khai thác bauxite ở Tây Nguyên.                                                                   | 11 | 80 |
| 124                                | Phan Công Du, Nguyễn Lê Quốc Hùng...       | Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh ( <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv.) <i>in vitro</i> ở điều kiện nhà kính và tự nhiên tại Lâm Đồng.                                       | 12 | 26 |
| 125                                | Trương Thị Chiên, Nguyễn Thị Thanh...      | Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng <i>Erwinia carotovora</i> từ đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam.                                                                      | 12 | 32 |
| 126                                | Nguyễn Văn Tâm, Nhữ Thu Nga...             | Đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị hình thái và tương quan kiểu hình của các dòng Náng hoa trắng ( <i>Crinum asiaticum</i> L.).                                                              | 12 | 36 |
| 127                                | Nguyễn Đức Thành, Hoàng Quốc Nam...        | Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hấp phụ phốt pho trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng.                                                                                                    | 12 | 41 |
| 128                                | Trịnh Hồng Sơn, Nguyễn Thị Hương           | Khả năng sinh trưởng và năng suất sinh sản của lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) nuôi tại Công ty Indovina Thái Bình.                                                      | 12 | 47 |
| 129                                | Phan Thanh Tâm, Nguyễn Mạnh Cường          | Nghiên cứu ứng dụng dịch chiết có hoạt tính sinh học từ gừng ( <i>Zingiber officinale</i> ), riềng ( <i>Alpinia officinarum</i> ) để bảo quản tôm thẻ chân trắng ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ). | 12 | 51 |
| 130                                | Hà Hồng Hạnh, Bùi Mạnh Minh...             | Xác định sự có mặt và phiên mã gen <i>ZmLEA14A</i> ở cây chuyển gen <i>Nicotiana tabacum</i> dòng NiC9-1.                                                                                         | 12 | 56 |
| <b>Khoa học xã hội và nhân văn</b> |                                            |                                                                                                                                                                                                   |    |    |
| 131                                | Lê Tất Phương, Đinh Thị Hào                | Triển vọng kinh tế Việt Nam 2019-2020 và một số cảnh báo.                                                                                                                                         | 4  | 1  |
| 132                                | Lê Đình Chiêu                              | Xây dựng mô hình kế hoạch kinh doanh cho các doanh nghiệp khai thác than thuộc Tập đoàn Công nghiệp Than - Khoáng sản Việt Nam (Vinacomin).                                                       | 4  | 8  |
| 133                                | Lê Văn Phục                                | Kinh nghiệm phát triển du lịch của một số nước trong khu vực và gợi ý cho Việt Nam.                                                                                                               | 4  | 12 |
| 134                                | Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Đình Đức         | Thực tiễn xây dựng và phát triển các nhóm nghiên cứu trong các trường đại học ở Việt Nam hiện nay.                                                                                                | 4  | 17 |
| 135                                | Nguyễn Thị Quỳnh Anh, Đặng Kim Khánh Ly... | Vận dụng lý thuyết di động xã hội trong quản lý nguồn nhân lực KH&CN chất lượng cao thích ứng với bối cảnh CMCN 4.0.                                                                              | 4  | 24 |
| 136                                | Nguyễn Vinh Hưng                           | Lịch sử chế định pháp luật về Thừa phát lại tại Việt Nam.                                                                                                                                         | 4  | 31 |
| 137                                | Hoàng Văn Nghĩa                            | Cơ chế dân chủ: Thực trạng, thách thức và giải pháp.                                                                                                                                              | 4  | 36 |
| 138                                | Bùi Thị Thu Trang, Hoàng Thị Huê           | Đánh giá giá trị bảo tồn loài vọoc Cát Bà tại Vườn quốc gia Cát Bà.                                                                                                                               | 4  | 41 |
| 139                                | Lê Thời Tân                                | Sơ chi và quy chiếu của ngôn ngữ và văn chương - Trường hợp con “tra” trong truyện <i>Cố hương</i> của Lỗ Tấn.                                                                                    | 4  | 47 |
| 140                                | Nguyễn Thị Năm Hoàng                       | Thiên tính nữ và góc nhìn giới tính trong văn chương Việt Nam đương đại.                                                                                                                          | 4  | 50 |
| 141                                | Vũ Thị Mai, Nguyễn Thị Kim Tiến            | Bản thể và tâm thế - Góc nhìn khác về người lính qua tiểu thuyết viết về chiến tranh của Nguyễn Bình Phương và Nguyễn Đình Tú.                                                                    | 4  | 56 |
| 142                                | Trần Thị Hồng                              | Tác động của chính sách về quyền tự chủ đến hoạt động KH&CN trong trường đại học.                                                                                                                 | 4  | 61 |
| 143                                | Trần Văn Công, Nguyễn Thị Hoài Phương...   | Thực trạng khó khăn tâm lý của học sinh và nhu cầu sử dụng ứng dụng tư vấn tâm lý trong trường học.                                                                                               | 10 | 1  |
| 144                                | Nguyễn Quỳnh Hoa, Ngô Quốc Dũng            | Sử dụng chỉ số đổi mới sáng tạo toàn cầu trong đánh giá quá trình phát triển kinh tế theo hướng công nghiệp hiện đại.                                                                             | 10 | 7  |
| 145                                | Lê Thùy Dung, Ngô Thị Tú Oanh...           | Thực trạng quản trị công ty và một số ảnh hưởng đến hoạt động sáp nhập, mua lại tại Việt Nam.                                                                                                     | 10 | 13 |
| 146                                | Đào Minh Quân, Nguyễn Đình Đức             | Nhận diện vai trò của nhóm nghiên cứu mạnh trong các trường đại học dựa trên tiếp cận các mối quan hệ của nhóm nghiên cứu.                                                                        | 10 | 19 |
| 147                                | Phùng Thị Yến                              | Giới và sự tham gia của người dân trong quản lý rừng bền vững.                                                                                                                                    | 10 | 24 |
| 148                                | Hoàng Lan Phương                           | Pháp luật về chuyển quyền sử dụng nhãn hiệu: Những bất cập cần khắc phục.                                                                                                                         | 10 | 29 |
| 149                                | Võ Trung Hậu                               | Quyền tác giả đối với liên kết website.                                                                                                                                                           | 10 | 34 |
| 150                                | Phạm Văn Tân                               | Một nghiên cứu về chế độ trách nhiệm dân sự đối với thiệt hại ô nhiễm dầu: Sự khác biệt giữa OPA và CLC.                                                                                          | 10 | 38 |
| 151                                | Nguyễn Khắc Sử                             | Khảo cổ học hang động núi lửa: Một loại hình di sản độc đáo ở Việt Nam (trường hợp hang C-6 Krông Nô).                                                                                            | 10 | 44 |
| 152                                | Lê Xuân Hưng                               | Tính chất và niên đại của các di tích công xưởng chế tác công cụ đá giai đoạn hậu kỳ Đá mới - sơ kỳ Kim khí ở Tây Nguyên.                                                                         | 10 | 49 |
| 153                                | Nguyễn Thị Thanh Chung                     | Định hướng khảo luận tầm nguyên hệ thống yếu tố Hán Việt bằng phương pháp nghiên cứu lịch sử - so sánh.                                                                                           | 10 | 54 |
| 154                                | Bạch Tân Sinh                              | Tác động của chuyển đổi chính sách KH&CN đến việc tạo ra và sử dụng tri thức tại viện R&D từ cách tiếp cận văn hóa chính sách.                                                                    | 10 | 60 |
| 155                                | Ngô Thắng Lợi, Nguyễn Thị Mai Anh          | Tái cơ cấu ngành kinh tế theo quan điểm phát triển bền vững: Định hướng và các giải pháp đến 2020 và những năm tiếp theo.                                                                         | 11 | 87 |
| 156                                | Vũ Minh Giang                              | Nghiên cứu, biên soạn bộ Lịch sử Việt Nam: Quy mô lớn, quan điểm mới.                                                                                                                             | 11 | 94 |



# QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

## Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết 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 viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

## Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, 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 (<sup>1,2...</sup>) ở phía trên. Dấu hoa thị (\*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

## Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

## Dẫn nhập/đặt vấn đề

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.

## Đối tượng và phương pháp

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...

## Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

## Bàn luận

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.

## 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.

## Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (<sup>1,2,3...</sup>) 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 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

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...

*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).

**Tập (số)**: dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

**Chú ý**: nếu có  $\geq 2$  tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

## Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa 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.

## 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
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học môi trường
- 1.8. Khoa học nano
- 1.9. Khoa học tính toán
- 1.10. Các lĩnh vực khoa học tự nhiên khác

### 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 Y - dược học

### 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 61 - Number 12 - December 2019

**Đánh giá nhĩ lượng của bệnh nhân khe hở vòm miệng bị viêm tai giữa ứ dịch.**

Khiếu Hữu Thanh, Nguyễn Đình Phúc, Lương Thị Minh Hương

**Đánh giá hiệu quả giảm đau bằng phương pháp nhĩ châm ở các huyết tử cung, nội tiết, giao cảm, gan, bụng trên bệnh nhân đau bụng kinh.**

Ngô Thị Hiếu Hằng, Bùi Phạm Minh Mẫn, Trịnh Thị Diệu Thường

**Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu nước bọt bằng phương pháp PCR.**

Triệu Tiến Sang, Trần Văn Khoa, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Hiệp, Nguyễn Thu Huyền, Nguyễn Thị Trang

**Xây dựng quy trình khuếch đại đẳng nhiệt Recombinase polymerase amplification (RPA) phát hiện *Leptospira* spp. gây bệnh.**

Hồ Hữu Thọ, Lê Thị Thúy, Nguyễn Đình Ứng, Hồ Anh Sơn, Hoàng Văn Lương, Nguyễn Văn Chuyên, Nguyễn Văn Ba, Nguyễn Trọng Chính

**Một số đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của *Serratia marcescens* phân lập trên bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.**

Hoàng Thị Hằng, Phạm Duy Thái, Trần Thị Vân Phương, Ngô Thị Hồng Hạnh, Trần Huy Hoàng

**Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) in vitro ở điều kiện nhà kính và tự nhiên tại Lâm Đồng.**

Phan Công Du, Nguyễn Lê Quốc Hùng, Hoàng Thanh Tùng, Đỗ Mạnh Cường, Lê Xuân Thám, Dương Tấn Nhứt

**Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng *Erwinia carotovora* từ đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam.**

Trương Thị Chiên, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Ngọc Lan, Nguyễn Thị Hiền, Trần Bảo Trâm

**Đánh giá đa dạng di truyền bằng chỉ thị hình thái và tương quan kiểu hình của các dòng Náng hoa trắng (*Crinum asiaticum* L.).**

Nguyễn Văn Tâm, Nhữ Thu Nga, Trịnh Văn Vượng, Phan Thúy Hiền, Trần Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Hương, Vũ Đình Hòa

**Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến hấp phụ photpho trong đất phù sa Đồng bằng sông Hồng.**

Nguyễn Đức Thành, Hoàng Quốc Nam, Lưu Thế Anh, Nguyễn Thị Thủy, Lê Bá Biên, Hoàng Thị Thu Duyên, Đinh Mai Văn

**Khả năng sinh trưởng và năng suất sinh sản của lợn cái (Landrace x Yorkshire) và (Yorkshire x Landrace) nuôi tại Công ty Indovina Thái Bình.**

Trịnh Hồng Sơn, Nguyễn Thị Hương

**Nghiên cứu ứng dụng dịch chiết có hoạt tính sinh học từ gừng (*Zingiber officinale*), riềng (*Alpinia officinarum*) để bảo quản tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*).**

Phan Thanh Tâm, Nguyễn Mạnh Cường

**Xác định sự có mặt và phiên mã gen *ZmLEA14A* ở cây chuyển gen *Nicotiana tabacum* dòng Nic9-1.**

Hà Hồng Hạnh, Bùi Mạnh Minh, Lê Thị Thu Hiền, Huỳnh Thị Thu Huệ

**1 The tympanogram characteristics of cleft palate patients suffering from otitis media with effusion.**

Huu Thanh Khiếu, Dinh Phuc Nguyen, Thi Minh Huong Luong

**5 Auricular acupuncture on uterus, endocrine, sympathetic, liver, abdominal acupoints for pain relief in patients with dysmenorrhea.**

Thi Hieu Hang Ngo, Pham Minh Man Bui, Thi Dieu Thuong Trinh

**9 The development of PCR assay for diagnosis of *Helicobacter pylori* in saliva samples.**

Tien Sang Trieu, Van Khoa Tran, Thanh Tung Nguyen, Hoang Hiep Nguyen, Thu Huyen Nguyen, Thi Trang Nguyen

**14 Development of isothermal Recombinase polymerase amplification (RPA) process for detection of *Leptospira* spp. causing diseases.**

Huu Tho Ho, Thi Thuy Le, Dinh Ung Nguyen, Anh Son Ho, Van Luong Hoang, Van Chuyen Nguyen, Van Ba Nguyen, Trong Chinh Nguyen

**20 Antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of *Serratia marcescens* strains isolated in patients treated at 108 Central Military Hospital.**

Thi Hang Hoang, Duy Thai Pham, Thi Van Phuong Tran, Thi Hong Hanh Ngo, Huy Hoang Tran

**26 The in vitro cultivation of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. in the natural and greenhouse conditions in Lam Dong province.**

Cong Du Phan, Le Quoc Hung Nguyen, Thanh Tung Hoang, Manh Cuong Do, Xuan Tham Le, Tan Nhut Duong

**32 Isolation and selection of bacterial strains with bioactivity against *Erwinia carotovora* from Ngọc Linh ginseng cultivated soil in Quang Nam.**

Thi Chien Truong, Thi Thanh Mai Nguyen, Xuan Canh Nguyen, Ngoc Lan Nguyen, Thi Hien Nguyen, Bao Tram Tran

**36 Evaluating the genetic diversity and phenotypic correlation of giant crinum lily lines (*Crinum asiaticum* L.).**

Van Tam Nguyen, Thu Nga Nhu, Van Vuong Trinh, Thuy Hien Phan, Ngoc Thanh Tran, Thi Huong Nguyen, Dinh Hoa Vu

**41 Effect of temperature and time on phosphorus adsorption in alluvial soils of the Red River Delta.**

Duc Thanh Nguyen, Quoc Nam Hoang, The Anh Luu, Thi Thuy Nguyen, Ba Bien Le, Thi Thu Duyen Hoang, Mai Van Dinh

**47 Growth and reproductive performance of female pigs (Landrace x Yorkshire) and (Yorkshire x Landrace) raised at Indovina Thai Binh Company.**

Hong Son Trinh, Thi Huong Nguyen

**51 Study on applying biological activity components from the extracts of ginger (*Zingiber officinale*) and galangal (*Alpinia officinarum*) for preserving whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*).**

Thanh Tam Phan, Manh Cuong Nguyen

**56 Verifying the presence and transcription of *ZmLEA14A* gene in *Nicotiana tabacum* line Nic9-1.**

Hong Hanh Ha, Manh Minh Bui, Thi Thu Hien Le, Thi Thu Hue Huynh