



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 61 - Số 9 - Tháng 9 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^d

PUBLICATION LICENCE

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

Kết quả chuyển thần kinh điều trị liệt hoàn toàn đám rối cánh tay do nhổ các rễ thần kinh

Nguyễn Viết Ngọc*, Lê Văn Đoàn, Nguyễn Văn Phú và cộng sự

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài 18/4/2019; ngày chuyển phản biện 22/4/2019; ngày nhận phản biện 21/5/2019; ngày chấp nhận đăng 30/5/2019

Tóm tắt:

Phẫu thuật điều trị liệt hoàn toàn đám rối thần kinh (TK) cánh tay do nhổ tất cả các rễ TK hiện nay vẫn là một thách thức lớn đối với cả nguồn cho và kỹ thuật phục hồi. Nghiên cứu này nhằm đánh giá kết quả với nguồn cho và kỹ thuật phục hồi thống nhất ở 30 bệnh nhân (BN) được phẫu thuật. 30 BN bị nhổ hoặc đứt sát lỗ ghép tất cả các rễ đám rối TK cánh tay, được phẫu thuật chuyển trực tiếp TK XI cho TK trên vai, toàn bộ rễ C7 từ bên lành phục hồi TK cơ bì, nhánh trước TK nách và TK giữa qua 2 đoạn ghép TK trụ có mạch nuôi. Đánh giá kết quả sau mổ trên 24 tháng theo thang điểm của Hội đồng nghiên cứu y học Anh (BMRC) cho thấy, giạng vai $\geq 91^\circ$ (M3) là 22/30 (73,3%); gấp khuỷu, gấp cổ tay và các ngón tay đạt $\geq M3$ lần lượt là 23/30 (76,7%), 13/30 (43,3%) và 8/30 (26,7%), phục hồi cảm giác ở bàn tay mức $\geq S2$ là 24/30 (80%) BN. Chuyển TK XI cho TK trên vai và chuyển toàn bộ rễ C7 bên lành phục hồi TK cơ bì, nhánh trước TK nách và TK giữa qua 2 đoạn ghép TK trụ có mạch nuôi là phẫu thuật hiệu quả, an toàn với nguồn cho ổn định.

Từ khóa: chuyển rễ C7 đối bên, đám rối TK cánh tay.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Phẫu thuật điều trị tổn thương nhổ hoặc đứt sát lỗ ghép tất cả các rễ TK đám rối cánh tay (ĐRCT) hiện nay vẫn là một thách thức lớn, phương pháp điều trị duy nhất là sử dụng TK ngoài đám rối để chuyển phục hồi TK quan trọng bên tổn thương. Hiện nay, đường hướng chung là chuyển nhiều nguồn TK để phục hồi đồng thời những động tác quan trọng của chi thể và sử dụng đoạn TK ghép có mạch nuôi.

Những chức năng quan trọng của chi trên được nhiều tác giả đồng thuận lựa chọn để phục hồi đối với loại tổn thương này là giạng vai, gấp khuỷu, gấp cổ - bàn tay và cảm giác bàn - ngón tay.

Từ tháng 10/2012 đến nay, chúng tôi đã tiến hành phẫu thuật phục hồi đồng thời các chức năng nêu trên trong một cuộc mổ, đó là chuyển nối trực tiếp TK XI cho TK trên vai, chuyển rễ C7 bên lành cho TK cơ bì, TK nách và TK giữa với 2 đoạn ghép là TK trụ có mạch nuôi đi qua đường hầm sau xương đòn và trước khí quản. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá kết quả của phẫu thuật, tính an toàn và ổn định của nguồn cho.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

30 BN bị liệt hoàn toàn ĐRCT do nhổ hoặc đứt sát lỗ

ghép toàn bộ các rễ TK, được phẫu thuật từ tháng 7/2015-11/2016 tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Tiêu chuẩn lựa chọn BN: BN được chẩn đoán nhổ, đứt tất cả các rễ TK ĐRCT qua khám lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (chụp MRI, CT-myelography). Thời gian từ khi tổn thương đến khi được mổ < 6 tháng. BN < 50 tuổi và đồng ý phẫu thuật. Các khớp vai, khuỷu, cổ tay và các khớp ở ngón tay bên liệt mềm mại. Không có tổn thương đưng dập, xơ hóa nặng các cơ vùng vai, khu trước cánh tay, cẳng tay và không có chống chỉ định của bệnh lý toàn thân.

Tiêu chuẩn loại trừ: BN đến muộn > 6 tháng, > 50 tuổi. Tổn thương sẹo co kéo vùng nách, cánh tay và khuỷu, các cơ vùng trên vai, dưới vai, khu trước cánh tay, cẳng tay bị tổn thương nặng. Cứng khớp vai, khuỷu hoặc hạn chế vận động thụ động nhiều. Có các bệnh lý toàn thân nặng, không cho phép phẫu thuật.

Phương pháp và quy trình phẫu thuật

- Nghiên cứu theo phương pháp quan sát mô tả, phân tích lâm sàng, theo dõi dọc, không nhóm chứng.

- Kỹ thuật được thực hiện qua 8 bước thứ tự như sau:

+ Rạch da theo đường ngang phía trên xương đòn 2 cm, từ bờ ngoài cơ ức - đòn - chũm kéo ra sau, bộc lộ đánh giá tổn thương ĐRCT. Tìm động mạch cổ ngang nông, tĩnh

*Tác giả liên hệ: Email: ngocnvhanoi108@gmail.com

Results of nerve transfer surgery in the treatment of total root avulsion type brachial plexus injuries

Viet Ngoc Nguyen*, Van Doan Le, Van Phu Nguyen, et al.

108 Military Central Hospital

Received 18 April 2019; accepted 30 May 2019

Abstract:

Surgical treatment in patients with total root avulsion type brachial plexus injuries is a major challenge in both donor sources of nerves and techniques. This study aims to assess the outcomes in 30 patients who had surgeries, with the unity of donor nerves and technique. 30 patients with total root avulsion or rupture brachial plexus injuries were treated with the accessory nerve (XI) to the suprascapular nerve transfer, and the total contralateral C7 to musculocutaneous, axillary, and median nerve transfer with 2 segments of vascularized ulnar nerve grafts in a surgery. The results were evaluated by BMRC, with the follow-up period of 18 months after surgery. Shoulder abduction angle $\geq 91^\circ$ accounted for 73.3% (n=22/30); elbow flexion, wrist flexion, and finger flexion $\geq M3$ accounted for 76.7% (n=23/30), 43.3% (n=13/30), and 26.7% (n=8/30), respectively. The sensory recovery of the hand at level $\geq S2$ was found in 80% (n=24/30) patients. The accessory nerve (XI) to suprascapular nerve transfer surgery and the total contralateral C7 nerve to musculocutaneous, axillary, and median nerve transfer surgery with 2 segments of vascularized ulnar nerve grafts were safe and effective with stable donor nerves.

Keywords: brachial plexus injury, contralateral C7 transfer.

Classification number: 3.2

mạch cổ nông, TK XI và TK trên vai.

+ Rạch da như bên tổn thương, bộc lộ đầy đủ tất cả các rễ TK của ĐRCT và xác định đánh dấu rễ C7.

+ Tạo một đường hầm trước khí quản sang bên đối diện và đặt chỉ chờ.

+ Rạch da chữ S, từ thành trước nách qua bờ dưới cơ ngực lớn đến hố nách và tới 1/3 trên cánh tay. Phẫu tích tìm TK cơ bì, TK nách, TK giữa (gồm cả rễ trong và rễ ngoài) và TK trụ.

+ Phẫu tích tạo đường hầm từ hố nách, đi sau xương đòn lên vùng tam giác cổ sau và đặt chỉ chờ.

+ Đặt ga rô sát nách, rạch da zíc zắc dọc theo đường đi của TK trụ, từ đầu dưới của đường rạch hố nách - cánh tay tới cổ tay. Bóc tách lấy TK trụ đi cùng bó mạch trụ từ nếp gấp cổ tay đến sát nguyên ủy. Tại vùng nguyên ủy, tách bao ngoài và cắt TK trụ sao cho không gây tổn thương mạch đi vào nuôi TK ở vùng này.

+ Luồn đoạn ghép TK trụ qua đường hầm và nối động mạch trụ vào động mạch cổ ngang nông, tĩnh mạch trụ với tĩnh mạch cổ nông, nối các mối nối TK bằng kỹ thuật vi phẫu.

+ Đóng các vết mổ 2 lớp. Khi đóng vết mổ vùng cổ bên tổn thương, chú ý đặt mối nối động mạch trụ với động mạch cổ ngang ngay dưới đường khâu da để theo dõi sự lưu thông của động mạch bằng ống nghe siêu âm Doppler.

Tiêu chuẩn đánh giá kết quả

Đánh giá kết quả phục hồi chức năng về vận động và cảm giác của TK nhận theo các chỉ tiêu của Hội đồng nghiên cứu y học Anh [1]. Sức cơ từ M0-M5, cảm giác từ S0-S4.

Kết quả

Sự phục hồi giạng vai (TK trên vai, mũ): 30 BN được theo dõi trên 24 tháng, trung bình $30,5 \pm 4,5$ tháng ($24 \div 40$ tháng) sau mổ, phục hồi giạng vai thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Phục hồi giạng vai (n=30 BN).

TGSM	Kết quả	Phục hồi giạng vai				Tổng
		$<45^\circ$	$45^\circ < 90^\circ$	$90^\circ < 120^\circ$	$>120^\circ$	
24÷30 tháng		3	3	6	0	12
31÷40 tháng		0	2	12	4	18
Tổng	Số lượng	3	5	18	4	30
	Phần trăm	10	16,7	60	13,3	100

Ghi chú: TGSM là thời gian sau mổ.

Kết quả bảng 1 cho thấy, 100% BN phục hồi động tác giạng vai, trong đó có 22/30 BN (73,3%) có góc giạng vai $\geq 90^\circ$ (sức cơ $\geq M3$).

Sự phục hồi của TK cơ bì: kết quả phục hồi TK cơ bì được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Phục hồi gấp khuỷu (n=30 BN).

TGSM	Kết quả	Phục hồi gấp khuỷu					Tổng
		M0	M1	M2	M3	M4	
24÷30 tháng		1	1	3	5	2	12
31÷40 tháng		0	0	2	11	5	18
Tổng	Số lượng	1	1	5	16	7	30
	Phần trăm	3,3	3,3	16,7	53,3	23,4	100

Kết quả bảng 2 cho thấy, tỷ lệ phục hồi gấp khuỷu là 29/30 BN (96,7%), trong đó phục hồi mức $\geq M3$ là 23/30 BN (76,7%).

Sự phục hồi của TK giữa: kết quả phục hồi TK giữa thể hiện ở bảng 3, 4 và 5.

Bảng 3. Phục hồi gấp cổ tay (n=30 BN).

TGSM	Kết quả	Phục hồi gấp cổ tay					Tổng
		M0	M1	M2	M3	M4	
24÷30 tháng		5	2	2	3	0	12
31÷40 tháng		2	2	4	8	2	18
Tổng	Số lượng	7	4	6	11	2	30
	Phần trăm	23,3	13,3	20	36,7	6,7	100

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ phục hồi gấp cổ tay là 23/30 BN (76,7%), trong đó phục hồi mức $\geq M3$ trở lên là 13/30 BN (43,3%).

Bảng 4. Phục hồi gấp các ngón tay (n=30 BN).

TGSM	Kết quả	Phục hồi gấp ngón tay					Tổng cộng
		M0	M1	M2	M3	M4	
24÷30 tháng		7	2	1	2	0	12
31÷40 tháng		2	3	7	6	0	18
Tổng	Số lượng	9	5	8	8	0	30
	Phần trăm	30	16,6	26,7	26,7	0	100

Kết quả bảng 4 cho thấy, tỷ lệ phục hồi gấp ngón tay là 21/30 BN (70%), có 8/30 BN (26,7%) phục hồi từ M3 trở lên.

Bảng 5. Phục hồi cảm giác bàn - ngón tay (n=30 BN).

TGSM	Kết quả	Phục hồi cảm giác bàn ngón tay					Tổng
		S0	S1	S2	S2+	S3	
24÷30 tháng		2	4	4	2	0	12
31÷40 tháng		0	0	10	6	2	18
Tổng	Số lượng	2	4	14	8	2	30
	Phần trăm	6,7	13,3	46,6	26,7	6,7	100

Kết quả bảng 5 cho thấy, 28/30 BN (93,3%) sau mổ phục hồi cảm giác, có 24/30 BN (80%) phục hồi ở mức $\geq S2$ (ngưỡng cảm giác bảo vệ).

Bàn luận

Về kết quả của phẫu thuật

Động tác giạng vai và gấp khuỷu là rất quan trọng của chi trên, được ưu tiên hàng đầu trong phẫu thuật phục hồi chi liệt. Nhìn chung, các tác giả đều thống nhất phục hồi giạng vai $\geq 91^\circ$ (M3) và gấp khuỷu đạt M3 trở lên được xem là có ý nghĩa [2, 3]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ở bảng 1 và 2 cho thấy, tỷ lệ phục hồi giạng vai $\geq 90^\circ$ là 22/30 BN (73,3%) và gấp khuỷu đạt M3 trở lên là 23/30 BN (76,7%). Trong đó, tỷ lệ sức giạng vai $\geq 120^\circ$ là 4/30 BN (13,3%) và gấp khuỷu đạt M4 là 7/30 BN (23,4%) với khả năng nâng tạ trung bình là 2 kg. Nghiên cứu của Chuang và cs [2] trên 23 BN phục hồi đồng thời TK cơ bì và TK giữa qua một đoạn ghép TK trụ với thời gian theo dõi tối thiểu 4 năm cho thấy, phục hồi gấp khuỷu mức M3 trở lên là 83%. Một nghiên cứu khác của Gao và cs [4] trên 22 BN cũng với phương pháp phẫu thuật như trên, với thời gian theo dõi tối thiểu là 4 năm thì tỷ lệ phục hồi gấp khuỷu đạt M3 trở lên là 66,7%. Như vậy, kết quả của chúng tôi là rất khích lệ.

Về kết quả phục hồi của TK giữa, báo cáo của Waikakul và cs [5] ở 96 BN với kỹ thuật chuyển nửa rễ C7 cho TK giữa có thời gian theo dõi trên 3 năm cho thấy, tỷ lệ phục hồi gấp cổ tay và gấp các ngón tay từ M3 trở lên lần lượt là 29 và 21%. Với kỹ thuật tương tự, kết quả nghiên cứu của Songcharoen và cs [6] cho thấy tỷ lệ phục hồi gấp cổ tay và các ngón tay là 29%. Báo cáo của Chuang và cs [2] ở 23 BN được phẫu thuật chuyển toàn bộ rễ C7 bên lành cho TK cơ bì và TK giữa với thời gian theo dõi trên 4 năm thì tỷ lệ phục hồi gấp khuỷu là 82,6% và gấp cổ tay - các ngón tay đạt M3 trở lên là 39%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bảng 3 và 4 cho thấy tỷ lệ phục hồi gấp cổ tay và gấp các ngón tay đạt M3 trở lên lần lượt là 13/30 BN (43,3%) và 8/30 BN (26,7%), kết quả này cũng đáng khích lệ.

Phục hồi cảm giác ở mức bảo vệ $\geq S2$ không những có ý nghĩa quan trọng giúp BN tránh được các thương tích đối với tay liệt mà còn tham gia vào quá trình tái lập chức năng vỏ não khi người bệnh được rèn luyện một kỹ năng nhận cảm mới. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bảng 5 cho thấy, 28/30 BN (93,3%) sau mổ trên 24 tháng phục hồi cảm giác do TK giữa chi phối ở khu vực bàn ngón tay, trong đó có 24/30 (80%) BN đạt mức $\geq S2$. Kết quả này thấp hơn so với

tỷ lệ 91,6% đạt mức $\geq S2$ trong nghiên cứu của Terzis và cs [7], 83,3% đạt mức $\geq S2$ của Waikakul và cs [5] vì thời gian đánh giá kết quả sau mổ của chúng tôi là từ 24÷40 tháng, còn của các tác giả này là trên 40 tháng. Theo thời gian khả năng phục hồi cảm giác ngày càng tăng lên.

Về tính an toàn và ưu điểm của kỹ thuật

Chiều dài đường hầm dưới da qua trước thành ngực từ bên liệt sang nền cổ bên lành ở người châu Á trong nghiên cứu của Waikakul và cs [5] là 43,5 cm, của Chuang và cs [2] là 40 cm, ở người da trắng trong nghiên cứu Terzis và cs [7] là 51 cm. Như vậy, đoạn TK ghép phải có độ dài bằng khoảng 2/3 tổng chiều dài của TK trụ từ nguyên ủy tới cổ tay và do đó chỉ có thể sử dụng được một đoạn ghép TK trụ.

Trong những nghiên cứu gần đây, một số tác giả chuyển rễ C7 bên lành qua đường hầm trước cột sống [8], theo các tác giả thì đường hầm này sẽ giảm tối đa chiều dài đoạn ghép. Tuy nhiên, tính an toàn của đường đi này không cao nên không được áp dụng rộng rãi. Theo Chuang và cs [2], đường hầm này rút ngắn được đường đi của đoạn ghép khoảng 10 cm nhưng có nhược điểm là hiện tượng dị cảm xuất hiện khi BN nuốt do đoạn ghép nằm ngay phía sau thực quản, gây khó chịu cho người bệnh.

Kỹ thuật của chúng tôi có một số ưu điểm, đó là: *thứ nhất*, đoạn ghép TK trụ được sử dụng dưới dạng vật ghép TK tự do, cấp máu cho đoạn xa của TK trụ qua cuống mạch trụ dưới được nối với động mạch cổ ngang nông và tĩnh mạch cổ nông, phần trung tâm của đoạn ghép TK trụ còn được tăng cường bởi nguồn mạch máu nhỏ được bảo tồn đi vào bao ngoài của TK ở sát nguyên ủy. Tại vị trí gấp đôi của đoạn TK ghép được mở dọc bao ngoài và cắt TK trong bao nên vẫn giữ được sự cấp máu tối ưu cho cả hai đoạn ghép, hai nguồn cấp máu có thể hỗ trợ cho nhau nên toàn bộ đoạn ghép TK trụ được cấp máu hoàn hảo, tránh được tình trạng xơ hóa trung tâm đoạn ghép [9]. *Thứ hai*, đoạn ghép được luồn qua đường hầm sau xương đòn bên tổn thương và đường hầm trước khí quản để sang bên lành. Đường đi này ngắn đáng kể so với đường hầm dưới da qua thành ngực như trong nghiên cứu của các tác giả nước ngoài, đây là yếu tố rất quan trọng cho phép sử dụng đoạn ghép TK trụ gấp đôi. Ngoài ra, theo chúng tôi, rễ C7 có 23.000 (17.000-40.000) sợi TK, trong khi TK trụ chỉ có 14.161 (10.365-22.690) sợi [10, 11] nên nếu sử dụng một đoạn ghép TK trụ thì một lượng lớn sợi trục từ rễ C7 không đi vào được đoạn ghép. Vì vậy, việc sử dụng TK trụ gấp đôi đảm bảo nhận tối đa số lượng sợi TK của C7 bên lành làm nguồn TK cho, kỹ thuật

này chúng tôi chưa thấy được báo cáo trong y văn.

Sự ổn định của nguồn cho

Chuyển nối trực tiếp TK XI cho TK trên vai phù hợp về kích thước, không qua đoạn ghép là một ưu điểm lớn cho kết quả phục hồi của TK nhận. Hơn nữa, trong tổn thương hoàn toàn ĐRCT thì gần như không có tổn thương TK XI, chúng tôi chưa tìm được báo cáo nào thống kê về số liệu này nhưng trong thực tế lâm sàng chúng tôi chưa gặp trường hợp nào liệt ĐRCT mà có kèm theo tổn thương TK XI. Một số tác giả có dùng TK hoành [12, 13] để chuyển cho TK trên vai nhưng theo chúng tôi TK hoành là rất quan trọng cho chức năng hô hấp, do vậy quan điểm của chúng tôi là không sử dụng TK hoành.

Với nguồn chuyển cho TK nách, đa số các tác giả dùng một trong các TK như: TK XI, TK hoành hoặc TK liên sườn và thường phải thực hiện qua một đoạn TK ghép kinh điển [12, 13]. Chúng tôi thực hiện chuyển rễ C7 đối bên đồng thời cho TK nách qua việc chia nhánh bì mu tay của đoạn ghép ngoại vi TK trụ cho nhánh trước TK nách, theo chúng tôi với kỹ thuật này nguồn cho là ổn định, số lượng axon đủ lớn, kích thước phù hợp và đặc biệt là đoạn TK ghép có mạch nuôi nên có ưu điểm hơn đoạn ghép kinh điển như đã phân tích ở trên, đây cũng là kỹ thuật mà chúng tôi chưa tìm thấy trong y văn.

Kết luận

Kết quả qua 30 BN được phẫu thuật chuyển TK XI cho TK trên vai và chuyển toàn bộ rễ C7 bên lành qua 2 đoạn ghép TK trụ có mạch nuôi phục hồi TK cơ bì, TK nách và TK giữa, với thời gian theo dõi và đánh giá sau mổ chưa dài (<40 tháng) kết quả đạt được 100% phục hồi giạng vai, trong đó giạng vai $\geq 91^\circ$ (M3) là 22/30 (73,3%); 29/30 (96,7%) phục hồi gấp khuỷu, trong đó gấp khuỷu đạt $\geq M3$ là 23/30 (76,7%); phục hồi gấp cổ tay là 23/30 (76,7%), có 13/30 (43,3%) BN đạt sức cơ M3; gấp ngón tay đạt 21/30 BN (70%), có 8/30 BN (26,7%) phục hồi sức cơ M3; phục hồi cảm giác ở bàn ngón tay đạt 28/30 (93,3%), mức $\geq S2$ là 24/30 (80%) BN.

Kỹ thuật chuyển nối TK XI cho TK trên vai và chuyển ghép rễ C7 bên lành với 2 đoạn ghép TK trụ có mạch nuôi, qua đường hầm sau xương đòn và trước khí quản là phẫu thuật an toàn, giảm đáng kể độ dài đoạn ghép, đoạn ghép sống ngay sau mổ, chuyển được tối đa các sợi TK của rễ C7 bên lành cho TK nhận bên liệt. Nguồn cho ổn định và kết quả phục hồi là khả quan.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài độc lập cấp quốc gia "Nghiên cứu ứng dụng và phát triển kỹ thuật vi phẫu trong điều trị tổn thương đám rối thần kinh cánh tay, đứt rời chi và chuyển ngón" (mã số ĐTĐL.CN-11/15). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Medical Research Council (1943), *Aids to the investigation of the peripheral nervous system* London: Her Majesty's Stationary Office.
- [2] D.C. Chuang, C. Hernon (2012), "Minimum 4-year follow-up on contralateral C7 nerve transfers for brachial plexus injuries", *J. Hand Surg. Am.*, **37**(2), pp.270-276.
- [3] Y.D. Gu (1989), *Neurotization by contralateral C7*, Presented at the 9th Symposium on the brachial plexus, Villars, Switzerland.
- [4] K. Gao, et al. (2013), "Outcome of contralateral C7 transfer to two recipient nerves in 22 patients with the total brachial plexus avulsion injury", *Microsurg.*, **33**(8), pp.605-611.
- [5] S. Waikakul, et al. (1999), "Clinical results of contralateral C7 root neurotization to the median nerve in brachial plexus injuries with total root avulsions", *J. Hand Surg. Br.*, **24**(5), pp.556-560.
- [6] P. Songcharoen, et al. (2001), "Hemi-contralateral C7 transfer to median nerve in the treatment of root avulsion brachial plexus injury", *J. Hand Surg. Am.*, **26**(6), pp.1058-1064.
- [7] J.K. Terzis, V.K. Kostopoulos (2009), "Vascularized ulnar nerve graft: 151 reconstructions for posttraumatic brachial plexus palsy", *Plast. Reconstr. Surg.*, **123**(4), pp.1276-1291.
- [8] S. Wang, et al. (2012), "Contralateral C7 nerve root transfer to neurotize the upper trunk via a modified prespinal route in repair of brachial plexus avulsion injury", *Microsurg.*, **32**(3), pp.183-188.
- [9] G.I. Taylor, F.J. Ham (1975), "The free vascularized nerve graft", *Plast. Reconstr. Surg.*, **56**, pp.166-170.
- [10] F. Bonnel (1984), "Microscopic anatomy of the adult human brachial plexus: An anatomical and histological basis for microsurgery", *Microsurg.*, **5**, pp.107-117.
- [11] C.L. Slingluff, et al. (1987), "The quantitative microanatomy of the brachial plexus in man: Reconstructive relevance", *Microreconstruction of nerve injuries*.
- [12] Y. Gu, K. Meng (1996), "Use of the Phrenic Nerve for Brachial Plexus Reconstruction", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **323**, pp.119-121.
- [13] W.D. Xu, et al. (2005), "Pulmonary function after complete unilateral phrenic nerve transection", *J. Neurosurg.*, **103**, pp.464-467.

Đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ứng dụng chẩn đoán vô sinh ở nam giới

Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Thị Trang*

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 8/5/2019; ngày chuyển phản biện 16/5/2019; ngày nhận phản biện 26/6/2019; ngày chấp nhận đăng 2/7/2019

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm cải tiến xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở các trường hợp nam giới vô sinh. Đối tượng nghiên cứu và phương pháp: nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 50 mẫu tinh dịch của bệnh nhân nam giới được chẩn đoán vô sinh đến làm xét nghiệm tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội và có mật độ tinh trùng ≥ 1 triệu/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy, bộ xét nghiệm cải tiến có hệ số biến thiên $CV\% = 2,26\% < 5\%$; $t_m = 0,97 < t_c$. Như vậy có thể kết luận: bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng cải tiến đạt yêu cầu của một bộ xét nghiệm định lượng.

Từ khóa: DFI, đứt gãy ADN tinh trùng, vô sinh.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Vô sinh hiện nay là vấn đề sức khỏe sinh sản với tỷ lệ gia tăng ở mức đáng báo động, được toàn xã hội quan tâm. Trong đó, vô sinh nam có tỷ lệ khá cao (gần tương đương như vô sinh nữ) nhưng vẫn chưa được coi trọng đúng mức do vấn đề cơ sở vật chất kỹ thuật, định kiến xã hội [1, 2]. Tại Việt Nam, hiện chỉ có xét nghiệm tinh dịch đồ được chỉ định thường quy và phổ biến, các chỉ số có mức độ quan trọng tương đương như định lượng kẽm, fructose trong tinh dịch [2], chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng, mức độ stress oxy hóa... thì lại chưa được quan tâm đúng mức. Xét nghiệm đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng được xây dựng trên phương pháp đánh giá sự phân tán chất nhuộm sắc (Sperm Chromatin Dispersion - SCD) do Fernandez và cs công bố năm 2003 [3], không chỉ cho biết được độ hoàn thiện của ADN tinh trùng mà còn đánh giá được khả năng sinh sản của nam giới, góp phần chẩn đoán và theo dõi điều trị vô sinh [4]. Mặc dù đã khẳng định được vai trò của mình trong chẩn đoán vô sinh nam [4], nhưng hiện nay xét nghiệm đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng mới chỉ xuất hiện tại một số trung tâm hỗ trợ sinh sản và bệnh viện lớn; lại được tiến hành bằng bộ kit nhập ngoại Halosperm của Hãng Halotech ADN (Tây Ban Nha) với giá thành khá cao, nên số lượng bệnh nhân đồng ý làm xét nghiệm vẫn còn hạn chế. Xuất phát từ tình hình thực tế trên, nhóm nghiên cứu

đã tiến hành xây dựng và đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm cải tiến xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở nam giới vô sinh theo phương pháp SCD với mục tiêu hoàn thiện quy trình, hạ giá thành nhưng vẫn đảm bảo chất lượng xét nghiệm để đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ở nam giới Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

50 mẫu tinh dịch của bệnh nhân nam được chẩn đoán vô sinh tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, làm xét nghiệm đánh giá độ đứt gãy ADN tinh trùng tại Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân nam từ 18 tuổi, xét nghiệm tinh dịch đồ kết quả mật độ tinh trùng ≥ 1 triệu/ml và đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân nam giới không thỏa mãn các tiêu chuẩn trên, bị các bệnh: ung thư bộ phận sinh dục, HIV, giang mai, lậu, bệnh cấp tính, bệnh tâm thần và bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Cỡ mẫu: để hoàn thiện quy trình, xác định độ chính xác, chúng tôi sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho một nghiên cứu

*Tác giả liên hệ: Email: trangnguyen@hmu.edu.vn

Evaluation on the accuracy of a test kit for analysing sperm DNA fragmentation in infertile men

Minh Thu Nguyen, Thi Trang Nguyen*

Hanoi Medical University

Received 8 May 2019; accepted 2 July 2019

Abstract:

The objective of this study is to evaluate the accuracy of the improved test kit for analysing sperm DNA fragmentation in infertile men. Subjects and methods: a cross-section study was conducted on 50 semen samples from infertile men with the sperm concentration ≥ 1 millions/ml. Results exhibited the improved test kit had the variable index $CV\% = 2.26\% < 5\%$; $t_m = 0.97 < t_c$. It can be concluded that the improved test kit for sperm DNA fragmentation analysis is qualified for quantitative tests.

Keywords: DFI, infertile, sperm DNA fragmentation.

Classification number: 3.2

cứ mô tả tính theo công thức của Lwanga và Lemeshow [5]: $n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{\varepsilon^2 p}$. Trong đó: $1 - \alpha/2 = 0,95$; $\varepsilon = 0,10$; $p = 95\%$ (độ chính xác của quy trình tham chiếu), n = số lần thực nghiệm cần thực hiện, tính được bằng 21, chúng tôi lấy gấp đôi và làm tròn số là 50.

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Phương pháp làm tiêu bản: cải tiến dựa trên quy trình SCD của Fernandez và cs (2003) [3], sử dụng bộ kit Halosperm của Hãng Halotech như sau:

Bước 1. Chuẩn bị thạch: đun cách thủy eppendorf chứa agarose pha sẵn ở nhiệt độ 95-100°C 5 phút hoặc trong lò vi sóng 3 phút, cho đến khi hóa lỏng hoàn toàn agarose. Pha loãng mẫu tinh dịch bằng dung dịch PBS sao cho nồng độ khoảng <15 triệu tinh trùng/ml tinh dịch. Giữ ống agarose ở nhiệt độ 37°C trong vòng 5 phút đến khi nhiệt độ trong eppendorf chứa thạch và nhiệt độ trong bể ủ nhiệt được cân bằng.

Bước 2. Chuẩn bị hỗn hợp tinh dịch - thạch: cho 25 μ l tinh dịch vào ống agarose và trộn đều bằng pipet. Giữ ống ở nhiệt độ 37°C và nhanh chóng thực hiện bước kế tiếp, tránh agarose bị đông. Nhỏ một giọt 25 μ l hỗn hợp tinh dịch - thạch lên vị trí được khoanh tròn trên lam kính, đặt lamên, ấn nhẹ, tránh bọt khí xuất hiện. Lam kính được đặt nằm ngang trong suốt quá trình thao tác. Đặt tiêu bản vào tủ lạnh 4°C, trong 10 phút để agarose đông lại.

Bước 3. Sau khi hỗn hợp tinh dịch - thạch đông lại, lấy tiêu bản ra khỏi tủ lạnh, bỏ lamên bằng cách trượt nhẹ ra.

Chuẩn bị dung dịch biến tính và làm biến tính ADN tinh trùng: lấy 80 μ l dung dịch biến tính cho vào ống đựng 10 ml nước cất, lắc đều sẽ được dung dịch biến tính cần thiết. Đặt tiêu bản vào khay chứa dung dịch biến tính trong vòng 7 phút.

Bước 4. Ly giải tế bào: lấy tiêu bản từ dung dịch biến tính và đặt vào khay chứa 10 ml dung dịch ly giải trong 5 phút.

Bước 5. Rửa dung dịch ly giải: sau khi kết thúc bước ly giải, đặt tiêu bản vào khay chứa nước cất trong 5 phút để rửa dung dịch ly giải.

Bước 6. Khử nước: khử nước bằng cách cho tiêu bản vào dung dịch cồn trong vòng 6 phút, sau đó để khô tự nhiên.

Bước 7. Nhuộm tiêu bản: đặt tiêu bản nằm ngang, nhỏ dung dịch Giemsa 5 - 30% phủ lên trên bề mặt tiêu bản, để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút rồi rửa qua nước từ vòi, chú ý tránh rửa quá mạnh làm nhạt màu quanh halo.

Xử lý số liệu

Đánh giá kết quả:

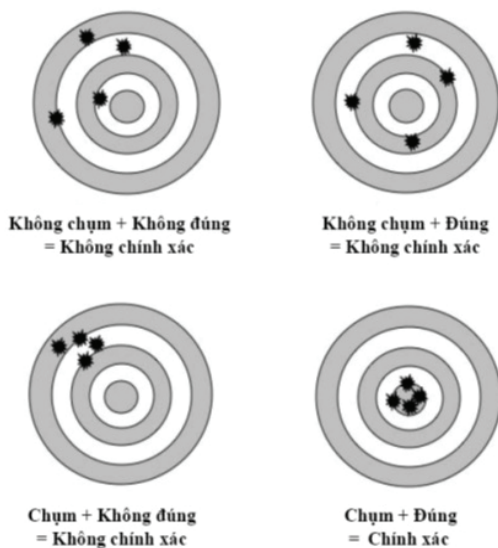
Quan sát lam kính dưới kính hiển vi quang học, đếm ít nhất 500 tinh trùng trên tiêu bản để xác định mức độ đứt gãy ADN của tinh trùng. Độ đứt gãy ADN tinh trùng được xác định bằng quãng Halo của tinh trùng theo Fernandez và cs [3].

Tỷ lệ đứt gãy ADN tinh trùng (DFI - DNA Fragmentation Index) được xác định theo công thức:

$$DFI = \frac{TT \text{ có halo} + TT \text{ không có halo} + TT \text{ thoái hóa}}{\text{Tổng số TT đếm được}} \times 100\%$$

Phân tích số liệu:

Đánh giá chính xác của bộ xét nghiệm thông qua 2 chỉ số là độ chụm và độ đúng [6]:



Hình 1. Minh họa độ chính xác [6].

• Độ chụm là mức độ dao động của các kết quả thử nghiệm độc lập quanh giá trị trung bình. Độ chụm là một khái niệm định tính và được biểu thị định lượng bằng độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD\% = CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

trong đó: SD: độ lệch chuẩn; n: số lần thí nghiệm; x_i : giá trị tính được của lần thử nghiệm thứ "i"; $\bar{x}$: giá trị trung bình của các lần thử nghiệm; RSD%: độ lệch chuẩn tương đối; CV%: hệ số biến thiên.

Độ chụm có thể được phân ra thành 3 trường hợp sau:

- Độ lặp lại (repeatability): thể hiện mức độ chính xác hay mức độ lặp lại, mức độ dao động giữa các kết quả thực nghiệm được thực hiện trong: i) cùng một phòng thí nghiệm; ii) cùng một mẫu thử đồng nhất; iii) cùng một kiểm nghiệm viên; iv) cùng một khoảng thời gian.

Độ lặp lại được xác định bằng cách: trên 1 mẫu tinh dịch của bệnh nhân, sử dụng bộ kit cải tiến tiến hành xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng lặp lại 10 lần. Tính độ lệch chuẩn SD và hệ số biến thiên CV% với yêu cầu $CV \leq 5\%$.

- Độ chụm trung gian (intermediate precision): biểu thị độ chính xác của phương pháp theo các biến số của phòng thí nghiệm: i) trong nhiều ngày; ii) với kiểm nghiệm viên khác nhau; iii) với các dụng cụ khác nhau.

- Độ tái lập (reproducibility): biểu thị độ chính xác của

nhiều phòng thí nghiệm tiến hành nghiên cứu trên cùng một mẫu đồng nhất. Tương tự như độ lặp lại với điều kiện: i) phòng thí nghiệm thay đổi; ii) thay đổi phương pháp.

• Độ đúng: chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng μ .

Xác định độ đúng bằng cách: trên 1 mẫu tinh dịch của bệnh nhân đã được xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng bằng kit Halosperm, tiến hành xét nghiệm bằng bộ kit cải tiến lặp lại 10 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, từ đó tính được chuẩn t_m theo công thức sau, rồi so sánh với t_c , với yêu cầu $t_m < t_c$:

$$t_{tn} = \frac{|\mu - \bar{x}|}{\sqrt{\frac{S^2}{n}}}$$

trong đó: t_m : giá trị t thực nghiệm; μ : giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận (tham chiếu); $\bar{x}$: giá trị trung bình của phương pháp thử nghiệm; S^2 : phương sai phương pháp thử nghiệm; n: số lần thí nghiệm; $t_c(\alpha, k)$: giá trị t hằng số của Bảng phân phối chuẩn Student với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ và $k = n-1$.

Đạo đức nghiên cứu

Tất cả những thông tin về bệnh nhân được giữ bí mật và chỉ được phân tích để phục vụ tư vấn sinh sản cho bệnh nhân và cho nghiên cứu này, không sử dụng cho bất kỳ mục đích nào khác.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Trên 1 mẫu tinh dịch đã được xác định DFI bằng kit Halosperm, chúng tôi sử dụng bộ kit cải tiến tiến hành xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng lặp lại 10 lần. Kết quả thu được trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm xác định độ chính xác của bộ kit tự pha.

Lần thí nghiệm	DFI (%)
Lần 1	15,4
Lần 2	15,0
Lần 3	14,4
Lần 4	14,2
Lần 5	15,2
Lần 6	15,2
Lần 7	15,2
Lần 8	15,0
Lần 9	14,6
Lần 10	15,0
Chứng (làm bằng kit Halo)	14,8

Độ chụm

Do phạm vi phòng thí nghiệm nên chúng tôi sẽ tính độ chụm thông qua độ lặp lại. Từ bảng kết quả trên, chúng tôi thu được bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chụm.

Giá trị trung bình DFI (%)	14,92
SD	0,391
CV%	2,62%

Trong các thử nghiệm, đặc biệt là thử nghiệm định lượng, có rất nhiều yếu tố sai số ảnh hưởng tới thử nghiệm, dẫn tới kết quả không chính xác. Do đó, để kiểm soát các yếu tố gây nhiễu này, cần thiết sử dụng khái niệm độ chụm. Độ chụm mô tả kết quả chỉ phụ thuộc vào yếu tố sai số ngẫu nhiên mà không liên quan đến kết quả thực của mẫu. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn, và ngược lại, độ chụm càng lớn thì hệ số biến thiên càng nhỏ [6]. Trong nghiên cứu này, bộ kit cải tiến của chúng tôi có độ lặp lại với hệ số biến thiên CV% = 2,62%. Theo [6], hệ số biến thiên có giá trị không vượt quá 5% nói lên quy trình có độ lặp lại đạt yêu cầu của phép phân tích. Như vậy, khi có tác động của các yếu tố sai số ngẫu nhiên, với cùng một mẫu, mức độ đứt gãy ADN tinh trùng xác định được trong các điều kiện khác nhau có sai số trong khoảng chấp nhận được.

Độ đúng

Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa các giá trị trung bình của kết quả thử nghiệm và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng.

Với thực nghiệm kiểm định độ đúng, chúng tôi tính được $t_m = 0,97$; bên cạnh đó thông qua tra bảng có $t_c = 2,262$ [6]. Như vậy $t_m < t_c$. Điều đó đồng nghĩa với việc chỉ số đứt gãy ADN tinh trùng xác định bằng bộ kit cải tiến có kết quả tương đương với phương pháp sử dụng bộ kit thương mại Halosperm. Quy trình đạt được độ đúng theo yêu cầu của một phép phân tích.

Khảo sát cấu trúc chromatin tinh trùng (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) được coi là một phương pháp tiêu chuẩn vàng để phân tích mức độ đứt gãy ADN tinh trùng. Một so sánh giữa kỹ thuật SCD của bộ kit Halosperm và SCSA đã được thực hiện trên 45 mẫu tinh dịch từ các bệnh nhân khám tại Trung tâm Y tế Sinh sản thuộc Đại học Minnesota (Hoa Kỳ). Các mẫu tinh dịch được xử lý đồng thời cho SCD và SCSA. Mức độ tương đồng giữa hai kỹ thuật là rất cao (hệ số tương quan nội hàm R: 0,85) khi sử dụng hàm Bland - Altman từ phần mềm SPSS để so sánh. Như vậy, bộ kit tự pha của chúng tôi cho kết quả tương đồng với bộ kit Halosperm, điều này cho thấy độ chính xác của bộ kit rất cao.

Tóm lại, bất kỳ kỹ thuật phân tích mức độ đứt gãy ADN

tinh trùng nào trong phòng thí nghiệm lâm sàng và phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản đều phải đơn giản, có thể tái tạo, và tốt nhất là không cần mới, phức tạp, hoặc dụng cụ đắt tiền [7]. Như vậy, các kỹ thuật đánh giá kết quả xét nghiệm mức độ đứt gãy ADN tinh trùng bằng kính hiển vi thông thường nên được áp dụng phổ biến. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, bộ kit xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng có kết quả tương đương với bộ kit Halosperm®, có quy trình kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng, chính xác và có khả năng tái sản xuất cao để phân tích sự đứt gãy ADN của tinh trùng.

Bộ kit này giúp bảo quản tốt hơn chất nhiễm sắc; kích thước quang sáng có thể được ước tính một cách chính xác với kính hiển vi thông thường nhờ sử dụng thuốc nhuộm Giemsa, hoặc xác định chính xác tuyệt đối bằng phần mềm tự động. Không giống như SCSA, bộ kit xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng có thể được sử dụng mà không cần các yêu cầu của dụng cụ phức tạp hoặc đắt tiền.

Kết luận

Bộ xét nghiệm cải tiến có độ chính xác đạt yêu cầu của một bộ xét nghiệm định lượng (với CV% = 2,62% < 5% và $t_m = 0,97 < t_c$).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của đồng nghiệp trong Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Viết Tiến, Ngô Huy Toàn và Bạch Huy Anh (2009), *Nghiên cứu thực trạng vô sinh ở Việt Nam theo các vùng sinh thái*, Đề tài cấp nhà nước, Bệnh viện Phụ sản Trung ương và Trường Đại học Y Hà Nội.
- [2] Trần Thị Trung Chiến, Trần Văn Hanh và Lê Văn Vệ (2009), *Vô sinh nam giới - Bệnh học giới tính nam*, Nhà xuất bản Y học, tr.72-122.
- [3] J. Fernandez, L. Muriel, V. Goyanes, et al. (2003), "Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test", *Fertil. Steril.*, **84**(4), pp.833-842.
- [4] N. Sheikh, I. Amiri, M. Farimani, et al. (2008), "Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men", *International Journal of Reproductive BioMedicine*, **6**(1), pp.13-18.
- [5] S.K. Lwanga and S. Lemeshow (1991), *Sample size determination in health studies, a practical manual*, WHO, Geneva.
- [6] Bộ Khoa học và Công nghệ (2015), *Tiêu chuẩn Việt Nam - TCVN 10863:2015, ISO/TS 22971:2005 về độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo - hướng dẫn sử dụng TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994) trong thiết kế, thực hiện và phân tích thống kê các kết quả độ lặp lại và độ tái lập liên phòng thí nghiệm*.
- [7] De C. Jonge (2002), "The clinical value of sperm nuclear DNA assessment", *Hum. Fertil. (Camb.)*, **5**(2), pp.51-53.

Nghiên cứu tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu cho sản xuất Iodine-125 tại Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt

Đoàn Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thế Nghĩa², Vũ Thanh Quang^{3*}

¹Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài 6/5/2019; ngày chuyển phản biện 9/5/2019; ngày nhận phản biện 12/6/2019; ngày chấp nhận đăng 28/6/2019

Tóm tắt:

Iodine-125 là dược chất quan trọng được sử dụng trong bộ kit chẩn đoán miễn dịch phóng xạ, chụp xạ hình tuyến giáp, điều trị ung thư tuyến tiền liệt và cấy hạt phóng xạ điều trị một số u ác tính và u não. Iodine-125 được sản xuất từ việc chiếu xạ bia khí Xenon bởi dòng neutron nhiệt từ lò phản ứng hạt nhân. Hiện nay, Iodine-125 chưa được sản xuất tại Việt Nam, việc tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu là bước quan trọng đầu tiên để triển khai sản xuất thành công loại dược chất phóng xạ này. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tiến hành lập trình tính toán xác định thời gian chiếu xạ tối ưu trong sản xuất Iodine-125 từ bia Xenon tự nhiên và bia Xenon giàu được chiếu xạ bởi dòng neutron nhiệt của Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt.

Từ khóa: bia khí Xenon, neutron nhiệt, sản xuất Iodine-125, thời gian chiếu xạ.

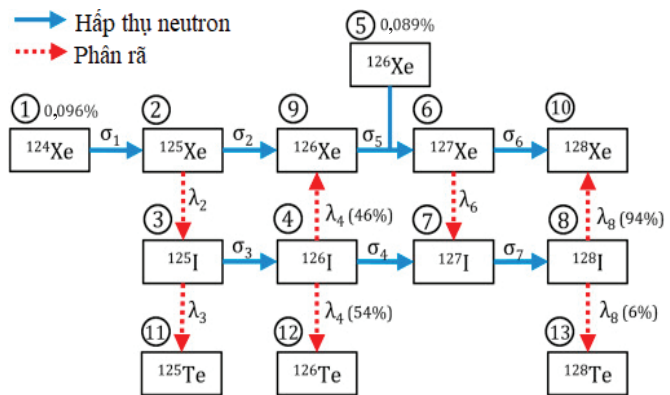
Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Iodine-125 là đồng vị phóng xạ gamma năng lượng thấp với thời gian bán rã 59,4 ngày, rất thuận lợi cho cả chẩn đoán cũng như điều trị. Iodine-125 được sử dụng trong bộ kit chẩn đoán miễn dịch phóng xạ, chụp xạ hình tuyến giáp, trong điều trị ung thư tuyến tiền liệt bằng kỹ thuật cấy hạt phóng xạ và trong xạ trị cấy ghép đối với một số u ác tính và u não [1, 2]. Chiếu xạ bia khí Xenon bởi dòng neutron nhiệt tạo thành Xenon-125 từ phản ứng hạt nhân $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125}\text{Xe}$, $T_{1/2}=16,9$ giờ, Xenon-125 phân rã EC (bắt electron) tạo thành Iodine-125 [3]. Có 2 lựa chọn vật liệu bia là Xenon tự nhiên có hàm lượng 0,096% Xenon-124 hoặc Xenon giàu có hàm lượng >99% Xenon-124 [3]. Lựa chọn thứ nhất cần chế tạo được bia chứa khối lượng lớn khí Xenon tự nhiên. Lựa chọn thứ hai cần có thiết bị chiếu xạ lặp tuần hoàn và hệ thống thu hồi khí Xenon giàu vì giá thành khí này khá đắt. Đối với cách thức chiếu xạ: có 2 lựa chọn là chiếu xạ theo mẻ (Batch process) và chiếu xạ vòng tuần hoàn (Loop process).

Trên thế giới đã có các nghiên cứu của Martinho và cộng sự (1984), Joshi và cộng sự (2012), Hai Quan Ho và cộng

sự (2018) về lập kế hoạch chiếu xạ và tính toán tối ưu cho sản xuất Iodine-125 trong lò phản ứng hạt nhân [4-6]. Các nghiên cứu này sử dụng cùng một sơ đồ tạo thành, phân rã (hình 1) và các hằng số hạt nhân (bảng 1) làm cơ sở để lập trình tính toán sự tích lũy ròng của các nhân phóng xạ Iodine và Xenon trong thời gian chiếu xạ và phân rã. Mã nguồn của chương trình được bảo hộ bản quyền, không công bố mở và vì vậy không thể tự do tiếp cận, sử dụng.



Hình 1. Sơ đồ tạo thành và phân rã của các hạt nhân khi chiếu xạ Xenon tự nhiên [5].

*Tác giả liên hệ: Email: vtquang.vie@gmail.com

Study on calculation of optimal irradiation time for Iodine-125 production at Dalat Nuclear Reactor

Thi Thu Hien Doan¹, The Nghia Nguyen²,
Thanh Quang Vu^{3*}

¹Vietnam Atomic Energy Institute

²University of Science, VNU

³108 Military Central Hospital

Received 6 May 2019; accepted 28 June 2019

Abstract:

Iodine-125 is an important radiopharmaceutical used in radiation immunity diagnostic kits, thyroid radiography, prostate cancer treatment, and brachytherapy to treat some malignant, brain tumors. Iodine-125 is produced from Xenon gas irradiated by thermal neutron in a nuclear reactor. At present, Iodine-125 has not yet been produced in Vietnam. Optimising the irradiation time is the first important step to carry out a successful production. In this work, we have programmed and calculated the optimal irradiation time for production of Iodine-125 from the natural Xenon and the enriched Xenon target irradiated by the thermal neutron of Dalat Nuclear Reactor.

Keywords: Iodine-125 production, irradiation time, thermal neutron, xenon target.

Classification number: 3.2

Bảng 1. Ký hiệu các đồng vị, độ giàu, thời gian bán rã, hằng số phân rã λ , tiết diện phản ứng và tích phân cộng hưởng [5].

Hạt nhân	Số ký hiệu	Độ giàu đồng vị, %	Thời gian bán rã	Hằng số phân rã, λ (s ⁻¹)	Tiết diện phản ứng, σ_0 (bar)	Tích phân cộng hưởng, I (bar)
¹²⁴ Xe	1	Thay đổi	∞	0	128	3600
¹²⁵ Xe	2	-	17 giờ	$1,13 \times 10^{-5}$	5600	0
¹²⁵ I	3	-	60,2 ngày	$1,333 \times 10^{-7}$	894	13730
¹²⁶ I	4	-	13,0 ngày	$6,17 \times 10^{-7}$	5960	40600
¹²⁶ Xe	5,9	0,09	∞	0	4	38
¹²⁷ Xe	6	-	36,41 ngày	$2,203 \times 10^{-7}$	0	0
¹²⁷ I	7	-	∞	0	6,2	147
¹²⁸ I	8	-	24,99 phút	$4,623 \times 10^{-4}$	0	0

Ở Việt Nam, Iodine-125 hiện chưa được sản xuất và phải nhập khẩu từ nước ngoài cho tất cả các nghiên cứu và ứng dụng. Tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu là bước đầu tiên quan trọng để triển khai sản xuất thành công, tránh được những rủi ro bức xạ và tốn kém. Nghiên cứu này đưa ra hệ phương trình mô tả sự tích lũy rỗng của các hạt nhân và lập trình tính toán tối ưu cho sản xuất Iodine-125 từ bia khí Xenon chiếu xạ tại kênh chiếu ướt của Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt, có thông lượng neutron trung bình là 9×10^{12} n/cm²/s và thông lượng tại bể là 2×10^{13} n/cm²/s [7]. Các kết quả tính toán thu được là cơ sở dữ liệu hữu ích cho việc triển khai sản xuất Iodine-125 tại Việt Nam.

Phương pháp tính toán

Từ sơ đồ hình 1, sự tích lũy và phân rã của các hạt nhân trong thời gian chiếu xạ neutron với thông lượng Φ (n/cm²/s) được mô tả bằng hệ phương trình vi phân sau:

$$\begin{aligned}
 \frac{dN_1}{dT} &= -\Phi \sigma_1 N_1 \\
 \frac{dN_2}{dT} &= \Phi \sigma_1 N_1 - (\lambda_2 + \Phi \sigma_2) N_2 \\
 \frac{dN_3}{dT} &= \lambda_2 N_2 - (\lambda_3 + \Phi \sigma_3) N_3 \\
 \frac{dN_4}{dT} &= \Phi \sigma_3 N_3 - (\lambda_4 + \Phi \sigma_4) N_4 \\
 \frac{dN_5}{dT} &= -\Phi \sigma_5 N_5 \\
 \frac{dN_9}{dT} &= \Phi (\sigma_2 N_2 - \sigma_5 N_9) + 0,46 \lambda_4 N_4 \\
 \frac{dN_6}{dT} &= \Phi \sigma_5 (N_5 + N_9) - (\lambda_6 + \Phi \sigma_6) N_6 \\
 \frac{dN_7}{dT} &= \lambda_6 N_6 + \Phi (\sigma_4 N_4 - \sigma_7 N_7) \\
 \frac{dN_8}{dT} &= \Phi \sigma_7 N_7 - \lambda_8 N_8
 \end{aligned}$$

trong đó: N_i là số hạt nhân thứ i ($i=1-9$); σ_i là tiết diện phản ứng đối với hạt nhân i ; λ_i là hằng số phân rã của hạt nhân i .

Sự tích lũy của các đồng vị trong thời gian phân rã

$$N_i = N_i(\text{EOI}) \times \text{EXP}(-\lambda_i T)$$

trong đó: $N_i(\text{EOI})$ là giá trị của N_i tại thời điểm dừng chiếu xạ (End of Irradiation).

Đặc biệt với $i=3$:

$$N_3 = [N_2(\text{EOI}) \times (1 - \text{EXP}(-\lambda_2 T)) + N_3(\text{EOI})] \times \text{EXP}(-\lambda_3 T)$$

và khi $i=7$:

$$N_7 = N_7(\text{EOI}) + N_6(\text{EOI}) \times [1 - \text{EXP}(-\lambda_6 T)]$$

Sơ đồ giải các phương trình vi phân

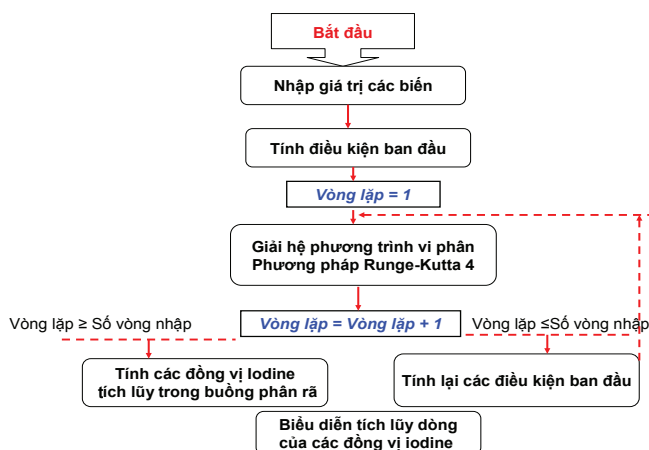
Hệ phương trình vi phân được giải dựa trên phương pháp tích phân số Runge-Kutta bậc 4, chương trình tính toán sử dụng ngôn ngữ lập trình Visual Basic.

Điều kiện đầu: tại thời điểm $t=0$; $N_i(t=0) = W \times \text{abund} \times 6,023 \times 10^{23} / (126)$

$$N_5(t=0) = N_9(0) = W \times 0,09 \times 10^{-2} \times 6,023 \times 10^{23} / (126)$$

$$N_i(t=0) = 0 \quad (i = 2, 3, 4, 6, 7, 8)$$

trong đó: W là khối lượng khí Xenon được chiếu xạ, g; abund là độ giàu của đồng vị trong khí Xenon, %.



Hình 2. Lưu đồ chương trình tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu trong sản xuất đồng vị I-125.

Kết quả và thảo luận

Kiểm chứng kết quả tính toán

Kết quả tính toán đối với 15 g Xenon tự nhiên và 0,4 g Xenon-124 > 99% chiếu xạ bởi dòng neutron nhiệt có thông lượng 5×10^{13} n/cm²/s được lập trình, giải theo lưu đồ thuật toán hình 2 và trình bày trong bảng 2 và bảng 3. Các kết quả nghiên cứu được so sánh với các số liệu công bố của IAEA [3].

Bảng 2. So sánh kết quả tính toán với số liệu của IAEA [3] đối với bia Xenon tự nhiên.

	Kết quả tính toán	IAEA	Kết quả tính toán	IAEA
Thời gian chiếu, giờ	200	200	300	300
Thời gian phân rã, ngày	40	40	45	45
Sản lượng Iodine-125, GBq	29,074	29,15	39,81	40,32
Hàm lượng Iodine-126 sau phân rã, %	0,996	0,77	1,20	0,89
Hoạt độ riêng, GBq/mg	608,70	>600	601,45	>600

Bảng 3. So sánh kết quả tính toán với số liệu của IAEA [3] đối với bia Xenon giàu.

	Kết quả tính toán	IAEA	Kết quả tính toán	IAEA
Thời gian chiếu, giờ	10	10	24	24
Thời gian phân rã, ngày	20	20	20	20
Sản lượng Iodine-125, GBq	53,98	50,71	128,74	121,2
Hàm lượng Iodine-126 sau phân rã, %	0,021	0,02	0,106	0,11
Hoạt độ riêng, GBq/mg	642,25	>600	642,12	>600

Các số liệu trình bày ở bảng 2 và 3 chỉ ra sự tương đồng tốt giữa số liệu của nghiên cứu này và của IAEA. Điều đó chứng tỏ phương pháp tích phân số Runge-Kutta bậc 4 được sử dụng trong nghiên cứu này là đủ chính xác và đáng tin cậy. Sự sai khác không đáng kể giữa 2 bộ số liệu trên có thể là do sự khác nhau về phương pháp tính và về dữ liệu hạt nhân như tiết diện phản ứng (σ); hằng số phân rã (λ); chỉ số neutron trên nhiệt và tích phân cộng hưởng. Trong nghiên cứu này sử dụng số liệu của các hằng số được công bố trong các nghiên cứu trước [4-6].

Xác định thời gian chiếu xạ tối ưu trong sản xuất Iodine-125

Iodine-125 sinh ra từ phân rã của Xenon-125. Sau khi tạo thành Iodine-125 phân rã thành Tellurium-125 bền và bắt neutron với tiết diện phản ứng 894 bar [4] tạo thành Iodine-126. Iodine-126 tiếp tục sinh ra Iodine-127 bền và Iodine-128 phóng xạ. Sự có mặt của Iodine-126 và Iodine-128 được xem là làm nhiễm bẩn sản phẩm Iodine-125 vì chúng gây ra các bức xạ có hại khi sử dụng trong y tế [3]. Để giảm thiểu sự nhiễm bẩn của Iodine-126 và Iodine-128 thì thời gian chiếu xạ và thời gian phân rã cần được tính tối ưu. Vì thời gian bán rã của Iodine-128 chỉ là 25 phút, ngắn hơn rất nhiều so với 13 ngày của Iodine-126 [3], nên sự nhiễm bẩn của Iodine-128 là rất nhỏ. Thời gian chiếu xạ được xem là tối ưu khi đạt hoạt độ cao nhất của Iodine-125 và tỷ lệ tạp nhân $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$. Sản xuất Iodine-125 được xem là tối ưu khi đạt công suất lớn nhất trong 1 năm và sản phẩm có chất lượng thỏa mãn điều kiện tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$ [6].

Trường hợp 1- bia Xenon tự nhiên chiếu xạ tại kênh chiếu ướt, $\Phi=9 \times 10^{12}$ n/cm²/s:

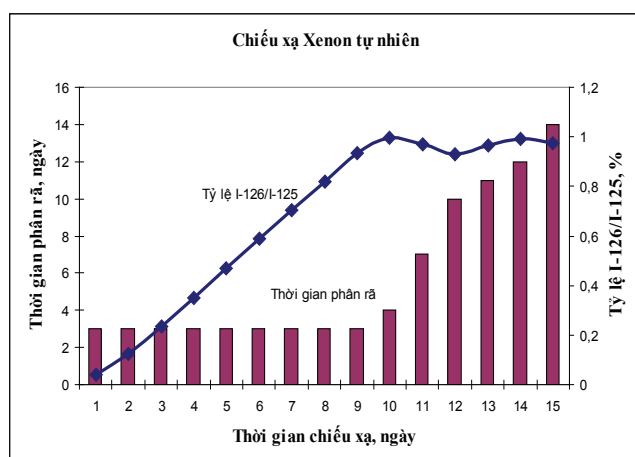
Nạp 50 g Xenon tự nhiên vào bia, chiếu bia trong kênh chiếu ướt của Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt có thông lượng neutron là 9×10^{12} n/cm²/s. Thời gian chiếu xạ là 15 ngày. Sau đó, bia được chuyển vào hotcell chờ phân rã. Cần xác định thời gian phân rã cực tiểu để hoạt độ Iodine-125 đạt cực đại và tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$.

Các kết quả tính toán theo lưu đồ thuật toán hình 2 cho trường hợp n=1 được trình bày ở bảng 4, chỉ ra rằng: với thời gian chiếu xạ như nhau, thời gian phân rã càng tăng thì hoạt độ Iodine-125 càng giảm, hàm lượng tạp chất càng giảm. Thời gian phân rã ít nhất là 14 ngày để hàm lượng tạp chất giảm $< 1\%$. Vì vậy, thời gian sản xuất tối ưu là 29 ngày/mẻ.

Giả sử Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt vận hành 120 ngày trong 1 năm cho sản xuất thì số mẻ tối đa là 4 và công suất tối đa là 160 GBq Iodine-125/năm. Tính toán tương tự cho thời gian chiếu xạ khác nhau. Kết quả của những tính toán này được trình bày trong hình 3 và hình 4.

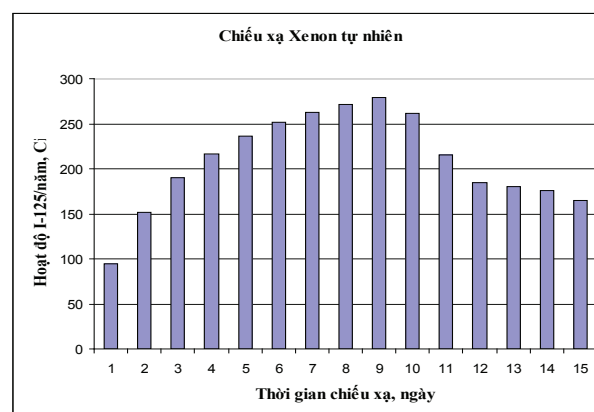
Bảng 4. Thời gian sản xuất tối ưu của một mẻ chiếu xạ 15 ngày.

TT	Thời gian chiếu xạ, ngày	Hoạt độ Iodine-125, GBq	Tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I}$, %	Thời gian phân rã, ngày	Thời gian sản xuất, ngày
1	15	44,88	1,547	3	18
2	15	43,51	1,36	6	21
3	15	42,06	1,199	9	24
4	15	40,64	1,058	12	27
5	15	40,17	1,014	13	28
6	15	39,71	0,973	14	29
7	15	39,26	0,933	15	30
8	15	38,81	0,895	16	31



Hình 3. Sự phụ thuộc của tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$ vào thời gian chiếu xạ và thời gian phân rã (đồ thị dạng đường). Sự phụ thuộc của thời gian phân rã để $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$ vào thời gian chiếu xạ (đồ thị dạng cột); 50 g Xenon tự nhiên, $\Phi=9 \times 10^{12}$ n/cm²/s.

Số liệu trên hình 3 chỉ ra rằng, với thời gian chiếu xạ từ 1 đến 9 ngày thì thời gian phân rã cực tiểu là 3 ngày để giữ tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$. Khi thời gian chiếu xạ tăng từ 10 đến 15 ngày thì thời gian phân rã tăng nhanh từ 4 đến 14 ngày, thời gian sản xuất 1 mẻ tương ứng tăng từ 14 đến 29 ngày. Vì vậy, số mẻ sản xuất trong 1 năm giảm từ 8 mẻ xuống còn 4 mẻ. Kết quả là sản lượng cả năm cũng giảm nhanh.



Hình 4. Sự phụ thuộc của sản lượng Iodine-125/năm vào thời gian chiếu xạ (50 g Xenon tự nhiên, 9×10^{12} n/cm²/s, thời gian sản xuất 120 ngày).

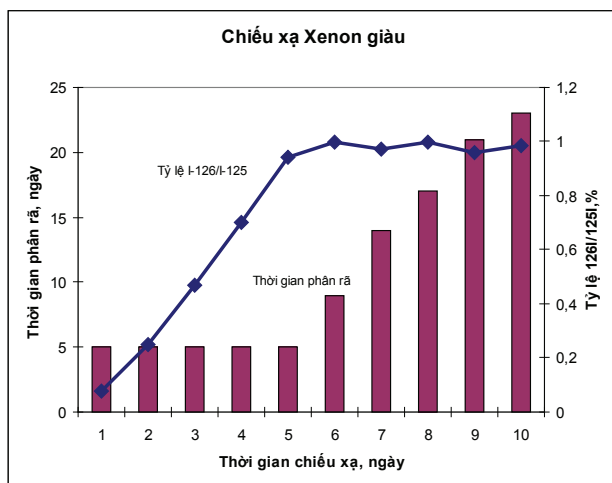
Hình 4 biểu diễn sản lượng Iodine-125 cực đại có thể sản xuất trong 1 năm. Như vậy, thời gian chiếu xạ tối ưu cho sản xuất Iodine-125 dùng bia khí Xenon tự nhiên chiếu xạ tại kênh ướt lò Đà Lạt là 9 ngày; thời gian phân rã sau chiếu xạ là 3 ngày. Nếu khối lượng Xenon tự nhiên/mẻ chiếu xạ là 50 g thì sản lượng cực đại là 278,5 GBq/năm.

Trường hợp 2 - bia Xenon giàu chiếu xạ tại hốc bể neutron, $\Phi=2 \times 10^{13}$ n/cm²/s:

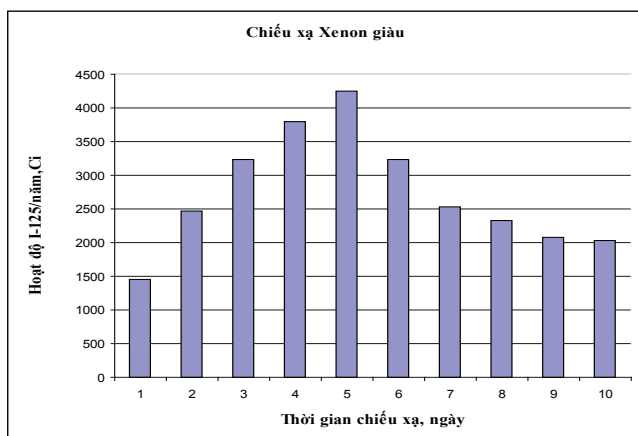
Bể neutron của Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt có thông lượng lớn nhất là khoảng 2×10^{13} n/cm²/s, có thể được sử dụng làm hốc chiếu mẫu. Chiếu xạ Xenon giàu thường được thực hiện ở hốc chiếu có thông lượng neutron lớn nhất để có được sản lượng Iodine-125 cao nhất và thời gian chiếu ngắn nhất nhằm giảm thiểu sự cháy của Xenon-125 và Iodine-125 tạo ra các tạp chất Iodine-126 và Iodine-128. Xác định thời gian chiếu xạ tối ưu đối với bia Xenon giàu được tiến hành tương tự như đối với bia Xenon tự nhiên.

Giả sử nạp 0,5 g Xenon độ giàu đồng vị $> 99\%$ vào bia và chiếu xạ bia trong hốc chiếu mẫu có 2×10^{13} n/cm²/s. Thời gian chiếu xạ thay đổi từ 1 đến 10 ngày. Thời gian chờ phân rã tối thiểu là 5 ngày để đảm bảo $> 99\%$ Xenon-125 phân rã thành Iodine-125. Thời gian sản xuất là 120 ngày/năm. Kết quả tính toán được thể hiện trên hình 5 và hình 6 cho thấy rằng: thời gian chiếu xạ tăng từ 1 đến 5 ngày, thời gian phân rã 5 ngày, cho sản lượng Iodine-125 tăng nhanh trong khi chất lượng luôn thỏa mãn yêu cầu $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$. Khi thời gian chiếu xạ tăng từ 6 đến 10 ngày thì thời gian phân rã phải tăng nhanh

để đảm bảo chỉ tiêu chất lượng. Vì vậy, thời gian sản xuất 1 mẻ tăng nhanh, số mẻ sản xuất/năm giảm mạnh làm cho sản lượng Iodine-125 liên tục giảm. Cực đại về sản lượng/năm ứng với trường hợp chiếu xạ 5 ngày, chờ phân rã 5 ngày. Thời gian sản xuất tối ưu cho 1 mẻ là 10 ngày. Như vậy sẽ thực hiện được 12 mẻ, thu được 4250 GBq Iodine-125/năm.



Hình 5. Sự phụ thuộc của tỷ lệ $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$ vào thời gian chiếu xạ và thời gian phân rã (đồ thị dạng đường). Sự phụ thuộc của thời gian phân rã để $^{126}\text{I}/^{125}\text{I} < 1\%$ vào thời gian chiếu xạ (đồ thị dạng cột).



Hình 6. Sự phụ thuộc của sản lượng Iodine-125/năm vào thời gian chiếu xạ (0,5 g Xenon giàu >99%, $\Phi = 2 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2/\text{s}$, thời gian sản xuất 120 ngày/năm).

Kết luận

Sự tương đồng của kết quả tính toán về sự tạo thành và phân rã của Iodine-125 với các số liệu đã công bố của IAEA [3] là minh chứng cho mức độ chính xác cao và đáng tin cậy của các số liệu trình bày trong nghiên cứu này. Kết quả tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu cho sản xuất Iodine-125 theo từng mẻ tại kênh chiếu ướt và hốc chiếu tại bể neutron của

Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt như sau:

- Sử dụng bia Xenon tự nhiên chiếu xạ tại kênh chiếu ướt: thời gian chiếu xạ tối ưu là 9 ngày, thời gian chờ phân rã là 3 ngày. Tổng thời gian sản xuất tối ưu cho 1 mẻ là 12 ngày. Sản lượng cực đại tính cho 120 ngày/năm đối với bia chứa 50 g Xenon tự nhiên là 278,5 GBq Iodine-125.

- Sử dụng bia Xenon giàu >99% Xenon-124 chiếu xạ tại hốc bể neutron: thời gian chiếu xạ tối ưu là 5 ngày, thời gian chờ phân rã là 5 ngày. Tổng thời gian sản xuất tối ưu cho 1 mẻ là 10 ngày. Sản lượng cực đại tính cho 120 ngày/năm đối với bia chứa 0,5 g Xenon giàu >99% Xenon-124 là 4250 GBq Iodine-125.

Trong thực tế, sản lượng Iodine-125 của 1 mẻ cũng như của cả năm sẽ ít hơn số liệu tính toán lý thuyết nêu trên vì các nguyên nhân như sự tự che chắn của hệ thống gá bia làm thay đổi thông lượng neutron ở các hốc chiếu, sự ảnh hưởng của chỉ số neutron trên nhiệt và tích phân cộng hưởng làm thay đổi tiết diện phản ứng và hiệu suất thu hồi của các bước xử lý hóa học mẫu đã chiếu xạ. Tuy nhiên, những số liệu tính toán nêu trên là đủ tin cậy và rất cần thiết cho việc dự báo, định hướng triển khai trong thực tế để đạt được hiệu quả sản xuất tốt nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin bày tỏ sự cảm ơn chân thành tới Ban Chủ nhiệm Chương trình KC05/16-20 và sự cảm ơn đặc biệt tới Chủ nhiệm Đề tài KC05.11/16-20 đã trợ giúp rất hiệu quả để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] John Metyko, William Erwin, Sheldon Landsberger (2016), "Verification of I-125 brachytherapy source strength for use in radioactive seed localization procedures", *Appl. Radiat. Isot.*, **112**, pp.62-68.
- [2] Wang Zhongmin, Chen Kemin (2011), "Clinical application of Image guided Iodine-125 seed implantation therapy in patients with advanced pancreatic cancer", *Reference*, **2**, pp.109-128.
- [3] IAEA TECDOC-1230 (2003), *Manual for Reactor Produced Radioisotopes*.
- [4] Eduardo Martinho, M. Anjos Neves and M. Carno Freitas (1984), " ^{125}I Production: Neutron Irradiation Planning", *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **35**(10), pp.933-938.
- [5] P.V. Joshi, et al. (2012), "Production of ^{125}I from neutron irradiation of natural Xe gas and a wet distillation process for radiopharmaceutical applications", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51**, pp.8575-8582.
- [6] Hai Quan Ho, Yuki Honda, Shimpei Hamamoto, Toshiaki Ishii, Nozomu Fujimoto, Etsuo Ishitsuka (2018), "Feasibility study of large-scale production of iodine-125 at the high temperature engineering test reactor", *Applied Radiation and Isotopes*, **140**, pp.209-214.
- [7] Nguyễn Duy Sang (2012), "Tính toán thông lượng neutron trong Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt với cấu hình nhiên liệu mới sử dụng chương trình mô phỏng Monte Carlo Code MCNP4C2", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **24b**, tr.123-130.

Dược động học - dược lực học của Rifampicin trong điều trị bệnh nhân lao phổi

Lê Thị Luyên^{1*}, Bùi Sơn Nhật¹, Vũ Đình Hòa², Nguyễn Thị Vân Anh³, Nguyễn Kim Cương⁴, Nguyễn Văn Hưng⁴

¹Khoa Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

⁴Bệnh viện Phổi Trung ương

Ngày nhận bài 12/7/2019; ngày chuyển phản biện 15/7/2019; ngày nhận phản biện 20/8/2019; ngày chấp nhận đăng 27/8/2019

Tóm tắt:

Mục tiêu: Rifampicin có vai trò chính trong diệt khuẩn và ngăn ngừa tái phát. Nghiên cứu này nhằm xác định các đặc điểm dược động học (PK) và dược lực học (PD) của Rifampicin ở bệnh nhân lao phổi không đa kháng thuốc và tỷ lệ bệnh nhân đạt đích AUC/MIC. **Phương pháp:** mẫu máu tĩnh mạch ở những thời điểm xác định kể từ sau khi uống Rifampicin được lấy ở 135 bệnh nhân lao phổi mới hoặc tái trị, không đa kháng thuốc, được điều trị bằng thuốc chống lao hàng một vào ngày 10-14 sau khi bắt đầu điều trị để định lượng nồng độ thuốc trong huyết tương bằng HPLC-MS/MS. Đồng thời, mẫu đờm của bệnh nhân trước thời điểm điều trị được thu thập để phân lập chủng *M. tuberculosis* gây bệnh nhằm xác định giá trị MIC với Rifampicin. Mô hình dược động học quần thể được xử lý trên phần mềm Monolix 2018; thông số AUC được tính trên gói phần mềm Simulx thuộc R. MIC được xác định bằng phương pháp vi phiên tỷ lệ, sử dụng môi trường M7H11. Tỷ lệ AUC/MIC của mỗi cá thể được so với giá trị đích AUC/MIC > 271. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mô hình dược động học quần thể của Rifampicin xây dựng được là mô hình một ngăn, giá trị AUC trung bình và trung vị là 50,565 và 45,99 mg.h/l dựa trên nồng độ Rifampicin đo được. MIC của Rifampicin xác định được ở 123 bệnh nhân hầu hết trong khoảng 0,25-1 µg/ml. Chỉ có 16/123 bệnh nhân đạt đích PK/PD với AUC/MIC > 271, tỷ lệ đạt đích rất thấp ở MIC > 0,25 µg/ml; khi MIC ≥ 1 µg/ml 0% đạt đích PK/PD. **Kết luận:** đặc điểm PK và PD của Rifampicin có sự biến thiên lớn giữa các cá thể. Có một tỷ lệ lớn không đạt chỉ số đích PK/PD tối ưu. Do đó cần có hiệu chỉnh liều Rifampicin hiện tại để nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân.

Từ khóa: bệnh lao, dược động học, dược lực học, MIC, Rifampicin.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Bệnh lao là nguyên nhân gây tử vong phổ biến trên thế giới, mặc dù tử vong do lao có thể tránh khỏi nếu được chẩn đoán sớm và điều trị phù hợp. Hiện nay, trên toàn cầu, công tác phòng chống bệnh lao vẫn còn nhiều thách thức, như sự khác biệt giữa các quốc gia trong kinh phí đầu tư; chậm phát triển các phương pháp chẩn đoán, điều trị, phòng ngừa mới [1] và sự gia tăng tình trạng vi khuẩn kháng thuốc. Chiến lược điều trị bệnh lao áp dụng phác đồ phối hợp nhiều thuốc đồng thời trong một thời gian hợp lý để đảm bảo khỏi bệnh và tránh tình trạng kháng thuốc. Tuy vậy, phác đồ điều trị thường quy chủ yếu dựa vào kinh nghiệm lâm sàng, trong khi hiệu quả còn chưa cao như mong đợi, độc tính của thuốc cao, thời gian điều trị kéo dài và chi phí cao [2]. Bên cạnh tăng cường nghiên cứu phát triển thuốc mới, nhu cầu trong điều trị lao đặt ra hiện nay là cần tối ưu hoá hiệu quả điều trị với các thuốc chống lao hiện có [3].

Rifampicin là một thuốc quan trọng trong các phác đồ điều trị lao. Đặc điểm của Rifampicin là sự biến thiên rất lớn về các thông số dược động học giữa các cá thể [4-6], mặt khác các chủng vi khuẩn lao gây bệnh có tính đáp ứng khác nhau giữa các bệnh nhân, vì vậy, nghiên cứu đặc điểm dược động học - dược lực học (PK/PD modeling) của Rifampicin ở bệnh nhân là cơ sở để dự kiến liều điều trị tối ưu.

Tại Việt Nam cho đến nay, các dữ liệu nghiên cứu về dược động học cũng như dược lực học của Rifampicin còn rất hạn chế, và đặc biệt chưa có nghiên cứu dược động học quần thể, cũng như chưa có phân tích dược động học - dược lực học của Rifampicin trên bệnh nhân lao. Do đó, chúng tôi thực hiện phân tích đặc điểm dược động học - dược lực học của Rifampicin ở bệnh nhân lao phổi với mục tiêu: xác định đặc điểm dược động học - dược lực học của Rifampicin và khảo sát tỷ lệ đạt đích dược động học - dược lực học trong quần thể bệnh nhân lao phổi.

*Tác giả liên hệ: Email: luyenle66@gmail.com

Pharmacokinetic - pharmacodynamic properties of Rifampicin in pulmonary tuberculosis patients

Thi Luyen Le^{1*}, Son Nhat Bui¹,
Dinh Hoa Vu², Thi Van Anh Nguyen³,
Kim Cuong Nguyen⁴, Van Hung Nguyen⁴

¹School of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University

²Hanoi University of Pharmacy

³National Institute of Hygiene and Epidemiology

⁴National Lung Hospital

Received 12 July 2019; accepted 27 August 2019

Abstract:

Objectives: Rifampicin is a key drug to kill *M. tuberculosis* and prevent recurrence in tuberculosis management. This research aims to determine pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) properties of Rifampicin in non-multidrug-resistant tuberculosis (non-MDRTB) patients and the proportion of patients who achieve the proposed target of AUC/MIC.

Methods: venous blood samples were collected at certain time points of 135 new cases or retreatment non-MDRTB patients to measure the concentration of Rifampicin in plasma by HPLC-MS/MS. In addition, patients' sputum samples were collected to isolate *M. tuberculosis* strains for the determination of MIC to Rifampicin. Population pharmacokinetic model and estimated individual parameter values were built by Monolix2018R1 and the R package Simulx. The MIC was determined by proportional 48-well microplate in Middlebrook 7H11. Finally, individual AUC/MIC were compared with the target of AUC/MIC>271.

Results and conclusions: one-compartment population PK model characterised by transit compartment absorption was built. The mean and median AUC values of population were 50.565 and 45.99 mg.h/l, respectively. The MIC values of 123 patients were almost in range of 0.25-1 µg/ml. Only 16/123 patients achieved the proposed target of AUC/MIC>271; the ratio lowered significantly in patients with MIC over 0.25 µg/ml and dropped to 0% in those with MIC of 1 µg/ml and higher. PK and PD properties of Rifampicin showed large variability between patients; however, the exposure can be deemed as suboptimal, thus leading the need to adjust dose and regimen of Rifampicin in pulmonary tuberculosis treatment.

Keywords: MIC, pharmacodynamic, pharmacokinetic, Rifampicin, tuberculosis.

Classification number: 3.4

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 135 bệnh nhân lao phổi mới hoặc tái trị được điều trị bằng phác đồ có Rifampicin và các thuốc chống lao hàng một khác. Bệnh nhân được thu dung tại ba địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Phổi Hà Nội, Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện 74 Trung ương trong thời gian 2017-2018.

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân từ 16 tuổi trở lên, chẩn đoán lao phổi AFB (+) mới hoặc tái trị; không mắc lao đa kháng (MDR-TB), xác định bằng kết quả GenXpertMTB+/RIF-); được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng một theo hướng dẫn của Chương trình chống lao quốc gia.

Tiêu chuẩn loại trừ: phụ nữ có thai và cho con bú; không xác định được các thông số được lực học; bệnh nhân suy gan, suy thận nặng, thiếu máu nặng (Hb<6 g/dl); tình trạng lâm sàng quá trầm trọng có nguy cơ tử vong; ngừng điều trị do tác dụng không mong muốn; không tuân thủ điều trị; kết quả kháng sinh đồ thuốc chống lao hàng một cho thấy kháng Rifampicin và Isoniazid.

Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học: nghiên cứu được triển khai sau khi được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Khoa Y dược - Đại học Quốc gia Hà Nội xét duyệt hồ sơ và chấp thuận. Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học nêu trên có mã số hoạt động IRB-VN01016 (do Bộ Y tế cấp) và IRB0001047 School of Medicine and Pharmacy VNU (do HHS-OHRP Hoa Kỳ cấp). Bệnh nhân tuyển chọn vào nghiên cứu đều được thực hiện đầy đủ quy trình lấy chấp thuận tham gia nghiên cứu và ký bản chấp thuận tham gia nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập thông tin lâm sàng từ bệnh nhân điều trị: bệnh nhân được ghi nhận các thông tin lâm sàng bao gồm: tuổi, giới tính, chiều cao, cân nặng, thể lao, các chỉ số sinh hóa (AST, ALT), tình trạng bệnh mắc kèm (HIV, tiểu đường) và loại thuốc chống lao đang sử dụng.

Thu thập mẫu máu và phân tích được động học: mẫu máu tĩnh mạch được lấy vào ngày điều trị thứ 10-14. Bệnh nhân được uống thuốc vào buổi sáng như điều trị thường quy sau khi ăn sáng 2h trước sự chứng kiến của nghiên cứu viên lấy mẫu máu. Thời điểm lấy mẫu được phân bố dưới 2 nhóm theo 2 chế độ khác nhau: (1) trước khi dùng thuốc và 1, 4, 6 h sau dùng thuốc; và (2) trước khi dùng thuốc và 2, 5, 8 h sau khi dùng thuốc (mỗi mẫu 3 ml máu). Thời điểm lấy mẫu trước khi dùng thuốc (0 h) trùng với thời điểm uống thuốc của ngày trước đó để đảm bảo thời điểm 0 h trùng với thời điểm 24 h sau khi uống thuốc của 1 ngày trước lấy mẫu. Mẫu máu được bảo quản lạnh ngay sau khi lấy và ly tâm trong vòng 15 phút sau khi lấy để tách huyết tương. Các

mẫu huyết tương được dán nhãn có mã số theo từng bệnh nhân và được bảo quản trong tủ lạnh sâu -70°C. Thời điểm uống thuốc của ngày lấy mẫu máu và ngày trước lấy mẫu được ghi nhận chính xác thời gian thực vào phiếu thông tin lấy mẫu được động học. Nồng độ thuốc trong huyết tương được định lượng tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương bằng kỹ thuật LC-MS/MS, phương pháp định lượng đã được chúng tôi xây dựng và thẩm định các tiêu chuẩn theo quy định của FDA [7].

Thu thập mẫu đờm và phân tích dược lực học: mẫu đờm ở thời điểm trước điều trị của từng bệnh nhân được thu thập (theo quy trình hướng dẫn của Chương trình chống lao quốc gia) để nuôi cấy vi khuẩn lao bằng MGIT tại các khoa vi sinh của từng bệnh viện, các mẫu có kết quả dương tính được chuyển về Bệnh viện Phổi Trung ương để định danh, phân lập vi khuẩn *M. tuberculosis* và làm kháng sinh đồ (tại Labo vi khuẩn lao chuẩn quốc gia - Bệnh viện Phổi Trung ương). Các chủng *M. tuberculosis* phân lập được của từng bệnh nhân được chuyển về Labo vi khuẩn lao của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của Rifampicin với *M. tuberculosis*. Giá trị MIC Rifampicin trong khoảng nồng độ từ 0,03125-32 µg/ml xác định bằng kỹ thuật vi phiên tỷ lệ 46 giếng trong môi trường M7H11.

Xây dựng mô hình dược động học quần thể của Rifampicin: trên cơ sở dữ liệu nồng độ Rifampicin trong huyết tương của các bệnh nhân ở các thời điểm sau uống thuốc, mô hình dược động học quần thể được xây dựng dựa trên mô hình ảnh hưởng hỗn hợp phi tuyến (*non-linear mixed effect model*) bằng phần mềm Monolix 2018R1; giá trị AUC được tính bằng phần mềm R đi kèm với Monolix là Simulx.

Bên cạnh việc xây dựng mô hình dược động học, một số yếu tố dự đoán đối với các tham số dược động học được đưa vào khảo sát ảnh hưởng, bao gồm: tuổi, giới tính, cân nặng, cân nặng trừ mỡ (Fat-free mass - FFM), thể lao (mới hoặc tái trị), tình trạng nhiễm HIV, tình trạng mắc tiểu đường, loại thuốc sử dụng. Yếu tố FFM ảnh hưởng tới thể tích và độ thanh thải được đưa vào mô hình, theo lý thuyết về “allometric scaling” của Anderson và Holford [8]. Tóm tắt kết quả mô hình dược động học quần thể của Rifampicin xây dựng được như sau:

Mô hình dược động học quần thể phù hợp nhất với dữ liệu nồng độ - thời gian là mô hình một ngăn. Các tham số dược động học tuân theo phân phối log chuẩn; mô hình sai số phù hợp nhất là mô hình sai số tỷ lệ. Ảnh hưởng của FFM đối với tham số thể tích (V) và độ thanh thải (Cl) thể hiện thông qua phương trình:

$$\begin{aligned}\text{Log } V &= \text{Log } V_{\text{pop}} + \beta_{-V_t\text{FFM}} \cdot \log\left(\frac{\text{FFM}}{41,10}\right) + \eta_V \\ \text{Log } Cl &= \text{Log } Cl_{\text{pop}} + \beta_{-Cl_t\text{FFM}} \cdot \log\left(\frac{\text{FFM}}{41,10}\right) + \eta_{Cl}\end{aligned}$$

trong đó: giá trị $\beta_{-V_t\text{FFM}}$ và $\beta_{-Cl_t\text{FFM}}$ được cố định lần lượt ở mức 1 và 0,75 theo lý thuyết của Anderson và Holford. V_{pop} và Cl_{pop} là thông số thể tích phân bố và độ thanh thải đại diện cho cá thể có FFM = 41,10 kg trong quần thể. Trong nghiên cứu này, $V_{\text{pop}} = 31,1$ l và $Cl_{\text{pop}} = 10,1$ l/h. η_V là hệ số dao động của thể tích phân bố cá thể so với thông số quần thể; η_{Cl} là hệ số dao động của độ thanh thải thuốc cá thể so với thông số quần thể.

Phân tích tỷ lệ đạt đích dược động học - dược lực học của Rifampicin ở quần thể bệnh nhân: trên cơ sở dữ liệu dược động học và dược lực học, giá trị AUC và MIC của từng bệnh nhân được đưa vào để tính tỷ lệ phần trăm số bệnh nhân đạt mục tiêu đích dược động học - dược lực học là AUC/MIC >271 [9].

Kết quả nghiên cứu

Đặc điểm mẫu nghiên cứu

Đặc điểm của 135 bệnh nhân nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm mẫu nghiên cứu.

Đặc điểm		Số bệnh nhân (%)
Giới tính	Nam	99 (73,3%)
	Nữ	36 (26,7%)
Tuổi ^a		46 [33-58]; 16-93
Cân nặng ^a		49 [44-55]; 32-73
BMI ^a		18,68 [16,81-20,34]; 10,82-24,30
FFM ^a		41,10 [35,03-46,17]; 25,30-57,21
Thể lao	Lao mới	80 (59,3%)
	Lao tái trị	55 (40,7%)
Bệnh mắc kèm	HIV(+)	1 (0,7%)
	Tiểu đường	16 (11,9%)
Loại thuốc sử dụng	3FDC(RMP150+INH75+PZA400 mg)	110 (81,5%)
	2FDC (RMP150+INH 100 mg)	24 (17,8%)
	Viên đơn hoạt chất (RMP 150 mg)	1 (0,7%)
Chế độ liều RMP mg/ngày	300 mg	9 (6,7%)
	450 mg	90 (66,7%)
	525 mg	1 (0,7%)
	600 mg	34 (25,2%)
	750 mg	1 (0,7%)
Trung bình liều theo cân nặng (mg/kg) ^b		9,69±0,92; 7,89-11,54

^a: biến liên tục trình bày dưới dạng: trung vị [khoảng tứ phân vị]; giá trị nhỏ nhất - giá trị lớn nhất; ^b: biến liên tục trình bày dưới dạng: giá trị trung bình+độ lệch chuẩn; giá trị nhỏ nhất - giá trị lớn nhất.

Trong số 135 bệnh nhân, nam chiếm 73,3%; độ tuổi trung vị 46 tuổi (độ tuổi nhỏ nhất là 16 và lớn nhất là 93). Đa số bệnh nhân uống Rifampicin liều 450 mg (90/135 bệnh nhân); mức liều tối đa ghi nhận được là 750 mg (1 bệnh nhân). Mức liều trung bình theo cân nặng là 9,69 mg/kg (liều thấp nhất 7,89 và cao nhất 11,54 mg/kg).

Đặc điểm dược động học quần thể của bệnh nhân lao

Trên cơ sở mô hình dược động học quần thể xây dựng được từ nồng độ Rifampicin đo được của từng cá thể tại các thời điểm khác nhau, các thông số PK của quần thể được tính toán. AUC là thông số PK được phân tích trong nghiên cứu này (bảng 2).

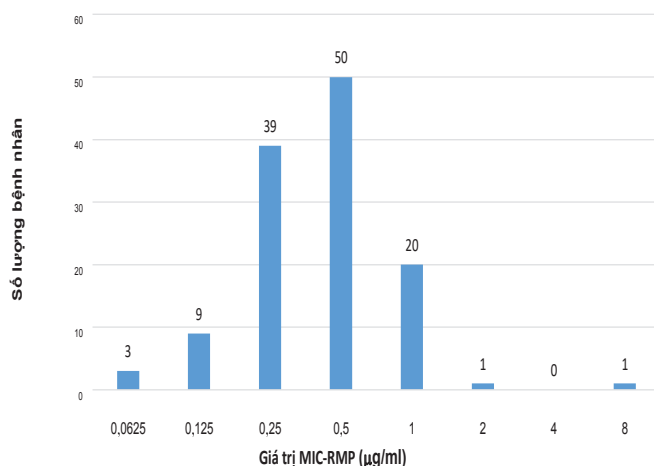
Bảng 2. AUC của quần thể bệnh nhân và các nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu.

Phân nhóm	Trung bình AUC [95% CI] (mg.h/l)	Trung vị (mg.h/l)	p-value
Tổng (n=135)	50,56 [46,12-55,00]	45,99	
Giới tính			
Nam (n=99)	48,62 [43,33-53,91]	44,69	0,064
Nữ (n=36)	55,91 [47,68-64,15]	48,03	
Khoảng cân nặng			
25-39 kg (n=10)	46,39 [29,09-63,69]	41,16	0,091
40-54 kg (n=88)	46,40 [43,03-49,78]	43,98	
55-70 kg (n=36)	61,46 [47,73-75,18]	51,51	
>70 kg (n=1)	66,32**		
FFM			
<42,2 (n=68)	51,99 [47,01-56,97]	47,13	0,059
>42,2 (n=67)	49,12 [41,61-56,63]	42,96	
Thể lao			
Lao mới (n=80)	50,23 [43,88-56,63]	44,95	0,395
Lao tái trị (n=55)	51,01 [45,04-56,98]	46,31	
Bệnh tiểu đường			
Mắc tiểu đường (n=16)	42,90 [33,94-51,85]	42,26	0,244
Không tiểu đường (n=119)	51,59 [46,70-56,49]	46,14	
Loại thuốc có			
3FDC (n=96)	49,69 [44,61-54,77]	44,85	0,133
Rifampicin sử dụng	2FDC (n=23)	51,63 [44,10-59,16]	
Viên đơn hoạt chất (n=1)	121,25**	47,86	

Note: p-value được kiểm định Mann-Whitney và kiểm định Kruskal-Wallis; **: giá trị của một cá thể (phân nhóm chỉ có 1 cá thể).

Đặc điểm dược lực học của *M. tuberculosis* đối với Rifampicin ở bệnh nhân lao

MIC đối với Rifampicin của từng chủng *M. tuberculosis* phân lập được từ đờm của mỗi bệnh nhân trước điều trị là thông số dược lực học được phân tích trong nghiên cứu dược động học - dược lực học. Trong số 135 bệnh nhân lao, dữ liệu MIC thu được của 123 bệnh nhân. Phân bố MIC của các chủng *M. tuberculosis* thể hiện ở hình 1.

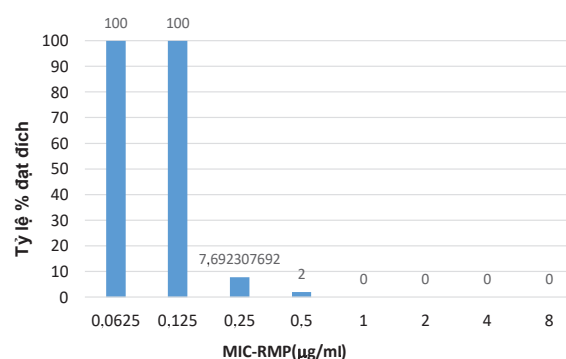


Hình 1. Phân bố MIC của các chủng *M. tuberculosis* phân lập từ mẫu đờm.

Hầu hết chủng *M. tuberculosis* phân lập từ mẫu đờm của bệnh nhân có MIC đối với Rifampicin ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$; trong đó, phần lớn MIC là 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (50/123 chủng) và 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (39/123 chủng). Mặc dù đã loại trừ những trường hợp kháng Rifampicin bằng GenXpertMTB/RIF và kháng sinh đồ nhưng 2 bệnh nhân có chủng *M. tuberculosis* MIC Rifampicin > 1 .

Tỷ lệ đạt đích dược động học/dược lực học

Mục tiêu của chỉ số PK/PD là đạt đích AUC/MIC > 271 . Phân bố tỷ lệ đạt đích như trong hình 2.



Hình 2. Tỷ lệ bệnh nhân đạt đích PK/PD (AUC/MIC > 271) đối với mỗi nhóm giá trị MIC.

Tỷ lệ đạt đích AUC/MIC > 271 đối với nhóm bệnh nhân có MIC 0,0625 và 0,125 $\mu\text{g/ml}$ là 100%. Tuy nhiên, tỷ lệ này hạ xuống còn rất thấp kể từ mức MIC 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (7,69%) và có xu hướng giảm dần. Khi MIC ≥ 1 , tỷ lệ đạt đích là 0%.

Bàn luận

Mô hình một ngăn là mô hình mô tả tốt nhất dữ liệu nồng độ thuốc - thời gian thu được trên bệnh nhân nghiên cứu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác về dược động học quần thể của Rifampicin ở bệnh nhân lao phổi trên thế giới. Mô hình hấp thu ngăn chuyển tiếp mô phỏng quá trình hấp thu từ điểm hấp thu vào ngăn trung tâm thông qua nhiều ngăn chuyển tiếp giả định; qua đó tốc độ hấp thu được mô phỏng tăng dần thay vì đột ngột tăng lên từ mức 0 [10].

Giá trị AUC của mỗi cá thể được tính thông qua gói phần mềm *Simulx* của R. So sánh giữa các phân nhóm (bảng 2) cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa AUC của một số phân nhóm như: thể lao, tình trạng tiểu đường, loại thuốc sử dụng và khoảng cân nặng. Điều này đồng nhất với kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới các thông số dược động học khi xây dựng mô hình. Tuy nhiên, từ kết quả, chúng tôi cũng nhận thấy giá trị AUC của phân nhóm 55-70 kg cao hơn so với hai phân nhóm còn lại. Thực

tế, tình trạng lượng thuốc trong máu của bệnh nhân có cân nặng thấp thấp hơn so với nhóm bệnh nhân có cân nặng cao hơn đã được ghi nhận trong các nghiên cứu khác [11, 12]. Điều này gợi ý rằng chế độ liều dựa theo cân nặng hiện tại không cho phép lượng thuốc trong máu tương đương nhau giữa các cá thể thuộc các nhóm cân nặng khác nhau; các đại lượng khác đại diện cho kích cỡ cơ thể như cân nặng trừ mỡ (FFM) có mối quan hệ chặt chẽ hơn với độ thanh thải ở một số thuốc thải trừ chủ yếu qua gan. Đồng thời, giá trị AUC ở nữ cao hơn nam, tuy sự chênh lệch không có ý nghĩa thống kê. Ảnh hưởng của giới tính đối với đặc điểm dược động học của Rifampicin vẫn còn chưa được thống nhất giữa các tài liệu khác nhau trong y văn. Nguyên nhân có thể do sự khác biệt về một số đặc điểm sinh lý giữa hai giới (cân nặng, lượng nước, lượng máu, hoạt động của enzym chuyển hóa... ở nam giới có xu hướng lớn hơn) hoặc do sự chênh lệch về sinh khả dụng dẫn tới thay đổi về CI/F và V/F [13, 14].

Giá trị MIC với Rifampicin của từng chủng *M. tuberculosis* phân lập từ mẫu đờm của bệnh nhân (hình 1) khác nhau giữa các cá thể và phần lớn có MIC $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. Vì chỉ chọn các chủng có kết quả kháng sinh đồ bằng phương pháp Lowenstein-Jensen nhạy cảm với Rifampicin, nên hầu hết các chủng có MIC ≤ 1 , tuy nhiên có 2/123 chủng có MIC > 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tỷ lệ đạt đích AUC/MIC của quần thể bệnh nhân (hình 2) cho thấy: tỷ lệ đạt đích PK/PD rất thấp đối với các giá trị MIC từ 0,25 trở đi, đặc biệt là 0% tại giá trị MIC = 1 $\mu\text{g/ml}$. Thông số AUC/MIC > 271 thể hiện khả năng tiêu diệt 1 log đơn vị khuẩn lạc *in vivo*; thông số này có ý nghĩa trong việc dự đoán hiệu quả điều trị cũng như khả năng phát sinh kháng thuốc của Rifampicin. Với tỷ lệ đạt mục tiêu như trên, có thể thấy: chế độ liều Rifampicin hiện tại cho khả năng diệt khuẩn tối ưu rất thấp, đặc biệt đối với vi khuẩn có MIC ≥ 1 . Kết quả tương tự cũng đã được phát hiện trong nghiên cứu của Chirehwa và cộng sự [11] trên bệnh nhân lao phổi tại Nam Phi, cũng như trong nghiên cứu của Goutelle [9] đối với người khỏe mạnh. Kết quả này cũng phản ánh tình trạng lượng thuốc Rifampicin trong cơ thể thấp dưới mức điều trị khi sử dụng chế độ liều hiện tại, gây ra giảm khả năng diệt khuẩn và tiết khuẩn trong tổn thương, dẫn tới nguy cơ kháng thuốc và tái phát bệnh lao cũng như kéo dài thời gian điều trị. Từ kết quả nghiên cứu này có thể đề xuất tăng liều Rifampicin để đạt kết quả điều trị tốt hơn. Nghiên cứu của Boeree (2015) [15] thực hiện trên bệnh nhân lao phổi tại Nam Phi với các mức liều Rifampicin cao hơn mức hiện hành (20, 25, 30 và 35 mg/kg) đã cho thấy tín hiệu tích cực với hiệu quả cao hơn (thể hiện ở độ giảm lượng vi khuẩn lớn hơn) cũng như khả năng dung nạp tốt của bệnh nhân với các mức liều cao nêu trên.

Kết luận

Nghiên cứu dược động học và dược lực học của Rifampicin ở bệnh nhân lao phổi không đa kháng thuốc điều trị bằng thuốc chống lao hàng một, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

1. Mô hình dược động học quần thể của Rifampicin xây dựng dựa trên nồng độ Rifampicin định lượng được là mô hình một ngăn, hấp thu theo chu trình có ngăn chuyển tiếp, thải trừ tuyến tính bậc một. Giá trị AUC trung bình và trung vị là 50,565 và 45,99 mg.h/l và không có sự khác biệt giữa các phân nhóm.
2. MIC của Rifampicin ở bệnh nhân không đa kháng thuốc hầu hết trong khoảng 0,25-1 $\mu\text{g/ml}$, tuy nhiên 2/123 bệnh nhân có MIC Rifampicin 2 $\mu\text{g/ml}$ và 8 $\mu\text{g/ml}$.
3. Với chế độ liều hiện tại, tỷ lệ bệnh nhân đạt đích AUC₀₋₂₄/MIC > 271 chỉ có 13% (16/123 bệnh nhân), tỷ lệ đạt đích rất thấp khi MIC $\geq 0,125$ và tỷ lệ đạt đích 0% nếu MIC ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, chế độ liều Rifampicin 8-12 mg/kg cân nặng trong điều trị cho bệnh nhân lao có thể còn quá thấp và không đạt mục tiêu điều trị, do đó cần hiệu chỉnh liều Rifampicin để đảm bảo hiệu quả điều trị và phòng tái phát sau điều trị.

LỜI CẢM ƠN

Nội dung nghiên cứu này thuộc đề tài nghiên cứu khoa học cấp nhà nước, Bộ Khoa học và Công nghệ cấp kinh phí trong Chương trình hợp tác nghiên cứu song phương đa phương về khoa học và công nghệ đến năm 2020 và Chương trình Newton Fund Vietnam (mã số đề tài HNQT/SPDP/01.06). Chúng tôi xin chân thành cảm ơn. Chúng tôi cũng xin cảm ơn Bệnh viện Phổi Trung ương, Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung ương, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Trung tâm Đánh giá Tương đương Sinh học - Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã phối hợp thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (2017), *Global tuberculosis report 2017*, https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf.
- [2] C. Lienhardt, P. Nahid, M.L. Rich, et al. (2017), *Target regimen profiles for treatment of tuberculosis: a WHO document*.
- [3] E.F. Egelund, A. Alsultan, and C.A. Peloquin (2015), "Optimizing the clinical pharmacology of tuberculosis medications", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **98**(4), pp.387-393.
- [4] E. Burhan, C. Ruesen, R. Ruslami, et al. (2013), "Isoniazid, rifampin, and pyrazinamide plasma concentrations in relation to treatment response in Indonesian pulmonary tuberculosis patients",

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **57(8)**, pp.3614-3619.

[5] S. Chideya, C.A. Winston, C.A. Peloquin, et al. (2009), "Isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide pharmacokinetics and treatment outcomes among a predominantly HIV-infected cohort of adults with tuberculosis from Botswana", *Clinical Infectious Diseases*, **48(12)**, pp.1685-1694.

[6] J. Reynolds and S.K. Heysell (2014), "Understanding pharmacokinetics to improve tuberculosis treatment outcome", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **10(6)**, pp.813-823.

[7] L.T. Luyen, T.M. Hung, L.T. Huyen, L.A. Tuan, D.T.L. Huong, H.V. Duc, B.T. Tung (2018), "Simultaneous determination of Pyrazinamide, Rifampicin, Ethambutol, Isoniazid, and AcetylIsoniazid in human plasma by LC-MS/MS method", *J. App. Pharm. Sci.*, **8(9)**, pp.61-73.

[8] B.J. Anderson and N.H. Holford (2008), "Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **48**, pp.303-332.

[9] S. Goutelle, L. Bourguignon, P.H. Maire, et al. (2009), "Population modeling and Monte Carlo simulation study of the pharmacokinetics and antituberculosis pharmacodynamics of rifampin in lungs", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53(7)**, pp.2974-2981.

[10] R.M. Savic, D.M. Jonker, T. Kerbusch, M.O. Karlsson (2007), "Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies", *Journal of Pharmacokinetics*

and Pharmacodynamics, **34(5)**, pp.711-726.

[11] M.T. Chirehwa, R. Rustomjee, T. Mthiyane, et al. (2016), "Model-based evaluation of higher doses of rifampin using a semimechanistic model incorporating autoinduction and saturation of hepatic extraction", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60(1)**, pp.487-494.

[12] H. McIlleron, R. Rustomjee, M. Vahedi, T. Mthiyane, et al. (2012), "Reduced antituberculosis drug concentrations in HIV-infected patients who are men or have low weight: implications for international dosing guidelines", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56(6)**, pp.3232-3238.

[13] R.C. Milán Segovia, A.M. Domínguez Ramírez, H. Jung Cook, et al. (2013), "Population pharmacokinetics of Rifampicin in Mexican patients with tuberculosis", *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **38(1)**, pp.56-61.

[14] K.Y. Seng, K.H. Hee, G.H. Soon, N. Chew, S.H. Khoo, L.S. Lee (2015), "Population pharmacokinetics of Rifampicin and 25-deacetyl-Rifampicin in healthy Asian adults", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70(12)**, pp.3298-3306.

[15] M.J. Boeree, A.H. Diacon, R. Dawson, et al. (2015), "A dose-ranging trial to optimize the dose of rifampin in the treatment of tuberculosis", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **191(9)**, pp.1058-1065.

Khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Lý Hải Triều¹, Nguyễn Thùy Diễm Thảo², Phùng Thị Thu Hường³,
Trần Bá Hiếu⁴, Lê Văn Minh^{1*}

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh, Viện Dược liệu

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

⁴Trung tâm Thử nghiệm lâm sàng và Tương đương sinh học, Viện Nghiên cứu Y - Dược học Quân sự

Ngày nhận bài 1/4/2019; ngày chuyển phản biện 3/4/2019; ngày nhận phản biện 24/5/2019; ngày chấp nhận đăng 3/6/2019

Tóm tắt:

Lá Nhàu chứa nhiều hợp chất flavonoid với các hoạt tính sinh học khác nhau, từ lâu đã được dân gian sử dụng trong chữa bệnh. Nghiên cứu này thực hiện tối ưu hóa điều kiện chiết cao lá Nhàu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với 4 yếu tố: dung môi, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dược liệu/dung môi. Với 3 tiêu chí về hàm lượng flavonoid, hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính kháng viêm, điều kiện chiết tối ưu được xác định là nồng độ ethanol 70%, ở 60°C, trong 95 phút, tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/25 (g/ml). Cao chiết thu được ở điều kiện này có hàm lượng flavonoid toàn phần là 2,227 mg RU/g chất khô, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng kháng 11,5 mm ở nồng độ 100 mg/ml đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa*) và hoạt tính kháng viêm ($IC_{50}=70,21 \mu\text{g/ml}$). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao lá Nhàu có hàm lượng hoạt chất và hoạt tính cao được chiết ở điều kiện tương đối ôn hòa, cho thấy tính kinh tế và có thể ứng dụng rộng rãi ở quy mô công nghiệp.

Từ khóa: đáp ứng bề mặt, flavonoid, kháng khuẩn, kháng viêm, Nhàu (*Morinda citrifolia* L.), tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Cây Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) thuộc họ Rubiaceae được dân gian dùng trong chữa cao huyết áp; quả giúp nhuận tràng, lợi tiểu, chữa đái đường, ho, sốt, kinh nguyệt không đều; lá dùng chữa mụn nhọt, sốt rét, kiết lỵ, đầy hơi, đau bụng [1]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy gần 200 hợp chất đã được xác định và tách chiết từ những phần khác nhau của loài *Morinda citrifolia* và thể hiện nhiều tác dụng như kháng khuẩn, kháng viêm, kháng nấm, kháng oxy hóa, kháng ung thư, giảm đau, điều hòa miễn dịch, làm lành vết thương, các tác dụng trên xương... [2]. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu về bộ phận quả, rễ. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trên lá Nhàu cho thấy chúng có chứa steroid, glycosid, phenolic, tannin, terpenoid, alkaloid, carbohydrat, flavonoid, đường khử, saponin, anthroquinon. Trong đó, thành phần flavonoid được cho là có đóng góp vào các tác dụng của lá Nhàu. Một số hợp chất đã được phân lập như rutin, quercetin 3,7-O-dimethylether, quercetin 3-O-methylether, kaempferol 3,4'-O-dimethylether, kaempferol 5,7-O-diarabinosid, apigenin [3, 4].

Công nghệ chiết xuất dược liệu chú trọng đến các yếu tố

như hiệu suất chiết, điều kiện chiết hay quy trình (an toàn và kinh tế), khả năng triển khai ở quy mô sản xuất. Để nâng cao hiệu quả của cao chiết bán thành phẩm từ dược liệu, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất thường được tối ưu hóa. Thông thường, các nhà khoa học dùng phương pháp cổ điển là luân phiên từng biến để thay đổi các thông số khảo sát trong quá trình tối ưu hóa. Tuy nhiên, phương pháp này không thể hiện rõ ràng sự tương tác hay ảnh hưởng giữa các biến với nhau và tổng số thí nghiệm thực hiện tăng lên nhiều khi số lượng biến khảo sát tăng. Do đó, hiện nay trong nghiên cứu, các nhà khoa học thường sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) để tối ưu hóa các thông số trong quá trình chiết. Phương pháp này được phát triển dựa trên các kỹ thuật toán học và thống kê, dựa trên sự phù hợp và liên quan giữa kết quả thu được từ mô hình thực nghiệm và thiết kế thí nghiệm [5, 6]. Phương pháp RSM đã được ứng dụng trong tối ưu hóa điều kiện chiết xuất hoạt chất tự nhiên, tổng hợp hóa học hay tối ưu hóa các quá trình hóa học khác [7, 8]. Điều này cho thấy phương pháp RSM có vai trò quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu để thay thế các phương pháp khác, giúp nâng cao hiệu quả quá trình tối ưu hóa các thông số. Do đó, trong

*Tác giả liên hệ: Email: levanminh05@gmail.com

Optimisation of the extraction conditions for Noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf extract using response surface methodology

Hai Trieu Ly¹, Thuy Diem Thao Nguyen²,
Thi Thu Huong Phung³, Ba Hieu Tran⁴, Van Minh Le^{1*}

¹Research Center of Ginseng and Medicinal Materials,
National Institute of Medicinal Materials

²University of Technology,

Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

⁴Clinical and Bio Equivalent Testing Center,
Institute of Biomedicine and Pharmacy

Received 1 April 2019; accepted 3 June 2019

Abstract:

Noni leaves have long been used as a traditional herb for the treatment of different ailments. Noni leaves have a high content of flavonoids with various biological activities. This study was carried out to optimise the extraction conditions of noni leaves using the response surface methodology with four factors, including solvent concentration, temperature, time, and material-solvent ratio. With the three criteria as total flavonoid content, antibacterial activity, and anti-inflammatory activity, the optimal extraction conditions of noni leaves were determined as follows: ethanol concentration of 70%, temperature of 60°C, time of 90 mins, and material-solvent ratio of 1/25 (g/ml). The extract obtained at these conditions had the total flavonoid content of 2.227 mg RU/g dry matter, exhibited antibacterial activity (zones of inhibition = 11.5 mm, at the concentration of 100 mg/ml against *P. aeruginosa*) and anti-inflammatory activity ($IC_{50}=70.21 \mu\text{g/ml}$). The study results showed that the noni leaf extract contains high levels of bioactive compound content and biological activities, can be extracted at relatively moderate conditions. This shows the economic advantages and wide applicability on an industrial scale.

Keywords: antibacterial, anti-inflammatory, flavonoid, Noni (*Morinda citrifolia* L.), optimisation, response surface methodology.

Classification number: 3.4

ngiên cứu này, chúng tôi sử dụng RSM để tối ưu hoá các thông số trong quá trình chiết cao lá Nhàu, góp phần tạo ra cao chiết tiềm năng cho các nghiên cứu sau này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

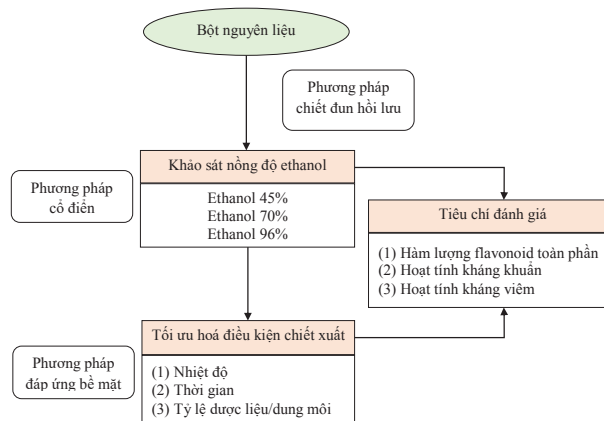
Lá Nhàu được thu tại Vườn bảo tồn gen và giống cây thuốc các tỉnh phía Nam (TP Hồ Chí Minh) vào tháng 3/2018. Mẫu được ThS Nguyễn Quốc Đạt - Viện Sinh thái học miền Nam xác định tên khoa học là *Morinda citrifolia* L.. Mẫu lá tươi được làm sạch, phơi sấy khô (độ ẩm: $7,80 \pm 0,06\%$) và xay thành bột để nghiên cứu. Mẫu dược liệu được bảo quản trong túi nilon kín và lưu giữ tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh (mã số lưu mẫu: MCL-TTS-001).

Hóa chất, dụng cụ

Ethanol 96% (Công ty Cổ phần dược phẩm OPC), Rutin (Sigma, Aldrich Co. Ltd, USA), Methanol (Merck), Diclofenac sodium (Sigma, Aldrich Co. Ltd, USA), Albumin trứng (HIMEDIA), viên amoxicilin 500 mg (Công ty Cổ phần dược phẩm DOMESCO), môi trường Luria-Bertani (LB), các chủng vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm bao gồm *Escherichia coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Bình chiết hồi lưu, bình lắng gạn, bình hút ẩm, cu-vet thạch anh, đĩa petri và một số dụng cụ, hóa chất khác.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát nồng độ ethanol chiết xuất: nồng độ ethanol được khảo sát là 45, 70 và 96%, sử dụng phương pháp chiết đun hồi lưu với điều kiện chiết như sau: khối lượng nguyên liệu đem chiết là 5 g; nhiệt độ chiết là 80°C; thời gian chiết là 120 phút; tỷ lệ dược liệu: dung môi là 1:20 (g/ml). Tiêu chí đánh giá dựa vào (1) hàm lượng flavonoid toàn phần, (2) hoạt tính kháng khuẩn và (3) hoạt tính kháng viêm *in vitro* (sơ đồ 1).



Sơ đồ 1. Thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết cao lá Nhàu.

Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa: thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu sử dụng phương pháp chiết đun hồi lưu dựa trên các tiêu chí bao gồm: (1) hàm lượng flavonoid toàn phần, (2) hoạt tính kháng khuẩn và (3) hoạt tính kháng viêm *invitro* sử dụng RSM (sơ đồ 1). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Design-Expert 11.0.

Phân tích thống kê mô hình biểu diễn sự phụ thuộc của hàm mục tiêu vào các nhân tố được mã hóa là một phương trình đa thức bậc hai có dạng:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Trong đó: Y là hiệu suất dự đoán hàm mục tiêu; b_0 là hệ số hồi quy bậc 0; X_i là nhân tố độc lập thứ i ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y; b_i là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của nhân tố X_i với Y; b_{ii} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y; b_{ij} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y.

Bài toán tối ưu được lập dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của các hàm mục tiêu vào các nhân tố nhiệt độ, thời gian và thể tích. Điều kiện ràng buộc là giới hạn của vùng nghiên cứu.

Trong nghiên cứu, 3 yếu tố được lựa chọn có ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất là nhiệt độ chiết (X_1), thời gian chiết (X_2) và tỷ lệ được liệu/dung môi hay thể tích dung môi (X_3). Giá trị biên của các nhân tố chiết được trình bày ở bảng 1. Số thí nghiệm $N = 2^k + 2k + 6$ ($N=20$ với $k=3$). Trong đó, k là số biến số độc lập và 2k là số thực nghiệm bổ sung tại điểm sao. Khoảng cách từ tâm đến điểm sao $\alpha=2^{k/4}$ ($\alpha=1,68$ với $k=3$). Tất cả các nghiên cứu được thực hiện ở 5 mức ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). Như vậy, trong nghiên cứu này 20 thí nghiệm sẽ được thực hiện với 2^3 số thí nghiệm của quy hoạch toàn phần, 6 thí nghiệm lặp lại tại tâm để đánh giá sai số và 6 thí nghiệm bổ sung tại điểm sao nằm cách vị trí tâm thực nghiệm một khoảng $\pm\alpha$. Các hàm mục tiêu bao gồm hàm lượng flavonoid toàn phần (Y_1), đường kính vòng kháng khuẩn (Y_2), IC_{50} kháng viêm (Y_3).

Bảng 1. Mã hóa các yếu tố và giá trị thực của yếu tố khảo sát.

Tên biến	Biến mã hóa	Mức nghiên cứu				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1 : nhiệt độ (°C)	U_1	50	60	75	90	100
X_2 : thời gian (phút)	U_2	60	95	150	205	240
X_3 : thể tích (ml)	U_3	235	300	400	500	600

Ghi chú: $\alpha=2$, $U_{\max}$, $U_{\min}$ là giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập; $U_0 = (U_{\min} + U_{\max})/2$ là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

Trong tất cả thí nghiệm, dịch chiết thu được sau quá trình chiết được cô quay dưới áp suất giảm bằng thiết bị cô quay. Cao chiết được trữ ở 2-8°C và hoà trong dung môi thích hợp cho từng thí nghiệm.

Phương pháp định lượng flavonoid toàn phần: xác định hàm lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp UV-Vis theo chuẩn rutin. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch chiết (từ phân đoạn ethyl acetat), 8 ml methanol và 1 ml $AlCl_3$ 2% được lắc đều. Tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 431 nm. Hàm lượng flavonoid toàn phần được tính bằng mg đương lượng rutin có trong 1 g mẫu thử (mg RU/g) [9].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn in vitro: các chủng vi khuẩn thử nghiệm sau khi hoạt hoá có mật độ $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ CFU/ml được trải đều lên đĩa thạch Luria-Bertani bằng que trải vô trùng. Tạo giếng thạch có đường kính 6 mm. Cho vào mỗi giếng 100 μ l dịch cao chiết thử nghiệm ở nồng độ 100 mg/ml. Ủ các đĩa thạch ở 37°C trong 24 giờ. Sự khuếch tán của cao chiết ra môi trường thạch sẽ ức chế sự tăng trưởng của các chủng vi sinh vật khảo sát tạo thành vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch. Xác định đường kính vòng (ĐKV) kháng khuẩn (mm) theo công thức $\text{ĐKV} = \text{ĐKV}_{\text{mẫu thử}} - \text{ĐKV}_{\text{chứng âm}}$. Amoxicilin được sử dụng làm chứng dương, còn DMSO 10% được sử dụng như chứng âm. Khảo sát lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình [10].

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro: hoạt tính kháng viêm của mẫu thử được đánh giá bằng phương pháp biến tính protein theo mô tả trước nhưng có một số sửa đổi nhỏ như sau: hỗn hợp phản ứng bao gồm 2 ml mẫu thử hoặc thuốc đối chiếu ở các nồng độ khác nhau và 2,9 ml dung dịch đệm PBS (pH=6,4) được trộn với 0,1 ml albumin trứng, ủ hỗn hợp ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Sự biến tính được tạo ra bằng cách giữ hỗn hợp phản ứng ở 70°C trong nước trong 10 phút. Làm mát và đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 660 nm. Sử dụng nước cất 2 lần làm mẫu trắng. Diclofenac sodium, thuốc chống viêm không steroid được sử dụng làm thuốc đối chiếu. Mỗi thí nghiệm được thực hiện 3 lần và lấy trung bình. Tỷ lệ ức chế sự biến tính protein được tính bằng công thức sau:

$$I(\%) = (OD_c - OD_t)/OD_c$$

Trong đó: OD_c là độ hấp thụ của mẫu chứng âm; OD_t là độ hấp thụ của mẫu có chứa chất thử. Xác định giá trị IC_{50} để đánh giá % ức chế của mẫu khảo sát [11].

Xử lý số liệu: các số liệu được biểu thị bằng trị số trung bình: Mean $\pm$ SEM. Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016, xử lý thống kê dựa vào phép kiểm tra t-test. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Design-Expert 11.0 để xây dựng mô hình toán học của quá trình chiết cũng như xác định các giá trị tối ưu.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm

Trong các nghiên cứu hiện nay, dung môi methanol hay ethanol thường được sử dụng để chiết xuất cao chiết tổng vì dung môi này có khả năng xuyên thấu qua màng tế bào thực vật, cũng như có thể tạo nối hydrogen liên phân tử với các nhóm phân cực khác, được xem là dung môi đa năng có thể chiết được nhiều hợp chất có độ phân cực khác nhau. Tuy nhiên, ethanol được ưu tiên sử dụng trong ngành dược và thực phẩm do an toàn và kinh tế hơn methanol. Trong nghiên cứu này, ethanol ở các nồng độ 45, 70 và 96% được lựa chọn để khảo sát, khối lượng nguyên liệu chiết là 5 g, nhiệt độ là 80°C, thời gian chiết là 120 phút, tỷ lệ được liệu/dung môi là 1/20 (g/ml). Kết quả phân tích hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm *in vitro* được trình bày ở bảng 2. Nhìn chung không có sự khác biệt về hoạt tính kháng khuẩn giữa 3 loại cao chiết nhưng cao chiết ethanol 70% có hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm cao hơn so với 2 cao chiết còn lại. Do đó, chúng tôi chọn ethanol 70% là dung môi thích hợp để chiết xuất cao chiết tổng từ lá Nhàu.

Bảng 2. Hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của lá Nhàu khi được chiết bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau.

Mẫu	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)			Kháng viêm IC ₅₀ (µg/ml)
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	
MCL45	2,156±0,098	14,33±0,33	11,00±0,58	19,17±0,17	74,91
MCL70	3,152±0,041	16,33±0,88	9,50±0,50	20,50±0,29	62,98
MCL96	2,814±0,276	15,17±0,17	13,50±0,29	20,50±0,50	71,78
Amox	-	14,83±0,17	11,17±0,17	19,17±0,17	-
DS	-	-	-	-	168,81

Ghi chú: MCL45, MCL70 và MCL96 lần lượt là cao chiết ethanol 45, 70 và 96%; Amox là chứng dương Amoxicilin (50 µg/ml) đối với thực nghiệm kháng khuẩn; DS là chứng dương Diclofenac sodium đối với thực nghiệm kháng viêm.

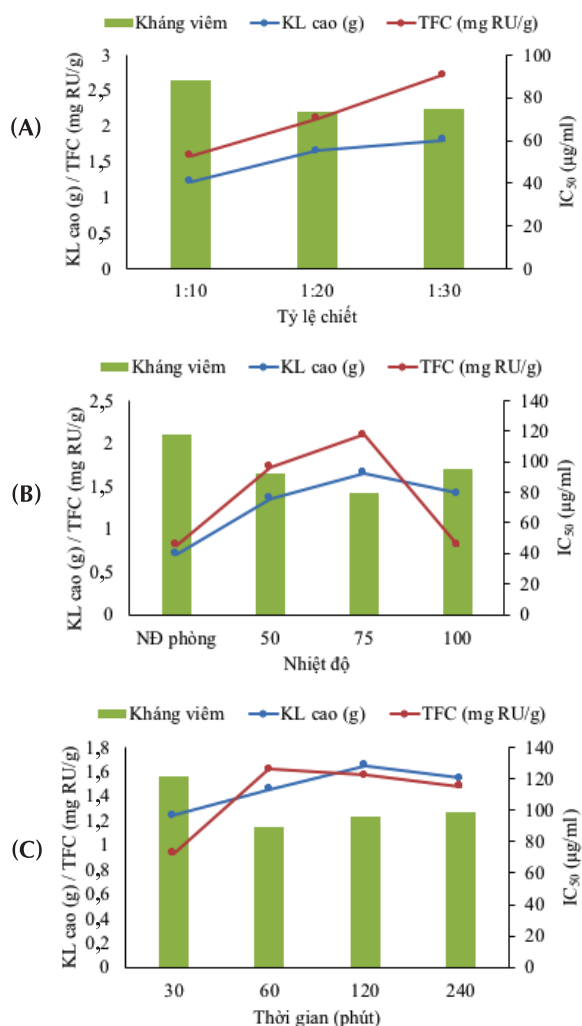
Tối ưu hoá điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu

Xác định miền khảo sát các yếu tố:

Nghiên cứu tiến hành khảo sát tiền tối ưu điều kiện chiết để xác định miền khảo sát của các thông số (nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ chiết) khi đưa dữ liệu đầu vào trên phần mềm với điều kiện chiết như sau: khối lượng nguyên liệu đem chiết là 5 g; nhiệt độ khảo sát là nhiệt độ phòng (25°C), 50, 75 và 100°C; thời gian chiết là 30, 60, 120 và 240 phút; tỷ lệ được liệu/dung môi khảo sát là 1/10, 1/20 và 1/30 (g/ml); nồng độ ethanol 70%.

Thông qua kết quả từ bảng 2 cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm có sự khác biệt

điển hình hơn so với hoạt tính kháng khuẩn. Do đó, nghiên cứu chọn hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm làm tiêu chí chính để khảo sát giai đoạn tiền tối ưu.



Hình 1. Khảo sát dự đoán miền tối ưu của tỷ lệ chiết (A), nhiệt độ chiết (B) và thời gian chiết (C).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tỷ lệ chiết tăng thì khối lượng cao chiết và hàm lượng flavonoid toàn phần tăng; hoạt tính kháng viêm tăng từ tỷ lệ chiết 1/10 đến 1/20 và không có sự khác biệt ở tỷ lệ 1/30 so với 1/20 (hình 1A). Điều này có thể lý giải là mặc dù khi tăng tỷ lệ chiết sẽ chiết được nhiều thành phần flavonoid hơn, nhưng có thể có những thành phần không thể hiện hoạt tính theo hướng kháng viêm. Khi nhiệt độ chiết tăng từ nhiệt độ phòng lên đến 75°C thì khối lượng cao chiết, hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm cũng tăng lên. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên đến 100°C thì cả 3 tiêu chí này đều giảm (hình 1B). Điều này có thể là do khi nhiệt độ tăng cao thì các hợp chất có hoạt tính kháng viêm bị phân hủy. Kết quả khảo sát thời gian chiết cho thấy, sau 30 phút chiết thì cả 3

tiêu chí đều cho kết quả thấp, có thể 30 phút chưa đủ để lấy hết các chất chiết được bao gồm cả những chất có hoạt tính kháng viêm trong dược liệu. Khối lượng cao chiết thu được tăng liên tục khi tăng thời gian chiết từ 30 đến 120 phút và giảm khi tăng thời gian lên gấp đôi (240 phút), tuy nhiên sự thay đổi này là không đáng kể. Hàm lượng flavonoid toàn phần và hoạt tính kháng viêm tăng từ 30 lên 60 phút chiết và có xu hướng giảm dần khi tăng thời gian chiết (hình 1C). Điều này có thể do chiết ở nhiệt độ cao trong thời gian dài có thể làm tác động bất lợi đến các hợp chất có hoạt tính kháng viêm.

Từ các khảo sát trên, chúng tôi chọn miền khảo sát các yếu tố như sau: tỷ lệ chiết là 1/10-1/30 (g/ml), nhiệt độ chiết là 50-100°C và thời gian chiết là 60-240 phút.

Ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm in vitro:

Bảng 3. Bảng ma trận thực nghiệm và kết quả hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của cao lá Nhàu.

Thí nghiệm thứ	Biến thực			Biến mã hoá			Hàm mục tiêu		
	X_1	X_2	X_3	U_1	U_2	U_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	60	205	500	-1	+1	+1	0,61±0,01	0,00±0,00	77,75
2	90	95	500	+1	-1	+1	2,46±0,12	13,50±0,50	57,81
3	90	95	300	+1	-1	-1	1,55±0,04	14,00±0,00	96,37
4	60	95	300	-1	-1	-1	3,58±0,12	20,00±0,00	76,13
5	90	205	300	+1	+1	-1	1,51±0,02	20,00±1,00	87,60
6	60	95	500	-1	-1	+1	2,58±0,04	21,50±1,50	83,54
7	90	205	500	+1	+1	+1	2,90±0,30	11,00±0,00	101,81
8	60	205	300	-1	+1	-1	2,34±0,07	10,50±0,00	103,75
9*	50	150	400	-2	0	0	1,68±0,04	10,00±0,00	93,10
10*	100	150	400	+2	0	0	0,72±0,03	16,00±0,00	96,26
11*	75	60	400	0	-2	0	1,68±0,05	0,00±0,00	89,92
12*	75	240	400	0	+2	0	1,46±0,02	15,00±0,00	98,60
13*	75	150	235	0	0	-2	1,57±0,14	14,00±0,00	85,23
14*	75	150	600	0	0	+2	2,72±0,12	22,50±0,50	75,11
15*	75	150	400	0	0	0	3,04±0,12	0,00±0,00	89,77
16*	75	150	400	0	0	0	2,11±0,12	18,50±1,50	87,96
17*	75	150	400	0	0	0	1,39±0,01	20,50±0,50	86,97
18*	75	150	400	0	0	0	2,25±0,07	21,50±3,50	103,90
19*	75	150	400	0	0	0	2,72±0,02	21,00±3,00	97,38
20*	75	150	400	0	0	0	2,09±0,09	15,00±0,00	73,87

Ghi chú: (*) thí nghiệm được tiến hành tại điểm sao; (°) thí nghiệm được tiến hành tại điểm tâm. Kháng khuẩn: cao chiết có nồng độ 100 mg/ml trên chủng *P. aeruginosa*.

Sau khi khảo sát các điều kiện chiết xuất được thiết kế trên phần mềm Design-Expert 11.0 và tiến hành thực nghiệm thu được kết quả như bảng 3. Từ kết quả bảng 3 có được phương trình hồi quy tương thích với thực nghiệm cho hàm lượng flavonoid toàn phần (1), hoạt tính kháng khuẩn (2) và kháng viêm (3) có dạng:

$$Y_1 = 2,05 - 0,1688X_1 - 0,2327X_2 + 0,1093X_3 + 0,4502X_1X_2 + 0,6289X_1X_3 - 0,0290X_2X_3 \quad (1)$$

$$Y_2 = 14,22 \quad (2)$$

$$Y_3 = 88,14 + 0,5663X_1 + 5,25X_2 - 4,39X_3 \quad (3)$$

Phương trình hồi quy (1) cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần chịu ảnh hưởng bậc 1 của cả 3 yếu tố nhiệt độ (X_1), thời gian (X_2), thể tích dung môi (X_3); không chịu ảnh hưởng bậc 2 của yếu tố nhưng đồng thời chịu ảnh hưởng của tương tác giữa 2 yếu tố. Cụ thể, trong 3 yếu tố khảo sát, 2 yếu tố X_1 và X_2 ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hàm bậc 1 với hệ số âm (-0,1688; -0,2327). Yếu tố X_3 ảnh hưởng đến hàm mục tiêu với hệ số dương của hàm bậc 1 là 0,1093. Hai yếu tố X_1X_2 tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hệ số dương (0,4502). Hai yếu tố X_1X_3 tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm mục tiêu theo hệ số dương (0,6289); còn 2 yếu tố X_2X_3 tương tác với nhau có sự ảnh hưởng không đáng kể với hệ số âm là -0,0290.

Đối với hoạt tính kháng khuẩn theo phương trình (2) cho thấy, hoạt tính này không chịu sự ảnh hưởng bậc 1, 2 của các yếu tố X_1 , X_2 , X_3 , cũng như sự tương tác của chúng.

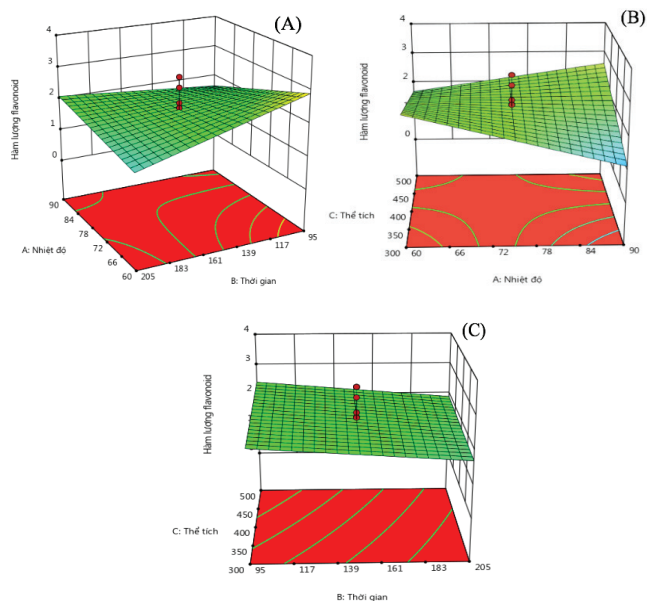
Đối với hoạt tính kháng viêm theo phương trình (3) cho thấy, hoạt tính này chỉ chịu ảnh hưởng bậc 1 của cả 3 yếu tố X_1 , X_2 , X_3 nhưng không chịu ảnh hưởng bậc 2 của 3 yếu tố X_1 , X_2 , X_3 đồng thời cũng không chịu ảnh hưởng của tương tác giữa chúng.

Theo mục tiêu nghiên cứu đặt ra, chọn các điều kiện phù hợp với hàm lượng flavonoid toàn phần cao nhất, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm cao nhất. Kết quả giá trị tối ưu các điều kiện trong quá trình chiết xuất cao chiết từ lá Nhàu bằng RSM được thể hiện trong bảng 4.

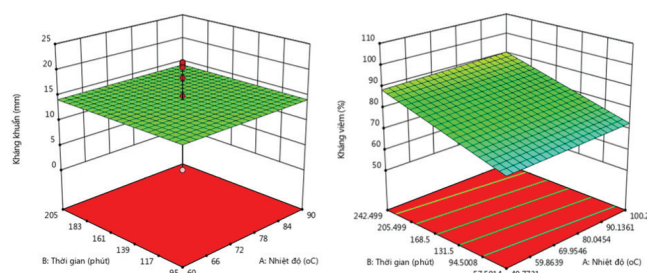
Bảng 4. Kết quả giá trị tối ưu hóa theo các yếu tố đáp ứng.

Yếu tố khảo sát	Yếu tố đáp ứng		
	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)
X_1 : nhiệt độ (°C)	60	75	90
X_2 : thời gian (phút)	95	150	95
X_3 : thể tích (ml)	300	600	500

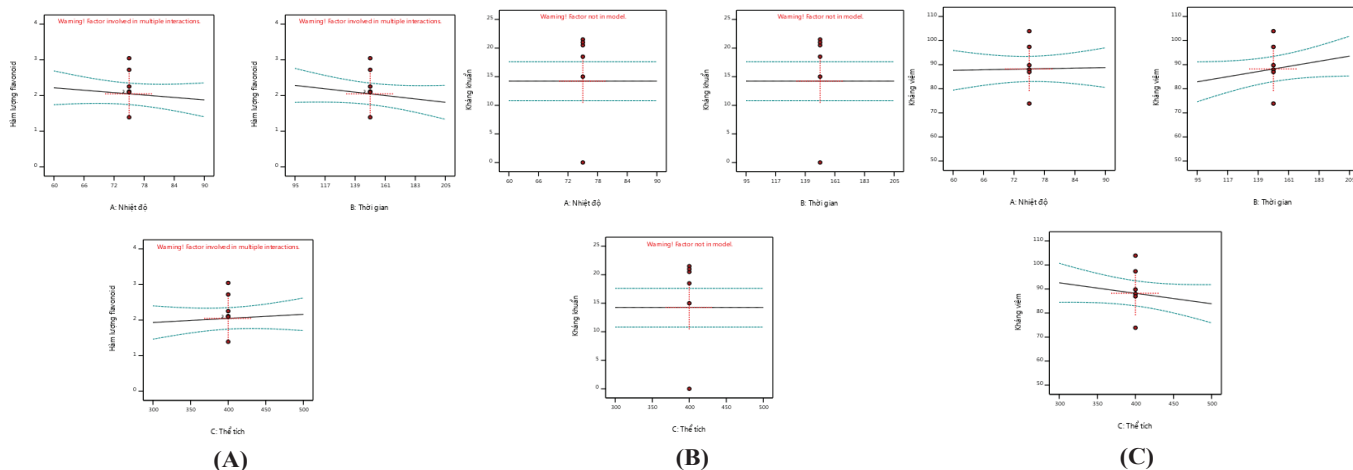
Từ kết quả hình 2 và 4A cho thấy, hàm lượng flavonoid toàn phần có xu hướng giảm giá trị khi yếu tố nhiệt độ chiết X_1 và thời gian chiết X_2 thay đổi. Đối với yếu tố thể tích dung môi X_3 thì hàm lượng flavonoid toàn phần thể hiện xu hướng tăng trong vùng khảo sát. Từ kết quả hình 3B và 4C cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn có xu hướng tăng khi yếu tố X_2 thay đổi trong vùng khảo sát. Đối với yếu tố X_3 thì hoạt tính kháng khuẩn thể hiện xu hướng giảm. Từ hình 3A và 4B cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn không thay đổi khi các yếu tố thay đổi trong vùng khảo sát.



Hình 2. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của 2 yếu tố đến hàm lượng flavonoid toàn phần bao gồm thời gian và nhiệt độ (A); thể tích và nhiệt độ (B); thời gian và thể tích (C).



Hình 3. Đồ thị 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của 2 yếu tố bao gồm thời gian và nhiệt độ đến hoạt tính kháng khuẩn (A) và kháng viêm (B).



Hình 4. Dự đoán sự thay đổi hàm lượng flavonoid toàn phần (A); hoạt tính kháng khuẩn (B) và hoạt tính kháng viêm (C) theo sự thay đổi của các yếu tố.

Từ các kết quả phân tích, các điều kiện chiết xuất được lựa chọn để chiết cao chiết tiềm năng từ lá Nhàu cho các khảo sát tiếp theo như sau: nhiệt độ chiết là 60°C; thời gian chiết là 95 phút; thể tích dung môi là 500 ml, tức tỷ lệ được liệu/dung môi là 1/25 (g/ml).

Đánh giá hiệu quả quá trình tối ưu hóa

Để kiểm tra tính tương thích của kết quả phương trình hồi quy từ phần mềm đối với thực nghiệm, tiến hành thực hiện lại quy trình chiết xuất với điều kiện tối ưu đã lựa chọn, thí nghiệm được thực hiện 3 lần và kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kiểm tra độ lặp lại của mô hình tối ưu hóa.

TT	X ₁ (°C)	X ₂ (phút)	X ₃ (ml)	Flavonoid (mg/g)	ĐKV (mm)	IC ₅₀ (μg/ml)
1	60	95	500	2,105	11,00	70,21
2	60	95	500	2,391	12,00	70,20
3	60	95	500	2,184	11,50	70,21
Trung bình				2,227±0,085	11,50±0,29	70,21±0,003

Sai số hàm lượng flavonoid toàn phần giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|2,227 - 2,41|}{2,41} \times 100\% = 7,5\%$$

Sai số hoạt tính kháng khuẩn giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|11,5 - 14,225|}{14,225} \times 100\% = 19,156\%$$

Sai số hoạt tính kháng viêm giữa kết quả sử dụng phần mềm và thực nghiệm:

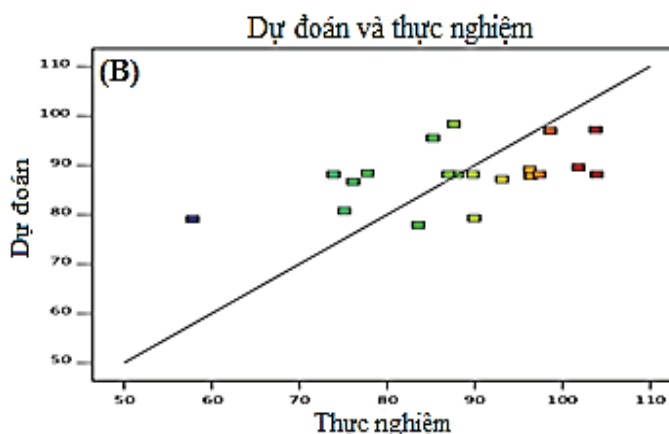
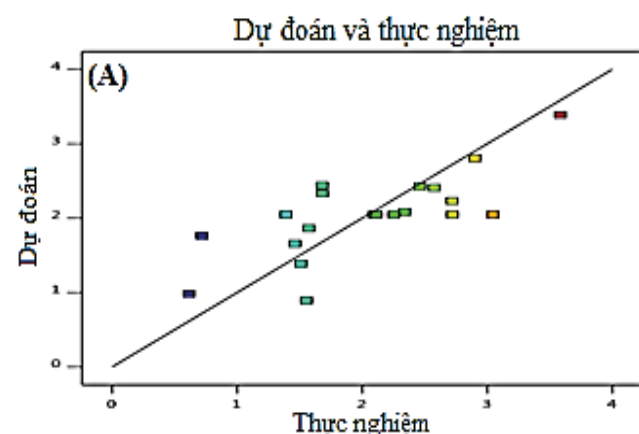
$$\% \Delta = \frac{|Kq_{tn} - Kq_{tt}|}{Kq_{tt}} \times 100\% = \frac{|70,206 - 77,94|}{77,94} \times 100\% = 9,9\%$$

Tính toán kết quả sai số trung bình sau 3 lần thực hiện thí nghiệm của hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm cho thấy, sai số thấp và mô hình tối ưu có độ lặp lại tốt.

Sau khi đưa ra kết quả về hàm lượng flavonoid toàn phần, hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm của 20 thí nghiệm thực nghiệm vào phần mềm Design-Expert 11.0, thu được kết quả phân tích phương sai và giá trị các hệ số của mô hình như bảng 6 và hình 5.

Bảng 6. Phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố chiết đến hàm mục tiêu Y_1 (hàm lượng flavonoid toàn phần) và Y_3 (hoạt tính kháng viêm).

Hàm mục tiêu	Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Y_1	X_1	0,389	1	0,389	0,99	0,338
	X_2	0,739	1	0,739	1,88	0,193
	X_3	0,163	1	0,163	0,42	0,531
	X_1X_2	1,620	1	1,620	4,13	0,063
	X_1X_3	3,160	1	3,160	8,05	0,014
	X_2X_3	0,007	1	0,007	0,02	0,898
	Tổng sai số	11,19	19			
	$CV=30,60\%, R^2=0,544$					
Y_3	X_1	4,38	1	4,38	0,036	0,853
	X_2	375,90	1	375,90	3,050	0,100
	X_3	263,11	1	263,11	2,140	0,163
	Tổng sai số	2614,28	19			
	$CV=12,59\%, R^2=0,246$					



Hình 5. So sánh hàm lượng flavonoid toàn phần (A) và hoạt tính kháng viêm (B) từ thực nghiệm và từ mô hình được xây dựng.

Đối với hàm mục tiêu Y_1 ; kết quả cho thấy, các biến đơn X_1 , X_2 , X_3 không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p>0,05$), nhưng tương tác bậc hai (X_1X_3) của biến này có ảnh hưởng đáng kể nên biến X_1 , X_3 được giữ lại để phân tích tối ưu. Riêng biến đơn X_2 không có ảnh hưởng đáng kể nên không được giữ lại phân tích tối ưu sau này. Kết quả phân tích cho thấy, các yếu tố tương tác với hàm mục

tiêu hàm lượng flavonoid toàn phần với giá trị mức ý nghĩa $R^2=0,544$ và độ tin cậy là 74%. Hệ số xác định R (coefficient of determination) cho biết 54,4% sự biến đổi của hàm lượng flavonoid toàn phần là do ảnh hưởng của các biến độc lập như hàm nhiệt độ, thời gian chiết và thể tích dung môi, có 45,6% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Bên cạnh đó, hệ số biến thiên CV (coefficient of variation) cao chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại thấp. Giá trị p của kiểm định sự không tương thích của mô hình là 0,393, lớn hơn 0,05. Như vậy, sự khác biệt giữa dự đoán của phần mềm và thực nghiệm không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$. Do đó, mô hình hồi quy trên tương thích với thực nghiệm.

Đối với hàm mục tiêu Y_3 ; kết quả cho thấy, các biến đơn X_1 , X_2 , X_3 không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p>0,05$) nên không được giữ lại để phân tích tối ưu sau này. Kết quả phân tích cho thấy, các yếu tố tương tác với hàm mục tiêu hoạt tính kháng viêm với giá trị mức ý nghĩa $R^2=0,246$ và độ tin cậy là 49,6%. Hệ số xác định R cho biết 24,6% sự biến đổi của hoạt tính kháng viêm là do ảnh hưởng của các biến độc lập như hàm nhiệt độ, thời gian chiết và thể tích dung môi, có 75,4% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được gây ra (sai số ngẫu nhiên). Bên cạnh đó, hệ số biến thiên CV cao chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại thấp. Giá trị p của kiểm định sự không tương thích của mô hình là 0,422, lớn hơn 0,05. Như vậy, sự khác biệt giữa dự đoán của phần mềm và thực

nghiệm không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$. Do đó, mô hình hồi quy trên tương thích với thực nghiệm.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của 3 nhân tố chiết (nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ được liệu/dung môi) đến hàm lượng flavonoid toàn phần,

hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm từ lá Nhàu. Kết hợp giữa phương pháp truyền thống và sự hỗ trợ của phần mềm thu được các giá trị tối ưu để chiết cao lá Nhàu như sau: dung môi chiết ethanol 70%, nhiệt độ chiết 60°C, thời gian chiết 95 phút và tỷ lệ dược liệu/dung môi 1/25 (g/ml). Cao chiết tại điều kiện chiết này có hàm lượng flavonoid toàn phần là 2,227 mg RU/g chất khô, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với ĐKV kháng khuẩn là 11,5 mm ở nồng độ 100 mg/ml đối với chủng *P. aeruginosa*, hoạt tính kháng viêm với giá trị IC_{50} là 70,21 μ g/ml. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, việc áp dụng phương pháp truyền thống với sự hỗ trợ của phần mềm thông minh trong quy trình chiết xuất giúp giảm chi phí, công sức và rút ngắn thời gian nghiên cứu. Đây là bước đầu thành công để tạo ra cao chiết tiềm năng từ lá Nhàu cho các nghiên cứu và ứng dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Viện Dược liệu (2007), *Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, **Tập II**, tr.443-446.
- [2] R.A. Assi, et al. (2017), “*Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials”, *Arabian Journal of Chemistry*, **10(5)**, pp.691-707.
- [3] M.R. Serafini, et al. (2011), “*Morinda citrifolia* Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration”, *Journal of Medicinal Food*, **14(10)**, pp.1159-1166.
- [4] H. Gu, et al. (2018), “*Morinda citrifolia* Leaf Extract Enhances Osteogenic Differentiation Through Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling”, *Journal of Medicinal Food*, **21(1)**, pp.57-69.
- [5] M.A. Bezerra, et al. (2008), “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry”, *Talanta*, **76(5)**, pp.965-977.
- [6] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay (2010), “Response surface methodology”, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, **2(2)**, pp.128-149.
- [7] X. Zhang, et al. (2017), “Optimization of Extract Method for *Cynomorium songaricum* Rupr. by Response Surface Methodology”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2017**, Article ID 6153802, pp.1-7.
- [8] H. Long, et al. (2017), “Optimization of monomethoxy polyethyleneglycol-modified oxalate decarboxylase by response surface methodology”, *Journal of Biological Physics*, **43(3)**, pp.445-459.
- [9] Thao T. Nguyen, Marie-Odile Parat, Mark P. Hodson, Jenny Pan, Paul N. Shaw, Amitha K. Hewavitharana (2016), “Chemical Characterization and *in vitro* Cytotoxicity on Squamous Cell Carcinoma Cells of *Carica Papaya* Leaf Extracts”, *Toxins*, **8(1)**, p.7.
- [10] Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Mai Trúc Tiên (2018), “Nghiên cứu thực nghiệm tác dụng kháng khuẩn, trị ho và long đờm của cao chiết cồn từ lá Tía tô”, *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **22(5)**, tr.34-39.
- [11] F. Alhakmani, S. Kumar, S.A. Khan (2013), “Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*”, *Asian Pacific Journal of*

Ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện các gen VEB, DIM và AmpC của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn

Ngô Thị Hồng Hạnh¹, Phạm Duy Thái¹, Trần Thị Vân Phương¹,
Hoàng Thị Hằng², Trần Huy Hoàng^{1*}

¹Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

²Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương

Ngày nhận bài 30/5/2019; ngày gửi phản biện 3/6/2019; ngày nhận phản biện 9/7/2019; ngày chấp nhận đăng 15/7/2019

Tóm tắt:

Pseudomonas aeruginosa là một trong những căn nguyên phổ biến gây nhiễm trùng bệnh viện, nhiễm trùng cơ hội. Với các cơ chế đề kháng kháng sinh đa dạng như sinh β -lactamase phổ rộng, tăng cường sự biểu hiện của các gen mã hóa bơm đẩy, ức chế kênh porin, thay đổi tính thấm của màng..., *P. aeruginosa* đã gây ra rất nhiều khó khăn cho các bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp. Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện các gen mã hóa ESBL (blaVEB), MBL (blaDIM) và AmpC ở các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn từ năm 2010 đến năm 2015. Trong tổng số 216 chủng nghiên cứu, kết quả cho thấy có 40 (18,51%) chủng mang gen blaVEB, 1 (0,46%) chủng mang gen blaDIM, 193 (89,35%) chủng mang gen AmpC. Trong số này, có 1 (0,46%) chủng mang đồng thời cả 2 gen DIM - AmpC và 38 (17,59%) chủng mang đồng thời cả 2 gen VEB - AmpC. Kết quả này đã nhấn mạnh sự đa dạng gen kháng kháng sinh của các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu cũng như chỉ ra tầm quan trọng của hoạt động kiểm soát nhiễm khuẩn tại bệnh viện để ngăn chặn sự lan truyền các tác nhân này và đem lại hiệu quả điều trị.

Từ khóa: AmpC, DIM, mPCR, *P. aeruginosa*, VEB.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Trực khuẩn mủ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*) là một căn nguyên thường gặp trong nhiễm khuẩn bệnh viện, chiếm tỷ lệ khoảng 10% gây ra các bệnh viêm phổi, nhiễm trùng huyết, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng vết mổ, ảnh hưởng đến sức khỏe của bệnh nhân cũng như gia tăng các gánh nặng về chi phí chăm sóc và điều trị [1-3]. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành trên thế giới cho thấy, các chủng *P. aeruginosa* đa kháng thuốc có rất nhiều cơ chế kháng đặc biệt như sản xuất các enzyme β -lactamase, ức chế các gen porin hoặc tăng cường sự biểu hiện của các bơm đẩy kháng sinh efflux pump. Có nhiều chủng *P. aeruginosa* được phân lập có khả năng sản xuất enzyme β -lactamase phổ rộng, trong đó có VEB-1 enzyme (Vietnamese extended spectrum β -lactamase) được phát hiện lần đầu tiên ở *Escherichia coli* trên một bệnh nhân người Việt Nam vào năm 1996 nhưng sau đó phân lập được ở *P. aeruginosa* trên một bệnh nhân người Thái Lan [4, 5]. Ngoài ra, các chủng *P. aeruginosa* phân lập được có MBLs đã được báo cáo ở nhiều nơi trên

thế giới bao gồm: IMP, VIM, SPM, GIM và mới đây nhất là DIM (*Dutch imipenemase*). β -lactamase DIM-1 có khả năng thủy phân các cephalosporin phổ rộng, carbapenem, trước đây được báo cáo ở Hà Lan [6]. Nhiều nghiên cứu trên lâm sàng cũng cho thấy bệnh nhân nhiễm *P. aeruginosa* tăng sản xuất AmpC có tỷ lệ không đáp ứng thuốc cao hơn 67,5 lần các trường hợp nhiễm trùng *P. aeruginosa* không tăng sản xuất AmpC [7, 8]. Sự đa dạng trong cơ chế kháng và các loại gen đề kháng giúp *P. aeruginosa* trở thành một trong những căn nguyên gây bệnh nguy hiểm. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu về *P. aeruginosa* chủ yếu tập trung mô tả thực trạng kháng kháng sinh để đưa ra các cảnh báo cho bác sĩ điều trị, chưa có nhiều nghiên cứu xác định các gen liên quan đến kháng thuốc. Kỹ thuật PCR là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao được sử dụng để phát hiện các gen kháng kháng sinh ở *P. aeruginosa*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển kỹ thuật multiplex PCR để phát hiện đồng thời các gen kháng kháng sinh VEB, DIM và AmpC trên các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại 2 Bệnh viện: Xanh Pôn và Thanh Nhàn.

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

Applying multiplex PCR to detect VEB, DIM and AmpC genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated at Saint Paul and Thanh Nhan Hospitals

Thi Hong Hanh Ngo¹, Duy Thai Pham¹,
Thi Van Phuong Tran¹, Thi Hang Hoang²,
Huy Hoang Tran^{1*}

¹National Institute of Hygiene and Epidemiology

²Hai Duong Medical Technical University

Received 30 May 2019; accepted 15 July 2019

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common agents causing nosocomial infections, opportunistic infections. There are a variety of antibiotic resistance mechanisms in *P. aeruginosa* such as: extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production, overexpression of efflux pump genes, inhibitions of porin channels, and changes in membrane permeability. *P. aeruginosa* has caused a lot of difficulties for clinicians in choosing appropriate treatment methods. In this study, we used multiplex PCR technique to detect ESBL (blaVEB), MBL (blaDIM) and AmpC coding genes in the strains of *P. aeruginosa* isolated at Saint Paul and Thanh Nhan Hospitals from 2010 to 2015. A total of 216 strains were studied, and the results showed that 40 (18.51%) strains had the blaVEB gene, 1 (0.46%) strain carried the blaDIM gene, 193 (89.35%) strains carried the AmpC gene. Out of them, 1 (0.46%) strain carried both the DIM and AmpC genes, and 38 (17.59%) strains simultaneously carried both VEB-AmpC genes. These results highlighted the antibiotic resistance gene diversity of *P. aeruginosa* strains in the study as well as pointed out the importance of infection control activities in hospitals to prevent the spread of these agents and achieve treatment effectiveness.

Keywords: AmpC, DIM, mPCR, *Pseudomonas aeruginosa*, VEB.

Classification number: 3.5

Phương pháp nghiên cứu

Chủng vi khuẩn

Nghiên cứu sử dụng 216 chủng *P. aeruginosa* được phân lập tại 2 Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhân trong giai đoạn 2010-2015. Các chủng được lưu trữ trong Ngân hàng chủng của Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Trước khi tiến hành nghiên cứu, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller - Hinton Agar (MHA) và sau đó được định danh lại bằng MALDI - TOF. Việc định danh lại các chủng vi khuẩn được thực hiện tại Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Hà Nội.

Địa điểm tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Kỹ thuật multiplex PCR (mPCR)

Tách chiết ADN: ADN khuôn được tách chiết bằng nhiệt: *P. aeruginosa* được xác định là chủng thuần và được nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng MHA, ủ ở 37°C. Lấy 3-5 khuẩn lạc *P. aeruginosa*, hòa đều vào 200 µl nước cất vô trùng đựng trong ống eppendorf 1,5 ml. Ống hòa khuẩn được vortex đều và để ở nhiệt độ 95°C trong vòng 10 phút và loại bỏ cặn, thu nước nổi làm khuôn mẫu ADN cho phản ứng mPCR. ADN khuôn được lưu giữ ở -20°C cho đến khi thực hiện phản ứng mPCR.

Phản ứng PCR: các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này đã được thiết kế trong nghiên cứu trước đó của Nadagopal Murugan [9] (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng.

Nhóm thuốc	Mồi	Trình tự mồi 5'—3'	Nhiệt độ gắn mồi (°C)	Kích thước đoạn khuếch đại
Betalactamase	VEB F	CCCGATGCAAAGCGTTATGA	60	576
	VEB R	ACCCCAACATCATTAGTGGC		
DIM	DIM F	TAACGACGAGGTACCTGAGC		410
	DIM R	ACCACACCACTACGTTGTCT		
AmpC	AmpC F	GATGAAGGCCAATGACATTCCG	742	742
	AmpC R	CATGTCGCCGACCTTGTAGTAA		

Thành phần của phản ứng mPCR bao gồm: 12,5 µl Go Taq Green Master Mix (Promega) đã bao gồm: 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP và 3 mM MgCl₂, 0,2 µl mồi ngược và mồi xuôi mỗi loại (10 µM), 1 µl ADN khuôn (1-10 ng/µl) và 10,3 µl nước Nuclease free. Tổng thể tích là 25 µl. Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermo-cycler (Applied Biosystems, Veriti) theo chương trình:

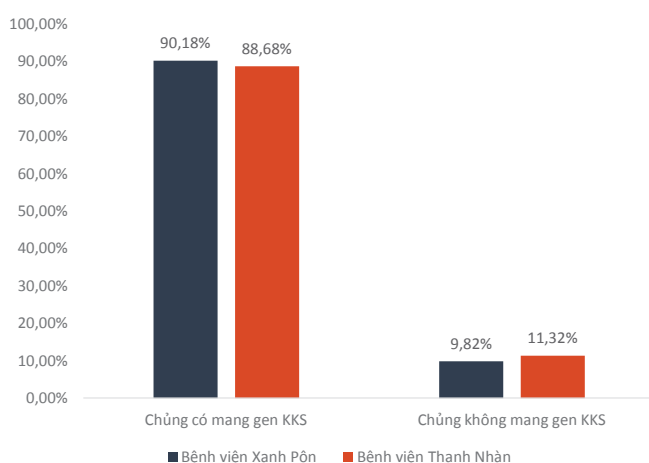
Giai đoạn khởi động 94°C trong 5 phút, giai đoạn biến tính ở 94°C/30 giây, gắn môi ở 60°C/30 giây, kéo dài ở 72°C/1,5 phút. Tổng số chu kỳ là 35. Giai đoạn kết thúc: 72°C/7 phút.

Điện di 10 µl 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.

Phân tích và quản lý số liệu

Phần mềm excel được sử dụng để quản lý và phân tích số liệu.

Kết quả nghiên cứu



Biểu đồ 1. Tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng kháng sinh (KKS) được phát hiện tại Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhân.

Biểu đồ 1 cho thấy tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng kháng sinh trong nghiên cứu này chiếm tỷ lệ rất cao, 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhân.

Bảng 2. Các chủng *P. aeruginosa* có mang gen kháng thuốc được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex PCR.

	VEB		DIM		AmpC	
	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính
Bệnh viện Xanh Pôn	32	131	1	162	146	17
Bệnh viện Thanh Nhân	8	45	0	53	47	6
Tổng	40	176	1	215	193	23

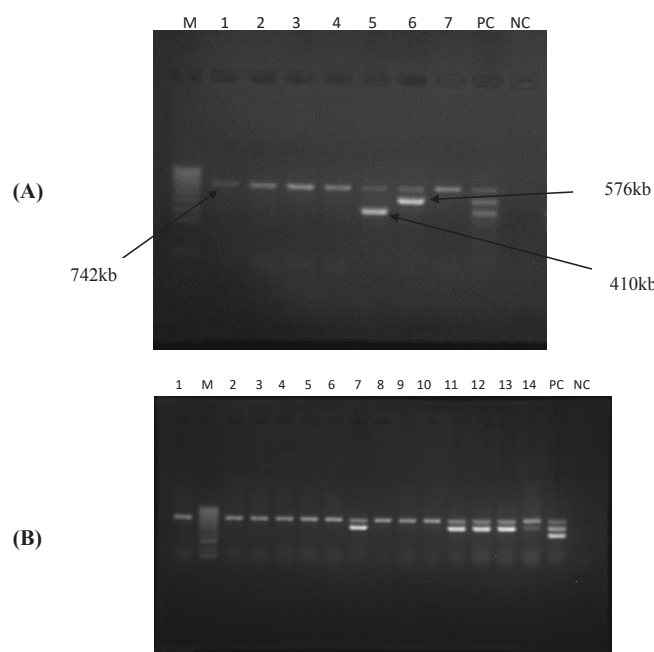
Kết quả multiplex PCR trên 216 chủng ở bảng 2 cho thấy, có 40 (18,51%) chủng có mang gen blaVEB, 1 (0,46%) chủng có mang gen blaDIM, 193 (89,35%) chủng có mang gen AmpC.

Trong số này, có 1 (0,46%) chủng mang đồng thời cả 2

gen DIM-AmpC và 38 (17,59%) chủng mang đồng thời cả 2 gen VEB-AmpC; không có chủng nào mang đồng thời cả 2 gen VEB-DIM hay cả 3 gen VEB-DIM-AmpC (bảng 3, hình 1).

Bảng 3. Các chủng *P. aeruginosa* mang 2-3 loại gen kháng thuốc.

	VEB-DIM	DIM-AmpC	VEB-AmpC	VEB-DIM-AmpC
Bệnh viện Xanh Pôn	0	1	31	0
Bệnh viện Thanh Nhân	0	0	7	0
Tổng	0	1	38	0



Hình 1. Kết quả multiplex PCR khuếch đại các gen VEB-DIM-AmpC. Ladder 100 bp (Bioline-100 bp). (A) Các vị trí 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: AmpC dương tính; vị trí 6: AmpC và DIM dương tính; vị trí 7: AmpC và VEB dương tính; vị trí PC: chứng dương với cả 3 gen AmpC-VEB-DIM; vị trí NC: chứng âm. (B) Các vị trí 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10: AmpC dương tính; vị trí 7, 11, 12, 13, 14: AmpC và VEB dương tính; vị trí PC: chứng dương với cả 3 gen AmpC-VEB-DIM; vị trí NC: chứng âm.

Bàn luận

P. aeruginosa một trong những căn nguyên chính gây nhiễm trùng bệnh viện có tỷ lệ kháng thuốc tăng cao và ngày càng đa dạng. Do đó, vi khuẩn đã gây ra những khó khăn cho bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn liệu pháp kháng sinh thích hợp để điều trị cho bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang ít nhất 1 loại gen kháng thuốc trong 3 gen blaVEB, blaDIM và AmpC chiếm tỷ lệ rất cao, lần lượt là 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhân.

Giống như một số vi khuẩn Gram âm khác, *P. aeruginosa*

có chứa một gen gây cảm ứng thuốc nằm trên nhiễm sắc thể - blaAmpC, mã hóa một loại enzyme β -lactamase phổ rộng thuộc lớp C [2]. Enzyme này góp phần vào sức đề kháng tự nhiên của vi sinh vật đối với các phân tử không bền và gây cảm ứng, như aminopenicillins, cephalosporin thế hệ thứ nhất và thứ hai [3]. Quan trọng hơn, khi được sản xuất quá mức do đột biến làm thay đổi quá trình phục hồi peptidoglycan, AmpC trở thành nguyên nhân chính gây ra sự kháng thuốc đối với các penicillin antipseudomonal (ticarcillin và piperacillin), monobactams (aztreonam), cephalosporin thế hệ thứ tư (cefepime) [10, 11] và có khả năng chống lại tác dụng ức chế của clavulanate, sulbactam và tazobactam [12]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang gen AmpC chiếm tỷ lệ rất cao (89,35%). Kết quả kháng sinh đồ cho thấy tỷ lệ các chủng kháng với cefepime là 85,24%. Như vậy, với sự xuất hiện của kiểu gen cùng những đặc điểm kiểu hình có thể nghi ngờ rằng các chủng trong nghiên cứu này có khả năng sản xuất AmpC ở mức cao. Để khẳng định chắc chắn cần thiết tiến hành nghiên cứu xác định mức độ biểu hiện gen AmpC hay khả năng sinh AmpC ở mức độ cao hoặc xác định các đột biến dẫn đến tăng sản xuất quá mức AmpC. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã được tiến hành và chỉ ra các đột biến được gọi là đột biến giải phóng phổ biến trong lâm sàng và chiếm tỷ lệ lớn ở các chủng kháng ceftazidime và cefepime trong các nghiên cứu khác nhau [8, 10-12]. Tình trạng đáng lo ngại này đã thúc đẩy sự phát triển của các loại β -lactam mới như ceftolozane và các chất ức chế AmpC mới như avibactam cho thấy các triển vọng trong công tác phòng chống loại đột biến này [13].

Bên cạnh đó, các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu này có mang gen blaVEB với tỷ lệ là 18,52%, thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Neil Woodford tại một bệnh viện ở Anh (2008-80%) nhưng cao hơn một chút so với nghiên cứu của Nandagopal Murugan tại Ấn Độ (2018-11,50%) và của Sahar Amirkamali tại Iran (2017-13,3%) [9, 13, 14]. Kết quả kháng sinh đồ tại Bệnh viện Xanh Pôn và Thanh Nhàn cho thấy, các chủng *P. aeruginosa* nêu trên có tỷ lệ đề kháng ceftazidime và cefepime cao (CAZ -72,68%, FEP-85,24%). Trong khi blaVEB được phát hiện khá phổ biến ở *P. aeruginosa* phân lập tại nhiều nước trên thế giới thì blaDIM là gen mới phát hiện trong giai đoạn hiện nay. Trên thế giới, các chủng mang gen blaDIM được báo cáo ở một vài trường hợp tại Hà Lan (1 trường hợp), Ấn Độ (5%), Sierra Leone (40%) [6, 9, 15] và trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện có một chủng mang gen blaDIM. Vi khuẩn có enzyme β -lactamase DIM-1 có khả năng ly giải cephalosporin phổ rộng và carbapenem [4, 6]. Các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng IMP và MEM rất cao, lần lượt là 97,63% và 95%. Do vậy, rất cần thiết phải tìm hiểu thêm về sự lan truyền và xuất hiện của

chủng vi khuẩn mang gen blaDIM tại Việt Nam.

Nghiên cứu cũng cho thấy một tỷ lệ không nhỏ (39/216-18,05%) chủng *P. aeruginosa* có đồng thời 2 loại gen kháng thuốc giúp làm tăng khả năng đề kháng kháng sinh, gây khó khăn rất lớn cho bác sĩ điều trị trong việc lựa chọn kháng sinh phù hợp. Điều này cũng cho thấy các chủng vi khuẩn mang gen kháng thuốc đang ngày càng đa dạng, một chủng vi khuẩn có thể mang một hoặc nhiều loại gen kháng thuốc khác nhau. Đây chính là hậu quả của việc lạm dụng kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn - một tình trạng hiện đang rất phổ biến tại Việt Nam - sử dụng kháng sinh bừa bãi, không tuân thủ theo phác đồ điều trị, liều lượng kháng sinh sử dụng không đúng. Ngoài ra, khả năng lan truyền gen kháng kháng sinh trong cùng loài hoặc giữa 2 loài vi khuẩn thông qua plasmid, transposons và integrons cũng giúp khả năng đề kháng của vi khuẩn đa dạng hơn. Do đó, tại các bệnh viện, việc thực hiện công tác kiểm soát nhiễm khuẩn là rất cần thiết để ngăn chặn sự lan truyền của các vi khuẩn kháng thuốc, từ đó có thể đưa ra phác đồ điều trị hiệu quả cho bệnh nhân.

Kết luận

Tỷ lệ các chủng *P. aeruginosa* có mang ít nhất 1 loại gen kháng thuốc trong 3 gen blaVEB, blaDIM và AmpC chiếm tỷ lệ rất cao, lần lượt là 90,18% tại Bệnh viện Xanh Pôn và 88,68% tại Bệnh viện Thanh Nhàn. Trong đó, 193/216 (89,35%) chủng *P. aeruginosa* mang gen AmpC, 40/216 (18,51%) mang gen VEB và 1/216 (0,46%) mang gen DIM.

Các chủng *P. aeruginosa* có sự đa dạng về kiểu gen kháng thuốc khi có 38/216 (17,59%) mang đồng thời cả 2 gen kháng kháng sinh, cho thấy khả năng đề kháng đa dạng của vi khuẩn này, từ đó có thể gây ra nhiều khó khăn cho bác sĩ lâm sàng trong việc lựa chọn phương pháp điều trị thích hợp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài cấp nhà nước mã số HNQT/SPĐP/02.16 và đề tài cấp cơ sở của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (theo Quyết định phê duyệt số 1782/QĐ-VSĐTTƯ). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2014), *Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance*.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (2016), *Antimicrobial Resistance/Biggest Threats*, https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.
- [3] K.M. Papp-Wallace, S. Bajaksouzian, A.M. Abdelhamed, et al. (2015), "Activities of ceftazidime, ceftaroline, and aztreonam alone and combined with avibactam against isogenic *Escherichia coli* strains expressing selected single beta-lactamases", *Diagn. Microbiol.*

Infect. Dis., **82**(1), pp.65-69.

[4] T. Naas, L. Poirel, P. Nordmann (2008), "Minor extended-spectrum beta-lactamases", *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, Suppl. 1, pp.42-52.

[5] T. Naas, L. Poirel, A. Karim, et al. (1999), "Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*", *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**(2), pp.411-419.

[6] L. Poirel, J.M. Rodriguez-Martinez, N. Al Naiemi, et al. (2010), "Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**(6), pp.2420-2424.

[7] V.H. Tam, K.T. Chang, A.N. Schilling, et al. (2009), "Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **63**(3), pp.279-285.

[8] P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson (2009), "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms", *Clin. Microbiol. Rev.*, **22**(4), pp.582-610.

[9] N. Murugan, J. Malathi, K.L. Therese, et al. (2018), "Application of six multiplex PCR's among 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for the detection of 20 drug resistance encoding genes", *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **34**(2), pp.79-88.

[10] J.M. Rodriguez-Martinez, L. Poirel, P. Nordmann (2009), "Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**(5), pp.1766-1771.

[11] G.A. Jacoby (2009), "AmpC beta-lactamases", *Clin. Microbiol. Rev.*, **22**(1), pp.161-182.

[12] M. Berrazeg, K. Jeannot, V.Y. Ntsogo Enguene, et al. (2015), "Mutations in beta-Lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**(10), pp.6248-6255.

[13] N. Woodford, J. Zhang, M.E. Kaufmann, et al. (2008), "Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom", *J. Antimicrob. Chemother.*, **62**(6), pp.1265-1268.

[14] S. Amirkamali, T. Naserpour-Farivar, K. Azarhoosh, Amir Peymani (2017), "Distribution of the blaOXA and resistance patterns of ESBL-producing, blaVEB-1, and blaGES-1 *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran", *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **50**(3), pp.315-320.

[15] T.A. Leski, U. Bangura, D.H. Jimmy, et al. (2013), "Identification of blaOXA-(5)(1)-like, blaOXA-(5)(8), blaDIM-(1), and blaVIM carbapenemase genes in hospital *Enterobacteriaceae* isolates from Sierra Leone", *J. Clin. Microbiol.*, **51**(7), pp.2435-2438.

Nghiên cứu khả năng chịu hạn của 6 giống lúa mùa ở giai đoạn sinh dưỡng trong điều kiện hạn nhân tạo

Lưu Hoài Nam*, Nguyễn Hoài Thanh, Võ Công Thành

Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 6/5/2019; ngày chuyển phản biện 10/5/2019; ngày nhận phản biện 19/6/2019; ngày chấp nhận đăng 26/6/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm hiểu sự thích ứng về biểu hiện sinh hóa của 6 giống lúa mùa đáp ứng trong điều kiện hạn giai đoạn sinh dưỡng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thừa số hai nhân tố khối hoàn toàn ngẫu nhiên, nhân tố thứ nhất là 6 giống lúa: Nàng Quýt, Nàng Chá Rần, Huyết Rồng, Bông Hường, Trắng Tép và Một Bụi Đỏ (giống Nàng Keo Chùm được sử dụng làm đối chứng nhạy cảm với hạn); nhân tố thứ hai là 2 điều kiện tưới (đủ nước, không tưới nước) với 3 lần lặp lại. Bài báo nghiên cứu về sự thay đổi các đặc tính sinh hóa trong điều kiện hạn so với đủ nước. Kết quả cho thấy, để thích ứng trong điều kiện hạn, 6 giống lúa có sự tích lũy cao hàm lượng chlorophyll, đường tổng số và proline trong lá. Hàm lượng chlorophyll a giảm 1,36 lần, chlorophyll b tăng 1,79 lần, chlorophyll tổng tăng 1,36 lần, đường tổng số tăng 1,70 lần, proline tăng 4,44 lần. Hai giống (Một Bụi Đỏ và Nàng Quýt) có hàm lượng đường tổng số và proline cao nhất ở điều kiện hạn. Đường tổng số và proline có hệ số tương quan thuận, proline là yếu tố quyết định khả năng chịu hạn.

Từ khóa: chịu hạn, giai đoạn sinh dưỡng, hệ số di truyền, sinh hóa.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực quan trọng cung cấp nhu cầu dinh dưỡng cho nửa triệu người trên thế giới và rất dễ bị ảnh hưởng bởi điều kiện khô hạn [1]. Hạn là một trong những yếu tố ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất lúa và đang trở thành vấn đề ngày càng nghiêm trọng ở nhiều nơi trên thế giới [2]. Ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, đợt hạn hán năm 1998 đã khiến gần 247.850 ha lúa bị ảnh hưởng, trong đó 32.000 ha bị mất trắng. Từ năm 2000 đến nay, tình trạng hạn hán đã liên tục xảy ra vào các năm 2002, 2004, 2005, 2006, 2009, 2015 và 2016 [3]. Tuy nhiên, đợt hạn hán và xâm nhập mặn vào mùa khô năm 2016 gây ảnh hưởng lớn nhất, toàn vùng Đồng bằng sông Cửu Long đã có đến 208.000 ha lúa bị thiệt hại, trong đó 60% bị thiệt hại nặng và nhiều vùng bị mất trắng. Người ta đã hoạch định một thứ tự ưu tiên cho đầu tư nghiên cứu tính chống chịu khô hạn, chịu mặn và chịu ngập úng trong lĩnh vực cải tiến giống cây trồng trên toàn thế giới [4]. Do đó, việc cải tiến giống và kỹ thuật canh tác đã và đang được đặt ra, việc sử dụng giống lúa có khả năng thích nghi và chống chịu cao là

một biện pháp tiết kiệm nước hữu hiệu nhất. Giống như các loài khác, sức chống chịu của lúa rất kém trong điều kiện khan hiếm nước, đặc biệt là trong giai đoạn sinh trưởng. Sự thiếu hụt nước có ảnh hưởng rất lớn đến sự khác biệt về: hình thái, sinh hóa trong vòng đời cây trồng (đặc biệt ở lúa), thiếu nước ảnh hưởng đến cả giai đoạn sinh trưởng lẫn sinh sản [5]. Nhiều nghiên cứu về sự thích ứng của cây lúa trong điều kiện hạn đã được thực hiện, như sự thay đổi hàm lượng chlorophyll, đường tổng số, proline trong lá, ảnh hưởng của hạn đến các đặc tính lá, rễ [6-8]. Cây trồng khi gặp stress hạn sẽ điều chỉnh áp suất thẩm thấu bằng cách tổng hợp các chất có vai trò thẩm thấu như proline, đường tổng số... Mặt khác, những giống lúa mùa là những giống truyền thống được người dân trồng suốt nhiều năm qua cũng chịu ảnh hưởng nghiêm trọng của hạn hán. Để nâng cao chất lượng và ổn định sản lượng lúa trong điều kiện khô hạn, nhằm giảm thiểu thiệt hại do hạn hán gây ra, việc chọn tạo giống lúa có khả năng chịu hạn là yêu cầu cấp thiết hiện nay. Kết quả thí nghiệm trên bộ giống lúa mùa đã thanh lọc hạn sơ bộ trong năm 2017 cho thấy có 6 giống lúa có khả năng chịu hạn tốt [9].

*Tác giả liên hệ: Email: namm4117004@gstudent.ctu.edu.vn

The adaptability of six seasonal rice varieties at the growth stage in artificial drought conditions

Hoai Nam Luu*, Hoai Thanh Nguyen, Cong Thanh Vo

Department of Genetics and Plant Breeding,
College of Agriculture, Can Tho University

Received 6 May 2019; accepted 26 June 2019

Abstract:

This study was conducted to investigate the biochemical adaptability of six rice varieties under drought stress during the growth stage. Experiment units were arranged according to the two-factor randomized complete block design: the first factor was six rice varieties (Nang Quot, Nang Cha Ran, Huyet Rong, Bong Huong, Trang Tep, and Mot Bui Do), and the other was irrigation conditions (irrigated, drought stress); the study was carried out with three replications. The Nang Keo Chum was used as the drought-sensitive control. The results showed a high accumulation of chlorophyll, total sugar, and proline in leaves of the six rice varieties to adapt well to the drought conditions. "Chlorophyll a" content decreased by 1.36 times, "chlorophyll b" content increased by 1.79 times, total chlorophyll content increased by 1.36 times, total sugar content increased by 1.70 times, and proline content increased by 4.4 times. In particular, the two varieties Mot Bui Do and Nang Quot had the highest total sugar and proline accumulation. Total sugar and proline showed a positive correlation coefficient, and proline was the key factor to determine the a drought tolerance.

Keywords: biochemical, drought tolerance, growth stage, heritability.

Classification number: 4.1

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tiếp tục tìm hiểu biểu hiện về chỉ tiêu sinh hóa của 6 giống lúa nêu trên đáp ứng trong điều kiện khô hạn giai đoạn sinh trưởng dinh dưỡng (giai đoạn này chỗi tích cực).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hạt của 6 giống lúa mùa (bảng 1) nhận từ Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng - Trường Đại học Cần Thơ, giống đối chứng Nang Keo Chùm được trồng từ tháng 4/2018 tại nhà lưới có mái che thuộc Bộ môn Di truyền và Chọn giống cây trồng.

Bảng 1. Danh sách các giống lúa được sử dụng.

Giống	Nguồn
Nàng Quot	Tiền Giang
Nàng Chá Rắn	Tiền Giang
Huyết Rồng	Cà Mau
Bông Hương	Trà Vinh
Trắng Tép	Bến Tre
Một Bui Đỏ	Bạc Liêu
Nàng Keo Chùm	Bến Tre

Bố trí thí nghiệm: đất trồng được phơi khô, làm nhuyễn, loại bỏ các tạp chất, sau đó được bổ sung thêm cát (tỷ lệ 6 cát:4 đất). Đất được cho vào chậu, các chậu sau đó được làm ẩm bằng cách tưới một lượng nước đồng nhất.

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp Uga (2012) [10]. Hạt sau khi nảy mầm được gieo vào chậu, mỗi cây/chậu. Thí nghiệm bố trí theo kiểu thừa số hai nhân tố khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 giống, 2 điều kiện tưới (đủ nước, không tưới nước) với 3 lần lặp lại. Nghiệm thức đối chứng được tưới nước thường xuyên, nghiệm thức gây hạn nhân tạo sau khi gieo các chậu không được tưới nước cho đến khi cây có biểu hiện hạn.

Các chậu được bổ sung phân bón theo công thức 100 N - 60 P₂O₅ - 60 K₂O/ha, bón vào thời điểm bón lót trước khi gieo. Ở điều kiện hạn, không tưới nước từ ngày cấy vào chậu cho đến khi có biểu hiện hạn.

Chỉ tiêu theo dõi: đo độ ẩm đất, thể năng nước, phân tích hàm lượng chlorophyll, đường tổng số, proline trong lá ngay khi cây có biểu hiện hạn.

- Độ ẩm đất (%): đo bằng máy Takemura.

- Hàm lượng chlorophyll: phân tích theo phương pháp Gross (1991) [11]. Hàm lượng chlorophyll được tính theo công thức:

$$\text{Chlorophyll a} = (0,0127 \times \text{OD663}) - (0,00269 \times \text{OD645});$$

$$\text{Chlorophyll b} = (0,0229 \times \text{OD645}) - (0,00468 \times \text{OD663});$$

$$\text{Chlorophyll tổng} = (0,0202 \times \text{OD645}) + (0,00802 \times \text{OD663}).$$

Trong đó: OD663, OD645 là giá trị hấp thụ đo ở bước sóng 663 và 645 nm.

- Hàm lượng đường tổng số: phân tích theo phương pháp Cagampang và Rodriguez (1980) [12].

- Hàm lượng proline: phân tích theo phương pháp Bates, et al. (1973) [13].

- Đánh giá độ cuộn lá ở 42 ngày sau khi gieo theo phương pháp IRRI (1996) [14].

Phân tích thống kê: số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 21.0, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

Kết quả và thảo luận

Diễn biến độ ẩm đất và khả năng chịu hạn của 6 giống lúa

Kết quả theo dõi độ ẩm đất ở nghiệm thức hạn nhân tạo (bảng 2) cho thấy, ở 42 ngày sau khi gieo độ ẩm đất giảm xuống thấp còn 10%, với độ ẩm này cả 6 giống lúa không hút được nước trong đất, cây bị mất nước, lá bắt đầu cuộn lại. So với giống Nàng Keo Chùm thì hai giống Một Bụi Đỏ và Nàng Quýt bị hạn với độ ẩm đất thấp hơn. Độ ẩm đất có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát hạn hán, khi độ ẩm đất thấp hơn một giới hạn nào đó, thực vật không hút đủ nước thì sẽ bị hạn [3]. Bốn giống lúa đều có biểu hiện hạn với độ ẩm đất <14%, kết quả này phù hợp với kết quả thí nghiệm hạn của Trần Nguyên Tháp (2001) [15].

Bảng 2. Sự thay đổi độ ẩm đất (%), thế năng nước (kPa) và pH ở nghiệm thức hạn nhân tạo.

Chỉ tiêu	21 ngày sau gieo	28 ngày sau gieo	35 ngày sau gieo	42 ngày sau gieo
Độ ẩm	80	73,3	40	10
Thế năng nước	-4,67	-8,16	-15,16	-19,67
pH	4,63	5,03	5,23	5,3

Thế năng nước của đất ở mức -9 kPa được đánh giá là ngưỡng bước vào stress hạn của thực vật, ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây. Năng suất lúa thường giảm khi thế năng nước của đất duy trì trong khoảng -10 kPa đến -40 kPa. Qua kết quả cho thấy, giai đoạn từ 35 đến 42 ngày sau gieo trung bình thế năng nước từ -15,16 kPa đến -19,67 kPa nằm trong mức gây hại cho cây lúa.

Kết quả đánh giá độ cuộn lá cho thấy, từ 35-40 ngày sau khi gieo 6 giống lúa bị hạn biểu hiện ở những cấp độ khác nhau, 3 giống Nàng Keo Chùm, Bông Hường, Nàng Quýt có biểu hiện hạn sớm nhất ở cấp 3 lá gấp sâu hình chữ V, trong khi đó giống Một Bụi Đỏ chưa có biểu hiện cho đến một tuần sau ở cấp 5 có lá hình chữ U.

Cuộn lá là một trong những cơ chế giúp cây thoát khỏi hạn hán [16] bằng cách điều chỉnh tiềm năng nước trong lá, cho phép cây hấp thụ nước trong đất tốt hơn trong điều kiện hạn, cuộn lá giúp làm giảm sự hấp thụ ánh sáng, thoát hơi nước và mất nước ở lá [17]. Điều này cho thấy, giống Một Bụi Đỏ có khả năng chống chịu hạn tốt hơn so với giống Nàng Keo Chùm do điều chỉnh tiềm năng nước trong lá để

hấp thụ nước trong đất tốt hơn. Cuộn lá là một tiêu chí đánh giá khả năng chịu hạn [18], do đó có thể sử dụng chỉ tiêu này để sàng lọc nhanh chóng hàng trăm dòng lúa [19].

Ảnh hưởng của hạn đến hàm lượng chlorophyll trong lá

Kết quả phân tích hàm lượng chlorophyll (bảng 3) cho thấy, ở 42 ngày sau khi gieo hàm lượng chlorophyll a, b và chlorophyll tổng tăng ở điều kiện hạn so với điều kiện đủ nước.

Khi cây lúa bị hạn, nhìn chung hàm lượng chlorophyll a giảm, trong khi đó hàm lượng chlorophyll b và chlorophyll tổng gia tăng so với điều kiện đủ nước. Khi cây bị hạn, có sự giảm đi hàm lượng chlorophyll a trong lá từ 1,13 đến 1,90 lần trong điều kiện hạn so với đủ nước. Giảm nhiều nhất là giống đối chứng Nàng Keo Chùm (1,90 lần), tiếp đến là Nàng Quýt (1,54 lần), Nàng Chá Rắn (1,41 lần), Trắng Tép (1,33 lần), Huyết Rồng (1,18 lần), Một Bụi Đỏ (1,14 lần) và ít nhất là Bông Hường giảm 1,13 lần.

Khi cây bị hạn, có sự tăng lên của hàm lượng chlorophyll b trong lá từ 1,25 đến 2,92 lần trong điều kiện hạn so với đủ nước. Giống tăng nhiều nhất là Trắng Tép (2,92 lần), tiếp đến là Nàng Chá Rắn (2,80 lần), Nàng Quýt (2,33 lần),

Bảng 3. Hàm lượng chlorophyll a, b và tổng (mg/g) trong lá ở hai điều kiện tại thời điểm 42 ngày sau khi gieo.

Điều kiện	Giống	Chl a	Chl b	Chl tổng
Đủ nước	Nàng Quýt	0,60 ^b	0,15 ^{hi}	0,94 ^d
	Nàng Chá Rắn	0,38 ^f	0,10 ^j	0,41 ^j
	Huyết Rồng	0,39 ^f	0,23 ^f	0,59 ⁱ
	Bông Hường	0,44 ^d	0,18 ^{gh}	0,64 ^h
	Trắng Tép	0,40 ^e	0,13 ^{ij}	0,57 ⁱ
	Một Bụi Đỏ	0,50 ^c	0,21 ^{fg}	0,77 ^g
	Nàng Keo Chùm	0,74 ^a	0,32 ^{de}	1,16 ^a
Hạn	Nàng Quýt	0,39 ^{ef}	0,35 ^{b-d}	0,92 ^d
	Nàng Chá Rắn	0,27 ⁱ	0,28 ^e	0,82 ^f
	Huyết Rồng	0,33 ^g	0,34 ^{cd}	1,00 ^c
	Bông Hường	0,39 ^{ef}	0,36 ^{a-c}	1,08 ^b
	Trắng Tép	0,30 ^h	0,38 ^{ab}	0,87 ^e
	Một bụi đỏ	0,44 ^d	0,28 ^e	0,96 ^d
	Nàng Keo Chùm	0,39 ^f	0,40 ^a	1,18 ^a
F _A		*	*	*
F _B		*	*	*
F _{AxB}		*	*	*
CV (%)		2,14%	11,29%	3,71%

Chl a: chlorophyll a; Chl b: chlorophyll b; Chl tổng: chlorophyll tổng. Trong cùng một cột, những số có chữ số theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt với mức ý nghĩa 5%.

Bông Hường (2,00 lần), Huyết Rồng (1,48 lần), Một Bụi Đỏ (1,33 lần) và ít nhất là Nàng Keo Chùm tăng 1,25 lần.

Khi cây có biểu hiện hạn, 5 giống (Huyết Rồng, Một Bụi Đỏ, Trắng Tép, Bông Hường, Nàng Chá Rắn) có sự gia tăng hàm lượng chlorophyll tổng trong lá ở điều kiện hạn so với đủ nước, kết quả có khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Giống Nàng Quót và Nàng Keo Chùm kết quả không có khác biệt thống kê. Giống tăng nhiều nhất là Nàng Chá Rắn (2,00 lần), tiếp theo là Bông Hường và Huyết Rồng (1,69 lần), Trắng Tép (1,53 lần) và Một Bụi Đỏ (1,25 lần).

Khi lượng nước trong lá giảm vượt qua ngưỡng cho phép, khí khổng đóng lại để làm chậm quá trình thoát hơi nước, làm giảm hàm lượng CO₂, ảnh hưởng đến quá trình quang hợp. Chlorophyll là một chỉ số thể hiện khả năng quang hợp, liên quan trực tiếp đến quá trình tăng trưởng của cây [20]. Trong điều kiện hạn nhân tạo, lá của 6 giống lúa có sự gia tăng hàm lượng chlorophyll so với điều kiện đủ nước, kết quả này phù hợp với nhận xét hàm lượng chlorophyll tăng khi cây bị stress hạn [21], hàm lượng chlorophyll trong lá tăng cao đã tăng cường tính chịu hạn của cây, giúp cây nhanh phục hồi sau hạn [22]. Sự gia tăng khối lượng lục lạp trong tế bào nhu mô lá giúp cây lúa hoàn thành chức năng quang hợp, duy trì sự sống, thích nghi với điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Điều này cho thấy sắc tố quang hợp (chlorophyll) trong lá được tăng cường, giúp cây thích nghi với điều kiện khô hạn.

Ảnh hưởng của hạn đến sự tích lũy hàm lượng đường tổng số trong lá

Hạn hán làm giảm hiệu quả quang hợp, lượng đường cung cấp cho các mô cũng bị ảnh hưởng. Đồng thời với việc đánh giá hàm lượng chlorophyll, hàm lượng đường tổng số và proline cũng được phân tích. Kết quả cho thấy ở 42 ngày sau khi gieo, hàm lượng đường tổng số trong lá tăng cao khác biệt với mức ý nghĩa thống kê 5% so với điều kiện đủ nước (bảng 4).

Có sự tích lũy đường tổng số trong lá khi độ ẩm đất giảm còn 40-45% và tăng cao khi cây bị hạn. Khi bị hạn, hàm lượng đường tổng số trong lá tăng 1,70 lần so với điều kiện đủ nước. Một Bụi Đỏ có hàm lượng đường tổng số cao nhất trong điều kiện hạn (2,03%). Nàng Keo Chùm có sự tích lũy đường tổng số trong lá tăng cao nhất (2,60 lần), tiếp đến là Nàng Quót (2,19 lần), Bông Hường (1,84 lần), Trắng Tép (1,82 lần), Một Bụi Đỏ (1,75 lần) và thấp nhất là Huyết Rồng (1,26 lần). Giống Nàng Chá Rắn có hàm lượng đường tổng số trong lá khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở 2 điều kiện.

Trong điều kiện hạn, sự tích lũy các loại đường sẽ tăng

lên [23], sự gia tăng hàm lượng đường là một trong những chỉ số đánh giá về khả năng chịu hạn [24]. Các giống có khả năng chống chịu hạn thông qua việc tích lũy đường tổng số lên gấp 2-3 lần so với điều kiện không hạn [7]. Trong thời gian bị hạn, đường hoạt động như hợp chất hòa tan điều chỉnh áp suất thẩm thấu, tiềm năng thẩm thấu tế bào được hạ xuống, thu hút nước vào tế bào, giúp duy trì sức trương tế bào, bảo vệ màng tế bào bằng cách tương tác với các phức hợp protein, enzyme và loại bỏ ROS [25], chính vì vậy hoạt động của các cơ quan và tế bào chất diễn ra với tốc độ bình thường [26]. Như vậy, trong điều kiện hạn, 6 giống lúa có sự gia tăng hàm lượng đường tổng số trong lá, giúp điều hòa áp suất thẩm thấu, tăng khả năng chống chịu hạn.

Ảnh hưởng của hạn đến sự tích lũy hàm lượng proline trong lá

Kết quả phân tích hàm lượng proline cho thấy, khi cây bị hạn hàm lượng proline trong lá tăng với mức ý nghĩa thống kê 5% so với điều kiện đủ nước (bảng 4).

Bảng 4. Hàm lượng đường tổng số và proline (mg/g Weight fresh) trong lá ở 2 điều kiện.

Điều kiện	Giống	Đường tổng số	Proline
Đủ nước	Nàng Quót	0,57g	0,127 ^f
	Nàng Chá Rắn	1,04 ^e	0,002 ⁱ
	Huyết Rồng	0,81 ^f	0,028 ^h
	Bông Hường	0,64 ^{fg}	0,004 ⁱ
	Trắng Tép	0,74 ^{fg}	0,025 ^h
	Một Bụi Đỏ	1,16 ^{cd}	0,176 ^e
	Nàng Keo Chùm	0,60 ^g	0,087 ^g
Hạn	Nàng Quót	1,25 ^{cd}	0,286 ^c
	Nàng Chá Rắn	1,12 ^{de}	0,305 ^b
	Huyết Rồng	1,02 ^e	0,210 ^d
	Bông Hường	1,18 ^{cd}	0,129 ^f
	Trắng Tép	1,35 ^c	0,309 ^b
	Một Bụi Đỏ	2,03 ^c	0,520 ^a
	Nàng Keo Chùm	1,56 ^b	0,289 ^c
F _A		*	*
F _B		*	*
F _{AxB}		*	*
CV (%)		10,13%	4,11%

Trong cùng một cột, những số có chữ số theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê, *: khác biệt với mức ý nghĩa 5%.

Hàm lượng proline trong lá tăng cao khi cây bị hạn, tăng 4,44 lần so với điều kiện đủ nước. Một Bụi Đỏ có hàm lượng proline trong điều kiện hạn cao nhất (hàm lượng proline lên đến 0,52%). Hàm lượng proline của các giống tăng từ

2,25-152,5 lần trong điều kiện hạn so với đủ nước, trong đó giống Nàng Chá Rắn tăng nhiều nhất (152,5 lần), tiếp đến là Bông Hường (32,25 lần), Trắng Tép (12,36 lần), Huyết Rồng (7,50 lần), Nàng Keo Chùm (3,32 lần), Một Bụi Đỏ (2,95 lần) và tăng ít nhất là Nàng Quót (2,25 lần). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả cho rằng hàm lượng proline tăng đáng kể khi cây bị hạn [27, 28].

Proline là một trong những chỉ số về khả năng chống chịu hạn [29, 30]. Sự tích lũy proline trong điều kiện stress ở nhiều loài tương quan với khả năng chống chịu [31]. Ở thực vật, tổng hợp proline diễn ra trong bào tương và trong plastid. Chất proline được hình thành từ glutamate, sau đó được chuyển thành proline bởi hai bước liên tiếp được xúc tác bởi pyrroline-5-carboxylatesynthetase (P5CS) và P5C reductase (P5CR). Sự suy giảm proline xảy ra trong ty thể do việc đảo ngược hoạt động của proline dehydrogenase (PDH) và pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) [32]. Các biểu hiện của gen này giúp tăng cường đáng kể hàm lượng proline nội sinh và làm tăng khả năng chịu hạn [30, 33]. Proline có vai trò đa năng trong việc bảo vệ thực vật khi gặp stress, tích trữ năng lượng điều chỉnh các quá trình oxy hóa khử tiềm ẩn, một chất loại bỏ ROS. Một số dẫn liệu cho thấy, việc tăng cường tổng hợp proline giúp duy trì trạng thái cân bằng NADPH/NADP⁺, ổn định trạng thái oxy hóa khử, ngăn ngừa tổn thương bộ máy quang hợp [34]. Như vậy, 6 giống lúa có sự tích lũy cao hàm lượng proline trong lá để tăng khả năng chống chịu hạn.

Hệ số tương quan giữa các chỉ tiêu sinh hóa

Qua kết quả phân tích tương quan (bảng 5) ta thấy, hàm lượng chlorophyll tổng không có mối tương quan với hàm lượng đường tổng số và proline. Hàm lượng đường tổng số và hàm lượng proline có mối tương quan thuận với nhau. Khi tăng tích lũy đường tổng số sẽ làm gia tăng hàm lượng proline trong lá. Đường hoạt động giống như hợp chất hoà tan điều chỉnh áp suất thẩm thấu, góp phần gia tăng tích lũy proline, giúp 6 giống lúa (kể cả giống đối chứng) tăng khả năng thích nghi với điều kiện hạn. Do vậy, hàm lượng proline là yếu tố quyết định khả năng chịu hạn của các giống lúa.

Bảng 5. Hệ số tương quan giữa các đặc tính sinh hóa.

Biến	Chl a	Chl b	Chl tổng	Đường tổng	Proline
Chl a	1	0,727	0,945**	0,196	0,419
Chl b	0,727	1	0,889**	-0,110	-0,059
Chl tổng	0,945**	0,889**	1	0,016	0,184
Đường tổng số	0,196	-0,110	0,016	1	0,865*
Proline	0,419	-0,059	0,184	0,865*	1

Ghi chú: * khác biệt mức ý nghĩa 5%, ** khác biệt mức ý nghĩa 1%

Kết luận và đề nghị

Kết luận

Nghiên cứu cho thấy, hàm lượng đường tổng số và proline có mối tương quan thuận với nhau, trong đó hàm lượng proline là yếu tố quyết định khả năng chịu hạn của các giống lúa.

Để thích ứng trong điều kiện hạn, 6 giống lúa có sự tích lũy cao hàm lượng chlorophyll, đường tổng số và proline trong lá. Hàm lượng chlorophyll tổng tăng 1,36 lần, hàm lượng đường tổng số tăng 1,70 lần, hàm lượng proline tăng 4,44 lần. So với Nàng Keo Chùm, hai giống Một Bụi Đỏ và Nàng Quót có hàm lượng đường tổng số, proline trong điều kiện hạn cao nhất.

Đề nghị

Bài báo này đã nghiên cứu hạn trong giai đoạn nảy chồi tích cực (42 ngày sau khi gieo) trước khi giai đoạn phân hoá đồng xảy ra, do đó cần tiến hành nghiên cứu tiếp tục khả năng chịu hạn ở các giai đoạn khác của cây lúa như giai đoạn sinh sản, từ lúc phân hoá mầm hoa đến trổ, từ trổ đến chín thu hoạch cũng như khả năng phục hồi khi stress xảy ra. Bên cạnh đó, cần nghiên cứu dấu chỉ thị phân tử DNA trên hai giống lúa mùa Nàng Quót và Một Bụi Đỏ. Đây là lần đầu nghiên cứu hạn trên giống lúa mùa nên sử dụng giống Nàng Keo Chùm làm đối chứng hạn để phân tích ở mức sinh học phân tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Wang, A. Yang, H. Yin, and J. Zhang (2008), "Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings", *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**(4), pp.427-434.
- [2] J.B. Passioura (2007), "The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives", *Journal of Experimental Botany*, **58**(2), pp.113-117.
- [3] Lê Huy Bá, Lương Văn Liệt và Nguyễn Xuân Hoàn (2017), *Khó hạn, xâm nhập mặn ở Đồng bằng sông Cửu Long: Cơ sở lý luận và thực tiễn*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [4] Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang (2003). *Cơ sở di truyền tính chống chịu đối với thiệt hại do môi trường của cây lúa*, Nhà xuất bản Nông nghiệp TP Hồ Chí Minh.
- [5] S. Pandey, H. Bhandari, R. Sharan, S. Ding, P. Prapertchod, D. Naik, and K.S. Taunk (2005), "Coping with drought in agriculture of developing countries: insights from rice farming in Asia", *Proceedings of the 2nd International Conference on Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress*, University of Rome, "La Sapienza", Rome, Italy.
- [6] B. Courtois, G. McLaren, P.K. Sinha, K. Prasad, R. Yadav, L. Shen (2000), "Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice", *Molecular Breeding*, **6**, pp.55-66.

- [7] C.M. Maisura, I. Lubis, A. Junaedinand, H. Ehara (2014), "Some physiological character responses of rice under drought conditions in a paddy system", *J. Int. Soc. Southeast Asian Agric. Sci.*, **20(1)**, pp.104-114.
- [8] J.B. Passioura (2007), "The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives", *Journal of Experimental Botany*, **58(2)**, pp.113-117.
- [9] Dương Tuấn Đạt (2018), *Bước đầu đánh giá khả năng chịu hạn của bộ giống lúa mùa của Khoa Nông nghiệp*, Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành nông học, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ, 47 trang.
- [10] Y. Uga (2012), *Quantitative measurement of root growth angle by using the basket method. Methodologies for root drought studies in rice*, International Rice Research Institute, pp.22-26.
- [11] J. Gross (1991), *Pigment in vegetables*, Van Nostrand Reinhold, New York.
- [12] G.B. Cagampang and F.M. Rodriguez (1980), *Methods of analysis for screening crops of appropriate qualities* (No.2), Analytical Services Laboratory, Institute of Plant Breeding, University of the Philippines at Los Banos.
- [13] L.S. Bates, R.P. Waldren and I.D. Teare (1973), "Rapid determination of free proline for water-stress studies", *Plant and Soil*, **39(1)**, pp.205-207.
- [14] IRRI (1996), *International Network for Genetic E-valuation of Rice: Standard Evaluation System for Rice*.
- [15] Trần Nguyên Thập (2001), *Nghiên cứu xác định một số đặc trưng của các giống lúa chịu hạn và chọn tạo giống lúa chịu hạn CH5*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp ngành chọn và nhân giống, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp.
- [16] M. Dingkuhn, R.T. Cruz, J.C. O'Toole, N.C. Turner, K. Doerffling (1991), "Responses of seven diverse rice cultivars to water deficits. III. Accumulation of abscisic acid and proline in relation to leaf water-potential and osmotic adjustment", *Field Crops Research*, **27(1-2)**, pp.103-117.
- [17] A. Kadioglu, R. Terzi (2007), "A dehydration avoidance mechanism: Leaf rolling", *Botanical Review*, **73(4)**, pp.290-302.
- [18] B. Singh, A. Bohra, S. Mishra, R. Joshi, S. Pandey (2015), "Embracing new-generation 'omics' tools to improve drought tolerance in cereal and food-legume crops", *Biol. Plant*, **59**, pp.413-428.
- [19] R. Lafitte, A. Blum, G. Atlin (2003), "Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes", *Breeding rice for drought-prone environments*, IRRI, pp.37-48.
- [20] R.C. Nageswara Rao, H.S. Talwar, G.C. Wright (2001), "Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using chlorophyll meter", *Journal of Agronomy and Crop Science*, **189**, pp.175-182.
- [21] L. Yanqiong, L. Xingliang, Z. Shaowei, C. Hong, Y. Yongjie, M. Changlong, L. Jun (2007), "Drought-resistant physiological characteristics of four shrub species in arid valley of Minjiang River", *China Acta Ecologica Sinica*, **27(3)**, pp.870-877.
- [22] G.C. Percival, K. Noviss (2008), "Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*)", *Tree Physiol.*, **28(11)**, pp.1685-1692.
- [23] Y. Kovtun, W.L. Chiu, G. Tena, J. Sheen (2000), "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **97**, pp.2940-2945.
- [24] B. Nohong (2015), "Effect of water stress on growth, yield, proline and soluble sugars contents of Signal grass and Napier grass species", *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, **9**, pp.14-21.
- [25] D.E.W. Van, R. Valluru (2009), "Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?", *J. Exp. Bot.*, **60**, pp.9-18.
- [26] G.V. Subbarao, O. Ito, R. Serraj, J.J. Crouch, S. Tobita, K. Okada, C.T. Hash, R. Ortiz, W.L. Berry (2005), *Physiological perspectives on improving crop adaptation to drought-justification for a systematic component-based approach*, Handbook of Photosynthesis, New York.
- [27] A.R. Abbasi, R. Sarvestani, B. Mohammadi, A. Bagheri (2014), "Drought Stress Induced Changes at Physiological and Biochemical Levels in Some Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Genospecies", *Journal of Agricultural Science and Technology*, **16**, pp.505-516.
- [28] M.S. Lum, M.M. Hanafi, Y.M. Rafii, A.S.N. Akmar (2014), "Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice", *J. Anim. Plant Sci.*, **24(5)**, pp.1487-1493.
- [29] C.A. Jaleel, R. Gopi, B. Sankar, P. Manivannan, A. Kishorekumar, R. Sridharan, R. Panneerselvam (2007), "Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism", *South Afr. J. Bot.*, **73**, pp.190-195.
- [30] A.C.G. Vendruscolo, I. Schuster, M. Pileggi, S. Scapim, H.B.C. Molinari, C.J. Marur, L.G.C. Vieira (2007), "Stress-induced synthesis of praline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat", *J. Plant Physiol.*, **164(10)**, pp.1367-1376.
- [31] M. Ashraf, M. Foolad (2007), "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance", *Environmental and Experimental Botany*, **59(2)**, pp.206-216.
- [32] V. Kumar, V. Shriram, M.A. Hossain, P.K. Kishor (2015), "Engineering proline metabolism for enhanced plant salt stress tolerance", *Managing salt tolerance in plants: molecular and genomic perspectives*.
- [33] J. Su, R. Wu (2004), "Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis", *Plant Sci.*, **166**, pp.941-948.
- [34] Nguyễn Văn Mã (2015), *Sinh lý chống chịu điều kiện môi trường bất lợi của thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

Xác định môi trường và kỹ thuật phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai)

Nguyễn Thị Hồng¹, Lê Minh Sát^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Gấm²

¹Công ty Cổ phần dược thảo Thiên Phúc

²Trường Đại học Lâm nghiệp

Ngày nhận bài 29/10/2018; ngày chuyển phản biện 2/11/2018; ngày nhận phản biện 6/12/2018; ngày chấp nhận đăng 14/12/2018

Tóm tắt:

Trong bài báo này, các tác giả đã nghiên cứu kỹ thuật phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trong môi trường nhân tạo. Từ quả thể nấm Đông trùng hạ thảo thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn, đã phân lập được 24 chủng giống gốc và tiến hành nhân giống cấp 1 và 2 các chủng giống trong môi trường nhân tạo. Kết quả cho thấy, công thức khử trùng quả thể nấm cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (92,86%) là dùng cồn 70% trong 1 phút và cefotaxim 0,4 mg/ml trong 1 phút. Môi trường nhân giống cấp 1 hiệu quả là: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + KNO_3 1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Môi trường gồm đường glucose 10 g/l + nhộng tằm 100 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + KNO_3 1 g/l + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 10 g/l + vitamin B₁ 0,2 g/l + vitamin B₈ 0,2 g/l phù hợp để nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo. Kết quả là cơ sở khoa học quan trọng, tạo tiền đề cho sản xuất giống nấm Đông trùng hạ thảo phục vụ nhu cầu về giống nấm chất lượng cao ngày một lớn hiện nay.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, nấm Đông trùng hạ thảo, nhân giống, phân lập giống gốc.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là loài nấm thuộc họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps*. Loài này được Carl Linnaeus mô tả vào năm 1753 với tên gọi *Clavaria militaris* [1]. *C. militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng và ấu trùng của côn trùng. Loài này chủ yếu lây nhiễm ở giai đoạn nhộng của các loài bướm khác nhau, rồi nhân lên trong cơ thể ký chủ vào mùa đông. Bào tử nấm theo gió dính vào bên ngoài ký chủ, sau đó từ bào tử hình thành các ống, nảy mầm có các thể bám. Các ống này tiết ra các enzyme như lipase, chitinase, protease làm tan vỏ ngoài của ký chủ và xâm nhập vào bên trong cơ thể. Sau đó, hệ sợi nấm hút dinh dưỡng và sinh trưởng mạnh mẽ chiếm toàn bộ cơ thể và gây chết ký chủ. Đến mùa hè quả thể nhô ra ngoài để phát tán bào tử vào không khí [1].

Các hợp chất được liệu của nấm *C. militaris* đã được ứng dụng trong điều trị bệnh và nâng cao sức khỏe con người. Hợp chất cordycepin (3'-deoxyadenosine) từ nấm cho thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật, ung thư, ngừa di căn, điều hòa miễn dịch [2]. Hợp chất CM-hs-CPS2 có tính kháng DPPH,

hoạt tính khử và tạo phức ở nồng độ (8 mg/ml) là 89% [3]. Acidic polysaccharide (APS) có khả năng ứng dụng trong điều trị cúm A và góp phần điều hòa hoạt động miễn dịch của các đại thực bào [4]. Protein (CMP) có kích thước 12 kDa, pI 5,1 và có hoạt tính trong khoảng pH 7÷9, ức chế nấm *Fusarium oxysporum* và gây độc đối với tế bào ung thư bàng quang [5]. Hợp chất cordycepin có khả năng kháng vi khuẩn *Clostridium*. Các hợp chất dẫn xuất từ nấm được ứng dụng trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột [6]. Cordycepin ngăn sự biểu hiện của gen T2D chịu trách nhiệm điều hòa bệnh tiểu đường thông qua việc ức chế các đáp ứng phản ứng viêm phụ thuộc NF- κ B, hy vọng sẽ ứng dụng được như một chất điều hòa miễn dịch dùng trong điều trị các bệnh về miễn dịch [7]. Enzyme tiêu sợi huyết tách chiết từ nấm *C. militaris* có hoạt tính gắn fibrin, xúc tiến việc phân hủy fibrin. Enzyme này có khả năng sử dụng trong điều trị tan huyết khối tương tự như các enzym fibrinolytic mạnh khác như nattokinase và enzyme chiết từ giun đất. Khi enzyme này có thể sản xuất ở quy mô lớn sẽ là một giải pháp thay thế hữu hiệu cho các enzym fibrinolytic giá thành cao hiện đang được sử dụng cho bệnh tim lão hóa

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

Determination of the environment and techniques of isolating the *Cordyceps militaris* collected in Hoang Lien Son National Park (Lao Cai)

Thi Hong Nguyen¹, Minh Sat Le^{1*},
Thi Hong Gam Nguyen²

¹Thien Phuc Medicinal Herbs Joint Stock Company

²Vietnam National University of Forestry

Received: 29 October 2018; accepted 14 December 2018

Abstract:

We have researched techniques for isolation and propagation of *Cordyceps militaris* in artificial culture media. From the fruit bodies of the fungus collected in the Hoang Lien National Park, 24 strains were isolated and rapidly multiplied in the artificial culture medium. The results showed that the highest percentage of fungal isolates (92.86%) was gained using 70% alcohol for 1 minute and cefotaxime 0.4 mg/ml for 1 minute. The effective medium for level 1 propagation included: Agar 10 g/l + Potato extracts (1 g potatoes/1 ml extract) 200 ml/l + sucrose 20 g/l + KH_2PO_4 0.5 g/l + K_2HPO_4 0.5 g/l + KNO_3 1 g/l + Pepton 5 g/l + Yeast 5 g/l. And the culture medium which included: Glucose 10 g/l + silkworm 100 g/l + KH_2PO_4 0.5 g/l + K_2HPO_4 0.5 g/l + KNO_3 1 g/l + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l + Pepton 5 g/l + Yeast extract 10 g/l + Vitamin B₁ 0.2 g/l + Vitamin B₈ 0.2 g/l was suitable for level 2 propagation of *C. militaris*. This finding is an important scientific evidence to create a premise for the production of *C. militaris* seedlings to serve the demand of high quality mushroom.

Keywords: *Cordyceps militaris*, isolation, mushroom, propagation.

Classification number: 4.1

ở người [8]. Dịch chiết từ quả thể nấm *C. militaris* (CMWE) được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) (chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide), việc phóng thích yếu tố hoại tử khối u α (TNF- α) và interleukin-6 (IL-6) của tế bào RAW 264,7. Các đại thực bào được xử lý với nồng độ CMWE khác nhau làm giảm đáng kể LPS, TNF- α , IL-6 và mức độ giảm theo nồng độ của dịch chiết. Những kết quả này cho thấy, CMWE có tác dụng ức chế mạnh đến việc sản xuất các chất trung gian gây viêm của tế bào [9]. Các polysaccharide CPS-1 và CPS-2 được tách chiết từ nấm *C. militaris* có thành phần từ các đơn phân là các đường monosaccharide, mannose và galactose. Hai polysaccharide này có khả năng phục hồi các tổn thương gan do ethanol và tác dụng này tăng lên khi tăng liều dùng chiết xuất [10]. *C. militaris* đã được trồng ở quy mô lớn do nó có được tính rất tốt và có thời gian sản xuất ngắn. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo ở Việt Nam còn nhiều hạn chế so với các nước trên thế giới. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định được công thức khử trùng trong phân lập giống gốc nấm, môi trường nhân giống cấp 1 và nhân giống cấp 2 hiệu quả, có thể áp dụng vào sản xuất đại trà tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai) ở các vị trí và cơ chất khác nhau, được ký hiệu thành 26 dòng riêng biệt. Hình 1 là một số vật liệu nghiên cứu được thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn.



Hình 1. Quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) dùng để phân lập giống gốc.

Khoai tây, đường sucrose, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Pepton, cao nấm men (Yeast extract), vitamin B_1 , vitamin B_8 , cồn tuyệt đối, cefotaxime.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị môi trường phân lập giống gốc, nhân giống cấp 1: khoai tây gọt vỏ, rửa sạch, thái mỏng, cho vào nồi (định lượng 200 g khoai tây/1 lít môi trường). Cho nước vào nồi, đun khoai tây cho đến khi sôi; giảm lửa, đun tiếp cho đến khi khoai chín nhừ; tắt bếp, đổ chất lấy nước dịch chiết khoai tây. Cho đường sucrose và các chất (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , Pepton, cao nấm men, vitamin B_1 , vitamin B_8) vào dịch chiết khoai và khuấy cho đường và các chất tan hoàn toàn. Dẫn nước cất vào trong cốc đựng chứa hỗn hợp môi trường dinh dưỡng đến vạch 1.000 ml. Môi trường được chuẩn pH đến 7,0 bằng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N. Cho hỗn hợp môi trường dinh dưỡng vào nồi, đun đến nhiệt độ 60°C (có bọt lăn tăn dưới đáy nồi) thì cho từ từ agar vào nồi, cho đến đâu thì khuấy cho agar tan đến đáy. Tiếp tục đun cho đến khi nồi dịch môi trường tan hoàn toàn, tạo thành dịch đồng nhất. Rót môi trường vào trong bình 500 ml, đậy nắp bình và cho vào nồi hấp thanh trùng 118°C trong 20 phút. Khử trùng xong, để bình môi trường nguội đến 40°C rồi rót môi trường vào đĩa petri (15 ml/đĩa), để môi trường đông đặc, đậy nắp đĩa petri. Bảo quản đĩa môi trường ở nhiệt độ phòng ($\leq 25^\circ\text{C}$), sử dụng trong vòng 7 ngày.

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp 2: cân chính xác các loại hóa chất cần thiết (đường glucose, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Pepton, cao nấm men, vitamin B_1 , vitamin B_8) rồi cho từng chất vào cốc chứa nước sạch; khuấy cho tan hoàn toàn. Dẫn nước cất vào trong cốc đựng chứa hỗn hợp môi trường dinh dưỡng đến vạch 1.000 ml. Môi trường được chuẩn pH đến 7,0 bằng dung dịch NaOH 1N hoặc HCl 1N. Rót môi trường vào trong bình trụ (200 ml/bình), đậy nắp bình và cho vào nồi hấp thanh trùng 118°C trong 20 phút. Khử trùng xong, để bình môi trường nguội đến nhiệt độ phòng ($\leq 25^\circ\text{C}$), sử dụng trong vòng 7 ngày.

Phân lập giống gốc nấm: quả thể nấm Đông trùng hạ thảo được mang về phòng thí nghiệm dùng bông tăm thấm nước cất đã khử trùng để rửa đất, bụi bẩn bám bên ngoài. Sau đó, ngâm quả thể nấm trong ống đựng cồn 70% trong vòng 30 giây đến 1 phút. Loại bỏ cồn, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 2 lần. Tiếp theo, ngâm quả thể nấm trong ống đựng dung dịch cefotaxim (4 mg/ml) từ 30 giây đến 2 phút. Loại bỏ dung dịch cefotaxim, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 2 lần. Thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Dùng dao vô trùng cắt mẫu thành những phần 2×2 mm, rồi dùng panh vô trùng kẹp lấy mẫu cấy đặt trên bề mặt đĩa môi trường phân lập mẫu (2÷3 mảnh mẫu/đĩa petri). Dán kín

mép đĩa petri, đặt nuôi đĩa mẫu ở điều kiện nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$ và không có ánh sáng.

Kỹ thuật nhân giống cấp 1: dùng dao cấy vô trùng cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm (5×5 mm) trên bề mặt đĩa; dùng panh kẹp vô trùng để lấy mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm cấy đặt lên đĩa môi trường nhân giống cấp 1 (1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc/đĩa petri). Dán kín mép đĩa petri, đặt nuôi đĩa mẫu ở nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$ và không có ánh sáng.

Kỹ thuật nhân giống cấp 2: dùng dao cấy vô trùng cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống cấp 1 (1×1 cm); dùng panh kẹp vô trùng để lấy mảnh thạch mang hệ sợi giống cấp 1 thả vào bình môi trường nhân giống cấp 2. Đóng chặt nắp bình và để lên trên khay kẹp bình mẫu của máy lắc nuôi mẫu. Nuôi mẫu ở điều kiện nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng yếu (< 500 lux), độ ẩm 62-65%, vận tốc máy lắc mẫu 180-200 vòng/phút cho hệ sợi nấm ăn lan trong bình môi trường nhân giống cấp 2.

Kỹ thuật bảo quản giống gốc nấm: dùng dao cấy cắt 1 mảnh thạch mang hệ sợi giống gốc nấm (2×2 mm) trên bề mặt đĩa; dùng panh kẹp để lấy phần hệ sợi giống gốc nấm phía trên mặt thạch cho vào trong ống eppendorf chứa môi trường dinh dưỡng; dùng pipet hút 500 μl glycerol 10% cho lên phía trên ống eppendorf đã cấy giống; đóng chặt nắp ống eppendorf. Cho các ống giống nấm vào phích, đổ nitor lỏng vào phích sao cho lượng nitor lỏng làm ngập các ống giống nấm, nắp phích lại và chờ cho đến khi lượng nitor lỏng trong phích bay hơi hết; dùng kẹp gấp các ống giống gốc nấm xếp vào hộp bảo quản ống eppendorf; xếp hộp bảo quản ống eppendorf có chứa các ống giống gốc nấm đã xử lý với nitor lỏng vào trong tủ lạnh sâu ($-20 \div -80^\circ\text{C}$) để bảo quản.

Xử lý số liệu: dùng phần mềm Microsoft Excell (2007).

Kết quả và thảo luận

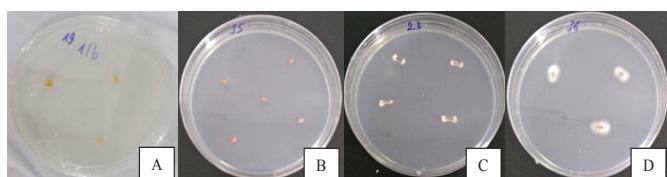
Kết quả phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo

Từ 26 chủng quả thể (260 mẫu), thực hiện 4 công thức khử trùng khác nhau, kết quả chúng tôi thu được 24 chủng (216 mẫu) giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo. Trong đó, công thức khử trùng KT3 với cồn 70% trong 60 giây và cefotaxim (4 mg/ml) trong 1 phút cho hiệu quả tạo giống gốc cao nhất (92,86%), cụ thể: tỷ lệ mẫu sạch đạt 92,86% và 100% mẫu sạch bung sợi nấm sau 24÷36 giờ phân lập. Kết quả cho thấy, thời gian khử trùng quả thể bằng cồn 70% từ 30 lên 60 giây cho hiệu quả khử trùng tăng lên, chứng tỏ thời gian khử trùng có ảnh hưởng đến hiệu quả tạo giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo. Các công thức khử trùng đều cho thời gian mẫu bắt đầu bung sợi nấm từ 24÷36h sau khi phân lập giống (bảng 1, hình 2 và 3).

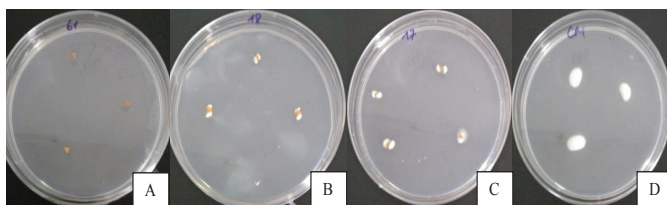
Bảng 1. Hiệu quả tạo giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	Thời gian khử trùng		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch bung sợi (%)	Hiệu quả tạo giống gốc (%)	Thời gian mẫu bắt đầu bung sợi (h)
	Cồn 70% (giờ)	Cefotaxim (4 mg/ml) (phút)				
KT1	30	1	70,00±0,15 ^a	100,00±0,00 ^b	70,00±0,12 ^c	24÷36
KT2	30	2	73,33±0,08 ^a	100,00±0,00 ^b	73,33±0,06 ^c	24÷36
KT3	60	1	92,86±0,10 ^a	100,00±0,00 ^b	92,86±0,10 ^c	24÷36
KT4	60	2	92,86±0,19 ^a	92,31±0,08 ^b	85,71±0,14 ^c	24÷36

Ghi chú: a, b, c chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$.



Hình 2. Mẫu sạch và mẫu bung sợi nấm Đông trùng hạ thảo sau phân lập bằng công thức khử trùng KT2. A: mẫu ban đầu; B: mẫu sau 24h; C: mẫu sau 48h và D: mẫu sau 72h nuôi cấy.



Hình 3. Mẫu sạch và mẫu bung sợi nấm Đông trùng hạ thảo sau phân lập bằng công thức khử trùng KT3. A: mẫu ban đầu; B: mẫu sau 24h; C: Mẫu sau 48h; D: mẫu sau 72h nuôi cấy.

Kết quả nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo

Giống gốc nấm, sau 7 ngày nuôi, đủ tiêu chuẩn để cấy chuyển sang môi trường nhân giống cấp 1. Chúng tôi bố trí 6 công thức nghiên cứu ảnh hưởng của KNO_3 và pepton đến khả năng nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo. 6 công thức này đều có chung các chất: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Sử dụng dòng giống gốc có ký hiệu CM làm vật liệu cho nghiên cứu này. Kết quả ở bảng 2 và hình 4 cho thấy, nồng độ chất dinh dưỡng khác nhau có ảnh hưởng rất rõ đến khả năng ăn lan hệ sợi giống cấp 1 trên môi trường nhân giống. Công thức môi trường G4 cho hệ sợi giống cấp 1 ăn lan nhanh nhất, hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều khắp bề

mặt đĩa môi trường nhân giống. Độ vượt hệ sợi của công thức này sau 3 ngày là 1,2 cm; sau 5 ngày là 2,1 cm; sau 7 ngày là 2,2 cm và sau 9 ngày là 1,8 cm. Kết quả cũng cho thấy, tốc độ ăn lan hệ sợi nhanh nhất là sau 5-7 ngày cấy giống vào môi trường nhân giống cấp 1.

Bảng 2. Hiệu quả nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	KNO_3 (g/l)	Pepton (g/l)	Đường kính vòng khuẩn lạc sau các ngày nuôi cấy (cm)					Đặc điểm hệ sợi nấm
			0 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày	
G1	0,5	3,0	0,5	1,0±0,05 ^a	2,2±0,07 ^b	4,0±0,09 ^c	5,5±0,08 ^d	Hệ sợi mảnh, ăn lan chậm, sợi bông xù
G2	0,5	5,0	0,5	1,2±0,07 ^a	2,5±0,08 ^b	4,5±0,08 ^c	6,0±0,06 ^d	Hệ sợi mảnh, ăn lan chậm, sợi bông xù
G3	1,0	3,0	0,5	1,5±0,08 ^a	3,3±0,10 ^b	5,8±0,09 ^c	7,6±0,05 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G4	1,0	5,0	0,5	1,7±0,04 ^a	3,8±0,05 ^b	6,0±0,07 ^c	7,8±0,04 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G5	1,5	3,0	0,5	1,4±0,06 ^a	2,6±0,08 ^b	4,4±0,08 ^c	6,1±0,05 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều
G6	1,5	5,0	0,5	1,3±0,05 ^a	2,6±0,10 ^b	4,2±0,09 ^c	5,7±0,07 ^d	Hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều



Hình 4. Giống nấm cấp 1 Đông trùng hạ thảo trong các môi trường nhân giống. A: môi trường G2; B: môi trường G4.

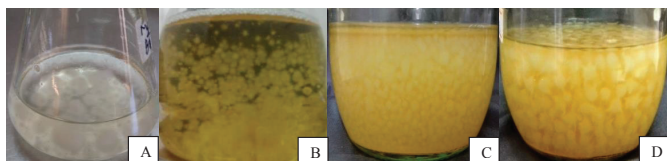
Kết quả nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo

Nghiên cứu thực hiện với 6 công thức thí nghiệm, thay đổi hàm lượng đường glucose và cao nấm men bổ sung vào môi trường nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo. Các công thức môi trường đều có chung hàm lượng các chất dinh dưỡng khác: nhộng tằm 100 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + KNO_3 1 g/l + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + vitamin B_1 0,2 g/l + vitamin B_8 0,2 g/l. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, khi tăng hàm lượng đường glucose từ 5 đến 10 g/l và tăng hàm lượng cao nấm men từ 5 đến 10 g/l cho hiệu quả nhân giống nấm cấp 2 thay đổi rõ rệt.

Công thức NG4 phù hợp nhất để nhân giống cấp 2. Môi trường này cho mật độ pellet cao nhất (82 pellet/10 ml môi trường), dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh (hình 5).

Bảng 3. Hiệu quả nhân giống cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo.

CTTN	Đường glucose (g/l)	Cao nấm men (g/l)	Mật độ pellet (số pellet/10 ml môi trường)	Đường kính pellet (mm)	Đặc điểm dịch giống
NG1	5	5	57±0,96 ^a	3,47±0,05 ^b	Dịch giống lỏng, pellet không có hình dạng nhất định
NG2	5	10	61±1,14 ^a	5,74±0,04 ^b	Dịch giống sánh, pellet không có hình dạng nhất định
NG3	10	5	58±1,22 ^a	3,69±0,08 ^b	Dịch giống sánh, pellet hình thành nhánh, có nhiều tua gai
NG4	10	10	82±1,18 ^a	1,92±0,02 ^b	Dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh.
NG5	15	5	72±0,92 ^a	2,84±0,05 ^b	Dịch giống sánh, pellet không có hình dạng nhất định
NG6	15	10	66±1,24 ^a	5,3±0,16 ^b	Dịch giống sánh, pellet hình thành nhánh, có nhiều tua gai



Hình 5. Giống nấm cấp 2 Đông trùng hạ thảo trong các môi trường nhân giống khác nhau. A: môi trường NG1; B: môi trường NG2; C: môi trường NG4; D: môi trường NG6.

Kết luận

Đã phân lập thành công 24 chủng (216 mẫu) giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo từ quả thể nấm mọc tự nhiên thu nhận tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn. Công thức khử trùng KT3 với cồn 70% trong 60 giây và cefotaxim (4 mg/ml) trong 1 phút cho hiệu quả tạo giống gốc cao nhất (92,86%).

Môi trường nhân giống cấp 1 hiệu quả là: agar 10 g/l + dịch chiết khoai tây (1 g khoai tây/1 ml dịch chiết) 200 ml/l + đường sucrose 20 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + KNO_3 1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 5 g/l. Hệ sợi giống cấp 1 ăn lan nhanh nhất, hệ sợi khỏe, ăn lan đồng đều khắp bề mặt đĩa môi trường nhân giống.

Môi trường nhân giống cấp 2 tốt nhất là: đường glucose 10 g/l + nhộng tằm 100 g/l + KH_2PO_4 0,5 g/l + K_2HPO_4 0,5 g/l + KNO_3 1 g/l + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l + Pepton 5 g/l + cao nấm men 10 g/l + vitamin B₁ 0,2 g/l + vitamin B₈ 0,2 g/l.

Mật độ pellet cao nhất (82 pellet/10 ml môi trường), dịch giống sánh, pellet có tua gai, ít phân nhánh.

Như vậy, kỹ thuật phân lập giống gốc và nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo đã được xây dựng. Kỹ thuật này có khả năng áp dụng vào thực tiễn sản xuất giống nấm để cung cấp giống nấm Đông trùng hạ thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Kobayasi (1982), “Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*”, *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **23**, pp.329-364.
- [2] K.D. Shonkor, et al. (2010), “Efficient production of anticancer agent Cordycepin by repeated batch culture of *C. militaris* Mutant”, *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, **4**, pp.20-22.
- [3] W. Fengyao, et al. (2011), “Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *C. Militaris*”, *African Journal of Microbiology Research*, **5(18)**, pp.2743-2751.
- [4] O. Yuko, et al. (2007), “In vivo antiinfluenza virus activity of an Immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *C. militaris* grown on germinated soybeans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, pp.10194-10199.
- [5] P. Byung Tae, et al. (2009), “Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *C. Militaris*”, *Korean Journal of Physiol Pharmacology*, **13**, pp.49-54.
- [6] A. Young Joon, et al. (2000), “Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *C. militaris* against *Clostridium* spp.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, pp.2744-2748.
- [7] S. Seulmee, et al. (2009), “Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages”, *Immune Network*, **9(3)**, pp.98-105.
- [8] K. Jae-Sung, et al. (2006), “A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *C. Militaris*”, *Journal of Microbiology*, **44(6)**, pp.622-631.
- [9] J. Wol Soon, et al. (2010), “The anti-inflammatory effects of water extract from *C. militaris* in murine macrophage”, *Mycobiology*, **38(1)**, pp.46-51.
- [10] H. Yan, et al. (2008), “A study on *C. militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis”, *African Journal of Biotechnology*, **7(22)**, pp.4004-4009.

Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống đầu dòng nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young

Phạm Thị Thu^{1*}, Nguyễn Duy Trình¹, Phạm Xuân Hội²

¹Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm

²Viện Di truyền nông nghiệp

Ngày nhận bài 27/2/2019; ngày chuyển phản biện 6/3/2019; ngày nhận phản biện 15/4/2019; ngày chấp nhận đăng 24/4/2019

Tóm tắt:

Nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young được biết đến nhiều trên thế giới do có giá trị dược liệu và giá trị dinh dưỡng cao. Nhằm xác định những điều kiện phù hợp cho sợi nấm rễ dài sinh trưởng trong môi trường nhân giống đầu dòng, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu và xác định được môi trường nuôi cấy phù hợp nhất là Lilly và Glucose - peptone. Nhiệt độ và pH tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm rễ dài trong điều kiện nhân giống đầu dòng là $25\pm 1^\circ\text{C}$ và $\text{pH}=7$ với nguồn carbon và nitơ là D-fructose và cao nấm men (yeast extract).

Từ khóa: giống đầu dòng, nấm rễ dài.

Chỉ số phân loại: 4.1

Investigation on propagation of master spawn technology of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young

Thi Thu Pham^{1*}, Duy Trinh Nguyen¹, Xuan Hoi Pham²

¹Mushroom Research Development Center

²Institute for Agricultural Genetics

Received 27 February 2019; accepted 24 April 2019

Abstract:

Oudemansiella raphanipes (Beck.) Pegler & T.W.K. Young has been known popularly due to its great medical and nutritional values. The aim of this study was to acquire basic data regarding the suitable conditions for *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young mycelial growth in culture medium. The results of the study illustrated that Lilly and glucose-peptone were selected as the most suitable culture media for cultivation of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young. The optimal temperature and pH for the mycelial growth of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young were $25\pm 1^\circ\text{C}$ and $\text{pH}=7$, respectively. The carbon and nitrogen sources for the optimal mycelial growth were D-fructose and yeast extract, respectively.

Keywords: long root, master spawn.

Classification number: 4.1

Đặt vấn đề

Nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young thuộc họ *Tricholomataceae*, bộ *Agaricales*, ngành nấm đảm *Basidiomycota* có nhiều đặc tính dược liệu quý, chứa các hợp chất kháng nấm bệnh quan trọng như Mucidin (strobilurin A) và Oudemansin, được sử dụng để kiểm soát các bệnh về nấm mốc trên các loại thực vật khác nhau. Chất Oudemansin được chiết xuất từ nấm rễ dài không chỉ chứa hoạt tính kháng nấm mà còn có tác dụng ức chế đối với sarcoma 180 và ung thư biểu mô Ehrlich trên chuột [1] cũng như có tác dụng hỗ trợ điều trị huyết áp cao và tác dụng ức chế trên *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn [2].

Nhiều nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống và nuôi trồng nấm rễ dài đã được công bố trên thế giới. Theo Sang Beom Kim và cs (2005) [3], môi trường Lilly (2 g asparagine, 10 g maltose, 0,5 g MgSO_4 , 1 g KH_2PO_4) là môi trường nhân giống cấp I phù hợp cho nấm rễ dài phát triển ở nhiệt độ 25°C và $\text{pH}=6$. Nguồn cacbon và nitơ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của sợi nấm rễ dài là xylose và alanin, tỷ lệ C/N 20:1 với glucose 3% (w/v). Nghiên cứu của Miles (1993) [4] khẳng định, trong thời gian lan sợi nấm gần như không cần ánh sáng, ánh sáng quá mạnh có thể kìm hãm sự sinh trưởng của sợi nấm.

Mặc dù có nhiều giá trị dinh dưỡng và giá trị dược liệu nhưng nấm rễ dài hiện vẫn là đối tượng mới ở Việt Nam. Với mục tiêu đa dạng hóa nguồn gen sinh học, tạo cơ sở cho sự phát triển của nấm rễ dài cũng như nâng cao năng suất

*Tác giả liên hệ: Email: pttu6988@gmail.com

và chất lượng các chủng nấm mới, chúng tôi tiến hành đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm rế dài trong môi trường nhân giống đầu dòng (hay còn gọi là giống cấp I).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm rế dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young ký hiệu T_M được Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm nhập từ Trung tâm Nghiên cứu nấm châu Á - Thái Bình Dương (Phúc Kiến, Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

pH môi trường nhân giống: giống gốc nấm rế dài 10 ngày tuổi có kích thước 5x5 mm được cấy chuyển sang cấp I trên môi trường PGA đặt ở giữa đĩa petri. Môi trường nhân giống cấp I đã được điều chỉnh pH trong phạm vi pH=4-9 với NaOH hoặc HCl và nuôi trong điều kiện tối trong 10 ngày ở 25°C.

Nhiệt độ nhân giống: nhân giống cấp 1 nấm rế dài trên môi trường PGA ở các ngưỡng nhiệt độ khác nhau (15, 20, 25, 30 và 35°C) với pH là 6. Sự tăng trưởng sợi nấm được theo dõi theo phương pháp của Shim và cs (1997) [5].

Môi trường nhân giống cấp I nấm rế dài được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nhân giống cấp I nấm rế dài.

Môi trường Thành phần (g/l)	PGA	MY	Lilly	PG(M)	Glucose-peptone	Mushroom-complete
Asparagine	-	-	2	-	-	-
Glucose	20	10	-	20	10	-
Yeast extract	-	3	-	-	10	2
Peptone	-	5	-	-	10	2
Malt extract	-	3	-	5	15	20
Maltose	-	-	10	-	-	-
MgSO ₄	-	-	0,5	-	-	0,5
KH ₂ PO ₄	-	-	1	-	-	0,5
K ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	1
Potatoes	200	-	-	200	-	-
Agar	20	20	20	20	20	20
pH	6	6	6	6	6	6

Ghi chú: “-” không xác định.

Ảnh hưởng của nguồn carbon: môi trường nhân giống được tạo từ peptone 5 g + MgSO₄ 0,05 g + KH₂PO₄ 0,46 g + K₂HPO₄ 1,0 g + thiamine-HCl 120 µg + agar 20 g, bổ sung nước cất cho đủ 1.000 ml. Mỗi nguồn carbon được thêm vào môi trường cơ bản ở nồng độ 0,1M trên 1.000 ml và được trộn đều [5].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: môi trường nhân giống được tạo từ: glucose 20 g + MgSO₄ 0,05 g + KH₂PO₄ 0,46 g + K₂HPO₄ 1,0 g + thiamine-HCl 120 µg + agar 20 g, bổ sung nước cất cho đủ 1.000 ml, sau đó được bổ sung với 6 nguồn nitơ. Các nguồn nitơ được thêm vào môi trường nhân giống ở nồng độ 0,02M [5]. 5 nguồn carbon và 6 nguồn nitơ được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm:

Công thức	Nguồn carbon	Nguồn nitơ
CT1	D-fructose	NaNO ₃
CT2	Glucose	NH ₄ NO ₃
CT3	Sucrose	Yeast
CT4	Maltose	Peptone
CT5	Manose	(NH ₄) ₂ SO ₄
CT6	-	(NH ₄) ₂ HPO ₄

Đặc điểm sinh trưởng, phát triển hệ sợi giống cấp I nấm rế dài: chỉ tiêu đánh giá đặc điểm sinh trưởng hệ sợi gồm đường kính sinh trưởng hệ sợi và mật độ hệ sợi. Mật độ sợi được đánh giá theo Kadiri (1998) [6] gồm các mức:

++: mật độ hệ sợi rất thưa	++++: mật độ hệ sợi dày
+++: mật độ hệ sợi thưa	+++++: mật độ hệ sợi dày đặc
++++: mật độ hệ sợi trung bình	

Đường kính hệ sợi (mm): hệ sợi được đo trong 10 ngày.

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Excel 2010 và IRRISTAT 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường nhân giống

6 loại môi trường đang được sử dụng phổ biến hiện nay trong nhân giống nấm gốc và giống cấp I là: PGA, MY, PG(M), Lilly, Glucose - peptone, Mushroom - complete. Căn cứ vào chỉ tiêu theo dõi, kết quả ghi nhận ở bảng 2 cho thấy, 2 môi trường Lilly và Glucose - peptone phù hợp cho sợi nấm rế dài phát triển. Mật độ hệ sợi dày đặc, phát triển dạng tỏa tròn đều, lan nhanh và có màu trắng đặc trưng của giống.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài trong giai đoạn nhân giống cấp I.

Công thức	Môi trường	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	PGA	65,9	++++	Hệ sợi dày mượt, có màu trắng đặc trưng.
CT2	MY	51,0	+++++	Hệ sợi dày, lan chậm, có màu trắng đặc trưng.
CT3	Lilly	69,3	+++++	Hệ sợi dày đặc, mượt và có màu trắng đặc trưng
CT4	PG(M)	63,6	++++	Hệ sợi dày, mượt, có màu trắng đặc trưng.
CT5	Glucose - peptone	67,1	+++++	Hệ sợi dày đặc, mượt và có màu trắng đặc trưng.
CT6	Mushroom - complete	56,3	+++	Hệ sợi trung bình, mượt và có màu trắng đặc trưng.
LSD		1,4		
CV%		3,1		



Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường nhân giống đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

Dựa vào kết quả nghiên cứu, có thể thấy sợi nấm rế dài có khả năng thích nghi trên nhiều loại môi trường nhân giống khác nhau. Trong các môi trường được chúng tôi tiến hành theo dõi thì môi trường Lilly và Glucose - pepton là 2 loại môi trường cho sự sinh trưởng hệ sợi nhanh nhất và mật độ hệ sợi dày mượt hơn cả (hình 1). Theo Sang Beom Kim và cs (2005) [3], môi trường phù hợp cho nấm rế dài phát triển là môi trường Lilly và Hamada (Dextrose 10 g/l, Ebiore 5 g/l, Hyponex 3 g/l, Yeast extract 3 g/l, agar 20 g/l).

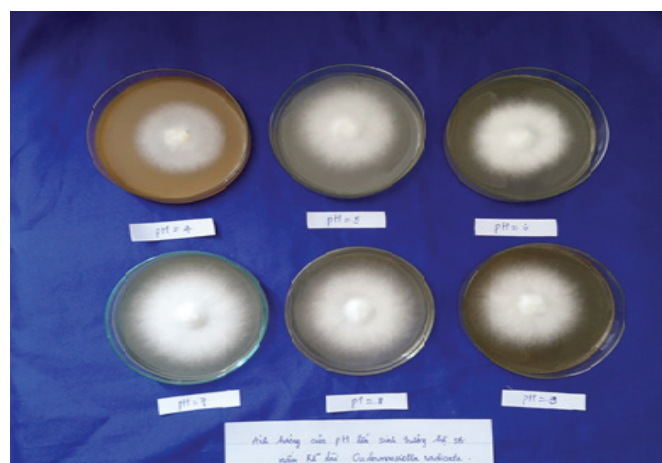
Ảnh hưởng của pH

pH là nhân tố ảnh hưởng đến sinh khối, khả năng hấp phụ chất dinh dưỡng, hình thái và cấu trúc tế bào, độ tan của muối và trạng thái ion của cơ chất, hoạt động của enzyme [7]. Với kết quả nghiên cứu về pH, 6 giá trị pH được chúng

tôi tiến hành đánh giá là: 4, 5, 6, 7, 8 và 9. Kết quả thí nghiệm ở bảng 3 cho thấy, hệ sợi nấm rế dài rất mạnh, thưa và yếu ở ngưỡng pH=4, tốc độ lan sợi cũng thấp nhất (61,4 mm); môi trường có pH=7,0-8,0 hệ sợi sinh trưởng tốt, tốc độ phát triển nhanh, mật độ sợi dày đặc, sợi bông và mượt, tốc độ mọc sợi nhanh nhất. Ở pH=5,0 hoặc pH=9,0 tốc độ sinh trưởng của hệ sợi chậm hơn, mật độ hệ sợi ở mức trung bình. Như vậy sợi nấm rế dài có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường có ngưỡng pH rộng từ 5 đến 9 (hình 2).

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài trong giai đoạn nhân giống cấp I.

Công thức	pH	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	4	61,4	++	Sợi mảnh, yếu, lan chậm
CT2	5	69,2	+++	Sợi mỏng
CT3	6	72,6	++++	Sợi dày
CT4	7	81,1	+++++	Sợi dày đặc, bông và mượt, lan nhanh
CT5	8	75,5	+++++	Sợi dày, mượt và lan nhanh
CT6	9	63,8	+++	Sợi mỏng
LSD		1,5		
CV%		3,0		



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

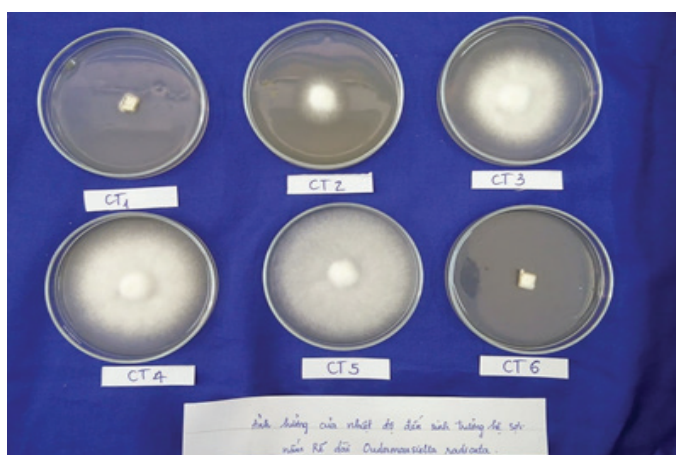
Ảnh hưởng của nhiệt độ

Theo Vladimir (2012) [8], dải nhiệt độ từ 25 đến 28°C là phù hợp nhất để hầu hết các loài nấm nhân sinh khối. Để tìm ra nhiệt độ phù hợp cho sự hình thành và phát triển của hệ sợi nấm rế dài, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá sự sinh trưởng hệ sợi nấm ở 6 ngưỡng nhiệt độ: 10±1°C, 15±1°C, 20±1°C, 25±1°C, 30±1°C và 35±1°C. Kết quả thu được (bảng 4) cho thấy, nhiệt độ 25±1°C phù hợp nhất cho nấm rế dài phát triển,

hệ sợi màu trắng đặc trưng của giống, phát triển nhanh dạng tủa tròn đều, đường kính hệ sợi 68,5 mm. Ở ngưỡng $10\pm 1^\circ\text{C}$ sợi nấm phát triển rất kém, hệ sợi mỏng, ở 30°C hệ sợi phát triển nhanh nhất nhưng mật độ hệ sợi thưa hơn. Đặc biệt, sợi nấm rễ dài không thể phát triển trong điều kiện nhiệt độ 35°C (hình 3). Do đó, ngưỡng $25\pm 1^\circ\text{C}$ là nhiệt độ thích hợp cho công tác nhân giống cấp I nấm rễ dài. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đó.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

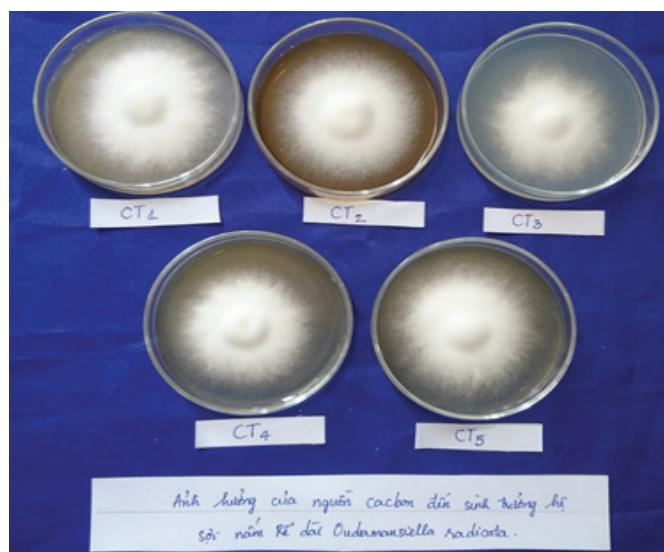
Công thức	Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Đặc điểm hệ sợi
CT1	$10\pm 1^\circ\text{C}$	5,2	+	Sợi rất mảnh, yếu
CT2	$15\pm 1^\circ\text{C}$	15,2	+++	Sợi trung bình, lan chậm
CT3	$20\pm 1^\circ\text{C}$	52,7	+++++	Sợi rất dày, bông và mượt
CT4	$25\pm 1^\circ\text{C}$	68,5	+++++	Sợi rất dày, bông và mượt
CT5	$30\pm 1^\circ\text{C}$	71,4	+++	Sợi trung bình, lan nhanh
CT6	$35\pm 1^\circ\text{C}$	-	-	-
LSD		1,6		
CV%		4,1		



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ

Cacbon và nitơ là hai nhân tố cơ bản cho sự sinh trưởng của vi sinh vật. Nguồn cacbon ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa của vi sinh vật. Giống nấm rễ dài đã được nhân giống trong môi trường chứa các nguồn cacbon khác nhau (D-fructose, glucose, manose, maltose và sucrose). Kết quả cho thấy, không có sự khác nhau về đặc điểm hệ sợi tại các công thức; trong các nguồn cacbon được khảo sát, D-Fructose cho mật độ hệ sợi dày, mượt và đường kính hệ sợi lớn nhất (68,3 mm) (hình 4, bảng 5).

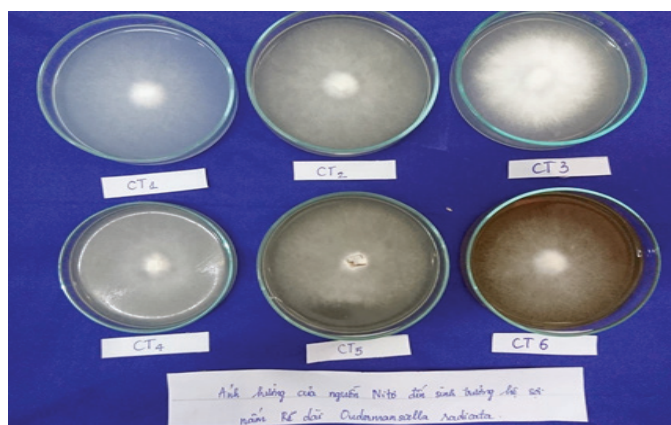


Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon và nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rễ dài.

Công thức	Nguồn cacbon	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi	Nguồn nitơ	Đường kính hệ sợi (mm)	Mật độ hệ sợi
CT1	D-fructose	68,3	+++++	NaNO_3	57,2	++
CT2	Glucose	66,0	+++++	NH_4NO_3	62,1	+++
CT3	Sucrose	55,7	++++	Yeast	61,7	+++++
CT4	Maltose	59,2	+++++	Peptone	60,5	++++
CT5	Manose	62,4	+++++	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	54,1	+++
CT6	-	-	-	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	51,3	++
LSD		1,2			1,7	
CV%		4,2			3,8	

Nitơ là nhân tố cần thiết trong tổng hợp enzyme trong cả quá trình chuyển hóa sơ cấp và thứ cấp. 6 nguồn nitơ đã được khảo sát lần lượt gồm: NaNO_3 , NH_4NO_3 , yeast, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Kết quả (bảng 5) cho thấy, các nguồn nitơ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng hệ sợi cũng như mật độ hệ sợi của nấm rễ dài. Dựa vào mật độ hệ sợi cũng như tốc độ lan sợi (hình 5), chúng tôi nhận định có thể sử dụng cao nấm men (yeast) để cung cấp nguồn nitơ cho nấm rễ dài trong môi trường nhân giống cấp 1. Theo nghiên cứu của Myoung Jun Jang và cs (2009) [9] thì nguồn nitơ hữu cơ cho hiệu quả nhân giống tốt hơn so với nguồn nitơ vô cơ (NaNO_3 , NH_4NO_3 và NH_4Cl).



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến sinh trưởng hệ sợi nấm rế dài.

Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu thu được, nhóm tác giả kiến nghị nên sử dụng môi trường nhân giống cấp 1 cho nấm rế dài là môi trường Lilly (2 g asparagine + 10 g maltose + 0,5 g $MgSO_4$ + 1 g KH_2PO_4 + 20 g agar) hoặc Glucose - peptone (10 g glucose + 10 g yeast extract + 10 g peptone + 15 g Malt extract + 20 g agar). Nhiệt độ, pH tối ưu cho sự sinh trưởng của giống nấm rế dài lần lượt là $25 \pm 1^\circ C$, pH=7 với nguồn carbon và nitơ lần lượt là D-fructose và yeast extract.

Tiếp tục các nghiên cứu để nhân giống và nuôi trồng nấm rế dài ở quy mô lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.Z. Ying, et al. (1987), *Icons of medicinal fungi from China*, Science Press.
- [2] W.H. Park, H.D. Lee (1999), *Illustrated book of Korean Medicinal mushrooms*, Kyo-Hak Publishing C. Ltd.
- [3] Sang Beom Kim, et al. (2005), "The Optimal Culture Conditions for the Mycelial Growth of *Oudemansiella radicata*", *Mycobiology*, **33**(4), pp.230-234.
- [4] P.G. Miles (1993), "Biological background for mushroom breeding", *Genetics and Breeding of Edible Mushroom*, Gordon and Breach Science publishers.
- [5] J.O. Shim, et al. (1997), "The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*", *Korean J. Mycol.*, **25**, pp.209-213.
- [6] M. Kadiri (1998), "Spawn and fruit body production of *Pleurotus sajor-caju* in Abeokuta Nigeria", *Nigerian Journal of Botany*, **11**, pp.125-131.
- [7] G.L. Yang, H.B. Xue (2000), *Specialized cultivation manual about edible and medicinal mushroom*, China Agricultural Press.
- [8] E. Vladimir (2012), "Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.
- [9] Myoung Jun Jang, et al. (2009), "Optimal Conditions for the Mycelial Growth of *Coprinus comatus* Strains", *Mycobiology*, **37**(2), pp.103-108.

Tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành nhằm nâng cao khả năng sinh protease của chủng *Bacillus subtilis* N6 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt quy mô pilot

Phạm Huỳnh Ninh¹, Vũ Minh¹, Nguyễn Thị Hà¹,
Bùi Thị Hồng Chiên¹, Trần Quốc Tuấn^{2*}

¹Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 19/4/2019, ngày chuyển phản biện 26/4/2019; ngày nhận phản biện 29/5/2019; ngày chấp nhận đăng 4/6/2019

Tóm tắt:

Khô dầu đậu nành là nguồn cung cấp protein rất tốt cho vật nuôi do có hàm lượng các axit amin không thay thế cao. Tuy nhiên, khô dầu đậu nành lại chứa một số protein gây dị ứng như glycinin và β -conglycinin. Các loại protein này bền nhiệt, kháng các enzyme trong hệ tiêu hóa của vật nuôi, gây kích ứng miễn dịch ở động vật non, tăng nhu động ruột non, dẫn đến tăng tỷ lệ tiêu chảy ở heo con, giảm hấp thụ dinh dưỡng. Nghiên cứu này tập trung vào tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành sử dụng vi khuẩn *Bacillus subtilis* N6 nhằm nâng cao khả năng sản sinh protease, góp phần phân giải các loại protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh protease của chủng vi khuẩn *B. subtilis* N6 được sàng lọc bằng thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman. Trong các điều kiện lên men khảo sát thì nhiệt độ, độ dày cơ chất và thời gian lên men là ba yếu tố tác động đáng kể nhất ($p < 0,05$). Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp đáp ứng bề mặt (response surface methodology - RSM). Kết quả cho thấy, điều kiện lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp protease là: nhiệt độ 35°C, độ dày cơ chất lên men là 1 cm và thời gian lên men là 35 giờ. Sau lên men 35 giờ, hoạt tính protease lên đến 632 U/g, cao hơn trước khi tối ưu 1,65 lần (382 U/g).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, đáp ứng bề mặt, khô dầu đậu nành, lên men bán rắn, tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 4.2

Giới thiệu

Khô dầu đậu nành, sản phẩm của quá trình tách chiết dầu từ hạt đậu nành, là nguồn cung cấp protein rất tốt cho vật nuôi do có hàm lượng các axit amin không thay thế cao. Tuy nhiên, việc sử dụng khô dầu đậu nành trong khẩu phần thức ăn cho gia súc, gia cầm non có hệ tiêu hóa chưa hoàn thiện bị hạn chế, hiệu quả không cao do khô dầu đậu nành chứa một số protein gây dị ứng, làm tăng nhu động và sự bài tiết nước của ruột non, dẫn đến tăng tỷ lệ tiêu chảy ở heo con, giảm hấp thụ dinh dưỡng, giảm năng suất [1-4]. Hai protein gây dị ứng chủ yếu trong đậu nành là glycinin (globulin 11S) và β -conglycinin (globulin 7S), chiếm hơn 50% lượng protein trong hạt đậu nành [5]. Chúng có khả năng bền nhiệt và kháng hầu hết các enzyme trong hệ tiêu hóa do có liên kết disulfua khá bền [6].

Lên men bán rắn là phương pháp lên men trên cơ chất rắn và hầu như chứa rất ít hay không có nước tự do. Tuy nhiên, hàm lượng ẩm phải đủ để cung cấp môi trường thuận lợi cho sự trao đổi chất và phát triển của vi sinh vật. Gần đây, lên men bán rắn đã thu hút nhiều sự chú ý do chi phí

vận hành thấp và đơn giản hơn so với các phương pháp lên men khác [7]. Phương pháp lên men bán rắn nhằm loại bỏ các protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành đã được nghiên cứu và ứng dụng trong thực tiễn sản xuất trên thế giới nhằm sản xuất khô dầu đậu nành sử dụng trong chế biến thức ăn chăn nuôi [8-10]. Trong đó, phương pháp lên men sử dụng vi khuẩn *Bacillus* tỏ ra có nhiều lợi thế hơn so với các vi khuẩn khác, nấm men hay nấm mốc do sản phẩm khô dầu đậu nành sau lên men có lượng protein hòa tan cao hơn, khả năng phân giải các protein gây dị ứng tốt hơn và sinh trưởng nhanh hơn [11]. Tuy nhiên, hầu như không có bất kỳ nghiên cứu dạng này được công bố tại Việt Nam.

Phương pháp đáp ứng bề mặt giờ đây đã được sử dụng phổ biến để nghiên cứu tối ưu hóa các quy trình công nghệ sinh học hay quy trình sản xuất công nghiệp [12]. Tối ưu hóa quy trình lên men bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (response surface methodology - RSM) là cách tiếp cận hiệu quả hơn so với phương pháp nghiên cứu truyền thống khảo sát từng yếu tố (one-factor-at-a-time) [13]. Phương pháp RSM gồm các kỹ thuật toán học, thống kê để mô hình hóa

*Tác giả liên hệ: Email: trqtuan@hcmus.edu.vn

Optimisation of semi-solid-state fermentation conditions for soybean meal to improve protease production of *Bacillus subtilis* N6 by response surface methodology

Huynh Ninh Pham¹, Minh Vu¹, Thi Ha Nguyen¹,
Thi Hong Chien Bui¹, Quoc Tuan Tran^{2*}

¹Institute of Animal Husbandry in South Vietnam

²University of Sciences, National University of Ho Chi Minh City

Received 19 April 2019; accepted 4 June 2019

Abstract:

Soybean meal is a major protein source in the animal diet owing to its excellent amino acid components. However, soybean meal still contains some proteins (glycinin and β -conglycinin) that cause allergies for young animals. These proteins have the high heat-stable ability, digestive enzyme resistance, which leads to the increase in immunological responses, intestinal peristalsis, and diarrhea and the decrease in nutrition absorption. This research focuses on the optimisation of the semi-solid-state fermentation conditions to improve the protease production of *B. subtilis* N6 in the soybean meal medium. The factors that affected the protease production of *B. subtilis* N6 would be screened by the Plackett-Burman design. Out of five screened factors, three factors that have the great effects were temperature, substrate thickness, and fermentation time ($p < 0.05$). Optimisation experiment was designed by the response surface methodology. The results showed that, the optimised temperature, soybean thickness, and fermentation time were 35°C, 1 cm, and 35h, respectively. These optimum conditions resulted in the enhancement in protease yield to 632 U/g with 1.65 fold increase.

Keywords: *Bacillus subtilis*, optimisation, response surface methodology, semi-solid-state fermentation, soybean meal.

Classification number: 4.2

và phân tích các vấn đề (thiết kế, phát triển, tối ưu quy trình hay sản phẩm) [14]. Do được tích hợp các kỹ thuật hồi quy, ANOVA nên RSM làm giảm đáng kể số thí nghiệm phải tiến hành, từ đó làm giảm chi phí và thời gian nghiên cứu. Sử dụng RSM để thiết kế tối ưu bao gồm ba bước: sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính, xác định khoảng tối ưu của từng yếu tố, và ước lượng mô hình đáp ứng bằng thiết kế phức tạp như Box-Behnken (box-behnken design - BBD) nhằm xác định tổ hợp tối ưu giá trị của các yếu tố đầu vào.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng mô hình Plackett-Burman (PB) để sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính protease của chủng *B. subtilis* N6, sau đó các điểm tối ưu của từng yếu tố mà tại đó hoạt tính protease đạt giá trị cao nhất được xác định bằng mô hình Box-Behnken nhằm phân giải tối đa các protein gây dị ứng, cải thiện chất lượng khô dầu đậu nành.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng *B. subtilis* N6 lấy từ bộ sưu tập của Bộ môn Sinh hóa - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Khô dầu đậu nành nhập khẩu từ Argentina do Công ty TNHH Việt Hưng cung cấp.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm của Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ từ tháng 01 đến 12/2018.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định hoạt tính protease: dịch tăng sinh chủng *B. subtilis* trên môi trường cao thịt sau 24 giờ được cấy vào cơ chất khô dầu đậu nành ẩm độ 40% với tỷ lệ 3% và ủ ở 37°C. Khô dầu đậu nành sau khi lên men được lacer với dung dịch đệm Sorensen pH 7,6 (theo tỷ lệ 5 g khô dầu đậu nành lên men + 25 ml đệm Sorensen), ly tâm thu dịch nổi để xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson cải tiến [14]. Cụ thể, hút 5 ml dung dịch 0,65% casein vào ống nghiệm, thêm 1 ml dịch enzyme thu nhận, ủ ở 35,5°C. Sau 30 phút bổ sung 5 ml dung dịch trichloro acetic 10%. Lọc lấy 1 ml dịch, thêm vào 2 ml NaOH 0,5N và 0,6 ml thuốc thử Folin. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn hàm lượng tyrosin và độ hấp thụ quang để xác định lượng tyrosin sinh ra trong phản ứng. Một đơn vị hoạt độ protease được định nghĩa 1 μ g tyrosin được tạo ra trong 1 phút dưới tác dụng của 1 ml enzyme.

Điện di polyacrylamide: để đánh giá mức độ phân hủy các protein kháng dinh dưỡng, mẫu khô dầu đậu nành lên men được tách chiết protein và thực hiện điện di SDS-PAGE trên separating gel 12,5% polyacrylamide, gel stacking 4% polyacrylamide [15].

Định lượng glycinin và β -conglycinin: hàm lượng glycinin và β -conglycinin trong khô dầu đậu nành được

phân tích bằng phương pháp ELISA sử dụng bộ glycinin ELISA Kit và β -conglycinin ELISA Kit của Hãng Wuhan Unibiotest Co., Ltd, Trung Quốc.

Tối ưu hóa và thiết kế thí nghiệm: sàng lọc yếu tố thí nghiệm bằng thiết kế Plackett-Burman [13]: sau khi có được kết quả của các thí nghiệm đơn yếu tố để làm cơ sở chọn lựa khoảng biến thiên giá trị phù hợp cho từng yếu tố, bố trí thí nghiệm sàng lọc các yếu tố bằng thiết kế Plackett-Burman nhằm xác định được 3 trong 5 yếu tố có tác động lớn tới quá trình sản sinh protease khi lên men khô dầu đậu nành với *B. subtilis* N6.

Thiết kế Plackett-Burman cho phép đánh giá mức ảnh hưởng của các yếu tố đến sinh tổng hợp protease, mỗi yếu tố được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là nhiệt độ lên men, độ dày lên men, thời gian lên men, tỷ lệ giống, pH (bảng 1). Thiết kế ma trận Plackett-Burman được trình bày trong bảng 2. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 11.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	P value
Nhiệt độ lên men	°C	X1	30	50	-57,83 ^a	0,0048
Độ dày lên men	cm	X2	1	5	-136,83 ^a	<0,0001
Thời gian lên men	giờ	X3	24	72	-77,00 ^a	0,0012
Tỷ lệ giống	%	X4	1	5	-30,67 ^b	0,0606
pH	-	X5	6	9	-3,17 ^b	0,8197

^aCó ý nghĩa ở độ tin cậy $p \leq 0,05$; ^bKhông có ý nghĩa ở độ tin cậy $p > 0,05$.

Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman.

Thí nghiệm	Các biến					Hoạt tính protease (U/g)	
	X1	X2	X3	X4	X5	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	1	1	-1	1	84	110,00
2	-1	-1	1	-1	1	398	383,67
3	-1	-1	-1	-1	-1	506	544,00
4	1	-1	1	1	-1	198	213,00
5	1	-1	-1	-1	1	437	422,00
6	1	1	1	-1	-1	70	0,67
7	-1	1	-1	1	1	234	202,67
8	1	-1	1	1	1	188	206,67
9	-1	1	1	1	-1	31	55,00
10	1	1	-1	-1	-1	120	154,67
11	1	1	-1	1	1	71	87,00
12	-1	-1	-1	1	-1	525	482,67

Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt: 3 yếu tố chính từ kết quả sàng lọc sẽ được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0 và +1) (bảng 3) với 15 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm trung tâm (bảng 4).

Bảng 3. Các yếu tố sử dụng trong Box-Behnken.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	1
Nhiệt độ lên men	°C	X1	30	40	50
Độ dày lên men	cm	X2	1	3	5
Thời gian lên men	giờ	X3	24	48	72

Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính protease (Y , U/g canh trường nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2: $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$.

Trong đó B_1, B_2, B_3 là các hệ số bậc 1; B_{11}, B_{22} và B_{33} là hệ số bậc 2; B_{12}, B_{23} và B_{13} là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; $X_1, X_2, X_3, X_{11}, X_{22}, X_{33}, X_{12}, X_{23}$ và X_{13} là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 11.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ. Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố khảo sát cho hoạt tính protease cao nhất.

Bảng 4. Thiết kế Box-Behnken.

Thí nghiệm	Các biến			Hoạt tính protease (U/g)	
	X1	X2	X3	Thực hiện	Mô hình
1	-1	-1	0	508	517,38
2	0	1	-1	139	143,38
3	1	0	1	36	15,75
4	-1	0	1	108	103,00
5	1	0	-1	33	38,00
6	0	0	0	412	403,33
7	1	1	0	57	47,63
8	1	-1	0	132	156,62
9	0	-1	1	362	357,63
10	0	0	0	401	403,33
11	-1	1	0	32	7,38
12	0	-1	-1	620	590,38
13	0	1	1	156	185,63
14	-1	0	-1	251	271,25
15	0	0	0	397	403,33

Kết quả và thảo luận

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt lực protease của *B. subtilis* N6

Tiến hành thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman với các yếu tố: nhiệt độ lên men, độ dày lên men, thời gian lên

men, tỷ lệ giống, pH cơ chất với hai mức thấp và cao. Phân tích kết quả bằng phần mềm Design expert 11 cho thấy có 3 yếu tố ảnh hưởng tới hoạt lực protease là nhiệt độ lên men, thời gian lên men và độ dày khối cơ chất lên men (p-value <0,05). Tuy nhiên, cả ba yếu tố đều ảnh hưởng âm. Thời gian và nhiệt độ lên men là các yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến việc sản sinh protease ở *Bacillus* [16, 17]. S. Mhamdi và cộng sự (2012) [18] cũng xác định thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính protease do chủng *Bacillus* sp. sinh ra. Từ kết quả sàng lọc này, chúng tôi chọn các yếu tố nhiệt độ lên men, thời gian lên men và độ dày khối cơ chất lên men cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken.

Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính protease của *B. subtilis* N6

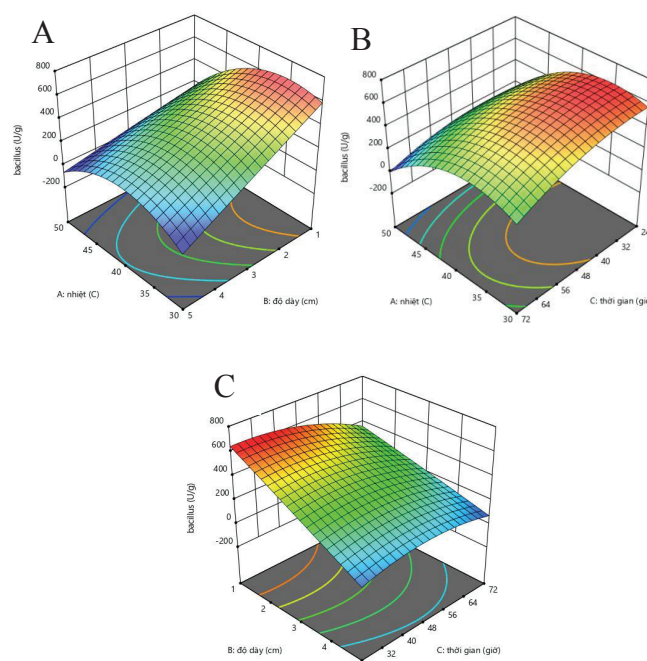
Sau khi xác định được 3 yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh protease trong quá trình lên men khô dầu đậu nành bằng *B. subtilis* N6, bố trí thí nghiệm theo thiết kế BBD nhằm xác định giá trị tối ưu nhất của 3 yếu tố chính cho quá trình lên men. Trong ma trận thiết kế BBD mỗi yếu tố sẽ được đánh giá ở 3 mức (-1, 0 và +1). Các yếu tố đầu vào bao gồm X1: nhiệt độ lên men, X2: độ dày khối cơ chất lên men và X3: thời gian lên men. Ma trận thiết kế thí nghiệm gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Quá trình lên men được thực hiện trong khay inox 1x0,5x0,15 m (dài x rộng x cao). Hàm mục tiêu là hoạt tính protease của *B. subtilis* N6 trong khối môi trường khô dầu đậu nành lên men.

Kết quả ANOVA (bảng 5) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê (p=0,0004), hệ số hồi quy $R^2=0,9862>0,75$ chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm. Giá trị R^2 dự đoán là 0,7802 phù hợp với R^2 điều chỉnh là 0,9615 (độ lệch 0,1813<0,2), tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 18,614>4 thể hiện tín hiệu đã đầy đủ.

Bảng 5. Kết quả ANOVA.

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương (sum of squares)	Bậc tự do (degree of freedom)	Trung bình bình phương sai (average of squares)	Chuẩn fisher (F - value)	Giá trị P (Probability value > F)
Mô hình	514600	9	57182,67	68,52	0,0001
X ₁	51360,13	1	51360,13	61,54	0,0005
X ₂	191600	1	191600	299,55	<0,0001
X ₃	18145,13	1	18145,13	21,74	0,0055
X ₁ X ₂	40200,25	1	40200,25	48,17	0,0010
X ₁ X ₃	5329,00	1	5329,00	6,39	0,0527
X ₂ X ₃	18906,25	1	18906,25	22,65	0,0051
X ₁ ²	173300	1	173300	207,69	<0,0001
X ₂ ²	72,03	1	72,03	0,0863	0,7807
X ₃ ²	23434,26	1	23434,26	28,08	0,0032
Sai số	4172,92	5			
Tổng	518800	14			

$R^2=0,9920$; CV=11,89%; R^2 điều chỉnh=0,9775; R^2 dự đoán=0,8745.



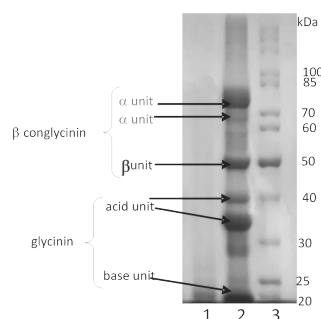
Hình 1. Mặt đáp ứng hoạt tính protease theo hai yếu tố: A. Nhiệt độ lên men (X1) - Độ dày cơ chất lên men (X2) với thời gian lên men là 30 giờ; B. Nhiệt độ lên men (X1) - Thời gian lên men (X3) với độ dày cơ chất lên men 1 cm; C. Độ dày cơ chất lên men (X2) - Thời gian lên men (X3) với nhiệt độ lên men 35°C.

Từ những kết quả trên ta nhận được phương trình hồi quy hoạt tính protease (U/g) = $403,33 - 80,13X_1 - 154,75X_2 - 47,63X_3 + 100,25X_1X_2 + 36,50X_1X_3 - 216,67X_1^2 - 79,67X_3^2$

Với ba đồ thị không gian ba chiều có trục Z là hoạt tính protease và lần lượt 2 biến độc lập trong 3 yếu tố khảo sát (hình 1) có thể thấy hoạt tính protease đạt cực đại khi độ dày khối cơ chất lên men ở mức thấp nhất. Hoạt tính protease cũng đạt mức cao khi nhiệt độ nằm trong vùng từ 30-40°C, thời gian lên men từ 24-48 giờ. Với các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, mức tối ưu của các yếu tố khảo sát được xác định lần lượt là: nhiệt độ 35°C, độ dày cơ chất lên men 1 cm, thời gian lên men là 30 giờ. Mô hình thí nghiệm dự đoán lượng protease tối ưu đạt được là 644,71 U/g. Thí nghiệm kiểm chứng các giá trị tối ưu của 3 yếu tố khảo sát cho kết quả hoạt tính protease thu được là 632 U/g.

Mức độ phân giải các protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành sau lên men cũng đã được kiểm chứng thông qua kết quả chạy SDS-PAGE và phân tích bằng bộ ELISA kit của mẫu khô đậu nành lên men với mức tối ưu của 3 yếu tố khảo sát (hình 2). Sau khi lên men không còn thấy vạch của các tiểu phân hai protein gây dị ứng là glycinin và β -conglycinin trong kết quả chạy SDS-PAGE, các protein có trọng lượng phân tử lớn đã bị phân giải gần hết, chỉ còn lại các protein ở mức 20 kDa. Trong khi đó, kết quả định lượng glycinin và β -conglycinin trong khô dầu đậu nành sau khi

lên men cho thấy 94,94% glycinin và 97,33% β -conglycinin đã được phân giải trong quá trình lên men (bảng 6). Điều này cho thấy quá trình lên men đã phân giải các protein gây dị ứng, nâng cao giá trị dinh dưỡng của khô dầu đậu nành sử dụng trong thức ăn chăn nuôi.



Hình 2. Kết quả chạy SDS-PAGE với 3 mức tối ưu của 3 yếu tố khảo sát (giếng 1: thang protein chuẩn, giếng 2: mẫu khô dầu đậu nành chưa lên men, giếng 3: mẫu khô dầu đậu nành lên men bán rắn với *B. Subtilis* N6).

Bảng 6. Kết quả định lượng glycinin và β -conglycinin sau khi lên men.

Protein gây dị ứng	Khô dầu đậu nành chưa lên men	Khô dầu đậu nành lên men với <i>B. subtilis</i> N6
Glycinin (mg/g)	87,33	4,42
β -conglycinin (mg/g)	121,56	3,25

Kết luận

Nghiên cứu đã tìm ra được các thông số tối ưu hóa khả năng sản sinh protease của *Bacillus subtilis* N6 trong quá trình lên men bán rắn khô dầu đậu nành áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken. Hoạt tính protease tối đa đạt được là 632 U/g khi lên men ở 35°C, độ dày cơ chất lên men 1 cm và thời gian lên men là 30 giờ. Điều kiện lên men này đã phân giải 94,94% glycinin và 97,33% β -conglycinin gây dị ứng trong khô dầu đậu nành.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất khô dầu đậu nành lên men bán rắn sử dụng trong chăn nuôi” do Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Zhao, G.X. Qin, Z.W. Sun, B. Zhang, T. Wang (2010), “Effects of glycinin and β -conglycinin on enterocyte apoptosis, proliferation and migration of piglets”, *Food and Agricultural Immunology*, **21**(3), pp.209-218.
- [2] Y. Zhao, G. Qin, Z. Sun, X. Zhang, N. Bao, T. Wang, L. Sun (2008), “Disappearance of immunoreactive glycinin and β -conglycinin

in the digestive tract of piglets”, *Archives of Animal Nutrition*, **62**(4), pp.322-330.

- [3] P. Sun, D. Li, B. Dong, S. Qiao, X. Ma (2008), “Effects of soybean glycinin on performance and immune function in early weaned pigs”, *Archives of Animal Nutrition*, **62**(4), pp.313-321.

- [4] Y. Hao, Z. Zhan, P. Guo, X. Piao, D. Li (2009), “Soybean β -conglycinin-induced gut hypersensitivity reaction in a piglet model”, *Archives of Animal Nutrition*, **63**(3), pp.188-202.

- [5] M. Samoto, M. Maebuchi, C. Miyazaki, H. Kugitani, M. Kohno, M. Hirotsuka, M. Kito (2007), “Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate”, *Food Chemistry*, **102**, pp.317-322.

- [6] B.J. Kuipers, A.C. Alting, H. Gruppen (2007), “Comparison of the aggregation behavior of soy and bovine whey protein hydrolysates”, *Biotechnology Advances*, **25**(6), pp.606-610.

- [7] S. Bhargav, B.P. Panda, M. Ali, S. Javed (2008), “Solid-state fermentation: an overview”, *Chem. Biochem. Eng.*, **22**(1), pp.49-70.

- [8] J. Feng, J. Liu, Z.R. Xu, Y.P. Lu, Y.Y. Liu (2007), “The effect of *Aspergillus oryzae* fermented soybean meal on growth performance, digestibility of dietary components and activities of intestinal enzymes in weaned piglets”, *Anim. Feed. Sci. Tech.*, **134**(3), pp.295-303.

- [9] J. Hu, W. Lu, C. Wang, R. Zhu, J. Qiao (2008), “Characteristics of solid-state fermented feed and its effects on performance and nutrient digestibility in growing-finishing pigs”, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **21**(11), pp.1635-1641.

- [10] C. Shi, Y. Zhang, Z. Lu, Y. Wang (2017), “Solid-state fermentation of corn-soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* for degrading antinutritional factors and enhancing nutritional value”, *J. Anim. Sci. Biotech.*, **8**, p.50.

- [11] R. Mukherjee, R. Chakraborty, A. Dutta (2016), “Role offermentation in improving nutritional quality of soybean meal”, *Asian - Australas. J. Anim. Sci.*, **29**(11), pp.1523-1529.

- [12] Q.K. Beg, V. Sahai, R. Gupta (2003), “Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor”, *Process Biochem.*, **39**, pp.203-209.

- [13] R.L. Plackett, J.P. Burman (1946), “The design of optimum multifactorial experiments”, *Biometrika.*, **33**, pp.305-325.

- [14] M.L. Anson (1938), “The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin”, *J. Gen. Physiol.*, **22**, pp.79-89.

- [15] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay (2010), “Response surface methodology”, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, **2**(2), pp.128-149.

- [16] U.K. Laemmli (1970), “Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, **227**, pp.680-685.

- [17] D.J.M. Kumar, R. Rakshitha, M.A. Vidhya, P.S. Jenifer, S. Prasad, M.R. Kumar, P.T. Kalaichelvan (2014), “Production, optimization and characterization of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* RJAS19”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17**(4), pp.529-534.

- [18] S. Mhamdi, H. Anissa, H.M. Ibtissem, F. Fakher, N. Moncef, S.K. Alya (2014), “Optimization of protease production by *Bacillus mojavensis* A21 on Chickpea and Faba Bean”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **5**, pp.1049-1060.

Tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá Chiên (*Bagarius yarrelli*) nuôi lồng tại Tuyên Quang và đề xuất biện pháp phòng trị

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Nguyễn Thị Hạnh¹, Phạm Thị Yến¹, Lê Thị Mây¹,
Nguyễn Quang Nghĩa², Phan Thị Vân¹, Phạm Thị Thanh¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

²Trung tâm Thủy sản Tuyên Quang

Ngày nhận bài 23/4/2019; ngày chuyển phản biện 29/4/2019; ngày nhận phản biện 17/6/2019; ngày chấp nhận đăng 5/7/2019

Tóm tắt:

Cá Chiên (*Bagarius yarrelli*) là 1 trong số 5 loài cá quý (Chiên, Lăng, Rầm xanh, Anh vũ và Bống), có giá trị kinh tế cao, đồng thời là đối tượng nuôi lồng chủ lực tại Tuyên Quang nói riêng, một số tỉnh phía Bắc nói chung. Tuyên Quang có lợi thế về mặt nước nuôi thủy sản, chủ động con giống, công nghệ, kỹ thuật nuôi, song còn hạn chế thông tin về bệnh ở cá Chiên. Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh xuất hiện phổ biến ở cá Chiên nuôi lồng tại địa phương. Phương pháp nuôi cấy, phân lập và gây nhiễm nhân tạo đã được áp dụng trong nghiên cứu. Kết quả cho thấy, *Aeromonas hydrophila* là tác nhân gây bệnh ở cá Chiên với biểu hiện bệnh lý như: đốm đỏ, loét, xuất huyết ở thân, ruột không có thức ăn, gan sưng huyết, ổ bụng chứa nhiều dịch. *A. hydrophila* có độc lực cao, gây chết cá 100% trong 3 ngày ở nồng độ gây nhiễm 10^4 - 10^6 cfu/ml. Ở nồng độ 10^3 cfu/ml, *A. hydrophila* gây chết cá thí nghiệm với biểu hiện loét phần bụng và gan thận sưng huyết, tỷ lệ chết cộng dồn tăng dần theo thời gian từ 47,6% ở ngày thứ 2, tăng lên 90,5% ở ngày thứ 4 và 100% ngày thứ 5.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, cá Chiên (*Bagarius yarrelli*), Tuyên Quang.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Tuyên Quang là tỉnh miền núi phía Bắc có lợi thế mạnh về nuôi thủy sản với diện tích mặt nước trên 12.000 ha, trong đó có trên 8.400 ha diện tích mặt nước hồ thủy điện, số còn lại là diện tích mặt nước hồ thủy lợi và mặt sông có khả năng nuôi trồng thủy sản. Với lợi thế này, tỉnh Tuyên Quang đã thông qua Nghị quyết về quy hoạch phát triển thủy sản giai đoạn 2016-2025, định hướng 2035 với mục đích phát triển thủy sản theo hướng sản xuất hàng hóa, tạo ra sản phẩm có năng suất, chất lượng, khả năng cạnh tranh cao, đáp ứng nhu cầu tiêu dùng trong và ngoài tỉnh, đồng thời tiến tới xuất khẩu.

Cá Chiên là một trong số loài cá thuộc nhóm “ngũ quý” (cá Chiên, cá Lăng, cá Rầm xanh, cá Anh vũ và cá Bống), đây là loài có giá trị kinh tế cao, và tỉnh Tuyên Quang đã chủ động được nguồn giống cá này bằng sinh sản nhân tạo. Năm 2018, Trung tâm Thủy sản Tuyên Quang đã sản xuất được 17.800 con cá Chiên giống, tăng gần 9.000 con so với 2017 và tăng 17.560 con so với 2015. Tuyên Quang có lợi thế về mặt nước nuôi thủy sản, chủ động được con giống, chủ động công nghệ, kỹ thuật nuôi, song còn hạn chế thông tin về bệnh cũng như quản lý phòng, trị bệnh ở cá Chiên trong suốt vụ nuôi. Một số loài cá như cá Tra, Basa, Lăng đã được nghiên cứu xác định nguyên nhân gây ra bệnh gan thận mủ, trắng

đuôi và xuất huyết, lở loét [1], trong khi đó còn thiếu các nghiên cứu về bệnh của cá Chiên. Do đó, cán bộ địa phương cũng như hộ nuôi còn lúng túng và gặp nhiều khó khăn trong phòng trị bệnh, điều này ảnh hưởng đến năng suất thu hoạch và gây thiệt hại kinh tế cho hộ nuôi. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh cho cá Chiên nuôi lồng có biểu hiện bệnh lý xuất huyết, lở loét ở thân, làm cơ sở khoa học để tiếp tục nghiên cứu các giải pháp giảm thiểu thiệt hại do bệnh gây ra.

Địa điểm, thời gian và phương pháp nghiên cứu

Địa điểm và thời gian

Cá Chiên thu tại lồng nuôi ở 2 huyện Na Hang, Hàm Yên và TP Tuyên Quang, tỉnh Tuyên Quang. Mẫu cá được phân tích tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA) thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I. Thời gian thực hiện từ tháng 7-12 năm 2018.

Thí nghiệm gây nhiễm vi khuẩn lên cá Chiên được bố trí triển khai tại Phòng thí nghiệm ươm thuộc CEDMA.

Mẫu cắt kính hiển vi điện tử thực hiện tại Phòng thí nghiệm siêu cấu trúc - Trung tâm Nghiên cứu y sinh, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

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

The causative agent of hemorrhagic disease in giant devil catfish (*Bagarius yarrelli*) in cage culture at Tuyen Quang province and proposing preventive and treatment measures

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Hanh Nguyen¹,
Thi Yen Pham¹, Thi May Le¹, Quang Nghia Nguyen²,
Thi Van Phan¹, Thi Thanh Pham¹

¹Research Institute for Aquaculture No 1

²Tuyen Quang Seafood Center

Received 23 April 2019; accepted 5 July 2019

Abstract:

Giant devil catfish (*Bagarius yarrelli*) is one of the five precious fish species which bring high economic values and are popularly cultured in cage in the northern mountainous provinces as well. Tuyen Quang province has the advantages of water sources for aquaculture breed availability, technology, and farming techniques, but has limited information of pathogens in giant devil catfish. Therefore, this study aims to determine common pathogens in giant devil catfish during cage culture in this province. Bacterial culture, isolation, identification, and infection experiment were applied for this study. The results showed that *Aeromonas hydrophila* was the causative agent of hemorrhagic disease in giant devil catfish with such clinical signs as red spots, ulcers, hemorrhage in skin and liver, empty stomach, and abdomen containing fluids. *A. hydrophila* had high virulence, causing mortality upto 100% in 3 days at the dose of 10^4 - 10^6 cfu/ml. At the concentration of 10^3 cfu/ml, *A. hydrophila* can cause the death of experimental fish with signs of abdominal ulcer, liver and kidney hemorrhage. The mortality increases gradually over time from 47.6% at day 2 to 90.5% at day 4 and reached 100% at day 5 post challenge.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, giant devil catfish (*Bagarius yarrelli*), Tuyen Quang province.

Classification number: 4.5

Phương pháp thu và phân tích mẫu

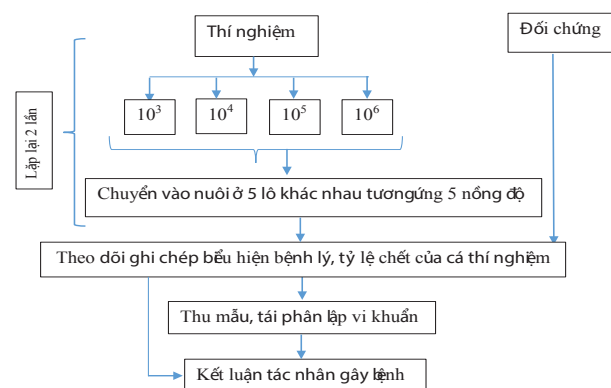
Phương pháp thu mẫu: mẫu cá Chiền nuôi lồng có biểu hiện xuất huyết, lở loét được thu để phân tích. Cá thu và phân tích ở giai đoạn nuôi thương phẩm có kích thước dao động từ 0,05-1,5 kg, phụ thuộc vào thời điểm thả cá và chế độ chăm sóc cá của chủ lồng nuôi. Giải phẫu cá tại điểm thu và cấy mẫu gan, thận, lách lên môi trường nuôi cấy cơ bản Tryptic Soy Agar (TSA) và môi trường chọn lọc Rimler Shotts agar (RS).

Phương pháp phân tích vi khuẩn: đĩa môi trường nuôi cấy vi khuẩn từ mô gan, thận và lách của cá Chiền được chuyển về phòng thí nghiệm và ủ trong điều kiện nhiệt độ 28-29°C trong 24-36h. Vi khuẩn được phân lập định danh loài thông qua kết quả nhuộm gram, dãy phản ứng sinh hóa của bộ kit API 20E, kết quả được tra trên phần mềm Apiweb TM-API 20E (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>).

Phương pháp thử khả năng kháng khuẩn: kháng sinh đồ được lập đối với vi khuẩn thu được từ mẫu cá Chiền bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer. Đo đường kính vòng vô khuẩn (mm): dựa vào chuẩn đường kính của vòng vô khuẩn theo tài liệu "The Clinical and Laboratory Standards Institute" [CLSI (former NCCLS M31-A2)] của Anonymous (2006) nhằm xác định loại kháng sinh nhạy, nhạy trung bình và kháng. Trong đó đường kính vòng vô khuẩn ≥ 16 mm là nhạy: S (sensitive), 12-15 mm là nhạy trung bình: M (medium) và ≤ 11 mm là kháng: R (resistant).

Phương pháp kính hiển vi điện tử: mẫu cắt kính hiển vi điện tử được cố định trong dung dịch glutanum-andehyt 2,5%, pha trong dung dịch đệm cacodylat 0,1 M (pH=7,2-7,4) và bảo quản lạnh ở 4°C trước khi chuyển đến phân tích tại Phòng thí nghiệm siêu cấu trúc, Trung tâm Nghiên cứu y sinh, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Để khẳng định vi khuẩn thu được từ mẫu cá Chiền bị bệnh là tác nhân gây bệnh, tiến hành gây nhiễm vi khuẩn thu được từ cá bệnh lên cá khỏe, sau đó tái phân lập lại vi khuẩn ở cá gây nhiễm từ các lô thí nghiệm. Các bước gây nhiễm được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ các bước gây nhiễm vi khuẩn lên cá Chiền.

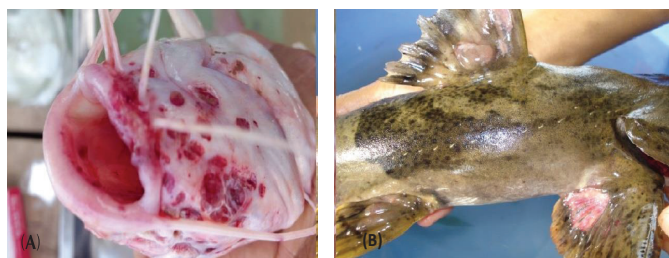
Cá trong mô hình thí nghiệm được nuôi thuần 7 ngày trước khi tiến hành gây nhiễm. Ở lô đối chứng, cá nuôi bình thường không có tác động nào của vi khuẩn. Ở lô thí nghiệm, sau 7 ngày nuôi thuần, cá được ngâm 2h trong các bể có mật độ vi khuẩn *A. hydrophila* khác nhau lần lượt từ 10^3 - 10^6 , mỗi nồng độ chứa 7 cá thể. Sau 2h, chúng được chuyển vào bể thí nghiệm nuôi theo dõi bình thường. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện nhiệt độ 25-27°C, pH=7,3-7,5, có sục khí và nước luôn chảy tràn liên tục để tạo dòng chảy, không để xảy ra hiện tượng nước đứng trong quá trình thí nghiệm.

Theo dõi, ghi lại số cá có biểu hiện bất thường, chết ở các lô thí nghiệm. Song song với đó tiến hành thu mẫu cá tái phân lập vi khuẩn để xác định có hay không vi khuẩn thu được trùng với vi khuẩn đã pha vào nước ngâm cá; kiểm tra trên kính hiển vi điện tử mẫu gan cá để xác định có hay không sự hiện diện của vi khuẩn.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Đặc điểm bệnh lý của cá nhiễm khuẩn *A. hydrophila*

Kết quả quan sát dấu hiệu bệnh lý cá bệnh cho thấy: cá giảm ăn, yếu, bơi lơ dờ tăng mật. Ở những mẫu cá nhiễm bệnh nặng trên thân xuất hiện các tổn thương như xuất huyết, loét đỏ với các đốm to nhỏ khác nhau. Tổn thương chủ yếu tập trung ở vùng miệng, đầu và các gốc vây (hình 2). Biểu hiện nội tạng khi giải phẫu nhận thấy ruột không có thức ăn, gan sưng huyết, ổ bụng chứa nhiều dịch. Ghi nhận của cá bệnh trong nghiên cứu này trùng hợp với kết quả nghiên cứu biểu hiện bệnh lý của một số loài cá da trơn nhiễm *A. hydrophila* như cá Lăng (*Ictalurus punctatus*) [1-3], cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) [4], Lươn [5].



Hình 2. Dấu hiệu bệnh lý của cá Chiên nhiễm khuẩn (*A. hydrophila*). (A) xuất hiện tổn thương xuất huyết, loét ở vùng đầu, miệng; (B) xuất huyết, loét ở gốc vây.

Phân lập và định danh vi khuẩn ở mẫu cá Chiên bị bệnh

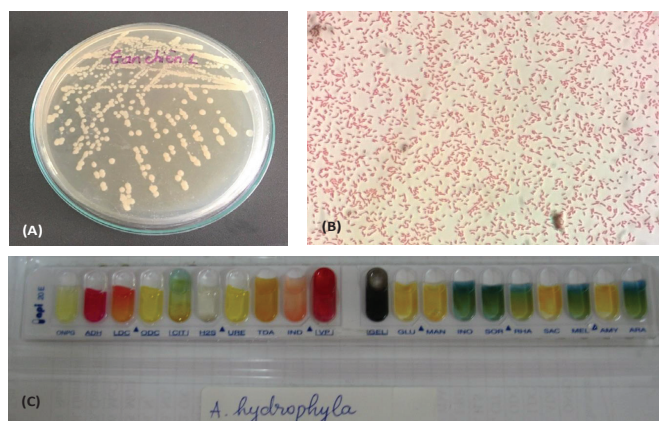
Tổng số 84 mẫu cá Chiên được thu vào tháng 7, 8, 9, 11 và 12, trong đó có 48 mẫu cá có biểu hiện bất thường với dấu hiệu như ruột không có thức ăn, xuất huyết, loét đốm đỏ... và 36 mẫu cá Chiên không có biểu hiện bất thường (bảng 1).

Bảng 1. Số mẫu và biểu hiện bệnh lý điển hình mẫu phân tích trong nghiên cứu.

TT	Dấu hiệu bệnh lý của mẫu thu phân tích	Số mẫu thu	Kết quả phân lập
1	Ruột không có thức ăn, gốc vây xuất huyết	8	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	Ruột không có thức ăn, trên thân xuất hiện các điểm xuất huyết, loét đốm đỏ ở thân, vùng đầu miệng	19	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	Ruột không có thức ăn, khoang bụng chứa nhiều dịch, gan sưng huyết	9	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	Ruột không có thức ăn, màu sắc gan không đồng đều, vùng sưng huyết đỏ, vùng nhợt nhạt	12	<i>Aeromonas hydrophila</i>
5	Cá không có biểu hiện bất thường	36	-
Tổng số mẫu thu phân tích		84	

Ghi chú: “-” mẫu có kết quả âm tính với chỉ tiêu phân tích vi khuẩn.

Kết quả nuôi cấy, phân lập vi khuẩn ở gan và thận của mẫu cá có biểu hiện mô tả tại bảng 1 cho thấy, đối với mẫu cá có dấu hiệu bất thường như ruột không có thức ăn, gốc vây xuất huyết, xuất hiện loét loét đỏ hay xuất huyết ở thân, vùng đầu miệng, khoang bụng chứa nhiều dịch, gan sưng huyết hay màu sắc gan không đồng đều, đã phân lập được cùng 1 loài vi khuẩn trùng khớp đến 99,9% với *A. hydrophila* khi tra đặc điểm sinh hóa từ kit API 20E trên phần mềm Apiweb TM-API 20E. Trong khi đó, các mẫu không có dấu hiệu bất thường đều cho kết quả âm tính với vi khuẩn. *A. hydrophila* là loài vi khuẩn xuất hiện phổ biến, thường trực trong môi trường nước ngọt nuôi thủy sản và có thể gây ra tổn thất lớn khi là tác nhân gây bệnh cho cá [6]. Cá nuôi bị bệnh do *A. hydrophila* gây ra được ghi nhận có 2 dạng phổ biến: xuất huyết cấp tính đặc trưng bởi phù nề toàn thân, xuất huyết, hoại tử có chiều hướng lan rộng bắt đầu từ 1 điểm nhỏ ban đầu và xuất huyết nội tạng (gan, lách, thận); và hội chứng loét mãn tính được đánh dấu bằng sự hình thành của loét ăn sâu từ da xuống cơ cá [7, 8].



Hình 3. Vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ cá Chiên bị bệnh. (A) hình thái khuẩn lạc mọc trên TSA; (B) hình thái vi khuẩn nhuộm gram; (C) đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn.

Trong nghiên cứu này, *A. hydrophila* thu được ở gan, thận cá Chiên bệnh có đặc điểm chính sau: khuẩn lạc mọc trên môi trường TSA sau 24h ủ ở nhiệt độ 28-29°C với sự xuất hiện của khuẩn lạc tròn lồi, rìa nhẵn và màu trắng sữa (hình 3A), trong khi đó ở môi trường RS khuẩn lạc có hình dạng tròn, lồi, màu vàng. Kết quả này trùng hợp với các nghiên cứu trước đây khi chỉ ra khuẩn lạc của *A. hydrophila* có dạng hình tròn, màu trắng sữa trên môi trường dinh dưỡng TSA [9] và có màu vàng trên môi trường RS do chúng có khả năng lên men 2 loại đường sacrose và mantol [10]. Rõ ràng *A. hydrophila* phân lập được trong nghiên cứu này có tính chất lên men 2 loại đường sacrose và mantol với kết quả phản ứng màu vàng ở thanh kit API 20E (hình 3C). Bên cạnh đó, kỹ thuật nhuộm gram cho thấy hình thái vi khuẩn *A. hydrophila* có dạng trực khuẩn, thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, với khả năng bắt màu hồng của thuốc nhuộm safranin (hình 3B), kết quả trùng khớp với nghiên cứu của Nicky B. Buller (2004) khi chỉ ra *A. hydrophila* có dạng hình que ngắn, thẳng, bắt màu hồng sau khi nhuộm gram với bộ 4 loại thuốc lần lượt là 1-Crystal Violet, 2-Lugol, 3-Aceton và 4-Safranin [11].

Khi cá nuôi nhiễm tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, biện pháp trị bệnh thường áp dụng là kháng sinh, tuy nhiên để đưa ra loại thuốc nào có hiệu quả diệt khuẩn cao, cần áp dụng phương pháp lập kháng sinh đồ, tránh trường hợp sử dụng thuốc theo cảm tính, kinh nghiệm. Vấn đề này đã được khắc phục và thực hiện trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, 7/8 loại kháng sinh thử đều không có khả năng kháng khuẩn hoặc có nhưng ở mức trung bình và yếu, chỉ có duy nhất kháng sinh Doxycycline có hiệu quả diệt khuẩn cao đối với vi khuẩn *A. hydrophila* thu được với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình đạt $26,5 \pm 1,1$ mm (bảng 2).

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của kháng sinh đối với vi khuẩn *A. hydrophila*.

TT	Tên thuốc kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Khả năng kháng khuẩn
1	Tetracyclin	$12,6 \pm 2,9$	M
2	Ornithin	0	R
3	Ampicycline	0	R
4	Novobiocin	$5,5 \pm 1,8$	R
5	Trimethoprin - sulfamethoxazol	$15,6 \pm 1,4$	M
6	Doxycycline	$26,5 \pm 1,1$	S
7	Neomycin	$7,5 \pm 1,7$	R
8	Erythromycin	$10,2 \pm 2,9$	R

Gây nhiễm *A. hydrophila* lên cá Chiên

Kết quả nghiên cứu chỉ rõ, *A. hydrophila* có độc lực cao đối với cá Chiên. Ở cả 3 nồng độ gây nhiễm 10^4 , 10^5 và 10^6 cfu/ml cá có tỷ lệ chết 100% ở ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm, đặc biệt ở nồng độ 10^6 cfu/ml cá chết 100% ngay ở ngày thứ 2. Ở nồng độ thấp hơn (10^3 cfu/ml) tỷ lệ chết kéo dài theo

thời gian từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm (47,6-100%). Biểu hiện bệnh lý đã không được ghi nhận ở lô gây nhiễm 10^4 - 10^6 cfu/ml, điều này được lý giải do vi khuẩn có độc lực mạnh, cá chết nhanh khi chưa kịp có biểu hiện bệnh lý, nhận định này trùng hợp với nghiên cứu của Sarker và cs (2016) [12]. Tuy nhiên, ở lô thí nghiệm 10^3 cfu/ml cá có biểu hiện loét phần bụng và gan thận sưng huyết (hình 4A), đồng thời kết quả tái phân lập *A. hydrophila* ở các lô gây nhiễm đều cho kết quả 100% là *A. hydrophila*. Trong khi đó, lô đối chứng âm (không gây nhiễm vi khuẩn) cá phát triển bình thường, phản xạ nhanh khi có tiếng động trong suốt 8 ngày thí nghiệm, kết quả phân lập vi khuẩn (bao gồm *A. hydrophila*) ở các ngày 3, 5 và 7 đều âm tính (bảng 3).



Hình 4. Kết quả gây nhiễm *A. hydrophila* lên cá Chiên. (A) biểu hiện lở loét vùng thân, gan sưng huyết của cá gây nhiễm; (B) hình thái khuẩn lạc trên Rimler Shotts agar; (C) hình ảnh vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử; (D) đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn.

Bảng 3. Tỷ lệ (%) mẫu tái phân lập *A. hydrophila* trong quá trình thí nghiệm.

TT	Ngày thí nghiệm	Tỷ lệ <i>A. hydrophila</i> tái phân lập từ thí nghiệm gây nhiễm (%) - Mật độ vi khuẩn gây nhiễm (cfu/ml)				Đối chứng
		10^6	10^5	10^4	10^3	
1	2	100	100	#	#	#
2	3	#	#	100	100	0
3	5	#	#	#	100 ⁽¹⁾	0
4	7	Kết thúc thí nghiệm ngày thứ 3				0

Ghi chú: #: không thu mẫu phân tích, số mẫu mỗi lần phân tích n=3; ⁽¹⁾: thu mẫu cấy kính hiển vi điện tử.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn hình thức gây nhiễm là ngâm - phương pháp được xem là mô tả một cách hiệu quả và gần nhất với con đường lây nhiễm tự nhiên của vi khuẩn nói chung và *A. hydrophila* nói riêng lên cá Chiên nuôi, đây là phương pháp được nhiều tác giả ứng dụng [12, 13]. Kết quả thí nghiệm gây nhiễm cho thấy, tổn thương quan sát được ở cá Chiên trong thí nghiệm ngâm trong nước chứa *A. hydrophila* tương tự như biểu hiện bệnh lý đã ghi nhận được ở cá Chiên bị bệnh nuôi tại vùng nghiên cứu (tổn thương loét ở thân, sưng huyết gan thận) (hình 4A), bên cạnh đó cá có biểu hiện bất thường trong thí nghiệm được thu tái phân lập vi khuẩn cho kết quả 100% mẫu là *A. hydrophila* thông qua hình ảnh khuẩn lạc mọc trên RS, hình thái vi khuẩn nhuộm gram và phản ứng sinh hóa trong kit API 20E (bảng 3 và hình 4B, D).

A. hydrophila được biết đến là chủng vi khuẩn có độc lực cao đối với cá nuôi nước ngọt, đặc biệt cá da trơn. Các thí nghiệm gây nhiễm đã chỉ ra *A. hydrophila* có độc lực gây chết cá Lăng với tỷ lệ cao (>90%) ở nồng độ gây nhiễm 2×10^7 cfu/ml trong thời gian 48h ở điều kiện nhiệt độ $27 \pm 1^\circ\text{C}$, với tổn thương ở vùng thân dễ nhận thấy như xuất huyết, đỏ ở da, các gốc vây. Hơn nữa, thí nghiệm đã ghi nhận có tỷ lệ cá chết khác nhau ($p < 0,05$) khi thời gian ngâm cá trong môi trường nước chứa vi khuẩn khác nhau (15 và 60 phút) [13]. Một nghiên cứu khác đã chỉ ra, *A. hydrophila* gây chết 100% cá Nheo trong suốt 7 ngày gây nhiễm, trong khi đó các chủng vi khuẩn khác gây chết với tỷ lệ thấp, lần lượt *A. sobria* (0%), *Plesiomonas shigelloides* (20%) [14].

Ở ngày thứ 5, mẫu cá Chiên thí nghiệm có biểu hiện bệnh lý ở lỗ gây nhiễm 10^3 cfu/ml được thu tái phân lập *A. hydrophila*, đồng thời cắt kính hiển vi điện tử. Kết quả thu được hình ảnh vi khuẩn có kích thước dài 1,84 và rộng 0,59 μm (hình 4C), đây là kích thước phù hợp nằm trong khoảng kích thước của *A. hydrophila* (0,3-1,0 μm rộng và 1,0-3,5 μm dài) được nhiều nghiên cứu chỉ ra [11, 15].

Kết luận

Vi khuẩn *A. hydrophila* là tác nhân gây bệnh ở cá Chiên với biểu hiện bệnh lý ngoài điển hình như: đốm đỏ, loét, xuất huyết ở thân (đặc biệt vùng đầu, miệng, gốc vây) và biểu hiện trong nội tạng khi giải phẫu là ruột không có thức ăn, gan sưng huyết, ổ bụng chứa nhiều dịch.

A. hydrophila có độc lực cao, ở nồng độ 10^4 - 10^6 cfu/ml gây chết cá cấp tính, không có dấu hiệu bệnh lý trong 3 ngày. Ở nồng độ 10^3 cfu/ml, *A. hydrophila* gây chết cá thí nghiệm với biểu hiện loét phần bụng và gan thận sưng huyết, tỷ lệ chết cộng dồn tăng dần theo thời gian từ 47,6% ở ngày thứ 2, tăng lên 90,5% ở ngày thứ 4 và 100% ngày thứ 5.

Kháng sinh Doxycycline có tác dụng diệt khuẩn cao đối với chủng *A. hydrophila* phân lập được ở cá Chiên thu tại lồng nuôi ở các huyện Na Hang, Hàm Yên và TP Tuyên Quang, tỉnh Tuyên Quang.

Kiến nghị cần tiếp tục nghiên cứu sử dụng các hợp chất hoạt tính sinh học tự nhiên có tác dụng diệt khuẩn nhằm đánh giá khả năng phòng bệnh, làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng biện pháp phòng trị bệnh cho cá Chiên nuôi theo hướng thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trịnh Thị Trang, Nguyễn Thị Dung, Trương Đình Hoài (2017), “Xác định tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá Lăng (*Ictalurus punctatus*) tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **15**(14), tr.446-455.
- [2] T. Majumdar, et al. (2007), “Role of virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* in the pathogenesis of ulcerative disease syndrome in *Clarias batrachus*”, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **44**, pp.401-406.
- [3] A.J. Ullal, R.W. Litaker, E.J. Noga (2008), “Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)”, *Dev. Comp. Immunol.*, **32**, pp.1301-1312.
- [4] Tu Thanh Dung, et al. (2008), *Common diseases of Pangasius Catfish farmed in Vietnam*, Global Aquaculture Advocate.
- [5] C. Esteve, et al. (1994), “O-serogrouping and surface components of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* pathogenic for eels”, *FEMS Microbiol. Lett.*, **117**, pp.85-90.
- [6] J.A. Plumb, L.A. Hanson (2010), *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*, Wiley Blackwell.
- [7] R.C. Cipriano, et al. (1984), *Aeromonas hydrophila and Motile Aeromonad Septicemias of Fish*, United States Fish and Wildlife Service.
- [8] H.W. Huizinga, et al. (1979), “Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede)”, *J. Fish Dis.*, **2**, pp.263-277.
- [9] Emanuel Goldman, Lorrence H. Green (2009), *Practical Handbook of Microbiology*, CRC Press. Taylor & Francis Group.
- [10] Subhi H. Khalaf, et al. (2005), “The Use of Modified Rimler-Shotts Agar as a Selective Medium for the Isolation of *Aeromonas* Species from Children Diarrhea in Mosul-Iraq”, *Raf. Jour. Sci.*, **16**(7), pp.5-14.
- [11] Nicky B. Buller (2004), *Bacteria from fish and other aquatic animals. A practical Identification Manual*, CABI publishing, Aquatic animals - Microbiology.
- [12] J. Sarker, M.A.R. Faruk (2016), “Experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in pangasius”, *Agriculture*, **27**(3), pp.392-399.
- [13] Zhang, Dunhua, et al. (2016), “Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*”, *Aquaculture*, **3**, pp.18-23.
- [14] Toshihiro Kuge, et al. (1992), “*Aeromonas hydrophila*, a Causative Agent of Mass Mortality in Cultured Japanese Catfish Larvae (*Silurus asotus*)”, *Gyobyo Kenkyu*, **27**(2), pp.57-62.
- [15] A.J. Horneman, A. Ali, S.L. Abbott (2007), *Manual of Clinical Microbiology*, Washington D.C.: ASM Press.

Dự đoán cơ chế lặp của họ gen mã hóa protein vận chuyển đường sucrose ở loài đậu gà (*Cicer arietinum*)

Chu Đức Hà^{1*}, Chu Thị Bích Thủy^{1,2}, Phạm Thị Lý Thu¹,
Phạm Phương Thu², La Việt Hồng²

¹Viện Di truyền nông nghiệp, VAAS

²Khoa Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Ngày nhận bài 18/3/2019; ngày chuyển phản biện 22/3/2019; ngày nhận phản biện 2/5/2019; ngày chấp nhận đăng 3/6/2019

Tóm tắt:

Ở thực vật, SWEET (sugars will eventually be exported transporter) là họ protein vận chuyển đường sucrose đóng vai trò quan trọng, tham gia vào nhiều quá trình sinh học thiết yếu trong tế bào. Trong nghiên cứu này, hiện tượng lặp của họ gen mã hóa SWEET ở cây đậu gà (*Cicer arietinum*) đã được phân tích thông qua các công cụ tin sinh học. Kết quả đã xác định được 6 sự kiện lặp trong họ gen *CaSWEET* ở đậu gà. 3/6 cặp gen lặp đều nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau, cho thấy hiện tượng lặp trên các vùng lớn của nhiễm sắc thể là cơ chế chính để nhân rộng họ gen *CaSWEET* tương tự như các loài thực vật khác. Phân tích cũng đã dự đoán rằng, sự sai khác trong cấu trúc của các gen lặp đã bị kìm hãm dưới áp lực của chọn lọc tự nhiên. Các sự kiện lặp được tính toán một cách tương đối xảy ra cách đây từ 23,06 đến 38,31 triệu năm trước. Vùng bảo thủ của họ *CaSWEET* đặc trưng bởi 7 domain TM và 7 trình tự motif. Kết quả của nghiên cứu đã cung cấp những dẫn liệu quan trọng về sự nhân rộng của họ gen *CaSWEET*, từ đó có thể đưa ra các giả thuyết về vai trò của các gen lặp đối với loài đậu gà.

Từ khóa: đậu gà, lặp gen, *SWEET*, tin sinh học.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Hiện tượng lặp gen (gene duplication) được giả thuyết là cơ chế chính để nhân rộng các họ đa gen (multigene family) ở thực vật [1]. Cụ thể, khoảng 65% gen được giải mã trong genome thực vật đều có thể tìm thấy gen lặp của chúng [1]. Hiện tượng này được giải thích chủ yếu do sự trao đổi bất thường giữa những alen tương đồng tạo nên cặp gen lặp ở khoảng cách gần nhau và sự lặp của các vùng nhiễm sắc thể lớn (segmental duplication) [2]. Vì vậy, nghiên cứu về cơ chế nhân rộng của các họ gen có thể cho phép tìm hiểu về phân hóa chức năng cũng như cấu trúc của các gen này, đây là những dẫn liệu quan trọng nhằm đánh giá vai trò của gen liên quan đến đáp ứng bất lợi của môi trường.

Ở thực vật, đường sucrose (đơn vị dự trữ năng lượng cơ bản trong tế bào) được vận chuyển chủ yếu nhờ nhóm protein SWEET. Trong đó, các gen mã hóa SWEET ở thực vật được chứng minh đóng vai trò trong nhiều quá trình

quan trọng như trao đổi chất, đáp ứng bất lợi... [3]. Trước đây, họ gen gồm 21 thành viên, mã hóa protein SWEET đã được xác định ở đậu gà (*Cicer arietinum*) [3] - cây trồng quan trọng thứ hai trong họ Đậu được sử dụng phổ biến làm thực phẩm, thức ăn gia súc, nhiên liệu sinh học và cải tạo môi trường (cố định N₂) [4-6]. Trong đó, hầu hết các gen *CaSWEET* đều có 6 exon [3]. Vì vậy, câu hỏi được đặt ra là họ gen *CaSWEET* được nhân rộng ra sao, và có tương tự như ở các loài thực vật khác hay không? Trong nghiên cứu này, cơ chế nhân rộng của họ gen *CaSWEET* ở *Cicer arietinum* đã được phân tích *in silico*. Cụ thể, các sự kiện lặp gen đã được dự đoán dựa trên sự tương đồng giữa các gen *CaSWEET* gần gũi. Sau đó, áp lực của chọn lọc tự nhiên và thời điểm xảy ra hiện tượng lặp gen đã được đánh giá. Cuối cùng, trình tự bảo thủ và các motif của họ SWEET đã được tìm hiểu. Kết quả của nghiên cứu này góp phần cung cấp những hiểu biết cơ bản về họ gen *CaSWEET* trong suốt quá trình tiến hóa của đậu gà.

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

Prediction of the gene duplication mechanism in the genes encoding sucrose transporters in chickpea (*Cicer arietinum*)

Duc Ha Chu^{1*}, Thi Bich Thuy Chu^{1,2},
Thi Ly Thu Pham¹, Phuong Thu Pham², Viet Hong La²

¹Agricultural Genetics Institute (VAAS)

²Faculty of Biology - Agricultural Technology,
Hanoi Pedagogical University 2

Received 18 March 2019; accepted 3 June 2019

Abstract:

In plants, SWEETs (sugars will eventually be exported transporters) are known as the major sucrose transporters that involve in various important biological processes. In this study, the gene duplication of the gene family encoding SWEETs in chickpea (*Cicer arietinum*) has been analysed based on the bioinformatics approach. As the results, a total of six duplication events occurring in the *CaSWEET* gene family in chickpea has been determined. Three (out of six) duplicated pairs were distributed on the distinct chromosomes, suggesting that the segmental duplication is considered as the major reason to explain the expansion of the *CaSWEET* gene family, as confirmed in many plant species. Our results also predicted that the purifying selection was appeared to maintain the preservation of SWEET proteins. These duplication events were calculated to approximately occur from 23.06 to 38.31 million years ago. Additionally, the conserved domain of *CaSWEET* consisted of seven TM units and seven specific motifs. Our study would provide a critical understanding of the expansion of *CaSWEET* genes, this could suggest the role of duplicated genes in chickpea plants.

Keywords: bioinformatics, chickpea, gene duplication, *SWEET*.

Classification number: 4.6

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Genome và proteome của giống đậu gà kabuli ‘CDC Frontier’ [7] được khai thác trên Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) [8].

Trình tự protein, đoạn exon mã hóa (coding DNA sequence, CDS) và vùng gen (genomic sequence) của 21 *CaSWEET* được khai thác từ nghiên cứu trước đây [3].

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp dự đoán sự kiện lặp gen: trình tự CDS (định dạng .fasta) của họ *CaSWEET* được sử dụng để so sánh trình tự tương đồng bằng công cụ ClustalX [9]. Mức độ tương đồng (%) của các trình tự CDS được tính toán bằng phần mềm BioEDIT [10]. Các bước tiến hành và thông số cài đặt được mô tả tương tự như trong nghiên cứu gần đây [11].

Phương pháp xây dựng cây phân loại: trình tự protein (định dạng .fasta) của họ *SWEET* được khai thác để phân tích trình tự tương đồng và thiết lập cây quan hệ phát sinh bằng phần mềm MEGA [12]. Trong đó, cây phân loại được xây dựng trên phương pháp Neighbor-Joining (N-J), phân tích bootstrap với 1.000 lần lấy lại mẫu như trong nghiên cứu gần đây [11].

Phương pháp xác định trị số thay thế đồng nghĩa và trái nghĩa: trị số thay thế đồng nghĩa (the number of synonymous substitutions per synonymous site - Ks) và trị số thay thế trái nghĩa (the number of nonsynonymous substitutions per non-synonymous site - Ka) của các sự kiện lặp gen của họ *CaSWEET* được dự đoán bằng cách truy vấn cặp CDS đã căn trình tự vào phần mềm DNAsp [13]. Thời điểm xảy ra sự kiện lặp gen (Y) được tính toán theo công thức $Y = Ks/2\lambda$, với $\lambda = 6,5 \times 10^{-9}$ (năm) [14].

Phương pháp phân tích vùng bảo thủ và motif: vùng bảo thủ SWEET ở đậu gà được kết xuất từ phần mềm MEGA [12]. Kết quả minh họa trình tự tương đồng của họ *CaSWEET* được biểu diễn trên phần mềm BioEDIT [10]. Các motif đặc trưng được xác định bằng cách truy vấn trình tự protein (.fasta) trên phần mềm MEME [15]. Kích thước motif được giới hạn trong khoảng 6÷50 amino acid với tối đa 29 motif.

Kết quả và thảo luận

Kết quả dự đoán hiện tượng lặp gen của họ gen *CaSWEET* ở đậu gà

Để dự đoán hiện tượng lặp trong họ gen *CaSWEET* ở đậu gà, trình tự CDS của các gen được căn trình tự trên

ClustalX [9] để đánh giá mức độ tương đồng bằng BioEDIT [10]. Trong nghiên cứu này, sự kiện gen lặp được định nghĩa là hai (hoặc nhiều gen) có trình tự nucleotide (CDS) tương đồng lớn hơn 70% như trong mô tả gần đây [16]. Kết quả đã xác định được 6 cặp gen lặp, có mức độ tương đồng cao hơn 70% (bảng 1). Cụ thể, *CaSWEET15* và *CaSWEET17* là cặp gen lặp có mức độ tương đồng thấp nhất (đạt 72,6%), trong khi *CaSWEET08* và *CaSWEET09* là cặp gen lặp có tương đồng ở cấp độ nucleotide cao nhất (77,3%) (bảng 1). Trước đó, 6 cặp gen lặp đã được dự đoán trong họ *MeSWEET* ở sắn (*Manihot esculenta*) với mức độ tương đồng lớn hơn 50% [11].

Bảng 1. Hiện tượng lặp của họ gen *CaSWEET* ở đậu gà.

TT	Cặp gen lặp	Chr	E	H (%)	Ka	Ks	Ka/Ks	Y (mya)
1	<i>CaSWEET01/CaSWEET21</i>	Ca1/US	-	73,5	0,246	0,450	0,547	34,58
2	<i>CaSWEET06/CaSWEET07</i>	Ca2/Ca2	T	75,6	0,199	0,382	0,520	29,41
3	<i>CaSWEET08/CaSWEET09</i>	Ca3/Ca3	T	77,3	0,231	0,300	0,770	23,06
4	<i>CaSWEET10/CaSWEET12</i>	Ca4/Ca5	S	74,8	0,243	0,388	0,626	29,83
5	<i>CaSWEET11/CaSWEET16</i>	Ca4/Ca5	S	73,3	0,244	0,498	0,490	38,31
6	<i>CaSWEET15/CaSWEET17</i>	Ca5/Ca6	S	72,6	0,292	0,420	0,695	32,33

TT: Số thứ tự; Chr: nhiễm sắc thể; US: vùng chưa chú giải; E: sự kiện lặp; S: lặp trong vùng lân cận trên cùng nhiễm sắc thể; T: lặp trong vùng lân cận dưới cùng nhiễm sắc thể; -: không xác định; H: mức độ tương đồng; Ka: giá trị thay thế trái nghĩa; Ks: giá trị thay thế đồng nghĩa; Y: thời điểm xảy ra hiện tượng lặp gen; mya: triệu năm về trước.

Phần lớn sự kiện lặp được dự đoán trong họ gen *CaSWEET* ở *C. arietinum* đều xảy ra trên các nhiễm sắc thể khác nhau (bảng 1). Cụ thể, 3 cặp gen lặp '*CaSWEET10* và *CaSWEET12*', '*CaSWEET11* và *CaSWEET16*' lần lượt phân bố trên nhiễm sắc thể Ca4 và Ca5, trong khi '*CaSWEET15* và *CaSWEET17*' nằm trên Ca5 và Ca6 (bảng 1). 2 cặp gen khác là '*CaSWEET06* và *CaSWEET07*' và '*CaSWEET08* và *CaSWEET09*' lần lượt cùng định vị trên nhiễm sắc thể Ca2 và Ca3, trong khi *CaSWEET21* trong cặp gen lặp '*CaSWEET01* và *CaSWEET21*' chưa được chú giải trên genome của *C. arietinum* [7] như trong ghi nhận gần đây [3] (bảng 1). Có thể thấy rằng, cơ chế lặp của họ gen *CaSWEET* được diễn ra chủ yếu do hiện tượng lặp trên các vùng nhiễm sắc thể khác nhau (3/6 sự kiện lặp) (bảng 1). Trước đó, hiện tượng lặp trên các nhiễm sắc thể cũng được ghi nhận đóng vai trò chính trong sự nhân rộng của họ gen mã hóa SWEET ở sắn [11], đậu tương (*Glycine max*) [17], cao lương (*Sorghum bicolor*) [18], mía đường (*Saccharum spp.*) [19]. Điều này cho thấy hiện tượng lặp trên các nhiễm sắc thể là nguyên nhân chính cho sự nhân rộng của họ gen *SWEET* ở thực vật nói chung.

Kết quả đánh giá vai trò của đột biến và chọn lọc tự nhiên đến quá trình lặp ở họ gen *CaSWEET*

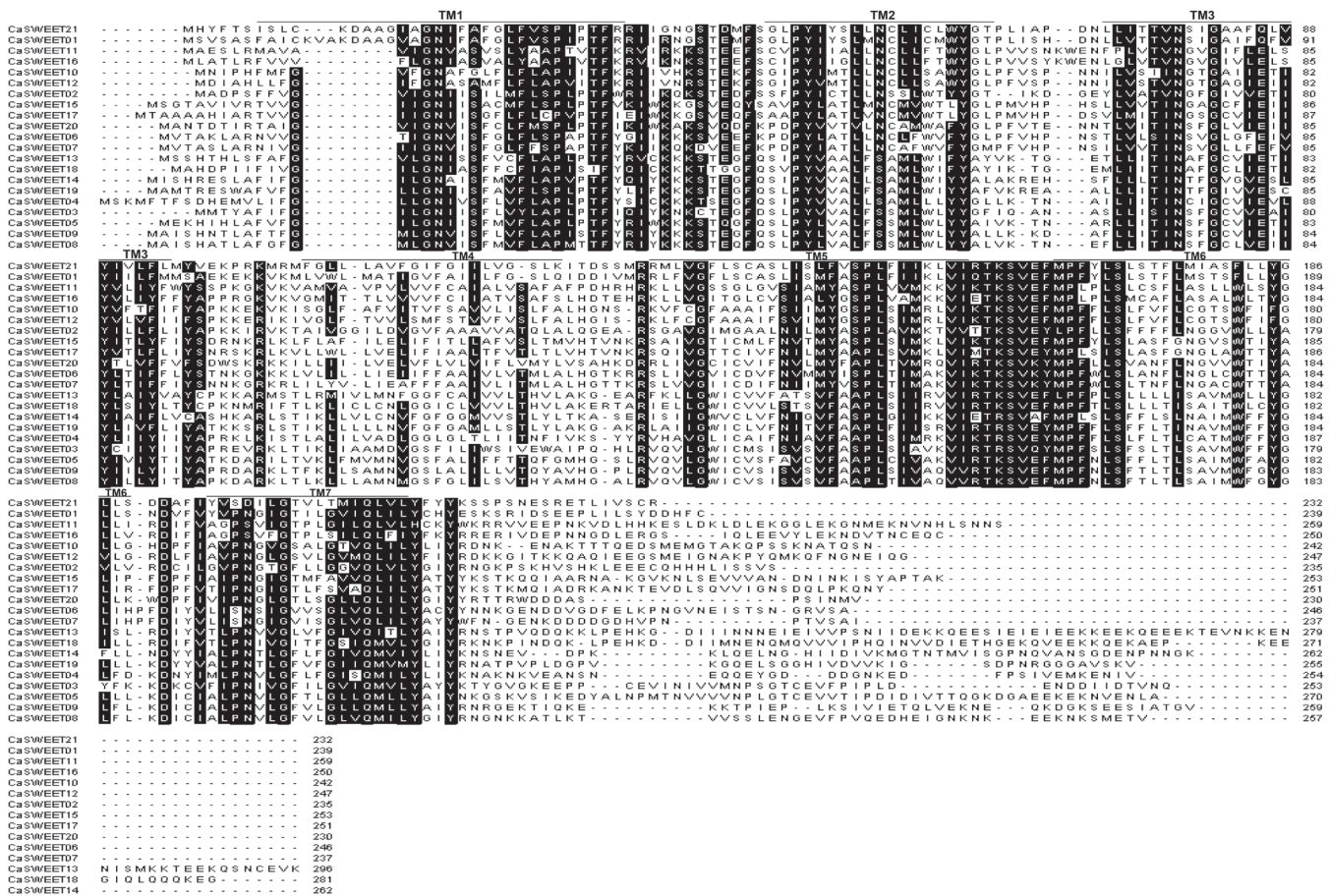
Để đánh giá vai trò của đột biến và áp lực của chọn lọc tự nhiên đến quá trình lặp của họ gen *CaSWEET*, trị số Ka, Ks và tỷ lệ Ka/Ks giữa 6 cặp gen lặp đã được nghiên cứu. Cụ thể, tỷ lệ Ka/Ks < 1, nghĩa là các đột biến điểm xảy ra trong cấu trúc gen bị kìm hãm, cặp gen có mức độ tương đồng cao, trong khi tỷ lệ này > 1, cho thấy chọn lọc tự nhiên đã thúc đẩy sự hình thành gen mới. Kết quả phân tích giá trị Ka/Ks của 6 cặp gen lặp trên phần mềm DNAsp [13] được thể hiện ở bảng 1.

Tất cả giá trị Ka/Ks của 6 sự kiện đều < 1, cho thấy số lượng đột biến thay thế trái nghĩa (Ka) nhỏ hơn đột biến thay thế đồng nghĩa (Ks) trên các gen lặp (bảng 1). Kết quả cho thấy, hiện tượng đột biến điểm gây sai khác xảy ra trên *CaSWEET* đã bị kìm hãm dưới áp lực của chọn lọc tự nhiên, từ đó đảm bảo sự toàn vẹn trong cấu trúc của SWEET ở *C. arietinum*. Trước đây, giá trị Ka/Ks < 1 cũng được ghi nhận ở 3/6 sự kiện lặp của họ *MeSWEET* ở sắn [11]. Ở đậu tương, vai trò kìm hãm sai khác của tiến hóa cũng được dự đoán ở phần lớn các sự kiện lặp (20/21) trong họ gen *GmSWEET* [17]. Những kết quả này đã chỉ ra rằng, trải qua quá trình tiến hóa, chọn lọc tự nhiên có thể đã gìn giữ sự toàn vẹn trong cấu trúc của họ gen *SWEET* nhằm đảm bảo chức năng của chúng ở phần lớn các loài thực vật.

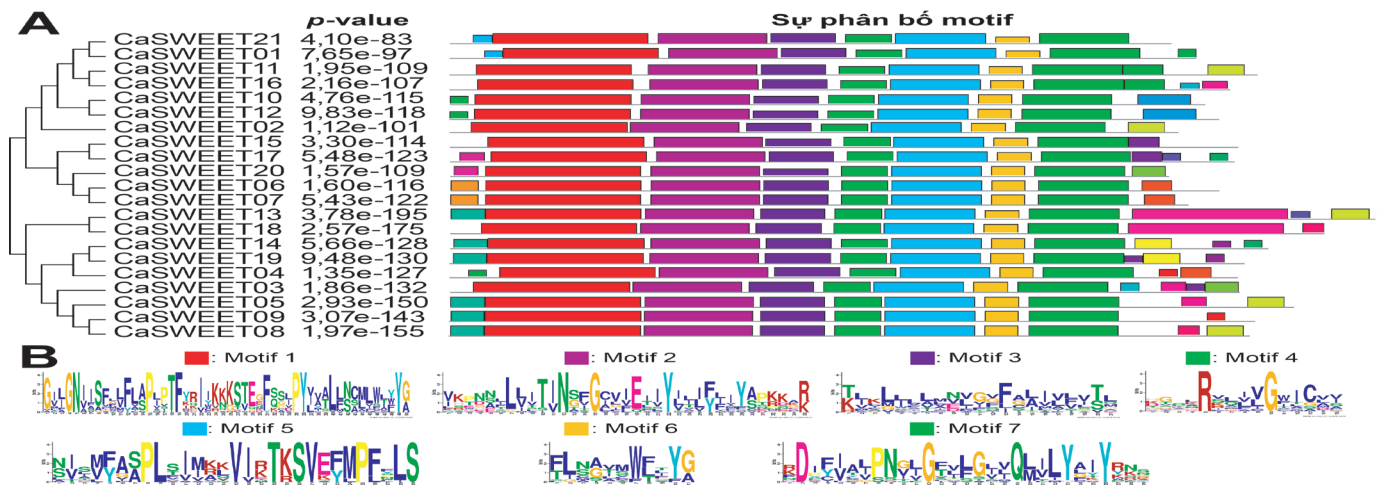
Cuối cùng, thời điểm xảy ra sự kiện lặp của họ gen *CaSWEET* được dự đoán một cách tương đối dựa trên công thức đã mô tả trước đây [14]. Các cặp gen *CaSWEET* lặp được xảy ra cách đây từ khoảng 23,06 ('*CaSWEET08* và *CaSWEET09*') đến 38,31 triệu năm về trước ('*CaSWEET11* và *CaSWEET16*') (bảng 1). Điều này cho thấy, các cặp gen lặp của họ *CaSWEET* đều xảy ra sau sự kiện lặp genome ở phân họ đậu (Papilionoideae), được cho là diễn ra cách đây khoảng 58 triệu năm về trước [20]. Trong đó, nhóm *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* và *C. arietinum* tách biệt với nhánh *Glycine max* và đậu triều (*Cajanus cajan*) cách đây khoảng 54 triệu năm về trước [21].

Kết quả phân tích vùng bảo thủ và trình tự motif đặc trưng của protein *SWEET* ở đậu gà

Trong nghiên cứu này, cấu trúc vùng bảo thủ và trình tự các motif đặc trưng của họ SWEET ở đậu gà lần lượt được phân tích trên MEGA [12] và MEME [15]. Kết quả xác định vùng bảo thủ và sự phân bố motif của họ SWEET được minh họa ở hình 1 và 2.



Hình 1. So sánh trình tự tương đồng của họ protein SWEET ở đậu gà.



Hình 2. Phân tích trình tự motif đặc trưng của họ SWEET ở đậu gà.

Dựa trên thuật toán căn trình tự tương đồng, vùng bảo thủ của họ SWEET ở đậu gà gồm 7 domain TM, trong đó có hai cặp lặp của 3 domain TM ('TM1-TM2-TM3' và 'TM5-TM6-TM7') được xen kẽ bởi đoạn TM4 (hình 1). Đây là dạng cấu trúc đặc trưng của protein vận chuyển SWEET, đã được báo cáo trên đậu tương [17] và ở thực vật nói chung [22].

Phân tích cho thấy, họ SWEET ở đậu gà chứa rất đa dạng các vùng motif đặc trưng (hình 2A). Cụ thể, 7 motif đã được tìm thấy ở tất cả các SWEET ở đậu gà (hình 2A, B), trong khi một số motif khác xuất hiện ở các CaSWEET trong cùng nhánh phân loại (hình 2A). Trong khi đó, ở cải dầu (*Brassica napus*) chỉ ghi nhận 5 motif đặc trưng cho họ

BnSWEET [23]. Sự tương đồng về vùng bảo thủ (hình 1) và các trình tự motif đặc trưng (hình 2) của họ SWEET ở đậu gà có thể được giải thích do sự toàn vẹn về số lượng cũng như cấu trúc của các gen mã hóa (6 exon) đã được ghi nhận trong nghiên cứu trước đây [3].

Kết luận

Đã xác định được 6 sự kiện lặp trong họ gen *CaSWEET* ở đậu gà. Phần lớn các cặp gen lặp nằm trên nhiễm sắc thể khác nhau, chứng tỏ quá trình lặp trên các nhiễm sắc thể là cơ chế chính giải thích cho sự nhân rộng của họ gen *CaSWEET* ở đậu gà.

Tỷ lệ Ka/Ks của 6 sự kiện lặp ở họ gen *CaSWEET* nhỏ hơn 1, chứng tỏ chọn lọc tự nhiên đã kìm hãm sự sai khác trong cấu trúc của các gen lặp. Các sự kiện lặp được dự đoán xảy ra cách đây từ 23,06 đến 38,31 triệu năm về trước.

Cấu trúc vùng bảo thủ của họ *CaSWEET* ở đậu gà chứa 7 domain TM đặc trưng. Phân tích cũng đã chỉ ra 7 trình tự motif đặc trưng nhất cho các *CaSWEET*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Panchy, M. Lehti-Shiu, S.H. Shiu (2016), "Evolution of gene duplication in plants", *Plant Physiol.*, **171**(4), pp.2294.
- [2] J.W. Clark, P.C.J. Donoghue (2018), "Whole-genome duplication and plant macroevolution", *Trends Plant. Sci.*, **23**(10), pp.933-945.
- [3] Chu Đức Hà, Chu Thị Hồng, Phùng Thị Vượng, Phạm Thị Lý Thu, Phạm Phương Thu, La Việt Hồng (2019), "Định danh và phân tích cấu trúc của họ gen mã hóa protein vận chuyển đường sucrose ở cây đậu gà (*Cicer arietinum*)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, **194**(1), tr.133-138.
- [4] H.S. El-Beltagi, N.A. El-Senousi, Z.A. Ali, A.A. Omran (2017), "The impact of using chickpea flour and dried carp fish powder on pizza quality", *PLoS ONE*, **12**(9), pp.e0183657.
- [5] M.N. Esfahani, et al. (2014), "Mechanisms of physiological adjustment of N₂ fixation in *Cicer arietinum* L. (chickpea) during early stages of water deficit: single or multi-factor controls", *Plant J.*, **79**(6), pp.964-980.
- [6] M. Nasr Esfahani, et al. (2017), "Comparative transcriptome analysis of nodules of two *Mesorhizobium*-chickpea associations with differential symbiotic efficiency under phosphate deficiency", *Plant J.*, **91**(5), pp.911-926.
- [7] R.K. Varshney, et al. (2013), "Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement", *Nat. Biotech.*, **31**(3), pp.240-246.
- [8] D.M. Goodstein, et al. (2012), "Phytozome: A comparative platform for green plant genomics", *Nucleic Acids Res.*, **40**(Database issue), pp.D1178-D1186.
- [9] J. Thompson, et al. (1997), "The ClustalX windows interface:

flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Res.*, **25**(24), pp.4876-4882.

- [10] T.A. Hall (1999), "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, pp.95-98.
- [11] Chu Duc Ha, Le Xuan Dac, Tran Thi Thanh Huyen, Pham Thi Ly Thu (2017), "Evolutionary analysis and expression profiling of the SWEET sugar transporter gene family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *HNUE Journal of Science*, **62**(10), pp.91-99.
- [12] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33**(7), pp.1870-1874.
- [13] P. Librado, J. Rozas (2009), "DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data", *Bioinformatics*, **25**(11), pp.1451-1452.
- [14] B.S. Gaut, et al. (1996), "Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(19), pp.10274-10279.
- [15] T.L. Bailey, J. Johnson, C.E. Grant, W.S. Noble (2015), "The MEME suite", *Nucleic Acids Res.*, **43**(W1), pp.W39-W49.
- [16] H.D. Chu, et al. (2018), "Identification, structural characterization and gene expression analysis of members of the nuclear factor-Y family in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dehydration and abscisic acid treatments", *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(11), p.E3290.
- [17] G. Patil, et al. (2015), "Soybean (*Glycine max*) SWEET gene family: insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis", *BMC Genomics*, **16**, p.520.
- [18] H. Mizuno, S. Kasuga, H. Kawahigashi (2016), "The sorghum SWEET gene family: stem sucrose accumulation as revealed through transcriptome profiling", *Biotechnol. Biofuels*, **9**, p.127.
- [19] Q. Zhang, et al. (2016), "Structure, phylogeny, allelic haplotypes and expression of sucrose transporter gene families in *Saccharum*", *BMC Genomics*, **17**, p.88.
- [20] S.B. Cannon, et al. (2010), "Polyploidy did not predate the evolution of nodulation in all legumes", *PLoS ONE*, **5**(7), pp.e11630.
- [21] M. Lavin, P.S. Herendeen, M.F. Wojciechowski (2005), "Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary", *Syst. Biol.*, **54**(4), pp.575-594.
- [22] Y.H. Xuan, et al. (2013), "Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(39), pp.E3685-E3694.
- [23] H. Jian, et al. (2016), "Genome-wide analysis and expression profiling of the SUC and SWEET gene families of sucrose transporters in oilseed rape (*Brassica napus* L.)", *Front. Plant Sci.*, **7**, p.1464.

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 (^{1,2...}) 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 (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 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 ≥ 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 và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của 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 9 - September 2019

Kết quả chuyển thần kinh điều trị liệt hoàn toàn đám rối cánh tay do nhũ các rễ thần kinh.

Nguyễn Việt Ngọc, Lê Văn Đoàn, Nguyễn Văn Phú và cộng sự

Đánh giá độ chính xác của bộ xét nghiệm xác định mức độ đứt gãy ADN tinh trùng ứng dụng chẩn đoán vô sinh ở nam giới.

Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Thị Trang

Nghiên cứu tính toán thời gian chiếu xạ tối ưu cho sản xuất Iodine-125 tại Lò phản ứng hạt nhân Đà Lạt.

Đoàn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thế Nghĩa, Vũ Thanh Quang

Được động học - dược lực học của Rifampicin trong điều trị bệnh nhân lao phổi.

Lê Thị Luyến, Bùi Sơn Nhật, Vũ Đình Hòa, Nguyễn Thị Vân Anh, Nguyễn Kim Cương, Nguyễn Văn Hưng

Khảo sát tối ưu hóa điều kiện chiết xuất cao lá Nhàu (*Morinda citrifolia* L.) bằng phương pháp đáp ứng bề mặt.

Lý Hải Triều, Nguyễn Thùy Diễm Thảo, Phùng Thị Thu Hương, Trần Bá Hiếu, Lê Văn Minh

Ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện các gen VEB, DIM và AmpC của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Xanh Pôn và Bệnh viện Thanh Nhàn.

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

Nghiên cứu khả năng chịu hạn của 6 giống lúa mùa ở giai đoạn sinh dưỡng trong điều kiện hạn nhân tạo.

Lưu Hoài Nam, Nguyễn Hoài Thanh, Võ Công Thành

Xác định môi trường và kỹ thuật phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai).

Nguyễn Thị Hồng, Lê Minh Sát, Nguyễn Thị Hồng Gấm

Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống đầu dòng nấm rễ dài *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young.

Phạm Thị Thu, Nguyễn Duy Trinh, Phạm Xuân Hội

Tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành nhằm nâng cao khả năng sinh protease của chủng *Bacillus subtilis* N6 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt quy mô pilot.

Phạm Huỳnh Ninh, Vũ Minh, Nguyễn Thị Hà, Bùi Thị Hồng Chiên, Trần Quốc Tuấn

Tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá Chiên (*Bagarius yarrelli*) nuôi lồng tại Tuyên Quang và đề xuất biện pháp phòng trị.

Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hạnh, Phạm Thị Yên, Lê Thị Mỹ, Nguyễn Quang Nghĩa, Phan Thị Vân, Phạm Thị Thanh

Dự đoán cơ chế lặp của họ gen mã hóa protein vận chuyển đường sucrose ở loài đậu gà (*Cicer arietinum*).

Chu Đức Hà, Chu Thị Bích Thủy, Phạm Thị Lý Thu, Phạm Phương Thu, La Việt Hồng

1 Results of nerve transfer surgery in the treatment of total root avulsion type brachial plexus injuries.

Viet Ngoc Nguyen, Van Doan Le, Van Phu Nguyen, et al.

6 Evaluation on the accuracy of a test kit for analysing sperm DNA fragmentation in infertile men.

Minh Thu Nguyen, Thi Trang Nguyen

10 Study on calculation of optimal irradiation time for Iodine-125 production at Dalat Nuclear Reactor.

Thi Thu Hien Doan, The Nghia Nguyen, Thanh Quang Vu

15 Pharmacokinetic - pharmacodynamic properties of Rifampicin in pulmonary tuberculosis patients.

Thi Luyen Le, Son Nhat Bui, Dinh Hoa Vu, Thi Van Anh Nguyen, Kim Cuong Nguyen, Van Hung Nguyen

21 Optimisation of the extraction conditions for Noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf extract using response surface methodology.

Hai Trieu Ly, Thuy Diem Thao Nguyen, Thi Thu Huong Phung, Ba Hieu Tran, Van Minh Le

29 Applying multiplex PCR to detect VEB, DIM and AmpC genes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated at Saint Paul and Thanh Nhan Hospitals.

Thi Hong Hanh Ngo, Duy Thai Pham, Thi Van Phuong Tran, Thi Hang Hoang, Huy Hoang Tran

34 The adaptability of six seasonal rice varieties at the growth stage in artificial drought conditions.

Hoai Nam Luu, Hoai Thanh Nguyen, Cong Thanh Vo

40 Determination of the environment and techniques of isolating the *Cordyceps militaris* collected in Hoang Lien Son National Park (Lao Cai).

Thi Hong Nguyen, Minh Sat Le, Thi Hong Gam Nguyen

45 Investigation on propagation of master spawn technology of *Oudemansiella raphanipes* (Beck.) Pegler & T.W.K. Young.

Thi Thu Pham, Duy Trinh Nguyen, Xuan Hoi Pham

50 Optimisation of semi-solid-state fermentation conditions for soybean meal to improve protease production of *Bacillus subtilis* N6 by response surface methodology.

Huynh Ninh Pham, Minh Vu, Thi Ha Nguyen, Thi Hong Chien Bui, Quoc Tuan Tran

55 The causative agent of hemorrhagic disease in giant devil catfish (*Bagarius yarrelli*) in cage culture at Tuyen Quang province and proposing preventive and treatment measures.

Thi My Hanh Truong, Thi Hanh Nguyen, Thi Yen Pham, Thi May Le, Quang Nghia Nguyen, Thi Van Phan, Thi Thanh Pham

60 Prediction of the gene duplication mechanism in the genes encoding sucrose transporters in chickpea (*Cicer arietinum*).

Duc Ha Chu, Thi Bich Thuy Chu, Thi Ly Thu Pham, Phuong Thu Pham, Viet Hong La